

REPULIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE POPULATION
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie
Département De Biotechnologies

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Sciences de la Nature
et de la Vie

Spécialité : Biologie des Interactions Plantes- Microorganismes.

Thème

Dépistage de bactéries phytopathogènes transmises
par semences de diverses plantes cultivées.

Présent par :

M^{elle} GHEZALI Imane

Devant le jury compose de :

M^{me} MOHAMED MAHMOUD.F	M.A.A, USD de Blida	Présidente
M^{me} KRIMI.Z	Professeur, USD de Blida	Promotrice
M^{me} BOUDJEMIA.H	M.A.A, USD de Blida	Examinatrice
M^{elle} TAFIFET.L	M.A, USD de Bouira	Examinatrice

2014/2015

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, à qui je dois cette fierté et qui m'ont beaucoup soutenu et aidé.

À mes sœurs et mes frères.

À toute ma famille.

À tous mes ami(e)s et à tous membre de ma promotion.

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mme KRIMIE Zolikhia, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahlab de Blida pour M'avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de phytopathologie. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'accordée m'ont permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme MOHAMED MAHMOUD.F, Maîtres de conférences à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université SAAD DAHLAB de Blida d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme BOUDJMIJAH et à Melle TAFIFAT.L, Maîtres de conférences à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université SAAD DAHLAB de Blida pour l'honneur qu'elles nous ont fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Un grand merci à mes très chers parents, mes sœurs et mes frères pour leur encouragement sans oublier YOUCEF.

Mes remerciements sont également adressés à Mme ANNAM Salma, ingénieurs du laboratoire de phytopathologie pour ces conseils et ces encouragements.

Enfin, un remerciement spécial à mes camarades, pour leur soutien moral, leur aide et leur solidarité.

Merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail.

IMANE

Liste des abréviations

Do: Densités optique.

Gram-: Gram negative.

Gram+: Gram positive.

H₂O₂: Eau Oxygéné.

KB: Milieu de culture King B.

LPGA: Milieu de culture.

UV: Ultra-violet.

Liste des figures

Figure 1 : Voies de dissémination des bactéries aux semences: pénétration directe systémique (A) et pénétration indirecte (B).....	12
Figure 2 : Les différentes espèces des semences (A : Courgette, B : Melon, C : Concombre, D : Haricot, E : Petit-pois, F : Betterave, G : Pomme de terre, H : Tomate, I : Chou).....	26
Figure 3 : Isolement des bactéries à partir des embryons des semences.....	29
Figure 4 : Schéma général du protocole expérimental de l'étude des bactéries transmises par semences.....	33
Figure 5: Résultats de l'isolement des bactéries à partir des échantillons de semences.....	35
Figure 6: Résultats de la réaction d'hypersensibilité sur le tabac de l'inoculation des isolats de semences.....	36
Figure 7: A : Résultat du test d'hypersensibilité sur le tabac après 3 jours d'inoculation B : Témoin négatif inoculé à l'eau distillée stérile.....	37
Figure 8 : A : Résultat du test d'hypersensibilité sur le tabac après une semaine d'inoculation B : Témoin négatif inoculé à l'eau distillée stérile.....	37
Figure 9 : Résultat du test de pathogénicité sur la pomme de terre.....	39
Figure10 : Résultats de la coloration de Gram.....	40
Figure11 : Résultat du test de fluorescence.....	40
Figure 12: Réaction au test catalase.....	40
Figure13 : Résultat de l'activité Cytochrome oxydase (A : positif, B : négative).....	41
Figure 14 : Résultat de test oxydation fermentation.....	41

Liste des tableaux

Tableau1 : Les différentes espèces et variétés des semences expérimentées.....	27
Tableau 2 : Résultats de la caractérisation macroscopique et microscopique des isolats bactériens isolés des semences étudiées.....	38
Tableau3 : Résultats de coloration de Gram.....	39
Tableau4 : Réponses biochimiques des isolats bactériens des semences étudiées.....	42
Tableau5 : Identification des bactéries pathogènes.....	43

Sommaire

Dédicace.....	I
Remerciements.....	II
Liste des abréviations.....	III
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Sommaire.....	VI
Résumé.....	VII
Abstract.....	VIII
المخلص.....	IX
Introduction.....	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences.....	4
1. Semences, définitions.....	5
2. Qualité des semences.....	5
3. Constitution de la semence.....	8
4. Production des semences.....	9
2. Les bactéries transmises par semences.....	11
3. Méthodes de détection des bactéries transmises par semences.....	18
4. Méthodes de lutte contre les bactéries transmises par semences.....	19
Chapitre II: Matériel et méthodes.....	25
Objectif de l'expérimentation.....	26
1. Matériel végétal (semences).....	26
2. Méthode d'isolement des bactéries.....	27
3. Purification et conservation des souches.....	29
4. Tests d'identification des bactéries.....	30
Chapitre III: Résultats et discussion.....	34
1. Résultats.....	35
2. Discussion.....	43
Conclusion et perspective.....	48

Références bibliographiques.....	51
Annexe.....	62
Table des matières.....	63

RESUME

Dépistage des bactéries phytopathogènes transmises par semences de diverses plantes cultivées.

La présente étude s'inscrit dans la problématique de recherche et d'identification des bactéries phytopathogènes transmises par semences. Neuf échantillons de semences des principales plantes cultivées en Algérie (pomme de terre, tomate, concombre, courgette, chou, haricote, petite pions, melon, betterave) ont été analysés pour la présence de bactéries phytopathogènes. Selon le cas, nous avons procédé à l'isolement des bactéries à partir de la semence entière et à partir de l'embryon. L'isolement sur deux milieux de culture, un milieu général et un autre spécifique, nous a permis d'obtenir 94 isolats qui ont été purifiés et conservés pour les tests ultérieurs.

La totalité des isolats ont subi la réaction d'hypersensibilité pour détecter ceux qui produiraient une réaction nécrotique après infiltration des limbes foliaires du tabac (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi). La réaction nécrotique révèle la pathogénicité des souches isolées. L'analyse biologique a mis en évidence de la capacité d'induire la nécrose de 17 souches bactériennes (18%). Le reste des souches (82%) constitue une proportion importante de bactéries saprophytes et endophytes véhiculée par la semence.

L'étude des caractères biochimiques des souches pathogènes à travers le test de coloration de Gram, la recherche des enzymes de type oxydase et catalase, le test de fluorescence sur le milieu King B et le type respiratoire par oxydation/fermentation du glucose, nous a permis de supposer la présence de trois genres de bactéries : *Clavibacter* spp. (76%), *Ralstonia* spp. (18%) et *Pectobacterium* spp. (6%). Ces genres sont communément regroupés des bactéries phytopathogènes transmises par semences.

Mots-clé : bactérie phytopathogène, semence, dépistage.

ABSTRACT

Screening for phytopathogenic bacteria transmitted by diverse plant seed grow.

This study is part of the problem of search and identification of seed-borne phytopathogenic bacteria. Nine seed samples of the main crops in Algeria (potato, tomato, cucumber, courgette, cabbage, haricote, melons, beets) were analyzed for the presence of phytopathogenic bacteria. As appropriate, we proceeded to the isolation of bacteria from the whole seed and from the embryo. Isolation on two culture media, general and another specific, we achieved a 94 isolates were purified and stored for subsequent tests.

All isolates underwent hypersensitivity reaction to detect those which would produce a necrotic reaction after infiltration of tobacco leaf limbs (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi). The necrotic reaction reveals the pathogenicity of strains isolated. The bioassay showed the ability to induce the necrosis of 17 bacterial strains (18%). The rest of the strains (82%) is a significant proportion of saprophytic bacteria and endophytic mediated by seeds.

The study of biochemistry pathogenic strains through the Gram stain test, looking for oxidase enzymes and catalase, the fluorescence test on the culture media King B and respiratory type oxidation / fermentation of glucose, we have may assume the presence of three genera of bacteria: *Clavibacter* spp. (76%), *Ralstonia* spp. (18%) and *Pectobacterium* spp. (6 %). These types are commonly grouped plant pathogenic bacteria transmitted by seeds.

Keywords: Phytopathogenic bacteria, seed, diagnostics.

الكشف عن البكتيريا

للمحاصيل المختلفة

دراستنا تتمحور حول إشكالية تحديد البكتيريا الممرضة المنتقلة عبر البذور. هذه الدراسة تتمحور حول إشكالية والتعرف على البكتيريا الممرضة للنبات التي تنتقل عن طريق البذور. وقد تم تحليل عينات من تسعة بذور المحاصيل الرئيسية في الجزائر (, , الخيار , , الفاصوليا , بطيخ و شمندر) عن وجود البكتيريا الممرضة للنبات ، انتقلنا إلى عزل البكتيريا من البذور كله ومن الجنين. عملية العزل تمت على وسطين عزل و تنقية 94 فصيلة وتخزينها لاختبارات لاحقة.

جميع الفصائل المعزولة خضعت لكشف رد فعل فرط الحساسية على .
يكشف عن التحليل البيولوجي أظهر القدرة على بكتيرية (18) .
بقية (82) هي نسبة كبيرة من البكتيريا غير الممرضة المحمولة على .

دراسة الكيمياء الحيوية السلالات المسببة للأمراض من خلال اختبار صبغة جرام، وتبحث عن الانزيمات أوكسيداز التنفسية تنفس/تخمر , اختبار الفلورة في الوسط KingB ,

البكتيريا Clavibacter spp 76% تليها Ralstonia spp 18 Pectobacterium spp 6 .
هذه الأنواع التي تم تجميعها مسببة للأمراض النبات التي تنتقل عن طريق البذور.

المفتاحية: البكتيريا المسببة للأمراض النبات

Introduction

Dans leur environnement, les plantes sont en contact permanent avec de nombreux parasites, dans la mesure où elles constituent d'excellents écosystèmes pour ces organismes. Ces bio-agresseurs phytopathogènes incluent les champignons, les bactéries, les virus, les viroïdes et les nématodes (Bally, 2006).

Parmi les agents pathogènes responsables de pertes économiques importantes, les bactéries sont considérées comme des agents bioagresseurs redoutables, car, la plupart sont classées dans la liste des organismes de quarantaine (Dagenais, 2010). La plupart des bactéries phytopathogènes appartiennent aux genres tels que; *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Phytoplasma* et *Spiroplasma*, Ils causent des maladies très graves parmi elles, le chancre de la tomate la moucheture bactérienne de la tomate, la pourriture molle de la pomme de terre et la pourriture noire du chou (Pao et al, 2005 ; Sarah et al, 2014).

La dissémination des maladies bactériennes est assurée par diverses manipulations telles que; la transplantation (Gitaitis et al , 1991), les traitements phytosanitaires, l'irrigation (Chang et al, 1992) et les semences infectées (Hausbeck et al, 2000). Les bactéries phytopathogènes transmises par semences assurent leur infection à travers le métabolisme principal et secondaire de la plante, leur pouvoir pathogène est essentiellement enzymatique ou toxigène (Heulin, 1999).

Les bactéries phytopathogènes transmises par les semences agissent comme une source d'inoculum primaire pour de nombreuses maladies bactériennes importantes. Par conséquent, les dégâts sont économiquement importants à leurs hôtes respectifs où dans la plupart des cas, ils provoquent des dommages sur les cultures tout au long du cycle de production et parfois même causent la mort au moment de la germination (Blancard, 1998 ; Gitaitis and Walcott 2007). Ces organismes sont capables d'infecter les plantes et d'entraîner des maladies responsables de pertes importantes pour les récoltes; c'est pourquoi la protection des cultures contre ces agents pathogènes est d'une importance majeure.

Le contrôle de ces maladies des plantes doit d'être efficace en utilisant des méthodes de lutte conventionnelles représentées par les méthodes physiques, génétiques, biologiques, et les facteurs humains . Les méthodes de lutte chimiques ont apporté des solutions rapides, générales, simples et efficaces aux problèmes de protection des cultures. Elles sont efficaces

contre les champignons par l'utilisation de fongicides alors que les maladies virales et bactériennes sont incurables et nécessitent des moyens de lutte préventifs. La prévention passe par les méthodes culturales prophylactiques mais également par un contrôle rigoureux des semences par application de mesures législatives lors de l'importation et l'exportation des semences afin de prévenir la dissémination et l'introduction des organismes de quarantaine (Anonyme, 2005). Dans le présent travail, nous avons recherché par des méthodologies classiques de laboratoire, la présence de bactéries transmises par les semences de quelques plantes cultivées.

Pour réaliser cette étude, nous avons collecté des échantillons de semences de diverses variétés d'espèces végétales cultivées, dont certaines sont produites localement ou alors importées.

Pour réaliser les objectifs de notre travail, une série d'étapes ont été nécessaires :

- Extraction des bactéries des semences ;
- Isolement, purification, et conservation des bactéries isolées ;
- Identification biologique (hypersensibilité sur le tabac, test du pouvoir pathogène) ;
- Identification biochimique ;
- Analyse des résultats obtenus et leur discussion par rapport à la bibliographie en rapport avec l'aspect de pathologie des semences.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

1. Semences, définitions

La semence est un organe de reproduction des végétaux supérieurs, elle est destinée à donner naissance à une nouvelle génération de plantes au cours du processus de germination. La semence assure par conséquent la survie de l'espèce (Multon, 1982).

Malgré leur similarité physique, le grain et la graine se distinguent par leur destination. Le premier peut être directement consommé ou transformé en huiles ou en farines, la seconde, elle, ne sert qu'à sa reproduction (Anvar, 2008).

Au sens commun, la semence se définit comme la « graine ou autre partie d'un végétal, apte à former une plante complète après semis ou enfouissement » (www.larousse.fr).

2. Qualité des semences

L'utilisation d'une semence de mauvaise qualité aura comme conséquence la production de plantules et d'arbres de mauvaise qualité, sinon, pas de plantules levées. Selon Domergue et Pirot (2008), une bonne semence possède les qualités suivantes

2.1. Qualité physique des semences

La qualité physique d'un lot de semences doit comporter les caractéristiques, développées ci-dessous.

2.1.1. Un minimum de semences endommagées

Les semences endommagées (cassées, fendues ou déformées) peuvent ne pas germer et sont plus facilement agressées par les insectes ou les micro-organismes. Il est possible d'éliminer la plupart des semences endommagées au cours du traitement (conditionnement).

2.1.2. Une quantité minimale de semences de mauvaises herbes ou de matières inertes

Les semences de bonne qualité ne devraient pas contenir de semences de mauvaises herbes, de sons, de pierres, et de semences d'autres cultures. Presque toutes ces impuretés peuvent être éliminées au cours du conditionnement.

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

2.1.3. Un minimum de semences malades

La décoloration ou les taches sont des symptômes suggérant que la semence peut présenter des micro-organismes qui l'ont déjà agressée ou qui l'agresseront lorsqu'elle commencera à pousser. La plante peut survivre et propager la maladie.

2.1.4. Taille uniforme des semences

Les semences matures de taille moyenne et grande auront généralement une germination et une vigueur plus importantes que celles des semences petites et immatures.

