THE206

I.N.R.A.
Station de Pathologie végétale
ANGERS

UNIVERSITE PARIS SUD ORSAY
Diplôme d'Etudes Approfondies
de Phytopathologie

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VARIABILITE DE *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE 1915) DYE 1978, AGENT DU CHANCRE CITRIQUE

VERNIERE Christian

Septembre 1988

THE 206

I.N.R.A.
Station de Pathologie végétale
ANGERS

UNIVERSITE PARIS SUD ORSAY
Diplôme d'Etudes Approfondies
de Phytopathologie

DK 514018

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VARIABILITE DE *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE 1915) DYE 1978, AGENT DU CHANCRE CITRIQUE

VERNIERE Christian

Septembre 1988

- REMERCIEMENTS -

Ce rapport représente les résultats des travaux réalisés au cours du stage effectué à la station de Pathologie Végétale du centre I.N.R.A. d'Angers de Mars à Août 1988.

Je tiens à remercier tout spécialement Monsieur Jacques Luisetti, directeur de la station de Pathologie Végétale, pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et le soutien scientifique qu'il a su m'apporté tout au long de ce stage.

J'associe à ces remerciements toutes les personnes du laboratoire, notamment Jean Luc Gaignard, assistant-ingénieur, pour sa disponibilité à répondre à toutes mes "petites questions" ; Catherine Daligaut, technicienne, pour son aide bien efficace quand cela fût nécessaire et Olivier Pruvost qui, au travers de nos discussions m'a fait partager son expérience.

Enfin, que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail soient ici remerciés, tout particulièrement Régine Samson qui a su me faire part de ses réflexions ; Elisabeth de Loménie et Monique Pé, secrétaires de la station, pour leur aide apportée à la mise en page finale de ce rapport ainsi que les personnes de l'Institut de Recherche des fruits et Agrumes de la Réunion qui m'ont fait parvenir le matériel biologique nécessaire à ce travail.

- SOMMAIRE -

	Pages
1 - Introduction.	1
2 - Matériel et Méthodes.	2
2-1 - les souches.	2
2-2 - Milieux de culture, entretien des souches.	2
2-3 - Utilisation des substrats carbonés.	3
2-3-1 - en milieu gélosé.	3
2-3-2 - sur plaques API.	3
2-4 - Sensibilité aux bactériophages.	3
2-4-1 - isolement de phages tempérés.	3
2-4-2 - lysotypie.	3
2-5 - Sensibilité aux antibiotiques - Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).	4
2-6 - Etude sérologique.	4
2-6-1 - obtentioin du sérum.	4
2-6-2 - étude des relations antigéniques : technique de l'immunofluorescence indirecte.	4
2-7 - Etude du pouvoir pathogène et de la sensibilité des hôtes - effet de la dose d'inoculum.	5
3 - Résultats - Discussion.	5
3-1 - Caractères culturaux, isolement des souches.	5
3-2 - Caractères biochimiques.	5
3-3 - Utilisation des substrats carbonés.	6
3-3-1 - en milieu gélosé.	6
3-3-2 - sur plaques API.	6
3-4 - Lysotypie.	7
3-5 - Sensibilité aux antibiotiques - détermination des CMI.	7
3-6 - Etude sérologique par la technique de l'immunofluorescence.	8
3-7 - Etude du pouvoir pathogène et de la sensibilité des hôtes - effet de la dose d'inoculum.	9
4 - Conclusion.	10
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	
ANNEXES.	

1 - INTRODUCTION.

Le chancre citrique ou "Citrus Bacterial Canker Disease" (CBCD) est une maladie bactérienne causée par **Xanthomonas campestris** pathovar **citri** (Hasse 1915) Dye 1978 (**X.c.**pv.**c.**) (21). Il affecte la majorité des espèces d'agrumes (famille des Rutacées) ainsi que d'autres Rutacées sauvages. **X.c.**pv.**c.** est présent dans la plupart des pays de la zone agrumicole tropicale où il occasione des dégâts qui peuvent être importants. Il est largement répandu en Asie à l'état endémique. Toutefois, il n'a pas encore été détecté dans le bassin méditérranéen (3,4,5,11, 12,13,14,17,22,30,32,43,44,46,47,53,55).

Au sein de ce pathovar, on distingue plusieurs formes ou pathotypes initialement décrits en fonction de leur spectre d'hôtes et de leur origine géographique :

-le type A, correspondant au chancre asiatique, possède le spectre d'hôtes le plus large et se retrouve dans la majeure partie des pays concernés par la maladie. Il a été observé pour la première au Japon à la fin du 19e siècle (17).

-le type B, agent du chancre sud américain, a été décrit en 1923 ; il est présent en Argentine, en Uruguay et au Paraguay. Il est apparu sur **Citrus lemon** et affecte essentiellement les citronniers et les limettiers.

-le type C, agent du chancre de la lime mexicaine (**Citrus aurantifolia**), a été découvert en 1963 au Brésil. Il semble limité à ce pays et restreint à la lime mexicaine (39,46). Selon Koizumi (1985), cette forme serait faiblement pathogène sur limettiers de Perse et de Tahiti et sur citronnier "Euréka" et citronnier de Sicile (33).

Enfin plus récemment, deux nouveaux types ont été décrits :

-un type D est apparu en 1981 sur lime mexicaine au Mexique ; il n'entraîne pas de symptômes sur fruits (45,48,49). L'association constante de la bactérie avec la maladie demande encore à être confirmée (27). Stapleton et Garza-Lopez (1988) préfèrent alors nommer la maladie "citrus leaf spot disease" (LSD) (52).

-un type E correspondant au chancre des pépinières est apparu en 1984 en Floride sur citrumelo (**Poncirus trifoliata** x **Citrus paradisi** cv. swingle) qui semble être son hôte le plus commun. Il se distingue par l'absence de pustules chancreuses sur les feuilles (31,50,51).

Pour appuyer cette classification interne au pathovar,de nombreuses études portant sur les caractères bactériologiques et plus récemment sur des aspects génétiques ont été réalisées.

Goto **et al.** (1980) distinguent les types A et B sur leur capacité à utiliser certains sucres et caractérisent le type B par sa sensibilité à un phage spécifique CP3 (28). Les types A et C ne sont pas clairement séparés par la lysotypie (40,42,54).

La sérologie permet de distinguer les types A et C par la technique de diffusion en gélose (6,39) et la technique ELISA (7) alors que le type B montre des affinités avec le type C (15,16). l'emploi d'anticorps monoclonaux distingue les types A et C (8) et fait apparaître des variants au sein du type D (2).

Civerolo (1985) sépare les types A,B et C par leur contenu plasmidique (18). Le type E montre à la fois un profil plasmidique différent et hétérogène (37).

Par une étude du DNA, Hartung et Civerolo (1987) et Gabriel et al. (1988) séparent le type A des types B, C et D qui ne sont pas différenciés. Le type E est séparé. (25,29)

Notre travail concerne l'étude de la variabilité de X.c.pv.c.. L'objectif est de préciser les caractéristiques de la bactérie et leurs variations au sein du pathovar citri. La maîtrise de ces données est une première étape en vue d'une étude ultérieure de la maladie sous son aspect épidémiologique. D'autre part, ce travail devrait permettre de faire apparaître les réalités d'une subdivision au sein du pathovar citri et ses limites.

2 - MATERIEL ET METHODES.

2-1 - Les souches.

Un certain nombre de souches proviennent de collections ou laboratoires étrangers. D'autres sont issues d'isolements antérieurs réalisés à partir d'échantillons reçus au laboratoire (Oman, Chine, Réunion). En outre, des isolements ont été réalisés au cours du stage à partir de dilacérations d'échantillons envoyés de la Réunion. La liste des souches et de leur origine est présentée en annexe 1.

2-2 - Milieux de culture, entretien des souches.

L'isolement des souches au laboratoire a été réalisé sur les milieux suivants : LPGA (extrait de levure:7g. ; biogélytone:7g. ; glucose:7g. ; agar: 15g. ; eau distillée (e.d.):1000ml ; cycloheximide:50ppm ; pH:7) ,LPGA + céphalexine (40ppm), LPGA + céphalotine (33ppm) + mezlocilline (32ppm), milieu LPA'A de Monnier (extrait de levure:5g. ; bactopeptone:5g. ; amidon de maïs:5g. ; agar:15g. ; e.d.:1000ml ; mezlocilline:32ppm ; céphalotine:33ppm) (38).

