

UNIVERSITE des ANTILLES et de la GUYANE
UFR SCIENCES EXACTES et NATURELLES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE des ANTILLES et de la GUYANE

En

Sciences de la Vie

Option Phytopathologie

Physiologie et Biologie des Organismes : Populations/Interactions

Ecole Doctorale Pluridisciplinaire de l'Université des Antilles et de la Guyane

TITRE

***XANTHOMONAS ALBILINEANS*, L'AGENT CAUSAL DE L'ECHAUDURE DES
FEUILLES DE LA CANNE A SUCRE : CARACTERISATION ET VARIABILITE
DES BASES GENETIQUES DU POUVOIR PATHOGENE, EN GUADELOUPE
ET DANS LE MONDE**

Présentée et soutenue publiquement
Le 22 mai 2006

Par

Patrice CHAMPOISEAU

Devant le jury composé de :

BA Amadou, Président, Professeur, Université des Antilles et de la Guyane
ARLAT Matthieu, Professeur, Université Paul Sabatier Toulouse III
GROS Olivier, Maître de conférences, HDR, Université des Antilles et de la Guyane
NESME Xavier, Docteur, HDR, Ingénieur de recherche, INRA de Lyon
ROTT Philippe, Docteur, HDR, Chercheur, CIRAD de Montpellier

UNIVERSITE des ANTILLES et de la GUYANE
UFR SCIENCES EXACTES et NATURELLES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE des ANTILLES et de la GUYANE

En

Sciences de la Vie

Option Phytopathologie

Physiologie et Biologie des Organismes : Populations/Interactions

Ecole Doctorale Pluridisciplinaire de l'Université des Antilles et de la Guyane

TITRE

***XANTHOMONAS ALBILINEANS*, L'AGENT CAUSAL DE L'ECHAUDURE DES
FEUILLES DE LA CANNE A SUCRE : CARACTERISATION ET VARIABILITE
DES BASES GENETIQUES DU POUVOIR PATHOGENE, EN GUADELOUPE
ET DANS LE MONDE**

Présentée et soutenue publiquement
Le 22 mai 2006

Par

Patrice CHAMPOISEAU

Devant le jury composé de :

BA Amadou, Président, Professeur, Université des Antilles et de la Guyane
ARLAT Matthieu, Professeur, Université Paul Sabatier Toulouse III
GROS Olivier, Maître de conférences, HDR, Université des Antilles et de la Guyane
NESME Xavier, Docteur, HDR, Ingénieur de recherche, INRA de Lyon
ROTT Philippe, Docteur, HDR, Chercheur, CIRAD de Montpellier

Cette thèse a été organisée avec le concours financier de "la Région Archipel Guadeloupe" et le "Fonds Social Européen".

*A mes parents,
Ma famille,
Mes amis.*

*Pour leur inestimable soutien et leur présence, même à distance,
Pour la place unique qu'ils occupent dans ma vie.*

Enfin qu'ils sachent, après toutes ces années, que :

*“Petit à petit ne veut pas dire paresse”
Proverbe africain*

REMERCIEMENTS

C'est avec beaucoup de reconnaissance et une émotion certaine que je rédige ces quelques lignes. Elles marquent le point final de ce travail de thèse, mais également l'aboutissement de sept années de recherche, de collaborations, de découvertes et d'amitiés créées ou renforcées au sein du Cirad, en Guadeloupe et à Montpellier. Je ne saurais citer toutes les personnes, responsables, encadrants, collègues, conseillers, amis ou membres de ma famille qui, de près ou de loin, ont permis la réalisation de ce travail et le bon déroulement de cette aventure scientifique et humaine. Ces remerciements vous sont adressés à tous, et tout particulièrement à :

Jean-Heinrich DAUGROIS, phytopathologiste au Cirad en Guadeloupe et coencadrant de ce travail de thèse. Pour m'avoir permis de réaliser mes premiers pas en recherche agronomique et m'avoir accordé sa confiance à l'occasion de ma première expérience professionnelle dans ce domaine. Pour son expérience partagée des maladies de la canne à sucre en Guadeloupe et pour les nombreux moments passés ensemble, de discussion et de détente, sans oublier ses nombreux cours de cuisine. Enfin, merci également à son épouse, Mylène, pour leur accueil au sein de leur famille et les nombreux services rendus, avec toute mon affection.

Philippe ROTT, phytopathologiste au Cirad à Montpellier et directeur de cette thèse, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Pour sa rigueur scientifique et professionnelle, pour sa lucidité, son optimisme, sa passion et sa détermination, pour sa bonne humeur et son irréprochable disponibilité. Merci pour m'avoir fait partager ses connaissances et son expérience des maladies de la canne à sucre. Pour son inestimable soutien dans les moments de doute et sa motivation ferme et permanente, pour les heures passées à lire et relire ce manuscrit, et bien d'autres, même si "*it is part of the job !*". Qu'il sache le plaisir grandissant que j'ai eu dans notre relation de travail et personnelle. Merci également à Claudia, son épouse, pour leur accueil, les cookies au chocolat et le "crumble" aux fruits rouges.

Monique ROYER, bio-moléculaireiste au Cirad à Montpellier, pour son encadrement et ses très précieux conseils dans tous les domaines de la biologie moléculaire. Pour sa disponibilité et les réponses immédiates qu'elle a su apporter à mes nombreuses interrogations de néophyte en la matière tout au long de ce travail.

Jean-Claude GIRARD, phytopathologiste au Cirad à Montpellier, pour son aide précieuse à la bonne réalisation des travaux de pathologie, pour ses conseils éclairés et son œil infailible au repérage des fautes à la lecture de nombreux manuscrits. Merci enfin pour son savoir partagé, dans tous les domaines, et pour ne jamais s'être approché trop près de mon ordinateur...

Christian BOUCHER, **Olivier GROS** et **Valérie VERDIER**, membres extérieurs de mes comités de thèse, pour leur regard critique, leurs encouragements et leurs précieux conseils pour la bonne réalisation scientifique de ce travail. Enfin, merci pour leur disponibilité et leur mobilité géographique à plusieurs reprises.

Matthieu ARLAT, professeur à l'université de Toulouse, et **Xavier NESME**, chercheur à l'INRA à Lyon, pour avoir bien accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et s'être déplacés en Guadeloupe à l'occasion de ma soutenance.

Amadou BÂ et **Olivier GROS**, professeur et maître de conférences à l'université des Antilles et de la Guyane, pour leurs critiques constructives de mon manuscrit de thèse et pour avoir bien accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Michel DUPONT et **Jean CRUSOL**, ancien et actuel directeurs de l'école doctorale pluridisciplinaire de l'université des Antilles et de la Guyane, pour m'avoir autorisé à m'inscrire et à suivre ma formation au sein de leur école doctorale à l'UAG.

Robert DOMAINQUE, responsable du programme canne à sucre puis de l'UR 75 du Cirad, et **Jean-Luc KHALFAOUI**, directeur-adjoint chargé des affaires scientifiques du Cirad-ca, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de leur unité et pour leur suivi scientifique et administratif.

Patrice GUILLAUME, directeur régional du Cirad en Guadeloupe, pour m'avoir accueilli au sein de la station de Roujol en 1999 et pour avoir donné son accord pour la réalisation de cette thèse en Guadeloupe.

Jean-Loup NOTTEGHEM, professeur à l'Agro de Montpellier et directeur de l'UMR BGPI, pour m'avoir accueilli au sein de son unité et pour ses conseils avisés pour la bonne réalisation scientifique et académique de cette thèse.

Philippe LETOURMY et **Xavier PERRIER**, bio-informaticiens au Cirad à Montpellier, pour leurs précieux conseils concernant la mise en place des essais expérimentaux et l'analyse statistique des données.

Eric VIVIEN, pour sa très grande patience dans l'explication des principes de bases de la biologie moléculaire, pour ses nombreux conseils dans tous les domaines et les nombreux services rendus. Merci pour son oreille attentive, sa bonne humeur inébranlable et son amitié. Pour tous les bons moments passés ensemble et, je l'espère, tous ceux à venir. Enfin, un grand merci à sa famille grandissante, Delphine, Louis, Gabriel et Blanche, pour leur accueil très familial.

Isabelle PIERETTI, technicienne au Cirad à Montpellier, pour tous ses conseils et son encadrement au laboratoire, pour son amitié, ses fous rires et son amour de *Nostalgie*...

Stéphane COCIANCICH, chercheur au Cirad à Montpellier, pour tous ses conseils pratiques et son explication des mécanismes biochimiques de l'albicidine, pour son amitié et sa bonne humeur constante. Enfin, pour son amour de la cocotte...

Michèle CHATENET, chercheur au Cirad à Montpellier, pour ses conseils et son aide précieuse au laboratoire, et à la bonne réalisation des manipulations de PFGE.

Danièle ROQUES et **Philippe ORIOL**, chercheurs au Cirad en Guadeloupe, pour leur savoir partagé de la canne à sucre, qu'ils sachent toute ma reconnaissance pour leur confiance et leur amitié.

Sandrine DUPLAN et **Nathalie LABOUREAU**, techniciennes au Cirad à Montpellier, pour leur aide précieuse au laboratoire, pour leur amitié, les innombrables services rendus et leur soutien dans mes efforts de course à pied...

Marie-Josée DAROUSSAT, technicienne au Cirad à Montpellier, pour son aide inestimable au laboratoire, sa joie et sa bonne humeur, pour son immense générosité et ses talents incomparables de cuisinière.

Rosiane BOISNE-NOC et **Steve JOSEPH**, techniciens au Cirad en Guadeloupe, pour leur aide précieuse et les heures passées ensemble au laboratoire et sur le terrain en Guadeloupe.

Jean-François BOUSQUET, **Rémy HABAS** et **Marc MULLER**, techniciens au Cirad à Montpellier, **Jean-Marie COUPAN** et **Jean-Claude EFILE**, techniciens au Cirad en Guadeloupe, pour leur aide dans la réalisation des essais de phytopathologie, pour les bons moments passés ensemble, les parties de volley, les randonnées et les soirées familiales.

Janine CAMAL, **Dominique HERAULT** et **Catherine REMONDAT**, assistantes de l'UR 75, **Florence BARTHOD**, **Geneviève BOURRELY** et **Dominique LAGRENEE**, assistantes à l'UMR BGPI, et **Annick ANNETTE**, assistante au Cirad en Guadeloupe, pour leur aide très précieuse au suivi des dossiers administratifs, pour leur bonne humeur et leur amitié.

Les AGRICULTEURS de Guadeloupe, qui m'ont autorisé à effectuer mes prélèvements dans leurs parcelles de canne à sucre, **les TECHNICIENS** du CTICS, des SICA et des CUMA de Guadeloupe, qui m'ont accompagné dans ces échantillonnages à travers l'île, qu'ils en soient vivement remerciés.

Tous les STAGIAIRES et **THESARDS** rencontrés en Guadeloupe et à Montpellier, pour les instants d'angoisse, les sorties, les pique-nique sur la plage, les nombreuses virées et tous les bons moments passés ensemble.

Tous les AMIS, d'ici et d'ailleurs, qui m'ont suivi et supporté tout au long de ce travail, pour leur soutien permanent et leur amitié, qu'ils en soient vivement remerciés, et tout particulièrement toi, Eric, et ton fameux punch maison, un peu à l'origine de cette aventure...

Valérie, témoin patiente, encourageante et ô combien compréhensive des dernières étapes de la réalisation de cette thèse, pour son soutien, sa présence et son affection....

Mes PARENTS, enfin, sans qui tout cela n'aurait pas été possible, pour leur inestimable soutien dans l'accomplissement de mes études, pour leurs encouragements dans tous mes choix, pour m'avoir transmis leur volonté et leur détermination, leur respect des autres, leur humilité, et leur goût de la vie, indispensables à cette aventure. Avec tout mon amour.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES.....	3
ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX.....	14
CHAPITRE I. Introduction	15
1. Présentation du pathosystème.....	16
1.1. L'hôte : la canne à sucre.....	16
1.1.1. Taxonomie et cytogénétique.....	16
1.1.2. Origine et répartition géographique	16
1.1.3. Importance économique	17
1.1.4. Description morphologique et anatomique.....	19
1.1.5. Physiologie et développement.....	21
1.1.6. Les maladies de la canne à sucre	22
1.2. La maladie : l'échaudure des feuilles	23
1.2.1. Symptomatologie.....	25
1.2.2. Mode de transmission	28
1.2.3. Moyens de lutte	28
1.3. L'agent causal : Xanthomonas albilineans.....	30
1.3.1. Classification et identification.....	30
1.3.2. Pénétration et multiplication dans la plante hôte	31
1.3.3. Isolement et identification	32
1.3.4. Variabilité de <i>X. albilineans</i>	35
1.3.5. Pouvoir pathogène de <i>X. albilineans</i>	37
1.3.5.1. <i>Symptômes foliaires et colonisation de la tige</i>	37
1.3.5.2. <i>L'albicidine : une toxine et une composante essentielle du</i> <i>pouvoir pathogène de X. albilineans</i>	38
1.3.5.3. <i>Bases génétiques de la biosynthèse de l'albicidine</i>	41
2. Fonctions et bases génétiques du pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes	43
2.1. Les systèmes et facteurs de pathogénie.....	45
2.1.1. Les systèmes de sécrétion	45
2.1.1.1. <i>Système de sécrétion de type I</i>	45
2.1.1.2. <i>Système de sécrétion de type II</i>	46
2.1.1.3. <i>Système de sécrétion de type III</i>	48
2.1.1.4. <i>Système de sécrétion de type IV</i>	49
2.1.1.5. <i>Autres systèmes de sécrétion</i>	50
2.1.2. Les effecteurs ou éliciteurs de type III.....	51
2.1.3. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire	55

2.1.4.	Les lipo-oligosaccharides et lipopolysaccharides.....	55
2.1.5.	Les exopolysaccharides	57
2.1.6.	Les phytohormones	59
2.1.7.	Les phytotoxines.....	60
2.1.8.	Les flagelles et protéines d'adhésion fibrillaires	63
2.1.9.	Les protéines d'adhésion non fibrillaires	65
2.2.	<i>La régulation de la pathogénie.....</i>	67
2.2.1.	Le quorum-sensing.....	68
2.2.2.	Les régulateurs des fonctions de pathogénie.....	71
2.2.3.	La régulation épigénétique	72
2.3.	<i>L'évolution de la pathogénie</i>	75
2.3.1.	Les mutations et l'inactivation des gènes de virulence.....	75
2.3.2.	Le transfert de gènes horizontal et les îlots de pathogénie	76
CHAPITRE II. Contexte scientifique et enjeu agronomique de l'étude		77
CHAPITRE III. Variation des gènes de biosynthèse de l'albicidine et variabilité du pouvoir pathogène de <i>X. albilineans</i>		81
Article 1.	Variation in Albicidin Biosynthesis Genes and in Pathogenicity of <i>Xanthomonas albilineans</i>, the Sugarcane Leaf Scald Pathogen	83
4.	Abstract	83
5.	Introduction	84
6.	Materials and methods	86
6.1.	<i>Bacterial strains</i>	86
6.2.	<i>RFLP analysis of albicidin biosynthesis genes</i>	88
6.3.	<i>Albicidin production assay.....</i>	89
6.4.	<i>Pathogenicity assay.....</i>	90
6.5.	<i>Statistical analysis</i>	92
7.	Results.....	92
7.1.	<i>Variability in albicidin biosynthesis genes.....</i>	92
7.2.	<i>Variability in albicidin production</i>	95
7.3.	<i>Variability in pathogenicity based on disease severity</i>	96
7.4.	<i>Variability in pathogenicity based on stalk colonization.....</i>	99
7.5.	<i>Genetic and pathogenic characterization of 20 strains of <i>X. albilineans</i>.....</i>	101
8.	Discussion.....	102
9.	Aknowledgments	107
10.	Literature cited	107
CHAPITRE IV. Vers l'identification de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de <i>X. albilineans</i>		113
Article 2.	High Variation in Pathogenicity of Genetically Closely Related Strains of <i>Xanthomonas albilineans</i>, the Sugarcane Leaf Scald Pathogen, in Guadeloupe	115
11.	Abstract	115

12. Introduction	116
13. Materials and methods	118
13.1. Bacterial strains and DNA preparation	118
13.2. Pathogenicity assays	118
13.3. RFLP analysis of total genomic DNA	122
13.4. RFLP analysis of albicidin biosynthesis genes	122
13.5. AFLP analysis	123
13.6. PCR-identification of pathogenicity related genes	124
13.7. Nucleotide sequence analysis of housekeeping genes	126
13.8. Phylogenetic analysis	126
13.9. Production of diffusible signal molecules	127
13.10. Statistical analysis	127
14. Results	127
14.1. Characteristics of the collection of <i>X. albilineans</i> strains used in this study	127
14.2. Variation in pathogenicity of <i>X. albilineans</i> strains in Guadeloupe	127
14.3. Genetic variation in <i>X. albilineans</i> from Guadeloupe analyzed by PFGE and Southern hybridization with albicidin biosynthesis genes	130
14.4. Genetic variation in <i>X. albilineans</i> from Guadeloupe analyzed by AFLP	130
14.5. PCR-amplification of pathogenicity-related genes from <i>X. albilineans</i>	131
14.6. Phylogenetic relationship between <i>X. albilineans</i> and other pathogenic and non-pathogenic bacteria	133
14.7. Production of diffusible signals	133
14.8. Relationship between variation in pathogenicity and genetic or physiological variation of 9 strains of <i>X. albilineans</i> from Guadeloupe	134
15. Discussion	135
16. Acknowledgments	138
17. Literature cited	139
CHAPITRE V. Conclusions et perspectives	145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
LISTE des ANNEXES	169

ABREVIATIONS

Remarque : les abréviations sont développées dans la langue dans laquelle elles apparaissent dans le texte, en français ou en anglais (*en italiques*). Pour plus de clarté, les traductions sont données entre parenthèses pour chaque abréviation.

ADN	Acide désoxyribonucléique (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i> (polymorphisme de longueur des fragments d'amplification)
AHL	Acyl homosérine lactone (<i>acyl homoserine lactone</i>)
avr	Avirulence (<i>avirulence</i>)
bp	<i>Base pair</i> (paire de bases)
BSA	<i>Bovin serum albumin</i> (albumine de sérum bovin)
Cf.	Conférer (<i>confer</i>)
CFU	<i>Colony forming unit</i> (unité formant colonie)
cm	Centimètre (<i>centimeter</i>)
cv.	Cultivar (<i>cultivar</i>)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (acide désoxyribonucléique)
DS	<i>Disease severity</i> (sévérité de la maladie)
DSF	<i>Diffusible signal factor</i> (facteur signal diffusible)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (acide éthylènediaminotétracétique)
EPS	Exopolysaccharides (<i>exopolysaccharides</i>)
ESC	<i>Extent of stalk colonization</i> (étendue de colonisation de la tige)
Fig.	Figure (<i>figure</i>)
g	Gramme (<i>gram</i>)
GSP	<i>General secretory pathway</i> (système général de sécrétion)
h	Heure (<i>hour</i>)
<i>hrp</i>	<i>Hypersensitive response and pathogenicity</i> (réponse hypersensible et pathogénie)
<i>hrc</i>	<i>hrp conserved</i> (<i>hrp</i> conservés)
IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i> (acide indole-3-acétique)
ISC	<i>Intensity of stalk colonization</i> (intensité de colonisation de la tige)
kb	<i>Kilobase</i> (kilobase)
L	<i>Liter</i> (litre)
LPO	Lipooligosaccharides (<i>lipooligosaccharides</i>)
LPS	Lipopolysaccharides (<i>lipopolysaccharides</i>)
mg	<i>Milligram</i> (milligramme)
ml	<i>Milliliter</i> (millilitre)
µl	<i>Microliter</i> (microlitre)
mm	<i>Millimeter</i> (millimètre)
µm	<i>Micrometer</i> (micromètre)
M	<i>Molar</i> (molaire)
MgCl ₂	<i>Magnesium chloride</i> (chlorure de magnésium)
mM	<i>Millimolar</i> (millimolaire)
µM	<i>Micromolar</i> (micromolaire)
ng	<i>Nanogram</i> (nanogramme)
nm	<i>Nanometer</i> (nanomètre)
no.	<i>Number</i> (numéro)
nos.	<i>Numbers</i> (numéros)
NRPS	<i>Non ribosomal peptide synthase</i> (peptide synthase non ribosomale)

ORF	<i>Open reading frame</i> (cadre ouvert de lecture)
^{32, 33} P	^{32, 33} <i>Phosphorus</i> (phosphore ^{32, 33})
PAI	<i>Pathogenicity islands</i> (îlots de pathogénie)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
PCWDE	<i>Plant cell-wall degrading enzymes</i> (enzymes de dégradation de la paroi cellulaire des plantes)
PFGE	<i>Pulse-field gel electrophoresis</i> (électrophorèse en champs pulsés)
PKS	<i>Polyketide synthase</i> (polycétide synthase)
pmol	<i>Picomolar</i> (picomolaire)
pv.	<i>Pathovar</i> (pathovar)
QS	<i>Quorum sensing</i> (quorum-sensing)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
RPF	<i>Regulator of pathogenicity factor</i> (régulateur des facteurs de pathogénie)
s	<i>Second</i> (seconde)
SNM	<i>Synonymous nucleotide mutation</i> (mutation nucléotidique synonyme)
spp.	Espèces (<i>species</i>)
Tfp	<i>Type IV pilus</i> (pilus de type IV)
TPS	<i>Two-partner secretion system</i> (système de sécrétion bipartite)
TISS	<i>Type I secretion system</i> (système de sécrétion de type I)
TISS	<i>Type II secretion pathway</i> (système de sécrétion de type II)
TTSS	<i>Type three secretion system</i> (système de sécrétion de type III)
UV	Ultraviolet (<i>ultra violet</i>)
vol	<i>Volume</i> (volume)
V	<i>Volt</i> (volt)
W	<i>Watt</i> (watt)
°C	<i>Celsius degree</i> (degré Celsius)
%	<i>Per cent</i> (pour cent)

LISTES des FIGURES

et TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I. Introduction	15
Figure 1. Grandes zones de production de la canne à sucre dans le monde et description des principaux pays producteurs (en tonnes de canne; F.A.O, 2004; Fauconnier et Bassereau, 1970).....	17
Figure 2. Les principaux pays producteurs de canne à sucre dans le monde (F.A.O, 2004).	18
Figure 3. Caractéristiques anatomiques et morphologiques de la canne à sucre. A, aspect général d'une touffe de canne. B, bouture de canne germée illustrant le développement des racines de tige et de bouture. C, portion d'une tige de canne montrant les détails d'un nœud et d'un entre-nœud. D, portion d'une feuille de canne montrant les différentes parties qui la composent (Julien <i>et al.</i> , 1989; Soopramanien, 2000).	20
Figure 4. Carte montrant la localisation de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre dans le monde (Rott, 1995).....	24
Figure 5. Symptômes d'échaudure des feuilles de la canne à sucre. A, aspect général d'une tige de canne sévèrement atteinte montrant l'enroulement et le dessèchement caractéristiques des feuilles. B, coupes longitudinales de tiges montrant des tissus sains (S) et malades (M; rougissement des faisceaux vasculaires). C, différentes intensités de symptômes foliaires (f = faible intensité à F = forte intensité). D, blanchiment du feuillage. E, feuille de canne montrant une strie blanche foliaire (indiquée par une flèche) parallèle à la nervure centrale. F, aileron de tige latéral présentant des symptômes d'échaudure des feuilles (Rott et Davis, 2000).	26
Figure 6. Symptômes atypiques d'échaudure (nécroses brunes) sur le limbe foliaire du cultivar de canne à sucre B69566, suite à la contamination du feuillage par voie aérienne en Guadeloupe (Daugrois <i>et al.</i> , 2003).	27
Figure 7. <i>Xanthomonas albilineans</i> . A, Aspect d'une cellule bactérienne en microscopie électronique à transmission en contraste négatif montrant la cellule en forme de bâtonnet allongé et le flagelle polaire unique (Birch, 2001). B, Aspect de colonies bactériennes sur milieu de culture gélosé après étalement avec un ensementeur spiral (Photo P. Rott, non daté).	31
Figure 8. Vaisseau de protoxylème d'une feuille de canne à sucre envahie par des cellules de <i>X. albilineans</i> (indiqué par une flèche), et cellules du limbe foliaire voisines montrant des plastides bloqués avant la différenciation chloroplastique, vus au microscope électronique à transmission en contratse positif (Birch, 2001).	32
Figure 9. Illustration des méthodes d'isolement de <i>X. albilineans</i> . A, empreinte d'une section de tige de canne sur un milieu de culture sélectif (Photo P. Champoiseau, 2004). B, extraction par centrifugation de la sève à partir de portions de tige de canne à sucre (Photo P. Champoiseau, 2004). C, dilacération d'une portion du limbe foliaire de canne à sucre dans de l'eau stérile (Photo P. Champoiseau, 2004). D, gouttes de rosée à la surface d'une feuille de canne prélevées pour la détection des bactéries épiphytes (Photo J.-H. Daugrois, 1998).	33

Figure 10. Illustration de différentes techniques d'identification de <i>X. albilineans</i> . A, résultat d'un test positif de séro-agglutination montrant la "précipitation" (en blanc) des cellules bactériennes (Photo P. Champoiseau, 2003). B, empreinte d'une tige de canne à sucre montrant des vaisseaux sains (S) et contaminés (C) révélés par sérologie (Photo J.-H. Daugrois, 2003). C, résultat d'un test de BIOLOG basé sur la dégradation de différents substrats carbonés (Photo F. Carrey, 2004). D, Résultat de l'amplification par PCR d'une séquence spécifique de <i>X. albilineans</i> (Pan <i>et al.</i> , 1999).	34
Figure 11. Petites et grandes colonies de <i>X. albilineans</i> observées sur un milieu de culture spécifique sous une loupe binoculaire (Photo P. Champoiseau, 2004)	35
Figure 12. Bio essai réalisé <i>in vitro</i> et basé sur la capacité de l'albicidine à inhiber la croissance d' <i>E. coli</i> et montrant une souche de <i>X. albilineans</i> productrice d'albicidine (Tox ⁺) et un mutant non producteur (Tox ⁻ ; Photo P. Rott, non daté).	39
Figure 13. Organisation et description des gènes de la région XALB1 du génome de <i>X. albilineans</i> , potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine (d'après Royer <i>et al.</i> , 2004).	42
Figure 14. Représentation schématique des principales fonctions et processus biochimiques impliqués dans la pathogénie et la survie dans le xylème de l'hôte bactérien phytopathogène Gram négatif, <i>X. fastidiosa</i> (Simpson <i>et al.</i> , 2000).	44
Figure 15. Illustration du système de sécrétion de type I chez <i>E. chrysanthemi</i> montrant les 3 sous-unités protéiques PrtD, PrtE et PrtF (Palacios <i>et al.</i> , 2001).	46
Figure 16. Illustration du système de sécrétion de type II. Sous-unités d'une protéine sécrétée par la voie de sécrétion de type II chez <i>P. aeruginosa</i> , (A et B) ; complexe protéique formé par DsbA, (AB5) ; protéine XcpQ formant le pore de sécrétion, (D) ; protéine XcpT constituant la composante majeure du pilus, (G) ; complexe protéique XcpY, XcpZ, XcpR régulant la sécrétion par phosphorylation ou hydrolyse de l'ATP (L, M et E) ; protéine XcpP communiquant le signal de phosphorylation au pore membranaire, (C) ; protéines XcpA et PilD nécessaires à la formation du pilus, (O) ; protéines absentes chez <i>P. aeruginosa</i> mais présentes chez d'autres organismes, (N et S; Sandkvist, 2001).	48
Figure 17. Illustration des différentes parties du système de sécrétion de type III : i) la composante majeure du tube qui s'étend de la base de la structure jusqu'à un pore formé dans la cellule hôte et qui permet le passage de protéines (en mauve), ii) l'anneau d'ancrage à la membrane externe (en vert), iii) les anneaux d'ancrage à la membrane interne (en rouge), iv) les protéines intégrées à la membrane interne (en orange) et v) les protéines associées à la membrane externe, (en bleu; Thomas et Finlay, 2003).	48
Figure 18. Illustration du système de sécrétion de type IV montrant la localisation des protéines VirB1 à VirB11 dans la double membrane bactérienne (Anonyme1, 2006).	50
Figure 19. Illustration de la sécrétion, de la localisation dans la cellule hôte et de la fonction putative des effecteurs de type III chez <i>P. syringae</i> , sécrétés par le TTSS. Le TTSS et les effecteurs sont exprimés en réponse aux conditions environnantes dans l'apoplaste de la plante (a). Les effecteurs de type III sont ensuite injectés dans la cellule hôte <i>via</i> le TTSS (b). Les effecteurs de type III peuvent être identifiés sur la base de caractéristiques communes concernant leur régulation et leur injection : i) expression induite par le facteur sigma HrpL, ii) présence du <i>hrp</i> -box dans le promoteur, iii) séquence riche en sérine dans les 50 premiers acides aminés, et iv) injection dans l'hôte par le TTSS. Les effecteurs de type III peuvent atteindre différentes localisations cellulaires et possèdent différentes fonctions. Ils peuvent être localisés dans la membrane plasmique (c).	