Lors du conditionnement d'un lot, les semences petites et légères sont habituellement éliminées.

2.2. Qualité physiologique des semences

Le pourcentage de germination est un indicateur de la capacité des semences à lever et à produire une plante dans des conditions normales. La vigueur de la semence est sa capacité à lever et à survivre dans des conditions potentiellement difficiles et à avoir une croissance rapide dans des conditions favorables. La perte de capacité de germination est la dernière étape d'un long processus de détérioration (perte graduelle de viabilité) (Chaux et Foury, 1994).

La diminution de vigueur et d'autres changements physiologiques se produisent avant la perte de germination. Par conséquent, les semences ayant une germination acceptable peuvent avoir une vigueur faible (Heller et al, 2004).

Les semences peuvent exercer leur fonction biologique uniquement si elles sont viables. Par conséquent, l'uniformité physique des semences d'une variété adaptée sera inutile si leur germination et leur vigueur sont faibles ou si elles ne réussissent pas à germer une fois ensemencées (Gate et Giban, 2003).

La différence entre une graine et une semence est que la première peut germer ou pas, tandis que la seconde doit germer. C'est pourquoi un taux de germination élevé est une spécification technique extrêmement importante chez les semences (Chaux et Foury, 1994).

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

2.3 .Qualité génétique des semences

2.3.1. Semences de la même variété

Au sein des espèces cultivées comme, le maïs, le riz ou les arachides, il existe des milliers de types différents de chaque culture, qui sont appelés «**variétés**» ou «**cultivars**». Les plantes produites par les semences d'une variété présentent les mêmes caractéristiques et se reproduisent d'une génération à l'autre. Un cultivar est défini comme un ensemble de plantes cultivées qui peut se distinguer clairement par toute caractéristique ; morphologique, physiologique, cytologique, chimique ou autres) et qui, une fois reproduite (par voie sexuée ou asexuée), conserve ses caractères distinctifs (Chaux et Foury, 1994).

2.3.2 .Les variétés améliorées

Les variétés améliorées résultent des programmes de sélection végétale et de développement variétal, des essais multi locaux, des systèmes nationaux d'homologation des variétés et des systèmes formels de production semencière (Hopkins ,2003).

2.3.3. Les variétés traditionnelles (connues également sous le nom de variétés locales)

Les variétés traditionnelles sont produites et conservées par les agriculteurs à partir d'autres types de variétés. Il peut s'agir d'une population locale de plantes sélectionnées par les agriculteurs ou de variétés améliorées mises en circulation. Les semences des différentes variétés de la même culture sont souvent difficiles ou impossibles à reconnaître une fois récoltées. Le mélange des différentes variétés de la même culture ou espèce peut se produire lorsque la graine/les semences sont vendues ou rentrent dans les systèmes formels et informels de commercialisation.

Un mélange de variétés peut atteindre la taille adulte à des moments différents, ce qui peut créer des problèmes dans la récolte et dans le conditionnement après la récolte, et produire des rendements plus faibles (Heller et al, 2004). L'inspection au champ, suivie de l'épuration par élimination des plantes indésirables, pendant la période de végétation des cultures est une des étapes qui sont entreprises pour optimiser la pureté variétale. Cependant, il faut souligner que les variétés traditionnelles ou locales, surtout les variétés à pollinisation croisée utilisées par les agriculteurs, sont souvent des populations de plantes qui ne sont pas très uniformes. Cette

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

hétérogénéité peut représenter un avantage dans certaines situations, comme dans les cas de précipitations peu fréquentes, de faible fertilité et d'attaques de ravageurs et de maladies.

Au Burundi, par exemple, les agriculteurs préfèrent planter des semences de haricots qui sont constituées d'un mélange de plusieurs variétés (Heller et al, 2004).

2.3.5. Tolérance aux ravageurs et aux maladies

On parle de tolérance aux ravageurs et aux maladies (facteurs biotiques) lorsqu'une plante peut vivre avec ces organismes sans souffrir de pertes significatives de rendement et de qualité. La tolérance aux principaux ravageurs et aux principales maladies est, évidemment, extrêmement importante et représente un des objectifs majeurs des sélectionneurs. La résistance aux maladies et aux ravageurs est définie comme la résistance absolue aux dommages provoqués par ces organismes. La tolérance et la résistance peuvent se dégrader avec le temps en raison des mutations des parasites ou des hôtes. Les sélectionneurs recherchent toujours de nouvelles sources de résistance et de tolérance. Il est important d'obtenir des informations précises sur la tolérance aux ravageurs et aux maladies d'une variété au moment où l'introduction de nouvelles cultures et variétés est prise en considération (Chaux et Foury, 1994).

2.4. Qualité et état sanitaire des semences

L'état sanitaire des semences renvoie à la présence ou à l'absence d'organismes responsables de maladies, comme les champignons, les bactéries et les virus, ainsi que de ravageurs, notamment les nématodes et les insectes. On réalise les essais de l'état sanitaire des semences dans les laboratoires de semences pour en évaluer la qualité sanitaire (Gate et Giban, 2003).

Il est important d'assurer un bon état sanitaire aux semences car:

1. Les maladies déjà présentes pourraient entraîner le développement progressif des maladies au champ et réduire la valeur commerciale des cultures;
2. Les lots de semences importées pourraient introduire des maladies ou des ravageurs dans des régions où ils n'étaient pas présents.

La meilleure façon d'éviter la contamination par les ravageurs et par les maladies est l'utilisation de pratiques adéquates de production semencière, c'est-à-dire le contrôle des

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

ravageurs et des maladies au cours du processus de production. Certaines maladies transmises par les semences peuvent être contrôlées ou supprimées par le traitement des semences au cours du conditionnement ou juste avant la plantation. L'utilisation de produits de traitement des semences est hautement réglementée aux niveaux national et international et doit être gérée avec attention. Des précautions particulières lorsque les semences traitées sont distribuées aux agriculteurs sont prises (Domergue et Pirot, 2008).

3. Constitution de la semence

Toute semence est constituée par au moins une graine (Multon, 1982). Les graines ont toutes fondamentalement la même constitution. Elles comprennent l'enveloppe qui entoure la graine, l'albumen c'est le tissu de réserve de la graine est constitué de cellules remplies de grains d'amidon (Boulal et al, 2007) et l'embryon qui est noyé ou non dans un tissu de réserve et entouré par un ou deux téguments. La structure essentielle de la graine, est le cotylédon ou scutellum : dont la fonction consiste à mobiliser et à absorber les nutriments lors de la germination (Hopkins, 2003).

4. Production des semences

L'intérêt principal de la production de semences est l'obtention d'une grande quantité de semences identiques, à partir d'une petite quantité. La production de semences implique différents acteurs et différentes étapes. Les différents acteurs sont :

Les chercheurs : ils créent les nouvelles variétés, développent les fiches techniques d'accompagnement qu'ils mettent à la disposition des services demandeurs des semences de pré-base et/ou des semences de base de la variété créée homologuée. Ils assurent la responsabilité de conservation et de maintenance des semences de souche et la multiplication de semences pré-base. Cette étape est rigoureuse, elle requiert l'élimination stricte des plants hors-types, des plants malades et des plantes d'autres espèces cultivées ainsi que des adventices dangereuses. Chaque variété est accompagnée d'une fiche technique (David, 1998).

Les producteurs semenciers (organismes de développement ou particuliers) : ils acquièrent les semences de la recherche (semences de pré-base ou de base) et les multiplient pour obtenir des semences de base ou certifiées, dans un but économique (David, 1998).

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

Les contrôleurs semenciers : ils dépendent de l'état, leur rôle est de contrôler la production de semences et d'attester du respect des normes établies pour leur certification. Le contrôle se fait en deux étapes : les inspections au champ et les analyses de laboratoire (David, 1998).

Les différentes étapes sont :

G0 : C'est le matériel de départ ; Il est issu d'autofécondations effectuées par le sélectionneur de la variété.

G1, G2, G3 : Ce sont les semences de pré-base : elles correspondent à des générations successives de multiplication dont la responsabilité est confiée à l'obteneur public ou privé de la variété. La tâche principale est la production de semences par autofécondation par utilisation de sachets d'autofécondation pour protéger la panicule ou par la pollinisation libre.

G4 : Ce sont les semences de base : elles sont obtenues à partir de la multiplication des semences de G3.

R1, R2 : Ce sont les semences certifiées de première et deuxième reproduction (R1 : issue des semences de base et R2 : issue de R1) (David, 1998 ; Amadou et al, 2008).

1.5. Stockage des semences

Le stockage des semences est la conservation des semences dans des conditions d'environnement contrôlées qui maintiennent la viabilité des semences pendant de longues périodes.

La longévité des semences dépend de la qualité initiale des semences, du taux d'humidité et de la température au cours du stockage. En général, un taux d'humidité bas et une température basse réduisent la perte de viabilité des semences. Diverses combinaisons de taux d'humidité et de températures peuvent être utilisées pour prolonger la viabilité des semences pendant le stockage (Cromarty, 1982).

Les deux options disponibles pour le stockage des semences sont les chambres froides et les réfrigérateurs. Le choix dépend du nombre d'accessions à stocker, de la taille des semences et des températures de stockage sélectionnées. Lorsque les collections sont petites et que des températures justes en dessous de zéro sont requises, des congélateurs verticaux ou horizontaux représentent une option peu onéreuse pour le stockage des semences (FAO/IPGRI, 1994).

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

Le stockage des échantillons de semences nécessite différentes étapes :

a) La vérification du nombre de semences dans l'accession

1. Les semences de chaque accession sont pesées, le poids des semences est ensuite convertit en nombres en utilisant le poids de 100 graines ou de 1000 graines.
2. Une vérification est effectuée ; l'échantillon doit contenir plus que le nombre requis de semences pour un échantillon génétiquement homogène (3000–4000 semences) ou un échantillon génétiquement hétérogène (4000–12000 semences).
3. Si l'échantillon contient moins que la quantité requise, il est procédé directement à la régénération, soit au stockage temporaire dans la banque de gènes et sa régénération est assurée à la première opportunité.

b) Identification d'un emplacement pour le stockage

L'étape suivante est de déterminer l'endroit à l'intérieur de la salle de stockage ou du congélateur auquel l'accession va être stockée.

1. il est nécessaire de vérifier le fichier d'inventaire pour trouver l'espace disponible pour l'accession.
2. Assigner l'espace auquel l'accession va être placée. Si l'accession est stockée dans plus d'un conteneur, les garder tous ensemble.

c) Placement des semences dans l'espace de stockage

Une liste des espaces assignés où chaque accession va être placée est dressée.

d) saisie des données (dans la base de données)

Les données concernant la place de stockage, la date et le nombre de conteneurs dans le fichier d'inventaire sont saisies (Linington, 2003).

2. Les bactéries transmises par semences

La semence peut héberger des organismes phytopathogènes au cours de son cycle de vie. Ces derniers affectent sa qualité et provoquent une diminution de la vigueur de la plantule ou sa mort au moment de la germination.

Les bactéries sont des organismes microscopiques constitués d'une seule cellule et se reproduisent par simple division et à une très grande vitesse. Le caractère pathogène de ces bactéries est d'ailleurs lié à leur extraordinaire capacité de se multiplier anormalement ou à leur possibilité génétique d'élaborer des substances dangereusement toxiques (Laffont, 1985).

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

2.1. Voies de dissémination des bactéries à la semence

D'une manière générale, les bactéries s'établissent sur ou à l'intérieur de la semence, leur invasion peut alors se faire soit directement à travers le xylème de la plante mère (par voie systémique) ou alors par pénétration indirecte à travers la paroi des tissus de l'ovaire (Figure 1). Dans le cas de la dissémination directe, les bactéries présentant une phase de développement systémique envahissent le système vasculaire des plantes et continuent ce parcours jusqu'aux tissus des graines sans l'expression de symptômes externes de la maladie. Exemples: *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*, *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* dans le cas du haricot. Dans le cas de la dissémination indirecte, l'infection se produit via les parties de la fleur/ fruits aux tissus de l'ovaire et des ovules il s'agit d'un processus d'invasion limité (non systémique) (Baker and Smith, 1996).

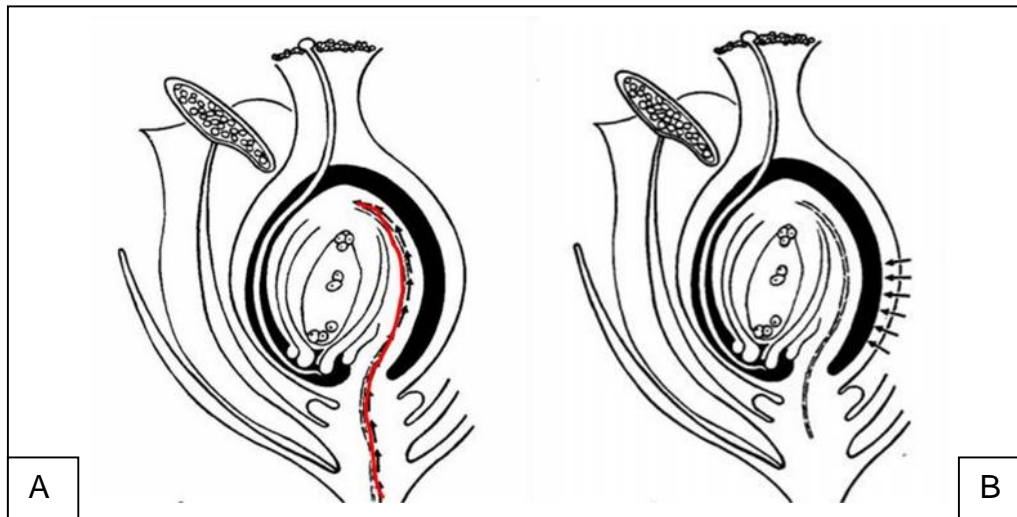


Figure 1 : Voies de dissémination des bactéries aux semences : pénétration directe systémique (A) et pénétration indirecte (B) (Baker and Smith, 1996)

2.2. Inventaire des différents genres de bactéries phytopathogènes transmises par semences

2.1.1. *Ralstonia* spp.

Ralstonia spp. est un genre qui regroupe plusieurs espèces de *Beta-Proteobacteria*, de l'ordre des *Burkholderiales* et de la famille des *Burkholderiaceae*, Gram-négatives constituées de

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

bactéries telluriques, pathogènes aux végétaux. La gamme d'hôtes est très large, elle est constituée de plus de 55 familles botaniques (Yabuuchi et al., 1996).

2.1.1.1. *Ralstonia solanacearum*

Le flétrissement bactérien est une phyto-bactériose vasculaire d'origine tellurique provoquée par *Ralstonia solanacearum*. Elle constitue l'une des maladies bactériennes les plus nuisibles au niveau mondial (Schell, 2000).