Les souches bactériennes sont observées en culture sur différents milieux : milieu LPGA, milieu LPA'A et un milieu SMB (saccharose:10g. ; bactopeptone:5g. ; K_2HPO_4:0,5g. ; $MgSO_4,7H_2O$: 0,3g. ; agar purifié Difco:15g. ; e.d.:1000ml) favorable à la croissance du type B de X.c.pv.c. (19).

Les différents tests biochimiques sont réalisés selon les méthodes décrites par Gardan et Luisetti (26).

Le milieu MEVAG est testé pour l'étude de la voie d'assimilation du glucose (peptone:3g. ; KCL:5g. ; glucose:10g. ; rouge de phénol:0,02g. ; e.d.:1000ml ; pH:8,5-9 avant autoclavage ; 13ml/tube de Yvan Hall).

Les souches sont entretenues sur LPGA et repiquées environ tous les 4 jours. Elles sont conservées dans de l'eau distillée stérile (e.d.s.) à -18°c ou sous forme lyophilisée.

L'incubation des boîtes de culture se fait dans une étuve à 28°c et à l'obscurité.

2-3 - Utilisation des substrats carbonés

2-3-1 - en milieu gélosé.

Les milieux de Goto (28) et de Dye (20) sont mis en comparaison pour l'utilisation de certains sucres. Les boîtes gélosées sont ensemencées à l'aide d'un multiensemenceur par dépôt de gouttes calibrées (environ 10^4 bact./goutte). On réalise deux répétitions par souche et par sucre. On note une croissance positive quand la culture est bombée ou le nombre de colonies supérieur à 10. Un voile ou un nombre de colonies inférieur à 10 sont notés par un signe négatif.

2-3-2 - sur plaques API.

Des plaques commercialisées par API et contenant une gamme de sucres, d'acides organiques et d'acides aminés sont ensemencées par addition d'une suspension bactérienne (10^6 bact./ml) jusqu'à obtention d'un dôme au dessus des cupules. La suspension est réalisée à partir d'une culture de 24h sur milieu LPGA. On étudie 2 souches par type de **X.c.**pv.**c.**, sauf pour le type C où une seule souche a été retenue pour l'étude. Une seule répétition par souche est effectuée. La lecture se fait à 3, 6 et 9 jours. On note l'apparition d'un trouble dans la cupule.

2-4 - Sensibilité aux bactériophages.

2-4-1 - isolement de phages tempérés.

On a recherché des phages tempérés sur des souches "réunionnaises" selon la méthode classique. La libération des prophages a été induite par le passage des suspensions bactériennes (10^7 bact./ml) sous un rayonnement ultraviolet pendant 1 mn. (tube UV 254nm). Les phages obtenus sont enrichis jusqu'à obtention d'un titre de 10^8-10^{10} u.f.p./ml puis conservées dans de l'e.d.s. à -18°c.

2-4-2 - Lysotypie.

Les souches sont testées vis à vis de l'action lytique des 3 bactériophages de référence, CP1, CP2, CP3, isolés au Japon et des prophages obtenus.

CP1 et CP2 sont des bactériophages tempérés alors que CP3 est un bactériophage virulent isolé du sol.

CP1, CP2, et CP3 ont été au préalable multipliés respectivement sur XC62, JB3-5 et XC64 jusqu'à obtention d'un titre de environ 10^8 bact./ml.

Les boîtes de milieu gélosé LPGA sont ensemencées en nappe par une suspension bactérienne de 10^7 bact./ml préparée à partir d'une culture de 24h sur milieu LPGA. L'excès est éliminé et les boîtes sont mises à sécher sous la hotte à flux laminaire pendant 15mn.

Les suspensions phagiques sont dosées au titre de la dilution de routine (TDR) et à une concentration 10 fois supérieure à ce titre. Une goutte calibrée de chaque dilution (20 mcl) est déposée sur la nappe bactérienne. On effectue 2 répétitions par dilution et par souche. On note l'apparition soit d'une lyse confluente, soit de plages de lyse.

2-5 - Sensibilité aux antibiotiques - Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Les différentes substances à étudier sont ajoutées dans du milieu LPGA (sans cycloheximide) en surfusion. Des boîtes suffisamment sèches sont ensemencées à l'aide d'un multiensemenceur par dépôt de gouttes calibrées (environ 10^4 bact./goutte). Les suspensions sont réalisées dans de l'e.d.s. à partir de culture de 24h sur milieu LPGA. La souche P209 (**Staphylococcus aureus**) est prise comme témoin de référence et des boîtes de LPGA sont utilisées comme témoin de croissance. On réalise 2 répétitions par souche et par antibiotique.

La lecture se fait après 48h d'incubation à 24-25°c. La notation utilisée est la suivante :

- positif : croissance ou colonies isolées (nombre supérieur à 10).
- négatif : léger voile ou quelques colonies isolées.

2-6 - Etude sérologique.

2-6-1 - obtention du sérum.

Des souches bactériennes sélectionnées en fonction de leur appartenance à un type de chancre ou de leur origine géographique et cultivées sur milieu NYGA, sont mises en suspension dans de l'eau physiologique tamponnée (NaCl:8g ; Na_2HPO_4,$12H_2O$:2,7g ; NaH_2PO_4,$2H_2O$:0,4g ; e.d.:1000ml ; pH:7,2). Les suspensions, contenant environ 10^8 bact./ml, sont placées dans de l'eau à ébullition pendant 60mn puis réparties en doses de 1ml et congelées à -18°c.

Des lapins de la race "Fauve de Bourgogne" sont immunisés par injection de la suspension préparée dans la veine marginale de l'oreille selon le protocole suivant :

- jour t_0 : prélèvement témoin.
- première semaine : 4 injections avec des quantités de suspension de 0,5 à 0,8ml.
- deuxième semaine : repos.
- troisième semaine : 4 injections avec des quantités de suspension de 0,5 à 0,8ml.
- jour t_0 + 24 : prélèvement pour le titrage.

Les prélèvements sont réalisés par coupure au niveau de l'oreille. Après la formation du caillot sanguin, le sérum est récupéré puis centrifugé à 3000 tr/mn pendant 10mn. Il est conservé dans un égal volume de glycérol à +6°c.

2-6-2 - étude des relations antigéniques : technique de l'immunofluorescence indirecte.

Le protocole suivi est une modification de la technique décrite par Faure et al. en 1977. (23) (annexe 2).

On note la présence de corps bactériens fluorescents aux différentes dilutions de l'immunsérum.

2-7 - Etude du pouvoir pathogène et de la sensibilité des hôtes - Effet de la dose d'inoculum.

Cette étude a été réalisée en prenant une souche de chaque pathotype (416/type A, XC96/type B, 380/type C, T20/type D, F6/type E) et une souche réunionnaise JA143.

Les espèces et cultivars suivants ont été inoculés : **Citrus volkameriana**, **C. lemon** cv. "Euréka", **C. sinensis** cv. "Thomson" et cv. "Pine apple", **C. aurantifolia** (lime de Tahiti) et des cultivars hybrides ; mandariniers cv. "Clémentine" et cv. "Beauty", tangor cv. "Ortanique" et tangelo cv. "Minneola".

Les inoculations se font par piqûres et dépôt d'une goutte de suspension faite dans de l'e.d.s. à partir de culture de 24h sur milieu LPGA. On travaille aux dilutions suivantes : 10^5, 10^7 et 10^9 bact./ml. On utilise 3 plantes par espèce ou cultivar, soit une plante par dilution. On sélectionne au hasard 2 feuilles par plante pour une souche. On réalise 10 piqûres par feuille, 5 de chaque côté de la nervure centrale.

Les plantes sont maintenues en serre (température variant de 20 à 40°c, humidité de 50 à 90%).

On note l'apparition de symptômes caractéristiques (pustules chancreuses, tâches huileuses).

3 - RESULTATS-DISCUSSION

3-1 - Caractères culturaux, isolement des souches.