Ici, ils pourraient interagir avec les protéines de l'hôte également associées à la membrane plasmique ou interférer avec les défenses extracellulaires. D'autres effecteurs sont localisés dans le cytoplasme (d). Ils pourraient intervenir dans la déphosphorylation de protéines de l'hôte (encore indéterminées). D'autres effecteurs pourraient agir en tant que protéases, en coupant les protéines de l'hôte (e). Certains effecteurs sont localisés dans le noyau cellulaire (f). Ces protéines pourraient réguler la transcription des gènes de l'hôte. La grande majorité des effecteurs de type III de *P. syringae* n'a pas encore été caractérisée et pourrait se localiser dans les chloroplastes, l'appareil de Golgi, les mitochondries ou d'autres localisations cellulaires (g) (Chang *et al.*, 2004).....54

Figure 20. Structure schématique d'un lipopolysaccharide (LPS) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et région codant la biosynthèse du LPS : Rha = rhamnose ; Glc = glucose ; Man = manose ; GlcA = acide glucuronique ; KDO = Acide kéto-déoxy-octonique ; GlcN = glucosamine (Pühler et Braun, 2006).56

Figure 21. Carte génétique illustrant l'organisation des gènes de l'opéron gum chez *X. campestris* (Katzen *et al.*, 1998).58

Figure 22. Structure chimique de l'acide indole-3-acétique (Anonyme2, 2006)59

Figure 23. Structures chimiques de différentes toxines produites par *P. syringae* : A, la coronatine ; B, la phaséolotoxine ; C, la tabtoxine ; et D, la syringomycine (Bender *et al.*, 1999).62

Figure 24. Carte génétique illustrant l'organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse de la syringomycine chez *P. syringae* pv. *syringae* (Bender *et al.*, 1999).62

Figure 25. Structure schématique d'un flagelle de mobilité bactérienne montrant les différentes parties i) du filament (filament et tube central), ii) du crochet, iii) du corps basal (disque basal, structure cytoplasmique et anneaux M, S, P et L), et iv) du moteur (axe du moteur, Mot A et Mot B). D'après MacNab (1996).64

Figure 26. Représentation schématique du système de sécrétion de type V de la famille des autotransporteurs.....66

Figure 27. Fonctionnement schématique du système de régulation par quorum-sensing (QS). En faible densité bactérienne, l'AHL synthase, une protéine de type LuxI (I) produit un niveau basal de molécules AHL. En forte densité bactérienne, l'AHL s'accumule dans le milieu et se lie à un facteur de transcription AHL-dépendant, une protéine de type LuxR (R), qui régule l'activation de gènes QS-dépendant. D'après Zhang (2003).69

Figure 28. Voie de biosynthèse et structure chimique des AHL. La chaîne "acyle" est synthétisée par la voie de biosynthèse classique des acides gras et l'homosérine lactone est dérivée de la S-adénosylméthionine. Quelques protéines et enzymes sont impliquées dans cette voie de biosynthèse, telles que des protéines de transport des acyles (ou ACP pour "*acyl carrier protein*"), une énolase-ACP réductase FabI et une AHL synthase. FabI est responsable de la réduction de l'énolase-ACP en acyle-ACP, qui réagit avec la S-adénosylméthionine, catalysée par l'AHL-synthase, pour produire les AHL (Zhang, 2003).70

CHAPITRE III. Variation des gènes de biosynthèse de l'albicidine et variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*81

Fig. 1 Experimental restriction fragment length polymorphism banding patterns and corresponding sizes (in bp) of theoretical DNA fragments of *Xanthomonas albilineans* strain Xa23R1 after hybridization with molecular probes pALB571 and pBKS/K7, following restriction of total genomic DNA with A, *HincII* and B, *PstI*

enzymes. Molecular probes pALB571 and pBKS/K7 cover together the entire 49-kb albicidin biosynthesis gene cluster and two additional 3-kb genomic regions required for albicidin biosynthesis (all cloned from *X. albilineans* strain Xa23R1). DNA fragments below the size of the smallest fragments shown in the figure were not observed experimentally. FUS are DNA fragments of unpredictable size (unknown flanking sequences)93

Fig. 2. Genetic relatedness of 74 *Xanthomonas albilineans* strains from worldwide locations based on restriction fragment length polymorphism (RFLP). After restriction with enzyme *HincII*, total genomic DNA was hybridized with DNA probes pALB571 and pBKS/K7. These two probes together cover the entire 49-kb albicidin biosynthesis gene cluster and two additional 3-kb genomic regions required for albicidin biosynthesis (all cloned from *X. albilineans* strain Xa23R1). Banding patterns obtained with the two probes were combined in 14 linearly combined haplotypes (HA1 to HA10 and HB1 to HB4). Combined haplotypes were used for hierarchical cluster analysis by the unweighted pair group method with arithmetic means. Genetic groups ALB-RFLP A and B were resolved at the 0.75 similarity level (see scale bar at the top left of the figure)94

Fig. 3. Disease progress curves in sugarcane cv. H70-144 as determined by disease severity on leaves after inoculation with 20 strains of *Xanthomonas albilineans*: A, 10 strains from worldwide locations and B, 10 strains from Guadeloupe. The experiment was set up in Montpellier (France) in a greenhouse using a randomized complete block design with nine replications of one plant each. Foliar symptoms were scored 4, 6, 8, 10 and 15 weeks after inoculation on noninoculated leaves with a 0-to-5 scale. Each point of disease severity corresponds to the mean score of nine plants. Strains that did not incite any symptom in inoculated plants were not represented on the figure: strains Xa23R1, FJI080, MTQ078, DOM097 and PNG130 (worldwide origin) and strain GPESJ47 (Guadeloupe). The experiment was duplicated once but only results of trial A are shown in the figure97

Fig. 4. Population densities of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane stalks of cv. H70-144 determined 15 weeks after inoculation with 10 strains from worldwide locations and 10 strains from Guadeloupe. The experiment was set up in a greenhouse in Montpellier (France) using a randomized complete block design with nine replications of one plant each. Population densities of the pathogen were determined with a 0-to-4 scale at three different locations of the sugarcane stalk: SL_0 (considered as the entry point of the pathogen into sugarcane stalk), SL_{-4} (fourth internode below SL_0), and SL_{+10} (tenth internode above SL_0). Only results at SL_{+10} are shown in the figure. Each bar corresponds to the mean value of nine stalks, and error bars refer to mean square. Strains: 1 = TWN052, 2 = HVO082, 3 = BLZ103, 4 = TWN107, 5 = BRA115, 6 = PNG130, 7 = DOM097, 8 = MTQ078, 9 = FJI080, 10 = Xa23R1 (worldwide origins); strains: 11 = GPEDC61, 12 = GPEF4, 13 = GPEG5, 14 = GPEDC38, 15 = GPEDC23, 16 = GPET16, 17 = GPEP14B, 18 = GPE48, 19 = GPESJ2, and 20 = GPESJ47 (Guadeloupe). Trial A and trial B are two independent duplications of the experiment100

CHAPITRE IV. Vers l'identification de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans*113

Fig. 1. UPGMA dendrograms showing similarity between 19 strains of *Xanthomonas albilineans* based on extent of sugarcane stalk colonization (ESC), 17 weeks after inoculation of sugarcane cv. B69566. ESC was calculated with bacterial population densities that were determined in every other internode and in all internodes above SL_0 in A, trial A and in B, trial B, respectively. SL_0 corresponded to the location of the three shortened stalk internodes that showed

reduced growth after mechanical plant inoculation (cut leaves above the growing point). SCG1 through SCG4 refer to different groups of increasing extent of stalk colonization that were identified in this study. Strain names in bold indicate strains of *X. albilineans* that were distributed in the same groups of stalk colonization in trial A and trial B. Scale bar represents Euclidean distance between strains based on ESC values.....129

Fig. 2. Genetic relatedness of nine strains of *Xanthomonas albilineans* from Guadeloupe based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). After enzymatic restriction with *SacI* and *MspI*, total genomic DNA was ligated with specific adapters and amplified by PCR with the selective primer combinations *SacI* + G/*MspI* + A, *SacI* + G/*MspI* + T, *SacI* + G/*MspI* + G, *SacI* + G/*MspI* + CT. Banding patterns obtained with the four primer combinations were combined in six linearly combined haplotypes (GA1, GA2 and GB1 to GB4). Combined haplotypes were used for hierarchical cluster analysis by the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) and two AFLP groups (A and B) were distinguished.....131

Fig. 3. Neighbor-joining tree of A, fragment *ihfA* (245 bp partial sequence of gene *ihfA*) and B, fragment *pilB* (644 bp partial sequence of gene *pilB*) nucleotide sequences of 10 strains of *X. albilineans* and 17 other bacterial strains (including 1 non pathogenic and 16 pathogenic strains). DNA fragments from *X. albilineans* strains from Guadeloupe (XAG = GPEPC17, GPEPC73, GPEPC75, GPEPC84, GPEPC86, GPEPC87, GPEPC101, GPEPC142 and GPEPC143), *X. albilineans* strain Xa23R1 (XAFI) from Florida, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strain CFBP 6653, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913 and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain 91-118 were PCR-amplified from total genomic DNA. Nucleotide sequence from other strains are from GenBank (accession no.; position): *Azoarcus* sp. strain EbN1 (A, CR555306, 504922-504611; B, CR555306, 2574125-2572410), *Burkholderia mallei* strain ATCC 23344 (A, CP000010, 1133153-1133557; B, CP000010, 2635324-2636583), *Burkholderia pseudomallei* strain K96243 (A, BX571965, 2309571-2309224; B, BX571965, 3584982-3586241), *Escherichia coli* strain K-12 MG1655 (A, U00096, 1793576-1793277; B, U00096, 117099-115714), *Nitrosomas europea* ATCC 19718 (A, BX321859, 116386-116078; B, BX321861, 195575-193884), *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 (A, AE004702, 1576-1274; B, AE004866, 9737-11437), *Pseudomonas putida* strain KT2440 (A, AE016783, 101086-101388; B, AE016793, 185393-187066), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B728a (A, CP000075, 2522380-2522682; B, CP000075, 905203-903509), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strain DC3000 (A, AE016853, 2634012-2634314; B, AE016853, 1006981-1005287), *Ralstonia solanacearum* strain GMI1000 (A, AL646065, 87590-87904; B, AL646072, 26520-28247), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306 (A, AE011899, 1068-769; B, AE011969, 10306-8570), *Xyllela fastidiosa* strain 9a5c (XF1) (A, AE003916, 5155-5454; B, AE004061, 3126-4859), *Xyllela fastidiosa* strain Temecula1 (XF2) (A, AE012560, 134145-133856; B, AE012560, 153609-155342), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10331 (A, AE013598, 3417819-3417520; B, AE013598, 1628312-1630099). Bootstrap values for 1,000 re-samplings are shown as percentage. Similar phylogenetic tree were obtained with the nucleotide sequences from *efp*, *rpfA*, and *xpsE* partial genes (Data not shown). Scale bar units are in number of substitutions per nucleotide.132

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I. Introduction	15
Tableau 1. Effecteurs de type III récemment caractérisés chez les bactéries phytopathogènes (d'après Chang <i>et. al.</i> , 2004).	51
CHAPITRE III. Variation des gènes de biosynthèse de l'albicidine et variabilité du pouvoir pathogène de <i>X. albilineans</i>	81
Table 1. Characteristics of <i>Xanthomonas albilineans</i> strains from worldwide locations used in this study	86
Table 2. Characteristics of <i>Xanthomonas albilineans</i> strains from Guadeloupe used in this study	88
Table 3. In vitro albicidin production by <i>Xanthomonas albilineans</i> as determined with a microbiological assay.....	91
Table 4. In vitro albicidin production by 10 strains of <i>Xanthomonas albilineans</i> from Guadeloupe as determined with a microbiological assay.....	96
Table 5. Disease severity on leaves and intensity of stalk colonization in sugarcane cv. H70-144 after inoculation with 10 strains of <i>Xanthomonas albilineans</i> from worldwide locations (I) and 10 strains of <i>X. albilineans</i> from Guadeloupe (II).....	98
Table 6. Summary of genetic and pathogenic characteristics of 10 strains of <i>Xanthomonas albilineans</i> from worldwide locations and 10 strains of <i>X. albilineans</i> from Guadeloupe	101
CHAPITRE IV. Vers l'identification de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de <i>X. albilineans</i>	113
Table 1. Characteristics of <i>Xanthomonas albilineans</i> strains from Guadeloupe used in this study	119
Table 2. Disease severity on leaves and extent of stalk colonization of sugarcane cv. B69566 after inoculation with 19 strains of <i>Xanthomonas albilineans</i> from Guadeloupe.....	121
Table 3. Expected sizes of DNA fragments amplified from pathogenicity related genes (I) and housekeeping genes (II) and characteristics of the oligonucleotides used as primers for PCR amplification	125
Table 4. Nucleotide sequence identity (%) within and among groups of strains of six xanthomonads and <i>Xylella fastidiosa</i>	133
Table 5. Summary of genetic and pathogenic characteristics of nine strains of <i>Xanthomonas albilineans</i> from Guadeloupe	134

CHAPITRE I. Introduction

Présentation du pathosystème

CHAPITRE I. Introduction

L'étude qui a fait l'objet de ce travail de thèse avait pour objectif de répondre à un double enjeu scientifique et agronomique vis-à-vis de la maladie de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre présente en Guadeloupe, mais aussi dans de nombreuses autres régions du monde. Cette étude s'inscrit dans un contexte scientifique général basé sur l'étude et la compréhension des mécanismes fondamentaux qui régissent l'interaction entre un microorganisme pathogène et sa plante hôte. Mais aussi, elle vise à l'amélioration des connaissances spécifiques liées à la maladie de l'échaudure des feuilles, telles que son origine, sa variabilité ou son évolution, ainsi qu'au développement d'outils et de techniques utilisables pour une meilleure gestion durable de cette maladie en Guadeloupe.

Cette première partie d'introduction a pour objectifs la présentation des différentes composantes du pathosystème qui a fait l'objet de cette étude, ainsi qu'une synthèse bibliographique faisant le bilan des connaissances actuelles sur le pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes, et qui sont à l'origine des travaux mis en place et des techniques développées dans le cadre de cette thèse. Ces travaux qui ont fait l'objet, dans leur intégralité, d'une publication et d'une soumission pour publication dans la revue internationale à comité de lecture *Phytopathology*, seront présentés sous forme d'articles insérés dans le manuscrit de thèse.

1. Présentation du pathosystème

Un pathosystème est caractérisé par un couple hôte-agent pathogène. Chez les plantes, l'agent pathogène peut-être une bactérie, un champignon, un virus ou encore un autre parasite. Généralement, l'étude d'un pathosystème sous-entend l'étude des mécanismes chimiques, physiques, physiologiques ou encore moléculaires qui interviennent dans l'interaction entre l'agent pathogène et sa plante hôte. Dans notre cas, il s'agit du pathosystème canne à sucre/*Xanthomonas albilineans*, associé à la maladie de l'échaudure des feuilles.

1.1. L'hôte : la canne à sucre

1.1.1. Taxonomie et cytogénétique

La canne à sucre est une monocotylédone appartenant à la famille des Graminées, à la tribu des Andropogonées et au genre *Saccharum* (S.; Blackburn, 1984). Aujourd'hui, il existe six espèces connues appartenant au genre *Saccharum*, dont deux espèces sauvages, *S. spontaneum* et *S. robustum*, dépourvues de sucre, et quatre espèces domestiquées, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* et *S. edule*, riches en sucre et cultivées par l'homme (Daniels et Roach, 1987). Les cultivars (cv.) modernes de canne à sucre (*Saccharum* spp.) sont des hybrides interspécifiques artificiels entre une ou plusieurs espèces domestiquées et l'espèce sauvage *S. spontaneum*. Ce sont des aneuploïdes complexes à forte polyploïdie ($2n > 100$) reproduits par voie végétative (Feldmann *et al.*, 1997).

1.1.2. Origine et répartition géographique

Les différents croisements de la canne à sucre et son acclimatation ancienne en de nombreux pays rendent l'étude de son origine très difficile, mais il semblerait que celle-ci se situe en Papouasie-Nouvelle-Guinée et que l'origine de sa domestication soit antérieure à 2500 ans avant notre ère. Au cours des siècles, la canne à sucre se serait d'abord répandue dans les îles du Pacifique sud, en Inde et en Chine (1500 à 1000 ans avant notre ère), puis, plus tardivement, en Perse (500 ans avant notre ère) d'où sa culture fut étendue en Afrique du Nord et aux îles de l'Atlantique (Madère, Canaries, îles du Cap-Vert, Sao Tomé). C'est en 1506, date du second voyage de Christophe Colomb en Amérique, que sa première introduction dans les Amériques et en Hispaniola (aujourd'hui Saint-Domingue) semble avoir eu lieu (Daniels et

Roach, 1987; Meyer, 1989). Ce n'est qu'au XVII^e siècle que la canne à sucre fut portée du Brésil à Barbade et dans les autres possessions anglaises, dans les îles espagnoles de l'Amérique, au Mexique, au Pérou, au Chili et enfin dans les colonies françaises, hollandaises et danoises. Son introduction dans les Antilles, et en particulier en Guadeloupe, est datée du début des années 1640 (Meyer, 1989).

La culture de la canne à sucre est limitée par le froid et l'altitude. Aujourd'hui, 97 pays dans le monde sont producteurs de canne à sucre (F.A.O, 2004) et se situent entre le 37° parallèle de latitude Nord et le 30° p arallèle de latitude Sud (Fauconnier et Bassereau, 1970). On peut ainsi déterminer trois zones principales de culture qui se caractérisent par des conditions climatiques, des rendements (en tonnes de canne) et des teneurs en sucre différentes : la zone sub-tropicale (A), la zone tropicale (B) et la zone équatoriale (C; Figure 1).

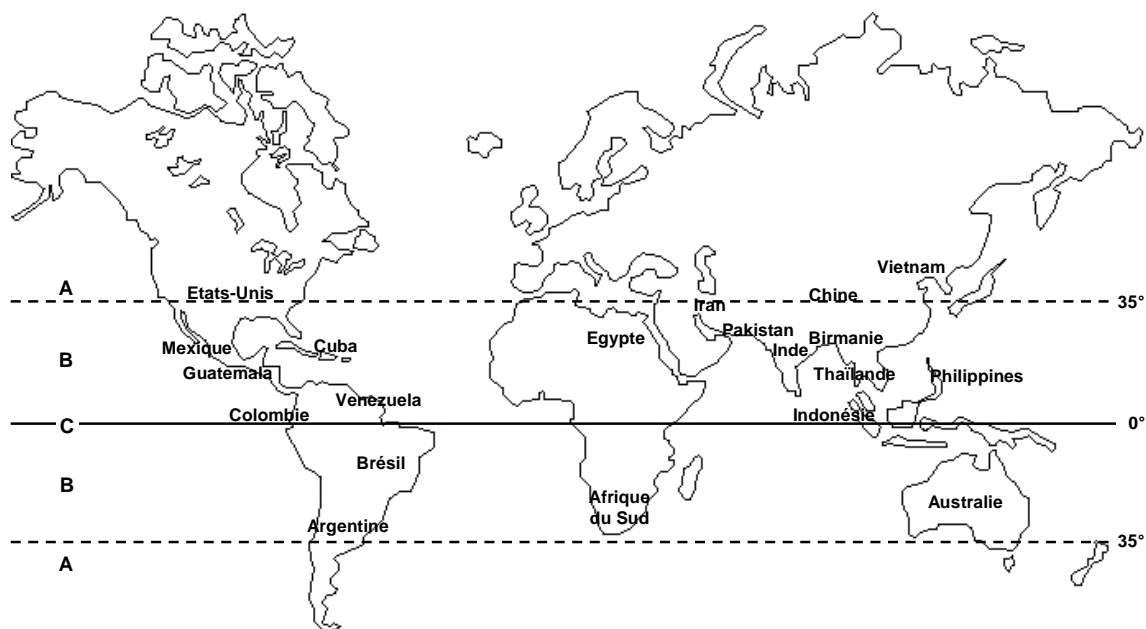


Figure 1. Grandes zones de production de la canne à sucre dans le monde et description des principaux pays producteurs (en tonnes de canne; F.A.O, 2004; Fauconnier et Bassereau, 1970).

1.1.3. Importance économique

La canne à sucre constitue l'une des plus importantes cultures des régions tropicales et subtropicales, avec près de 19 millions d'hectares cultivés dans 97 pays. La production mondiale de canne à sucre a atteint 1.324 millions de tonnes en 2004, dont près de 49% sont réparties entre le Brésil et l'Inde (Figure 2).

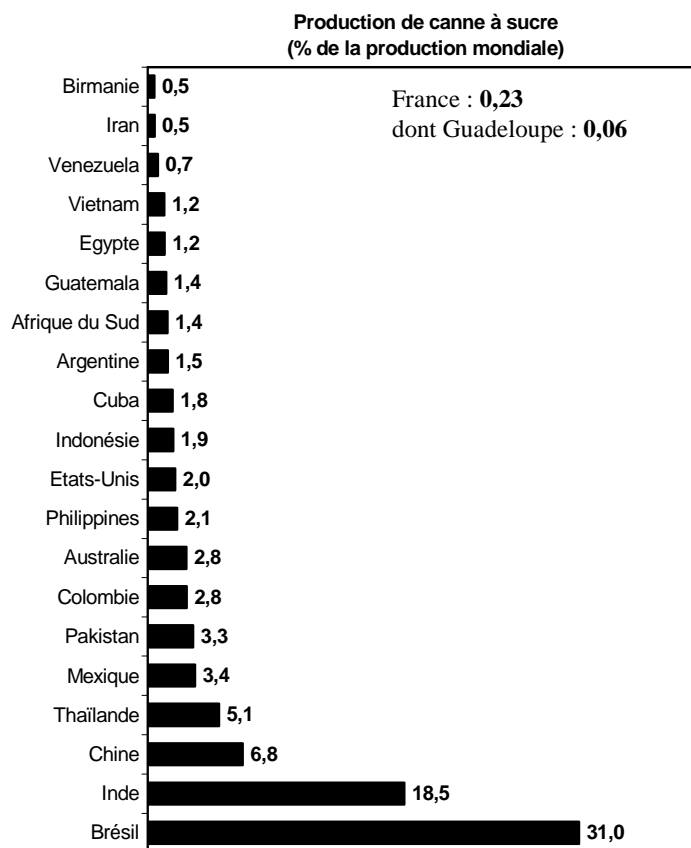


Figure 2. Les principaux pays producteurs de canne à sucre dans le monde (F.A.O, 2004).

La canne à sucre représente, avec la betterave sucrière, la principale source de sucre dans le monde qui donne lieu à une exploitation industrielle. Depuis une quinzaine d'années, la part de la canne à sucre dans la production mondiale de sucre augmente régulièrement. En 1995/1996, avec 86,94 millions de tonnes, la canne représentait 70,6% de la production mondiale. En 1999/2000, elle atteint 96,99 millions de tonnes et représente 72,2% du sucre mondial. Parmi les principaux pays producteurs de canne à sucre, le Brésil et l'Inde représentaient plus de la moitié de la production mondiale dès le début des années 1960. A partir de 1961, la part du Brésil dans la production mondiale de sucre a commencé à augmenter, atteignant ainsi le quart de la production mondiale en 1990 et près de 30% en 2002 (Kingsman, 2004).

