



HAL
open science

Identifier les compromis adaptatifs des pathogènes des plantes dans le but de concevoir des stratégies de contrôle des maladies

Emâ Dorieux

► **To cite this version:**

Emâ Dorieux. Identifier les compromis adaptatifs des pathogènes des plantes dans le but de concevoir des stratégies de contrôle des maladies. [Stage] Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (UAPV), FRA. 2012, 45 p. hal-02810174

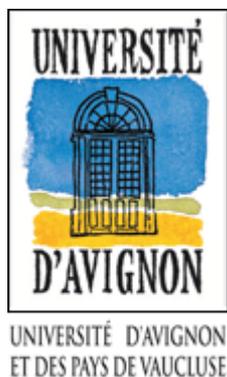
HAL Id: hal-02810174

<https://hal.inrae.fr/hal-02810174>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



MASTER AGROSCIENCES

Gestion de la Qualité des Productions Végétales

Parcours Recherche - Phytoprotection

2^{ème} année

IDENTIFIER LES COMPROMIS ADAPTATIFS DES PATHOGENES
DES PLANTES DANS LE BUT DE CONCEVOIR DES STRATEGIES
DE CONTROLE DES MALADIES

DORIEUX, Emâ

Lieu de stage :



Institut National de la Recherche Agronomique :
Unité de Pathologie Végétale

Université de Montpellier 2 :
UMR 5119 Ecosym

Encadrement :

Maître de Stage : Cindy Morris
Marc Bardin
Thierry Bouvier

Année Universitaire 2011 - 2012



Identifier les compromis adaptatifs des pathogènes des plantes dans le but de concevoir des stratégies de contrôle des maladies de DORIEUX Emâ est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 3.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/).

Emâ Dorieux, 2012

INRA PACA, site d'Avignon – UR 407 Pathologie Végétale
UM2 – UMR 5119 Ecosym
Stage M2 Gestion de la Qualité des Productions Végétales, Recherche - Phytoprotection, Université
d'Avignon et des pays du Vaucluse

Identifier les compromis adaptatifs des pathogènes des plantes dans le but de concevoir des stratégies de contrôle des maladies

Résumé

Les milieux de vie des organismes sont des systèmes complexes qui varient au cours du temps et de l'espace entraînant ces organismes à évoluer et procéder à des compromis quant à leur adaptation. L'étude des agents pathogènes des plantes était auparavant focalisée sur l'étude du cycle de vie de l'organisme sur la plante hôte cultivée. De récentes études ont mis en évidence que les microorganismes et notamment les pathogènes effectuent une grande part de leur histoire de vie en dehors de la plante hôte et que ce nouvel habitat influence leurs traits de vie et en particulier le lien à la plante. L'objectif de mon stage était de mettre en évidence les compromis adaptatifs de deux agents pathogènes des plantes majeurs que sont *Pseudomonas syringae* et *Botrytis cinerea* à partir de souches issues d'habitats non agricole et de souches issues d'habitats agricole, dans le but de concevoir des stratégies de lutte utilisables en agriculture.

Ces résultats suggèrent que l'origine et donc l'habitat différencie les microorganismes et qu'il existe bien des compromis adaptatifs ; par exemple les populations de *B. cinerea* qui produisent le plus de sclérotés sporulent moins que les autres. La compréhension de l'importance des habitats alternatifs sur l'histoire de vie des agents pathogènes est essentiel et permettra de saisir la façon dont les agents pathogènes survivent en absence d'hôtes, comment et où de nouveaux pathotypes sont susceptibles d'émerger, et participent aux épidémies agricoles.

Mots-clés : Compromis adaptatifs, *Pseudomonas syringae*, *Botrytis cinerea*, évolution, stress nutritif, stress salin.

Identifying adaptive trade-offs in plant pathogens as a means of conceiving disease control strategies

Abstract

The habitats of living organisms are complex systems that vary over time and space causing these organisms to evolve and make compromises, otherwise known as adaptation. The study of plant pathogens was previously focused on the study of the life cycle on the cultivated host plant. Recent studies have shown that microorganisms including pathogens endure a large part of their life history outside of the host plant environment and the conditions of the new habitat influence their life and especially their relation with the plant. The objective of my internship was to elucidate trade-offs for two major plant pathogens, *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea*, by using strains isolated from agricultural and non-agricultural habitats. In the long term this type of approach can lead to new ideas for disease control strategies used in agriculture based on the major weakness of the pathogens. These results suggest that the origin and habitat of microorganisms lead to different traits and forms of trade-off ; for example populations of *B. cinerea* that produce more sclerotia sporulate less than others. Understanding the importance of alternative habitats on the life history of pathogens is essential and will capture how pathogens survive in the absence of hosts, how and where new pathotypes are likely to emerge, and can be involved in agricultural epidemics.

KeyWords : Trade-offs, *Pseudomonas syringae*, *Botrytis cinerea*, evolution, nutrient stress, salt stress.

Remerciements

Je remercie particulièrement Cindy et Marc pour m'avoir confié un sujet si passionnant. Merci de m'avoir permis d'apprendre tout ça et de m'avoir permis de m'approprier mon sujet.

Merci à Thierry et Corinne pour mon bref et si conséquent séjour à Montpellier.

Un grand merci à Charlotte, Caroline, Claire et Magalie pour m'avoir accompagné chaque jour.

Merci à Odile pour tes commentaires si justes.

Merci à vous tous pour les bons moments du repas de midi.

Merci à toute l'équipe Mistral et à toutes les personnes de « Patho ».

Merci aux fantômes du labo Bactério qui nous ont tenu compagnie à Claudia et moi les soirs de Juillet.

Merci à Claudia pour tes encouragements et ton exemple de ténacité !

Merci à vous tous pour votre gentillesse, votre patience et votre écoute.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cité mais qui se reconnaîtront.

Merci à tous de m'avoir fait participer à ce monde si grand et passionnant qu'est la recherche.

Et merci à mon chéri qui m'a entourée et soutenue chaque fois que c'était nécessaire et même plus.

Liste des figures, tableaux et annexes

Figures :

Figure 1 : Bactérie *Pseudomonas syringae* vue au microscope électronique.

Figure 2 : Symptômes causés par l'agent pathogène *Pseudomonas syringae* sur différents hôtes.

Figure 3 : Cycle de maladie du chancre et de la gommose des fruits à noyaux causée par *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*.

Figure 4 : Cycle de vie hypothétique de *P. syringae*.

Figure 5 : Symptômes causés par l'agent pathogène *Botrytis cinerea* sur différents hôtes.

Figure 6 : Cycle de développement (production asexuée) de *Botrytis cinerea* sur différentes cultures.

Figure 7 : Mesure d'agressivité de *Pseudomonas syringae* sur plantule de melon.

Figure 8 : Exemple de résultats de dénombrement obtenu par la méthode de dilution et inclinaison de la boîte de Pétri.

Figure 9 : Appareil de mesure automatique de l'absorbance de suspensions cellulaires et les microplaques de 96 puits nécessaires.

Figure 10 : Numérotation des feuilles du plant de tomate.

Figure 11 : Exemples de développement mycélien de *Botrytis cinerea* sur milieu Potato Dextrose Agar en boîte de Pétri.

Figure 12 : Exemples de sclérotés de *Botrytis cinerea* obtenus sur milieu Potato Dextrose Agar en boîte de Pétri.

Figure 13 : Informations génomiques de *P. syringae* en fonction des souches.

Figure 14 : Cinétique de croissance de *P. syringae*.

Figure 15 : Exemple de courbe de croissance de *P. syringae* en milieu de type bouillon nutritif.

Figure 16 : Exemple de courbes obtenues par automatisation au Fluostar.

Figure 17 : Agressivité de *P. syringae* sur plantule de melon au stade deux cotylédons.

Figure 18 : Comparaison de la concentration de cellules de *Pseudomonas syringae* entre le milieu témoin (violet) et le milieu salé (jaune). Cette comparaison est effectuée au début de la courbe de croissance à 18 ou 24h selon les souches.

Figure 19 : Ecart de croissance cellulaire de *Pseudomonas syringae* dans un milieu salé et un milieu témoin.

Figure 20 : Exemple de cultures bactériennes de *P. syringae*.

Figure 21 : Cinétique de croissance de *P. syringae* en milieu oligotrophe et comparaison des milieux nutritif et oligotrophe.

Figure 22 : Exemple de courbe de croissance mycélienne de *B. cinerea*.

Figure 23 : Cinétiques de croissance de *B. cinerea*, moyenne des deux tests.

Figure 24 : Corrélations des paramètres de cinétique de croissance mycélienne de *B. cinerea*.

Figure 25 : Corrélation de l'agressivité sur tomate et de la vitesse radiale de *B. cinerea*.

Figure 26 : Evaluation de la sporulation de *B. cinerea*

Figure 27 : Corrélation du nombre de spores produites par ml et le nombre de spores produites par boîtes et par jours de sporulation de *B. cinerea*.

Figure 28 : Evaluation du nombre de sclérotés produits par *B. cinerea*.

Figure 29 : Corrélation du nombre de sclérotés et du nombre de spores par ml produits par *B. cinerea*.

Figure 30 : Corrélations de la croissance mycélienne de *B. cinerea* en conditions de stress.

Tableaux :

Tableau 1 : Présentation des souches de *Pseudomonas syringae*

Tableau 2 : Présentation des souches de *Botrytis cinerea*

Tableau 3 : Résultats des analyses de corrélation des informations génomiques

Tableau 4 : Résultats des analyses statistiques des données d'AUGPC de cinétique de croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*.

Tableau 5 : Résultats des analyses statistiques des données de vitesse de croissance radiale de mycélium de *Botrytis cinerea*.

Tableau 6 : Résultats des analyses statistiques des données de diamètre à 3 jours de mycélium de *Botrytis cinerea*.

Annexes :

Annexe I : Composition des milieux

Annexe II, A : Complément graphique de l'analyse de corrélation entre la production de spores par ml et l'AUGPC de la croissance mycélienne de *B. cinerea*.

Annexe II, B : Complément graphique de l'analyse de corrélation entre la production de spores par ml et l'indice d'agressivité sur tomate.

Sommaire

<i>Remerciements</i>	1
<i>Liste des figures, tableaux et annexes</i>	4
<i>Sommaire</i>	6
<i>Introduction</i>	8
I Introduction générale	8
II Synthèse bibliographique	10
II.1 <i>Pseudomonas syringae</i>	10
II.2 <i>Botrytis cinerea</i>	14
<i>Matériels et Méthodes</i>	18
I Matériel microbien	18
I.1. <i>Pseudomonas syringae</i>	18
I.2. <i>Botrytis cinerea</i>	19
II Evaluation phénotypique du pouvoir pathogène de <i>P. syringae</i> sur melon	20
III Cinétique de croissance bactérienne en milieu riche	21
III.1 Durée d'incubation pour une multiplication par un facteur de 10	21
III.2. Courbes de croissance automatisées	21
IV Evaluation phénotypique du pouvoir pathogène de <i>Botrytis cinerea</i> sur tomate	22
V Cinétique de croissance mycélienne sur milieu riche	22
VI Evaluation de la sporulation de <i>Botrytis cinerea</i> sur milieu riche	23
VII Formation de sclérotés de <i>Botrytis cinerea</i>	23
VIII Culture microbienne en conditions de stress	23
VIII.1 Croissance bactérienne	23
VIII.2 Croissance mycélienne sur milieu pauvre et température basse	24
IX Analyse des données	25
<i>Résultats et discussion</i>	26
I <i>Pseudomonas syringae</i>	26
I.1 Génomique	26
I.2 Cinétiques de croissance bactérienne en milieu riche	27
I.3 Evaluation phénotypique du pouvoir pathogène de <i>P. syringae</i> sur melon.....	29
I.4 Croissance bactérienne en milieu salé.....	30
I.5 Milieu oligotrophe.....	31
II. <i>Botrytis cinerea</i>	32
II.1 Cinétique de croissance mycélienne sur milieu riche	32

II.2 Evaluation de la sporulation de <i>Botrytis cinerea</i> sur milieu riche	35
II.3 Formation de sclérotés de <i>Botrytis cinerea</i>	37
II.4 Croissance mycélienne en conditions de stress.....	37
<i>Conclusion</i>	39
<i>Bibliographie</i>	41
<i>Annexes</i>	44
Annexe I : Composition des milieux	44
Annexe II : Compléments graphiques	45

Introduction

I Introduction générale

Les milieux de vie des organismes vivants sont des systèmes complexes qui varient au cours du temps et de l'espace. Cette variabilité de l'environnement est à l'origine de nombreuses stratégies adaptatives et de traits d'histoire de vie particuliers chez ces organismes afin de pouvoir s'adapter et survivre (Meyers and Bull, 2002 ; Issartel, 2007). La stratégie adaptative admet une relation entre l'énergie disponible et les possibilités de son allocation au sein du système vivant. Ce qui entraîne donc un choix soumis aux contraintes de l'environnement, c'est la pression de sélection (Roux *et al.*, 1997), ne survivent que ceux qui sont adaptés. Il existe toutefois une certaine plasticité adaptative qui permet la pérennité des êtres vivants en abaissant la pression de sélection (vulnérabilité) au niveau de l'individu et donc de la population. On parle plutôt de compromis adaptatifs car la stratégie adaptative inclut le concept de sélection naturelle (Roux *et al.*, 1997).

Jusqu'à présent l'étude des agents responsables des maladies des plantes cultivées n'était centrée que sur leur cycle de vie en lien direct avec le végétal, en excluant les étapes hors du milieu agricole (Morris *et al.*, 2007). Or de nombreux agents pathogènes des plantes ne sont pas des parasites obligatoires. Une meilleure compréhension de la vie saprophyte d'agents pathogènes humains dans des habitats divers a permis de nombreux progrès dans le domaine médical. et en particulier la manière dont leur adaptation aux contraintes peut influencer leurs capacités pathogènes (Alizon, 2008). Un rapport de « American Academy of Microbiology » indique que l'adaptation des pathogènes humains à un hôte non humain peut conférer la virulence, par exemple *Legionella pneumophila* ou *Vibrio cholerae* utilisent des mécanismes d'adaptations qui contribuent à leur virulence chez l'humain (Cangelosi *et al.*, 2004). On peut donc penser que le même phénomène existe chez les pathogènes des plantes et que la survie dans d'autres types d'habitats peut avoir un impact sur la virulence vis-à-vis des plantes et en particulier pour les organismes saprophytes.

Morris *et al.* (2007) suggèrent l'importance potentielle des habitats non agricoles notamment dans le cycle de vie de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae*. En effet Morris *et al.* (2007) ont mis en évidence que les souches de *P. syringae* issues de zones non agricoles possédaient des compétences similaires aux souches isolées d'épidémies, soulignant donc l'importance des échanges entre le système agricole et l'environnement. Par exemple des souches de *P. syringae* sont présentes dans des cours d'eau issus de la fonte de neige et possèdent l'agressivité nécessaire pour causer la bactériose chez le melon ainsi que d'autres espèces végétales, par exemple. Les niches non agricoles auraient donc un rôle dans l'évolution de la maladie comme source d'inoculum ou indirectement comme réservoir de diversité phénotypique et génotypique (Morris *et al.*, 2007). Morris *et al.* (2009) montrent notamment que de nombreux caractères de virulence ont une deuxième fonction en habitat non agricole facilitant la survie et la croissance de divers agents phytopathogènes.

Une vision plus globale de l'histoire de vie des agents pathogènes des plantes permettrait de mieux comprendre et d'anticiper les évolutions de ces organismes et les événements mis en jeu dans leur pouvoir pathogène et notamment son coût en lien avec leur capacité reproductive. En effet la production de toutes les enzymes de dégradation nécessaires à l'infection représente une allocation d'énergie importante pour ces organismes. Cela permettrait ainsi d'améliorer la gestion et la protection des cultures en augmentant la prévision des conditions qui favorisent l'émergence de nouveaux pathogènes (Morris *et al.*, 2009).

Dans un tel contexte agronomique de changement avec la réduction d'utilisation de produits phytosanitaires prévue par le plan Ecophyto 2018 (Grenelle de l'Environnement), avec le retrait de molécules chimiques jugées trop dangereuses ou bien la quasi inexistence de méthodes de contrôle possibles, il semble indispensable de comprendre davantage les paramètres qui influencent le pouvoir pathogène de ces microorganismes et qui nous permettront de dépasser leur capacité adaptative à nos moyens de lutte.