Les colonies de **X.c.pv.c.** sur le milieu LPGA apparaissent bombées, muqueuses, rondes, de couleur jaune paille à jaune d'or. Leur croissance est relativement lente (colonies de 1 à 2 mm après 3 jours). Sur le milieu LPA'A, les colonies peu muqueuses ont une taille réduite (0,5 mm après 3 jours). Elles s'entourent d'un halo clair consécutif à l'hydrolyse de l'amidon présent dans le milieu. Les colonies prennent une couleur jaune pâle. Les colonies sur le milieu SMB sont plus grandes et plus muqueuses que sur le milieu LPGA.

Les souches des types B et C et la souche XC90 (type D) se distinguent par une mucosité plus faible, une couleur jaune d'or et une croissance plus lente que les autres souches sur le milieu LPGA, notamment pour XC64, XC69 et XC70. Leur croissance est plus importante sur le milieu SMB. Elle est plus faible, ou nulle pour XC64 et XC69, sur le milieu LPA'A.

Lors des isolements, l'emploi du milieu LPA'A a permis une sélection plus aisée des bactéries, limitant le développement des germes commensaux. De plus, la présence d'un halo lié aux bactéries recherchées facilite leur reconnaissance. Toutefois, la croissance très faible de certaines souches sur le milieu LPA'A interdit son utilisation exclusive lors d'isolements.

3-2 - Caractères biochimiques.

Les souches de la collection étudiée ont les caractères suivants : oxydatif, cytochrome c oxydase -, nitrate réductase -, production d'H_2S, esculine +, hypersensibilité sur tabac, hydrolyse de l'amidon +, arginine dihydrolase -.

L'étude de la voie d'assimilation du glucose par le test d'Hugh et Leifson n'est pas aisée. Le virage de l'indicateur est faible ou inexistant après 8 jours de culture. Le milieu MEVAG donne une réponse lisible en 24-48h puis il y a alcalinisation du milieu.

Ces résultats confirment leur appartenance au genre **Xanthomonas** (10).

La gélatine (test de Frazier ou technique du culot) n'est pas hydrolysée après 10 jours par les souches des types B et C et par XC90 (type D). La souche 380 (type C) hydrolyse très faiblement la gélatine par la technique du culot.

3-3 - Utilisation des substrats carbonés

3-3-1 - en milieu gélosé.

La comparaison des milieux de Dye et de Goto met en évidence une différence dans la vitesse de croissance des souches sur chaque milieu. Après 48h, les cultures sont bien visibles sur le milieu de Dye alors que la croissance sur le milieu de Goto, en présence des mêmes sucres, est faible ou nulle.

Les résultats sont donnés pour 14 jours de culture. Aucune acidification n'est visible sur le milieu de Dye. Elle est très faible ou nulle sur le milieu de Goto. On observe une croissance de toutes les souches sur les milieux de Dye et de Goto en présence de glucose, de saccharose, de cellobiose et sur le milieu de Dye avec du mannose, du raffinose ou du tréhalose. Les souches du type B et XC70 ont une croissance plus faible ou nulle sur le milieu de Goto en présence de glucose ou de cellobiose.

Ces résultats confirment l'appartenance des souches à l'espèce **Xanthomonas campestris** (10).

Des variations de la croissance sont observées avec le maltose et le lactose (milieux de Dye et de Goto) et avec le malonate (milieu de Goto).(annexe 3).

Les souches des types A et E, les souches d'Oman, de Chine, de Taiwan et de la Réunion et la souche T20 utilisent le lactose et le maltose.

Les souches du type B et la souche XC90 utilisent peu ou pas le lactose et le maltose.

Les souches des types B et C n'assimilent pas le malonate.

3-3-2 - sur plaques API.

Les 9 souches étudiées assimilent les substrats suivants : D glucose, D fructose, D cellobiose, D mannose, saccharose, tréhalose, β gentobiose, D lyxose, L fucose, esculine, glycérol, N acétyl glucosamine, succinate et pyruvate.

Sorbitol, inositol, érythrytol, rhamnose, gluconate, malonate, DL tartrate, cystéine, méthionine, phénylalanine, trytophane et citrulline ne sont pas assimilés.

Seule la souche du type C étudiée n'assimile pas la dα alanine, la lα alanine et le p-hydroxybenzoate.

L'acétate et le raffinose sont assimilés seulement par les souches de Floride.

Les 2 souches du type B n'assimilent pas le maltose, le lactose, l'amidon, le glycogène, le L malate, et la L histidine.

Seule la souche F_1 assimile les substrats L norleucine, L valine, L ornithine, L lysine, D arabinose, L tyrosine et mannitol.

La souche T20 assimile faiblement le butyrate, la salicine et le D turanose.

Les résultats obtenus montrent que l'assimilation de certains substrats dépend du milieu de culture utilisé (annexe 4). Une étude du profil de l'assimilation des substrats carbonés devra donc être attaché à un milieu de culture déterminé et le plus standardisé possible. L'emploi de plaques API, permettant l'étude d'une large gamme de substrats, paraît le plus approprié.

3-4 - Lysotypie

Deux phages tempérés PR1 et PR2 ont été obtenus respectivement à partir des souches réunionnaises C12-1 et B23-1.

Les résultats mettent en évidence 3 lysogroupes :

- le lysogroupe 1 caractérisé par la résistance aux trois phages CP1, CP2 et CP3 comprend les souches des types C et E, la souche T20 (type D), certaines souches du type A (Brésil), les souches d'Oman et certaines souches réunionnaises.

- le lysogroupe 2 regroupe les souches de Taiwan, et certaines souches du type A ou d'origine réunionnaise, sensibles à CP1 et CP2 mais résistantes à CP3.

- le lysogroupe 3 distingue les souches de type B et la souche XC90 sensibles au seul phage CP3.

Les phages PR1 et PR2 se comportent comme CP1 et CP2.

Il apparaît donc que seul le type B peut être caractérisé par lysotypie et que la sensibilité d'une souche à CP1 ou CP2 signifie son appartenance au type A.

Toutefois, certains profils lysotypiques ne correspondent pas à ceux cités dans la littérature (XC59 et XC63 : $CP1^r$-$CP2^s$-$CP3^r$, XC62 : $CP1^s$-$CP2^r$-$CP3^r$). Il est probable que les phages CP1 et CP2 utilisés lors de notre étude ne soient qu'un seul et même phage CP1.

3-5 - Sensibilité aux antibiotiques - détermination des CMI.

Les souches sont classées en 3 classes de sensibilité à partir des CMI obtenues (annexes 5 et 6) :

-sensible (S) : CMI $\leq$ 4 mcg/ml.

-sensibilité intermédiaire (I) : 8 mcg/ml $\leq$ CMI $\leq$ 32 mcg/ml.

-résistante (R) : CMI $\geq$ 64 mcg/ml.

Toutes les souches de **X.c.**pv.**c.** se montrent très sensibles ou sensibles (CMI$\leq$8 mcg/ml) à la streptomycine, à la kanamycine, à la gentamycine, à l'érythromycine et à la fluméquine. La majorité des souches sont peu sensibles ou résistantes à la céphalotine et à la céphalexine, seules les souches XC64, XC69 et XC70 y sont sensibles.

Il existe 2 profils de sensibilité au sein des types B, C et D. XC64 et XC69 (type B) et XC70 (type C) ont des CMI plus faibles que les autres souches de leur type respectif pour la carbénicilline, la céphalotine, la céphalexine, la vancomycine et la meziocilline.

XC90 (type D) se rapproche des souches XC93, XC94 et XC96 du type B.

Les souches 380 et 381 (type C), les souches de Chine, de Taiwan et celles de la Réunion ont un profil de sensibilité voisin.

Les souches du type E ne se distinguent pas des autres souches.

La sensibilité de certaines souches à la meziocilline et à la céphalotine, antibiotiques entrant dans la composition du milieu semi-sélectif LPA'A, montre les limites d'un tel milieu dans la recherche de souches de **X.c.**pv.**c.**. Une sélection de souches parmi la population naturelle de **X.c.**pv.**c.** pourrait s'opérer.

Les résultats obtenus avec d'autres pathovars de l'espèce **Xanthomonas campestris** (O. Pruvost, communication personnelle, 1988) montrent leur sensibilité à la streptomycine, à la kanamycine, à la gentamycine, à l'érythromycine et à la fluméquine. Comme les souches du pathovar **citri**, elles ont des CMI élevées pour la kasugamycine, excepté le pathovar **oryzae**. Leur sensibilité à la carbénicilline est plus forte (annexe 7-1).

3-6 - Etude sérologique par la technique de l'immunofluorescence.