Mis à part la production de sucre et de rhum, les dérivés de la canne à sucre sont utilisés comme fourrage, comme complément alimentaire pour bétail, comme source

d'énergie à partir de la bagasse (résidu de broyage des tiges de canne) et enfin en alcool. Au Brésil, la moitié de la canne est transformée en alcool, soient près de 154 millions d'hectolitres (en 2004), destiné à l'utilisation comme carburant pour automobiles. Lancé en 1975, le plan Proalcool, qui représentait le plus grand programme d'énergie renouvelable au monde, avait été conçu comme une alternative stratégique au remplacement de l'essence par l'éthanol, produit de la canne à sucre. D'ici 2010, le Brésil projette une production de près de 240 millions d'hectolitres d'alcool à destination industrielle, ce qui représente un véritable atout pour ce pays, et un essor considérable pour la culture mondiale de la canne à sucre.

En Guadeloupe, la culture de la canne à sucre représente la deuxième activité agricole après celle de la banane, et le sucre est la seconde production de l'île. En 2003, la production totale de canne à sucre avoisinait les 572.300 tonnes de cannes usinées, pour une production totale de sucre de 63.554 tonnes (Montout, 2003).

1.1.4. Description morphologique et anatomique

La canne à sucre, comme toutes les graminées, se présente sous la forme d'une touffe de tiges (encore appelées talles ou repousses) possédant un système racinaire fibreux, de grands épis de fleurs et de longues feuilles (Figure 3).

La tige de canne à sucre peut atteindre 2 à 5 mètres de hauteur pour un diamètre variant de 2 à 6 centimètres (Van Dillewijn, 1960). Le nombre de tiges par touffe de canne peut ainsi varier de 5 à 15 selon le cultivar. La tige est constituée d'une série de phytomères qui prennent naissance au niveau du méristème végétatif apical au sommet de la tige. Un phytomère est constitué d'un entre-nœud et d'un nœud qui porte la gaine prolongée par le limbe foliaire. L'intérieur de la tige est constitué d'une masse importante de tissus de stockages (essentiellement pour le saccharose) formée de cellules du parenchyme entre lesquelles se trouvent les faisceaux vasculaires du phloème et du xylème (Soopramanien, 2000).

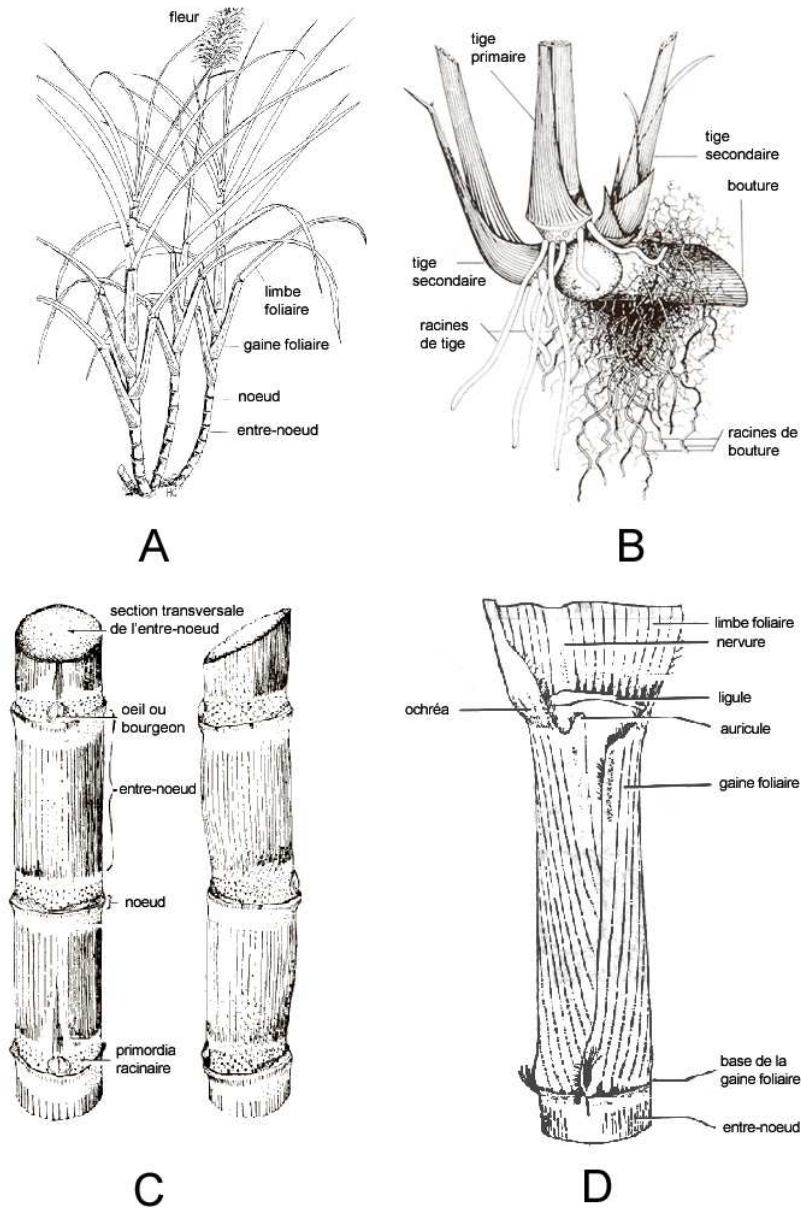


Figure 3. Caractéristiques anatomiques et morphologiques de la canne à sucre. A, aspect général d'une touffe de canne. B, bouture de canne germée illustrant le développement des racines de tige et de bouture. C, portion d'une tige de canne montrant les détails d'un nœud et d'un entre-nœud. D, portion d'une feuille de canne montrant les différentes parties qui la composent (Julien *et al.*, 1989; Soopramanien, 2000).

Les feuilles de canne à sucre sont ordinairement insérées de façon alterne sur les nœuds et sont composées de deux parties, la gaine et le limbe foliaires séparés par une articulation comprenant l'ochréa, la ligule et les auricules. La gaine, de forme tubulaire, est la partie basse de la feuille qui s'enroule autour de l'entre-nœud (Van

Dillewijn, 1960). Une coupe transversale du limbe foliaire révèle des épidermes supérieurs et inférieurs entre lesquels se trouvent des cellules fibreuses, des cellules du parenchyme ou du mésophylle et de larges faisceaux vasculaires (Soopramanien, 2000). Les faisceaux du phloème et du xylème de la gaine foliaire communiquent avec les faisceaux correspondants de la tige au niveau du nœud lorsque les feuilles sont encore jeunes (Blackburn, 1984).

Le système racinaire se développe à partir de la *primordia* racinaire lorsqu'une partie de la tige de canne à sucre, appelée bouture, est plantée dans les conditions favorables. Deux types de racines se développent successivement et portent des rôles différents. Les racines de bouture tout d'abord, minces et ramifiées, qui prennent en charge l'alimentation hydrique et minérale des premières tiges. Les racines de tige se développent ensuite, plus épaisses et peu ramifiées, elles prendront le relais de l'alimentation de la future plante (Soopramanien, 2000). A l'état mature de la plante, on distingue généralement trois types de racine : i) les racines superficielles qui assurent l'alimentation hydrique et minérale de la plante, ii) les racines de soutien qui assurent la fixation de la plante et l'absorption d'eau et iii) les racines "cordon", peu nombreuses et profondes dans le sol, qui jouent un rôle dans la lutte contre la sécheresse (Blackburn, 1984).

1.1.5. Physiologie et développement

La canne à sucre, lorsqu'elle est mature, peut subir une induction florale dans des conditions environnementales très particulières, incluant une nyctipériode appropriée, des températures minimales et maximales données et une hygrométrie particulière (Julien *et al.*, 1989). L'inflorescence de la canne à sucre (aussi appelée aigrette ou flèche) est un panicule rose argenté portant des fleurs hermaphrodites donnant des caryopses de très petite taille (Van Dillewijn, 1960). Les graines fertiles, encore appelées "fuzz", sont exclusivement utilisées en création variétale (Feldmann *et al.*, 1997). La canne à sucre cultivée de façon commerciale est multipliée de façon végétative grâce aux boutures de tige, voire aux cannes entières dans certains pays. Dans les conditions adéquates, les bourgeons latéraux se développent à partir de la bouture pour donner la tige primaire d'où se développeront les talles secondaires, puis les talles tertiaires,...définissant ainsi le tallage. Après la floraison, ou un dommage du méristème apical (qui peut-être causé par certaines maladies, des produits chi-

miques ou encore certains insectes tels que les foreurs de tiges), les bourgeons latéraux pourront se développer sur les tiges de canne matures et former ce que l'on appelle les "ailerons latéraux" (Soopramanien, 2000). Après la germination, les trois étapes importantes du développement de la canne à sucre sont le tallage, la croissance de tige et la maturation.

Le tallage intervient tout de suite après la germination. Le nombre de talles maximal lors de la culture ou le nombre de talles au moment de la récolte dépendent de nombreux facteurs tels que la variété de canne à sucre, l'humidité et la température du sol, la quantité d'azote disponible, l'ensoleillement et l'incidence des ravageurs ou de certaines maladies, tel que le charbon notamment (Soopramanien, 2000).

La croissance, ou élongation de tige, consiste en une phase de multiplication, de différenciation et d'élongation cellulaire qui intervient durant une période déterminée dépendante de facteurs environnementaux. C'est une phase de très forte croissance végétative et d'activité photosynthétique maximale au cours de laquelle la canne à sucre assimile les matières organiques (azote, phosphore, potassium et autres minéraux) nécessaires à sa croissance et sa physiologie (Soopramanien, 2000). Les matières organiques non utilisées par la plante (< 40%) seront stockées sous forme de saccharose. D'un point de vue physiologique, la canne à sucre possède une activité photosynthétique de type C4, particulièrement efficace pour la fixation du CO₂ et qui peut être affecté par la présence de maladies (Alexander, 1973).

La maturation correspond à une phase de synthèse et d'accumulation de saccharose importante, à hauteur de 65-70% de l'utilisation des ressources carbonées. La variété de canne à sucre, mais aussi les conditions environnementales, l'irrigation ou l'utilisation de produits chimiques peuvent influencer la maturation (Soopramanien, 2000).

1.1.6. Les maladies de la canne à sucre

La canne à sucre est une monoculture pluriannuelle plantée sur de grandes surfaces, ce qui la rend particulièrement exposée aux ravageurs ainsi qu'à de nombreuses maladies. L'utilisation des boutures lors des plantations facilite considérablement la propagation des agents pathogènes, impliquant la mise en place de schémas de pépinières, le développement de techniques d'assainissement du maté-

riel végétal ainsi que des règles phytosanitaires strictes pour l'échange du matériel végétal (telles que des quarantaines; Feldmann *et al.*, 1994; Rott *et al.*, 1997a). Par ailleurs, les méthodes de lutte font essentiellement appel à l'utilisation de variétés résistantes qui peuvent jouer le rôle d'inoculum pour des variétés sensibles, sans toutefois présenter de symptômes (Fauconnier, 1991). En 2000, près de 60 maladies d'origines bactérienne, virale, fongique ou encore provoquées par des phytoplasmes étaient recensées sur la canne à sucre (Rott *et al.*, 2000). Dans certains cas (variétés sensibles, évolution de l'agent pathogène, conditions environnementales particulières,...), ces maladies peuvent provoquer des dégâts très importants et avoir des conséquences économiques graves à l'échelle d'une parcelle, d'une aire de culture, voire d'un pays.

En Guadeloupe, il existe trois maladies principales de la canne à sucre qui font l'objet d'études particulières et/ou qui sont intégrées dans le schéma d'assainissement et de sélection variétale : i) une maladie fongique, le charbon, provoquée par le champignon *Ustilago scitaminea*, ii) une maladie virale impliquant le *Sugarcane yellow leaf virus*, responsable du syndrome de la feuille jaune, et iii) une bactériose vasculaire, l'échaudure des feuilles, causée par *Xanthomonas albilineans* (Rott *et al.*, 2000; CIRAD, 2002). Depuis une vingtaine d'années, la recrudescence de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre dans plusieurs zones géographiques a fait l'objet de nouvelles études, et notamment en Guadeloupe, zone géographique dont les conditions environnementales sont très propices au développement et à l'étude de cette maladie bactérienne.

1.2. La maladie : l'échaudure des feuilles

L'échaudure des feuilles (*leaf scald* en anglais), provoquée par *Xanthomonas albilineans*, est considérée comme une des principales maladies d'origine bactérienne de la canne à sucre. Le premier signalement de l'échaudure des feuilles date de 1911, par North (North, 1926), qui émit l'hypothèse que la maladie était originaire de Nouvelle-Guinée et qu'elle aurait été introduite en Australie par le biais de boutures infectées, sans toutefois pouvoir le démontrer (Martin et Robinson, 1961). Des rapports plus récents ont établi que la maladie serait en réalité apparue aux îles Fidji, dès 1908, où elle aurait pu être confondue avec d'autres maladies ou serait restée à l'état d'infection latente (Ricaud et Ryan, 1989).

La canne à sucre est l'hôte principal de *X. albilineans*, mais d'autres *Poaceae* comme le maïs ou des graminées sauvages poussant à proximité des plantations de canne (*Brachiaria piligera*, *Imperata cylindrica*, *Panicum maximum*, *Paspalum* spp., *Pennisetum purpureum* et *Rottboelia cochinchinensis*) ont été décrits comme hôtes occasionnels de la bactérie (Orian, 1942). La présence naturelle et fréquente des hôtes sauvages dans les zones de production de canne à sucre pourrait expliquer pourquoi la maladie n'a jamais pu être éliminée une fois installée dans un terroir donné (Ricaud et Ryan, 1989).

Les répercussions économiques de l'échaudure des feuilles peuvent être très importantes lorsque des variétés sensibles de canne à sucre sont touchées, en particulier lorsque la maladie touche pour la première fois une zone de production ou lorsqu'une nouvelle souche apparaît (Rott, 1995).

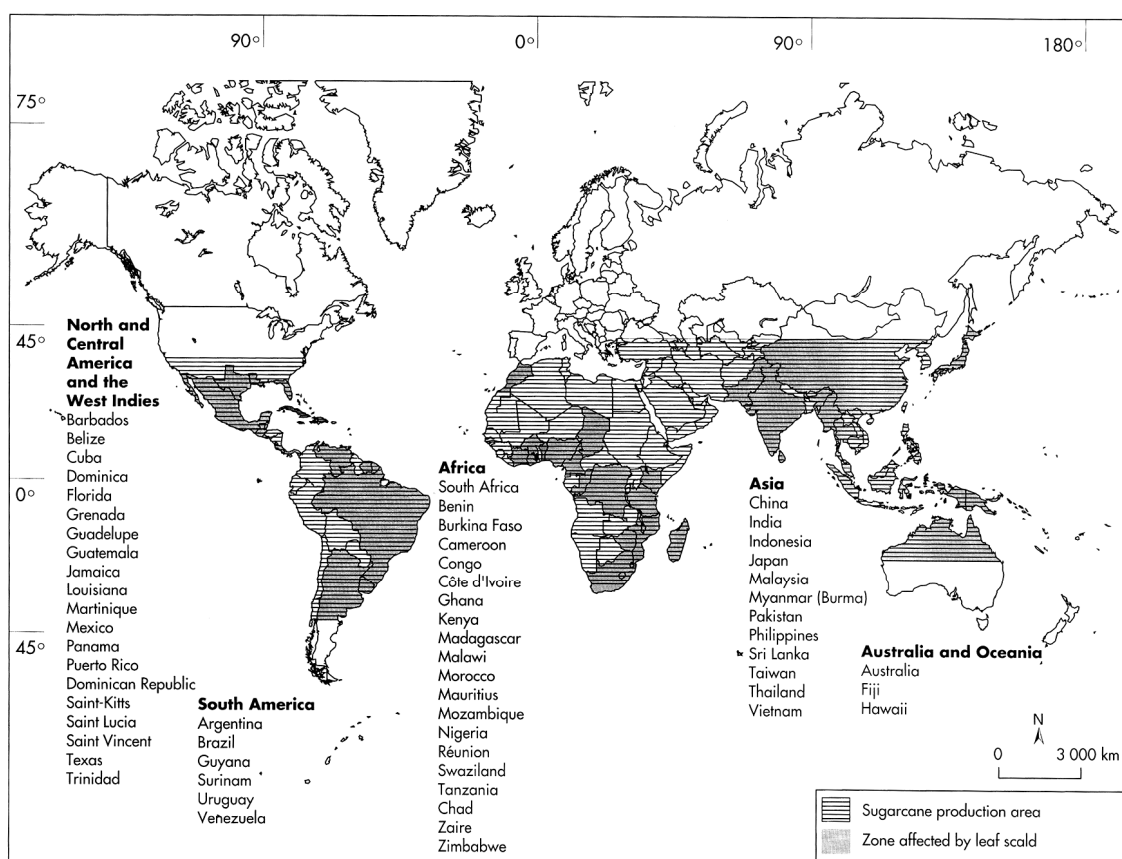


Figure 4. Carte montrant la localisation de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre dans le monde (Rott, 1995).

En 1961, 15 pays contaminés ou ayant été atteints par l'échaudure des feuilles avaient été répertoriés (Martin et Robinson, 1961). Aujourd'hui, cette maladie est recensée dans au moins 61 zones géographiques à travers le monde (Rott, 1995; Figure 4).

En Guadeloupe, l'échaudure des feuilles a été observée pour la première fois en 1968 sur la variété B49119. Depuis, la maladie s'est répandue à la plupart des champs commerciaux avec une recrudescence particulière au cours des quinze dernières années (Rott, 1995).

1.2.1. Symptomatologie

Il existe deux formes principales de la maladie : une forme chronique et une forme aiguë. Ces deux formes apparaissent parfois indépendamment l'une de l'autre mais, le plus souvent, on observe une évolution graduelle de la forme chronique vers la forme aiguë (Rott *et al.*, 1988a). Ces deux formes de la maladie sont caractérisées par l'apparition de symptômes internes et externes. On distingue également deux phases distinctes : une phase de latence au cours de laquelle la plante, porteuse de l'agent pathogène, ne présente aucun symptôme de la maladie, et une phase d'éclipse (Martin et Robinson, 1961; Ricaud et Ryan, 1989; Rott et Davis, 2000).

La forme chronique de la maladie se caractérise par la présence, sur le limbe des feuilles, de stries ou lignes blanches ou jaunes parallèles aux nervures, d'une largeur variant de 1 à 2 mm. Ces lignes peuvent prendre une couleur violacée lorsqu'elles s'étendent vers la gaine et constituent le seul symptôme externe visible sur les cultivars résistants. Lorsque la maladie s'intensifie, on observe un élargissement des stries coïncidant avec le blanchiment du tissu foliaire, notamment sur les feuilles vieillissantes. Le feuillage tout entier peut ainsi être chlorosé et prendre une couleur blanchâtre. La décoloration du limbe est accompagnée d'un dessèchement de l'extrémité des feuilles qui finissent par se recourber vers l'intérieur, évoquant la forme d'un fuseau. Sur les tiges plus âgées, la phase chronique se caractérise tout particulièrement par le démarrage et le développement des bourgeons axillaires, sans effet de dominance apicale. Les pousses axillaires formées, aussi appelées ailerons, peuvent alors présenter les mêmes symptômes que les tiges principales. En section longitudinale ou transversale, la tige malade présente un rougissement caractéristique des faisceaux vasculaires au niveau des nœuds, voire des entre-nœuds. Les symp-

tômes chez les hôtes occasionnels sont généralement restreints à de petites bandes de chlorose ou aux classiques lignes blanches en "trait de crayon". Sur les cultivars sensibles, la maladie peut entraîner la mort de la plante entière (Figure 5).

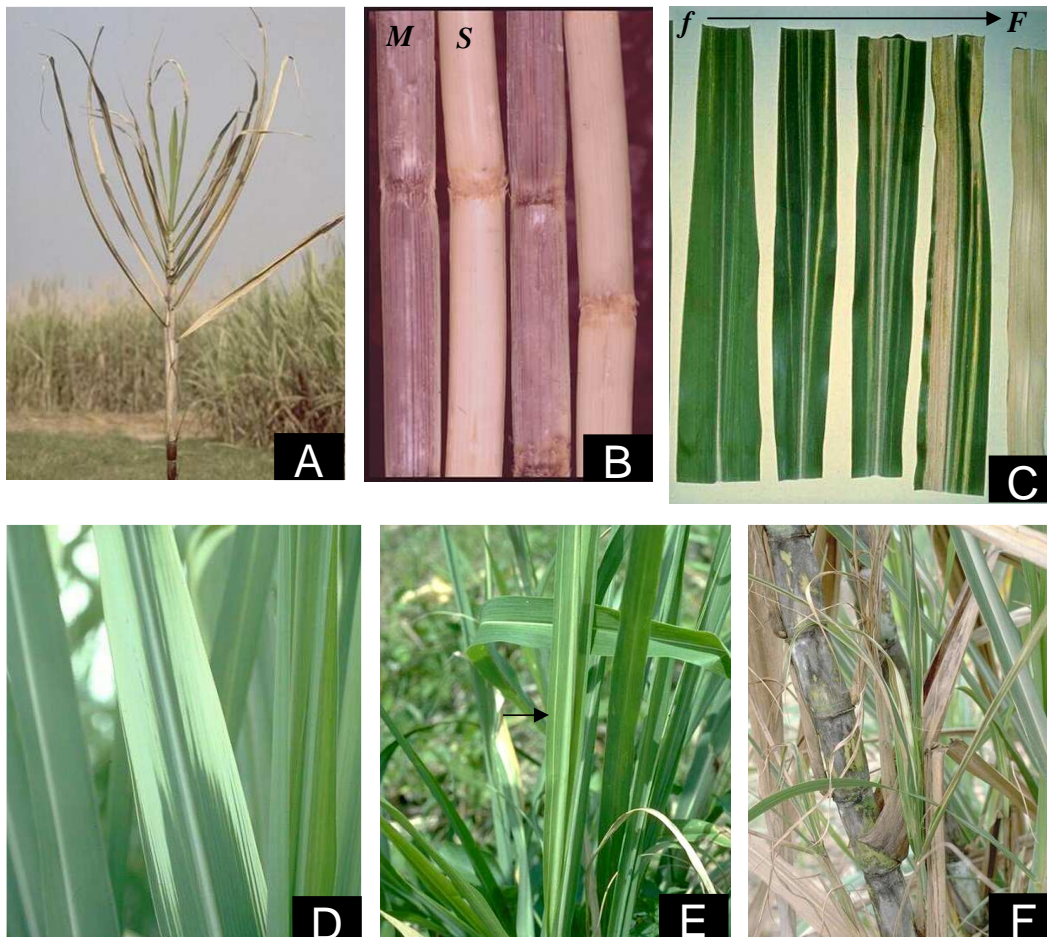


Figure 5. Symptômes d'échaudure des feuilles de la canne à sucre. A, aspect général d'une tige de canne sévèrement atteinte montrant l'enroulement et le dessèchement caractéristiques des feuilles. B, coupes longitudinales de tiges montrant des tissus sains (S) et malades (M; rougissement des faisceaux vasculaires). C, différentes intensités de symptômes foliaires (f = faible intensité à F = forte intensité). D, blanchiment du feuillage. E, feuille de canne montrant une strie blanche foliaire (indiquée par une flèche) parallèle à la nervure centrale. F, aileron de tige latéral présentant des symptômes d'échaudure des feuilles (Rott et Davis, 2000).

La forme aiguë de la maladie semble être limitée aux cultivars les plus sensibles et se manifeste par un flétrissement et un dessèchement soudain des cannes mures, sans qu'il y ait pour autant de symptômes caractéristiques de la phase chronique. Les raisons de son apparition sont encore mal connues, mais celle-ci se pro-

duit souvent après une période de pluie suivie d'une période de sécheresse prolongée.

La phase de latence constitue l'un des principaux obstacles à la lutte contre l'échaudure des feuilles. En effet, la plante peut tolérer l'agent pathogène pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois, sans pour autant présenter de symptômes, ou alors ne présenter que quelques lignes blanches foliaires discrètes pouvant échapper, au champ, à l'attention de l'observateur. Cette phase de latence prend fin pour des raisons encore indéterminées, mais l'hypothèse la plus probable semble être liée à un état de stress consécutif à des conditions climatiques ou nutritionnelles particulières, favorisant le développement de la maladie.

La phase d'éclipse a généralement lieu en même temps que la phase de latence. Les lignes blanches caractéristiques de la forme chronique apparaissent et disparaissent sur le limbe foliaire. Les symptômes ne sont plus visibles après la sénescence et la mort des feuilles âgées, et les plus jeunes feuilles ne présentent plus de symptômes.

Depuis une quinzaine d'années, des **symptômes atypiques** de la maladie ont aussi été observés sur les feuilles de canne à sucre. Initialement décrits à Maurice (Autrey *et al.*, 1995b; Saumtally *et al.*, 1996), ces symptômes ont depuis été observés en Floride (Comstock, 2001) et en Guadeloupe (Daugrois *et al.*, 2003; Figure 6).



Figure 6. Symptômes atypiques d'échaudure (nécroses brunes) sur le limbe foliaire du cultivar de canne à sucre B69566, suite à la contamination du feuillage par voie aérienne en Guadeloupe (Daugrois *et al.*, 2003).

Ils se présentent sous la forme de petites lésions nécrotiques marron-brun sur le limbe foliaire, parallèles aux nervures et le plus souvent prolongées à l'une ou aux

deux extrémités par un unique faisceau vasculaire décoloré, semblable aux stries foliaires de la forme chronique de la maladie.

Ces symptômes ont été associés à une contamination aérienne du feuillage de la canne à sucre à partir de plantes qui ne présentaient pas d'autres symptômes caractéristiques d'une infection systémique (Comstock, 2001).