Dans ce contexte les objectifs de mon stage étaient d'évaluer l'interrelation des différents traits de fitness de deux agents pathogènes des plantes, *Pseudomonas syringae* et *Botrytis cinerea*, et d'identifier les compromis adaptatifs qui sont évocateurs de leurs limites adaptatives.

Durant mon stage, j'ai exploré les compromis adaptatifs pour deux agents phytopathogènes : *Pseudomonas syringae* et *Botrytis cinerea*. Ces agents sont responsables de maladies de grande importance économique ; *Botrytis cinerea* est un des principaux agents pathogènes de la partie aérienne de la tomate en France (INRA, Ecophyto R&D, 2009). C'est un champignon ascomycète considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (Ajouz, 2009 ; Martinez *et al.*, 2005) et capable d'attaquer plus de 200 espèces végétales. Quant à la bactérie *P. syringae* elle est responsable de l'épidémie de bactériose du melon dans le sud-est de la France qui causa d'énormes pertes, 80% de la récolte (Morris *et al.*, 2000) et plus actuellement des épidémies sur le kiwi en France et en Italie (Vanneste *et al.*, 2011 ; Scortichini, 2010). Ce sont des agents pathogènes des parties aériennes des plantes dans les conditions environnementales fraîches et humides et qui possèdent ainsi une écologie proche.

Le but de ce travail était de mettre en évidence des paramètres résultant de compromis adaptatif afin de concevoir des stratégies utilisables en agriculture pour contrôler les maladies en réduisant les populations de pathogènes et ou en favorisant les populations non pathogènes.

Chez beaucoup d'agents phytopathogènes (bactéries ou champignons), la persistance dans l'environnement de souches non pathogènes sur les plantes a été décrite. L'avantage écologique pour le micro-organisme et les conditions qui favorisent la persistance de ces souches ne sont généralement pas connus. Les travaux que nous proposons de réaliser ambitionnent d'acquérir des connaissances

concernant les liens éventuels entre l'évolution du cout adaptatif (dont le pouvoir pathogène) et l'adaptation des souches de *B. cinerea* et *P. syringae* à des conditions environnementales diverses, et d'identifier les conditions qui favorisent la survie et le développement de souches peu agressives de l'agent pathogène. A terme ce projet vise à exploiter ces connaissances pour concevoir des dispositifs de culture et des pratiques culturales qui limiteront la capacité des populations agressives de cet agent pathogène à dominer la flore microbienne des plantes cultivées ou qui favoriseront le développement de populations peu agressives.

J'ai ainsi réalisé mon stage d'une part dans l'Unité de Pathologie Végétale et plus précisément dans l'équipe Mistral, sous la direction de Cindy MORRIS et Marc BARDIN, et d'autre part dans l'Unité d'Ecologie des Systèmes Marins Côtiers (ECOSYM) sous la direction de Thierry BOUVIER.

Située sur le site d'Avignon, l'Unité de Pathologie Végétale appartient au Centre de Recherche PACA de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA). L'INRA PACA est parmi les cinq plus grands centres INRA de France avec un budget de 54 millions d'euros.

Située sur le campus de l'Université Montpellier II, ECOSYM est une Unité Mixte de Recherche regroupant les Universités Montpellier I et II (UM1 et 2), le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer).

L'unité de recherche de Pathologie végétale de l'INRA possède une collection unique de 7000 souches de *Pseudomonas syringae* et de plus de 4000 souches de *Botrytis cinerea* issues de plantes cultivées, de plantes sauvages et de milieux non agricoles. Parmi celles-ci j'ai travaillé sur environ 50 souches de chaque agent pathogène provenant pour la moitié de plantes cultivées et pour l'autre moitié de divers milieux. De plus l'équipe détient des connaissances et des savoir-faire accumulés depuis de nombreuses années, me fournissant ainsi l'environnement idéal pour ce projet.

II Synthèse bibliographique

II.1 *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae est une bactérie phytopathogène appartenant à la sous-classe des Protéobactéries, à la famille des Pseudomonadacées et au genre *Pseudomonas* crée par Migula en 1894. C'est une bactérie à Gram négatif, aérobie stricte, chimio-hétérotrophe et qui ne possède pas de cytochrome C oxydase. Elle n'accumule pas le poly- β -hydroxybutyrate et produit sur milieu KB un pigment jaune verdâtre et fluorescent sous UV appelé pyoverdine.

Elle se caractérise par une forme en bâtonnet (Figure 1) qui peut être mobile avec 1 à 3 flagelles polaires.

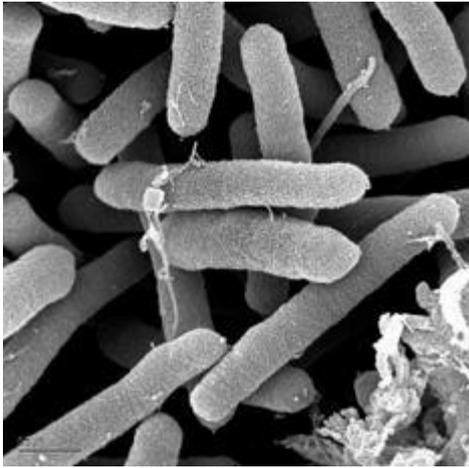


Figure 1 : Bactérie *Pseudomonas syringae* vue au microscope électronique. Photo : Gordon Vrdoljak, Electron Microscopy Laboratory, U.C. Berkeley

Elle possède un chromosome. Certaines souches possèdent aussi un plasmide dont le poids moléculaire peut être variable (Gaignard et Luisetti, 1993).

Cette espèce est actuellement divisée en 56 pathovars (Bradbury, 1986 ; Young, 2010). Certains pathovars sont spécifiques d'une espèce végétale particulière comme par exemple *Pseudomonas syringae* *pv persicae* sur pêcher alors que d'autres ne le sont pas comme *P. syringae* *pv syringae* qui a été isolée de 177 espèces végétales différentes (Gaignard et Luisetti, 1993).

Les symptômes provoqués par la bactérie (Figure 2) ne sont caractéristiques qu'au début de l'infection avec un aspect huileux des tissus gorgés d'eau et se confondent rapidement avec d'autres dégâts ayant des origines diverses (Gaignard et Luisetti, 1993).

L'aptitude épiphyte est caractérisée par la capacité de la bactérie à vivre et effectuer son cycle complet à la surface des organes des plantes cultivées et adventices sans provoquer de symptômes ni causer d'infection (Crosse, 1959 ; English et Davis, 1960 ; Hirano et Upper, 1983). L'abondance de la population épiphyte est importante pour l'initiation de l'infection (Hirano et Upper, 1990). Lorsque les conditions sont favorables, elle pénètre par les stomates et les blessures pour amorcer la phase parasitaire (Figure 2).

Le cycle de vie de *P. syringae* était auparavant décrit comme la succession de la phase épiphyte et parasitaire (Figure 3) mais Morris *et al.* (2008) ont proposé une autre vision de ce cycle de vie en liaison directe avec le cycle de l'eau (Figure 4). La répartition de *P. syringae* dans l'environnement est très diverse ; elle est présente en zone agricole où elle cause de gros dommages, mais aussi en phase épiphyte (dans la phyllosphère) sur les débris végétaux de plantes hôtes, le sol, les plantes adventices ou les semences. Elle peut être transportée dans les airs en aérosol lors de la phase épiphyte (Morris *et al.*, 2007) et ensuite ramenée au sol avec la pluie (Constantinidou *et al.*, 1990). Morris *et al.* (2004) ont suggéré qu'ils pourraient avoir un rôle dans les précipitations grâce à son activité glaçogène qui leur confère de plus une résistance aux dégâts du gel.

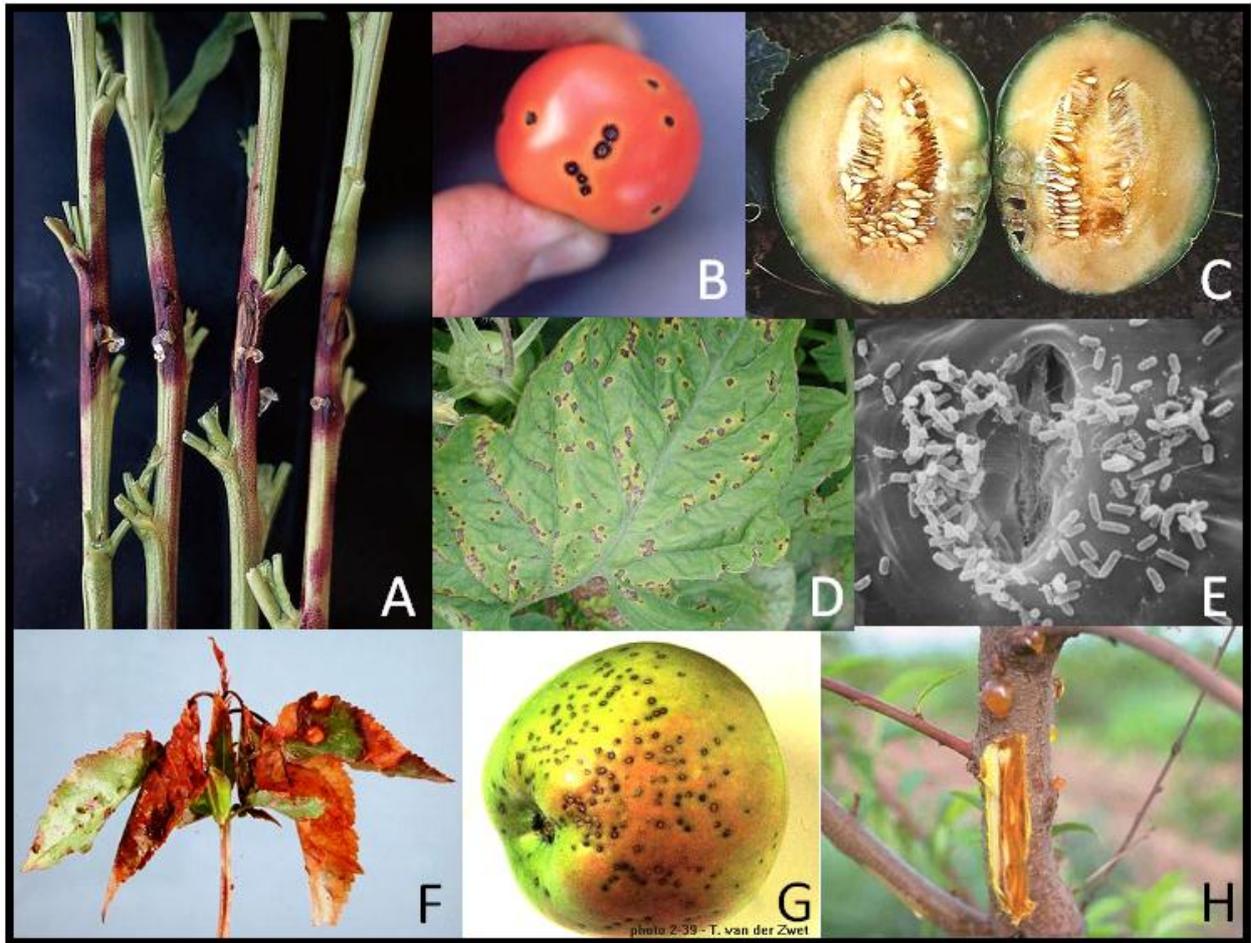


Figure 2 : Symptômes causés par l'agent pathogène *Pseudomonas syringae* sur différents hôtes.

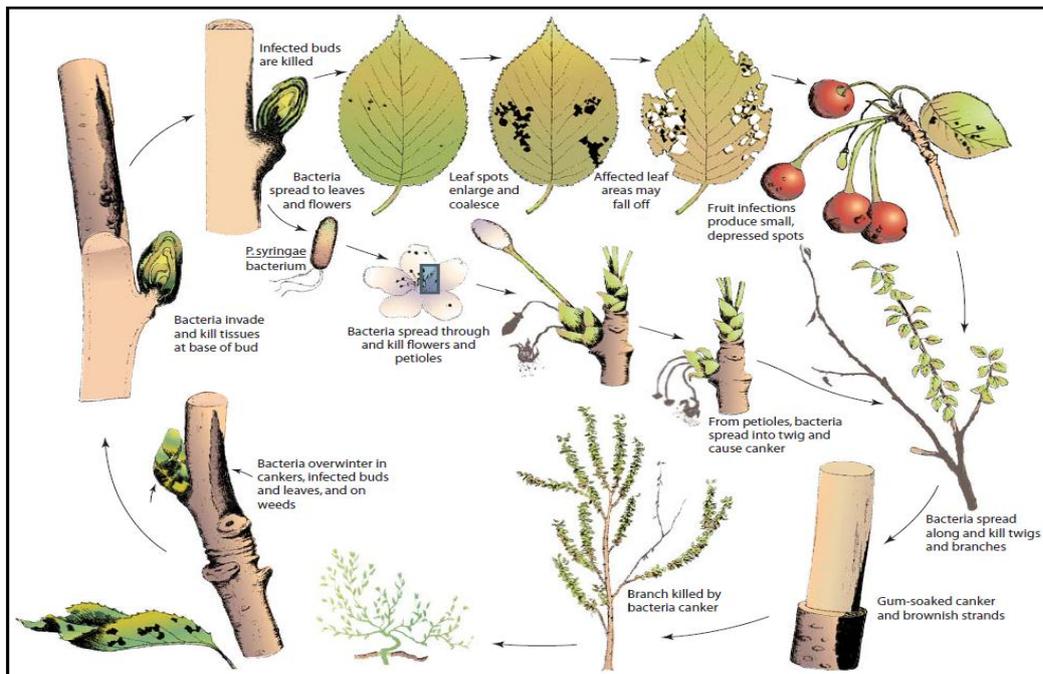


Figure 3 : Cycle de maladie du chancre et de la gommose des fruits à noyaux causée par *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (d'après Agrios, 2005).

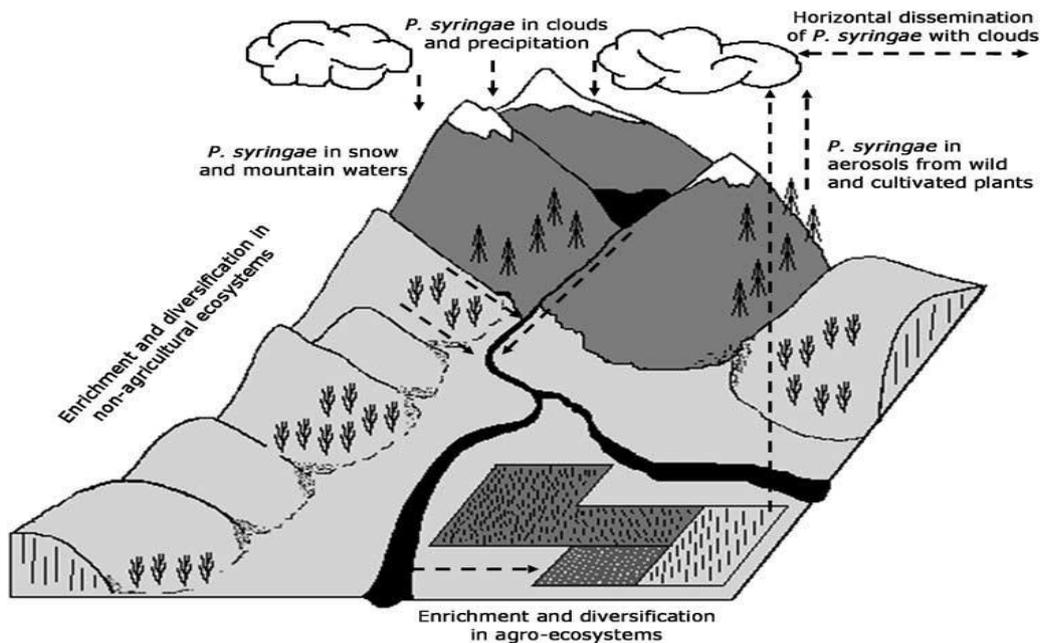


Figure 4 : Cycle de vie hypothétique de *P. syringae* (d'après Morris et al., 2008). Les bactéries présentes dans les nuages sont nettoyées de l'atmosphère par la pluie et la neige. La fonte de la neige et la pluie contenant *P. syringae* alimentent les lacs et les cours d'eau. Ces eaux peuvent être des habitats pour la bactérie, dans l'eau libre ou dans les biofilms épilithiques. Ils sont aussi des vecteurs de diffusion. Ces différentes niches abritant *P. syringae* (plantes sauvages, neige, eau et biofilms épilithiques) offrent différentes pressions de sélection qui devraient avoir des effets différents sur la population de *P. syringae* suivant les biotypes. Certaines de ces niches pourraient contribuer à la diminution de certains biotypes de *P. syringae*, tandis que d'autres pourraient favoriser la multiplication. L'utilisation des eaux du fleuve pour l'irrigation transporte *P. syringae* aux plantes cultivées et aux équipements agricoles. *P. syringae* entrera également en contact avec les plantes cultivées par la pluie, par l'intermédiaire de systèmes d'irrigation basés sur la collecte des eaux de pluie ou par l'intermédiaire de la diffusion aérienne. Certains biotypes de *P. syringae* pourraient être mieux adaptés que d'autres aux contraintes rencontrées dans les systèmes agricoles. *P. syringae* en phase épiphyte sur les plantes (sauvages ou cultivées) est « vaporisé » en aérosols et transporté vers les nuages dans lesquels il pourrait être transporté horizontalement.