Les 7 séries d'injections réalisées ont permis d'obtenir 5 immunsérums avec les titres suivants en réaction homologue : sérum anti416 (1/6400), sérum antiXC96 (1/1600), sérum anti380 (1/1600), sérum antiT20 (1/6400) et sérum antiF6 (1/1600). Un sérum anti1814 (1/6400) a aussi été utilisé.

Les dilutions suivantes des différents immunsérums ont été retenues pour l'étude :

- sérums anti1814 (Réunion) et antiT20 (type D) : 1/6400, 1/1600, 1/400, 1/100.
- sérums antiXC96 (type B) et antiF6 (type E) : 1/800, 1/100.
- sérum anti380 (type C) : 1/1600, 1/400, 1/100.
- sérum anti416 (type A) : 1/1600, 1/100.

Les résultats montrent que seules les souches du type A, de Taiwan, de Chine, d'Oman et de Réunion ont une affinité importante pour les 2 immunsérums anti1814 et anti416 (annexe 8). Ces mêmes souches ne montrent pas d'affinité pour les sérums antiXC96 (sauf 1207, CH4 et JB3-1 au 1/100), anti380 (sauf CH4 au 1/100) et antiF6. Une légère affinité de ces souches est mise en évidence avec le sérum antiT20 au 1/100 ou au 1/400.

Les souches des types B et C ont un profil sérologique voisin : très faible affinité ou nulle pour les sérums anti1814, anti416 et antiT20, faible affinité avec le sérum antiF6 et forte avec les sérums antiXC96 et anti380. Les souches XC64, XC69 et XC70 montrent une affinité légèrement moins grande avec le sérum antiXC96 et très faible ou nulle avec le sérum antiF6.

Au sein du type D, les 2 souches ont un comportement différent. XC90 a le même profil que XC93, XC94 et XC96 qui appartiennent au type B. T20 se caractérise par un profil particulier.

Les 2 souches du type E se singularisent par leur profil sérologique particulier.

L'étude sérologique d'autres pathovars de **Xanthomonas campestris** montre des affinités entre les pathovars **phaseoli** et **mangiferae indicae** et les sérums antiXC96, anti380 et antiF6. Les pathovars **manihotis** et **oryzae** ont un profil analogue ou voisin à celui des souches du type A (annexe 7-2).

Cette étude sérologique permet donc de caractériser les types A et E par leur profil antigénique. Les types B et C voisins se distinguent des autres types. Elle met aussi en évidence une hétérogénéité antigénique au sein du type D comme l'ont déjà signalé Alvarez **et al.** (1,2). Cependant, il serait souhaitable de poursuivre cette étude sérologique par d'autres approches qui pourraient amener à une classification des souches en sérogroupes (immunodiffusion, techniques d'absorption).

3-7 Etude du pouvoir pathogène et de la sensibilité des hôtes - effet de la dose d'inoculum.

La présence ou non de symptômes est notée après 40 jours d'incubation.

Les souches T20 (type D) et F6 (type E) n'ont provoqué aucune lésion sur l' ensemble des plantes inoculées et cela pour chaque dose. Pour les souches ayant donné des lésions, la dose de 10^5 bact./ml n'a pas entraîné l'apparition de symptômes. L'analyse des résultats porte donc sur les 3 souches des types A, B et C et sur la souche réunionnaise JA143 inoculées aux doses de 10^7 et 10^9 bact./ml. (annexe 9).

Une analyse de variance portant sur les pourcentages de lésions (après transformation en Arcsin) montre des différences significatives à 1% au niveau de la sensibilité des différents espèces et cultivars, au niveau du pouvoir pathogène des souches et au niveau de l'effet des doses d'inoculum employées.

Il apparaît que la souche du type A est la plus pathogène alors que celle du type C se montre la moins pathogène.

Des différences significatives de sensibilité entre les hôtes sont mises en évidence pour les combinaisons souche/dose (bact./ml) suivantes : 416/10^9 (significatif à 5%), XC96/10^7, 380/10^7, 380/10^9 (significatif à 1%). Un classement de la sensibilité des plantes a été obtenu après la mise en oeuvre du test des ranges de Duncan. (annexe 10).

La souche 416 (type A) met en évidence 3 classes de sensibilité. L'oranger cv. "Thomson" se montre le plus sensible et le mandarinier cv. "Beauty" le plus tolérant. Les autres hôtes ont une sensibilité intermédiaire.

L'oranger cv. "Thomson" appartient aussi à la classe des hôtes les plus sensibles vis à vis de XC96 (type B) à laquelle appartiennent l'oranger cv. "Pine apple" et **Citrus volkameriana.** Dans nos conditions expérimentales, le citronnier cv. "Euréka" s'est montré peu sensible au pathotype B alors qu'il est considéré comme un hôte sensible. La sensibilité de nombreux hôtes à la souche du type B après inoculation, mais à des niveaux moindres que la souche du type A, confirme les résultats de Namekata **et al.** (1977) (41).

Parmi les espèces et cultivars développant des lésions après inoculation de la souche 380 du type C, la lime de Tahiti est un des hôtes les plus sensibles à la dose 10^7 bact./ml et le plus sensible à la dose 10^9 bact./ml. Ce résultat confirme la grande sensibilité de **Citrus aurantifolia** au type C. Tangelo cv. "Minneola" apparaît comme un hôte sensible aux 2 doses d'inoculum alors que **Citrus volkameriana**, peu sensible à la dose de 10^9 bact./ml, est le plus sensible à la dose de 10^7 bact./ml.

Seuls les orangers cultivars "Thomson" et "Pine apple" et **Citrus volkameriana** se sont montrés légèrement sensibles à la souche réunionnaise JA143. Cette souche, décrite comme pathogène lors d'expériences antérieures, s'est montrée peu efficace à provoquer des lésions.

De plus nos résultats mettent en évidence que la dose 10^7 bact./ml est plus efficace que la dose 10^9 bact./ml. Il apparaît rapidement une nécrose au point d'inoculation avec la dose de 10^9 bact./ml. Le développement, dans un premier temps, de tels symptômes atypiques nous fait penser à un début de réaction d'hypersensibilité, réaction de défense de la plante mise en évidence dans le cas de couple hôte/pathogène hétérologue. (33,34).

La non pathogénie des souches T20 et F6, dans nos conditions expérimentales, soulève la question de leur appartenance réelle au pathovar **citri** ou de leur rôle en tant qu'agent causal de la maladie. Stapleton et Garza-Lopez (1988), devant la difficulté à isoler des bactéries du type D à partir de lésions, émettent l'hypothèse que ces bactéries ne seraient pas le déterminant principal du chancre mexicain (52). Gabriel **et al.** (1986) après avoir montré les relations pathogéniques et génétiques des souches de Floride avec les pathovars **phaseoli** et **alfafae** discutent de leur appartenance au pathovar **citri** (24).

Ces résultats demandent encore à être confirmés, sur un plus grand nombre de souches, dans des conditions d'environnement contrôlées et sur du matériel végétal homogène. Il serait intéressant de mener une étude parallèle similaire sur du matériel végétal **in vitro**. Si nos résultats se confirmaient, alors nous pourrions envisager un test de caractérisation des 3 pathotypes A, B et C à partir des résultats d'inoculations sur le mandarinier cv. "Beauty" et sur l'oranger cv. "Thomson".

4 - CONCLUSION.

Les résultats obtenus mettent en évidence une variabilité au sein du pathovar **citri** pour certains caractères. La sérologie, la lysotypie et l'hydrolyse de la gélatine permettent de caractériser clairement les types A, B, C et E. Les 2 souches du type D se différencient nettement entre elles sur l'ensemble des caractères étudiés. La souche XC90 se rapproche fortement du type B. Hartung et Civerolo (1986) avaient déjà relevé une similitude entre les types B, C et la souche XC90 au niveau de leur "empreinte génomique" (29). La souche T20 se distingue de l'ensemble des souches par la sérologie. D'autre part, les différents pathotypes se distinguent par leur pouvoir pathogène vis à vis de certaines espèces ou cultivars de **Citrus**. La classification en pathotypes A, B, C, D et E peut donc être mise en relation avec un ensemble de caractères culturaux, biochimiques, lysotypiques, sérologiques et pathologiques.