1.2.2. Mode de transmission

La transmission mécanique de *X. albilineans* par l'homme est le principal mode de transmission de la maladie, et elle s'effectue essentiellement par les instruments de coupe et les boutures utilisées lors des plantations (Ricaud et Ryan, 1989; Rott et Davis, 2000). En raison de la phase de latence de l'échaudure des feuilles, ce mode de transmission a largement contribué à la propagation de la maladie à travers le monde par l'échange de boutures infectées.

La transmission de *X. albilineans* par voie aérienne a été mise en évidence en Floride (Comstock, 2001), en Guadeloupe (Klett et Rott, 1994; Daugrois *et al.*, 2003) et à Maurice (Autrey *et al.*, 1995b). Elle a pu être associée à l'existence d'une phase épiphyte dans le cycle infectieux de la maladie, notamment en Guadeloupe (Daugrois *et al.*, 2005). Lors d'une contamination aérienne, l'agent pathogène pénètre dans la plante par les feuilles, *via* les ouvertures naturelles (stomates ou hydathodes) ou des blessures, fréquentes dans les cultures au champ (Rudolph, 1993). Les feuilles infectées peuvent alors servir de sources d'inoculum de l'agent pathogène sous l'action du vent ou de fortes pluies (Klett et Rott, 1994). Le passage en systémie (dans la plante) de l'agent pathogène, suite à une contamination du feuillage de plants de canne à sucre indemnes de la maladie, a été décrit en Guadeloupe sur le cultivar B69566, sensible à la maladie (Daugrois *et al.*, 2005).

1.2.3. Moyens de lutte

Les pratiques culturales de la canne à sucre rendent cette culture particulièrement sensible à l'échaudure des feuilles, notamment du fait de quelques spécificités : i) les épidémies sont facilitées dans un contexte de monoculture sur de grandes surfaces agricoles, ii) la propagation des agents pathogènes est facilitée par la multiplication végétative par bouturage et iii) la sélection variétale est longue et difficile, notamment à cause du caractère pluriannuel de la culture. Les méthodes de lutte contre

l'échaudure des feuilles sont essentiellement préventives car aucun moyen de lutte chimique n'est utilisé à l'heure actuelle.

La sélection variétale représente le moyen de lutte le plus efficace et le plus répandu pour lutter contre les principales maladies de la canne à sucre. Il permet l'obtention de nouvelles variétés de canne par croisements d'espèces présentant des qualités agronomiques particulières ou une résistance naturelle à une maladie. L'espèce *S. spontaneaum*, résistante à l'échaudure des feuilles, a été utilisée dans de nombreux schémas de sélection variétale. La création variétale est un processus relativement long (10-12 ans en moyenne) qui nécessite la mise en place de schémas de sélection complexes, tel que celui existant en Guadeloupe (Annexe 1). Pour être efficace dans la lutte contre les maladies à long terme, la sélection doit être accompagnée de mesures prophylactiques telles que i) l'élimination du matériel végétal infecté, ii) le nettoyage et la désinfection des outils de coupe en pépinières et iii) des contrôles sanitaires et la production de matériel végétal assaini.

Les contrôles sanitaires strictes ont été mis en place pour l'échange et la distribution de matériel végétal (boutures) d'un pays à l'autre, voire même à l'intérieur d'un même pays. C'est par exemple le rôle de la quarantaine internationale du CIRAD à Montpellier. Celle-ci, au cours de deux cycles de quarantaine d'une durée de un an chacun, a pour objectif de tester, assainir et finalement certifier le bon état phytosanitaire du matériel végétal à l'égard des principaux organismes pathogènes de la canne à sucre (Rott, 1995).

L'assainissement du matériel végétal fait appel aux techniques récentes de culture *in vitro* mais aussi aux techniques plus classiques de thermothérapie des boutures. La culture *in vitro* permet la production et la multiplication de matériel végétal assaini en laboratoire à partir de différents tissus de plantes, tels que les méristèmes apicaux ou les bourgeons latéraux (Feldmann *et al.*, 1994). Les vitroplants ainsi produits seront utilisés pour la mise en place des schémas de pépinières, mais aussi dans différents essais expérimentaux, notamment de phytopathologie.

La thermothérapie des boutures est une méthode basée sur la destruction des bactéries dans les boutures grâce à la chaleur, sans dommage pour les tissus végétaux. Elle est surtout efficace contre les maladies bactériennes et fongiques. Elle consiste en un trempage des boutures préalablement immergées dans de l'eau à

25°C pendant 48 heures, suivi d'un bain d'eau chauffée à 50°C pendant une durée 3 heures (Rott, 1995). Ce procédé n'est cependant pas toujours compatible avec la taille des surfaces agricoles à planter, et son utilisation est le plus souvent limitée aux pépinières ou aux quarantaines.

La mise en place de pépinières dans plusieurs zones de production de canne à sucre, incluant la Guadeloupe, permet la multiplication et la distribution aux planteurs de matériel végétal préalablement assaini pour garantir un état sanitaire optimum des champs commerciaux.

La mise au point et l'efficacité de ces techniques pour le contrôle et la gestion durable de l'échaudure des feuilles nécessitent une connaissance approfondie de l'agent qui en est responsable : *Xanthomonas albilineans*.

1.3. L'agent causal : Xanthomonas albilineans

1.3.1. Classification et identification

Bacterium albilineans a été le premier nom proposé par Ashby en 1929 (Ashby, 1929) à partir de l'observation d'une culture bactérienne fournie par North (North, 1926). Puis, Martin et Robinson (1961) ont placé l'espèce dans un nouveau genre, *Phytomonas albilineans*. Depuis, la bactérie a été reclassée parmi les bactéries isolées de plantes et pigmentées en jaune possédant un unique flagelle, sous le nom de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson (Dowson, 1943). D'autres synonymes de cette bactérie présents dans la littérature sont *Agrobacterium albilineans* (Ashby) Savulescu, *Pseudomonas albilineans* (Ashby) Krasil'nikov ou encore *X. albilineans* var. *paspali* Orian (Dye et Lelliott, 1974; Ricaud et Ryan, 1989).

Le genre *Xanthomonas*, genre chromogène de la famille des *Pseudomonacées*, comprend les bactéries pathogènes synthétisant de nombreux pigments caroténoïdes jaunes, insolubles dans l'eau (Bugnicourt, 1998). Il constitue une branche distincte dans le groupe gamma des protéobactéries (Stackebrandt, 1988).

Xanthomonas albilineans est une bactérie Gram négatif, aérobic, en forme de bâtonnet court et possédant un unique flagelle polaire lui permettant de se déplacer en milieu liquide. Elle produit des pigments xanthomonadines et des acides à partir de divers substrats carbonés (Rott *et al.*, 1988b). Elle produit également de l'hydrogène

sulfuré, utilise le glucose par voie oxydative et dégrade les acides organiques. L'acide glutaminique et la méthionine sont nécessaires à sa croissance.

Bien que présentant les caractéristiques du genre *Xanthomonas*, *X. albilineans* se distingue des autres espèces de *Xanthomonas* par un spectre caractéristique de résistance aux antibiotiques, par une production de mucus très faible, et un temps de génération élevé en comparaison avec les autres *Xanthomonas* (24 heures en général; Vauterin *et al.*, 1993; Vivien, 2005). En culture sur milieu gélosé, elle forme des colonies circulaires, convexes, lisses, brillantes et translucides de couleur jaune-miel qui a tendance à foncer après 5 jours de croissance à 28°C. Sa température maximum de croissance étant de 37°C (Martin et Robinson, 1961; Figure 7).



Figure 7. *Xanthomonas albilineans*. A, Aspect d'une cellule bactérienne en microscopie électronique à transmission en contraste négatif montrant la cellule en forme de bâtonnet allongé et le flagelle polaire unique (Birch, 2001). B, Aspect de colonies bactériennes sur milieu de culture gélosé après étalement avec un ensementeur spiral (Photo P. Rott, non daté).

1.3.2. Pénétration et multiplication dans la plante hôte

Des études de microscopie optique ont confirmé que la bactérie demeurait confinée exclusivement aux vaisseaux du xylème et aux espaces intercellulaires adjacents, et que les chloroplastes des tissus chlorotiques étaient de petite taille et désorganisés. Des études ultra-structurales ont permis de confirmer ces résultats et de montrer que seuls des proplastides (et non des chloroplastes) étaient présents dans les tissus chlorotiques adjacents aux vaisseaux du xylème colonisés (Birch et Patil, 1983; Birch, 2001; Figure 8).

D'une manière générale, les *Xanthomonas* ne possèdent pas de mécanismes actifs pour franchir les barrières physiques des plantes. Ces bactéries pénètrent donc dans la plante *via* les ouvertures naturelles et les blessures (Rudolph, 1993).

Une fois installée dans les vaisseaux du xylème, la bactérie est capable de coloniser de façon systémique l'ensemble de la plante, mais les mécanismes d'interaction existant entre *Saccharum* spp. et *X. albilineans* sont encore très peu connus (Rott *et al.*, 1994a). Il a été montré, néanmoins, que la taille des populations bactériennes de *X. albilineans* dans la plante, après inoculation artificielle, dépend du niveau de résistance du cultivar inoculé (Rott *et al.*, 1994a; Rott *et al.*, 1997b), ainsi que de la souche bactérienne utilisée pour l'inoculation (Mohamed, 1995; Daugrois *et al.*, 2003).

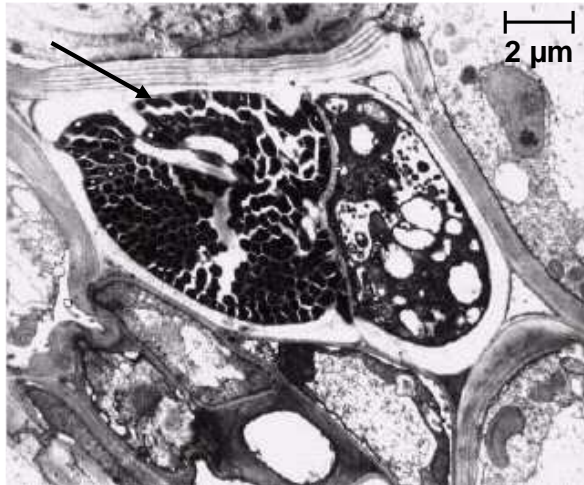


Figure 8. Vaisseau de protoxylème d'une feuille de canne à sucre envahie par des cellules de *X. albilineans* (indiqué par une flèche), et cellules du limbe foliaire voisines montrant des plastides bloqués avant la différenciation chloroplastique, vus au microscope électronique à transmission en contraste positif (Birch, 2001).

1.3.3. Isolement et identification

Plusieurs méthodes sont couramment utilisées pour isoler l'agent pathogène dans la plante hôte au niveau de la tige ou de la feuille, ou pour récupérer les bactéries à la surface des feuilles (Figure 9) :

La dilacération foliaire permet d'isoler facilement la bactérie à partir de nécroses foliaires ou la détection de la bactérie dans les feuilles saines sans symptôme. Elle consiste à dilacérer avec un scalpel quelques centimètres carrés d'un échantillon de limbe foliaire dans 2-3 ml d'eau stérile.

L’empreinte de tige ou de feuille consiste à appliquer directement la portion transversale d’une tige ou d’une feuille, généralement la nervure foliaire, sur un milieu de culture spécifique.

La centrifugation de tige permet d’isoler facilement l’agent pathogène des tiges de canne infectées, ainsi que le dénombrement des populations bactériennes dans la sève extraite.

Le prélèvement de gouttes d’eau (d’exsudation, de rosée ou de pluie) en marge ou à la surface des feuilles de canne permet l’isolement et le dénombrement des populations bactériennes en phase épiphyte, sans destruction de la feuille.

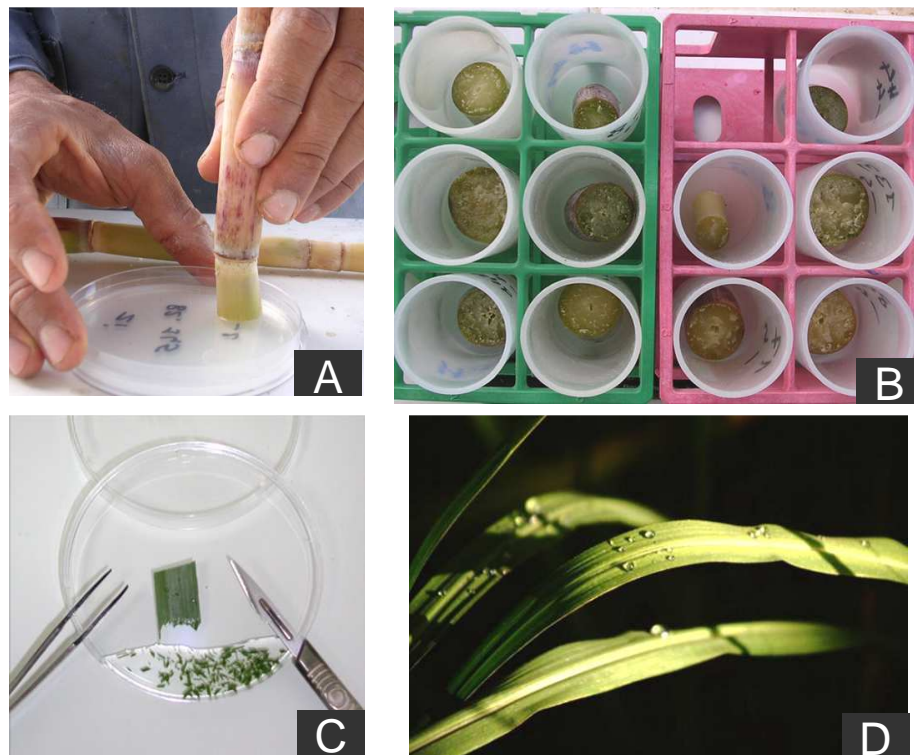


Figure 9. Illustration des méthodes d’isolement de *X. albilineans*. A, empreinte d’une section de tige de canne sur un milieu de culture sélectif (Photo P. Champoiseau, 2004). B, extraction par centrifugation de la sève à partir de portions de tige de canne à sucre (Photo P. Champoiseau, 2004). C, dilacération d’une portion du limbe foliaire de canne à sucre dans de l’eau stérile (Photo P. Champoiseau, 2004). D, gouttes de rosée à la surface d’une feuille de canne prélevées pour la détection des bactéries épiphytes (Photo J.-H. Daugrois, 1998).

Ces différentes techniques sont une première étape pour l’étude et la conservation des cultures bactériennes de *X. albilineans*. Des techniques complémentaires ont été

développées pour l'identification et la caractérisation spécifiques de la bactérie (Comstock, 1992; Davis *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 1998). On distingue notamment (Figure 10) :

L'utilisation de milieux de culture sélectifs. Ils ont pu être développés facilement grâce à des caractéristiques propres de *X. albilineans*, à savoir l'aspect et la vitesse de croissance des colonies, ainsi que la résistance naturelle de la bactérie à plusieurs antibiotiques. C'est une méthode très fiable qui permet d'identifier une bactérie unique dans un échantillon (Annexe 2).

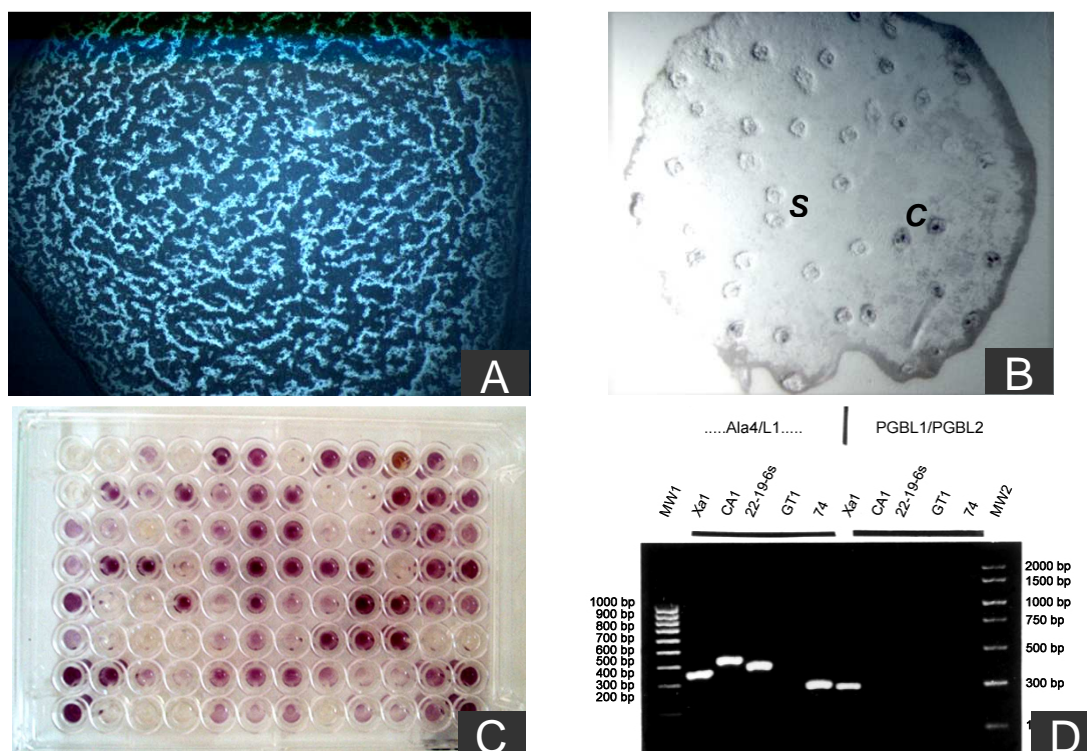


Figure 10. Illustration de différentes techniques d'identification de *X. albilineans*. A, résultat d'un test positif de séro-agglutination montrant la "précipitation" (en blanc) des cellules bactériennes (Photo P. Champoiseau, 2003). B, empreinte d'une tige de canne à sucre montrant des vaisseaux sains (S) et contaminés (C) révélés par sérologie (Photo J.-H. Daugrois, 2003). C, résultat d'un test de BIOLOG basé sur la dégradation de différents substrats carbonés (Photo F. Carrey, 2004). D, Résultat de l'amplification par PCR d'une séquence spécifique de *X. albilineans* (Pan *et al.*, 1999).

Les techniques de dégradation de composés organiques permettent l'identification de bactéries Gram positif ou Gram négatif à partir de profils de dégradations d'un ensemble de substrats carbonés (test de BIOLOG).

Les méthodes immunologiques ont été développées pour l'aide au diagnostic de l'échaudure des feuilles. Elles sont basées sur le principe de reconnaissance antigène/anticorps et font appel à des immunosérums spécifiques représentant les différents groupes sérologiques ou sérovars identifiés au sein de l'espèce (Rott *et al.*, 1994b).

Les méthodes de biologie moléculaire sont basées sur l'étude de l'ADN de la bactérie. La technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a très largement contribué au développement d'amorces nucléotidiques spécifiques pour la détection et l'identification de *X. albilineans*. (Pan *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1999).

1.3.4. Variabilité de *X. albilineans*

L'efficacité de la sélection variétale, la maîtrise de la résistance à l'échaudure des feuilles, ainsi que la mise au point et l'utilisation efficace des techniques de diagnostic de *X. albilineans* décrites précédemment nécessitent une connaissance approfondie de la variabilité de l'agent pathogène. L'étude de la variabilité de *X. albilineans* a déjà fait l'objet de nombreux travaux synthétisés par Rott et Davis (1996), mais l'évolution permanente de l'agent pathogène et des outils de recherche disponibles impliquent un suivi permanent de cette variabilité et la mise en place de nouvelles études.

Une variabilité de la morphologie des cellules et des colonies bactériennes a été décrite par quelques chercheurs (Ricaud et Ryan, 1989; Figure 11). Par ailleurs, la différence de taille et de vitesse de croissance des colonies bactériennes a été associée à une différence d'agressivité entre les différentes souches de *X. albilineans* (Ricaud et Ryan, 1989).

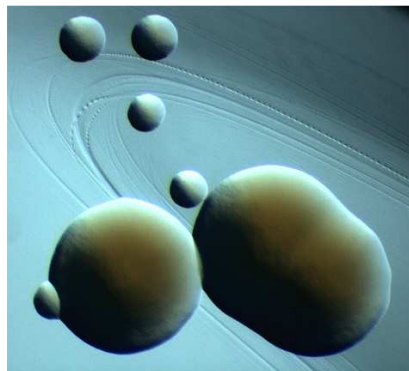


Figure 11. Petites et grandes colonies de *X. albilineans* observées sur un milieu de culture spécifique sous une loupe binoculaire (Photo P. Champoiseau, 2004)

Une variabilité protéique a été montrée chez 65 souches de *X. albilineans* originaires de 22 zones géographiques différentes. L'étude des protéines cellulaires totales a permis de distinguer deux groupes protéiques majeurs (Rott et Davis, 1996).

Une variabilité lipidique existe également. Trois groupes d'esters méthyliques d'acide gras ont été identifiés chez 65 souches de *X. albilineans* originaires de 22 zones géographiques différentes (Yang *et al.*, 1993).

Une variabilité lysotypique (réaction aux bactériophages) a été montrée chez 28 souches de *X. albilineans* et 6 lysovars ont été identifiés grâce à 10 bactériophages (Rott *et al.*, 1986).

Une variabilité sérologique (réaction aux anticorps) a été caractérisée plus récemment chez 271 souches de *X. albilineans* originaires de 33 zones géographiques différentes et 3 groupes sérologiques, ou sérovars, ont été décrits (Rott et Davis, 1996).

Une première étude de la variabilité génétique de 24 souches de *X. albilineans*, réalisée grâce à la technique RFLP, avait permis d'identifier 2 groupes génétiques majeurs (Davis, 1992; Davis *et al.*, 1993). Une étude plus récente menée avec 218 souches de *X. albilineans* originaires de 31 zones géographiques distinctes a permis d'identifier 54 haplotypes différents et 8 groupes génétiques majeurs (PFGE A à H) grâce à la technique d'électrophorèse en champs pulsés et après digestion avec l'enzyme à site de coupure rare *SpeI* (Davis *et al.*, 1997). Deux groupes génétiques supplémentaires (PFGE I et J), soient 10 groupes PFGE au total, ont par la suite été identifiés avec 87 souches bactériennes (Clerc, 1997). Récemment, l'étude du polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (AFLP) menée avec 162 souches de *X. albilineans* et prélevées dans 32 zones géographiques a permis de mettre en évidence 59 haplotypes classés en 8 groupes génétiques différents (Pilet *et al.*, 2000).

La variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans* a fait l'objet d'un grand nombre de travaux qui sont abordés dans le paragraphe suivant.

1.3.5. Pouvoir pathogène de *X. albilineans*

Les connaissances du pouvoir pathogène de *X. albilineans* et de ses déterminants génétiques en font un modèle à la fois original et encore mal connu par rapport aux autres *Xanthomonas*, dont certains génomes ont déjà été séquencés. En effet, chez la plupart des *Xanthomonas*, comme chez de nombreux autres genres de bactéries phytopathogènes, des gènes jouant un rôle clé dans les interactions entre la plante hôte et l'agent pathogène ont été identifiés. Ces gènes qui sont essentiels pour l'expression de la pathogénie sont connus sous le nom de gènes *avr* (pour "avirulence") et *hrp* (pour "hypersensitive response and pathogenicity"; Chatterjee et Vidaver, 1986; Gopalan et He, 1996; Leach et White, 1996). Chez *X. albilineans*, aucun gène *avr* ou *hrp* n'a été identifié jusqu'à ce jour par recherche d'homologie de séquences avec des gènes homologues issus d'autres espèces de *Xanthomonas* (Leite Jr et al., 1994; Costet et al., 2002). Par ailleurs, *X. albilineans* est le seul *Xanthomonas* à produire un complexe de pathotoxines, dont la composante majeure est l'albicidine, et connu sous le nom de famille albicidine. L'albicidine est une composante essentielle du pouvoir pathogène de *X. albilineans* et cette toxine présente également des propriétés antibiotiques.

1.3.5.1. Symptômes foliaires et colonisation de la tige

Deux composantes essentielles du pouvoir pathogène de *X. albilineans* ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche : l'induction des symptômes foliaires et la capacité de colonisation de la tige de canne à sucre. Ces travaux ont permis de mettre en évidence i) l'existence de variants de pathogénie, ou pathotypes, sur la base de l'intensité des symptômes foliaires (généralement utilisée pour caractériser la sévérité de la maladie), et ii) l'existence de variants de colonisation de la tige, ou colovars, basés sur l'importance des densités de populations bactériennes à différents niveaux de la tige de canne à sucre (Mohamed, 1995; Mohamed et al., 1996; Daugrois et al., 2003). L'intensité des symptômes foliaires de la maladie et la taille des populations bactériennes dans la tige dépendent du niveau de résistance variétal du cultivar infecté. Après inoculation avec la méthode de décapitation-dépôt, développée pour le criblage variétal et couramment utilisée pour l'étude de la pathogénie de *X. albilineans* (Koike, 1965; Rott et al., 1997b; Daugrois et al., 2003), des cultivars sensibles à l'échaudure des feuilles qui présentent des symptômes sévères de la

maladie sont généralement très fortement colonisés à tous les niveaux de la tige (Rott *et al.*, 1997b). En revanche, des cultivars de canne à sucre résistants ou tolérants à la maladie et qui expriment peu ou pas de symptômes d'échaudure après inoculation, sont colonisés de façon différente par *X. albilineans*. Dans ce cas, les plus fortes densités de populations bactériennes sont généralement présentes dans la partie basse de la tige, sous la zone d'inoculation (Rott *et al.*, 1997b; Daugrois *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que le haut de la tige pouvait parfois être plus fortement colonisé par *X. albilineans*, après inoculation artificielle ou naturelle de plants de canne à sucre (Comstock et Irey, 1992). Des études ont ainsi montré que des populations bactériennes pouvaient rester stables pendant plusieurs mois dans le bas de la tige de canne, après avoir atteint un certain seuil et ce malgré une diminution de la sévérité de la maladie (Rott *et al.*, 1994a). Enfin, un certain nombre de facteurs peuvent agir sur la colonisation de la tige et le développement des populations bactériennes tels que l'âge et la taille des plantes au moment de l'inoculation, les conditions environnementales au cours de l'expérimentation ou encore la durée totale de l'expérimentation jusqu'à l'évaluation des populations bactériennes dans la tige (Rott *et al.*, 1997b). Par ailleurs, Il a été montré que l'intensité des symptômes foliaires de la maladie est corrélée positivement aux densités de populations bactériennes au niveau de l'apex des tiges de canne à sucre (Rott *et al.*, 1994a; Rott *et al.*, 1997b). Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que deux mécanismes pouvaient intervenir dans la résistance à l'échaudure des feuilles : i) une résistance à la colonisation de l'apex de la canne à sucre, caractérisée par l'absence de symptômes foliaires, et ii) une résistance à la colonisation du bas et du haut de la tige de canne à sucre (Rott *et al.*, 1997b). Des interactions entre des cultivars de canne à sucre et des souches de *X. albilineans* ont été montrées par certains auteurs. Elles ont permis de suggérer l'existence de races au sein de l'espèce (Autrey *et al.*, 1995a; Mohamed, 1995; Mohamed *et al.*, 1996), mais des résultats contradictoires obtenus par ailleurs ne permettent pas de l'affirmer de façon certaine (Daugrois *et al.*, 2003).