Le spectre d'hôtes de *Ralstonia solanacearum* est très large, il comprend environ 200 espèces végétales appartenant à plus de 55 familles botaniques. Le flétrissement bactérien cause des dégâts importants sur les Solanacées cultivées (tomate, pomme de terre, aubergine et poivron) et sur les Cucurbitacées (melon, concombre) (Cariglia et al, 2004). Les symptômes sur la tomate, se manifestent d'abord avec une épinnostie foliaire et l'apparition de bourrelets et de racines adventives sur la tige, accompagnés d'exsudats bactériens blanchâtres sortant des vaisseaux et un brunissement des vaisseaux du xylème.

Sur la pomme de terre, les symptômes se manifestent par un flétrissement progressif des plants. Les tubercules présentent des exsudats bactériens blanchâtres sortant des vaisseaux qui brunissent et peuvent entraîner leur pourriture (Vasse et al, 1995 ; Araud-Razou et al, 1998).

2.1.2. *Pseudomonas* spp.

Le genre *Pseudomonas* regroupe plusieurs espèces de bactéries Gram-négatives, de la section des *Gammaproteobacteria*, de l'ordre des *Pseudomonadales*, et de la famille des *Pseudomonadaceae* (Van Hall, 1904). La cellule de *Pseudomonas* est un bâtonnet droit ou bacille de taille moyenne de 0.7-3µm de longueur et de 0.7-1µm d'épaisseur, ne retient pas la coloration de Gram (Gram négatif), isolé, en paires ou en chaînes, mobile par un à trois flagelles. *Pseudomonas syringae* est une bactérie aérobie stricte, chimiohétérotrophe, ne possède pas de cytochrome C, oxydase et arginine dés-hydrogénase négative. La plupart des souches des différents pathovars cultivées sur milieu B de King produisent un pigment jaune verdâtre et fluorescent sous UV: il s'agit d'un pigment hydrosoluble (pyoverdine) (Gaignard et Luisetti, 1993).

Ces bactéries sont pathogènes aux végétaux et peuvent être transmises par leurs semences (Schaad et al, 2000). Plusieurs espèces de bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

véhiculées par la semence et peuvent causer des maladies lors de la germination ou au cours du cycle biologique de la plante.

2.1.2.1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Pseudomonas syringae pv. *tomato* est l'agent pathogène de la moucheture bactérienne sur la tomate, les principaux symptômes de la maladie se manifestent sous forme de taches sur les fruits mûrs qui peuvent devenir creux, et sont entourés par une zone de maturation retardée (Gail, 2000).

2.1.2.2. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

Pseudomonas syringae pv. *lachrymans* est une bactérie transmise par la semence des Cucurbitacées. C'est l'agent pathogène des taches angulaires des *Cucurbitacées* (Shila et al, 2013).

2.1.2.3. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

La graisse à halo est une maladie importante du haricot et certaines autres légumineuses causée par *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (syn. *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*). Les symptômes sont des lésions aqueuses sur les feuilles, les gousses, les tiges ou les pétioles, qui se développent rapidement. Les semences infectées peuvent être asymptomatiques ou être représentées par une coloration jaune-beurre sur le manteau de la graine (Dawn et al, 2011).

2.1.2.3. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*

La bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* cause la graisse bactérienne du pois, Les premiers symptômes initient la formation de petites taches graisseuses qui apparaissent sur les feuilles, les gousses et les tiges. Ces taches s'unissent à mesure qu'elles s'agrandissent. Les feuilles deviennent brunes et sénescents. Sur les gousses, les lésions débutent par des taches olive d'aspect graisseux (Jenner, 1991).

2.1.3. *Xanthomonas* spp.

Le genre *Xanthomonas* regroupe plusieurs espèces pathogènes de *Gammaproteobacteria*, de l'ordre des *Xanthomonadales* et de la famille des *Xanthomonadaceae* (Dowson, 1939) ce

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

sont des bactéries à Gram négatif pouvant être transmises par les semences de nombreuses plantes cultivées (Bradbury, 1984). Ce genre regroupait dans les années 90, plus de 170 espèces dont bon nombre sont des espèces phytopathogènes subdivisées en plus de 140 pathovars selon leurs plantes hôtes. Les membres du genre *Xanthomonas* infectent 124 espèces de plantes monocotylédones et 268 espèces de plantes dicotylédones (Leyns *et al.*, 1984).

2.1.3.1. *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*

La bactérie *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* est responsable de la gâle bactérienne. Les plantes hôtes sont ; la tomate, la pomme de terre, le poivron et le tabac et de nombreuses autres *Solanaceae*, notamment des adventices, qui ont été signalées comme hôtes éventuels. Les symptômes sur les feuilles de tomate ou de poivron sont des lésions qui se présentent comme des zones irrégulières saturées d'eau, d'abord vertes puis brunes et nécrosées. Les jeunes lésions dues à *P. syringae pv. tomato* ont le même aspect, mais finissent entourées d'une auréole jaune plus nette; les lésions sont souvent en forme de stries et les auréoles peuvent se réunir en larges zones chlorotiques (Goode & Sasser, 1980). Sur les fruits de la tomate des lésions graisseuses de couleur verte à noir donnent lieu à des pustules liégeuses en relief, craquelées, pouvant atteindre 1 cm de diamètre (Blancard, 2009).

Aussi bien *X. vesicatoria* que *P. syringae pv. tomato* peuvent provoquer des chancres sur les tiges, similaires à ceux dus à *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Blancard, 2009).

2.1.3.2. *Xanthomonas campestris pv. campestris*

La bactérie *Xanthomonas campestris pv. campestris* cause la nervation noire des Crucifères. Cette maladie présente une distribution universelle, elle est considérée comme l'une des plus destructives sur les Crucifères cultivés. Les choux, choux-fleurs, brocolis, choux de Bruxelles, rutabagas, choux chinois, navets, radis, choux frisés, choux-raves, la moutarde et le canola sont affectés par la nervation noire. Cependant, le chou, le chou frisé et le chou-fleur sont les plus sensibles à la maladie (Kocks, C.G. et J.C. Zadoks. 1996). La maladie est toujours présente à un degré plus ou moins élevé dans plusieurs pays producteurs de semences comme les États-Unis, le Japon et différentes régions de l'Europe (Dzhalilov et Tiwari. 1995). Cette bactérie transmise par semence se trouve logée au niveau de son embryon et génère à la levée une maladie systémique qui réduit la vigueur de la plantule.

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

2.1.3.3. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* (syn. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) cause la gousse commune sur le haricot. Les symptômes sont très similaires à ceux provoqués par *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, sur les semences. L'infection se produit quand les gousses sont à l'état jeune, les semences peuvent pourrir à un stade avancé de la maladie (Mutlu et al, 2008).

2.1.4. *Erwinia* spp. (*Pectobacterium carotovorum*).

Erwinia est un genre bactérien de la section des *Gammaproteobacteria*, de l'ordre de *Enterobacteriales*, de la famille des *Enterobacteriaceae* (Hauben et al, 1998). Plusieurs espèces de bactéries du genre *Erwinia* peuvent être transmises par les semences de diverses espèces cultivées.

2.1.4.1. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* est une bactérie responsable de la pourriture molle qui infecte strictement la pomme de terre en produisant un peptide phytotoxique responsable de la nécrose induite (Pao et al, 2005).

2.1.4.2. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* est une bactérie phytopathogène transmise par la semence de plusieurs espèces botaniques comme la carotte, la betterave, le navet, la tomate, la pomme de terre, les concombres et l'oignon (Hueck, 1998).

2.1.4.3. *Erwinia tracheiphila*

Erwinia tracheiphila est une bactérie phytopathogène transmise par semences responsable de la maladie du flétrissement bactérien des Cucurbitacées notamment le concombre, la courge, le melon et la citrouille. Les symptômes de la maladie apparaissent sur une seule feuille qui soudain se fane et devient vert terne, les bactéries se propagent à travers les vaisseaux de xylème et atteignent les semences par voie systémique (Zitter et al, 2015).

2.1.5. *Clavibacter michiganensis*

Les bactéries pathogènes de l'espèce *Clavibacter michiganensis* sont à Gram positif, elles appartiennent aux *Actinobacteria*, à l'ordre des *Actinomycetales* et à la famille des

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

Microbacteriaceae (Davis et al, 1984). Ces bactéries sont tous des agents pathogènes vasculaires et de quarantaine dans de nombreux pays (Jahr et al., 1999; Eichenlaub et al, 2006).

2.1.5.1. *Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis est une bactérie à Gram+, agent pathogène vasculaire responsable du chancre bactérien. Cette bactérie est transmise à la semence par voie systémique et induit un flétrissement quand les conditions sont favorables au développement de la maladie. La principale plante-hôte d'importance économique est la tomate (EPPO, 2005; Eichenlaub *et al.* 2006; Gartemann *et al.* 2008; De León *et al.* 2011). Les symptômes initiaux de la maladie apparaissent au niveau des feuilles. Il s'agit en premier lieu d'un flétrissement des feuilles des parties inférieures des plants qui atteint les parties supérieures jusqu'aux fruits qui deviennent déformés (Utkhede et Koch, 2004).

2.1.5.2. *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*

Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus est responsable du flétrissement bactérien de la pomme de terre, elle se retrouve dans le système vasculaire de la tige et des tubercules. Sur les parties aériennes, elle engendre un flétrissement débutant sur les feuilles basales. Un jaunissement et des brûlures situées entre les nervures peuvent également être observés sur les feuilles. Ces symptômes peuvent affecter une seule tige ou un seul côté d'une tige. Les tubercules ne montrent pas obligatoirement de symptômes externes. Une coupe des tubercules permet de noter dans la région de l'anneau vasculaire, une pourriture molle ayant une coloration jaunâtre à brunâtre (Lise et Michel, 2005).

2.1.7. *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* regroupe des bactéries à Gram +, phytopathogènes appartenant à la section des *Actinobacteria*, de l'ordre d'*Actinomycetales* et de la famille de *Streptomycetaceae* (Waksman & Henrici, 1943).

2.1.7.1. *Streptomyces scabies*

La gale commune de la pomme de terre est une bactériose transmise par semences causée principalement par *Streptomyces scabies*. Cette maladie est responsable de diminutions de

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

rendements importantes. Les principales plantes-hôtes sont ; pomme de terre, la carotte et la betterave (Lerat et al.,2009).

2.1.8. *Curtobacterium* spp.

Curtobacterium est un genre de Protéobactéries de l'ordre des Actinomycetales de la famille des Microbacteriaceae (Yamada et Komagata, 1972). Ce genre regroupe une dizaine d'espèces dont plusieurs sont des bactéries phytopathogènes.

2.1.8.1. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* est une bactérie de quarantaine responsable du flétrissement bactérien du haricot. Elle cause des dégâts très importants dans les pays producteurs de haricot destiné à la consommation et à la production de semences. Les principales plantes-hôtes décrites, sont le haricot et le soja (Hall ,1991) .

2. Les bactéries transmises par semences, organismes de quarantaine

La plupart des bactéries phytopathogènes sont des organismes de quarantaine qui subissent des contrôles rigoureux au niveau des frontières lors de leur importation ou exportation. L'OEPP (Organisation Euro-méditerranéenne de Protection des Plantes) est une commission internationale qui publie la liste de quarantaine des organismes nuisibles pour la région et les pays concernés par les échanges commerciaux de semences.

La transmission aux semences est une étape critique dans l'écologie de nombreuses bactéries pathogènes des plantes, mais aussi dans l'épidémiologie des maladies bactériennes des plantes. Les bactéries survivent dans ou sur les semences pour une longue période, parfois plus longtemps que la durée de vie de la graine elle-même. Selon l'agent pathogène, les semences contaminées ou infectées peuvent représenter la principale source d'inoculum. Le blocage de cette source d'inoculum est donc un objectif majeur pour contrôler efficacement les maladies bactériennes transmises par les semences.

Un organisme de quarantaine est défini comme un organisme nuisible qui a une importance potentielle pour l'économie de la zone menacée et, n'est pas encore présent dans cette zone ou bien qui y est présent mais n'y est pas largement disséminé et, fait l'objet d'une lutte officielle (Dagenais, 2010).

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

Pour les bactéries organismes de quarantaine; les semences constituent le principal acteur de dissémination à longue distance des maladies bactériennes.

3 .Méthodes de détection des bactéries transmises par semences

Les méthodes de détection des bactéries transmises par semences

Les principales techniques mises en œuvre pour la détection sont :

- L'isolement des bactéries par les méthodes classiques et l'identification biochimique et biologique par utilisation des tests physiologiques, biochimiques, la réaction d'hypersensibilité sur le tabac ainsi que l'inoculation de plantes hôtes ;
- Les kits de diagnostic phytosanitaires, basés sur la technique immunoenzymatique pour la plupart, qui permettent de déterminer rapidement la présence ou l'absence de maladie ;
- Les techniques de biologie moléculaire pour l'identification (Anonyme, 2007).

4. Méthodes de lutte contre les bactéries transmises par semences

4.1. Lutte culturale

Les méthodes de lutte curative restent inefficaces. Une combinaison de plusieurs techniques culturales peut permettre de limiter le risque de contamination :

Utilisation de matériel végétale sain,

- La mise en place d'un assolement adéquat
- L'utilisation d'hybrides résistances ou variétés,
- La rotation culturale

Les travaux de sélection visant à proposer des variétés résistantes ne sont pas satisfaisants pour le moment bien que la recherches-y travaille. L'application de quelques mesures prophylactique permet de contrôler le développement de la maladie et d'éviter sa dissémination à la semence.

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

4 .2. Lutte biologique

Les rotations culturales avec des plantes non hôtes sont aussi des moyens efficaces pour diminuer les populations bactériennes présentes dans le sol (Ahikari et Basnyat, 1998). Dans le cas du flétrissement bactérien des Solanacées, les rotations culturales se montrent plus ou moins efficaces selon le phylotype de *Ralstonia solanacearum* présent et nécessitent souvent de cultiver les plantes non hôtes sur une période de plusieurs années (Elphiston et Aley, 1993).

Les amendements organiques comme les boues des stations d'épuration, les résidus de la canne à sucre, de farine de soja, de l'urée mais aussi les huiles essentielles agissent comme des biofumigants et permettent dans certains cas de diminuer les populations bactériennes (Pradhanang, et al, 2003). Ceci peut être dû à la production d'une ou plusieurs substances toxiques à action bactéricide.

Une des méthodes de la lutte biologique est d'utiliser en compétition un agent biologique et l'agent pathogène cible ; le but étant d'essayer d'inhiber totalement la croissance de l'agent pathogène. Des souches peu agressives ont aussi un effet protecteur. L'effet protecteur peut s'expliquer par la compétition pour l'espace et par l'induction d'une résistance locale non spécifique dont témoignent la production de thylles et le brunissement des cellules. Les plantes hôtes sensibles peuvent aussi être protégées par des rhizobactéries antagonistes, des champignons, des actinomycètes qui ont des effets antibiotiques contre *Ralstonia solanacearum*. De même, des souches de *Bacillus sp.* et de *Pseudomonas sp.* permettent de réduire efficacement le taux de flétrissement bactérien chez la pomme de terre, la tomate et le piment. Ces organismes colonisent les racines des jeunes plantes et empêchent alors l'entrée de *Ralstonia solanacearum*. La capacité des *Pseudomonas spp. fluorescents* à coloniser rapidement la rhizosphère fait de ces bactéries un groupe taxonomique de grand intérêt pour leur utilisation en lutte biologique contre l'agent du chancre bactérien (Verma *et al.* 2007 ; Trivedi *et al.* 2008).