D'autre part, nos résultats indiquent que les souches de Taiwan, de Chine, d'Oman et de la Réunion sont apparentées au type A. Elles montrent les mêmes affinités sérologiques que les souches de ce type et hydrolysent la gélatine. Les variations observées pour les autres caractères chez ces souches sont similaires à celles observées au sein du type A.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1 - ALVAREZ A.M., BENEDICT A.A., CIVEROLO E.L. 1986. Unique strains of **Xanthomonas campestris** pv.**citri** associated with mexican citrus bacteriosis. **Phythopathology.** 76 (10) 1078 (Abstr.).

2 - ALVAREZ A.M., BENEDICT A.A., MIZUMOTO C.Y., CIVEROLO E.L. 1987. Mexican lime bacteriosis examined with monoclonal antibodies.**Proc. Sixth Int. Conf. Plant Path. Bact., College Park, 1985.** p 847-852.

3 - AUBERT B., LUISETTI J., CIVEROLO E.L., CADET TH., LAVILLE E. 1982. Le chancre citrique à l'île de la Réunion. **Fruits.** 37 (11) 705-722.

4 - AUBERT B. 1983. Quelques stratégies adoptées dans divers pays agrumicoles pour lutter contre le chancre citrique-orientations possibles pour l'île de la Réunion. **Rapport de mission IRFA.** 28p.

5 - AUBERT B. 1987. Le symposium chancre citrique/blight organisé par l'institut biologique de st Paul,juin 1987. **Doc. interne IRFA.** 18p.

6 - BACH E.E., ALBA A.P.C., PEREIRA A.L., ZAGATTO A.G., ROSSETI V. 1978. Serological studies of **Xanthomonas citri** (Hasse) Dowson. **Arq. Inst. Biol., Sao Paulo.** 45 (4) 229-236.

7 - BACH E.E., ALBA A.P.C., NETO J.R. 1982. Detection of strains of **Xanthomonas campestris** pv. **citri** (Hasse) Dye by enzyme linked immunosorbent assay (Elisa). **Fitopatologia Brasileira.** 7 , 407-415.

8 - BACH E.E., ROSSETTI V. 1984. A review of serological studies on **Xanthomonas campestris** pv. **citri. Proc. Int. Soc. citriculture.** 1 , 361-363.

9 - BACH E.E. 1987. Serological applied to the studies on **Xanthomonas campestris** pv. **citri.** (Abstr.). **Abstr. Int. Symp. Citrus Canker, Declinio/Blight and similar diseases, Sao paulo, Brazil, 1987.** 55p.

10- BRADBURY J.F. 1984. Genus II.**Xanthomonas** Dowson, 1939. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 1 , 199-210.

11- BRUN J. 1971. Le chancre bactérien des citrus. **Fruits.** 26 (7-8) 533-540.

12- CALAVAN E.C. 1956. Citrus canker : a bacterial disease caused by **Xanthomonas citri. Calif. State Dept. Agr. Bull.** 45 (4) 259-262.

13- CHAKRAVARTI B.P., CHAUDARY S.L. 1987. Citrus in India with special reference to Rajasthan. (Abstr.). **Abstr. Int. Symp. Citrus Canker, Declinio/Blight and similar diseases, Sao Paulo, Brazil, 1987.** 55p.

14- CIVEROLO E.L. 1981. Citrus Bacterial Canker Disease : an overview. **Proc. Int. Soc. Citriculture.** 1 , 390-394.

15- CIVEROLO E.L., HELKIE C. 1981. Indirect enzyme linked immunosorbent assay of **Xanthomonas campestris** pv.**citri. Proc. Fifth Int. Conf. Plant Path. Bact., Cali, 1981.** p 105-113.

16- CIVEROLO E.L., FAN F. 1982. **Xanthomonas campestris** pv.**citri**, detection and identification by enzyme linked immunosorbent assay. **Plant Disease.** 6 , 231-236.

17- CIVEROLO E.L. 1984. Bacterial canker disease of citrus. **J. Rio Grande Vall. Hort. Soc..** 37 , 127-146.

18- CIVEROLO E.L. 1985. Indigenous plasmids in **Xanthomonas campestris** pv. **citri**. **Phytopathology.** 75 , 524-528.

19- DE ECHENIQUE B.I.C., LAGORY D., STALL R.E. 1985. A medium for cultivation of the B strain of **Xanthomonas campestris** pv.**citri** cause of cancrosis B in Argentina and Uruguay. **Plant Disease.** 69 (2) 122-123.

20- DYE D.W. 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of the **Xanthomonas** spp. **N. Z. J. Sci..** 5 (4) 393-416.

21- DYE D.W., BRADBURY J.F., GOTO M., HAYWARD A.C., LELLIOT R.A., SCHROTH M.N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Rev. Plant Path..** 59 (4) 153-168.

22- EL GOORANI M.A. 1987. Plant diseases caused by bacteria in United Arab Emirates. **Proc. Sixth Int. Conf. Plant Path. Bact., College Park, 1985.** p.653-657.

23- FAURE M., DUPOUEY P., MORELEC M.J. 1977. Les techniques de l'immunofluorescence et les réactions immuno-enzymatiques. Maloine S.A. ed.Paris 6e. 566p.

24- GABRIEL D.W., BURGES A.R., LAZO G.R., ROFFEY R. 1986. **Xanthomonas campestris** pvs.**citri**, **alfafae** and **phaseoli** are genetically and pathologically related. **Phytopathology.** 76 : 1076 (Abstr.)

25- GABRIEL D.W., HUNTER J.E., KINGSLEY M.T., MILLER J.W., LAZO G.R. 1988. Clonal population structure of **Xanthomonas campestris** and genetic diversity among citrus canker strains. **Mol.Plant-Microbe Int..** 1 (2) 59-65.

26- GARDAN L., LUISETTI J. 1982. Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes. I.N.R.A. Angers. 32p.

27- GARZA-LOPEZ J.G., URRUTIA V.M.M., RODRIGUEZ J.B. 1987. Present status of mexican lime **Citrus aurantifolia** swingle "bacteriosis" in Mexico. (Abstr.). **Abstr. Int. Symp. Citrus Canker, Declinio/Blight and similar diseases, Sao Paulo, Brazil, 1987.** 55p.

28- GOTO M., TAKAHASHI T., MESSINA M.A. 1980. A comparative study of the strain of **Xanthomonas campestris** pv. **citri** isolated from citrus canker in Japan and cancrosis B in Argentina. **Ann. Phytopath. Soc. Japan.** 46 , 329-338.

29- HARTUNG J.J., CIVEROLO E.L. 1987. Genomic fingerprints of **Xanthomonas campestris** pv. **citri** strains from Asia, South America and Florida. **Phytopathology.** 77 , 282-285.

30- JONES D.R., MOFFET M.L., NAVARATNAM S.J. 1984. Citrus canker on Thursday Island. **Austr. Plant Path..** 13 (4) 64-65.

31- KENDER W.J. 1987. Citrus canker : situation in the United States. (Abstr.). **Abstr. Int. Symp. Citrus canker, Declinio/Blight and similar diseases, Sao Paulo, Brazil, 1987.** 55p.

32- KHAN I.D., HINGORANI M.K. 1970. Strain studies in **Xanthomonas citri** (Hasse) Dowson. **J. Hort. Sci..** 45 , 15-17.

33- KLEMENT Z., FARKAS G.L., LOVREKOVITCH L. 1964. Hypersensitive reaction by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. **Phytopathology.** 54 , 474-477.

34- KLEMENT Z. 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. **Ann. Rev. Phytopathology.** 5 , 17-43.

35- KOIZUMI M. 1985. Citrus canker : the world situation. in **citrus canker : an international perspective.** ed. by L.W.Timmer. 28p.

36- LAVILLE J. 1985. Etude de souches de **Xanthomonas campestris** pv. **citri,** (Hasse, 1915) Dye 1978, isolées de l'île de la Réunion. **Fruits.** 40 (11) 719-738.

37- LAZO G.R., GABRIEL D.W. 1987. Conservation of plasmid DNA and pathovar identification of strains of **Xanthomonas campestris.** **Phytopathology.** 77 (3) 448-453.

38- MONNIER E. 1986. Contribution à l'étude épidémiologique de **Xanthomonas campestris** agent causal du chancre citrique dans le cadre de l'île de la Réunion. Thèse de 3ème cycle, Faculté des sciences d'Orsay/Paris XI. 207p.