1.3.5.2. *L'albicidine : une toxine et une composante essentielle du pouvoir pathogène de X. albilineans*

Le rôle de l'albicidine dans l'expression des symptômes foliaires a été suggéré dès les années 40 par Orian. Ce dernier proposa l'implication d'un métabolite secondaire toxique agissant sur la formation des chloroplastes pour expliquer leur ab-

sence des tissus chlorotiques de canne à sucre atteinte d'échaudure des feuilles (Orian, 1942). Cependant, il n'a pas réussi à démontrer l'implication d'une phyto-toxine par le test classique d'induction de symptômes avec différentes fractions de milieu de culture de *X. albilineans* (Birch, 2001). Depuis, l'implication de la toxine albicidine dans le pouvoir pathogène de la bactérie a été démontrée par différents auteurs : i) l'albicidine a été associée à l'apparition des symptômes d'échaudure des feuilles et notamment les lignes blanches et les chloroses foliaires (Birch et Patil, 1987a) ; ii) l'albicidine bloque la réplication de l'ADN du chloroplaste qui reste bloqué au stade proplaste (Birch et Patil, 1987b) ; iii) des mutants d'insertion tox^- , incapables de produire la toxine, ne sont pas pathogènes et n'induisent plus de symptômes sur des variétés très sensibles (Birch, 2001) ; et enfin, iv) des cannes à sucre transgéniques exprimant un gène de détoxification de l'albicidine sont résistantes à l'échaudure des feuilles (Zhang *et al.*, 1999).

L'albicidine possède également une activité antibiotique à des concentrations nanomolaires sur une large gamme de bactéries Gram positif et Gram négatif (Birch, 2001). La toxine bloque sélectivement la synthèse d'ADN chez *Escherichia coli* et elle est rapidement accumulée *via* un pore normalement impliqué dans l'import de nucléosides (*tsx*; Birch et Patil, 1985). La résistance spontanée d'*E. coli* à l'albicidine résulte d'une mutation du gène *tsx* ayant pour effet le blocage de l'import des nucléosides par ce pore (Birch *et al.*, 1990). Un bio essai réalisé *in vitro* et basé sur les caractéristiques antibiotiques de l'albicidine, et notamment la capacité à inhiber la croissance d'*E. coli*, a ainsi été développé pour évaluer et caractériser la production d'albicidine par *X. albilineans* (Birch et Patil, 1985; Figure 12).

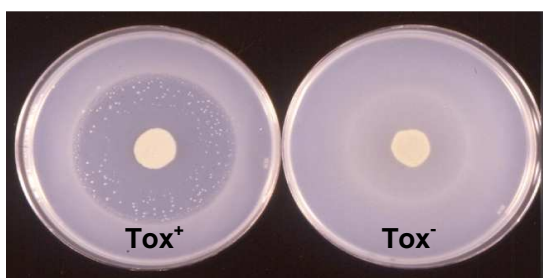


Figure 12. Bio essai réalisé *in vitro* et basé sur la capacité de l'albicidine à inhiber la croissance d'*E. coli* et montrant une souche de *X. albilineans* productrice d'albicidine (Tox^+) et un mutant non producteur (Tox^-); Photo P. Rott, non daté).

Une variation de la quantité d'albicidine produite par différentes souches de *X. albilineans* a pu être étudiée grâce au bio essai évoqué précédemment. Même si de nombreux facteurs peuvent influencer la production d'albicidine *in vitro*, tels que

l'épaisseur et la composition chimique du milieu de culture, la température ou encore la vitesse de croissance des bactéries (Zhang *et al.*, 1998), l'existence de variants de production d'albicidine, ou albivars, au sein de l'espèce *albilineans* a été démontrée à plusieurs reprises (Birch et Patil, 1985; Birch, 2001; Champoiseau, 2001).

Le rôle de l'albicidine dans la colonisation systémique de la plante a par ailleurs été suggéré sur la base de deux observations (Birch, 2001) : i) des souches de *X. albilineans* dont la production d'albicidine est bloquée par l'expression du gène *albD*, jouant un rôle dans la détoxification de l'albicidine (Zhang et Birch, 1995), sont moins efficaces à coloniser la plante de façon systémique (Zhang et Birch, 1997) ; ii) des souches sauvages de *X. albilineans* productrices d'albicidine et dont les populations sont très élevées dans des cultivars sensibles de canne à sucre, ne se multiplient pas beaucoup dans les tissus des plants transgéniques exprimant fortement le gène *albD* (Zhang *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la résistance à l'albicidine dans des plants transgéniques de canne à sucre, résultant de l'expression du gène de détoxification *albD*, protège non seulement contre l'expression des symptômes foliaires de la maladie, mais aussi contre l'invasion systémique et le développement de fortes populations de *X. albilineans* dans la tige (Birch, 2001). Les chloroplastes sont le lieu de synthèse de nombreux métabolites secondaires dont certains pourraient jouer un rôle important dans les mécanismes de défense de la plante. Le blocage de la différenciation des chloroplastes par l'albicidine pourrait également bloquer la synthèse de ces métabolites secondaires, ce qui expliquerait pourquoi l'albicidine favorise la colonisation de la tige par *X. albilineans* (Birch, 2001). Cependant, des mutants *Tox⁻* non producteurs de toxine, et qui n'ont pas induit de symptômes d'échaudure des feuilles sur des plantes inoculées, sont néanmoins capables de coloniser la tige de canne à sucre, suggérant que l'albicidine n'est pas nécessaire à la colonisation systémique (Birch et Patil, 1987a). Par ailleurs, il n'est pas exclu que l'activité antibiotique de l'albicidine puisse jouer un rôle dans l'inhibition du développement d'agents pathogènes secondaires ou d'autres microorganismes endophytes, et ainsi conférer un avantage compétitif à *X. albilineans* dans la colonisation de la plante. De façon similaire, l'albicidine pourrait jouer un rôle dans la compétition pour la colonisation épiphyte du feuillage de *X. albilineans*, en inhibant la croissance d'autres micro-organismes. En effet, il a été montré en Guadeloupe dans une parcelle de canne à sucre colonisée par voie aérienne par deux souches de *X. albili-*

neans, appartenant à des sérovars différents et dont l'une n'a pas produit d'albicidine *in vitro*, que seule la souche productrice d'albicidine avait colonisé l'ensemble de la parcelle 25 semaines après la première détection de la bactérie dans la parcelle (Daugrois *et al.*, 2003).

Les caractéristiques chimiques et la structure de l'albicidine n'ont pas encore été déterminées car celle-ci n'est produite qu'en très faible quantité par *X. albilineans*, ce qui rend sa purification et son étude relativement fastidieuses. Des données morcelaires de Résonance Magnétique Nucléaire du proton et du carbone 13 ont néanmoins déjà permis de préciser que l'albicidine est un composé aromatique de faible poids moléculaire (environ 842 Da) et composé de 38 atomes de carbone (Birch et Patil, 1985). L'albicidine est un antibiotique de nature non peptidique, soluble dans les solvants organiques, partiellement soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants moins polaires.

1.3.5.3. Bases génétiques de la biosynthèse de l'albicidine

L'étude des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine chez la souche Xa23R1 originaire de Floride a tout d'abord permis de montrer que la majorité de ces gènes sont regroupés dans la même région du génome de *X. albilineans* (Rott *et al.*, 1996). Plus récemment, cette région de 56 kb, nommée XALB1, a été entièrement séquencée et annotée, elle comprend 20 ORFs (*albI-albXX* ; Royer *et al.*, 2004; Figure 13).

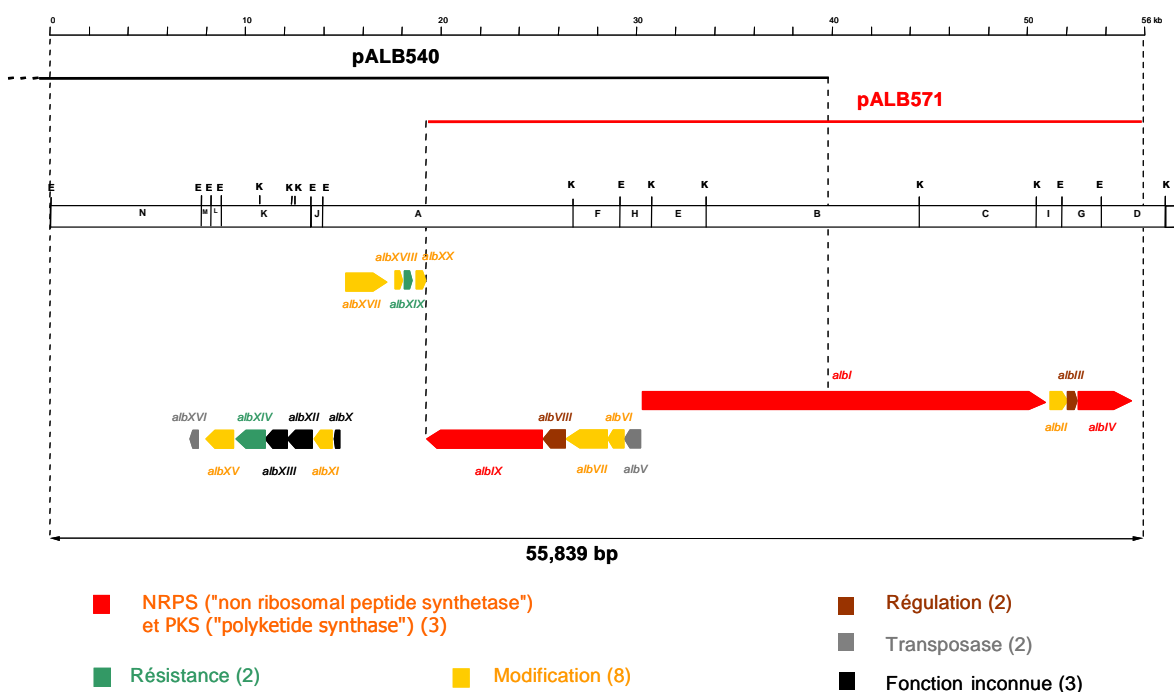


Figure 13. Organisation et description des gènes de la région XALB1 du génome de *X. albilineans*, potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine (d'après Royer *et al.*, 2004).

Trois gènes majeurs codent des mégasynthétases modulaires de type polycétide synthase (PKS, pour "*polyketide synthase*") et peptide synthase non ribosomale (NRPS, pour "*non ribosomal peptide synthase*") qui occupent près de 52% de la région XALB1 : *albl*, *alblIV* et *alblIX*. Les autres ORFs potentiellement impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine codent des protéines putatives de régulation, de modification et de résistance (Royer *et al.*, 2004). Tous ces ORFs sont présents dans deux cosmides chevauchants, pALB571 (*albl* à *alblIX*) et pALB540 (une partie de *albl*, *alblV* à *alblXX*), qui sont issus d'une banque d'ADN génomique qui a été obtenue à partir de la souche Xa23R1. Deux autres régions du génome de la souche Xa23R1, nommées XALB2 et XALB3 et d'une taille de 3 kb chacune, sont également impliquées dans la biosynthèse de l'albicidine. La région XALB2 contient un seul gène (*alblXXI*) qui code une phosphopantéthéinyl transférase nécessaire pour l'activation post traductionnelle des PKS et NRPS (Huang *et al.*, 2000; Royer *et al.*, 2004). La région XALB3 contient également un seul gène (*alblXXII*) qui code la protéine de stress HtpG dont le rôle dans la biosynthèse de l'albicidine n'a pas encore été déterminé (Vivien *et al.*, 2005). Une partie de la région XALB1 (qui comprend les ORFs *alblX* à

albXX), la région XALB2 (*albXXI*) et la région XALB3 (*albXXII*) ont été sous-clonées dans un plasmide unique appelé pBKS/K7 (E. Vivien, communication personnelle).

En conclusion, il apparaît de façon évidente que l'albicidine, impliquée dans l'induction des symptômes foliaires de l'échaudure des feuilles, joue un rôle prépondérant dans la pathogénie de *X. albilineans*. Le récent clonage et décryptage de l'ensemble des gènes impliqués, ou potentiellement impliqués, dans la biosynthèse de l'albicidine a permis de développer un outil majeur pour l'étude et la compréhension de la variabilité des bases génétiques du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. Cette étude fera l'objet de la première partie de cette thèse (chapitre III). Par ailleurs, il a été émis l'hypothèse que l'albicidine pouvait agir comme un facteur de virulence agissant conjointement avec d'autres facteurs de virulence déjà identifiés chez d'autres *Xanthomonas* ou d'autres bactéries phytopathogènes dont les génomes ont déjà été entièrement ou en partie séquencés. Des travaux ont été réalisés dans la deuxième partie de cette thèse pour rechercher et caractériser des marqueurs génétiques ou physiologiques, autres que les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine, qui seraient associés à la variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. Ces travaux feront l'objet du chapitre IV de ce manuscrit.

Dans la suite de cette introduction, une synthèse bibliographique des principaux facteurs de virulence ou de pathogénie déjà identifiés chez les bactéries phytopathogènes a pour objectif de fournir les éléments de compréhension des travaux réalisés au cours de cette étude.

CHAPITRE I. Introduction

Fonctions et bases génétiques du pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes

2. Fonctions et bases génétiques du pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes

Le récent décryptage du génome complet de plusieurs bactéries phytopathogènes telles que *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000), *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner *et al.*, 2001), *Ralstonia solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Da Silva *et al.*, 2002), *P. syringae* pv. *syringae* (Buell *et al.*, 2003), *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004), ou encore *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Lee *et al.*, 2005), a très largement contribué à améliorer les connaissances sur les interactions plante-agent pathogène grâce notamment à l'identification, l'étude et la compréhension des grandes fonctions et des bases génétiques des composantes du pouvoir pathogène de ces bactéries. Ainsi, un certain nombre de facteurs, plus ou moins spécifiques des différentes bactéries pathogènes, et associés à la virulence ou la pathogénie de ces bactéries, ont pu être identifiés et caractérisés par la suite. Historiquement, un facteur de virulence a été défini comme étant une molécule présente à la surface des bactéries, ou transloquée du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, et qui est susceptible d'influencer la croissance de l'agent pathogène dans la plante (Salmond, 1994). Cette définition a été étendue par la suite pour inclure un concept permettant de distinguer les agents pathogènes, qui sont supposés être virulents, des agents non pathogènes, supposés être non virulents. Récemment, les nombreuses études portant sur les facteurs de virulence et les interactions hôte/agent pathogène ont permis de montrer que ce concept ne pouvait s'appliquer à l'ensemble des agents pathogènes, selon la nature même de l'interaction et la redéfinition de la notion de virulence. Certains auteurs ont donc proposé une nouvelle définition, et les facteurs de virulence seraient l'ensemble des attributs microbiens qui modulent les dommages de l'hôte (Casadevall et Pirofski, 1999, 2001). Parmi les molécules excrétées dans le milieu extracellulaire on distingue des enzymes de dégradations extracellulaires, des phytohormones, des phytotoxines, des molécules signal, des molécules impliquées dans la reconnaissance plante hôte/pathogène ou encore des facteurs de régulation de la pathogénie. Les flagelles, les pilus, les lipopolysaccharides et les exopolysaccharides ou encore les protéines membranaires externes constituent, quant à eux, des facteurs de virulence solidaires de la membrane externe des bactéries (Salmond, 1994; Figure 14).

Cette partie a pour objectif de présenter de façon succincte, mais le plus exhaustivement possible, l'ensemble des grandes fonctions de pathogénie identifiées à ce jour chez les bactéries Gram négatif, et notamment les bactéries phytopathogènes, avec un regard particulier sur les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces différents facteurs.

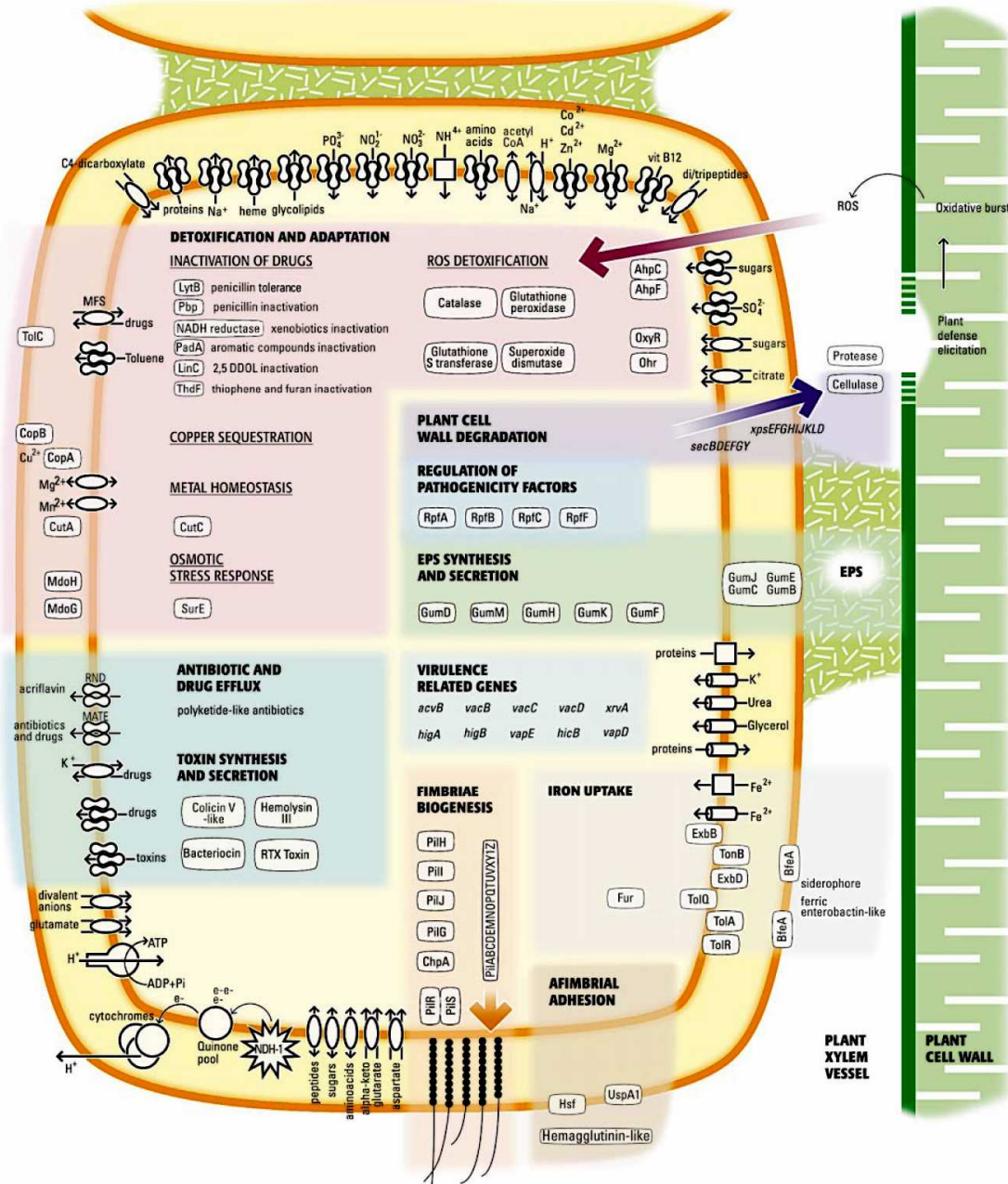


Figure 14. Représentation schématique des principales fonctions et processus biochimiques impliqués dans la pathogénie et la survie dans le xylème de l'hôte bactérien phytopathogène Gram négatif, *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000).

2.1. Les systèmes et facteurs de pathogénie

2.1.1. Les systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion protéiques ne constituent pas à proprement parler des facteurs de virulence, mais contribuent de façon capitale à l'interaction et la survie des bactéries avec et dans leur environnement, l'exploitation des ressources du milieu ainsi que l'expression de la pathogénie. Chez les bactéries Gram négatif, notamment, ils sont nécessaires à la sécrétion ou l'export dans le milieu extracellulaire des facteurs de virulence au travers de la double membrane cellulaire, constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne, ou cytoplasmique, séparées par le périplasme. Le terme "export" décrit le mouvement d'une protéine depuis le cytoplasme vers le périplasme au travers de la membrane interne, alors que la "sécrétion" décrit la translocation de la protéine dans le milieu extracellulaire (Salmond, 1994). Par ailleurs, les systèmes de sécrétion représentent des systèmes uniformes, extrêmement conservés chez la plupart, voire l'ensemble, des bactéries phytopathogènes (Genin et Boucher, 2004). Jusqu'à ce jour, quatre systèmes de sécrétion protéiques majeurs et deux systèmes de sécrétion potentiellement impliqués dans la virulence des bactéries Gram négatif ont été décrits et sont présentés ci-dessous.

2.1.1.1. Système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I (TISS pour "*type I secretion system*") est utilisé par de nombreuses bactéries pour la sécrétion de toxines et d'enzymes extracellulaires (Salmond, 1994). L'exemple le plus caractéristique et le plus étudié est très certainement la synthèse de protéase par l'agent pathogène *Erwinia chrysanthemi* (Delepelaire et Wandersman, 1990; Palacios *et al.*, 2001). Dans ce système, les protéines sont transportées directement du cytoplasme vers le milieu extracellulaire de façon active grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Elles ne possèdent pas la séquence peptidique N-terminal caractéristique pour le transport des protéines dit "séquence-dépendant" à travers la membrane interne des bactéries Gram négatif, mais sont reconnues grâce à une séquence riche en glycine localisé à la partie C-terminale (Delepelaire et Wandersman, 1990; Salmond, 1994). Ce système de sécrétion est composé de 3 sous-unités protéiques chez *E. chrysanthemi*, PrtD, PrtE, et PrtF codées par les gènes correspondants *prtD*, *prtE*, et *prtF*, d'où l'appellation de "système

ABC". PrtD et PrtE, localisées dans la membrane interne, et PrtF, localisée dans la membrane externe, forment un canal pour le passage des protéines à travers la membrane cellulaire (Figure 15). Le rôle du TISS apparaît essentiel mais non déterminant dans la pathogénie de certaines bactéries phytopathogènes, comme il l'a été montré chez *E. chrysanthemi*, dans la mesure où le rôle des protéases, et plus largement des enzymes extracellulaires, ne semble pas seul déterminant dans la virulence des bactéries Gram négatif (Salmond, 1994).

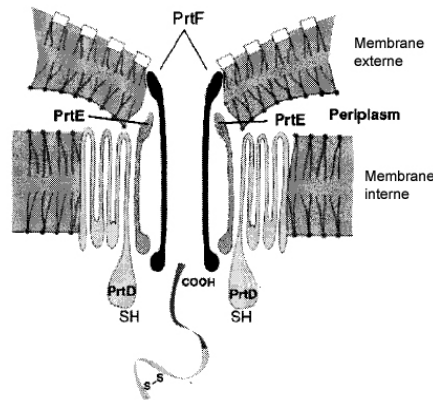


Figure 15. Illustration du système de sécrétion de type I chez *E. chrysanthemi* montrant les 3 sous-unités protéiques PrtD, PrtE et PrtF (Palacios *et al.*, 2001).

2.1.1.2. Système de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II (TISS pour "*type II secretion system*") a été mis en évidence et largement décrit chez plusieurs bactéries Gram négatif, notamment *Erwinia spp.*, *X. campestris* et *R. solanacearum* (Salmond, 1994; Sandkvist, 2001; Genin et Boucher, 2004). Il permet la sécrétion dans le milieu extracellulaire de nombreuses protéines diverses qui sont le plus généralement des enzymes de dégradation de la paroi des cellules de la plante (pectate lyases, polygalacturonases, pectine méthylestérases, cellulases, protéases, lipases, phospholipases, élastases,...). Pour cette raison, ce système est aussi connu sous le nom de système général de sécrétion (GSP pour "*general secretory pathway*"). Dans ce système, dit "sec-dépendant", les protéines sont reconnues par une séquence d'acides aminés hydrophobes, ou "séquence signal", localisée au niveau de leur partie N-terminale et nécessaire à leur exportation et qui sera ensuite éliminée par une peptidase dans le milieu périplasmique (Salmond, 1994). Plusieurs protéines sont nécessaires à la formation de ce système, dont une ATPase, une protéine chaperon et une peptidase. Contrairement

au TISS, la sécrétion de type II s'effectue en deux étapes incluant : i) une translocation de la protéine dans le périplasma, où elle subit une maturation, puis ii) une exécution à travers la membrane externe (Figure 16). Les protéines du TISS sont codées par un ensemble de gènes qui sont organisés en grandes unités transcriptionnelles (ou clusters) chez plusieurs bactéries phytopathogènes, tels que les gènes *gsp* chez *R. solanacearum* (Genin et Boucher, 2004), les gènes *out* chez *E. carotovora* (Salmond, 1994) ou encore les gènes *xps* chez *X. campestris* et *X. axonopodis* (Da Silva *et al.*, 2002), *X. oryzae* (Lee *et al.*, 2005) ou *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000). Il a été montré que l'organisation ainsi que le nombre de ces gènes peuvent varier d'une espèce à l'autre. Chez la plupart des bactéries pathogènes, des mutants déficients dans leur capacité à synthétiser les protéines du TISS présentent le plus souvent une diminution de leur virulence (Salmond, 1994), voire une incapacité complète à provoquer les symptômes de la maladie et à coloniser la plante (Kang *et al.*, 1994).