Cet élément permettrait à la bactérie de coloniser une large gamme de substrats non agricoles et de trouver des niches écologiques dans lesquelles elle peut survivre. Sands *et al.* (1982) et Amato *et al.* (2007) ont montré sa présence dans les nuages, Morris et collaborateurs (Riffaud et Morris, 2002 ; Morris *et al.*, 2010) l'ont mise en évidence dans l'eau des lacs. Morris *et al.* (2007) ont montré que *P. syringae* était présente dans des biofilms épilithiques (surfaces des rochers) de rivières situées en dehors des zones agricoles et en amont par rapport au cycle de l'eau, dans des réservoirs alpins tels que la neige ou les torrents. Tout ceci suggère donc que *P. syringae* possède une grande capacité de dissémination en relation avec le cycle de l'eau et donc une grande capacité d'adaptation à différents habitats.

Le pouvoir pathogène s'exprime de deux façons : par la production de protéines effectrices qui modulent les fonctions de la plante hôte et sont transmises grâce au système de sécrétion de type III (He *et al.*, 2004 ; Troisfontaines et Cornelis, 2005). Ces protéines ont pour action de désarmer les systèmes de défense des plantes. Ainsi que par l'émission d'autres types de molécules telles que des exopolysaccharides (Rudolph et Sonneberg, 1997), des phytotoxines (Gross et Cody 1985; Gross 1991) telle que la syringomycine (de Vay *et al.*, 1968), des phytohormones et ainsi que de nombreuses enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (ou végétale).

Le pouvoir glaçogène de *Pseudomonas syringae* provient d'une protéine de la membrane externe qui oriente les molécules d'eau pour former un noyau de glace (Wolber *et al.*, 1986). Le noyau entraîne la rupture de la surfusion de l'eau et donc la prise en glace de l'eau libre environnante. Les bactéries en phase épiphyte sont responsables de nombreux dégâts non seulement par l'éclatement physique des cellules mais aussi par l'ouverture que cela génère et qui permet l'entrée de bactéries pathogènes dans la plantes. La cristallisation débute à l'extérieur de l'organe végétal et colonise le tissu interne par les stomates et les blessures faisant geler l'intérieur de la plante (Burke *et al.*, 1976). Cela entraîne la mort de l'organe (Gaignard et Luisetti, 1993) ou seulement une nouvelle ouverture pour des populations pathogènes (Lindow *et al.*, 1983).

Les moyens de lutte contre *Pseudomonas syringae* sont peu nombreux et généralement peu efficaces. En plus des méthodes prophylactiques de gestion des hôtes, du sol et du matériel agricole, le cuivre est utilisé comme bactéricide puisqu'à forte dose il inhibe la croissance bactérienne. Il entraîne cependant des détériorations du sol et notamment de l'équilibre microbien. Les antibiotiques tels que tétracycline, streptomycine ou gentamicine se révèlent peu efficaces aux Etats-Unis où ils sont autorisés (McManus *et al.*, 2002). Les méthodes biologiques semblent plus prometteuses, basées sur des mécanismes de compétitions et d'antagonisme entre les microorganismes, elles préservent l'environnement de la plante, l'utilisateur et le consommateur. Par exemple, aux Etats-Unis une souche de *P. fluorescens* non glaçogène est utilisée en lyophilisat pour protéger les fraisiers contre les dégâts du gel (Lindow et Brandl, 2003).

II.2 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers. est un champignon phytopathogène appartenant à la division des Deutéromycète et responsable de la pourriture grise (Gray mould). Il est de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae. Il existe sous forme parfaite (reproduction sexuée) en laboratoire et appartient à la division des Ascomycètes (*Botryotinia fuckeliana*), de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae. Ce champignon ubiquiste, polyphage et nécrotrophe possède une large gamme d'hôtes, de 200 à 230 espèces (van Kan, 2006 ; Williamson *et al.*, 2007 ; Jarvis, 1980) et cause des maladies de très grande importance économique (Gullino, 1992). Les pertes mondiales dues à *B. cinerea* sur vigne sont estimées à 2 milliards \$ par an (Elmer et Michailides, 2004). En France, les pertes estimées pour la vigne correspondent à 15-40% des récoltes selon les conditions climatiques (Cilindre *et al.*, 2007). Les coûts financiers par l'utilisation de fongicides sont très importants et le marché mondial des produits de contrôle de *B. cinerea* est estimé à 15-25 millions de dollars par an (Elad et Stewart, 2004).

Les symptômes de la maladie s'expriment sur tous les organes aériens et à tous les stades de développement de la plante (Figure 5). Les feuilles présentent des taches circulaires brun clair qui évoluent rapidement jusqu'à couvrir toute la feuille et atteindre la tige. Des chancres bruns aux contours bien délimités se forment sur la tige généralement à partir de blessures de taille, entraînant le dépérissement de l'organe et la mort de la plante. Par exemple, sur les fruits de tomates, des cercles blanchâtres appelés « tâches fantômes » se dessinent et une pourriture molle peut apparaître (Blancard, 2009). L'ensemble des tissus touchés se couvre d'une dense moisissure grise caractéristique comportant les particules de dissémination du pathogène : les conidies.



Figure 5 : Symptômes causés par l'agent pathogène *Botrytis cinerea* sur différents hôtes.

Le cycle de vie classiquement décrit chez *B. cinerea* est lié à son interaction avec sa plante hôte (Figure 6). Mais des études exploratoires réalisées ces dernières années au laboratoire de Pathologie Végétale d'Avignon ont permis d'isoler ce champignon dans des habitats non agricoles comme de la neige, des précipitations et des plantes sauvages asymptomatiques (Bardin *et al.*, 2012). *Botrytis cinerea* a également été isolé dans des nuages (Amato *et al.*, 2007) et il peut survivre dans le sol (Jarvis, 1977). Ces résultats suggèrent que ce champignon a une vie saprophytique mais l'importance de cette phase dans son cycle de vie n'est pas connue.

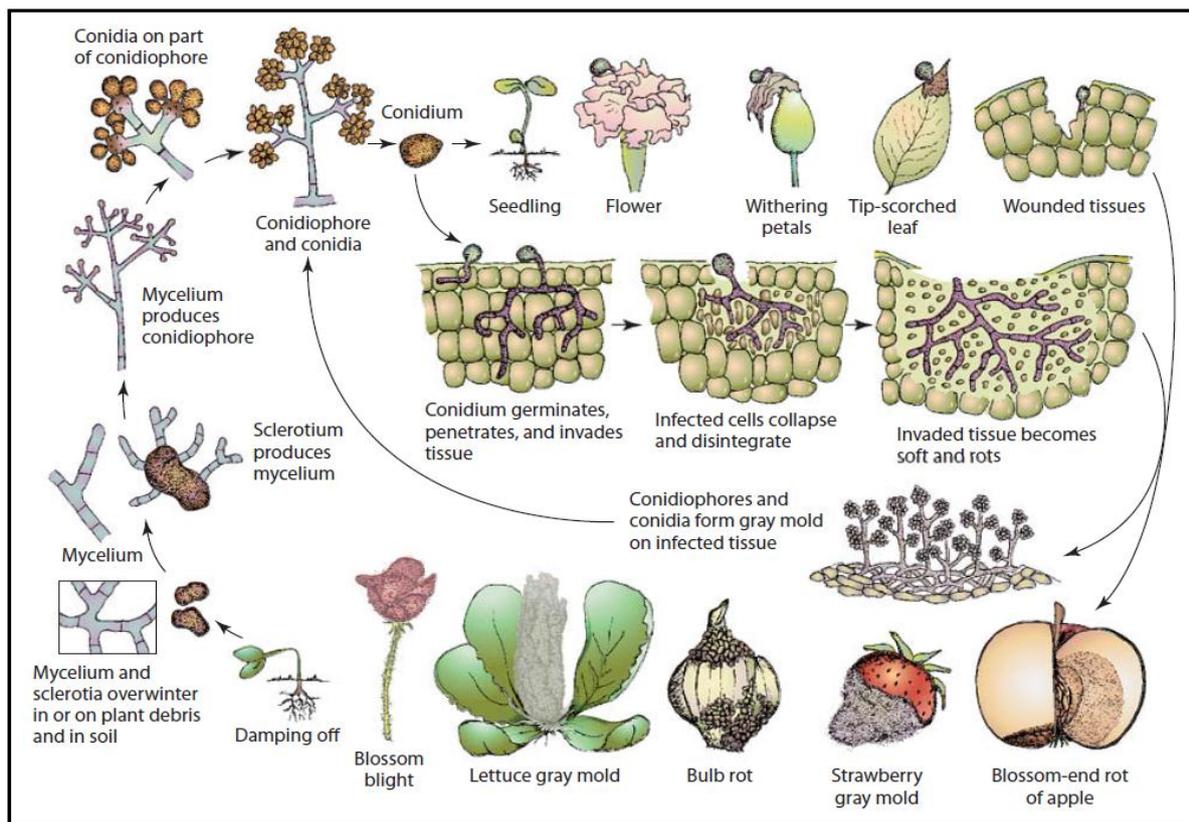


Figure 6 : Cycle de développement (production asexuée) de *Botrytis cinerea* sur différentes cultures (d'après Agrios, 2005).

Son cycle de vie est rythmé par trois formes dépendantes des conditions : le mycélium, les conidies et les sclérotés. La spore ou l'inoculum primaire apporté par le vent germe et pénètre dans le tissu végétal, généralement par une blessure ou une ouverture naturelle. Une pénétration directe à travers la cuticule de la plante a également été décrite mais elle est probablement plus rare. Le mycélium colonise alors le tissu en hydrolysant les composés peptidiques. Si les conditions sont favorables, il fructifie pour donner naissance aux conidiophores qui produisent les conidies. Celles-ci forment le feutrage gris facilement identifiable (Figure 5) et assurent l'importante dissémination de l'agent pathogène. En conditions défavorables, des sclérotés formés par des amas mycéliens durcis apparaissent. Ils pourront ensuite germer lorsque les conditions redeviendront favorables et ré-initier un cycle. Une phase sexuée avec production d'ascospores dans des ascocarpes a également été décrite en laboratoire mais elle n'a jamais été détectée dans la nature. Cependant une étude de la recombinaison génétique des populations suggère que le phénomène est plus courant que ce que les scientifiques supposaient (Vaczy *et al.*, 2008 ; Fournier et Giraud, 2008). L'humidité relative avoisinant les 95% et une température comprise entre 17 et 23°C sont particulièrement favorables à son développement (Blancard, 2009).

Les populations de *B. cinerea* sont constituées de souches dont le pouvoir pathogène est très variable. L'existence de souches hypo-virulentes dans les populations naturelles de ce champignon (Castro *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2007) suggère qu'elles ont un avantage sélectif dans des conditions particulières. D'autre part, Walker *et al.* (2011) ont mis en évidence l'existence de deux sous-groupes à l'intérieur de l'espèce *B. cinerea* : les *B. cinerea* « vrais » et les *B. pseudocinerea*.

Les méthodes de lutte sont principalement chimiques et prophylactiques, il n'existe pas de variétés commercialisées résistantes à *B. cinerea* (Dik et Wubben, 2004). Il existe cependant d'importantes différences de sensibilité chez les plantes. Chez la tomate, des sources de résistances ont été mises en évidence dans des espèces apparentées de la tomate et sont actuellement exploitées par les sélectionneurs (Finkers *et al.*, 2008 ; Blancard, 2009). De nombreux agents de lutte biologique ont été décrits, tels que la chitine, le bicarbonate de sodium, des extraits de plantes ou encore des agents microbiens. Actuellement, aucune des méthodes de lutte disponibles ne permet de garantir une efficacité totale contre *B. cinerea* dans la protection des cultures.

Matériels et Méthodes

I Matériel microbien

La composition des milieux de culture est donnée en Annexe I.

I.1. *Pseudomonas syringae*

Cinquante souches de la collection de *P. syringae* de l'UR de Pathologie Végétale ont été utilisées (Tableau 1). La moitié des souches ont été isolées de plantes cultivées et l'autre moitié d'origines diverses. Les souches ont été aussi choisies pour représenter une gamme d'agressivité sur plantes. Les souches sont conservées à long terme en cryotubes de 1,5 ml contenant un milieu glycerolé et placées à -80°C. A court terme, les souches sont conservées en tampon phosphate et placées à 4°C (Annexe I). Lors de l'utilisation des souches, la pointe d'une öse est trempée et étalée sur une boîte de Pétri garnie de milieu B de King (KB ; Annexe I), 2 à 3 jours avant inoculation. Les boîtes sont ensuite placées en chambre de culture à 25°C et à l'obscurité.

Les données concernant le génome de *P. syringae* ont été obtenues sur la plateforme JGI (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/er/main.cgi>) où sont déposées les séquences génomiques de 13 souches de *Pseudomonas syringae* d'origine non agricole et de 23 souches d'origine agricole réalisés préalablement à mon stage.

Tableau 1 : Présentation des souches de *Pseudomonas syringae*

Non Agricole				Agricole			
Nom	Génome séquencé	Origine spécifique	Groupe génomique	Nom	Génome séquencé	Origine spécifique	Groupe génomique
CC1524	Oui	Eau	CC1524	TA-043	Oui	Adventice	TA-002
CC1417	Oui	Biofilm	CC1524	CC1466	Oui	Adventice	TA-002
CC1582	Oui	Biofilm	TA-002	CC1630	Oui	Adventice	GR-1
CC1557	Oui	Neige	TA-002	JD20_actinidiae	Oui	Culture	GR-1
CC1583	Oui	Biofilm	TA-002	JD24_lachrymans	Oui	Culture	GR-1
UB246	Oui	Eau	UB-246	JD22_morsprunorum	Oui	Culture	GR-1
CC1416	Oui	Biofilm	GR-1	JD16_lachrymans	Oui	Culture	GR-1
CC1544	Oui	Eau	GR-1	JD07_DC3000	Oui	Culture	GR-1
CC1559	Oui	Neige	GR-1	CC0440	Oui	Culture	Gr-2
USA007	Oui	Eau	GR-1	CC0457	Oui	Culture	Gr-2
CC1543	Oui	Eau	Gr-2	CC0094	Oui	Culture	Gr-2
UB303	Oui	Eau	Gr-2	CC1458	Oui	Adventice	Gr-2

USA011	En cours	Eau	Gr-2		JD21_aptata	Oui	Culture	Gr-2
USA032	En cours	Eau	USA-032		JD23_japonica	Oui	Culture	Gr-2
CC1504	Non	Eau	SZ030		JD09_B728a	Oui	Culture	Gr-2
SZ030	Non	Eau	SZ030		JD06_pisi	Oui	Culture	Gr-2
UB-169	Non	Eau	CC1524		JD03_glycineaR4	Oui	Culture	Gr-3
UB-009	Non	Eau	Gr-2		JD04_mori	Oui	Culture	Gr-3
UB-015	Non	Eau	SZ030		JD11_1448A	Oui	Culture	Gr-3
UB-186	Non	Eau	SZ030		JD10_tabaci	Oui	Culture	Gr-3
Vi-016	Non	Eau	Gr-2		CC1513	Oui	Adventice	Gr-4
Vi-009	Non	Eau	Gr-2		CC1629	Oui	Culture	Gr-4
SZ087	Non	Eau	Gr-2		JD12_oryzae	Oui	Culture	Gr-4
SZ145	Non	Eau	Gr-1		JD05_cit7	Oui	Culture	Cit7
SZ122	Non	Eau	Gr-1		Psy642	Oui	Adventice	SZ030

I.2. *Botrytis cinerea*

Cinquante-cinq souches de la collection de l'Unité de Pathologie Végétale ont été utilisées. Trente souches ont été isolées de plantes cultivées et les autres sont d'origines diverses (Tableau 2). Les souches ont été choisies pour représenter une gamme d'agressivité. Les souches sont conservées sous forme de conidies en cryotubes de 1,5 ml, contenant 20% de glycérol et un tampon phosphate, maintenus à -20°C à l'obscurité. Lors de sa multiplication, une goutte est déposée sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) en boîtes de Pétri, 15 jours avant inoculation. Les boîtes sont ensuite placées en chambre de culture à 21°C à une photopériode de 14 h.