39- NAMEKATA T., OLIVEIRA A.R. 1972. Comparative serological studies between **Xanthomonas citri** and a bacterium causing canker on mexican lime. **Proc. Third. Int. Conf. Plant Path. Bact., Wageningen, 1971.** p 151-152.

40- NAMEKATA T. 1977. Bacteriophages CP1 and CP2 behavior to the causal agents of différent types of citrus canker. **I-Congreso mundial de citricultura, 1973.** 2 , 663-664.

41- NAMEKATA T., BALLMER E. 1977. Comparative studies on pathogenicity among causal agents of the three citrus canker. **I-congreso mundial de citricultura, 1973.** 2 , 659-662.

42- OBATA T. 1974. Distribution of **Xanthomonas citri** strain in relation to the sensitivity to phages CP1 and CP2. **Ann. Phytopath. Soc. Japan.** 40 , 6-13.

43- ROBBS C.F., NETO J.R., RIBEIRO R., KIMURA O. 1981. Annotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. **Proc. Fifth Int. Conf. Plant Path. Bact., Cali, 1981.** p 601-613.

44- RODRIGUEZ G.S., GARZA-LOPEZ J.G., STAPLETON J.J., CIVEROLO E.L. 1985. Citrus bacteriosis in Mexico. **Plant Disease.** 69 (9) 808-810.

45- RODRIGUEZ G.S., STAPLETON J.J., CIVEROLO E.L. 1987. **Xanthomonas campestris** involved in mexican lime bacteriosis in Colima. **Proc. Sixth Int. Conf. Plant Path. Bact., college Park, 1985.** p 658-662.

46- ROSSETTI V. 1977. Citrus canker in latin America : a review. **Proc. Int. Soc. citriculture.** 3 , 918-923.

47- ROSSETTI V. 1981. Identificaçao do cancro citrico. **O Biologico.** 47 (5) 145-153.

48- SANCHEZ S.D., LOAIZA R.R. 1983. Bacteriosis of mexican lime (**Citrus aurantifolia**). **F.A.O. Plant Prot. Bull.** 31 (3) 131-132.

49- SANCHEZ-ANGUIANO H.M., FELIX-CASTRO F.A. 1984. An overview of citrus canker (bacteriosis) on mexican lime at Tecoman, Colima, Mexico. **Proc. Int. Soc. citriculture.** 1 , 323-324.

50- SCHOULTIES C.L., MILLER J.W., STALL R.E., CIVEROLO E.L., SASSER M. 1985. A new outbreak of citrus canker in Florida. **Plant Disease.** 69 : 361 (Abstr.).

51- SCHOULTIES C.L., CIVEROLO E.L., MILLER J.W., STALL R.E., KRASS C.J., POE S.R., DUCHARME E.P. 1987. Citrus canker in Florida. **Plant Disease.** 71 (5) 388-395.

52- STAPLETON J.J., GARZA-LOPEZ J.G. 1988. Epidemiology of a citrus leaf spot disease in Colima, Mexico. **Phytopathology.** 78 (4) 440-443.

53- UEMATSU T., CHUENCHITT S., KARNJANARA S., VIVITHAJINDA S., NABHEERONG N., BENJATHIKUL S., NILMANEE S., DHIRABHAVA W., BUANGSUWON D. 1983. Bacterial diseases on economic crops in Thailand. **Ministry Agr., For., Fish. Japan/ Ministry Agr. Coop. Thailand.** p 236-266.

54- WAKIMOTO S. 1967. Some characteristics of citrus canker bacteria **Xanthomonas citri** (Hasse) Dowson, and the related phages isolated from Japan. **Ann. Phytopath. Soc. Japan.** 33 , 301-310.

55- WU W.C. 1987. Citrus canker in Taiwan. (Abstr.). **Abstr. Int. Symp. citrus canker, Declinio/Blight and similar diseases, Sao Paulo, Brazil, 1987.** 55p.

- SOMMAIRE DES ANNEXES -

1 - Origine des souches.

a - tableau de référence des souches de **Xanthomonas campestris** pv. **citri.**
b - tableau de référence des souches de **Xanthomonas campestris** non pathovar **citri.**

2 - Immunofluorescence indirecte - Modification de la technique décrite par Faure **et al.**, 1977.

3 - Croissance des souches en présence de substrats carbonés sur milieux de Dye et de Goto.

4 - Comparaison de l'assimilation de différents substrats en fonction du milieu.

5 - Tableau de détermination des CMI.

6 - Estimation de la sensibilité des souches de **X.c.**pv.**c.** à partir des CMI.

7 - Etude de souches de **Xanthomonas campestris** non pathovar **citri.**

a - tableau de détermination des CMI.
b - relations antigéniques : tableau des dilutions limites des immunsérums donnant une fluorescence.

8 - Relations antigéniques au sein du pathovar **citri.**

9 - Tableau du pourcentage de lésions en fonction de la souche, de la dose d'inoculum et de l'hôte.

10 - Tableau du classement de la sensibilité des hôtes en fonction de la combinaison souche/dose.

ANNEXE 1: ORIGINE DES SOUCHES .

a - Tableau de réference des souches de **Xanthomonas campestris** pv. **citri.**

ORIGINE	HOTE	CODE SOUCHE	TYPE CBCD	SOURCE	AUTRE REFERENCE	DATE ISOLEMENT
Japon	Citrus sp.	XC62	A	Civerolo	JB3-7	
"	"	XC63	A	"		
Argentine	C.lemon	XC64	B	"	JB3-8	
"	"	XC69	B	"		
"	"	XC93	B	"		
"	"	XC94	B	"		
"	"	XC96	B	"		
Brésil	C.aurantifolia	XC70	C	"		
"	"	380	C	Neto J.R.		1981
"	"	381	C	"	PDDCC8432	"
"	C.sinensis	222	A	"		1980
"	C.reticulata	245	A	"	NCPPB3115	"
"	C.aurantifolia	416	A	"		1982
"	"	XC59	A	Civerolo		
Pakistan		XC100	A	"		
Oman		XC101	A	"		
Nord Yémen		XC98	A	"		
Oman	C.aurantifolia	JF90-2				1986
"	"	JF90-3				"
"	"	JF90-5				"
N-Zélande	Citrus sp.	1207	A	Coll.INRA	NCPPB1472	1956
"	C.limon	2525	A	"	NCPPB409	"
Hong-Kong	C.grandis	1209	A	"		1963
Taiwan		2548			XW90	
"		2549			XW47	
Chine		CH2		Luisetti J.		1988
"		CH4		"		"
"		CH5		"		"

ANNEXE 1-a : (suite)

ORIGINE	HOTE	CODE SOUCHE	TYPE CBCD	SOURCE	AUTRE REFERENCE	DATE ISOLEMENT
Réunion	Citrus sp.	JA143	A	Laville J.		1981
"	C.sinensis	JB3-1		"		"
"	C.lemon	JB3-5		"		"
"	C.sinensis	JA151-1		"		"
"	"	JA151-5		"		"
"	clémentinier	JA151-8		"		"
"	"	JA151-9		"		"
"	C.lemon	JA162-5		"		"
"	Citrus sp.	JA163-2		"		"
"	C.sinensis	JA163-4		"		"
"	Citrus sp.	JA167-2		"		"
"	C.hystrix	JB50-10-A		"		1982
"	"	JB50-10-B		"		"
"	C.sinensis	JB53-1-b		"		
"	C.grandis	1814		Luisetti J.		1978
"	C.hystrix	JG3-1				1987
"	"	JG3-4				"
"	C.sinensis	JH98-1		Verniere C.		1988
"	C.grandis	JH98-2		"		"
"	citrumello	JH98-4		"		"
"	citrumello	JH98-5		"		"
"	lime de tahiti	C12-1		IRFA Réunion		"
"	C.sinensis	C14		"		"
"	"	C19-1		"		"
"	clémentinier	B23-1		"		"
"	C.hystrix	C22-1		"		"
"	tangelo	C42		"		"

1-b-Tableau de réference des souches de Xanthomonas campestris non pathovar citri (coll.INRA Angers).