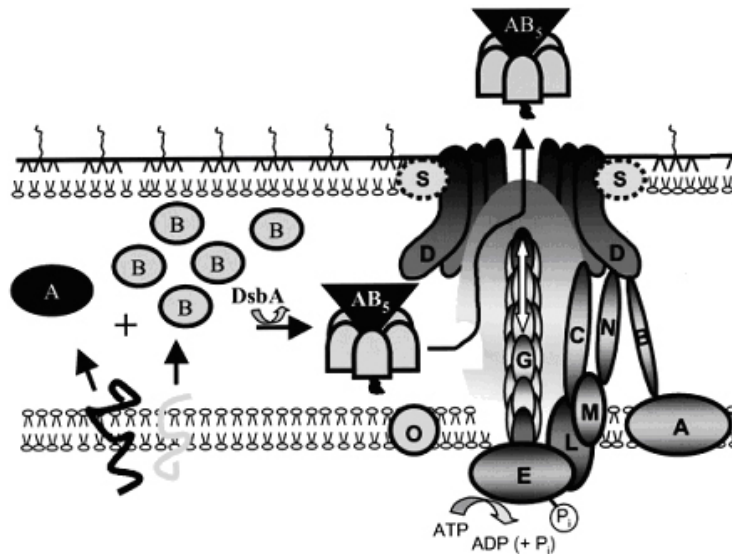


Figure 16. Illustration du système de sécrétion de type II. Sous-unités d'une protéine sécrétée par la voie de sécrétion de type II chez *P. aeruginosa*, (A et B) ; complexe protéique formé par DsbA, (AB5) ; protéine XcpQ formant le pore de sécrétion, (D) ; protéine XcpT constituant la composante majeure du pilus, (G) ; complexe protéique XcpY, XcpZ, XcpR régulant la sécrétion par phosphorylation ou hydrolyse de l'ATP (L, M et E) ; protéine XcpP communiquant le signal de phosphorylation au pore membranaire, (C) ; protéines XcpA et PilD nécessaires à la formation du pilus, (O) ; protéines absentes chez *P. aeruginosa* mais présentes chez d'autres organismes, (N et S; Sandkvist, 2001).

2.1.1.3. Système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III (TTSS pour "*type three secretion system*") des bactéries Gram négatif a fait l'objet de nombreux travaux de recherche au cours des 15 dernières années en raison du rôle prépondérant qu'il joue dans la pathogénie de nombreux pathogènes très divers (Genin et Boucher, 2004). Ce système de sécrétion est impliqué dans la réponse d'hypersensibilité exprimée par les plantes lors de l'infection par l'agent pathogène dans le cas d'une interaction incompatible (Salmond, 1994). Il permet l'injection directe dans la cellule de la plante hôte de nombreux facteurs de virulence, encore appelés effecteurs, *via* un pilus rattaché à la membrane externe de la bactérie (Figure 17).

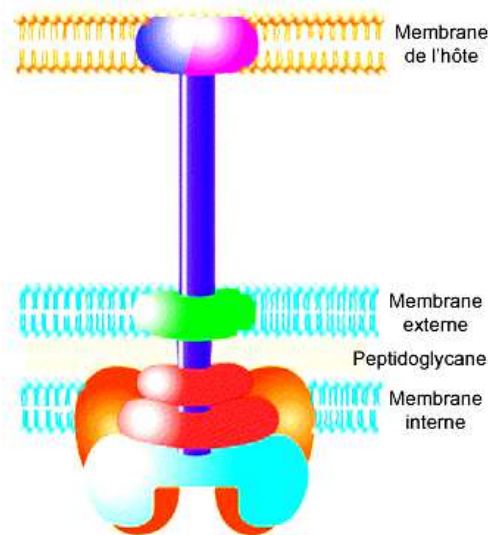


Figure 17. Illustration des différentes parties du système de sécrétion de type III : i) la composante majeure du tube qui s'étend de la base de la structure jusqu'à un pore formé dans la cellule hôte et qui permet le passage de protéines (en mauve), ii) l'anneau d'ancrage à la membrane externe (en vert), iii) les anneaux d'ancrage à la membrane interne (en rouge), iv) les protéines intégrées à la membrane interne (en orange) et v) les protéines associées à la membrane externe, (en bleu; Thomas et Finlay, 2003).

Les protéines du TTSS sont codées par un ensemble de gènes, les gènes *hrp* ("*hypersensitive response and pathogenicity*") et *hrc* ("*hrp conserved*"), qui sont or-

ganisés en groupements de gènes (généralement 20-40 kb) dans le génome de la plupart des bactéries pathogènes (Salmond, 1994). Les analyses de séquences ont permis de mettre en évidence une forte homologie dans la séquence en acides aminés de la plupart des protéines du TTSS entre différentes espèces bactériennes. Le nombre et l'organisation de ces gènes varient cependant d'une espèce à l'autre (Hueck, 1998). L'analyse du génome de certaines bactéries phytopathogènes a révélé que la totalité des gènes du TTSS pouvait être absente, notamment chez *X. fastidiosa*, *A. tumefaciens* ou encore *L. xyli subsp. xyli* (Van Sluys *et al.*, 2002). Les gènes du TTSS sont nécessaires pour une colonisation efficace de la plante hôte, et pour une croissance optimale de l'agent pathogène *in planta* (Salmond, 1994). Cependant, les gènes *hrp* ne sont pas toujours essentiels pour l'invasion de la plante hôte dans la mesure où chez certains agents pathogènes, tel que *R. solanacearum*, des mutants du TTSS conservent leur capacité à coloniser le système vasculaire de la plante, malgré une réduction de la taille des populations bactériennes (Genin et Boucher, 2004).

2.1.1.4. Système de sécrétion de type IV

Le système de sécrétion de type IV (TIVSS pour "*type IV secretion system*") permet la sécrétion de complexes nucléoprotéiques ou protéiques à travers la membrane des bactéries Gram négatif (Foulongne *et al.*, 2002). Les plus connus jouent un rôle majeur dans l'échange de plasmides (t-DNA) au cours de la conjugaison bactérienne, mais il a été montré plus récemment, chez *A. tumefaciens*, qu'ils pouvaient également jouer un rôle dans la virulence de certaines bactéries phytopathogènes (Foulongne *et al.*, 2002). L'étude des gènes de ce système de sécrétion chez *A. tumefaciens* a permis d'identifier 11 gènes, les gènes *virB*, qui sont organisés en opérons (Van Sluys *et al.*, 2002). Ces gènes codent des protéines similaires aux protéines de transfert par conjugaison, localisées essentiellement dans la membrane interne des bactéries et impliquées dans le transfert de macromolécules *via* une structure en forme de pilus, similaire au TTSS (Salmond, 1994; Van Sluys *et al.*, 2002; Figure 18). Des homologues des gènes *virB* ont été retrouvés chez la plupart des bactéries phytopathogènes, avec un nombre et une organisation variables selon l'agent pathogène (Foulongne *et al.*, 2002; Van Sluys *et al.*, 2002).

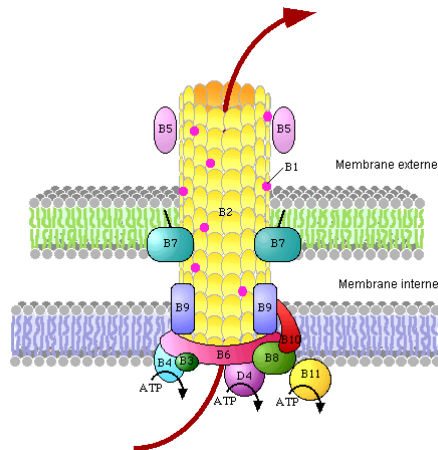


Figure 18. Illustration du système de sécrétion de type IV montrant la localisation des protéines VirB1 à VirB11 dans la double membrane bactérienne (Anonyme1, 2006).

2.1.1.5. Autres systèmes de sécrétion

Deux autres mécanismes, ou systèmes, semblent impliqués dans la sécrétion dans le milieu extérieur de facteurs potentiellement impliqués dans la virulence et les interactions avec la plante hôte chez certaines bactéries pathogènes, et notamment *R. solanacearum* (Genin et Boucher, 2004).

Le système de sécrétion de type V, ou système autotransporteur, est constitué de grosses protéines d'adhésion associées à la surface des bactéries. Ces autotransporteurs sont caractérisés par un domaine transmembranaire qui forme un pore dans la membrane externe des bactéries au travers duquel la protéine mature passe à la surface externe de la cellule (Genin et Boucher, 2004). Des gènes impliqués dans ce système autotransporteur ont aussi été identifiés chez *Xanthomonas*, *Ralstonia* et *Xylella* et ils codent des adhésines ou des protéines proches des hémagglutinines (Van Sluys *et al.*, 2002; Genin et Boucher, 2004). Ces protéines d'adhésion externes seront abordées un peu plus en détail plus loin dans ce chapitre.

Un dernier système, impliqué dans la sécrétion de larges exoprotéines (cytolysines, protéines d'acquisition du fer, quelques adhésines,...) qui jouent un rôle dans la virulence de bactéries Gram négatif a été récemment identifié. Il s'agit d'un système de sécrétion bipartite (TPS pour "*two-partner secretion system*"; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001) qui se compose de deux protéines en fusion : une protéine "de transport" localisée dans la membrane externe et une protéine "substrat" sécrétée par le transporteur. Ces protéines sont en réalité deux domaines appartenant aux exoprotéines et possédant des caractéristiques différentes. Les gènes qui codent ces deux domaines

protéiques sont généralement organisés en opérons dans le génome des bactéries (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001; Genin et Boucher, 2004).

Le rôle de ces deux derniers systèmes de sécrétion dans la virulence ou la pathogénie des bactéries est ainsi directement lié à celui des exoprotéines qu'ils sécrètent et/ou qui les composent, et qui seront présentées plus loin dans ce chapitre.

2.1.2. Les effecteurs ou éliciteurs de type III

De nombreuses bactéries phytopathogènes expriment leur pathogénie en injectant des protéines de virulence directement à l'intérieur des cellules hôtes *via* le TTSS. Ces protéines sont connues sous le nom d'effecteurs. Etant donnée la très grande hétérogénéité dans la séquence et la fonction de ces effecteurs, des approches très diverses ont été employées pour identifier les gènes codant pour eux chez les bactéries phytopathogènes. La liste des effecteurs connus à ce jour est donc très probablement incomplète, notamment en raison d'un grand nombre de candidats potentiels. Néanmoins, des études récentes menées chez *P. syringae* ont permis d'identifier des caractéristiques communes aux effecteurs bactériens, facilitant leur identification et par la même la compréhension de leurs modes d'action dans la cellule hôte (Collmer *et al.*, 2002; Greenberg et Vinatzer, 2003; Chang *et al.*, 2004). L'ensemble des effecteurs de type III sécrétés par une bactérie phytopathogène constitue le sécrétome (Greenberg et Vinatzer, 2003; Tableau 1).

Tableau 1. Effecteurs de type III récemment caractérisés chez les bactéries phytopathogènes (d'après Chang *et al.*, 2004)^x.

Effecteur	Fonction	Activité connue ?	Phénotype dans l'hôte ^y	Autres phénotypes ^z
XopD	SUMO protéase	Oui	Inconnu	ND
AvrPphB	Cystéine protéase	Oui	Clivage PBS1	ND
HopPtoD2	Tyrosine phosphatase	Oui	Croissance optimale des cellules de l'hôte	Suppression HR "burst" oxydatif chez le tabac
HrpW	Pectate liase	Liaison pectate calcium	Inconnu	ND
HopPtoM	Inconnue	NA	Formation lésions	ND
HopPtoA1	Inconnue	NA	Taille optimale des colonies bactériennes	ND
HopPtoA2	Inconnue	NA	Taille optimale des colonies bactériennes	ND
AvrPto	Inconnue	NA	Croissance optimale des cellules de l'hôte	Blocage réponse papillaire de l'hôte
AvrBs3	Inconnue	NA	Formation pustules	ND
AvrRpt2	Cystéine protéase	Non	Libération surface de feuilles, optimisation croissance, disparition RIN4	ND
AvrPtoB	Inconnue	NA	Inconnu	Blocage mort cellulaire chez le tabac et les levures
AvrB	Kinase ?	Non	Phosphorylation RIN4	Chlorose chez <i>Arabidopsis</i>

^x Abréviations : NA = non applicable; ND = non déterminé.

^y Phénotype effecteur-dépendant induit par un agent pathogène dans son hôte d'origine.

^z Phénotype effecteur-dépendant dans un hôte hétérologue, via *Agrobacterium* ou exprimé dans des plantes transgéniques. L'induction d'une réponse de résistance n'est pas incluse dans ces phénotypes.

Les effecteurs jouent un rôle prépondérant dans l'interaction entre la plante hôte et l'agent pathogène, et ils permettent dans certains cas, et indirectement, la mise en place des mécanismes de résistance chez la plante. En effet, chez les plantes résistantes (protéines R), le système de surveillance repose essentiellement sur la reconnaissance des effecteurs de type III. De cette reconnaissance résulte l'induction d'une succession de mécanismes de défense chez la plante, dont la réponse d'hyper-sensibilité (HR) et de mort cellulaire, rendant ainsi l'agent pathogène avirulent, d'où la description première des effecteurs de type III sous le nom de protéines avirulentes (ou Avr; Chang *et al.*, 2004). Trois fonctions de virulence générales ont été proposées pour les effecteurs de type III : i) la "libération" des bactéries à la surface des organes de la plante, et notamment à la surface des feuilles, comme cela a été montré expérimentalement, ii) l'acquisition des nutriments, phénomène qui n'a encore jamais été démontré expérimentalement à ce jour et iii) la suppression des défenses basales ou induites de l'hôte. Les défenses basales des plantes sont celles qui interviennent, même chez les plantes sensibles, pour limiter le développement de la maladie en absence de la réaction HR (Chang *et al.*, 2004). La plupart des données disponibles à ce jour suggèrent que les effecteurs de type III agissent directement en supprimant les réponses de défense basale de l'hôte. Les cibles cellulaires et les fonctions connues et putatives des effecteurs de type III chez *P. syringae* sont décrites de façon plus détaillée dans la Figure 19.

Dans certains cas, les effecteurs de type III sont très conservés entre les souches bactériennes d'une même espèce, voire de deux espèces différentes. Cette observation est très certainement liée au transfert horizontal des gènes codant pour ces effecteurs qui sont souvent associés à des éléments génétiques mobiles et qui possèdent les caractéristiques connues des îlots de pathogénie (Cf. § 2.3.2). Ainsi, la comparaison des membres d'une famille d'effecteurs peut révéler des domaines conservés d'acides aminés dans leurs séquences (Chang *et al.*, 2004). Malgré ces domaines très conservés, il peut exister une variation allélique importante de ces effecteurs entre souches de deux espèces différentes, voire au sein d'une même espèce bactérienne. Cette variation rend difficile la détection et la caractérisation de ces ef-

fecteurs (Greenberg et Vinatzer, 2003). Elle pourrait être associée à des mutations neutres non sélectionnées et dirigées par la "détection" d'un effecteur de type III particulier par une protéine R de l'hôte (Chang *et al.*, 2004). Cette modularité au sein d'une famille d'effecteurs doit certainement jouer un rôle important pour faciliter l'interaction avec des hôtes alternatifs ou l'adaptation à la divergence des cibles dans un même hôte (Chang *et al.*, 2004).

L'importance du rôle des effecteurs de type III dans la pathogénie des bactéries phytopathogènes est variable et dépend du type d'effecteur considéré. Ainsi, chez *P. syringae*, de larges délétions dans le génome de la souche DC3000 a permis de mettre en évidence un "locus d'effecteurs conservés", essentiel pour l'expression de la pathogénie, ainsi qu'un "locus d'effecteurs échangeables" moins conservé, et jouant un rôle mineur dans la croissance et le développement de la bactérie dans l'hôte (Collmer *et al.*, 2000). Par ailleurs, une étude très récente menée sur *X. campestris* pv. *campestris* a montré que des mutations dans huit gènes d'avirulence putatifs de cette bactérie n'avaient pas d'effet notable sur la pathogénie, mais qu'un de ces mutants affectait la spécificité de race chez cet agent pathogène (Castaneda *et al.*, 2005).

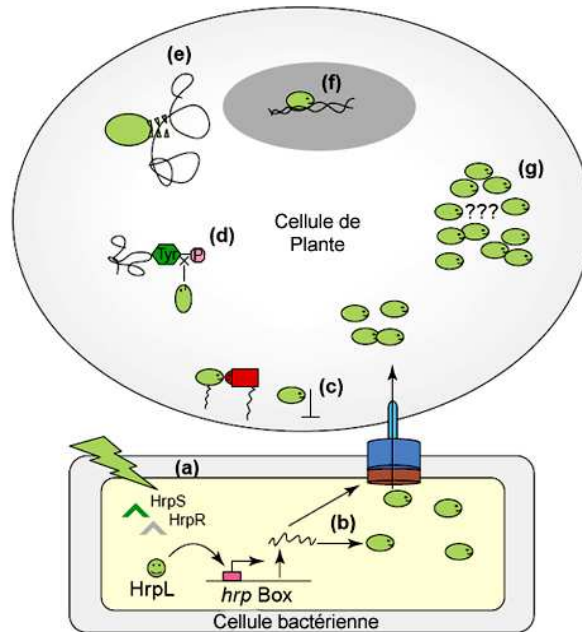


Figure 19. Illustration de la sécrétion, de la localisation dans la cellule hôte et de la fonction putative des effecteurs de type III chez *P. syringae*, sécrétés par le TTSS. Le TTSS et les effecteurs sont exprimés en réponse aux conditions environnantes dans l'apoplaste de la plante (a). Les effecteurs de type III sont ensuite injectés dans la cellule hôte *via* le TTSS (b). Les effecteurs de type III peuvent être identifiés sur la base de caractéristiques communes concernant leur régulation et leur injection : i) expression induite par le facteur sigma HrpL, ii) présence du *hrp*-box dans le promoteur, iii) séquence riche en sérine dans les 50 premiers acides aminés, et iv) injection dans l'hôte par le TTSS. Les effecteurs de type III peuvent atteindre différentes localisations cellulaires et possèdent différentes fonctions. Ils peuvent être localisés dans la membrane plasmique (c). Ici, ils pourraient interagir avec les protéines de l'hôte également associées à la membrane plasmique ou interférer avec les défenses extracellulaires. D'autres effecteurs sont localisés dans le cytoplasme (d). Ils pourraient intervenir dans la déphosphorylation de protéines de l'hôte (encore indéterminées). D'autres effecteurs pourraient agir en tant que protéases, en coupant les protéines de l'hôte (e). Certains effecteurs sont localisés dans le noyau cellulaire (f). Ces protéines pourraient réguler la transcription des gènes de l'hôte. La grande majorité des effecteurs de type III de *P. syringae* n'a pas encore été caractérisée et pourrait se localiser dans les chloroplastes, l'appareil de Golgi, les mitochondries ou d'autres localisations cellulaires (g) (Chang *et al.*, 2004).

La nature très modulaire du système Hrp/effecteurs suggère que ce système fonctionne de manière universelle dans un grand nombre de plantes hôtes potentielles avec un "réservoir" d'effecteurs changeant très fréquemment.

Au final, l'identification et la caractérisation des effecteurs de type III demande la mise en place de stratégies complexes, basées non pas sur la simple homologie de séquences nucléotidiques d'une souche ou d'une espèce bactérienne à l'autre, mais davantage sur leurs fonctions, leur localisation sur le génome, ou encore leur régulation (Greenberg et Vinatzer, 2003).

2.1.3. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire

Les enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de la paroi des cellules de la plante hôte (PCWDE pour "*plant cell-wall degrading enzymes*") sont très répandues parmi les agents phytopathogènes. Elles ont pour rôle essentiel la dégradation des polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine) et de la lignine qui composent les parois cellulaires des végétaux. Des gènes codant pour ces enzymes de dégradation extracellulaires ont été mis en évidence chez toutes les bactéries Gram négatif dont les génomes ont été séquencés récemment, en nombre et combinaisons très différents (Van Sluys *et al.*, 2002). Ces gènes codent des pectine estérases, des polygalacturonases, des xylanases, des pectate lyases, des cellulases ou encore des pectinases (Simpson *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 2002; Salanoubat *et al.*, 2002; Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). Les différences de symptômes provoqués par *X. campestris* pv. *campestris* (pourriture des tissus) et *X. axonopodis* pv. *citri* (chancres) résultent très probablement des différences dans la composition et la fonctionnalité des PCWDE entre ces deux agents pathogènes (Da Silva *et al.*, 2002). Le rôle des PCWDE ne semble pas essentiel pour l'expression de la maladie chez les bactéries, comme cela a été montré par inactivation génétique de gènes isolés codant pour ces enzymes chez *R. solanacearum* (Denny *et al.*, 1990; Huang et Allen, 2000). En revanche, leur rôle dans la contribution à la pathogénie a été démontrée clairement chez *E. chrysanthemi*, chez laquelle une pectine estérase favorise la macération des tissus (Shevchnik et Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997), ou encore chez *R. solanacearum*, chez laquelle une polygalacturonase facilite la colonisation des tissus vasculaires de l'hôte (Huang et Allen, 1997). De plus, chez *R. solanacearum*, des mutants incapables de synthétiser une ou plusieurs enzymes cellulolytiques provoquent des symptômes moins sévères que chez la souche sauvage (Liu *et al.*, 2005).

2.1.4. Les lipo-oligosaccharides et lipopolysaccharides

Les lipo-oligosaccharides (LPO) et lipopolysaccharides (LPS) sont des constituants majeurs de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Ils sont responsables de la reconnaissance antigénique et de l'induction de résistances non spécifiques aux infections bactériennes. Cependant, les LPO et LPS sont également reconnus à ce jour comme étant des facteurs importants dans la pathogénie de nombreuses

bactéries Gram négatif, en jouant un rôle prépondérant dans l'adhérence aux cellules de l'hôte (Jacques, 1996; Cao *et al.*, 2001). Les LPS sont généralement constitués d'un hétéropolysaccharide hydrophile (qui se compose d'une chaîne O-antigène spécifique et du corps oligosaccharidique) et d'un pont covalent lipidique, le lipide A (Jacques, 1996; Figure 20). Des groupements de gènes distincts impliqués dans la biosynthèse des O-antigènes sont présents dans les génomes de *X. axonopodis* pv. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris*, et présentent une très faible similarité (Da Silva *et al.*, 2002). Cette observation est cohérente avec le rôle attribué aux O-antigènes des LPS dans l'interaction spécifique souche (ou pathovar)/plante hôte impliquée dans la spécificité de la gamme d'hôtes ainsi que dans la pathogénie. Dans ce cas les LPS ont un rôle de barrière contre les toxines produites par les pathogènes (Dow *et al.*, 1995).

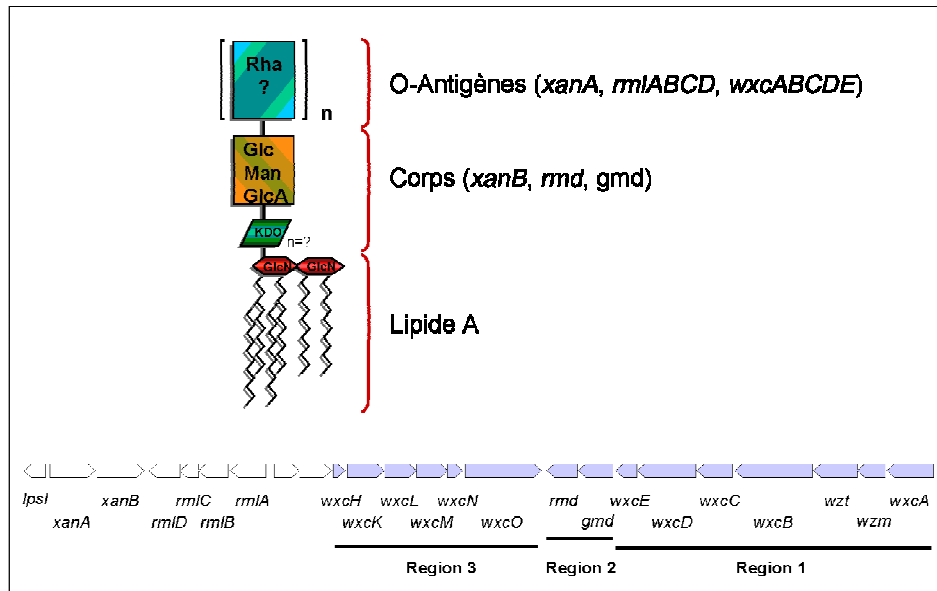


Figure 20. Structure schématique d'un lipopolysaccharide (LPS) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et région codant la biosynthèse du LPS : Rha = rhamnose ; Glc = glucose ; Man = manose ; GlcA = acide glucuronique ; KDO = Acide kéto-déoxy-octonique ; GlcN = glucosamine (Pühler et Braun, 2006).

Chez *R. solanacearum*, les gènes impliqués dans la biosynthèse des LPS sont localisés dans un groupement de gènes appelé cluster ops. Celui-ci regroupe également les gènes impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides, composés essentiels pour la pathogénie de cette bactérie (Kao et Sequeira, 1991). En effet, deux mutants de *R. solanacearum* présentant des LPS altérés ne sont pas capables de survivre dans la plante hôte et n'induisent pas de symptômes de la maladie chez

le tabac, contrairement à la souche sauvage parentale (Titarenko *et al.*, 1997). Cependant, la restauration de la biosynthèse des LPS par complémentation ne suffit pas, seule, à restaurer le phénotype virulent, indiquant par-là l'importance combinée des exopolysaccharides dans la pathogénie de cette bactérie (Titarenko *et al.*, 1997).