La lutte biologique, encore peu employée, représente un espoir mais elle est difficilement envisageable au champ car elle dépend fortement des conditions environnementales.

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

4.2. Lutte génétique

La résistance variétale correspond à la stratégie la plus efficace pour lutter contre le flétrissement bactérien. Le travail de recherche consiste, dans un premier temps, à identifier des sources de résistance ou de tolérance (plantes colonisées mais dépourvues de symptômes) et adaptées aux conditions climatiques. Dans un deuxième temps, des variétés résistantes sont créées en tentant d'introduire les gènes de résistance aux organismes phytopathogènes dans des variétés sensibles tout en s'attachant à conserver leur valeur agronomique.

Les variétés résistantes disponibles actuellement sont utilisées dans les programmes de recherche, certaines disponibles en commerce ne sont pas toutes intéressantes car la résistance se révèle instable dans le temps et dans l'espace, en raison de la grande variabilité des virulences et d'agressivité des souches de *Ralstonia solanacearum*, ainsi que des différences de conditions agro-pédo-climatiques influençant le développement de la maladie (Wang et al, 1998). De plus, les variétés résistantes ne répondent pas toujours aux exigences des producteurs et des consommateurs locaux.

Le mécanisme de résistance est lié à la capacité de la plante à limiter la colonisation bactérienne au niveau du système racinaire (Grimault et al, 1994).

Il en résulte que la lutte génétique doit généralement être envisagée dans une stratégie globale de lutte raisonnée.

4.3. Lutte chimique

Des travaux de désinfection des couches superficielles du sol par la chaleur ou par l'application de fumigation. Comme le formol, l'hypochlorite de calcium, le bromure de méthyle, la chloropicrine ou des huiles essentielles comme le thymol ou l'huile de palme ont été conduits ces dernières années. En culture sous serre, ces travaux expérimentaux ont fourni des résultats intéressants, les bactéries ayant été totalement éliminées. En revanche, au champ, l'efficacité s'est avérée être limitée dans le temps, principalement lorsque la qualité d'inoculum était importante. Les traitements par fumigation sont, par ailleurs, très onéreux et surtout polluants comme le bromure de méthyle (en voie d'interdiction et usage limité à quelque culture), ce qui limite l'usage de cette technique à grande échelle. En revanche la

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

fumigation associée à la solarisation peut réduire l'impact des maladies bactériennes (Chellemi et al, 1993 ;Schonfeld et al.,2002) .

On a plusieurs produits avec différentes matières actives ont été utilisés pour évaluer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et ensuite la Dose Minimale Inhibitrice (DMI) .

4.4. Lutte physique

4.4.1. Traitements de semences à la vapeur

Un procédé développé en Suède par la société Thermoseed permet de désinfecter les semences à la vapeur et d'éliminer les organismes phytopathogènes. Depuis 2002, des semences conventionnelles de blé sont traitées par ce procédé et depuis 2006, l'unité de traitement est disponible sur le marché. Elle est capable de traiter plus de 200 tonnes de céréales par jour (Lizot et al .2002) .

4.4.2. Traitements de semences à l'eau chaude : la thermothérapie

Après une période de déclin liée au développement des traitements chimiques des semences, cette technique est à nouveau expérimentée, voire utilisée à l'échelle industrielle, en particulier dans certains systèmes de culture biologiques où il n'existe aucun traitement de semences homologuées à ce jour (Wisbar et al. 2008). La thermothérapie est une méthode de contrôle très efficace contre de nombreux agents pathogènes véhiculés par les semences, ce traitement peut être délicat à mettre en œuvre car il faut tenir compte de durée du traitement et de la température pour ne pas affecter la faculté germinative des graines.

4.5. La législation

La législation dans le domaine de la pathologie des semences consiste en l'application des mesures de loi nationales et internationales lors de l'importation et l'exportation des semences.

Les mesures de loi retenues, doivent cibler en particulier la protection sanitaire des végétaux et les produits végétaux par la prévention et la lutte contre les organismes nuisibles tant au niveau de leur introduction qu'à celui de leur propagation sur le territoire national en vue de sauvegarder et de garantir un environnement satisfaisant propice à un développement durable conformément à la constitution.

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

L'importation des produits phytosanitaires à usage agricole est régie par le cadre législatif, réglementaire et procédural suivant :

- L'importation des produits phytosanitaires à usage agricole non homologués est interdite. Les produits phytosanitaires à usage agricole sont soumis, avant leur mise sur le marché en Algérie, à une homologation délivrée par le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.
- L'importation de produits phytosanitaires à usage agricole est assurée par des importateurs. L'importateur de produits phytosanitaires à usage agricole, agréé, est tenu de s'approvisionner auprès des fabricants et/ ou des sociétés de formulation agréés dans leurs pays d'origine par les autorités compétentes.
- L'importation de produits phytosanitaires à usage agricole est soumise à l'obtention d'une autorisation technique préalable délivrée par l'autorité phytosanitaire nationale, sur demande de l'importateur, selon le modèle (Anonyme, 2002).
- L'importation de semences et plants destinés à la reproduction et/ ou à la multiplication est soumise à une autorisation technique préalable d'importation (Anonyme, 2004).
- Les végétaux et produits végétaux importés sont soumis à un contrôle phytosanitaire obligatoire au niveau des points d'entrée aériens, terrestres et maritimes officiels du territoire national
- Le contrôle phytosanitaire porte sur l'examen minutieux de la totalité de la cargaison importée, avec prélèvement d'échantillons à des fins d'analyse, en vue de s'assurer de la conformité de la marchandise avec les exigences phytosanitaires et réglementaires nationales, avant son introduction sur le territoire national.
- L'importation de végétaux et produits végétaux, sous tout régime douanier autre que le transit international sans rupture de charge, doit être accompagnée obligatoirement du certificat phytosanitaire délivré par les services officiels du pays d'origine, selon le modèle conforme à celui établi par la Convention Internationale pour la Protection des Végétaux, texte révisé en 1997 (Anonyme, 2002) .
- L'agent de l'autorité phytosanitaire aux frontières délivre un certificat de libre circulation, lorsque la cargaison est reconnue, après analyse, saine et indemne de présence d'organismes nuisibles réglementés de quarantaine.

Chapitre1 : Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmises par semences

- En cas de présence avérée d'un organisme nuisible réglementé, les marchandises feront l'objet d'une mesure d'interception, notifiée à l'importateur (Anonyme, 2011).

L'exportation des produits végétaux est régie par le cadre législatif, réglementaire et procédural suivant :

- Les produits végétaux destinés à l'exportation sont soumis à un contrôle phytosanitaire obligatoire, au niveau des points de sortie aériens, terrestres et maritimes officiels du territoire national. Le contrôle phytosanitaire porte sur l'examen minutieux de la totalité de la cargaison à exporter, avec prélèvement d'échantillons à des fins d'analyse, en vue de s'assurer de la conformité de la marchandise avec les exigences phytosanitaires du pays importateur (Anonyme, 2002).

Chapitre II
Matériel et méthodes

Objectif de l'expérimentation

Notre travail consiste à étudier des bactéries phytopathogènes transmises par les semences de quelques espèces de plantes cultivées. Nous avons réalisé cette recherche en trois étapes : l'isolement et la purification des bactéries hébergées par la semence, la réalisation du test d'hypersensibilité par inoculation de plantes de tabac avec les bactéries isolées et sélectionnées et une étude biochimique et physiologique.

1. Matériel végétal (semences)

Le matériel végétal utilisé dans cette essai est composé de semences ont été fournies gracieusement par un agriculteur. Ces semences de diverses plantes cultivées sans symptômes apparents, appartenant à neuf génotypes différents (courgette, melon, concombre, haricot, petit-pois, betterave, pomme de terre, tomate et chou) (Figure 02).

Avant de débiter l'expérimentation, pour faciliter l'étiquetage des échantillons de semences, un code a été attribué lors des isolements en fonction du nom de l'espèce. Le nom scientifique, la variété, l'origine, l'année de production de la semence sont présentés dans le tableau 01.



Figure 02 : Les différentes espèces des semences (A : Courgette, B : Melon, C : Concombre, D : Haricot, E : Petit-pois, F : Betterave, G : Pomme de terre, H : Tomate, I : Chou)

Tableau 01 : Les différentes espèces et variétés des semences expérimentées.

Semence	Variété	Année de production	Origine	Code
Tomate (<i>Solanum lycopersicum L.</i>)	Kawa	2014	Locale (Tipaza)	T
Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum L.</i>)	Safrane	2014	Importée (France)	B
Pois (<i>Vicia pisiformis L.</i>)	Altesse	2012	Importée (France)	P
Haricot (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>)	Djedida	2014	Importée (Etats-Unis)	H
Courgette (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	Shahla	2010	Importée (France)	Cr
Concombre (<i>Cucumis sativus L.</i>)	Sargon	2009	Importée (Chine)	C
Chou (<i>Brassicas oleracea L.</i>)	Milan	2012	Importée (Italie)	K
Betterave (<i>Bacta vulgaris L.</i>)	Technisem	2012	Importée (Italie)	R
Melon (<i>Cucumis melon L.</i>)	Griballe	2012	Importée (France)	M

2. Méthode d'isolement des bactéries

Toutes les manipulations ont été menées au laboratoire de phytopathologie de l'université SAAD DAHLAB de BLIDA dans des conditions stériles à côté d'un bec Bunsen, par désinfection du matériel utilisé et du plan de travail à l'eau de javel et à l'alcool à 70% et ce, avant et après chaque manipulation pour éviter les contaminations.

Le matériel utilisé pour les manipulations, les boîtes de Pétri en verre, les pinces et les bistouris sont stérilisés au four Pasteur à 250°C pendant 1 heure. Les milieux liquides et solutions comme : l'eau distillée, les milieux de cultures et le papier wattman ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Deux milieux ont été utilisés pour l'isolement, le milieu général LPGA, qui permet la croissance d'un grand nombre de bactéries et le milieu spécifique King B permettant la croissance des *Pseudomonas* spp. *fluorescents*. Ces derniers lors de leur croissance diffusent un pigment fluorescent jaune-verdatre sur le milieu KB permettant de les reconnaître.

La première étape du diagnostic au laboratoire consiste à isoler les bactéries à partir des tissus végétaux. Nous avons procédé selon deux méthodes d'isolement selon la localisation des bactéries dans la semence. En général, les bactéries se trouvent logées dans l'embryon, les cotylédons ou bien à la surface de l'enveloppe des téguments.

2.1. À partir de la semence entière

Pour chaque type de semence un gramme a été pesé, ensuite l'échantillon subi trois lavages successifs à l'eau distille stérile. Un broyage est effectué entre le pilon et un mortier stérile contient 1 à 3 ml d'eau distillée stérile selon la taille de semence. L'échantillon est déchiqueté et écrasé en petits fragments de manière à libérer les bactéries qui se trouvent localisées dans les espaces intercellulaires des tissus. Le macérât qui consiste en la solution mère est récupéré dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile c'est la dilution 10^{-1} . Cette dernière solution subit par la suite des dilutions au dixième (10^{-2} et 10^{-3}).

Un volume de 100 μ L de chaque suspension est déposé en boîte de pétri contenant le milieu de culture. Ce volume est étale à l'aide de billes en verre stériles. Une fois les boîtes de Pétriensemencées, elles sont entreposées à l'étuve à 27-28°C pour leur incubation. Après une semaine d'incubation, la lecture des boîtes est effectuée et les colonies bactériennes apparues sur les milieux d'isolement sont décrites en fonction des caractéristiques suivantes : couleur, taille, opacité, élévation et contour.

Les semences ayant subi les étapes précédant sont tomate, betterave, chou et pomme de terre.

Pour les échantillons de semences initialement traités avec les fongicides (haricote, petit-pois, concombre et courgette), nous avons procédé à leur lavage sous l'eau courante du robinet de manière à éliminer l'excès des produits qui risque d'inhiber la croissance bactérienne. Ces semences suivent par la suite le même protocole que celui décrit précédemment.

Pour les semences non traitée (Tomate, Chou et Betterave) on à d'autre méthode d'isolement pour détermine les bactéries de surface extracellulaire. On mettre les graine dans un tube à

essai contient 1 à 3 ml de l'eau distille la solution obtenir on mettre d'un Agitateur horizontale pendant 30 minutes. La solution obtenir c'est la dilution 10^{-1} . Cette dernière solution subit par la suite des dilutions au dixième (10^{-2} et 10^{-3}). Un volume de 100 μ L de chaque suspension est déposé en boîte de pétri contenant le milieu de culture. Ce volume est étale à l'aide de billes en verre stériles. Une fois les boîtes de Pétriensemencées, elles sont entreposées à l'étuve à 27-28°C pour leur incubation. Après une semaine d'incubation, la lecture des boîtes est effectuée et les colonies bactériennes apparues sur les milieux d'isolement sont décrites en fonction des caractéristiques suivantes : couleur, taille, opacité, élévation et contour.

Notre expérimentation à raison de trois répétitions par traitement et par milieu pour augmenter les chances d'isoler le plus grand nombre de bactéries.

2.2. Isolement des bactéries à partir des embryons des semences

Pour étudier la présence des bactéries dans les embryons, nous avons prélevé délicatement et stérilement 5 à 7 d'embryon des semences de haricot, de tomate et de petit pois. les embryons sont par la suite déposés directement sur le milieu gélosé des deux types de milieux préparés (Figure 03).

Nous avons effectué notre expérimentation à raison de trois répétitions par traitement et par milieu pour augmenter les chances d'isoler le plus grand nombre de bactéries (Figure 04). Les boîtes contenant les embryons sont incubées horizontalement le couvercle des boîtes de Pétri vers le haut à 27-28°C. La lecture des résultats s'est faite une semaine après l'incubation.

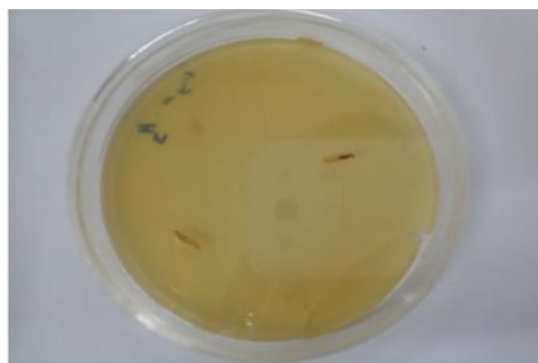


Figure 03 : Isolement des bactéries à partir des embryons des semences

3. Purification et conservation des souches

Après incubation, certaines colonies bactériennes ont été sélectionnées sur la base de leur description dans la bibliographie. Nous nous sommes basées sur la description des principales bactéries qui sont communément transmises par la semence des différentes plantes cultivées analysées (Schalle, 2011).