CODE	PATHOVARS	HOTES	DATE ISOLEMENT
412	phaseoli	haricot	
1716	mangiferae indicae	manguier	1957
1718	pelargoni	Pelargonium hortorum	1975
1119	campestris	chou	
1159	corylina	noisetier	1939
1421	begoniae	bégonia	
1857	manihotis	manioc	1978
2035	malvacearum	cotonnier	
1022	juglandis	noyer	1967
1545	vesicatoria	tomate	1973
2532	oryzae	riz	

ANNEXE 2 : IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE - MODIFICATION DE LA TECHNIQUE

DECRITE PAR FAURE **et al.**, 1977.

- Préparation du frottis bactérien :

- préparer des suspensions bactériennes (10^6 bact./ml) à partir de culture de 24h sur milieu gélosé LPA (extrait de levure:7g ; biogélytone:7g ; agar:15g ; e.d.:1000 ml ; pH:7-7,2) - bien agiter.

- déposer une goutte calibrée (20 mcl) dans chaque puit.

- laisser sécher.

- recouvrir avec de l'alcool.

- laisser agir 10 mn.

- Réactions immunologiques :

1 - diluer l'immunsérum avec du tampon physiologique (NaCl:8g ; $HNa_2PO_4,12H_2O$:2,7g ; $H_2NaPO_4,2H_2O$:0,04g ; e.d.:1000 ml ; pH:7,2).

- déposer une goutte calibrée (20 mcl) dans chaque puit.

- laisser en contact 30 mn.

- rejeter l'excès de sérum.

- immerger les lames successivement 2 fois 5 mn dans 2 bacs de tampon physiologique.

- essuyer en dessous et entre les puits.

2 - diluer le sérum anti-lapin fluorescent ou "conjugué" à la dilution conseillée (1/50) dans du tampon physiologique.

- déposer une goutte calibrée (20 mcl) de conjugué dans chaque puit.

- laisser en contact 30 mn.

- rejeter l'excès de conjugué.

- immerger les lames successivement 2 fois 5 mn dans 2 bacs de tampon physiologique.

- essuyer la lame en dessous et entre les puits.

- mettre 2 ou 3 gouttes d'histolaque entre les puits - déposer une lamelle - luter.

- Témoins : - négatif : même frottis sans l'immunsérum.

- positif : frottis réalisé avec la bactérie homologue.

ANNEXE 3 : CROISSANCE DES SOUCHES EN PRESENCE DE SUBSTRATS CARBONES SUR MILIEUX DE DYE ET DE GOTO.

SUBSTRATS / MILIEUX / SOUCHES	MALTOSE DYE	MALTOSE GOTO	LACTOSE DYE	LACTOSE GOTO	MALONATE GOTO
TYPE A					+/-
OMAN					+
CHINE	++	+	++	+	+/-
REUNION					+/-
TAIWAN					+
TYPE B	(+)/-	(+)/-	(+)/-	-	-
TYPE C	+	-	+	(+)	-
TYPE D XC90	(+)/-	-	(+)	-	(+)
TYPE D T20	++	+	++	+	+
TYPE E	++	+	++	+	+/-

++ : forte croissance, + : croissance, (+) : faible croissance,
- : pas decroissance (lecture à 14 jours).

ANNEXE 4 : COMPARAISON DE L'ASSIMILATION DE DIFFERENTS SUBTRATS EN FONCTION DU MILIEU.

SUBSTRATS / MILIEUX / SOUCHES		MALTOSE			LACTOSE			MALONATE	
		DYE	GOTO	API	DYE	GOTO	API	GOTO	API
TYPE A	XC62	+	(+)	+	+	+	-	-	-
	416	+	+	+	+	+	-	+	-
TYPE B	XC93	(+)	-	-	-	-	-	-	-
	XC96	-	-	-	-	-	-	-	-
TYPE C/380		+	-	-	+	+	+	-	-
TYPE D	XC90	+	-	-	(+)	-	-	(+)	-
	T20	+	+	+	+	+	+	+	-
TYPE E	F1	+	+	(+)	+	+	+	+	-
	F6	+	+	+	+	+	-	-	-

- milieux de Dye et de Goto : lecture à 14 jours.
- milieu API : lecture à 9 jours.

+ : croissance, (+) : faible croissance, - : pas de croissance.

ANNEXE 5 : TABLEAU DE DETERMINATION DES CMI (mcg / ml).

SOUCHES ANTIBIOTIQUES	TYPE A	TYPE B	TYPE C	TYPE D	TYPE E	REUNION	TAIW/CHINE	OMAN
CARBENICILLINE (B lactamines)	4 à >128	<1 à 16	32 à >128	8 à 32	8	≥128	16 à 32	>128
CEPHALOTINE (B lactamines)	32 à >128	<1 à 64	32 à >128	32 à >128	64 à 128	64 à >128	>128	>128
CEPHALEXINE (cephalosporines)	>128	8 à >128	32 à >128	>128	64 à 128	>128	>128	>128
STREPTOMYCINE (aminosides)	2	≤2	2	2 à 8	2 à 8	≤2	≤2	≤2
KANAMYCINE (aminosides)	2 à 4	≤2	2	4 à 16	2 à 4	<1 à 4	2 à 4	2
GENTAMYCINE (aminosides)	2 à 4	≤2	2	4	4	<1 à 4	2 à 4	2
ERYTHROMYCINE (macrolides)	≤2	1 à 8	1 à 4	2 à 8	1 à 2	≤2	≤2	≤2
VANCOMYCINE (polysaccharides)	8 à 64	1 à 64	2 à 32	16 à 32	4	8 à 64	8 à 32	2 à 32
AC.NALIDIXIQUE (quinolones)	8 à 16	1 à 8	4 à 8	8 à 16	8	4 à 16	8	8 à 16
FLUMEQUINE (quinolones)	≤2	<2	1 à 2	2	2	≤2	≤2	≤2
MEZLOCILLINE (B lactamines)	1 à 128	1 à 16	4 à 128	4 à 8	1 à 8	16 à >128	8 à 16	≥128
KASUGAMYCINE (aminosides)	32 à >128	32 à 128	16 à 64	64	64 à 128	16 à 128	64	64
SULFATE DE CU.	30 à 125	<30	60	60 à 125	60	30 à 125	60 à 125	60 à 125
Hg	8 à 32	4 à 16	16 à 32	16	8 à 16	8 à 32	16 à 32	16 à 32

ANNEXE 6 : ESTIMATION DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES DE X.c.pv.c. A PARTIR DES CMI.

SOUCHES / ANTIBIOTIQUES	TYPE A	TYPE B a / b	TYPE C c / d	TYPE D e / f	TYPE E	REUNION	TAIW/CHINE	OMAN
CARBENICILLINE	S,I,R	S / I	I / R	I / I	I	R	I	R
CEPHALOTINE	I,R	S / I,R	I / R	I / R	R	R	R	R
CEPHALEXINE	R	I / R	I / R	R / R	R	R	R	R
STREPTOMYCINE	S	S / S	S / S	S / I	S,I	S	S	S
KANAMYCINE	S	S / S	S / S	S / I	S	S	S	S
GENTAMYCINE	S	S / S	S / S	S / S	S	S	S	S
ERYTHROMYCINE	S	S / S,I	S / S	S / S	S	S	S	S
VANCOMYCINE	I,R	S / I,R	S / I	I / I	S	I,R	I	S,I
AC.NALIDIXIQUE	I	S / S,I	S / I	I / I	I	I	I	I
FLUMEQUINE	S	S / S	S / S	S / S	S	S	S	S
MEZLOCILLINE	S,I,R	S / I	S / R	S / I	S,I	I,R	I	R
KASUGAMYCINE	I,R	R / I,R	R / I	R / R	R	I,R	R	R
SULFATE DE CU.	S,I	S / S	I / I	I / I	I	S,I	I	I
Hg	I	S,I / I	I / I	I / I	I	I	I	I

- S : CMI $\leqslant$ 4 mcg/ml, (Cu : CMI $\leqslant$ 30 mcg/ml).
- I : 8 $\leqslant$ CMI $\leqslant$ 32 mcg/ml, (Cu : CMI de 60 à 125 mcg/ml).
- R : CMI $\geqslant$ 64 mcg/ml, (Cu : CMI $\geqslant$ 250 mcg/ml).

a : XC64, XC69 .
b : XC93, XC94, XC96.
c : XC70.
d : 380, 381.
e : XC90.
f : T20.

ANNEXE 7 : ETUDE DE SOUCHES DE **Xanthomonas campestris** NON PATHOVAR **citri.**

7-a-Tableau de détermination des CMI.