2.1.5. Les exopolysaccharides

La plupart des microorganismes synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Les polysaccharides excrétés à l'extérieur de la cellule sont appelés "exopolysaccharides" (EPS) ou "polysaccharides exocellulaires". Les polysaccharides peuvent être excrétés soit dans le milieu environnant, soit rester liés à la surface de la cellule sous forme de capsule. Les EPS sont extrêmement variables dans leur composition et donc dans leurs propriétés chimiques et physiques (Leigh et Coplin, 1992). Selon leur composition chimique, les EPS peuvent être classés en deux groupes : les homopolysaccharides constitués d'un seul monomère saccharidique, et les hétéropolysaccharides qui peuvent contenir plusieurs types de sucre. Le rôle majeur des EPS chez les bactéries est de nature protectrice vis-à-vis de leur environnement, et notamment pour la résistance contre la dessiccation (Ophir et Gutnick, 1994). La nature anionique de la couche d'EPS autour de la cellule peut aider à capturer des minéraux essentiels et des nutriments (Sutherland, 1997). Chez plusieurs agents phytopathogènes, et notamment chez les genres *Pseudomonas*, *Erwinia* et *Xanthomonas*, les EPS jouent également un rôle important dans la pathogénie en favorisant la survie à long terme des bactéries, en provoquant l'induction du flétrissement par blocage des membranes cellulaires chez certaines hôtes, ou encore en provoquant le détrempage ou la rétention d'eau dans le milieu intercellulaire (phénomène connu sous le nom de "*water-soaking*") qui est nécessaire à la colonisation bactérienne (Rudolph, 1993). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré le rôle essentiel des EPS dans la formation de biofilms qui sont indispensables à la survie et à l'interaction des bactéries pathogènes dans leur environnement. Plusieurs auteurs suggèrent que certains EPS sont synthétisés spécifiquement et uniquement dans ces biofilms (Sutherland, 2001).

La famille des *Xanthomonas* produit également des EPS qui sont connus sous le nom de gomme xanthane. La forte valeur commerciale du xanthane a été à l'origine

de nombreux travaux pour le décryptage des gènes et la compréhension des voies de biosynthèse de cette substance, notamment chez *X. campestris* pv. *campestris* (Harding *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1997). Dans la plante, le xanthane est principalement responsable du "water-soaking" durant la colonisation des tissus de l'hôte par *Xanthomonas* (Rudolph, 1993). La biosynthèse du xanthane dans la famille des *Xanthomonas* est codée par 12 gènes appelés *gumB* à *gumM*. Ces gènes sont regroupés en un cluster unique de 16 kb au sein duquel chaque gène possède une fonction associée à la biosynthèse ou l'export du xanthane (Harding *et al.*, 1995; Figure 21). Les études de mutations au sein de l'opéron *gum* ont permis de montrer que si le xanthane ne joue pas un rôle essentiel dans la virulence, des mutations des gènes *gum* impliqués dans les derniers stades de biosynthèse de cette molécule peuvent néanmoins se traduire par une réduction d'agressivité de *X. campestris* envers son hôte (Chou *et al.*, 1997; Katzen *et al.*, 1998).

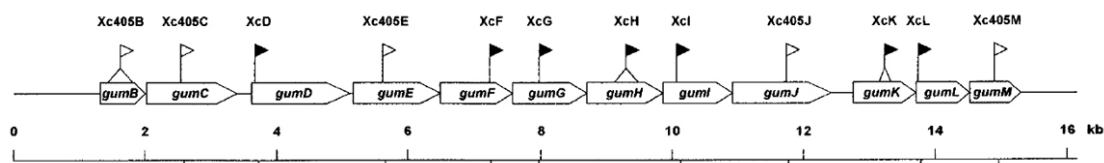


Figure 21. Carte génétique illustrant l'organisation des gènes de l'opéron *gum* chez *X. campestris* (Katzen *et al.*, 1998).

Ce groupement de gènes est extrêmement conservé entre deux espèces de *Xanthomonas* telles que *X. axonopodis* pv. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris*, avec près de 98% d'identité en acides nucléiques (Da Silva *et al.*, 2002). En revanche, lorsque ces espèces sont comparées avec la souche de *X. fastidiosa* 9a5c, les identités en acides nucléiques diminuent jusqu'à des valeurs comprises entre 65% et 83%. L'absence des gènes *gumG*, *gumI* et *gumL*, impliqués dans l'élongation et la modification du polymère de xanthane chez *X. fastidiosa* 9a5c, est à l'origine des différences de propriétés physico-chimiques et de quantité de gomme produite. Ces différences pourraient expliquer l'adaptation de cette bactérie à la transmission et au passage par un vecteur (Moreira *et al.*, 2004).

L'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du xanthane est contrôlée par la concentration du sucre dans le milieu environnant, ainsi que par les gènes du

système de régulation des facteurs de pathogénie décrits ci-après (Vojnov *et al.*, 2001).

2.1.6. Les phytohormones

Les hormones de plantes (les auxines et les cytokinines) sont impliquées à différents niveaux de la croissance et du développement des plantes, telles que l'élongation, la division cellulaire, la différenciation des tissus ou encore la dominance apicale (Costacurta et Vanderleyden, 1995). La biosynthèse et la reconnaissance des hormones bactériennes par les cellules de la plante hôte s'avèrent déterminantes pour la croissance cellulaire végétale notamment dans la stimulation de la croissance des racines, ainsi que pour la différenciation vers les deux types d'interactions, pathogénie ou symbiose (Van Sluys *et al.*, 2002). La production de phytohormones a été montrée et très étudiée chez de nombreuses bactéries phytopathogènes, notamment chez certains *Xanthomonas* et différents pathovars de *P. syringae* (Rudolph, 1993; Glickmann *et al.*, 1998). La production d'auxine, et particulièrement l'acide indole-3-acétique (IAA pour "*Indole-3-acetic acid*"; Figure 22), confère un meilleur taux de survie à *P. syringae* pv. *savastanoi* durant l'infection (Gardan *et al.*, 1992). La production d'auxine au cours de l'infection a également été suggérée chez *R. solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002).

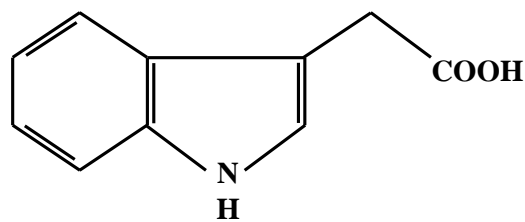


Figure 22. Structure chimique de l'acide indole-3-acétique (Anonyme2, 2006)

Chez certaines bactéries, et notamment *P. syringae* et *A. tumefaciens*, la biosynthèse des IAA à partir du L-Tryptophane (Trp) utilise la voie de biosynthèse de l'indole-3 acétamide. Cette biosynthèse implique deux enzymes, une Trp-2 monoxygénase et une indolacétamide hydrolase qui sont codées par les gènes *iaaM* et *iaaH*, respectivement. Les gènes correspondants chez *A. tumefaciens*, *tms1* et *tms2*, possèdent une identité en acides nucléiques avec les gènes de *P. syringae* de 54 et 38%, respectivement (Glickmann *et al.*, 1998). D'autres voies de biosynthèse des IAA, à partir du N-acétyltryptophane, ont été décrites chez d'autres bactéries phyto-

pathogènes, telles que *Xylella* et *Xanthomonas*, chez lesquelles aucun homologue des gènes *iaaM* ou *iaaH* n'a pu être identifié (Van Sluys *et al.*, 2002). Enfin, certaines bactéries symbiotiques, chez lesquelles aucun gène codant pour les enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'auxine n'a été identifié, ne semblent pas produire cette hormone, telles que *Sinorhizobium meliloti* ou *Mesorhizobium loti* (Costa-curta et Vanderleyden, 1995).

Les cytokinines sont des dérivés de l'adénine possédant une chaîne latérale isopentényle et sont principalement impliquées dans l'initiation de la division cellulaire. Seules *R. solanacearum* et *A. tumefaciens* possèdent les gènes isopentényle transférases, *ipt*, impliqués dans la biosynthèse de cette classe d'hormones (Van Sluys *et al.*, 2002).

2.1.7. Les phytotoxines

La grande majorité des bactéries pathogènes, et notamment les bactéries pathogènes de plantes, produisent des molécules ou des métabolites secondaires qui sont impliqués dans l'expression des symptômes et le développement de la maladie. Ces molécules, qui sont sans spécificité d'hôte, sont connues sous le nom de phytotoxines. D'un point de vue pathologique, les phytotoxines possèdent un certain nombre de caractéristiques communes qui les définissent : i) absence de virulence ou virulence très réduite chez les souches de l'agent pathogène non productrices de toxine, ii) existence d'une corrélation entre la quantité de toxine produite et la sévérité de la pathogénie, iii) production de la phytotoxine durant la phase de croissance de l'agent pathogène *in planta*, iv) possibilité de reproduire expérimentalement les symptômes *in planta* avec la phytotoxine purifiée. Les phytotoxines sont à l'origine de l'expression de la plupart des symptômes classiques (chlorose, nécrose, croissance anormale ou encore flétrissement) causés par les organismes phytopathogènes qui les synthétisent (Bender *et al.*, 1999).

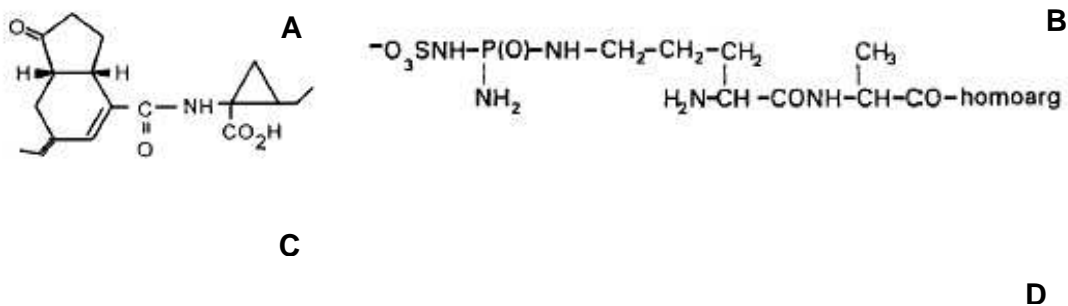
Toutes les bactéries phytopathogènes dont le génome a été séquencé à ce jour, à l'exception de *X. campestris* pv. *campestris*, possèdent dans leur génome des gènes impliqués dans la biosynthèse de la famille de toxines RTX (pour "*repeat in toxin*"). La plupart des toxines RTX, mais pas toutes, sont sécrétées par le système de sécrétion de type I (Delepelaire, 2004). La plus étudiée des toxines RTX est très certainement l'alpha-hémolysine, produite par *E. coli*, qui agit par lyse des cellules de

l'hôte en formant des pores instables et hydrophiles dans la membrane des cellules végétales (Van Sluys *et al.*, 2002). La fonction et le mode d'action de ces toxines RTX chez les bactéries phytopathogènes restent à explorer.

D'autres phytotoxines bactériennes ont été particulièrement étudiées et sont essentiellement produites par différents pathovars de *P. syringae* (Gross, 1991; Bender *et al.*, 1999). Ces phytotoxines appartiennent à quatre grandes classes qui sont caractérisées par une grande variabilité en terme d'origine, de structure et de mode d'action. Elles se différencient en deux groupes selon la nature des symptômes qu'elles provoquent dans les tissus des plantes infectées, à savoir des chloroses ou des nécroses (Gross, 1991). Les toxines responsables de chloroses sont les plus répandues parmi les pathovars de *P. syringae* et on distingue : i) la coronatine, qui appartient à la famille des polycétides, ii) la phaséolotoxine, qui fait partie d'une famille de peptides modifiés, et iii) la tabtoxine, qui appartient à la famille des β -lactames. A l'opposé, les toxines à l'origine de nécroses, la syringomycine et la syringopeptine, sont limitées au pathovar *syringae* et appartiennent à une famille de lipodepsipeptides non ribosomaux (Bender *et al.*, 1999; Figure 23).

La plupart des phytotoxines de *P. syringae* possèdent des analogies structurales avec des antibiotiques connus. Ceux-ci sont synthétisés par une voie non ribosomale impliquant des mégasynthétases modulaires de type NRPS ("non ribosomal peptide synthase") et PKS ("polyketide synthase"; Bender *et al.*, 1999).

Ces analogies structurales ont permis de proposer des schémas de biosynthèse, souvent complexes, de ces toxines et d'identifier les gènes impliqués. La plupart de ces gènes sont organisés en groupes, à l'image des six gènes impliqués dans la biosynthèse de la syringomycine qui occupent une région du génome de *P. syringae* pv. *syringae* de 37 kb (Guenzi *et al.*, 1998; Figure 24).



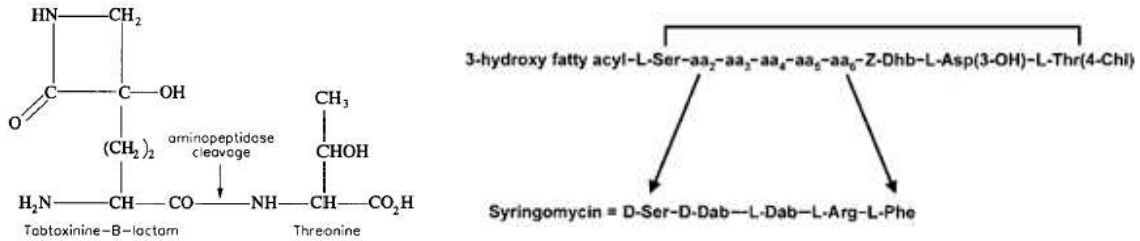


Figure 23. Structures chimiques de différentes toxines produites par *P. syringae* : A, la coronatine ; B, la phasélotoxine ; C, la tabtoxine ; et D, la syringomycine (Bender *et al.*, 1999).

De même, les huit gènes (au moins) impliqués dans la biosynthèse de la phasélotoxine occupent une région du génome de *P. syringae* pv. *phaseolicola* de 25 kb (Zhang *et al.*, 1993).

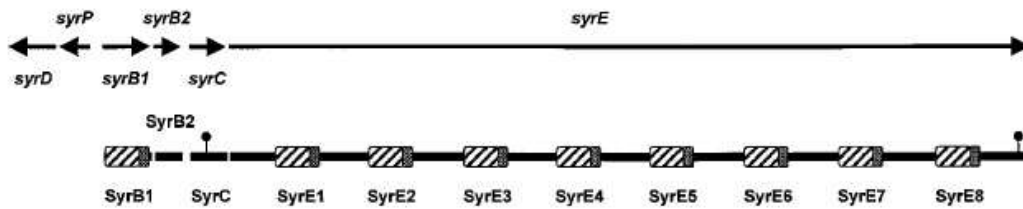


Figure 24. Carte génétique illustrant l'organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse de la syringomycine chez *P. syringae* pv. *syringae* (Bender *et al.*, 1999).

De nombreux travaux ont démontré que des délétions ou des mutations (simples ou d'insertion) au niveau de certains de ces gènes, et notamment les gènes codant pour les mégasynthétases modulaires, se traduisaient par un phénotype Tox^- de ces mutants (Gross, 1991; Bender *et al.*, 1999).

Si ces phytotoxines ne sont pas essentielles pour l'expression de la pathogénie des bactéries qui les produisent, elles fonctionnent en général comme des facteurs de virulence dont la production accentue l'intensité de la maladie. Par exemple, les phytotoxines produites par *P. syringae* peuvent contribuer au mouvement systémique de la bactérie dans la plante, à la taille des lésions, ou encore à la multiplication de l'agent pathogène dans l'hôte. Elles peuvent en outre augmenter de façon significative la virulence des différents pathovars qui les produisent (Bender *et al.*, 1999).

On rappellera ici que l'albicidine, ou le complexe de molécules albicidines produit par *X. albilineans*, appartient à la famille de toxines synthétisées par des mégasynthétases modulaires de type NRPS et PKS (Royer *et al.*, 2004). Cette toxine joue un rôle prépondérant dans l'expression des symptômes de la maladie provoquée par cet agent pathogène et il a également été montré que des mutants *Tox⁻* sont incapables d'induire les symptômes de la maladie (Birch et Patil, 1987b).

2.1.8. Les flagelles et protéines d'adhésion fibrillaires

On trouve chez les bactéries phytopathogènes deux types de structures distinctes impliquées dans la mobilité des cellules dans l'hôte ou dans le milieu extérieur : i) le flagelle, connu depuis longtemps, facilement observable en microscopie et impliqué dans la mobilité natatoire ou "*swimming motility*" et ii) le pilus de type IV (Tfp pour "*type IV pilus*"), plus récemment décrit et associé à une mobilité de type reptatoire ou "*twitching motility*" (Genin et Boucher, 2004).

Le flagelle possède une structure filamenteuse responsable de la mobilité cellulaire. Il constitue également un système d'export pour les protéines impliquées dans la biosynthèse de ce filament. Les flagelles sont des structures complexes composées d'un long filament hélicoïdal ancré dans la membrane cellulaire grâce à un "crochet" flexible et un corps basal complexe. Le filament du flagelle est constitué d'un tube creux composé d'un très grand nombre de copies d'une protéine unique, la flagelline, qui est polymérisée en une hélice complexe. Le mouvement du flagelle est contrôlé au niveau du corps basal par les différentes parties du moteur flagellaire, composé de trois protéines (MacNab, 1996; Figure 25). Les gènes codant pour les flagelles ont été identifiés chez la plupart des bactéries phytopathogènes (Tans-Kersten *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2002; Buell *et al.*, 2003; Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), à l'exception de *X. fastidiosa* (souche 9a5c; Simpson *et al.*, 2000), très probablement en raison d'une adaptation de l'agent pathogène au passage dans le vecteur ou à la vie dans le xylème (Moreira *et al.*, 2004). Chez les bactéries phytopathogènes où ils ont été identifiés, les gènes impliqués dans la biosynthèse des flagelles sont généralement organisés en opérons au sein d'un, et le plus souvent de plusieurs, groupements de gènes. Ces clusters comprennent généralement plusieurs copies du même gène, comme c'est le cas pour les gènes *tsr* chez *X. axonopodis* pv. *citri* ou les gènes *fli* chez *R. solanacearum* (Tans-Kersten *et al.*,

2001; Moreira *et al.*, 2004). Une autre caractéristique commune dans l'organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse des flagelles chez ces différents agents pathogènes est la présence au sein, ou à proximité de ces clusters, des gènes *mcp* codant pour des protéines jouant un rôle dans le processus de chimiotactisme (Moreira *et al.*, 2004).

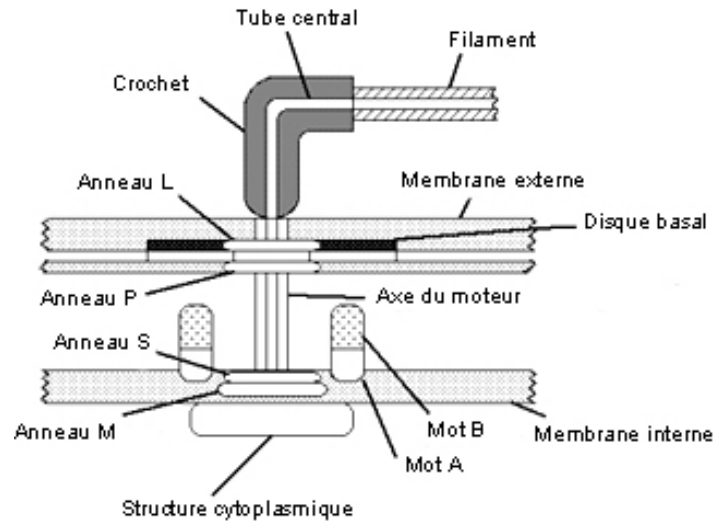


Figure 25. Structure schématique d'un flagelle de mobilité bactérienne montrant les différentes parties i) du filament (filament et tube central), ii) du crochet, iii) du corps basal (disque basal, structure cytoplasmique et anneaux M, S, P et L), et iv) du moteur (axe du moteur, Mot A et Mot B). D'après MacNab (1996).

La mobilité cellulaire est un élément important dans la capacité de colonisation de la plante hôte et la virulence de nombreuses bactéries phytopathogènes. Cependant, le rôle des flagelles dans la mobilité *in planta*, et donc l'invasion de la plante, n'est pas encore clairement élucidé (Rudolph, 1993). Une étude récente a néanmoins montré que des mutations dans certains gènes *fli* (impliqués dans la biosynthèse du flagelle) chez *R. solanacearum*, se traduisaient par une réduction significative de la capacité des mutants à provoquer la maladie chez des plants de tomate inoculés (Tans-Kersten *et al.*, 2001), soulignant ainsi la contribution de ces flagelles dans la pathogénie des bactéries qui en sont dotées.

La "*twitching motility*" est une forme de translocation des bactéries sur des surfaces solides, indépendante du flagelle, et décrite chez de nombreuses bactéries Gram négatif (Wall et Kaiser, 1999). Elle repose sur un système de pilus de type IV (Tfp)

qui est essentiellement constitué d'une unique protéine, PilA, assemblée en un polymère pour former un filament polaire flexible (Genin et Boucher, 2004). Chez les bactéries animales telle que *P. aeruginosa*, où il a été initialement décrit, le Tfp intervient dans des fonctions diverses telles que l'adhésion, l'agrégation, la formation des biofilms, le transfert de gènes horizontal, le développement multicellulaire, la pathogénie et finalement la "*twitching motility*" (Liu *et al.*, 2001). Son rôle dans la mobilité des bactéries phytopathogènes, et notamment *R. solanacearum*, a été mis en évidence plus récemment (Liu *et al.*, 2001). Les gènes impliqués dans sa biosynthèse ont également été identifiés dans les génomes de *Xylella*, de divers *Xanthomonas* et de *P. syringae* (Van Sluys *et al.*, 2002; Buell *et al.*, 2003). Chez ces différents agents pathogènes, les gènes *pil* qui sont impliqués dans la biosynthèse du Tfp sont généralement organisés en opérons au sein de groupements de gènes. Certains de ces gènes, tel que *pilA*, sont présents en copies multiples au sein de ces clusters et présentent une forte homologie entre les différents agents pathogènes (Liu *et al.*, 2001; Van Sluys *et al.*, 2002).

L'importance et le rôle du Tfp dans la pathogénie des bactéries phytopathogènes semblent variables selon les organismes considérés. Chez *R. solanacearum*, une mutation dans le gène *pilA* se traduit par une diminution de la virulence de cet agent pathogène dans les plants de tomate (Kang *et al.*, 2002). En revanche, chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* et *P. syringae* pv. *tomato*, des mutations dans le gène *fimA* (homologue de *pilA*) ont montré que celui-ci était d'avantage responsable de l'agrégation de cellule à cellule et de la protection contre le stress environnemental que de l'adhésion ou de la colonisation de la surface des plantes (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997; Roine *et al.*, 1998). Chez *X. fastidiosa*, le Tfp pourrait être responsable de la formation d'une population de bactéries agrégées, utile pour résister au courant de la sève dans le xylème et faciliter ainsi l'adhérence aux vaisseaux, conjointement à d'autres composants tels que les EPS (Van Sluys *et al.*, 2002).

2.1.9. Les protéines d'adhésion non fibrillaires

Les protéines d'adhésion non fibrillaires sécrétées dans le milieu extracellulaire ont été très largement décrites et étudiées chez les bactéries humaines et animales étant donnée leur importance dans la pathogénie de ces organismes. Ces protéines, qui appartiennent à la famille des autotransporteurs, sont sécrétées dans le milieu exté-

rieur à travers la double membrane des bactéries Gram négatif *via* le système de sécrétion de type V (Henderson et Nataro, 2001; Van Sluys *et al.*, 2002; Figure 26).

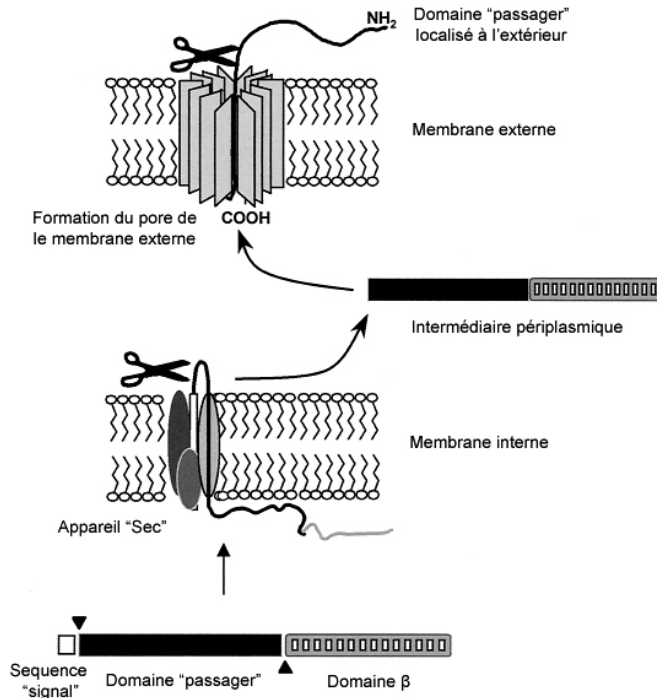


Figure 26. Représentation schématique du système de sécrétion de type V de la famille des autotransporteurs. (Henderson et Nataro, 2001)

Ce système de sécrétion est remarquable par sa simplicité et repose sur des caractéristiques communes à toutes les protéines sécrétées par ce système : i) un peptide leader amino-terminal (pour la sécrétion à travers la membrane interne), ii) la protéine sécrétée mature (ou domaine "passager"), et iii) un domaine C-terminal, qui forme un pore dans la membrane externe au travers duquel le domaine "passager" passe à la surface cellulaire. Tous ces éléments sont inclus dans une seule molécule, et la sécrétion est énergétiquement indépendante (Henderson et Nataro, 2001). Les protéines d'adhésion non fibrillaires sont également caractérisées par des régions riches en glycine et des tailles importantes, généralement supérieures à 2500 acides aminés, soit huit fois la taille moyenne des protéines bactériennes (Van Sluys *et al.*, 2002).