Tableau 2 : Présentation des souches de *Botrytis cinerea*

Non Agricole				Agricole			
Nom	Origine spécifique	Date	Lieu	Nom	Origine spécifique	Date	Lieu
381	Air	2002	Balandran	05A550	Vigne		
CEN12-13	Neige	2010	Ceillac	05A587	Vigne	2005	Hautvillers
CEN14-1	Neige	2010	Ceillac	05A590	Vigne	2005	Hautvillers
CEN20.1	Neige	2010	Ceillac	06C111	Vigne		
CEW18-1	Eau	2010	Ceillac	06C12	Vigne		
CVN2-1	Neige	2010	Vars	06C163	Vigne		
CVW17-1	Eau	2010	Vars	06C278	Vigne	2006	Hautvillers
LAL10-1	Litière	2010	Lautaret	06C7	Vigne	2006	Hautvillers
LAP5-4	Précipitation	2010	Lautaret	B0510	Vigne	1992	Italie
LAV3-1	Végétation	2010	Lautaret	BC1	Tomate	1989	Plougastel
LAW3-2	Eau	2010	Lautaret	BC100	Tomate	2006	Lattaquié (Syrie)
MOP6-3	Précipitation	2010	Montfavet	BC21	Fraise	1991	Carpentras
MOP7-4	Précipitation	2010	Montfavet	BC25	Tomate	1991	Versailles
NH PM9	Végétation	2008	La Clusaz	BC26	Tomate	1991	Versaille
NH-DV1	Déchets végétaux	2006	Entraigues	BC55	Vigne	1993	Menerbes
NH-Ne2	Neige	2006	Villard de Lans	BC73	Cerise	1994	Montfavet

NH-Oi1	Oiseau	2006	Cheval.Blanc	BC75	Fraise	1995	Monteux
NH-PL1	Précipitation	2005	Chateaurenard	BC77	Pointsetta	1995	Albenga (Italie)
NH-PL2	Précipitation	2005	Chateaurenard	BC82	Gerbera	1995	Frejus
STP12-2	Précipitation	2010	St Saturnin	BC83			
STP8-1	Précipitation	2010	St Saturnin	BC96	Hortensia	1998	Angers
STP9-1	Précipitation	2010	St Saturnin	C10	Tomate	2003	Isle sur Sorgues
SZP32-1	Précipitation	2010	Sauze	E14	Tomate		Eyguière
SZP34-1	Précipitation	2010	Sauze	E2	Tomate	2003	Eyguière
SZP36-1	Précipitation	2010	Sauze	E258	Tomate	2003	Eyguière
				E349	Tomate	2003	Eyguière
				H6	Tomate	1991	Berre
				SAS405	Vigne	1992	Italie
				SAS56	Rose	1992	Italie
				T4	Tomate		France

II Evaluation phénotypique du pouvoir pathogène de *P. syringae* sur melon

Les plantules de melon au stade deux cotylédons (semées deux semaines auparavant environ) sont disposées en barquette de 12. L'inoculum est préparé à partir de culture de colonies âgées de 2 à 3 jours cultivées sur milieu KB. Pour chaque souche, une colonie est prélevée et suspendue dans de l'eau distillée stérile. La suspension est ensuite calibrée à une densité optique $DO_{580}=0,06$, ce qui correspond à une concentration de 10^8 cellules/ml. Les plantules sont inoculées à la seringue, directement entre les cotylédons comme indiqué dans la Figure 7. Une goutte se forme et sera naturellement absorbée par la plante. Les barquettes sont ensuite placées en chambre de culture à 18°C pendant 8h sans éclairage et à 22°C pendant 16h avec éclairage, l'hygrométrie est maintenue à 80% d'humidité.

Les notations se font à 3 et 7 jours après inoculation. Une note de 1 à 4 est donnée à chaque plantule en fonction du développement de la bactériose : 0 correspond à aucune lésion et 4 à la mort de la plante (Figure 7).



Figure 7 : Mesure d'agressivité de *Pseudomonas syringae* sur plantule de melon. (A) disposition des plantules, (B) inoculation de la plantule avec une seringue, (C à E) Symptômes obtenus 7 jours après inoculation. Photos : INRA

III Cinétique de croissance bactérienne en milieu riche

III.1 Durée d'incubation pour une multiplication par un facteur de 10

Chaque souche âgée de 2 à 3 jours et cultivée sur milieu KB est suspendue dans de l'eau distillée stérile. Afin d'initier la croissance bactérienne dans un milieu, la suspension est calibrée à une densité optique $DO_{580}=0,06$ (10^8 cellules/ml) et ensuite à travers des dilutions à 1/10 successives la suspension est diluée à 10^4 cellules/ml. Dans un tube à essai, 500 μ l de cette suspension sont ajoutés à 4,5ml de bouillon nutritif (Annexe I). Ainsi, la croissance bactérienne démarre à partir d'une population à 103 cellules/ml. Les tubes sont ensuite placés en chambre de culture à une température de 25°C et sous agitation à 200 rpm. Des prélèvements réguliers sont réalisés pour suivre la croissance et dénombrer les cellules. Le prélèvement est dilué par dilutions à 1/10 successives et déposé en gouttes de 20 μ l sur milieu KB en boîte de Pétri. La boîte est inclinée de façon à étaler les gouttes (Figure 8). Chaque colonie qui se développe est ensuite comptabilisée (ufc = unité formant colonie).



Figure 8 : Exemple de résultats de dénombrement obtenu par la méthode de dilution et inclinaison de la boîte de Pétri. Chaque « colonne » de colonie est issue d'une goutte de 20 μ l.

III.2. Courbes de croissance automatisées

Ce test utilise un appareil de mesure automatique de la densité optique DO_{590} de suspension de cellules en microplaque de 96 puits : le Fluostar (Figure 9). Chaque souche est suspendue et calibrée comme précédemment pour obtenir une concentration finale de 10^3 cellules/ml dans un volume de 220 μ l de bouillon nutritif. La température est de 25°C environ. Les mesures s'effectuent toutes les 20 minutes après 10 secondes d'agitation.



Figure 9 : Appareil de mesure automatique de l'absorbance de suspensions cellulaires et des microplaques de 96 puits nécessaires.

IV Evaluation phénotypique du pouvoir pathogène de *Botrytis cinerea* sur tomate

Les feuilles 3 et 4 (Figure 10) de chaque plant de tomate sont sectionnées en laissant un morceau de pétiole d'environ 1cm sur la tige (chicot). L'inoculum est préparé à partir de cultures de mycélium en croissance sporulé et sous forme de suspension de 10^6 spores/mL. Une goutte de 10 μ L est déposée sur chaque chicot. Après absorption de la goutte d'inoculum par la plaie d'effeuillage (quelques minutes), les plantes sont ensuite placées en chambre de culture à une température de 21°C et une photopériode de 14 h. L'humidité relative est maintenue de façon à être supérieure à 85% par un arrosage abondant et un milieu hermétique.

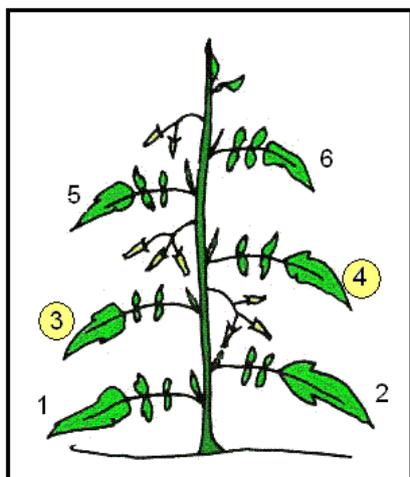


Figure 10 : Numérotation des feuilles du plant de tomate. Les feuilles 3 et 4 sont sectionnées pour permettre l'inoculation des chicots par *B. cinerea*.

Le champignon se développe d'abord sur le chicot de pétiole, puis attaque la tige, formant une lésion chancreuse. La longueur des chancres mesurée en millimètres tous les jours durant 7 jours après inoculation. Cette mesure est rapportée à la mesure de référence de BC1 fournissant un indice d'agressivité en %BC1. Les données produites ont été acquises antérieurement à mon stage et m'ont été fournies par le laboratoire de Pathologie Végétale.

V Cinétique de croissance mycélienne sur milieu riche

Une goutte de la suspension de conidies maintenue à -20°C de chaque souche est déposée sur une boîte de Pétri contenant du milieu PDA. 3 jours plus tard des implants de mycélium de 5mm de diamètre sont extraits à l'emporte-pièce de ces boîtes et inoculent des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre contenant du milieu PDA. Les boîtes sont ensuite placées en chambre de culture à 21°C à une photopériode de 14 h.

Le développement mycélien est noté à l'aide de deux mesures perpendiculaires du diamètre de la colonie mycélienne (Figure 11). Les mesures sont effectuées chaque jour à la même heure durant 15 jours.

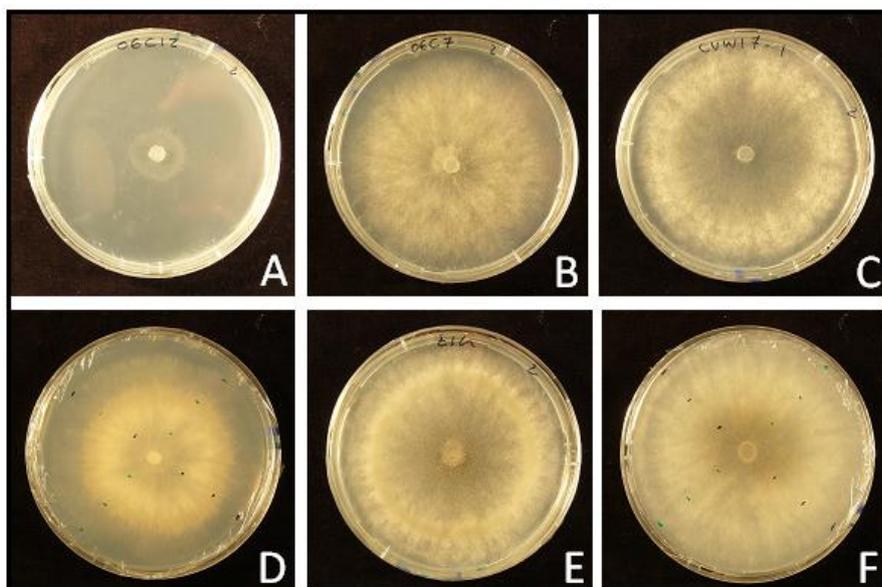


Figure 11 : Exemples de développement mycélien de *Botrytis cinerea* sur milieu Potato Dextrose Agar en boîte de Pétri. Ces cultures sont âgées de 4 jours.

VI Evaluation de la sporulation de *Botrytis cinerea* sur milieu riche

Le développement mycélien qui fournira les spores (conidies) est obtenu suivant la méthode décrite dans le paragraphe V précédent page 16. La date de démarrage de la sporulation durant les 15 jours est notée.

À 15 jours, les spores sont récoltées à l'aide d'une solution d'éthanol à 20% contenant une goutte de Tween (détergent). Les spores sont ensuite dénombrées au microscope optique grâce à la cellule de Malassez.

VII Formation de sclérotes de *Botrytis cinerea*

Le développement mycélien qui fournira les sclérotes est obtenu suivant la méthode décrite dans le paragraphe V précédent page 16. 7 jours après inoculation des boîtes de 9cm, les boîtes sont placées à l'obscurité à 21°C durant 4 semaines puis à 4°C durant 5 semaines. Les sclérotes sont dénombrés et photographiés (Figure 12).

VIII Culture microbienne en conditions de stress

VIII.1 Croissance bactérienne

VIII.1.a Milieu pauvre et température basse

La suspension cellulaire est réalisée comme décrite au paragraphe III.1 page 15, puis la concentration est fixée à 103 cellules/ml et les cellules sont mises en culture dans un milieu oligotrophe. Ce milieu est

composé d'une préparation de Tryptone Caséine Soja (TCS) à 133,2 $\mu\text{g/l}$ et de chlorure de calcium (CaCl_2) à 0.1g/l. Le pH final de cette solution est de 5. Les tubes sont ensuite placés en chambre de culture à une température de 10°C et sous agitation à 200rpm. Le suivi de la croissance et le dénombrement des cellules sont réalisés grâce à la méthode précédente.

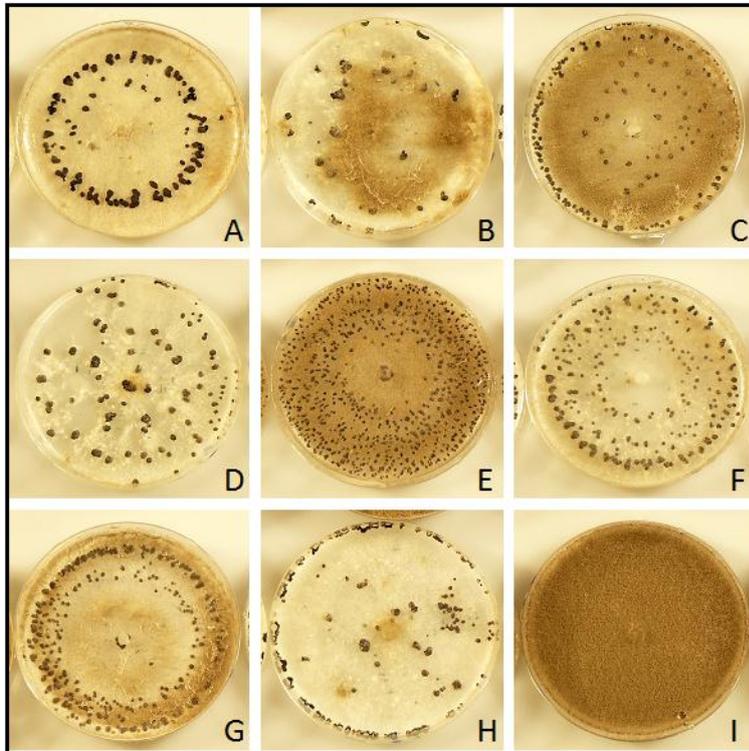


Figure 12 : Exemples de sclérotés de *Botrytis cinerea* obtenus sur milieu Potato Dextrose Agar en boîte de Pétri. Ces cultures ont été produites selon la méthode décrite dans le paragraphe VII du matériel et méthode.

VIII.1.b Milieu salé

La culture cellulaire est réalisée de façon identique à la méthode décrite au paragraphe III.1 page 15. Le milieu de culture (bouillon nutritif) est additionné de chlorure de sodium (NaCl) à 15g/l. Le suivi de la croissance et le dénombrement des cellules sont réalisés grâce à la méthode précédente.

VIII.2 Croissance mycélienne sur milieu pauvre et température basse

La méthode est la même que décrite au paragraphe V page 16. Les implants de mycélium de 5mm de diamètre sont déposés dans les boîtes de Pétri de 9cm de diamètre qui contiennent un milieu Glucose-Ammonium-Agar (GAA ; Annexe I). Les boîtes sont ensuite placées en chambre de culture à 10°C à une photopériode de 14 h. Les mesures sont effectuées de même.

IX Analyse des données

L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel libre R (version 2.15.1). Des analyses de variance ont été réalisées pour apprécier l'effet des facteurs.

La durée d'incubation pour une multiplication par un facteur de 10 est calculée par l'augmentation par facteur 10 de la concentration en cellules à T0, et se détermine avec l'équation de la droite formée par les deux valeurs encadrantes de $C_0 \cdot 10$.

Le résultat utilisé des courbes obtenues par automatisation est le coefficient directeur de la droite formée par la phase de croissance exponentielle.

Le rapport entre le nombre de cellules du témoin et le nombre de cellules du stress est utilisé pour mesurer le stress du milieu de croissance salé sur la cinétique de croissance de *P. syringae*.