SOUCHES / ANTIBIOTIQUES	a	b	c	d
CARBENICILLINE	8 à 32	4	4	<1
STREPTOMYCINE	≤4	≤2	<1	<1
KANAMYCINE	≤4	≤2	<1	<1
GENTAMYCINE	≤8	≤2	<1	<1
ERYTHROMYCINE	≤4	2	2	4
VANCOMYCINE	16 à 32	16	16	<1
AC.NALIDIXIQUE	8 à 32	8	16	2
FLUMEQUINE	≤4	<1	8	<1
KASUGAMICINE	≥64	≥128	128	8
SULFATE DE CU.	60 à 250	60	15	60
Hg	4 à 16	2 à 16	4	2

a : pvs. manihotis, mangiferae-indicae, pelargoni, campestris, vesicatoria, juglandis, begoniae.
b : pvs. corylina, malvacearum.
c : pv. phaseoli.
d : pv. oryzae.

-7-b : Relations antigéniques-Tableau des dilutions limites des immunsérums donnant une fluorescence.

SERUMS / SOUCHES	ANTI-1814	ANTI-416	ANTI-XC96	ANTI-380	ANTI-T20	ANTI-F6
a	-	-	800	1600	-	450/600
b	4000	1600	100	100	400	-
c	-	-	<100	250/400	-	-
d	-	-	<100	<100	-	-
e	-	100	800	1000	400	<100
f	400	100	<100	<100	-	-

a: pvs. phaseoli, mangiferae-indicae.
b: pvs. manihotis, oryzae.
c: pvs. pelargoni, malvacearum.
d: pvs. campestris, vesicatoria, begoniae.
e: pv. corylina.
f: pv. juglandis.
-: pas de fluorescence à la dilution 1/100.
la valeur indiquée est l'inverse du titre de la dilution (valeur moyenne entre les répétitions effectuées, une seule répétition avec le sérum anti-416).

ANNEXE 8: RELATIONS ANTIGENIQUES AU SEIN DU PATHOVAR CITRI .

-Tableau des dilutions de l'immunsérum donnant une fluorescence.

SERUMS / SOUCHES	ANTI-1814	ANTI-416	ANTI-XC96	ANTI-380	ANTI-T20	ANTI-F6
TYPE A	>1600*	1600	-	<50	100 / 400	-
TYPE B						
XC64,XC69	-	-	450	1600	-	<50
XC93,XC94,XC96	<100	-	800	1600	-	100 / 300
XC70	<100	<100	600	1600	100	-
TYPE C						
380,381	<100	<100	800	1600	-	<100
XC90	100	-	800	1600	-	300
TYPE D						
T20	100	-	100	-	6400	-
TYPE E / F1-F6	-	-	600	1000-400	-	800
TAIWAN,OMAN, CHINE	>4000	1600	-	-	250/400	-
REUNION	>1600	1600	-	<100	100/400	-

-:pas de fluorescence à la dilution 1/100
*:la valeur indiquée est l'inverse du titre de la dilution (valeur moyenne entre les répétitions effectuées, une seule répétition avec le sérum anti-416).

ANNEXE 9 : TABLEAU DU POURCENTAGE DE LESIONS EN FONCTION DE LA SOUCHE, DE LA DOSE D'INOCULUM (bact./ml) ET DE L'HOTE. (2 répétitions)

SOUCHE/TYPE	416/A		XC96/B		380/C		JA143	
DOSE (log) / HOTES	7	9	7	9	7	9	7	9
ORANGER	100	60	70	40	0	0	0	20
cv."pine apple"	100	50	80	10	0	0	0	70
ORANGER	100	50	70	30	0	10	60	0
cv."thomson"	90	100	80	70	0	0	20	0
MANDARINE	70	0	30	50	0	30	0	0
cv."beauty"	80	0	60	0	0	0	0	0
MANDARINE	100	60	0	20	0	0	0	0
cv."clémentine"	60	40	0	30	0	0	0	0
TANGOR	90	40	60	30	0	0	0	0
cv."ortanique"	80	60	40	20	0	0	0	0
CITRONNIER	60	30	10	10	20	0	0	0
cv."euréka"	80	30	10	10	20	0	0	0
TANGELO	100	30	0	10	40	40	0	0
cv."minneola"	100	10	10	0	50	30	0	0
LIME DE TAHITI	80	20	30	0	60	80	0	0
	70	70	10	0	60	50	0	0
CITRUS	100	10	60	10	90	0	30	0
VOLKAMERIANA	100	30	90	0	100	30	0	0

ANNEXE 10 : TABLEAU DU CLASSEMENT DE LA SENSIBILITE DES HOTES EN FONCTION DE LA COMBINAISON SOUCHE / DOSE.

(lecture 40 jours après inoculation)

SOUCHE/DOSE(log) HOTES	416 / 9	XC96 / 7	380 / 7	380 / 9
ORANGER cv."pine apple"	2	1	4*	5*
ORANGER cv."thomson"	1	1	4*	4
MANDARINE cv."beauty"	3*	2	4*	3
MANDARINE cv.clémentine"	2	4*	4*	5*
TANGOR cv."ortanique"	2	2	4*	5*
CITRONNIER cv.euréka"	2	3	3	5*
TANGELO cv.minneola"	2	4*	2	2
LIME DE TAHITI	2	3	2	1
CITRUS VOLKAMERIANA	2	1	1	3

* : pas de lésions apparentes.
1 à 5 : classement par ordre de sensibilité décroissante (après test des ranges de Duncan).

- RESUME -

La variabilité de 55 souches de **Xanthomonas campestris** pv. **citri**, représentatives des pathotypes de référence A, B, C, D et E ou isolées à partir d'échantillons provenant de l'île de la Réunion, de Chine et d'Oman, est étudiée. La gélatine n'est pas hydrolysée par les souches des types B et C et par une souche du type D (XC90). L'étude de l'assimilation des carbohydrates est réalisée à partir de différents milieux mis en comparaison. Une variabilité est mise en évidence dans l'utilisation du lactose, du maltose et du malonate. Seules les souches du type B et la souche XC90 sont lysées par le phage CP3. Les phages CP1 et CP2 et les 2 phages tempérés obtenus à partir de souches de la Réunion lysent seulement certaines souches du type A et certains des isolats étudiés. La détermination du niveau de sensibilité à une gamme d'antibiotiques a mis en évidence une hétérogénéité au sein du pathovar **citri**. L'intérêt du milieu semi-sélectif LPA'A contenant certains antibiotiques est discuté. Par la technique de l'immunofluorescence indirecte, les 6 antisérums obtenus à partir de bactéries tuées ont permis de séparer 4 groupes d'affinité en relation avec l'appartenance à un pathotype. Les 2 souches XC90 et T20 du type D ont montré un profil d'affinité différent. Pour différents espèces et cultivars de **Citrus**, il a été établi un classement de la sensibilité vis à vis de chaque pathotype. Les isolats de Chine, d'Oman et de l'île de la Réunion ont été apparentés au pathotype A. La connaissance d'une telle variabilité devrait être utile pour les études ultérieures envisagées en pathologie et en épidémiologie.

- SUMMARY -

55 **Xanthomonas campestris** pv. **citri** strains, including reference strains of the pathotypes A, B, C, D and E and isolates from Reunion island, China and Oman, were studied for their variability. Type B and C strains and one strain of type D (XC90) did not hydrolyze gelatin. Different media were compared for carbohydrates assimilation. Variations were observed in utilisation of lactose, maltose and malonate. Only type B strains and XC90 (type D) were sensitive to phage CP3 whereas only some type A strains and some isolates were lyzed by phages CP1 and CP2 and by two temperate phages isolated from Reunion strains. Strains were compared for their susceptibility to a range of antibiotics and an heterogeneity into the pathovar **citri** has been shown. Interest of a semiselective medium LPA'A containing antibiotics is discussed. On the basis of affinity to 6 antisera obtained from heat killed bacteria, 4 groups related to the pathotypes were separated by immunofluorescence technique. The two type D strains, XC90 and T20, were separated by their serological profiles. Different degrees of susceptibility to each pathotype strain were established according to **Citrus** species and cultivars. Isolates from China, Oman and Reunion island were related to the pathotype A. Knowledge of such variability should be useful for further studies in epidemiology.