Les colonies obtenues sont purifiées sur les 2 milieux de cultures LPGA et King B. Cette opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure (Jones et Geider, 2001).

Les isolats retenus sont conservés sur le milieu LPGA en tubes inclinés à 4 °C pour subir par la suite une série de tests de caractérisation biologique et biochimique pour une éventuelle détermination du genre de bactéries isolées.

4. Tests d'identification des bactéries

4.1. Tests biologiques

4.1.1. Test d'hypersensibilité sur le tabac (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*)

Le test d'hypersensibilité sur le tabac (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) permet de mettre en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement ou nécrose des zones d'inoculation (Jones et Geider, 2001).

Ce test se réalise par infiltration sous épidermique d'une suspension bactérienne d'une culture bactérienne jeune de 24 à 48 heures sur le limbe foliaire du tabac. La suspension infiltrée d'une densité optique (DO) environ 0,2 à 0,3 correspondant à une concentration cellulaire de 10^7 à 10^8 cfu/ml (Mabagala et Saettler, 1992). La mesure de la croissance bactérienne est réalisée par la lecture de l'absorbance après 24h et 48h d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre (prolabo, Paris) réglé à une longueur d'onde de 600 nm.

Le témoin négatif consiste à faire infiltrer de l'eau distillée stérile au niveau du limbe foliaire du tabac.

Le test est considéré positif s'il apparaît au bout de 24 heures une plage nécrotique correspondant à la zone infiltrée, et il est négatif si aucune réaction n'est observée.

Chaque isolat est inoculé sur une feuille, par conséquent, un plant peut servir pour plusieurs souches du moment que la réaction nécrotique est locale.

4.1.2. Test de pathogénicité sur la pomme de terre (test de pectinolyse)

Le test de pectinolyse sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme pectinolytique servant à décomposer la pectine. Dans une boîte de Pétri contenant un fragment de pomme de terre prélevé stérilement de l'intérieur d'un tubercule, les isolats bactériens âgés de 24 heures isolés de la semence de la pomme de terre sont déposés à la surface des fragments à l'aide d'une anse. Après 48 heures, la présence d'une pourriture indique une réaction positive (Schaad et al, 2001). Les bactéries appartenant à l'espèce *Pectobacterium carotovorum* devraient induire une pourriture molle sur les fragments de pomme de terre inoculés.

4.2. Tests biochimiques

4.2.1. Test de coloration de Gram

Cette méthode met en évidence des différences de structure, de composition chimique des parois bactériennes et leur réactivité vis-à-vis des colorants de Gram.

La fixation de la bactérie à tester se fait à la chaleur et en présence d'une goutte d'eau distillée stérile après la préparation du frottis par étalement d'une culture bactérienne âgée de 24 heures sur une lame. Les frottis fixés sont d'abord colorés au violet de gentiane, cette opération est suivie par l'application d'une solution de lugol. La décoloration est effectuée par un lavage des lames à l'alcool 95°.

Après un lavage abondant avec un jet d'eau distillée stérile, le frottis subit une deuxième coloration à l'aide d'une solution de fuschine basique.

L'observation des frottis colorés se fait au microscope optique grossissement 1000 X en utilisant de l'huile à immersion. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positif tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram-négatifs (Hildbrand *et al.*, 1988).

4.2.2. Test de fluorescence sur King B

Une colonie âgée de 24 à 72 heures a étéensemencée en stries dans une boîte de Pétri contenant du milieu King B. Après une durée d'incubation de 48 heures à 27°C, une fluorescence éventuelle est révélée sous une lampe à ultra-violet (UV) ce qui nous permettra d'orienter notre diagnostic, car les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont souvent définis sur la base de ce test, du fait qu'ils produisent des molécules sidérophores qui diffusent dans le milieu King B et qui ont la propriété de capter le fer.

Le test est positif s'il y'a apparition de fluorescence allant du vert au bleu. Il est négatif en absence de fluorescence (Schaad *et al.*, 2001).

4.2.3. Test d'activité cytochrome oxydase

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome C oxydase. Nous avons utilisé une goutte de réactif de N, N, diméthylparaphénylène diamine sur un papier buvard stérile, pour réaliser une émulsion immédiate à l'aide de l'anse de culture sur le buvard imbibé. Le test est considéré positif si une couleur rose violacée apparaît, Le test est négatif en l'absence de coloration (Klement *et al*, 1990).

4.2.4. Test catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'oxygène (H_2O_2). Sur une lame en verre stérile, une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les isolats bactériens âgés de 24 heures sont déposés dans la solution de peroxyde d'hydrogène à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Après 2 minutes, la présence de bulles révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive (Dickey, 1988).

4.2.5. Fermentation du glucose (oxydation /fermentation)

Une culture bactérienne âgée de 24 heures estensemencée sur le milieu Hugh and Leifson (Hugh et Leifson, 1953). Ce milieu semi solide est utilisé pour différencier entre la voie fermentative et la voie oxydative des bactéries phytopathogènes (Schaad et al, 1988).

Pour le test de fermentation, une couche d'environ 1 cm d'huile de vaseline stérile est additionnée à la surface du tube à l'aide d'une seringue et un filtre stérile pour éviter tout contact avec l'air.

Pour le test d'oxydation, seulement les bouchons des tubes à essai ne sont pas serrés puis, sont incubés pendant 48 à 72 heures à 27°C.

La présence d'une coloration jaunâtre indique la fermentation du glucose par la bactérie. Une réaction négative ne cause aucun changement de couleur et le milieu reste bleu.

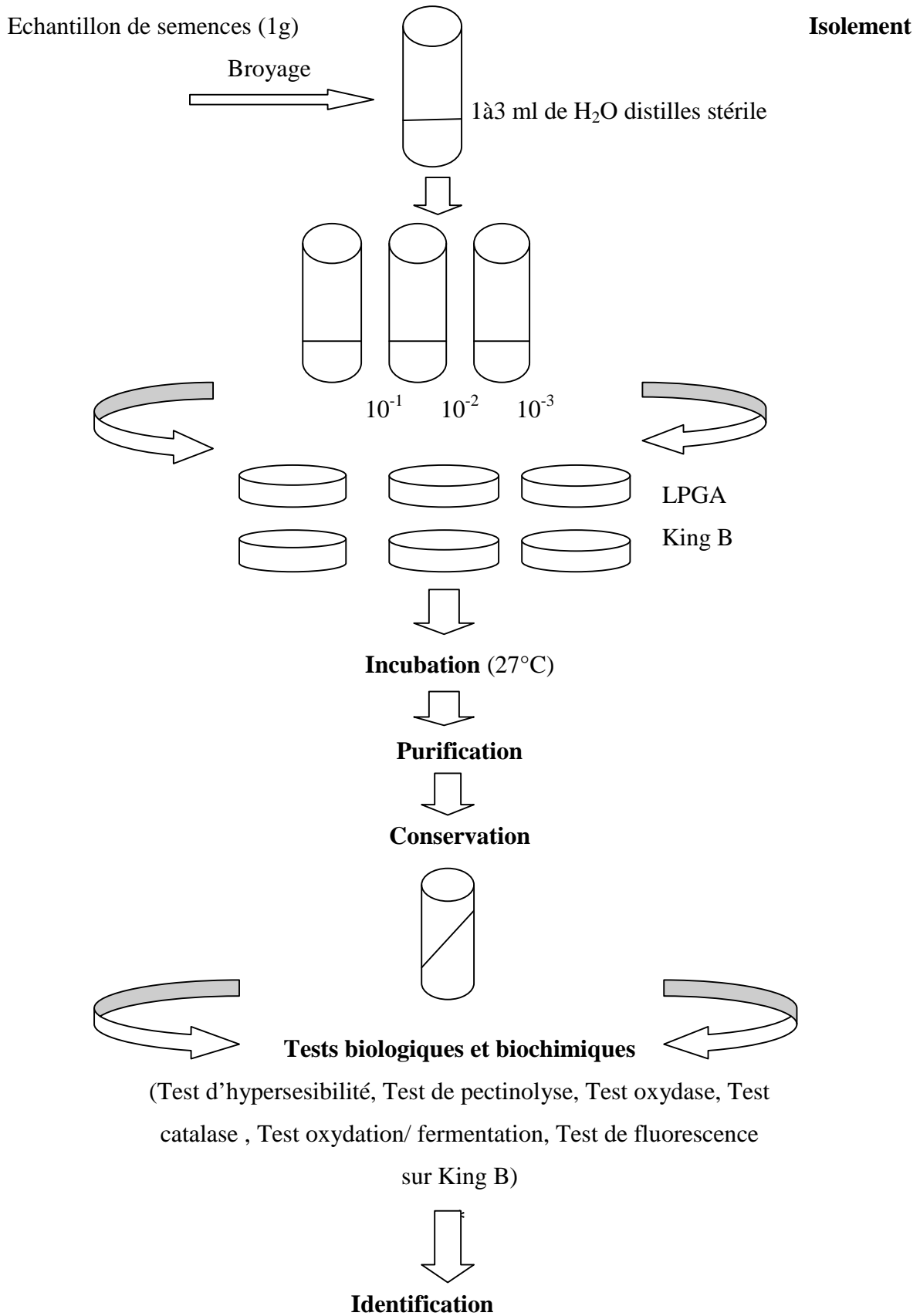


Figure 04 : Schéma général du protocole expérimental de l'étude des bactéries transmises par semences.

Chapitre III
Résultats et discussion

1. Résultats

À partir des neuf échantillons de semences analysés, nous avons isolé et purifié sur les deux milieux de culture King B et LPGA un total de 94 isolats bactériens (Figure 5).

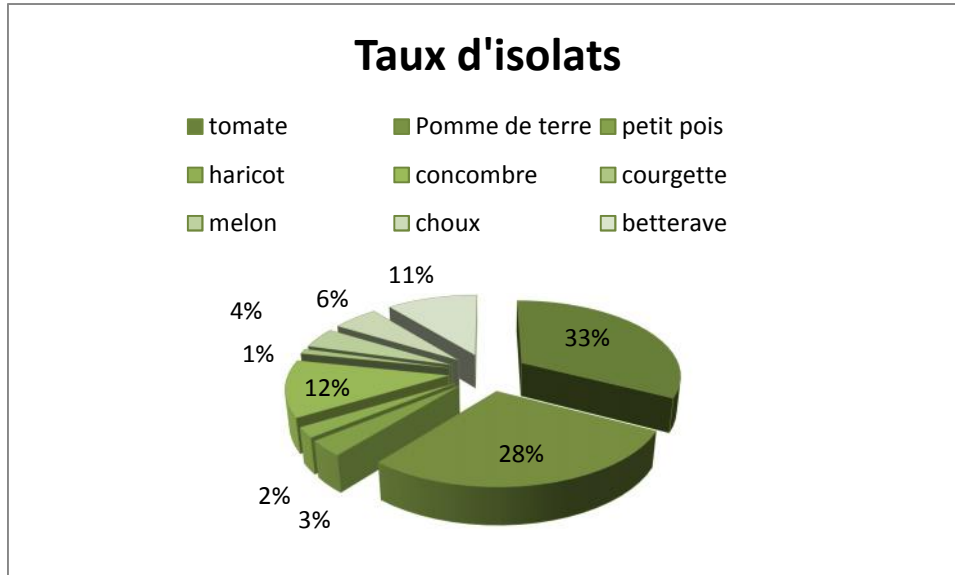


Figure 5: Résultats de l'isolement des bactéries à partir des échantillons de semences.

Sur un total de 94 isolats obtenus, (30) 32% proviennent de la semence de tomate, (26) 28% à partir de la pomme de terre, (11) 12% à partir de concombre, (10) 11% à partir de la betterave, (5) 6% à partir du chou, (4) 4% à partir du melon, (3) 3% à partir du petit pois, (2) 2% à partir du haricot et seulement (1) 1% à partir de la courgette.

1.1. Caractérisation des isolats

1.1.2. Caractéristiques macroscopiques

La culture des isolats sur le milieu LPGA a révélé une bonne croissance. Après incubation, les colonies prennent des tailles de 2 mm à 5mm, leur coloration varie du blanc, au crème, au jaune, ou orangée. Elles sont planes ou bombées, de forme circulaire, ovale irrégulière ou ovale régulière (tableau2).

1.1.3. Caractéristiques microscopiques

L'observation a montré que les cellules bactériennes isolées ont une forme en cocci ou en bacille (tableau 2).

1.2. Réaction au test d'hypersensibilité sur le tabac

La réaction d'hypersensibilité donne une indication sur la présence de gènes de pathogénie chez les bactéries isolées. Les résultats sont apparus après 3 à 7 jours, la réponse s'est traduite par une réaction nécrotique au niveau des parties du limbe infiltrées par les bactéries testées (figure 6).

L'inoculation des feuilles de tabac avec les 94 isolats, donne les résultats suivants : 18 % des isolats ont montré une réaction positive (nécrose), et 82% des isolats ont montré une réaction négative comme celles du témoin (eau distillée stérile), pour lesquels, les parties infiltrées sont restées intactes.

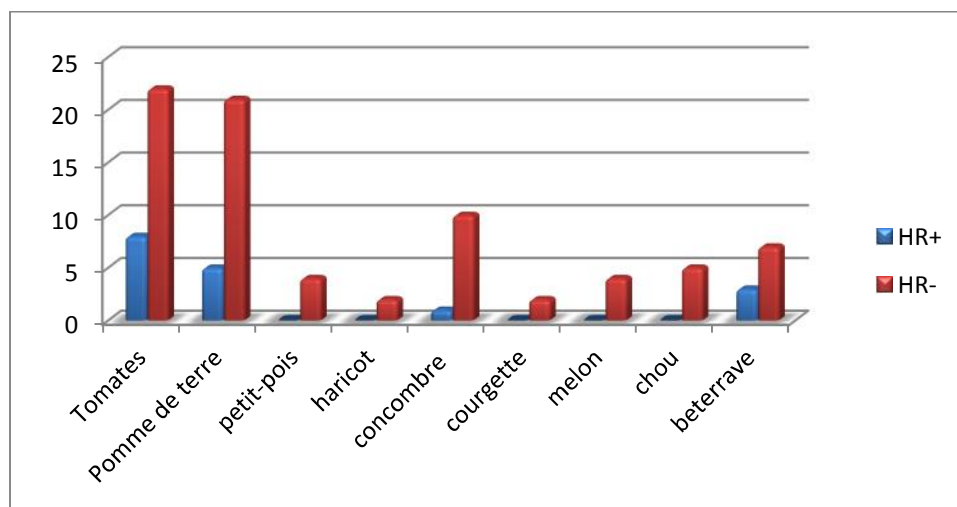


Figure 6: Résultats de la réaction d'hypersensibilité sur le tabac de l'inoculation des isolats de semences.

Quatre échantillons de semences ont montré une réaction positive au test d'hypersensibilité sur le tabac. Le pourcentage le plus important est représenté par la tomate avec 8 isolats, (10%). Les échantillons de pomme de terre ont permis l'isolement de 5 bactéries phytopathogènes (6%). Les semences de betterave ont recensé 3 isolats phytopathogènes (4%) alors que ceux du concombre 1 isolat (1%) (Figure 6).