La vitesse de croissance mycélienne de *B. cinerea* sur milieu riche est calculé selon la formule suivante :
$$v = \frac{((\text{diametreJfinal} - 1) - (\text{diametreJ1}))}{\text{nombre de jours}} / 2$$

L'AUGPC représente l'aire sous la courbe de croissance mycélienne de *B. cinerea* sur milieu riche entre J5 et J1 est calculée selon la formule suivante : $\text{AUGPC} = (J1/2) + J2 + J3 + J4 + (J5/2)$

L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel libre R (version 2.15.1).

Résultats et discussion

I *Pseudomonas syringae*

I.1 Génomique

Une analyse de variance a un facteur (ANOVA) indique que les souches d'origine agricole possèdent un nombre total de bases significativement plus important ($P = 0.006^{**}$) que les souches non agricoles, avec une moyenne de 6260829 bases contre 5874766 bases pour les souches d'origine non agricole (Figure 13). Les mêmes tendances sont observées pour le nombre de gènes totaux avec $P = 0.074$, ainsi que pour le nombre total de gènes codants pour une protéine avec $P = 0.079$ et pour le nombre de gènes codants pour l'ARN (Acide Ribose Nucléique) avec $P = 0.010^*$. Ces informations suggèrent que les souches d'origine agricole possèdent plus de ressources génétiques. On peut donc penser que le mode de développement ou la vie en association avec les plantes sélectionne des souches avec des informations génétiques supplémentaires nécessaires au pouvoir pathogène.

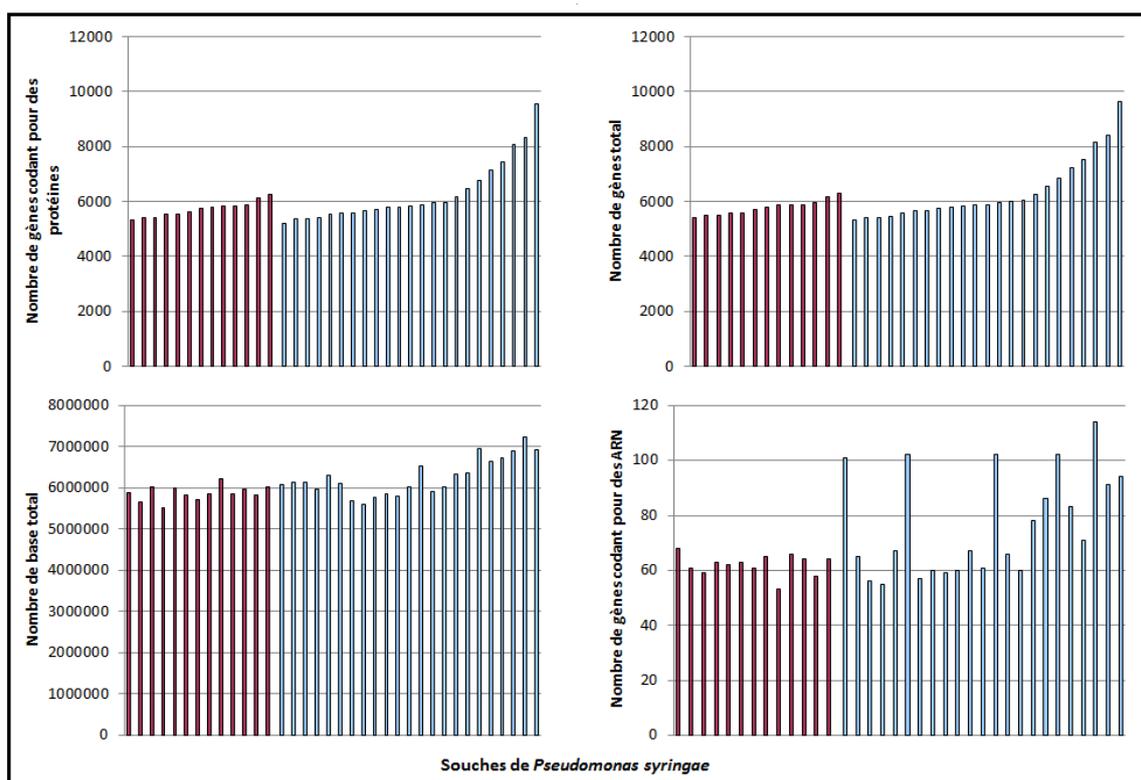


Figure 13 : Informations génomiques de *P. syringae* en fonction des souches. L'ordre des souches est conservé pour les quatre graphiques. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en rouge (gauche) et les souches d'origine agricole en bleu (droite).

Une analyse de corrélation sur ces informations génétiques indique que l'ensemble de ces données est corrélé ($P < 0.05$), le résultat est présenté dans le tableau 3. Un seul des quatre paramètres d'information génétique sera donc utilisé dans les comparaisons de données suivantes.

Tableau 3 : Résultats des analyses de corrélation des informations génomiques

Paramètres mesurés	Nombre de gènes	Nombre de gènes codant pour des protéines	Nombre de gènes codant pour des ARN
Nombre de bases	P= 6.998e-09 cor=0.795	P= 1.006e-08 cor=0.790	P= 9.393e-07 cor= 0.715
Nombre de gènes		P< 2.2e-16 cor= 0.100	P= 0.0004615 cor= 0.554
Nombre de gènes codant pour des protéines			P= 0.0006519 cor= 0.541

I.2 Cinétiques de croissance bactérienne en milieu riche

I.2.a Durée d'incubation pour une multiplication par un facteur de 10

Une analyse ANOVA de l'ensemble des 50 souches de *P. syringae* testées indique que les souches d'origine agricole sont significativement plus lentes ($P=0.002^{**}$) à se développer dans un milieu artificiel représentant les conditions de croissance optimales que les souches non agricoles (Figure 14). En effet 8h et 11min en moyenne sont nécessaires aux souches d'origine non agricole pour augmenter le nombre initial de cellules (ufc : unité formant colonie) par un facteur de 10, tandis que les souches d'origine agricole nécessitent 10h et 8min en moyenne pour atteindre la même concentration de cellules.

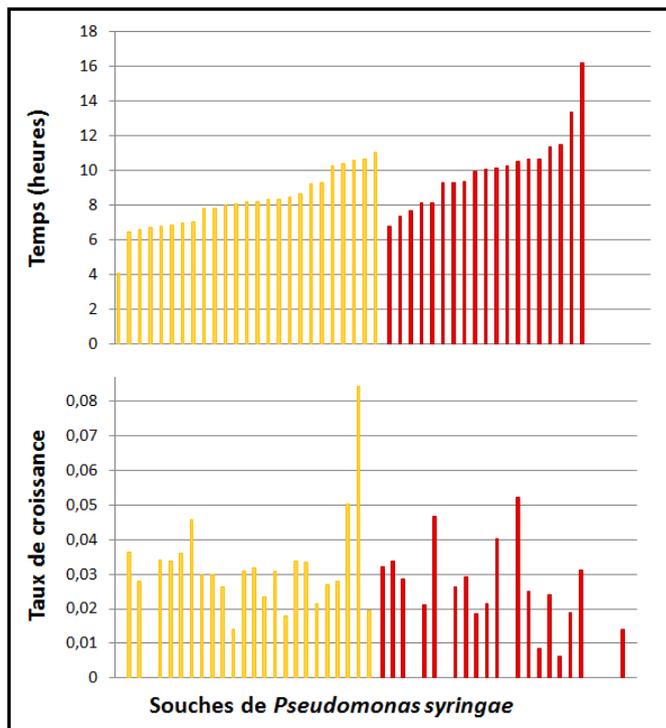


Figure 14 : Cinétique de croissance de *P. syringae*. L'ordre des souches est conservé pour les deux graphiques. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en jaune (gauche) et les souches d'origine agricole en rouge (droite). Le graphique du haut représente le temps nécessaire à chaque souche pour augmenter le nombre de cellule par un facteur de 10. Le graphique du bas représente le coefficient directeur de la phase exponentielle de la courbe de croissance obtenue par automatisé. On note l'absence de corrélation entre les deux informations.

Une à deux répétitions de la mesure par souche ont été effectuées pour ce test ne permettant pas l'analyse de variance entre les souches, cependant dans ce type de travail exploratoire nous cherchons à comparer des échantillons de souches représentatives de l'ensemble.

Le coefficient de corrélation de ces données de multiplication par 10 de la concentration initiale avec les données génomiques de *P. syringae* a été calculé. Aucun des paramètres génomiques n'est corrélé avec ces données ($P > 0.05$), cela suggère que ce n'est pas la quantité de matériel génétique à dupliquer durant la multiplication cellulaire qui est responsable de l'écart de vitesse entre les souches, mais plutôt le métabolisme propre de chaque souche de *P. syringae*.

I.2.b Courbes de croissance automatisées

Cette deuxième méthode de mesure de la cinétique de croissance est différente de la précédente pour plusieurs raisons, en effet les conditions de dénombrement et d'oxygénation des bactéries ne sont pas identiques. Le taux de croissance représente l'inclinaison de la droite de la phase exponentielle (Figures 15 et 16) de la courbe de croissance de *P. syringae*.

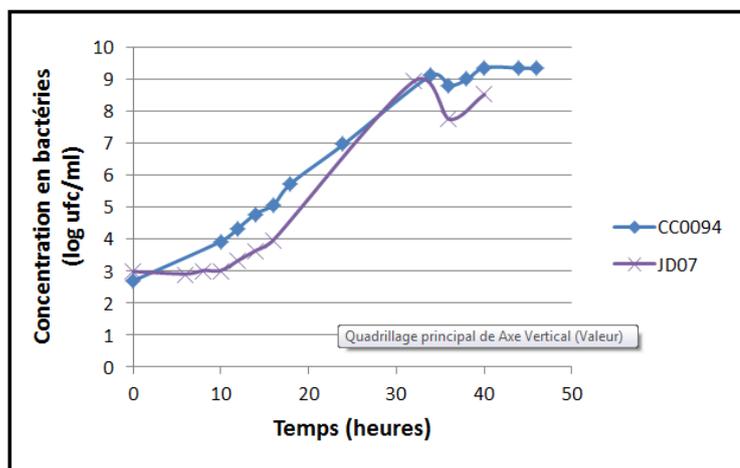


Figure 15 : Exemple de courbe de croissance de *P. syringae* en milieu de type bouillon nutritif.

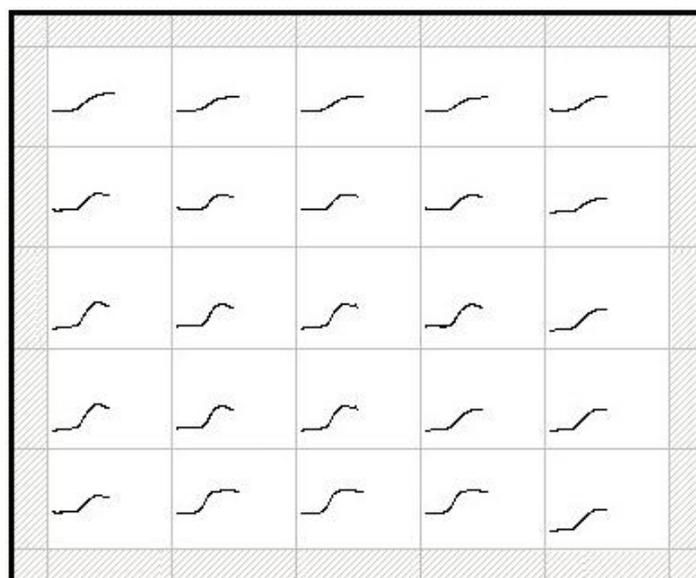


Figure 16 : Exemple de courbes obtenues par automatisation au Fluostar (Temps en abscisse et DO_{590} en ordonnée).

Une analyse ANOVA indique que l'origine ou le groupe génomique de chaque souche n'a pas d'influence sur le taux de croissance (Figure 14), respectivement $P=0.199$ et $P=0.759$. D'autre part, il n'y a pas de corrélation entre le taux de croissance et le temps de multiplication de la concentration initiale des cellules par 10 ($P=0.264$). Ceci nous indique donc que la principale différence de développement entre les souches en conditions optimales artificielles est la phase de latence (Figure 15). Cet élément est important car en condition de compétition entre deux souches pour les mêmes ressources nutritives, pour

un même taux de croissance, c'est la souche la plus rapide à commencer sa multiplication qui est avantagée. Dans ce cas-là, les souches d'origines agricoles sont donc désavantagées par rapport aux souches non agricoles en milieu artificiel. Barrett *et al.* (2011) indiquent d'ailleurs les mécanismes complexes d'évolution mis en jeu dans les cas de concurrence entre deux pathotypes. On peut donc penser que les souches d'origines agricoles possèdent un système d'outils supplémentaire et plus complexe qui leur permet de surmonter la défense des plantes lors de l'attaque. Une deuxième hypothèse est que pendant la période avant la phase exponentielle ces souches produisent les éléments qui vont préparer la plante pour leur développement et ainsi faciliter leur attaque.

I.3 Evaluation phénotypique du pouvoir pathogène de *P. syringae* sur melon

Une analyse ANOVA de l'ensemble des 50 souches de *P. syringae* testées indique que les souches d'origine agricole et non agricole ne sont pas significativement distinctes, avec $P=0.317$ et des moyennes respectives de 0.460 et de 0.746. A l'inverse, une analyse de variance indique que l'agressivité des souches de *P. syringae* est très significativement différentes suivant les groupes génomiques auxquelles elles appartiennent avec $P=0.002^{**}$ (Figure 17). Ces groupes génomiques ont été déterminés par une analyse phylogénétique de Morris *et al.* (2000) grâce à l'utilisation de gènes de « ménages » c'est-à-dire des gènes indispensables aux fonctions vitales de l'organisme.

Cette mesure du pouvoir pathogène est complexe car elle met en jeu de nombreux acteurs : la vitesse de croissance, l'équipement enzymatique du biotype et les interactions moléculaires avec la plante.

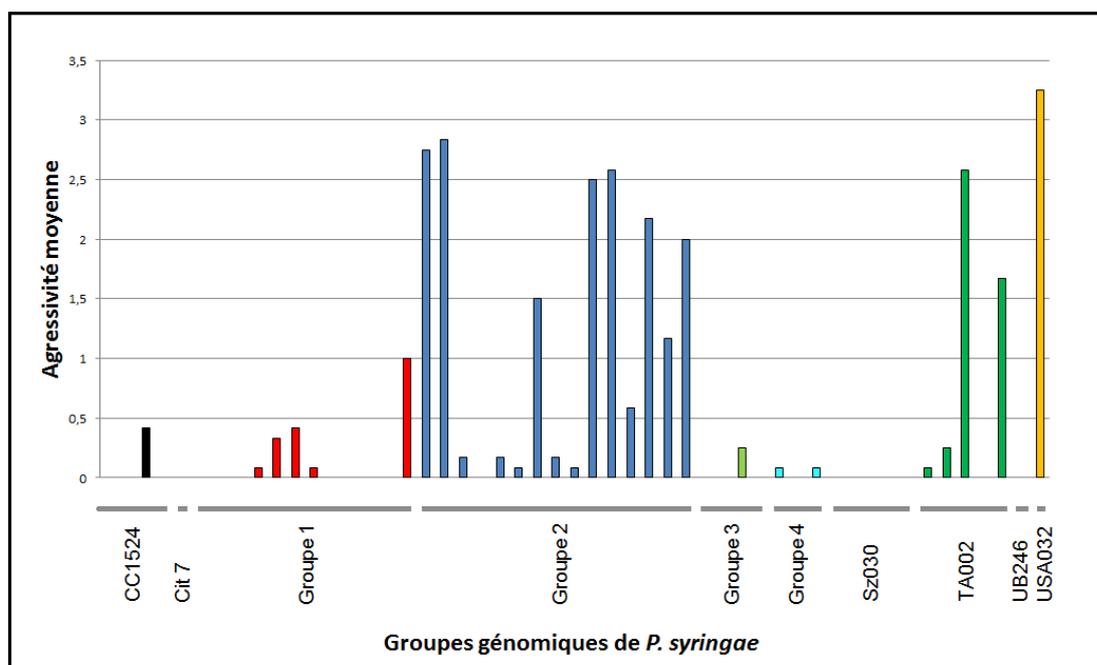


Figure 17 : Agressivité de *P. syringae* sur plantule de melon au stade deux cotylédons. Les souches sont classées en fonction des groupes génomiques auxquelles elles appartiennent. En absence de bâton de diagramme, la valeur est égale à 0.

I.4 Croissance bactérienne en milieu salé

Cette expérimentation a permis de montrer que *P. syringae* se développe à 25°C, sous agitation et dans un milieu nutritif qui possède une concentration de 20g/l de chlorure de sodium (NaCl), ce qui n'avait pas été décrit auparavant. Ugur *et al.* (2012) décrivent la présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau mer et Membre et Burlot (1994) expérimentent le stress salin sur *Pseudomonas marginalis* à 25g/L de NaCl mais ce type d'expérimentation sur *P. syringae* n'avait pas encore été réalisé.

La mesure de ce paramètre a été effectuée une fois par souche et pour 31 souches ne permettant pas d'analyse de variance entre les souches. D'autre part la présence de sel dans le milieu semble affecter notre capacité à dénombrer les colonies selon la méthode décrite dans la partie « Matériel et Méthodes » paragraphe III.1 page 15 et les données de 18 et 24h sont disponibles pour 17 souches (Figure 18).

L'analyse statistique du rapport des concentrations de cellules entre la suspension bactérienne stressée et témoin pour 18 et 24h n'indique aucun élément significatif (Figure 19), de même que les analyses de corrélation avec les autres paramètres.

Un deuxième essai sur 3 souches de *P. syringae* et dans les mêmes conditions de croissance mais avec une concentration de 35g/l de chlorure de sodium indique que *P. syringae* se développe en 4 jours.

Cette expérimentation m'a aussi permis de voir une coloration du milieu de culture de la souche CC1513 en présence de sel (Figure 20). Cet élément est intéressant car il permet de mettre en évidence une réponse de la bactérie au stress engendré par le sel et indique une grande variabilité d'effet.

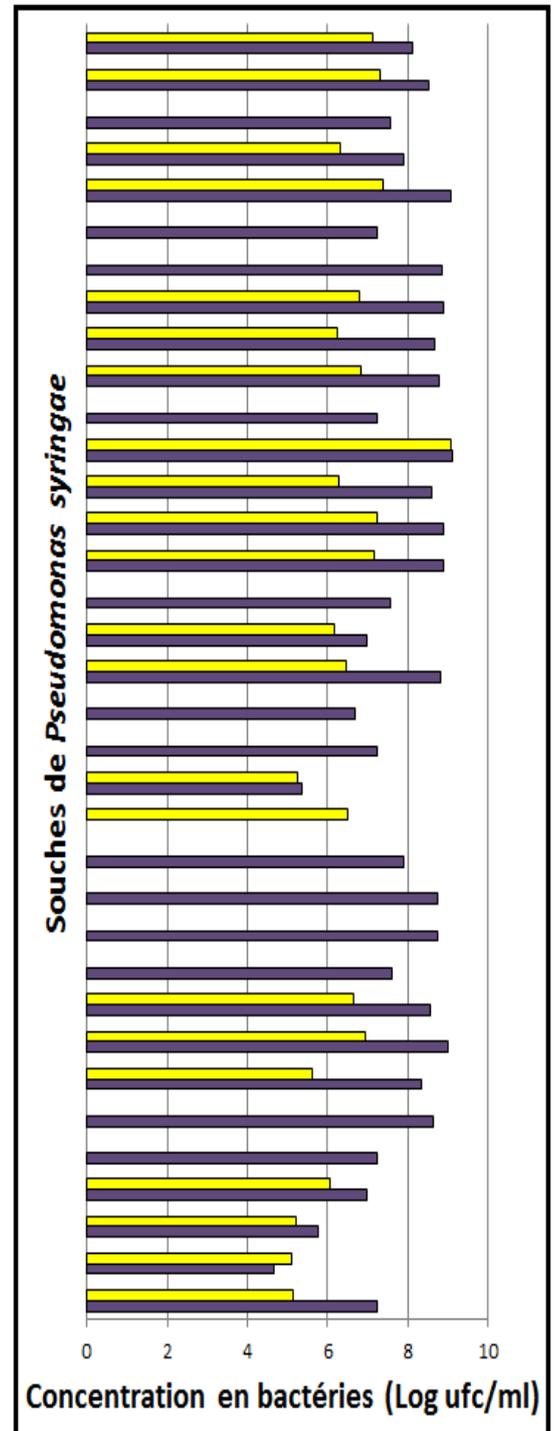


Figure 18 : Comparaison de la concentration de cellules de *Pseudomonas syringae* entre le milieu témoin (violet) et le milieu salé (jaune). Cette comparaison est effectuée au début de la courbe de croissance à 18 ou 24h selon les souches.

Le choix d'observer ce paramètre est en lien avec la nouvelle vision du cycle de vie de *P. syringae*, en effet Morris *et al.* (2008, 2010) ont mis en évidence le lien entre le cycle de l'eau et la bactérie. L'eau

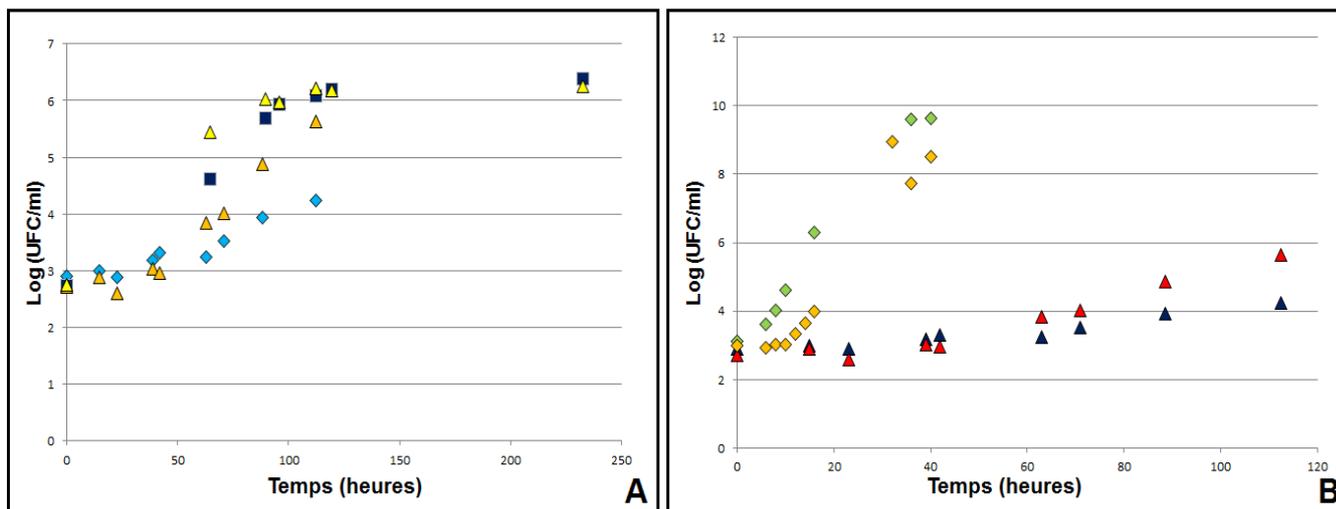


Figure 21 : Cinétique de croissance de *P. syringae* (A) en milieu oligotrophe et (B) comparaison des milieux nutritif et oligotrophe.

II. Botrytis cinerea

II.1 Cinétique de croissance mycélienne sur milieu riche

La croissance mycélienne de *B. cinerea* est présentée dans la Figure 20 en fonction du temps. Elle est traditionnellement divisée en 3 phases : une phase de latence, une phase de croissance continue et une phase de stagnation. La Figure 22 illustre les différents types de courbes obtenues.

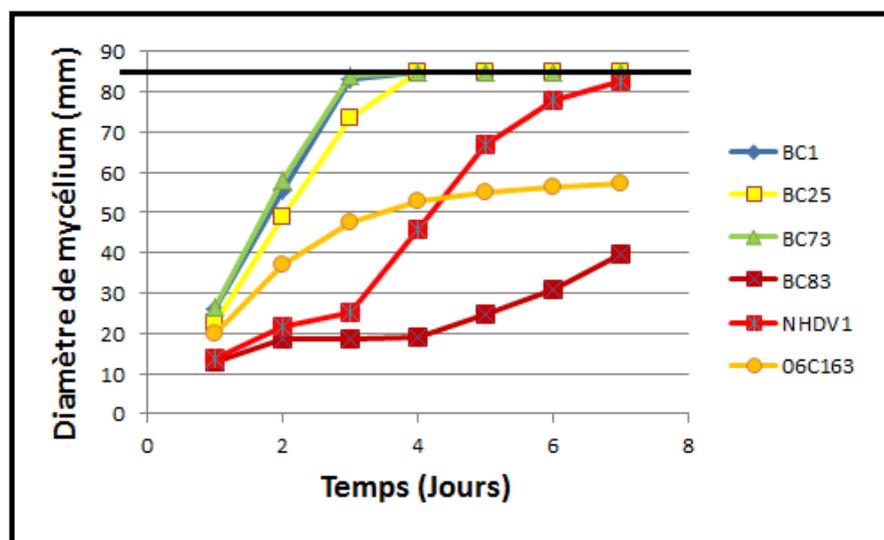


Figure 22 : Exemple de courbe de croissance mycélienne de *B. cinerea*. La droite (noire) à 85mm représente la taille maximale atteinte et la taille de la boîte de Pétri.

Deux tests indépendants ont été réalisés pour évaluer la croissance mycélienne de 55 souches de *B. cinerea*. L'analyse de variance sur l'ensemble des résultats AUGPC à 5 jours montre qu'il n'y a pas

d'effet "répétition" significatif ($P= 0.108$) (Figure 23). L'analyse de l'effet « souche » est très significatif ($P < 2e-16^{***}$) et explique 93.02% de la variation. L'analyse de variance a un facteur indique que la différence d'AUGPC en fonction de l'origine des souches est très significative ($P=0.001^{**}$, Tableau 4). En effet les souches d'origine non agricole possèdent une aire sous la courbe plus importante que les souches d'origine agricole. Ce résultat est similaire à ce qui a été montré plus haut pour *P. syringae*. Il serait intéressant de recouper ces informations avec des données génomiques lorsqu'elles seront disponibles.

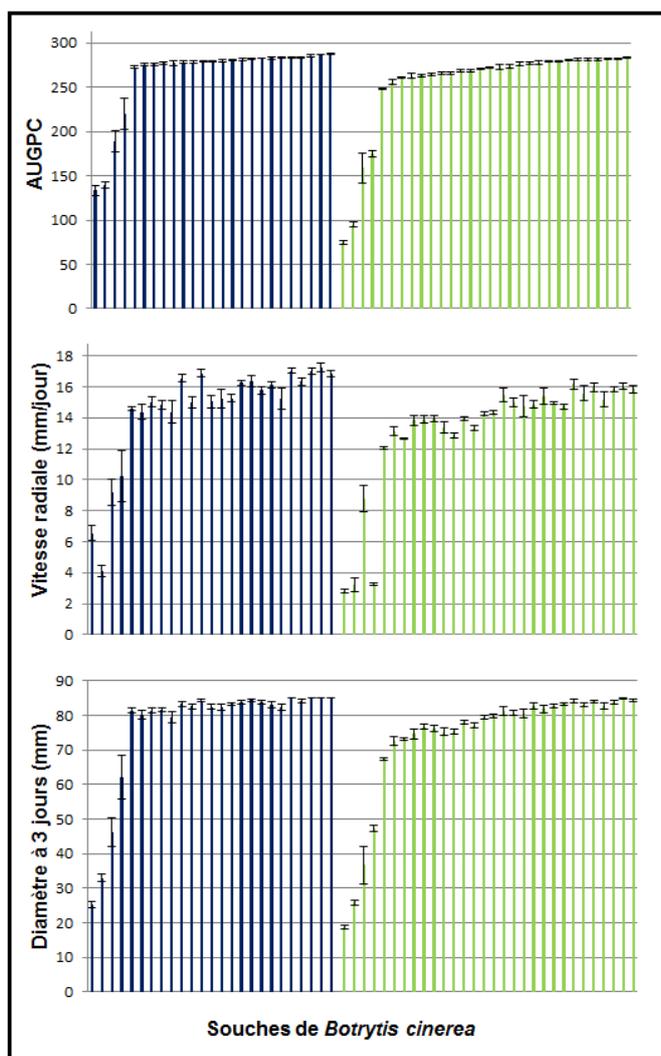


Figure 23 : Cinétiques de croissance de *B. cinerea*, moyenne des deux tests. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. L'ordre des souches est conservé dans les trois graphiques. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en bleu (gauche) et les souches d'origine agricole en vert (droite).

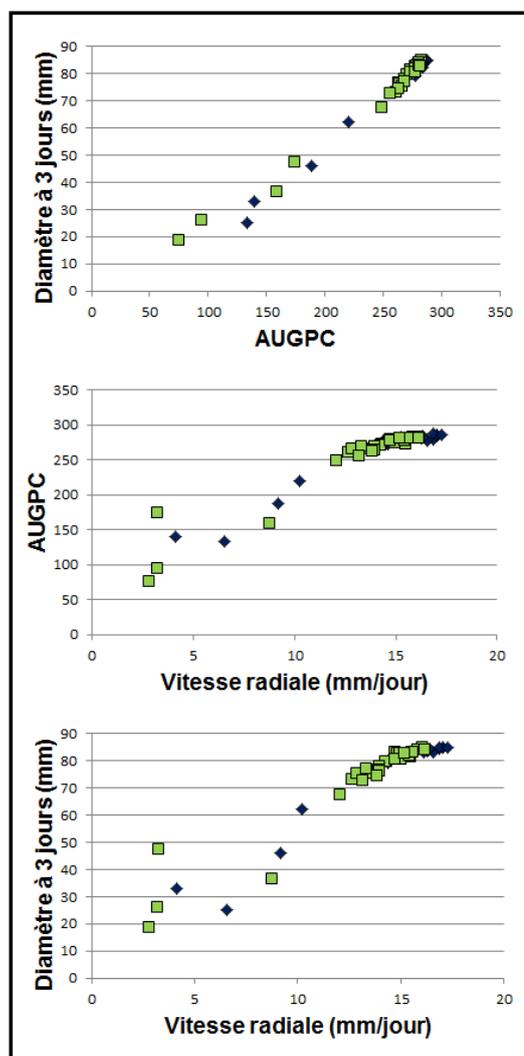


Figure 24 : Corrélations des paramètres de cinétique de croissance mycélienne de *B. cinerea*. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en bleu (losange) et les souches d'origine agricole en vert (carré).

L'analyse de variance sur l'ensemble des résultats de la vitesse de croissance radiale montre un effet "répétition" très significatif ($P < 2.2e-16^{***}$), cependant cet effet « répétition » n'explique que 2.50% de la variation. De plus l'effet « souche » est très significatif ($P < 2e-16^{***}$) et explique 86.62% de la variation (Figure 23). D'autre part une analyse de l'effet origine indique que la vitesse de croissance est très significativement différente ($P= 2.963e-05^{***}$) pour les souches d'origine agricole et non agricole.

Tableau 4 : Résultats des analyses statistiques des données d'AUGPC de cinétique de croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*.

	Répétitions 1 et 2		
	Non agricoles	Agricoles	Total
Nombres de souches	25	30	55
Effet « souche »	P <2e-16 ***	P <2e-16 ***	P <2e-16 ***
Moyenne ± erreur standard	262.97 ± 8.79	252.63 ± 9.79	257.33 ± 6.65
Minimum	133.25	74.87	74.87
Maximum	287.25	282.96	287.25
Médiane	279.42	271.33	277.17

Les deux répétitions ont donc été analysées de façon distincte, le tableau 5 présente les résultats.

Tableau 5 : Résultats des analyses statistiques des données de vitesse de croissance radiale de mycélium de *Botrytis cinerea*.

	Répétition 1			Répétition 2		
	Non agricoles	Agricoles	Total	Non agricoles	Agricoles	Total
Nombres de souches	25	30	55	25	30	55
Effet « souche »	P <2e-16 ***	P <2e-16 ***	P <2e-16 ***	P <2e-16 ***	P <2e-16 ***	P <2e-16 ***
Moyenne ± erreur standard	13,87 ± 0,60	12,47 ± 0,67	13,12 ± 0,46	15,00 ± 0,86	13,83 ± 0,73	14,36 ± 0,56
Minimum	4,62	2,74	2,74	3,64	2,60	2,60
Maximum	16,58	15,58	16,58	18,08	17,25	18,08
Médiane	14,5	13,62	13,96	16,75	14,63	16

On constate dans le tableau 5 que tous les résultats indiquent le même phénomène : les souches sont significativement différentes entre elles et les souches d'origine non agricole possèdent un développement significativement plus rapide que les souches d'origine agricole.