Les isolats issus du petit-pois, du haricot, de la courgette, du melon et du chou n'ayant pas donné une réaction négative au test d'hypersensibilité sur le tabac ont été éliminés et seuls ceux ayant répondu positivement subissent la suite des tests de caractérisation et d'identification.

Nous avons pu noter cependant que, certains isolats expriment des réponses nécrotiques plus sévères par rapport à d'autres, cette différence de réponse est liée probablement à la virulence des souches (Figure 7 et Figure 8).

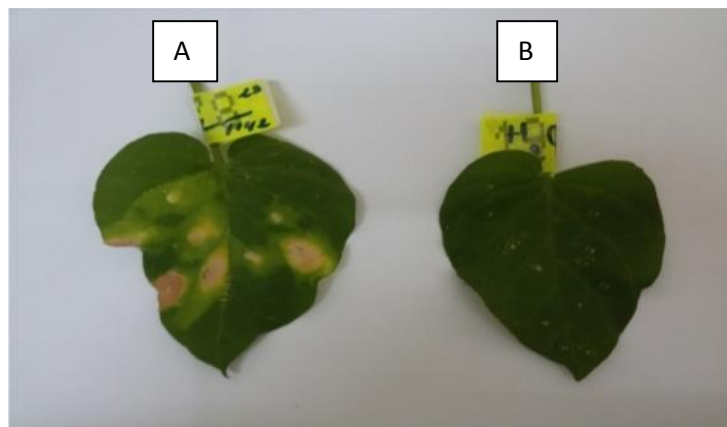


Figure 7 : A : Résultat du test d'hypersensibilité sur le tabac après 3 jours d'inoculation (nécrose prononcée, réponse sévère).

B : Témoin négatif inoculé à l'eau distillée stérile.



Figure 8 : A : Résultat du test d'hypersensibilité sur le tabac après une semaine d'inoculation (nécrose légère). B : Témoin négatif inoculé à l'eau distillée stérile.

Tableau 2: Résultats de la caractérisation macroscopique et microscopique des isolats bactériens isolés des semences étudiées

Echantillon	isolat	Etude macroscopique				Etude microscopique
		Diamètre (mm)	couleur	contour	Aspect	Forme de la cellule
Tomate	T ₁₃	2	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	T ₁₁₂	3	Blanche	Régulier	Surface demi bombée lisse luisante	Bacille
	T ₁₄₂	2	Blanche	Régulier	Surface demi bombée lisse luisante	Bacille
	T ₂₄	2	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	T ₂₆	2	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	T ₂₆₂₂	4	Jaune	régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	T ₃₃₁₁	4	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	T ₃₃₁₂	5	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
Pomme de terre	B ₈	2	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	B ₉	2	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	B ₁₀	5	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	B ₁₂	4	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	B ₂₁	2	Blanche	Régulier	Surface demi bombée lisse luisante	Bacille
Betterave	R ₄	4	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	R ₆	3	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
	R ₇	2	Jaune	Régulier	Surface bombée lisse luisante	Bacille
Concombre	C ₄	5	Crème	régulier	Surface plate lisse	Cocci bacille

1.3. Test de pathogénicité sur la pomme de terre

L'ensemble des isolats issus de la pomme de terre inoculés sur les disques de pomme de terre, n'ont pas montré de réaction de pectinolyse sur les tissus.



Figure 9 : Résultat du test de pathogénicité sur la pomme de terre .

1.4. Caractérisation biochimique

1.4.1. La coloration de Gram

Les isolats à Gram (+) sous microscope optique apparaissent sous forme de bâtonnets et prennent une couleur violette après coloration.

Les isolats à Gram (-), sous microscope optique apparaissent sous forme de bâtonnets ou de cocci et prennent une couleur rose après coloration.

Tableau 4: Résultats de coloration de Gram.

Type de souche		Nombre des souches (%)	Total	
Gram+	Bâtonnet	13 (76%)	13	17
	Cocci	0 (0%)		
Gram-	Bâtonnet	3 (18%)	4	
	Cocci	1 (6%)		

Sur un total de 17 isolats qui ont subi la coloration de Gram, 24% correspondant aux Gram- et 76% des isolats correspondant aux Gram+.

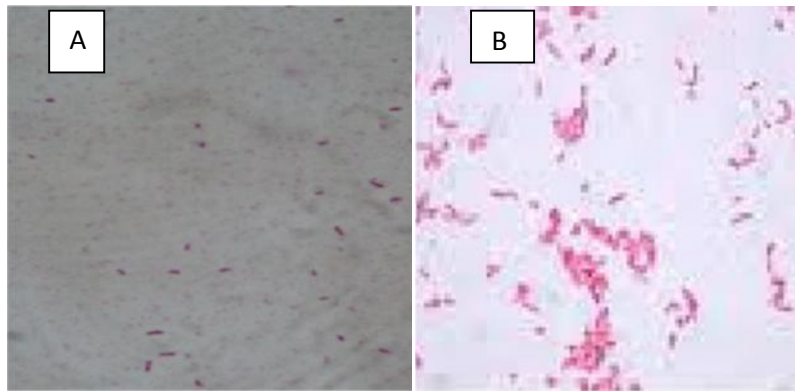


Figure 10: Résultats de la coloration de Gram (A : Gram + ; B : Gram -).

1.4.2. Test de fluorescence sur le milieu King B

Le test de fluorescence sur le milieu King B est négatif pour l'ensemble des isolats de tomate (tableau 3). Les souches ne produisent pas de pigments fluorescents lorsqu'ils sont visualisés sous une lampe à UV (Figure 11).

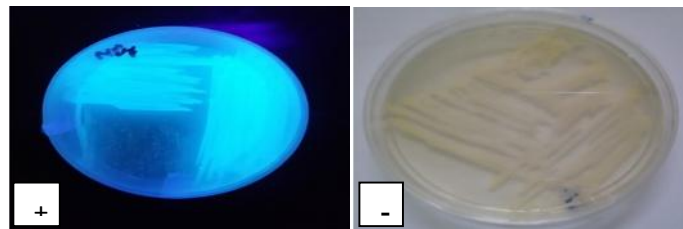


Figure 11: Résultat du test de fluorescence

1.4.3. Test catalase

Le test de la catalase a montré que 59% des isolats sont catalase positive. La réaction montre un dégagement de bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur la colonie de l'isolat (Figure 12). Cependant, 41% des isolats ne possèdent pas l'enzyme catalase (tableau3).

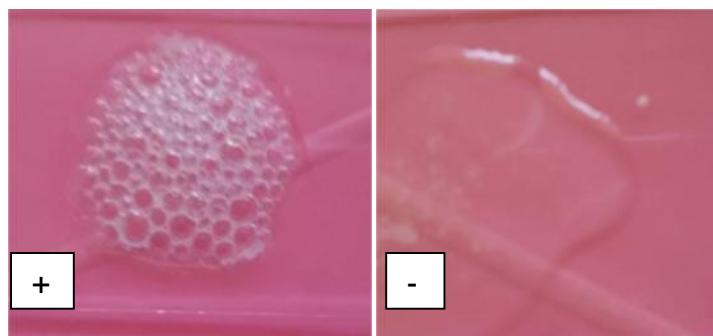


Figure 12: Réaction au test catalase.

1.4.4. Test d'activité cytochrome oxydase

L'étalement des isolats sur le disque de papier buvard stérile et la révélation par le réactif Oxalate de diméthylparaphénylène-diamine est resté incolore sur 18% des isolats, ce qui signifie que le test oxydase est négatif. Cependant, 82 % des isolats, produisent une coloration bleue-violette en présence du réactif, ce qui signifie que le test oxydase est positif (tableau 3).

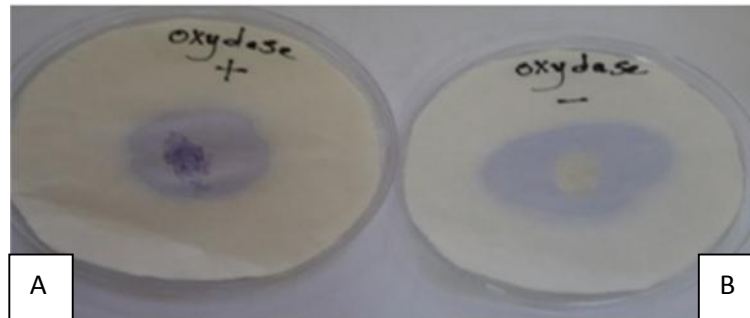


Figure 13: Résultat de l'activité Cytochrome oxydase (A : positif, B : négative).

1.4.5. Type respiratoire : oxydation /fermentation

Le test d'oxydation est positif pour l'ensemble des isolats, parallèlement, le test fermentation est positif pour l'ensemble des isolats testés. Par conséquent, tous les isolats assurent les deux types de métabolisme oxydatif et fermentatif (tableau 3).

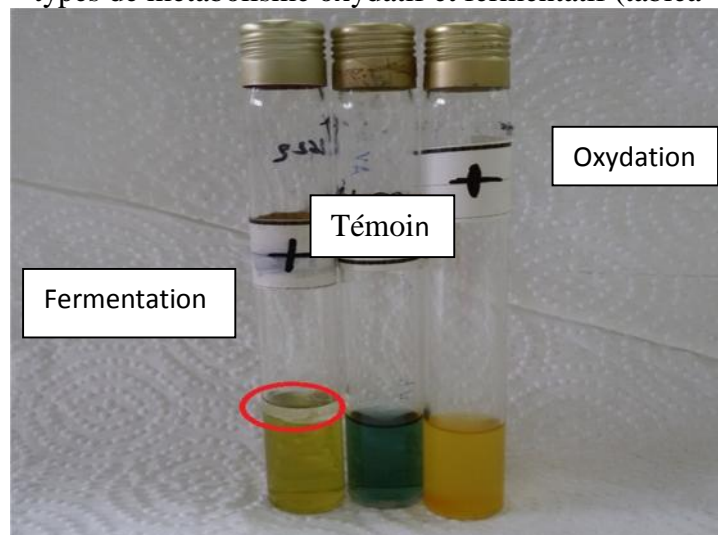


Figure 14: Résultat du test d'oxydation/fermentation.

Tableau 3 : Réponses biochimiques des isolats bactériens des semences étudiées.

Echantillon de semence	Isolat	Coloration de Gram	Fluorescence sur milieu King B	Test catalase	Test oxydase	Test d'oxydation	Test de fermentation
Tomate	T ₁₃	-	-	-	-	+	+
	T ₁₁₂	-	-	+	+	+	+
	T ₁₄₂	+	-	-	+	+	+
	T ₂₄	+	-	+	+	+	+
	T ₂₆	+	-	+	-	+	+
	T ₂₆₂₂	+	-	-	-	+	+
	T ₃₃₁₁	+	-	-	-	+	+
	T ₃₃₁₂	+	-	+	-	+	+
Pomme de terre	B ₈	+	NF	-	-	+	+
	B ₉	+	NF	-	-	+	+
	B ₁₀	+	NF	-	-	+	+
	B ₁₂	+	NF	+	-	+	+
	B ₂₁	-	NF	+	-	+	+
Betterave	R ₄	+	NF	+	-	+	+
	R ₆	+	NF	+	-	+	+
	R ₇	+	NF	+	-	+	+
Concombre	C ₄	-	NF	+	-	+	+

(+) Réaction positive

(-) Réaction négative

NF : N'est pas fait.

D'après le test d'hypersensibilité sur le tabac et les biochimiques principaux réalisés (coloration de Gram, catalase, oxydase, test de fluorescence sur le milieu King B, oxydation/Fermentation), nous pouvons supposer la présence des genres bactériens ; *Clavibacter* spp., *Pectobacterium* spp. et *Ralstonia* spp. , à partir des semences analysés (tableau 5) .

Tableau 5 : Identification du genre de bactéries phytopathogènes isolées des semences.

Echantillon	Souche	Identification du genre
Tomate	T ₁₃	<i>Clavibacter</i> spp.
	T ₁₁₂	<i>Ralstonia</i> ssp.
	T ₁₄₂	<i>Ralstonia</i> ssp.
	T ₂₄	<i>Clavibacter</i> spp.
	T ₂₆	<i>Clavibacter</i> spp.
	T ₂₆₂₂	<i>Clavibacter</i> spp.
	T ₃₃₁₁	<i>Clavibacter</i> spp.
	T ₃₃₁₂	<i>Clavibacter</i> spp.
Pomme de terre	B ₈	<i>Clavibacter</i> spp.
	B ₉	<i>Clavibacter</i> spp.
	B ₁₀	<i>Clavibacter</i> spp.
	B ₁₂	<i>Clavibacter</i> spp.
	B ₂₁	<i>Ralstonia</i> ssp.
Betterave	R ₄	<i>Clavibacter</i> spp.
	R ₆	<i>Clavibacter</i> spp.
	R ₇	<i>Clavibacter</i> spp.
Concombre	C ₄	<i>Pectobacterium</i> ssp.

Sur la tomate, on peut supposer le genre *Clavibacter* spp. pour les isolats (T₁₃, T₂₄, T₂₆, T₂₆₂₂, T₃₃₁₁ et T₃₃₁₂). L'aspect macroscopique montre des colonies luisantes, circulaires, lisses et de couleur jaune. L'observation après coloration de Gram, indique qu'il s'agit de bâtonnets, aérobies oxydatives à Gram positif. Le second genre pourrait être *Ralstonia* ssp. pour les isolats (T₁₁₂ et T₁₄₂), ces derniers montrent un aspect macroscopique avec des colonies lisses, luisantes. Cependant, l'aspect microscopique montre des cellules bactériennes à bâtonnets et à Gram-négatif.

Sur la pomme de terre on peut supposer le genre *Clavibacter* spp. pour les isolats (B₈, B₉, B₁₀ et B₁₂) et le genre *Ralstonia* ssp. pour l'isolat (B₂₁).

Sur la semence de betterave on suppose la présence du genre *Clavibacter* spp. sur les isolats (R₄, R₆, R₇). Cependant, la bactérie isolée à partir des échantillons de semences du concombre pourrait appartenir au genre *Pectobacterium* ssp. pour l'isolat (C₄). L'aspect macroscopique montre des colonies grandes, lisses, de forme convexe avec une coloration blanche et l'aspect microscopique sont des Gram négatif, sous la forme de bâtonnets.

2. Discussion

Un total de 94 bactéries ont été isolées à partir des neuf échantillons de semences locales et importées de diverses plantes cultivées. Sur les deux milieux d'isolement ; LPGA et le milieu spécifique King B. Les bactéries montrent un taux de croissance important du fait de la richesse de ces milieux en composés carbonés et azotés répondant aux exigences nutritionnelles des bactéries (Pilet M-F. et al ,2005).

Les semences étudiées sont pour la plupart importées (pomme de terre, betterave, melon, courgette, concombre, chou, petit pois et haricot) à l'exception de la tomate qui est produite localement. Sur les 94 bactéries provenant des différentes semences, un total de 30 isolats (32%) ont été recensés à partir de la tomate. Cette espèce est considérée comme une culture très sensible aux maladies en général et en particulier à celles causées par les bactéries. D'après Blancard, (2009), le nombre de maladies affectant la tomate est importante : plusieurs centaines de bioagresseurs, plus de 50 affections non parasitaires, sans compter les nouvelles pathologies émergentes avec une fréquence inquiétante.

La deuxième étape a permis de recenser parmi les bactéries isolées, celles qui sont phytopathogènes. En effet, le test d'hypersensibilité sur le tabac permet d'identifier les bactéries phytopathogènes après leur inoculation sur le tabac, par une réaction nécrotique spécifique (Jones et Geider, 2001).

Les résultats ont montré que les bactéries issues des semences de tomate, de pomme de terre, de concombre et de betterave infiltrées sur le limbe du tabac produisent des nécroses caractéristiques au niveau de la zone d'inoculation. Ce résultat nous indique la présence de bactéries phytopathogènes dans le lot de semences de ces plantes cultivées. Par contre, les bactéries isolées des échantillons de semences de petit pois, de haricot, chou, de courgette et de melon n'ont pas montré une réaction nécrotique sur le tabac indiquant par conséquent, l'absence de bactéries phytopathogènes. Ce résultat nous révèle que nous avons isolé deux types de bactéries sur nos milieux, aussi bien celles qui sont phytopathogènes que les saprophytes. Ces dernières ont par la suite été éliminées de la suite des tests préconisés dans notre protocole expérimental.

Les souches bactériennes sélectionnées de la pomme de terre et testées pour leur pouvoir pectinolytique n'ont pas montré de réaction positive. En effet, ce test nous permet de recenser pour les pathogènes bactériens de la pomme de terre ceux qui causent la pourriture molle et les bactéries à l'origine de cette attaque sont *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* et *Pectobacterium carotovorum* ssp. *chrysanthemi*. Les bactéries testées ne possèdent pas par conséquent, l'enzyme pectinolytique responsable de la macération des tissus (Schaad *et al*, 2001).

Les résultats d'identification préliminaire des bactéries phytopathogènes isolées lors de cette étude montrent la présence majoritaire des Gram+ avec 76% par rapport aux Gram- qui ont été retrouvées à de faibles pourcentages soit, 24% uniquement. La bibliographie rapporte que la majorité des bactéries phytopathogènes appartiennent aux Gram- (Saddler, 1994).

L'étude des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques ont montré une diversité de genres de bactéries phytopathogènes isolés à partir des semences.

L'identification des espèces se base sur le profil biochimique, mais dans notre étude les tests utilisés ne nous permettent pas une identification précise de l'espèce. D'après Franz *et al*, (2004), l'utilisation de l'identification phénotypique traditionnelle pour caractériser les espèces devient extrêmement difficile, sinon impossible.

A partir de la pomme de terre les isolats pathogènes (B₈, B₉, B₁₀, B₁₂) pourraient correspondre au genre *Clavibacter* spp. d'après l'observation microscopique et la coloration de Gram. En effet, les bactéries observées sont des bacilles à Gram positif et l'observation macroscopique des colonies montre une surface lisse luisante de couleur jaune. Plusieurs auteurs, dans la littérature, ont montré que l'observation après coloration de Gram, indique qu'il s'agit de cellules en forme de bâtonnets, aérobies, Gram positive (Bradbury, 1986) et l'observation des souches de *Clavibacter* spp. développées sur milieu LPGA forment des colonies luisantes, circulaires, lisses, et de couleur jaune (Rat *et al*, 1991). L'espèce à l'origine de dégâts importants sur la pomme de terre est *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, elle est transmise par semences et constitue un organisme de quarantaine. Cette bactérie provoque le flétrissement bactérien et la mort de la plante et le pourrissement des tubercules. Les pertes de récolte sont particulièrement importantes (Lise *et Michel*, 2005).

Concernant l'autre groupe de souches pathogènes isolées de la pomme de terre, l'observation microscopique a montré des bacilles à Gram-négatif et l'observation macroscopique révèle des colonies luisantes avec une surface lisse comme indiqué dans les travaux de Saddler, (1994). Nous avons supposé que ces bactéries seraient des *Ralstonia solanacearum*. Cette bactérie est d'origine tellurique mais peut être disséminée également par la semence. Elle provoque la maladie du flétrissement bactérien sur la pomme de terre (Yabuuchi et al, 1996).

Les échantillons de tomate ont permis d'isoler des bactéries phytopathogènes à la fois à partir de la semence entière mais aussi à partir des cotylédons de la graine. Quatre bactéries ont été isolées à partir de la semence entière (T₁₃, T₂₄, T₂₆, T₂₆₂₂) et deux seulement à partir de l'embryon (T₃₃₁₁, T₃₃₁₂). Nos observations microscopique et macroscopique sont en adéquation avec ceux rapportés par Davis et al, (1984) et Bradbury, (1986). D'autres auteurs rapportent que la localisation des *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* dans l'endosperme et / ou l'embryon de graines confirmée par épifluorescence et microscopie confocale à balayage laser. L'enrichissement des broyats de semences et l'isolement direct à partir des graines non brisées et les grands fragments de graines permettent de reproduire les mêmes résultats (Lelis, 2015).

Le genre *Ralstonia* spp est supposé également sur les semences de tomate, en effet, *Ralstonia solanacearum* provoque sur la tomate le flétrissement bactérien qui constitue une maladie dévastatrice. Dans de nombreux de pays, cette bactérie est déclarée comme un organisme de quarantaine. Le contrôle de la maladie est extrêmement difficile, surtout si les semences sont infectées .

A partir des échantillons de semences de betterave, les bactéries appartenant au genre *Clavibacter* spp. ont été identifiées sur la base des tests macroscopiques et microscopiques. Le genre *Clavibacter* spp. pourrait être hébergé par la semence de betterave. Dans ce sens, des auteurs ont rapporté que cette espèce constitue un hôte naturel même si ce dernier ne manifeste pas de symptômes et les bactéries appartenant à ce genre, ont été également retrouvées dans les semences de cette espèce (Bugbee & Gudmestad, 1988).

A partir des semences de concombre on suppose le genre *Pectobacterium* spp., l'observation microscopique des cellules indique des bâtonnets à Gram négatif et l'observation macroscopique montre des colonies lisses de coloration blanche comme rapporté par Van der Zwet et al, (2012) et Hauben et Swings, (1999).

Conclusion

Les bactéries phytopathogènes provoquent des dégâts économiques très importants. Les *Xanthomonas* spp. , *Pseudomonas* spp. , *Pectobacterium* spp., *Clavibacter* spp. *Ralstonia* spp. sont des genres qui regroupent des bactéries phytopathogènes causant des maladies redoutables. De très nombreuses plantes monocotylédones et dicotylédones peuvent être affectées, les symptômes développés sur les parties aériennes et souterraines de leurs hôtes sont de type ; nécroses, pourritures, flétrissement, ...etc.

Des conditions de température et d'humidité propres à chaque bactérie sont favorables au développement de la maladie. La dissémination de bactéries se fait par voie aérienne et est favorisée par la pluie et l'arrosage. Le vent peut également propager les foyers de plusieurs maladies bactériennes. La semence cependant, constitue la principale source de dissémination des bactéries phytopathogènes à de longues distances.

Les bactéries présentes dans les semences des plantes cultivées à des proportions même infimes peuvent être suffisantes pour déclencher une épidémie. Afin de pouvoir garantir la bonne qualité sanitaire des semences commerciales, il est donc indispensable de s'assurer de leur état phytosanitaire du fait que l'échange de semences est l'agent principal de diffusion des maladies bactériennes.

A travers cette étude, nous avons isolé et identifié des bactéries phytopathogènes à partir des semences de plantes cultivées. Toute les semences étudiée est importes sauf la tomate, Nous avons isolé 94 isolant des bactéries à travers deux méthodes d'isolement, on isolée un nombre très élève des bactéries à partir d'embryon et de la semence entière, en suite un nombre important des bactéries à partir de la pomme de terre, et un nombre très faible des bactéries à partir de les semences entière de melon, concombre, courgette, chou, betterave, haricot et petit pois.

Les bactéries isolées ont été identifiées et caractérisées par des méthodes biologiques et biochimiques. La méthode biologique a permis d'éliminer un nombre très important des souches isolées non pathogènes et de déterminer les souches isolées pathogènes par une réaction positive lorsqu'elles ont été injectées à des feuilles de tabac. La production de nécroses comme une réaction d'hypersensibilité est spécifique pour les bactéries phytopathogènes.

Les résultats obtenus ont montré que sur un total de 94 isolats bactériens nous avons décelé seulement 18 % de bactéries phytopathogènes. Les bactéries non phytopathogènes pourraient être des organismes saprophytes portés par la semence ou alors des endophytes bactériens jouant des rôles divers dans la protection de la semence contre les divers types de stress biotique et abiotique (Geoffrey et al, 2012).

L'utilisation de quelques méthodes biochimiques basées sur la coloration de Gram, le test oxydase, le test catalase, le test de fluorescence sur le milieu King B, le test oxydation/fermentation, nous a par la suite permis d'orienter le diagnostic en supposant quelques genres sur les bactéries isolées à partir des échantillons de semences.

Ce travail nous a permis de supposer le genre des isolats bactérienne phytopathogènes transmise par semences (Tomate, Pomme de terre, Concombre et Betterave). Par contre les bactéries isolées à partir du Melon, Courgette, Choux, Haricot et Petit pois ne sont pas pathogènes sur le tabac qui seraient probablement pose deux hypothèse la première ces semences saines et la seconde hypothèse il existe des bactéries dans les semences procédant non cultivable sur les deux milieux utilisés dans notre étude.

Trois genres phytopathogènes pourraient être supposés être isolés des échantillons de semences dans cette étude ; *Clavibacter* spp , *Ralstonia* spp et *Pectobacterium* spp. Ces derniers ont été décrits comporter des bactéries phytopathogènes transmises par les semences de nombreuses plantes cultivées et qui peuvent causer des dégâts aux cultures au moment de la germination ou bien en plein cycle végétatif. Ces organismes causent des flétrissements, pourritures, taches grasseuses, nécroses et parfois induire la mort de la plante.

Les résultats montrent également que chez une même semence, plus d'un genre ont été isolés comme c'est le cas de la tomate et de la pomme de terre avec deux genres (*Clavibacter* spp et *Ralstonia* spp). Ce résultat confirme la présence de nombreux pathogènes hébergés par la semence comme rapporté dans la bibliographie.

Les résultats obtenus par cette étude sont préliminaires et basés sur des techniques de laboratoire, classiques, ils ouvrent des perspectives futures notamment dans:

- L'étude d'autres espèces et d'autres variétés de semences pour identifier des bactéries phytopathogènes, dans le but de réaliser un échantillonnage plus représentatif et afin de répondre aussi aux exigences spécifiques du diagnostic des maladies des plantes.

- Application du génie génétique pour l'identification des souches isolées par utilisation de méthodes comme la PCR qui constitue un outil très pratique et précis dans le domaine de la phytopathologie, car elle permet une détection plus rapide et plus fiable des agents phytopathogènes.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographie

A

Anonyme, 2011 . Ministère de l'Agriculture ; Organisme de quarantaine .Arrêté du 10 février 2011 fixant les listes A et B des espèces et variétés végétales autorisées à la production et à la commercialisation.

Amadou M. Beye, Monty P. Jones, Brent M. Simpson ,2008 . Guide du riziculteur: comment améliorer la qualité de la semence ? Collection ADRAO/AFRICA RICE.

Anvar, Shabnam Laure, 2008, *Semences et droit : l'emprise d'un modèle économique dominant sur une réglementation sectorielle*, Thèse pour doctorat en droit, Université de Paris-I Sorbonne, en ligne : http://tel.archivesouvertes.fr/docs/00/33/57/66/PDF/20081030_These_Anvar_Tome_1_Semences_et_droit.pdf , lien vérifié en août 2011.

Anonyme, 2005 .Application de mesures législatives lors de l'importation et l'exportation des semences.

Anonyme, 2004. Ministère de l'Agriculture .Importation des produits végétaux.

Anonyme, 2002. Ministère de l'Agriculture. Décret présidentiel n° 02-400 du 25 novembre 2002 portant ratification de la Convention Internationale pour la Protection des Végétaux, telle qu'approuvée par la Conférence de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.

Anonyme, 2002 . Ministère de l'Agriculture .L'exportation des produits végétaux.

Araud-Razou, I., Vasse, J., Montrozier, H., Etchebar, C., and Trigalet, A. ,1998. Detection and visualisation of the major acidic polysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonisation. *EurJ Plant Pathol* 104: Pp795–809.

Adhikari, T.B. and R.C. Basnyat. 1998. Effect of crop rotation and cultivar resistance on bacterial wilt of tomato in Nepal.*Can. J. Plant Pathol.* 20: Pp283-287.

B

Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Candresse T. ,2009. Les maladies de la tomate. ed. INRA.

Boulal H., Zaghouane O., EL Mourid M. et Rezgui S. ,2007. Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed. ITGC, INRA, ICARDA, Algérie, Pp176 .

Bally F, 2006. Microbiologie Pathogenese. Volume1, Pp 24.

Blancard, 1998 .Maladies de la tomate observer, identifie, lutte, Pp232 .

Baker K. F., and S. H. Smith. 1996. Dynamics of Seed Transmission of Plant Pathogens. Annual Review of Phytopathology. Vol. 4: Pp 311-332.

Bugbee & Gudmestad, 1988 .The recovery of *Corynebacterium sepedonicum* from sugarbeet seed. Phytopathology 78:Pp 205-208.

Bradbury J.F., 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria, CAB International Mycological Institute, Kew, UK.

Bradbury R.F. ,1984. Genus II *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Krieg, R., Holt, J.G. Eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore: Pp 199–210 .

C

Cariglia A.,2007. Lutte préventive contre le flétrissement bactérien en culture de tomate hors sol - Etat des connaissances et conseils.

Cariglia B., Alessandro D. and Cristiano P., 2004.The biodiversity Conservation Centre of Cagliari.

Chaux C. et Foury C., 1994 .Maitrise des facteurs de production, qualité et traitement des semences,mise en culture par semis in place in Production légumière.Tome 1-Generalite. Tec et Doc. Lavoisier. Pp 227-431-445.

Chellemi , D.O,Olson, S.M , Scott,J.W , Miltchell,D.J., and R.McSorley,1993 .Reduction of patoparasitic on tomato.

Chang, R. J., Ries, S. M., Pataky, J. K., 1992 . Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathol.* 82: Pp 553-560.

Cromarty, A.S., Ellis, R.H. and Roberts, E.H., 1982. The design of seed storage facilities for genetic conservation, Pp 96 .

D

De Leon L, Siverio F, Lopez MM and Rodriguez A, 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease*, 95,Pp 1328–1339.

Dawn L., Arnold, Helen C., Lovell, Robert W. Jackson and John W.,Mansfield ,2011 .*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from ‘has bean’ to supermodel.