Un troisième paramètre de mesure de la croissance est le diamètre du mycélium des souches à 3 jours (Figure 23). L'analyse de variance sur l'ensemble des résultats du diamètre à 3 jours montre un effet "répétition" très significatif ($P = 1.555e-13^{***}$), cependant cet effet «répétition» n'explique que 0.36% de la variation. De plus l'effet « souche » est très significatif ($P <2e-16^{***}$) et explique 91.90% de la variation. Les deux répétitions ont donc été analysées séparément et les résultats sont groupés dans le tableau 6. Ces analyses indiquent que les souches d'origine non agricole sont significativement plus rapides à se développer que les souches d'origine agricole, ce qui est conforme au résultat attendu au vues des paragraphes précédents.

La Figure 24 présente les courbes de corrélation entre les trois paramètres de croissance précédents. On observe que ces données sont complètement corrélées ($P <2e-16^{***}$), un seul des trois paramètres sera donc utilisé pour la suite de ce travail, la vitesse de croissance radiale.

Tableau 6 : Résultats des analyses statistiques des données de diamètre à 3 jours de mycélium de *Botrytis cinerea*.

	Répétition 1			Répétition 2		
	Non agricoles	Agricoles	Total	Non agricoles	Agricoles	Total
Nombres de souches	25	30	55	25	30	55
Effet « souche »	P < 2.2e-16 ***					
Moyenne ± erreur standard	76.03 ± 3.39	71.30 ± 3.37	73.49 ± 2.39	76.75 ± 3.52	74.67 ± 3.11	75.61 ± 2.31
Minimum	25.33	17.17	17.17	25	20.17	20.17
Maximum	85	85	85	85	85	85
Médiane	81.83	76.67	80	84.50	80.08	83.50

L'analyse de corrélation entre la croissance mycélienne (vitesse de croissance radiale) sur milieu artificiel et l'indice d'agressivité déterminé sur tomate (Figure 25) indique une corrélation positive ($P=0.003$) de coefficient 0.392 entre les valeurs de vitesse de croissance radiale et l'agressivité. Ceci signifie que la vitesse de croissance augmente avec la taille de lésion de chancre sur tomate. Cependant on note la présence de ce qui semble être un point d'inflexion (Figure 25). L'analyse de corrélation des données séparées de part et d'autre de ce point (valeur de vitesse radiale 15,22 mm/j) indique une tendance de corrélation positive jusqu'à ce point, puis une tendance de corrélation négative plus la vitesse augmente.

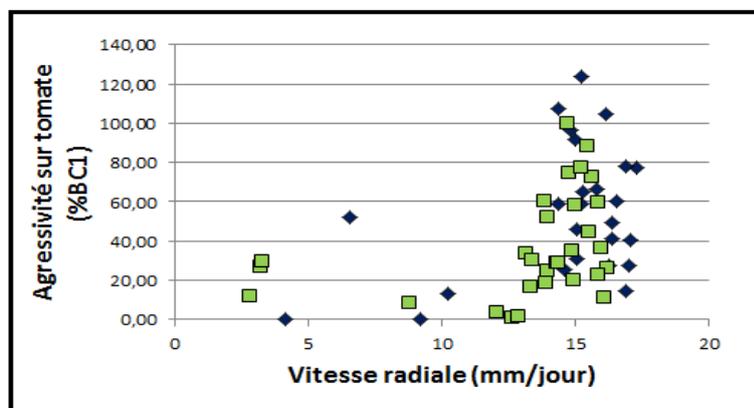


Figure 25 : Corrélation de l'agressivité sur tomate et de la vitesse radiale de *B. cinerea*. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en bleu (losange) et les souches d'origine agricole en vert (carré).

II.2 Evaluation de la sporulation de *Botrytis cinerea* sur milieu riche

La mesure de ce paramètre a été effectuée sur trois comptages indépendants, ce sont ces répétitions qui sont utilisées dans l'analyse de variance entre souches. L'ANOVA de la quantité de spores (conidie) de *B. cinerea* produit par ml et par souche indique que l'effet « souche » est significatif ($P < 2e-16^{***}$). Une analyse de l'effet origine indique que la quantité de spores par ml est significativement différente ($P=0.0234^*$) pour les souches d'origine agricole et non agricole (Figure 26). En effet les souches d'origine agricole produisent plus de spores que les souches d'origine non agricole (Figure 26). La grande

production de spores d'une souche est importante dans la dissémination de la maladie. En effet en situation d'attaque de plantes, la souche qui possède la plus grande capacité de dissémination est avantagée par rapport aux autres pour des conditions égales.

L'analyse de variance de la quantité de spores en fonction du nombre de jours durant lesquelles elles ont été produites par souche (Figure 26) indique le même effet que précédemment ($P < 2e-16^{***}$), de même que pour l'effet origine ($P=0.046^*$). La corrélation entre la quantité de spores par ml et la quantité de spores estimées en fonction du nombre de jours de production (Figure 27) est positive ($P < 2.2e-16$ et $\text{corr}=0.983$). Seule la mesure du nombre de spores par ml sera donc utilisée dans les analyses suivantes.

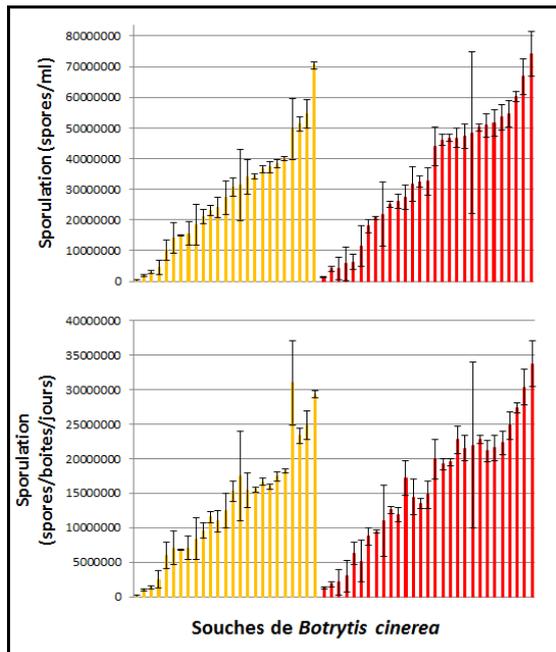


Figure 26 : Evaluation de la sporulation de *B. cinerea*. L'ordre des souches est conservé dans les deux graphiques. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en jaune (gauche) et les souches d'origine agricole en rouge (droite).

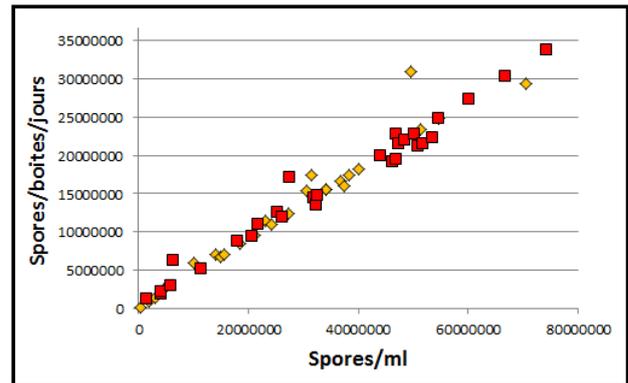


Figure 27 : Corrélation du nombre de spores produites par ml et le nombre de spores produites par boîtes et par jours de sporulation de *B. cinerea*. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en jaune (losange) et les souches d'origine agricole en rouge (carré).

L'analyse de corrélation entre la production de spores par ml et l'AUGPC de la croissance mycélienne de *B. cinerea* n'indique pas de corrélation ($P=0.094$, $\text{cor}=0.230$) mais une tendance (Annexe II, A). Les souches les plus rapides à se développer auraient tendance à produire plus de spores, cette nuance est importante car elle peut indiquer un mode de fonctionnement des souches. Deux mécanismes sont observables, en effet certaines souches développent le mycélium jusqu'au bord de la boîte de Pétri et commence ensuite à sporuler tandis que d'autres sporulent à partir de 3 jours sans avoir atteint le bord de la boîte. En condition d'attaque de plante on peut penser que certaines souches sporulent dès qu'elles sont en contact avec suffisamment de ressources tandis que d'autres se développent d'abord et lorsqu'elles épuisent les ressources entament alors leur dispersion.

La production de spores par ml et l'indice d'agressivité sur tomate ne sont pas corrélés ($P=0.766$ et $\text{cor}=0.041$), ce qui indique que les mécanismes en jeu sont complexes et probablement différents (Annexe II, B).

II.3 Formation de sclérotes de *Botrytis cinerea*

La mesure de ce paramètre a été effectuée une seule fois par souche à l'aide de trois comptages indépendants. Cette analyse montre que le nombre de sclérotes produites par *B. cinerea* est très significativement différent entre les souches ($P < 2 \times 10^{-16}^{***}$) quelle que soit l'origine de la souche (Figure 28). Par contre il n'y a pas de différence de production de sclérotes entre les souches d'origine agricole ou non agricole ($P=0.167$).

La confrontation de ces données avec la production de spores de *B. cinerea* par ml indique une corrélation significativement négative ($P=0.002$ et $\text{cor}=-0.239$) (Figure 29), c'est-à-dire que plus une souche produit un grand nombre de spores, moins elle ne produit de sclérotes. C'est un élément important dans la stratégie de développement d'un mycète. En effet la capacité d'une souche à se disséminer et donc à sporuler est importante lors d'une épidémie, plus la souche sera en mesure de se disperser dans le milieu et plus elle aura de chance de perdurer (fitness élevé). Une deuxième stratégie pour assurer le maintien de la population dans le milieu est la capacité à survivre aux conditions difficiles. C'est deux stratégies sont distinctes et cela indique un compromis dans l'allocation d'énergie de l'organisme.

A l'inverse, les analyses de corrélation de la production de sclérotes avec l'indice d'agressivité, la vitesse de croissance radiale (respectivement $P=0.021$ et $\text{cor}=-0.309$; $P=0.687$ et $\text{cor}=-0.055$) n'indiquent pas de lien direct entre ces paramètres.

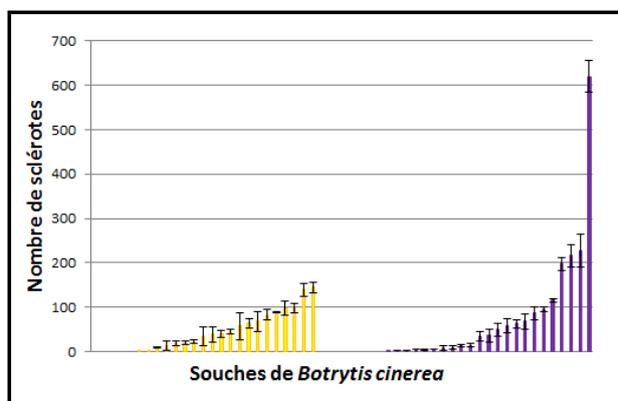


Figure 28 : Evaluation du nombre de sclérotés produits par *B. cinerea*. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en jaune (gauche) et les souches d'origine agricole en rouge (droite).

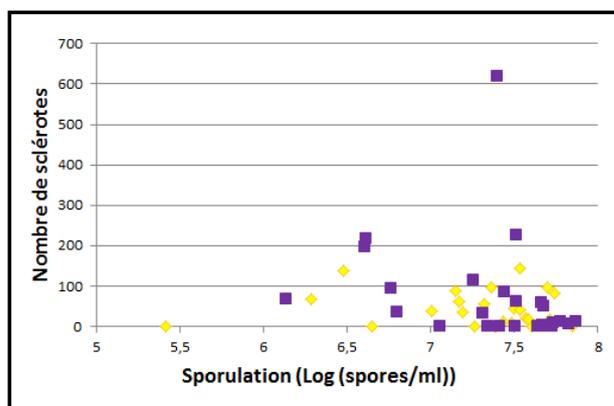


Figure 29 : Corrélation du nombre de sclérotés et du nombre de spores par ml produits par *B. cinerea*. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en jaune (losange) et les souches d'origine agricole en rouge (carré).

II.4 Croissance mycélienne en conditions de stress

Une analyse de variance à trois facteurs permettant de mesurer les effets « souches », « milieu » et « température » indique que les différences sont très significatives ($P < 2.2 \times 10^{-16}^{***}$) entre ces éléments. Les effets « souches » et « températures » sont principalement responsables de la variation à respectivement 41.72% et 41.39%, tandis que l'effet « milieu » est de 21.13%. Une analyse de corrélation

des diamètres à 3 jours entre les deux températures (Figure 30 A) indique une corrélation de 0.942 ($P < 2.2e-16$). L'analyse de la vitesse de croissance radiale entre les températures (Figure 30 B) indique une corrélation de 0.860 ($P < 2.2e-16$). De même que précédemment, l'analyse des diamètres à 3 jours entre les types de milieu (Figure 30 C) donne une corrélation de 0.938 ($P < 2.2e-16$) et des vitesses de croissance entre les types de milieu (Figure 30) de 0.651 ($P = 8.12e-10$). On observe donc que les différences entre les conditions optimales et les conditions oligotrophe sur le développement mycélien sont les plus importantes pour la vitesse de croissance et non pour le diamètre à 3 jours. L'écart entre les conditions se ressent avec le temps.

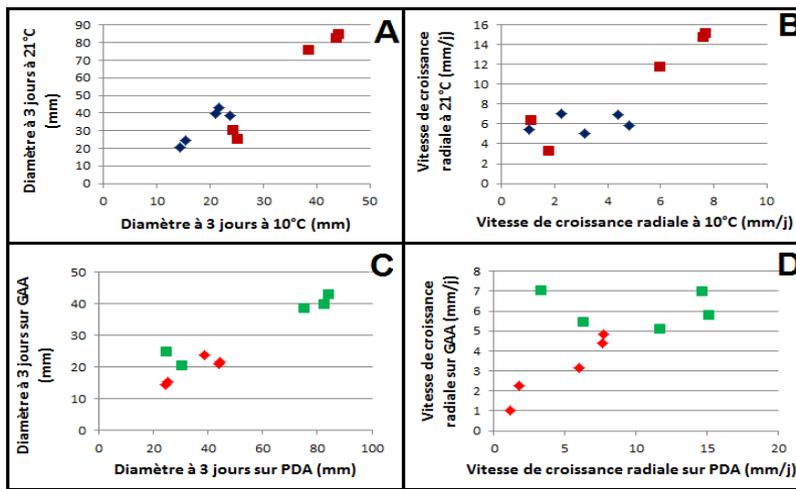


Figure 30 : Corrélations de la croissance mycélienne de *B. cinerea* en conditions de stress. Les carrés rouges (A, B) représentent le milieu PDA et les losanges bleus le milieu GAA. Les carrés verts (C, D) représentent la température de 21°C et les losanges rouges la température de 10°C.

Conclusion

L'ensemble de nos résultats confirme l'intérêt de ce travail, en effet pour la majorité des paramètres étudiées la différence suivant l'origine des souches est significative quel que soit le microorganisme étudié. L'habitat non agricole a donc un rôle important sur le développement de la diversité des biotypes des agents pathogènes des plantes. Leur relation avec les plantes supérieures et en particulier avec les plantes cultivées ne représente qu'une courte période de leur histoire évolutive (Morris *et al.*, 2007).

D'autres travaux relatent l'étude des compromis adaptatifs chez des organismes divers, comme chez le Guppy, un poisson qui adapte sa capacité reproductive et sa vitesse d'esquive du prédateur (Ghalambor *et al.*, 2004). Mann (2011) converse sur la capacité des systèmes biologiques à réaliser les compromis adaptatifs et dépasser les barrières évolutives. Mais il n'existe que peu d'étude chez les agents pathogènes de plantes.

La poursuite de cette démarche par la répétition des tests précédents ainsi que l'ajout de tests complémentaires pourrait permettre une meilleure compréhension de ce phénomène. Des tests d'agressivité sur d'autres espèces de plantes, le développement en milieu acide, basique ou oligotrophe, la survie des sclérotés de *Botrytis cinerea* ainsi que sa dispersion, la motilité de *Pseudomonas syringae* sont autant de paramètres à étudier pour caractériser au mieux ces populations. D'autre part, afin de tester la plasticité des phénotypes de nos microorganismes, il serait intéressant de réaliser l'ensemble de ces tests à partir de spores et bactéries produites en conditions de stress.

Ce qui détermine le pouvoir pathogène et donc l'agressivité d'un microorganisme est complexe et nécessite beaucoup d'énergie, il serait donc important de faire le lien entre cette agressivité mesurée et l'équipement enzymatique et hormonale utilisé par ces souches lors de l'interaction avec la plante. En effet Morris *et al.* (2009) mettent en évidence l'importance des protéines effectrices dans le pouvoir pathogène et l'influence de l'environnement sur ces protéines. Montarry *et al.* (2010) ont mis en évidence que le fitness était corrélé négativement avec la complexité de la virulence chez *Phytophthora infestans* responsable du mildiou de la pomme de terre ;

L'agressivité est parmi les plus importants traits d'histoire de vie d'un agent pathogène, affectant l'incidence et l'impact de l'agent pathogène dans les systèmes humains, agricoles et naturels (Barrett *et al.*, 2011). Morris *et al.* (2009) indiquent notamment la capacité des milieux non agricoles à favoriser l'évolution des traits de vie qui contribuent à la virulence du pathogène. Comprendre l'action et l'importance des habitats alternatifs sur l'histoire de vie des agents pathogènes est essentiel pour

déterminer les coûts généraux de la virulence pour le fitness de ces pathogènes. En élargissant nos paradigmes concernant l'histoire de vie des agents pathogènes ainsi que les forces sélectives qui entraînent leur évolution, nous allons améliorer notre compréhension de la façon dont les agents pathogènes survivent en absence d'hôtes, comment et où de nouveaux pathotypes sont susceptibles d'émerger, et l'importance des habitats naturels pour les épidémies agricoles.

Une compréhension plus complète des forces qui conduisent à l'évolution des agents pathogènes des plantes sera essentielle pour renforcer et diversifier les stratégies durables de lutte contre les maladies, et d'améliorer la prévision des conditions qui favorisent l'émergence de nouveaux agents pathogènes.

Bibliographie

- Agrios GN** (2005). Plant Pathology. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, p. 922.
- Ajouz S** (2009). Thèse pour obtenir le grade de Docteur. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse.
- Alizon S** (2008). Transmission-recovery trade-offs to study parasite evolution. *The American Naturalist* 172:E113-E121
- Amato P, Parazols M, Sancelme M, Paolo L, Mailhot G, Delort A-M** (2007). Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 242–254.
- Bardin M, Monteil C, Leyronas C, Troulet C, Duffaud M, Morris CE** (2012) Sources potentielles d'inoculum de *Botrytis cinerea* en dehors du contexte agricole sensu stricto. 9. Rencontres de Phytopathologie-Mycologie de la Société Française de Phytopathologie, Aussois, France, 2012/01/16-20 (Poster).
- Barrett LG, Bell T, Dwyer G, Bergelson J** (2011). Cheating, trade-offs and the evolution of aggressiveness in a natural pathogen population. *Ecology Letters* 14:1149-1157.
- Blancard D** (2009). Les maladies de la tomate, identifier, connaître, maîtriser. Editions Quae.
- Bradbury JF** (1986). Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute (ed), Slough 332p.
- Burke MJ, Gusta LA, Quamme HA, Weiser CJ, Li PH** (1976). Freezing and injury to plants. *Annu Rev Plant Physiol* 27:507-528
- Cangelosi GA, Freitag NE, Buckley MR** (2004). From outside to inside: environmental microorganisms as human pathogens. A report from the American Academy of Microbiology. Washington (D.C.): American Acad of Mic.
- Castro M, Kramer K, Valdivia L, Ortiz S, Castillo A** (2003). A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters* 228: 87-91.
- Cilindre C, Castro AJ, Clément C, Jeandet P, and Marchal R** (2007). Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by twodimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. *Food Chemistry* 103: 139-149.
- Constantinidou HA, Hirano SS, Baker LS, Upper CD** (1990). Atmospheric dispersal of ice nucleation active bacteria: the role of rain. *Phytopathol* 80:934-937
- Crosse JE** (1959). Bacterial canker of stone-fruits. IV . Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Ann Appl BioI* 47:306-1717.
- de Vay JE, Lukezic FL, Sinden SL, English H, Coplin DL** (1968). A biocide produced by pathogenic isolates of *Pseudomonas syringae* and its possible role in the bacterial canker disease of peach trees. *Phytopathol* 58:95-101
- Dik AJ, Wubben JP** (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses, p. 319-331, in: Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides.
- Plan écophyto 2018** de réduction des usages de pesticides (2008) Ministère de l'agriculture et de la pêche
- Elad Y, Stewart A** (2004). Microbial control of *Botrytis spp*, p. 223-241, in: Botrytis: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Elmer PAG, Michailides TJ** (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops, p. 243-272, in: Botrytis: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- English H, Davis JR** (1960). The source of inoculum for bacterial canker and blast of stone fruit trees. *Phytopathology* 50:634
- Finkers R, Bai YL, van den Berg P, van Berloo R, Meijer-Dekens F, ten Have A, van Kan J, Lindhout P, van Heusden AW** (2008). Quantitative resistance to *Botrytis cinerea* from *Solanum neorickii*. *Euphytica* 159: 83-92.
- Fournier E, Giraud T** (2008). Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J of Evol Biol* 21: 122-132.
- Gaignard JL, Luisetti J** (1993). *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie* 13:333-370.

- Ghalambor CK, Reznick DN, Walker JA** (2004). Constraints on adaptative evolution: the functional trade-off between reproduction and fast-start swimming performance in the Trinidadian Guppy. *The American naturalist* 164(1):38-50.
- Gross DC** (1991). Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annual Review of Phytopathology* 29:247-278.
- Gross DC, Cody YS** (1985). Mechanism of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. *Canadian Journal of Microbiology* 31:403-410.
- Gullino ML** (1992). Chemical control of *Botrytis* spp. 217-222, in: Recent advances in *Botrytis* research. K. Verhoeff, N. E. Malathrakakis and B. Williamson, eds. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- He SY, Nomura K, Whittam TS** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694: 181-206.
- Hirano SS, Upper CD** (1983). Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 21:243-69.
- Hirano SS, Upper CD** (1990). Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annual Review of Phytopathology* 28:155-77.
- Brismontier E, Nicot PC, Pitrat M** (2009) Ecophyto R&D, vers des systèmes de cultures économes en produits phytosanitaires, Tome V : analyse comparative de différents systèmes en cultures légumières. INRA
- Issartel J** (2007). Thèse pour obtenir le grade de Docteur. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Jarvis WR** (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada, p. 195.
- Jarvis WR** (1980). Epidemiology, p. 219-50, in: The biology of *Botrytis*. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.
- Lindow SE** (1983). The role of bacterial ice nucleation in frost injury. *Plant Annual Review of Phytopathology* 21:363-384.
- Lindow SE, Brandl MT** (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology* 69:1875-1883.
- Mann D** (2011). Natural world contradiction matrix: How biological systems resolve trade-offs and compromises. *Procedia Engineering* 9: 714-723.
- Martinez F, Dubos B, Fermaud M** (2005). The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* 95: 692-700.
- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL** (2002). Antibiotic use in plant in agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 40:443-+.
- Meyers LA, Bull JJ** (2002). Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends in Ecology & Evolution* 17:551-557.
- Montarry J, Hamelin FM, Glais I, Corbière R, Andrivon D** (2010). Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *BMC Evolutionary Biology* 10:283
- Morris CE, Glaux C, Latour X, Gardan L, Samson R, Pitrat M** (2000). The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France. *Phytopathology* 90: 636-646.
- Morris CE, Georgakapolous D, Sands DC** (2004). Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *Journal of Physics* 121: 87-103.
- Morris CE, Kinkel LL, Kun X, Prior P, Sands DC** (2007). A surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infectious Genetics and Evolution* 7: 84-92.
- Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, Buffière A, Yan S, Dominguez H, Thompson BM** (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME Journal* 2(3): 321-334.
- Morris CE, Bardin M, Kinkel LL, Moury B, Nicot PC, Sands DC** (2009). Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. *PLoS Pathogens* 5:e1000693.
- Morris CE, Bardin M, Kinkel LL, Moury B, Nicot PC, Sands DC** (2010). Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. *PLoS Pathogens*: in press.
- Morris CE, Sands DC, Vanneste JL, Montarry J, Oakley B, Guilbaud C, 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(3):e00107-10.

Riffaud CM-H, Morris CE (2002). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in irrigation water retention basins by immunofluorescence colony staining. Eur J Plant Pathol 108: 539–545.

Roux M, Ameziane N, David J (1997). Compromis adaptatifs et ontogenèse chez les crinoïdes pédonculés. Geobios 30, Sup 2(0): 319-327.

Rudolph K et Sonneberg B (1997). Role exopolysaccharides from *Pseudomonas syringae* pathovars in pathogenesis. 265-270. In : Rudolph K, Burr TJ, Mansfield JW, Stead S, Vivian A et Von Kietzell J (eds). *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (NL).

Sands DC, Langhans VE, Scharen AL, de Smet G (1982). The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications. J Hungarian Meteorol Serv 86: 148–152.

Scortichini M (2010). Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and fruit trees species. J. Plant. Pathol. 92 :S73-S78.

Troisfontaines P et Cornelis GR (2005). Type III secretion : More systems than you think. Physiology 20:326-339.

Vaczy KZ, Sándor E, Karaffa L, Fekete E, Fekete E, Árnayasi M, Czeglédi L, Kövics GJ, Druzhinina IS, Kubicek CP (2008). Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in hungarian vineyards. Phytopathol 98:1313-1319.

Van Kan J (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. Trends in Plant Science 11: 247-253

Vanneste JL, Poliakoff F, Audusseau C, Cornish DA, Paillard S, Rivoal C et al. (2011). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*, the causal agent of bacterial canker fruit of kiwifruit in France. Plant Dis 95:1311.

Walker AN, Gautier A, Confais J, Martinho D, Viaud M, Le Pêcheur P, Dupont J, Fournier E (2011). *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in french vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. Phytopathol 12: 1433-1445.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan J (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8: 561-580

Wolber PK, Deininger CA, Southworth MW, Vandekerckhove J, Vanmontagu M, Warren GJ (1986). Identification and purification of a bacterial ice nucleation protein. Proc Natl Acad Sci USA 83:7256-7260.

Wu MD, Zhang L, et al. (2007). Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. Phytopathol 97(12): 1590-1599.

Young JM (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. J Plant Pathol 92:S5-S14.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux

Tampon phosphate (Tp1) :

8,75g de K₂HPO₄

6,75g de KH₂PO₄

1L d'eau distillée

Agitation

Autoclaver

Bouillon nutritif :

4,5g de Nutrient Broth

2g d'Extrait de levure

5g de Pectine de pomme

1L d'eau distillée

Agitation

Autoclaver

Milieu B de King :

1,5g de K₂HPO₄

1,5g de MgSO₄ 7H₂O

15g de Protéose Peptone N°3

10ml de Glycerol

15g d'Agar

1L d'eau distillée

Agitation

Autoclaver

Milieu PDA (Patatoes Dextrose Agar)

39g de Patatoes Dextrose Agar

1L d'eau distillée

Agitation

Autoclaver

GAA :

1g de Glucose

0,1g de NH₄NO₃

15g d'Agar

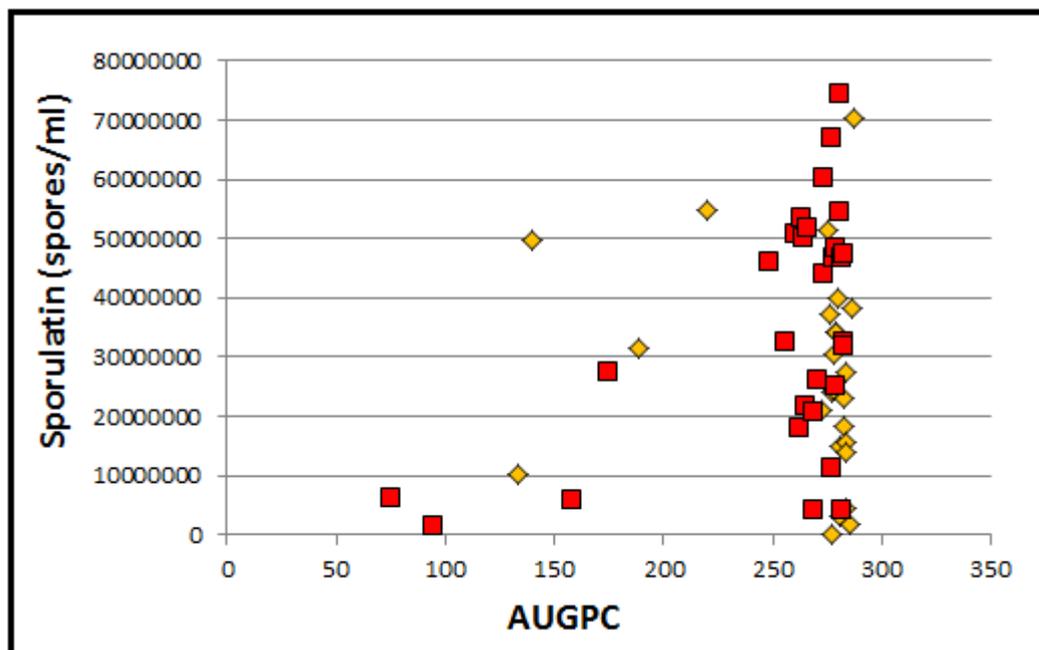
1L d'eau distillée

Agitation

Autoclaver

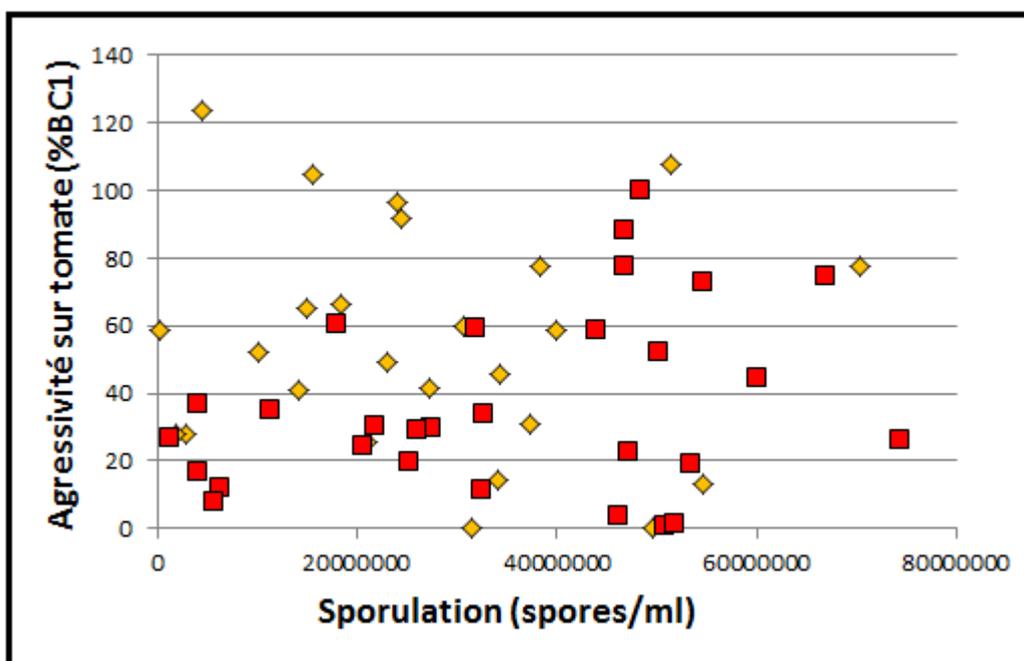
Annexe II : Compléments graphiques

Annexe II, A : Complément graphique de l'analyse de corrélation entre la production de spores par ml et l'AUGPC de la croissance mycélienne de *B. cinerea*.



Corrélation du nombre de spores produites par ml et l'AUGPC de *B. cinerea*. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en jaune (losange) et les souches d'origine agricole en rouge (carré).

Annexe II, B : Complément graphique de l'analyse de corrélation entre la production de spores par ml et l'indice d'agressivité sur tomate.



Corrélation du nombre de spores produites par ml et l'indice d'agressivité de *B. cinerea* déterminé sur tomate. Les souches d'origine non agricoles sont représentées en jaune (losange) et les souches d'origine agricole en rouge (carré).