Domergue M. et Pirot R., 2008. *Jalropha Cl/l'cas* L. Rapport de Synthèse bibliographique. CIRAD et AGRO génération. France. Pp118.

David, 1998. Producing bean seed. Handbook One. CIAT

Dellagi A, Brisset MN, Paulin JP, Expert D., 1998. Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 8:Pp734-742.

Dzhalilov, F.S. et R.D. Tiwari. 1995. Soil and cabbage plant debris as infection sources of black rot. *Arch. Phytopath. Pflanz.* 29 : Pp383-386.

Davis , MJ,Gillaspie AK,Vidaver and Harris, 1984,Clavibacter a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria ,including *Clavibacter xyli* subsp.cynodontis subsp.nov.,pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease.*International Journal of Systematic Bacteriology*,34,Pp107-117.

Dowson , 1939 . The Taxonomy of *Xanthomonas*.

E

Eichenlaub R., Gartemann K. H. et Burger A. ,2006. *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. In Gnanamanickam SS, ed. Plant-associated bacteria. Dordrecht, the Netherlands: Springer, Pp385-421.

EPPO, 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Elphinstone, J.G. and P. Aley. 1993. Integrated control of bacterial wilt in seed production by the Burundi National Potato Program, Pp 284-288.

F

FAO/IPGRI, 1994. Manipulation des semences dans les banques des gènes.

G

Gartemann KH, Abt B, Bekel T, Burger A, Engemann J, Flügel M, Gaigalat L, Goesmann A, Gräfen I, Kalinowski J, Kaup O, Kirchner O, Krause L, Linke B, McHardy A, Meyer F, Pohle S, Rückert C, Schneiker S, Zellermann EM, Pühler A, Eichenlaub R, Kaiser O, Bartels D. , 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity.

Gitaitis and Walcott, 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases.

Geoffrey Orgeur , Aurélia Luciani Valérie Grimault , Jean-François Guimbaud , Marie-Agnès Jacques ,2006. Le projet européen TESTA (Treatment methods, Evidence for Seed Transmission and Assessment of seed health): compréhension des mécanismes de transmission des agents pathogènes à et par la semence pour un développement de méthodes de détection d'agents pathogènes et de traitements alternatifs sur semences.

Gate P et Giban M, 2003. Stades du blé .ED Paris, ITCF. Pp68.

Gail M. , 2000. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time.

Grimault V, Anais G, Prior P. 1994. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathol.* 43: Pp 663-668.

Gaignard JL, Luisetti J., 1993. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *agronomie* 13,Pp 333-370.

Gitaitis R.D., R.W. Beaver and A.E. Voloudakis, 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease* 75, 834–838.

Goode, M.J.; Sasser, M., 1980 .Prevention - the key to controlling bacterial speck and bacterial speck of tomato. *Plant Disease* 64, Pp831-834.

H

Heulin .T ,2005. Interactions plantes pathogènes et symbiotes.

Heller R., Esnault R. et Lance C., 2004 .Physiologie végétale 2. Développement. Ed Dunod.Paris. Pp 64-260.

Hopkins W.G., 2003. Physiologie végétale .Traduction de la 2^{ème} édition américaine par Serge R.Ed de Boeck Pp 309-362.

Hausbeck, M. K., Bell. J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., Fulbright, D. W., 2000. Effect of Bactericides on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomatoes in the Greenhouse and on Disease Development and Crop Yield in the Field. *Phytophthol.* 90:Pp38-44.

Hauben L., Swings J., 1999. Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, The Proteobacteria, Port B the Gamma proteobacteria, ed Spinger N°2, Vol. 2:Pp 670-677.

Hauben L., Moore E.R.B., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L. and Swings J., 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, Pp384-397.

Hueck CJ. ,1998 . Microbiol Mol Biol Rev 62(2):379-433. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.

Hall, R., ed. 1991. Compendium of" Bean Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota. Pp102 .

Hugh, R. and Leifson, E. ,1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of bacteriology* 66, Pp24-26.

J

Jones JDG, Dangl JL., 2006. The plant immune system. Nature Rev. Pp 444:323–329.

Jones, A. and Geider, K. ,2001. Gram negative bacteria. Erwinia amylovora group. In Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria ed. Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chum, W. pp. 40–55. St Paul, MN: APS Press.

Jahr H., Dreier J., Meletzus D., Bahro R. et Eichenlaub R. 1999. The endo- -1,4 glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13(7):Pp 703–714.

Jenner C.,Hitchin E.,Mansfield J.,Walters K.,Betteridge P.and Taylor J. ,1991.Gene-for-gene interaction between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *phaseolus*.Moi.Plant-Microbe interact.4:Pp553-562.

K

Kocks, C.G. and Zadoks. C.G.,1996. "CABBAGE REFUSE PILES AS SOURCES OF INOCULUM FOR BLACK ROT EPIDEMICS",*Plant disease*, 80(7), Pp 789-792.

Klement K., Rudolph K., Sands D.C. ,1990. Methods in Phytobacteriology. Intl Specialized Book Service Inc. Pp 810.

King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. ,1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*: 44, 301-307.

L

Lerat, S.; Simao-Beauvoir, A. M.; Beaulieu, C.,2009."Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity". *Molecular Plant Pathology* **10** (5): Pp 579–85.

Lise V. et Michel L., 2005. Immunofluorescence (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*).

Linington, S. H. 2003. The design of seed banks. Pp. 591–636 in *Seed conservation: Turning science into practice.* (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard and R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, GB.

Lizot, J.F., Griboval, B., Guénard, M., 2002. Désinfection des semences : des produits naturels pour le bio. *Alter-Agri*. N° 53.

Leyns F, De Cleene M, Swings J & De Ley J,1984 .The host range of the genus *Xanthomonas*. *Bot Rev* 50: 305–355.

Lelliott et Stead., 1987. Milieu Levure Peptone Glucose Agar (LPGA)

Laffont J., 1985. le désherbage des céréales. *AGRI-NAHAN*.Pp 96 .

M

Mutlu, N.; Vidaver, A. K.; Coyne, D. P.; Steadman, J. R.; Lambrecht, P. A.; and Reiser, J., 2008. "Differential Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv.*phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* Strains on Bean Genotypes with Common Blight Resistance".

Mabagala R.B ET Saettler A.W, 1992. An improved semi selective medium of recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*. *Plant Dis.* 76:Pp443-446.

Multon J.L,1982 .Conservation et stockage des graines et grains et produits dérivés céréales, oléagineuse, proteagineuse, aliments pour animaux. *Technique et Documentation Lavoisier Paris* Apria. Volume1 ,233.

P

Sarah M. Markland, Daniel F. Farkas, Kalmia E. Kniel, and Dallas G. Hoover, 2014. *Les bactéries sporulées pathogènes et capable de résister à l'inactivation par des traitements thermiques.*

Shila S. J., Islam M. R., Ahmed N. N., Dastogeer K. M. G., Meah M. B. 2013, Detection of *Pseudomonas Syringae* pv. *Lachrymans* Associated with the Seeds of Cucurbits.

Pao W., Miller VA., Politi KA, Riely GJ. , Somwar R., Zakowski MF., Kris MG. , Varmus H., 2005. Acquired resistances of lung adenocarcinomas to gefitinib or enlotinib is associated with a seconde mutation in the EGFR Kinase domain.

Pilet M-F., Magras Catherine et Michel Federighi ,2005. Bacteries lactiques In Bacteriologie alimentaire “compendium d’hygiene des aliments”. Federighi M. vegetables. LWT., 41:432-441.

Pradhanang, P.M., Momol, M.T., Olson, S.M. and Jones, J.B. ,2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant disease*. 87:Pp 423-427.

S

Schaad, N. W., Opgenorth D. , and Gaush P. ,2002. Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology* **92**(7): 721-728.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W., 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press. Third edition 373p. St Paul, Minnesota (US).
Schaad *et al*, 2001.

Schell MA, 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology*, 38:263-292.

Schaad N.W., Hildebrand D.C., Scoth M.N., Sands D.C., 1988. In plant pathologic bacteria, laboratory guide for identification. ed N°02. N. W. APS Minnesota. USA. 37- 53.

Saddler GS ,1994. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1220. *Burkholderia solanacearum*. *Mycopathologia* **128**, 61–63.

T

Trivedi Pankaj , Anita Pandey, and Lok Man S. Palni ,2008.Bacterial Inoculants for Field Applications Under Mountain Ecosystem: Present Initiatives and Future Prospects.

U

Utkhede et Koch, 2004.Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl* 49(3) , Pp 305-313.

W

Wisbar A., Hinke R. ,2008. Traitements de semences à l'eau chaude, témoignage sur semences potagères. Actes journée technique ITAB sur la thermothérapie, 22 janvier 2008, Paris.

Wang, Y., D. Rind, C.R. Trepte, G.S. Kent, G.K. Yue, and K.M. Skeens, 1998 .An empirical model study of the tropospheric meridional circulation based on SAGE II observations. *J. Geophys. Res.*, Pp103.

Waksman, S. A., and Hinrici, A. T., 1943 . The nomenclature and classification of the *actinomyces*. *J. Bacteriol.* Pp 46, 337.

www.larousse.fr/dictionnaires/francais/semence/71953.

V

Van der Zwet T., Orolaza-Halbrendt N. and Zeller W., 2012. Losses due to fire blight and economic importance of the disease. In: *Fire blight. History, biology and management*. APS Press, St. Paul, MN, USA,Pp 37–41.

Varma, A.H. and Padh, N. ,2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal*. 2,Pp 386-392.

Vasse J., Frey P., Trigalet A., 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:Pp241-251.

Van Hall, 1904. Nomenclature and classification of *Pseudomonas*.

Y

Yabuuchi ,Vandamme P. ,Coenye C.,1996. Taxonomy of the genus *Ralstonia* (Smith 1896) .

Yamada et Komagata, 1972 . Description of *Curtobacterium* spp.

Z

Zitter, D.L. Hopkins, and C.E. Thomas, 2015. Compendium of Cucurbit Diseases, eds. T.A. APS Press.

Annexes

Milieux de culture utilisés

Annexe 1 : Composition de milieu LPGA (Lelliott et Stead., 1987), utilisés pour l'isolement des souches .

Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	10g
Bactotryptone	5g
Agar bactériologique.....	17g
H ₂ O distillée	1000ml

pH =7-7.2, autoclavage pendant 20mn à 120°C.

Annexe 2 : Composition de milieu King B (King et al ,1954), utilisés pour l'isolement des souches.

Protéose-peptone No. 3.....	20,0g
Glycérol	10,0ml
Phosphate de potassium dibasique.....	1,50 g
Sulfate de magnésium heptahydraté.....	1,50 g
Agar bactériologique.....	15, 0 g
H ₂ O distillée	1000ml

pH =7, autoclavage pendant 20mn à 120°C.

Annexe 3: Composition de milieu Hugh et Leifson (Hugh et Leifson, 1953), utilisés pour le test biochimique.

Bactotryptone.....	2,0 g
Phosphate de potassium dibasique.....	0,3 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Bleu de bromothymol.....	0,03 g
D(+)-glucose.....	10,0 g*
Agar bactériologique.....	0,3 g
H ₂ O distillée	1000ml

pH =7, (*) Après autoclavage 20mn à 120°C, on ajoute les 10 g de glucose par filtration.

Table des matières

Dédicace	
Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Table de matière	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Introduction.....	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique sur les caractéristiques des semences et les bactéries phytopathogènes transmise par semences.....	3
1. Semences, définitions.....	3
2. Qualité des semences	3
2.1. Qualité physique des semences	3
2.1.1. Un minimum de semences endommagées	3
2.1.2. Une quantité minimale de semences de mauvaises herbes ou de matières inertes	3
2.1.3. Un minimum de semences malades	3
2.1.4. Taille uniforme des semences	4
2.2. Qualité physiologique des semences.....	4
2.3 .Qualité génétique des semences	4
2.3.1. Semences de la même variété.....	4
2.3.2 .Les variétés améliorées	5
2.3.3. Les variétés traditionnelles (connues également sous le nom de variétés locales)	5
2.3.5. Tolérance aux ravageurs et aux maladies.....	5
2.4. Qualité et état sanitaire des semences	6
3. Constitution de la semence.....	6
4. Production des semences.....	7
1.5. Stockage des semences.....	8

2. Les bactéries transmises par semences.....	9
2.1. Voies de dissémination des bactéries à la semence.....	9
2.2. Inventaire des différents genres de bactéries phytopathogènes transmises par semences.....	10
2.1.1. <i>Ralstonia spp.</i>	10
2.1.2. <i>Pseudomonas spp.</i>	11
2.1.3. <i>Xanthomonas spp.</i>	12
2.1.4. <i>Erwinia spp.</i>	13
2.1.5. <i>Clavibacter michiganensis</i>	14
2.1.7. <i>Streptomyces</i>	14
2.1.8. <i>Curtobacterium spp.</i>	15
3. Méthodes de détection des bactéries transmises par semences.....	16
4. Méthodes de lutte contre les bactéries transmises par semences	17
4.1. Lutte culturale	17
4.2. Lutte biologique	17
4.2. Lutte génétique.....	18
4.3. Lutte chimique.....	19
4.4. Lutte physique	19
4.4.1. Traitements de semences à la vapeur	20
4.4.2. Traitements de semences à l'eau chaude : la thermothérapie	20
4.4. La législation.....	20
Chapitre II: Matériel et méthodes.....	22
Objectif de l'expérimentation.	22
1. Matériel végétal (semences).....	22
2. Méthode d'isolement des bactéries	23
2.1. À partir de la semence entière	24
2.2. Isolement des bactéries à partir des embryons des semences.....	25
3. Purification et conservation des souches.....	26
4. Tests d'identification des bactéries.....	26
4.1. Tests biologiques.....	26
4.1.1. Test d'hypersensibilité sur le tabac (<i>Nicotiana tabacum var. Xanthi</i>).....	26

4.1.2. Test de pathogénicité sur la pomme de terre (test de pectinolyse).....	26
4.2. Tests biochimiques.....	27
4.2.1. Test de coloration de Gram	27
4.2.2. Test de fluorescence sur King B	27
4.2.3. Test d'activité cytochrome oxydase	27
4.2.4. Test catalase	28
Chapitre III: Résultats et discussion.....	30
1. Résultats	30
1.1. Caractérisation des isolats	30
1.1.2. Caractéristiques macroscopiques	30
1.1.3. Caractéristiques microscopiques	30
1.2. Réaction au test d'hypersensibilité sur le tabac	32
1.3. Test de pathogénicité sur la pomme de terre.....	31
1.4. Caractérisation biochimique.....	34
1.4.1. La coloration de Gram.....	34
1.4.2. Test de fluorescence sur le milieu King B	34
1.4.3. Test catalase	35
1.4.4. Test d'activité cytochrome oxydase	35
1.4.5. Test respiratoire :oxydation/fermentation.....	36
2. Discussion.....	40
Conclusion et perspectives	43
Références bibliographiques	
Annexes	