Trois adhésines putatives ont été mises en évidence chez *X. fastidiosa*. Elles présentent de fortes homologues avec les produits des gènes *hsf* et *hia* d'*H. influenzae* chez qui les protéines d'adhésion ont été largement étudiées (Simpson *et al.*, 2000).

Chez *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *citri* et *X. oryzae* pv. *oryzae*, des gènes homologues du gène codant pour une autre protéine d'adhésion, XadA, ont également été identifiés (Da Silva *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005).

D'autres protéines d'adhésion identifiées ou putatives, relatives aux hémagglutinines ou aux hémolysines, ont été identifiées d'abord chez *Xylella*, puis chez *R. solanacearum* et *Xanthomonas*. Les gènes codant pour ces protéines sont en nombre variable chez ces différents agents pathogènes (Van Sluys *et al.*, 2002).

Toutes ces protéines de surface doivent favoriser l'attachement et l'agrégation des bactéries à la surface des plantes, dans le xylème ou encore à l'intérieur de l'insecte vecteur (chez *Xylella*), contribuant ainsi à la pathogénie de ces bactéries. Effectivement, des mutations dans le gène *xadA* chez *X. oryzae* pv. *oryzae* se traduisent par une diminution significative de la virulence des mutants par rapport au type sauvage après l'injection de l'agent pathogène dans les feuilles ou après une inoculation épiphyte de plantes avec les mutants (Ray *et al.*, 2002). De la même manière, une mutation dans le gène *hecA*, codant pour une adhésine impliquée dans l'attachement, l'agrégation, la mort cellulaire et la virulence d' *E. chrysanthemi*, se traduit par une réduction de la virulence de la bactérie sur des jeunes plants de *Nicotiana clevelandii* (Rojas *et al.*, 2002). A l'inverse, des résultats récents ont permis de montrer que certaines protéines d'adhésion pouvaient diminuer la virulence d'une bactérie pathogène du xylème. En effet, chez *X. fastidiosa*, une mutation dans deux gènes (*hxfA* et *hxfB*) codant pour deux hémagglutinines impliquées dans la formation de biofilms se sont traduites par une virulence accrue des mutants par rapport au type sauvage. Cette virulence accrue s'est traduite par une augmentation des densités de populations bactériennes, de la vitesse de colonisation et de la mort de la plante infectée par ces mutants. Dans ce cas précis, l'hémagglutinine extracellulaire de *X. fastidiosa* joue un rôle dans l'atténuation de la virulence et probablement le retard de la mort de l'hôte (Guilhabert et Kirkpatrick, 2005).

2.2. La régulation de la pathogénie

L'expression (activation ou répression) de nombreux gènes codant pour les facteurs de pathogénie est très généralement sous le contrôle d'autres gènes, connus sous le nom de régulateurs. Ces gènes sont très fréquemment localisés au sein, ou à proximité, des groupements de gènes impliqués dans la pathogénie et codent des

régulateurs transcriptionnels contrôlant l'expression d'un, voire plusieurs gènes simultanément (effet pléiotropique; Hacker et Kaper, 2000; Cao *et al.*, 2001). Leur expression est elle-même dépendante de différents signaux tels que la température, le pH, l'osmolarité, l'oxygène, la concentration en ions ou encore d'autres molécules présentes dans l'environnement des bactéries. Le nombre, ainsi que la diversité de ces facteurs de régulation, ne permettent pas d'en dresser une liste exhaustive. Cependant, deux systèmes de régulation particuliers jouent un rôle prépondérant dans la régulation des gènes de pathogénie des bactéries phytopathogènes et sont présentés plus en détail ci-après.

2.2.1. Le quorum-sensing

Le quorum-sensing (QS) joue un rôle clé dans la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la pathogénie de nombreuses bactéries pathogènes des animaux et des plantes (Cao *et al.*, 2001; Fuqua *et al.*, 2001; Whitehead *et al.*, 2001; Withers *et al.*, 2001; Von Bodman *et al.*, 2003). Initialement appelé autoinduction chez *Vibrio fischeri* (Nealson, 1977), il met en jeu un système de communication de cellule à cellule. Le QS est dépendant de la densité de population bactérienne et, par son intermédiaire, les bactéries régulent l'expression d'un grand nombre de gènes cibles grâce à la sécrétion et la détection dans le milieu environnant de petites molécules "signal", appelés autoinducteurs. Ce système a été mis en évidence et très largement décrit chez de nombreuses bactéries phytopathogènes appartenant au genre *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* ou *Xanthomonas*, où il intervient dans la régulation de différents facteurs de pathogénie (Von Bodman *et al.*, 2003). Le QS implique l'échange de molécules "signal" diffusibles de faible poids moléculaire entre les membres d'une population localisée. Si la production du signal par la population bactérienne est plus importante que sa perte par diffusion ou inactivation, le signal s'accumule jusqu'à un niveau seuil qui permet l'activation de récepteurs protéiques spécifiques. Ceux-ci, à leur tour, peuvent entraîner des changements divers dans l'expression des gènes des membres de la population. Un pré requis important pour l'établissement du QS est donc une croissance des cellules bactériennes dans une grande proximité, tel que dans un biofilm, ou lorsque celles-ci sont localisées dans un environnement confiné ou clos (Von Bodman *et al.*, 2003). Chez *V. fischeri*, où il a été décrit pour la première fois, le QS est impliqué dans l'activation par signal des gènes de bioluminescence, ou gènes *lux*. Les molécules impliquées dans ce

système sont synthétisées par une protéine synthase, LuxI, et diffusent librement à travers la membrane des bactéries. Elles interagissent dans le cytoplasme avec une protéine récepteur, luxR, pour former un complexe actif afin pour le promoteur des gènes *lux* (Figure 27).

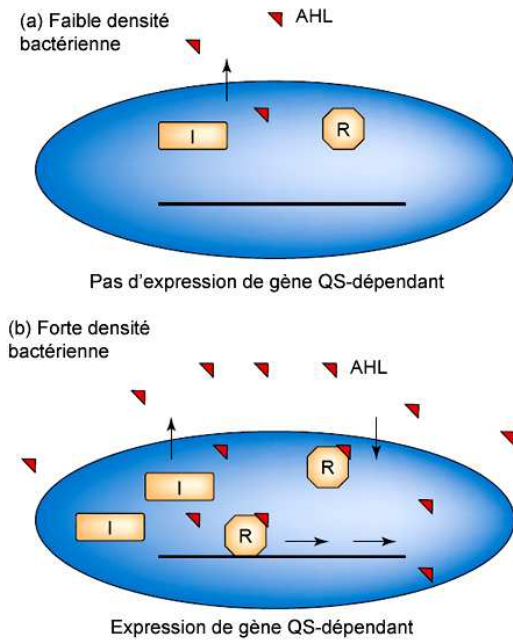


Figure 27. Fonctionnement schématisé du système de régulation par quorum sensing (QS). En faible densité bactérienne, l'AHL synthase, une protéine de type LuxI (I) produit un niveau basal de molécules AHL. En forte densité bactérienne, l'AHL s'accumule dans le milieu et se lie à un facteur de transcription AHL-dépendant, une protéine de type LuxR (R), qui régule l'activation de gènes QS-dépendant. D'après Zhang (2003).

La très grande majorité des molécules "signal" impliquées dans le QS appartiennent à la famille des *N*-acylhomoserine lactones (AHL), et diffèrent par la taille de leur chaîne latérale *N*-liée, la nature de la substitution à la position carbone 3C et la présence ou l'absence d'un ou de plusieurs ponts insaturés entre les chaînes latérales (Brelles-Marino et Bedmar, 2001). Certaines bactéries ne produisent qu'un seul type d'AHL détectable alors que d'autres, telle que *P. aeruginosa*, peuvent en revanche produire plusieurs molécules possédant toutes une activité détectable (Cha *et al.*, 1998). Les AHL sont issues de deux voies de biosynthèse faisant intervenir différentes protéines et enzymes (Figure 28).

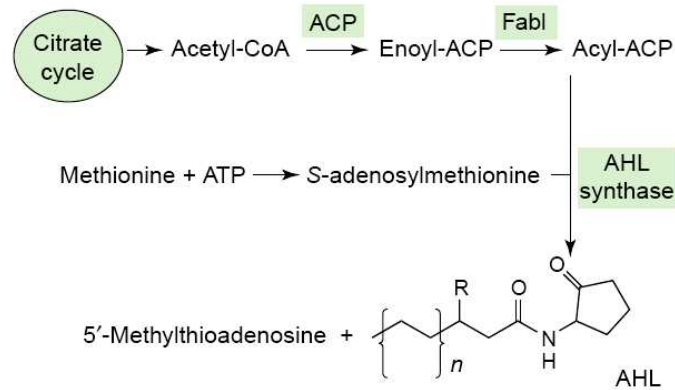


Figure 28. Voie de biosynthèse et structure chimique des AHL. La chaîne "acyle" est synthétisée par la voie de biosynthèse classique des acides gras et l'homosérine lactone est dérivée de la S-adenosylméthionine. Quelques protéines et enzymes sont impliquées dans cette voie de biosynthèse, telles que des protéines de transport des acyles (ou ACP pour "acyl carrier protein"), une énoyle-ACP réductase FabI et une AHL synthase. FabI est responsable de la réduction de l'énoyle-ACP en acyle-ACP, qui réagit avec la S-adenosylméthionine, catalysée par l'AHL-synthase, pour produire les AHL (Zhang, 2003).

Bien que les gènes "cibles" dépendant du système de régulation du QS peuvent être très différents d'une espèce bactérienne à l'autre, les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du couple autoinducteur/régulateur transcriptionnel sont, quant à eux, très conservés et regroupent des homologues des gènes *luxR* et *luxI* chez plusieurs espèces de bactéries phytopathogènes, tels que *tral/traR* chez *A. tumefaciens*; *expl/expR*, *carl/carR*, *esall/esaR* ou encore *eagl/eagR* chez différentes espèces du genre *Erwinia* (Cao *et al.*, 2001). L'identification et la caractérisation de ces gènes a permis la synthèse de différentes souches bactériennes "AHL rapporteur" utilisées dans des bio essais et capables de détecter la production d'une grande variété de molécules AHL (qui diffèrent par la longueur de leur chaîne latérale et la nature de la substitution à la position carbone C3) chez différentes bactéries (Cha *et al.*, 1998; Brelles-Marino et Bedmar, 2001).

L'utilisation de mutants pour les gènes impliqués dans le QS a permis de démontrer le rôle essentiel de ce système dans la régulation de nombreuses et diverses fonctions telles que la bioluminescence, la mobilité, la formation de biofilms, la division cellulaire, la survie au stress, le transfert d'ADN horizontal ou encore la synthèse de facteurs de pathogénie (Cao *et al.*, 2001; Von Bodman *et al.*, 2003). Chez les bactéries phytopathogènes, et notamment *Erwinia* spp., l'expression de divers facteurs de

pathogénie, tels que la synthèse d'EPS, d'antibiotiques ou encore d'enzymes extracellulaires, est dépendante du QS (Pirhonen *et al.*, 1993; McGowan *et al.*, 1995; Reverchon *et al.*, 1998). Un autre type de molécule, l'acide 3-hydroxypalmitique méthylester, également dérivée des acides gras et impliquée dans le QS a été identifiée chez *R. solanacearum* (Flavier *et al.*, 1997).

Chez *Xanthomonas*, en revanche, la production d'AHL n'a pu être détectée que chez quelques isolats bactériens, et en très faible quantité (Cha *et al.*, 1998). Chez ce genre bactérien, comme chez *Xylella*, d'autres gènes ont été identifiés, les gènes *rpf*, qui jouent un rôle dans la régulation de certains facteurs de pathogénie et qui sont décrits ci-après.

2.2.2. Les régulateurs des fonctions de pathogénie

Un autre système de régulation est basé sur une famille de molécules "signal" de faible poids moléculaire qui sont appelées "facteur signal diffusible" (ou DSF pour "diffusible signal factor"). Il a été identifié chez plusieurs bactéries phytopathogènes, et notamment chez *Xanthomonas* et *Xylella* (Barber *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2004). Les DSF constituent une nouvelle famille de molécules "signal" dérivées des acides gras et qui se différencient essentiellement des AHL par la présence d'un double pont insaturé en position α,β (Wang *et al.*, 2004). La synthèse des molécules DSF est sous le contrôle d'un ensemble de gènes, appelés gènes *rpf*, qui codent des régulateurs des fonctions de pathogénie (ou RPF pour "regulation pathogenicity factor"). Neuf gènes *rpf* (*A*, *B*, *F*, *C*, *H*, *G*, *D*, *I*, et *E*) ont été identifiés chez *X. campestris* pv. *campestris* (Tang *et al.*, 1991; Dow *et al.*, 2000). Des homologues de ces gènes *rpf*, à l'exception des gènes *rpfH* et/ou *rpfI*, ont été mis en évidence chez *X. fastidiosa* et d'autres *Xanthomonas* dont le génome a été séquencé plus récemment (Dow et Daniels, 2000; Da Silva *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005).

Chez *Xanthomonas* et *Xylella*, les gènes *rpf* contrôlent l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS et des enzymes extracellulaires (Tang *et al.*, 1991), avec des effets variables sur la pathogénie de ces bactéries. Ainsi, chez *X. campestris* pv. *campestris*, des mutations dans les gènes *rpfE* et *rpfC* se traduisent par une modification de la production de différentes enzymes extracellulaires (protéase, endoglucanase et polygalacturonase), sans modification de la pathogénie de cette bactérie (Dow *et al.*, 2000). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, en revanche, une muta-

tion du gène *rpfC* affecte la production d'EPS et la virulence de cet agent pathogène sur le riz (Tang *et al.*, 1996). Chez *X. fastidiosa*, une mutation du gène *rpfF* bloque la formation de biofilm chez le vecteur mais n'a aucun effet sur la formation de biofilm dans la plante (Newman *et al.*, 2004).

Récemment, des homologues des gènes *rpf* ont également été décrits chez certaines bactéries Gram positif et un champignon pathogène, *Candida albicans*, suggérant la nature très conservée de ce système de communication de cellule à cellule chez les procaryotes et les eucaryotes (Wang *et al.*, 2004).

2.2.3. La régulation épigénétique

La régulation épigénétique regroupe l'ensemble des systèmes de régulation de nature non génétique. Elle est évoquée dans ce chapitre en raison du rôle important qu'elle peut jouer dans la régulation de l'expression des gènes et les variations phénotypiques de nombreux caractères chez les eucaryotes et les procaryotes.

Le terme épigénèse a été créé par Harvey en 1651 pour décrire la formation progressive des différentes parties de l'embryon. En génétique moderne, le terme épigénétique définit les modifications du phénotype qui sont hérissables en dépit du fait qu'elles ne sont pas dues à des modifications génétiques (mutations ou remaniements du génome). Elles peuvent apparaître à la suite d'un signal de l'environnement, mais elles ne disparaissent pas avec ce signal, comme cela a été montré initialement suite à l'expérience de Novick et Wiener (1957) décrivant l'activation de l'opéron lactose chez la bactérie pathogène *E. coli*. Les modifications épigénétiques ont par la suite fait l'objet de nombreux travaux chez les organismes supérieurs, et particulièrement chez les mammifères et les plantes, chez lesquels elles sont notamment responsables de l'extinction d'un des deux chromosomes X dans les cellules de mammifères femelles (Panning et Jaenisch, 1998) ou de l'inactivation de l'expression de transgènes dans les plantes transgéniques (Matzke *et al.*, 2000). Ces dernières années, les nombreuses études menées chez les microorganismes, et notamment chez les bactéries, ont permis de mettre en évidence des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation épigénétique :

La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le mieux décrit chez les bactéries et elle a fait l'objet de plusieurs synthèses bibliographiques (Casadesus et

Torreblanca, 1996; Marinus, 1996; Reisenauer *et al.*, 1999). La méthylation de l'ADN intervient aux positions C-5 et N-4 de la cytosine et à la position N-6 de l'adénine, et elle est catalysée par des enzymes connues sous le nom d'ADN méthyltransférases (Palmer et Marinus, 1994). Historiquement, la méthylation de l'ADN a été associée à des systèmes de restriction-modification de l'ADN importants pour la protection des cellules contre les ADN étrangers tels que les transposons et les ADN viraux (Meselson *et al.*, 1972; Kobayashi *et al.*, 1999). Les systèmes de restriction-modification contiennent des ADN méthylases qui protègent les séquences de l'ADN de l'hôte contre la restriction des enzymes correspondantes qui digèrent les ADN étrangers. Certaines méthyltransférases, dont l'ADN adénine méthylase (Dam), l'ADN cytosine méthylase (Dcm) et la méthylase de régulation de cycle de la cellule (CcrM), ne possèdent pas d'enzymes de restriction qui leurs sont associées (Reisenauer *et al.*, 1999). Ces méthyltransférases participent donc aux événements de régulation de la cellule, et notamment la régulation de la virulence chez les bactéries (Low *et al.*, 2001). La méthylation de l'ADN, et particulièrement la méthylation de l'adénine, peut altérer les interactions entre l'ADN avec les protéines de régulation, par un effet stérique direct ou un effet indirect sur la structure de l'ADN (Low *et al.*, 2001). Par ailleurs, des altérations des niveaux de l'adénine méthylase modifient la virulence de certaines bactéries pathogènes, dont *Salmonella* spp., *Yersinia pseudotuberculosis* et *Vibrio cholerae*, en contrôlant l'expression d'un certain nombre de gènes de virulence (Low *et al.*, 2001). Il a été montré très récemment que la virulence des mutants Dam⁻ d'*Erwinia chrysanthemi* était très réduite sur deux de ses hôtes, les violettes d'Afrique et la laitue (Yang et Keen, données non publiées; Low *et al.*, 2001), mettant en évidence le rôle de la méthylation de l'ADN chez les bactéries phytopathogènes. Par ailleurs, la méthylation de l'ADN entraîne des modifications des histones et de la condensation de la chromatine, qui est un autre mécanisme impliqué dans la régulation épigénétique décrit ci-après.

La modification covalente des histones est un autre facteur clef de la régulation de l'expression des gènes qui a été très étudié chez les eucaryotes. En effet, les protéines histones, qui conditionnent le "paquetage" de l'ADN, sont soumises à de nombreuses modifications post-transcriptionnelles au niveau de leurs extrémités aminoterminales, et en particulier l'acétylation et la méthylation des résidus lysine et arginine, qui peuvent modifier l'assemblage de l'hétérochromatine (chromatine non ac-

tive) chez les eucaryotes (Rice et Allis, 2001). La modification de la structure de l'hétérochromatine a des répercussions sur de nombreux processus cellulaires (transcription, réparation, recombinaison, ségrégation des chromosomes,...) qui peuvent jouer un rôle dans les mécanismes de régulation épigénétiques.

Chez les procaryotes, et les bactéries en particulier, l'ADN se trouve sous la forme d'une structure compacte appelée nucléoïde. La forme et la taille de cette structure sont conditionnées par un certain nombre de protéines d'architecture ou d'enroulement associées au nucléoïde parmi lesquelles on distingue les protéines H-NS (pour "*histone-like nucleoid structuring protein*"), les protéines HU (pour "*heat unstable protein*"; Varshavsky *et al.*, 1977) et, plus récemment identifiées, les Fis (pour "*factor for inversion stimulation*") et les IHF (pour "*integration host factor*"; Murphy et Zimmerman, 1997). La majorité de ces protéines ont été identifiées il y a plus de 25 ans, mais leur rôle dans l'organisation et la compaction de la chromatine des bactéries n'a été étudié que très récemment. Un rôle de ces protéines dans le repliement de l'ADN fonctionnellement analogue à celui du remodelage de la chromatine des eucaryotes a été proposé (Dame, 2005). Ces protéines pourraient donc aussi intervenir dans la régulation de l'expression des gènes par modification des sites de reconnaissance de l'ARN polymérase, connue sous le nom de *silencing* (Rine, 1999). On peut alors aisément imaginer que la méthylation et/ou l'acétylation des protéines associées au nucléoïde chez les bactéries joue un rôle dans la régulation épigénétique de nombreux facteurs chez les bactéries, y compris les facteurs de virulence.

L'ARN *silencing* est apparu au cours des dernières années comme un vecteur incontournable de la régulation épigénétique chez les plantes et les champignons (Matzke *et al.*, 2001a). Ce mécanisme met en jeu de petites séquences d'ARN non codantes, les miRNA (pour "*micro RNA*") et les siRNA (pour "*small interfering RNA*"). Les siRNA interviennent dans l'inhibition d'ADN étrangers comme les rétrovirus ou les rétrotransposons endogènes. Ils forment des duplex avec l'ARN messager cible et ces duplex guident la dégradation post-transcriptionnelle de l'ARN messager cible. Chez les plantes, ils induisent la méthylation des séquences d'ADN homologues qui sont à l'origine des effets de gène *silencing* à travers les effets de la modification de la chromatine décrits précédemment (Matzke *et al.*, 2001b; Gendrel et Colot, 2005). Bien que les aspects nucléaires de l'ARN *silencing* aient été principalement décrits

chez les plantes, on peut émettre l'hypothèse que des phénomènes similaires de gène *silencing*, basés sur la liaison ADN-ARN ou les modifications de la structure des protéines associés au nucléoïde, ont lieu chez les bactéries, et notamment les bactéries phytopathogènes.

2.3. L'évolution de la pathogénie

Les génomes des microorganismes et notamment des bactéries pathogènes de plantes subissent une évolution permanente par laquelle de nouveaux gènes peuvent être acquis ou des gènes déjà existants sont perdus par mutation ou délétion (Hacker et Kaper, 2000; Ochman et Moran, 2001). Ces changements, lorsqu'ils concernent des facteurs impliqués dans la pathogénie, permettent, dans certaines circonstances, une adaptation rapide de ces bactéries aux évolutions de l'environnement ou une adaptation à de nouveaux hôtes (Metzgar et Wills, 2000). Ce dernier paragraphe a pour objectif de présenter de façon succincte les principales caractéristiques des événements génétiques associés à l'évolution de la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes.

2.3.1. Les mutations et l'inactivation des gènes de virulence

Chez les bactéries phytopathogènes, certaines mutations peuvent servir à leur évolution adaptative, notamment dans le cas des facteurs d'avirulence (Ochman et Moran, 2001). Les modèles d'évolution prédisent qu'en l'absence de fonction de virulence du facteur Avr, la pression de sélection sur l'agent pathogène, exercée par la population végétale qui possède le gène de résistance (R) correspondant, se traduit par la sélection et le maintien de la forme mutée du gène *avr* (Genin et Boucher, 2004). L'analyse du génome de *R. solanacearum*, par exemple, a permis de révéler la présence de formes inactivées de gènes de virulence potentiels qui ont été perdus par mutation, délétion ou ont été inactivés de façon transitoire (Genin et Boucher, 2004).

Ainsi, un autre événement permettant une adaptation rapide des bactéries à leur environnement est l'inactivation réversible (ou transitoire) de gènes, y compris les gènes de pathogénie, selon un modèle on/off (Genin et Boucher, 2004). Cet événement est parfaitement illustré par le mécanisme qui permet la régulation de la variation de phase chez *R. solanacearum*, grâce à l'altération du gène *phcA*. Ce gène, qui

code un régulateur transcriptionnel, contrôle certains processus physiologiques majeurs (dont la pathogénie) au cours du cycle de vie de la bactérie. L'activité de PhcA est sous le contrôle d'une molécule "signal" atypique du QS, mais la conversion phénotypique de la forme sauvage pathogène vers la forme altérée, très mobile et non pathogène, peut-être la conséquence d'un grand nombre d'évènements de mutations à l'intérieur du gène *phcA*, dont l'insertion d'éléments transposables ou de séquences répétées en tandem (Poussier *et al.*, 2003). Dans certains cas, des évènements de réversion de la forme non pathogène vers la forme pathogène sont détectés dans la plante, suggérant ainsi que le taux de mutation phénotypique peut être modulé par des facteurs de l'environnement (Poussier *et al.*, 2003). Très récemment, il a été montré que la différence de virulence affectant la spécificité de race chez *P. syringae* pv. *phaseolicola* était liée à l'absence d'un gène d'avirulence (*avrPphF*) résultant d'un évènement de délétion d'un fragment de petite taille (9,5 kb), associé à la présence d'un élément transposable chimérique au sein d'un îlot de pathogénie localisé dans un plasmide (Rivas *et al.*, 2005).

2.3.2. Le transfert de gènes horizontal et les îlots de pathogénie

Le transfert de gènes horizontal, au même titre que les évènements de mutation, délétion, ou insertion d'éléments transposables, permet une modification rapide du phénotype des bactéries. Il intervient *via* les transposons, les intégrons, les plasmides ou encore les prophages de certains virus qui peuvent porter des gènes codant pour une adaptation écologique spécifique ou pour de nouveaux facteurs associés à la pathogénie ou l'interaction hôte-bactérie (Van Sluys *et al.*, 2002). La plupart des gènes associés à la pathogénie que nous avons décrits précédemment sont organisés en groupements de gènes localisés dans des régions distinctes du génome et appelées îlots de pathogénie (ou PAI pour "*pathogenicity islands*"). Ces derniers sont généralement associés à des éléments génétiques mobiles et peuvent avoir été acquis par transfert de gènes horizontal (Hacker et Kaper, 2000). Les PAI associées au transfert de gènes horizontal sont facilement identifiables au sein du génome des bactéries et possèdent souvent une ou plusieurs des caractéristiques suivantes : i) une différence dans la teneur en G+C (si l'ADN du donneur et du receveur possèdent une différence de teneur en G+C) et dans l'utilisation des codons, ii) une présence de petites séquences répétées en bordure des PAI, iii) une association avec des gènes de transfert d'ARN, et enfin iv) une association avec des gènes cryptiques ou fonc-

tionnels codant pour des facteurs de mobilité, tels que des intégrases, des transposases ou des éléments d'insertion de séquence. Enfin, les PAI constituent souvent des régions d'ADN instables (Hacker et Kaper, 2000).

Des séquences d'ADN caractéristiques des PAI ont été décrites chez de nombreuses bactéries phytopathogènes des genres *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* ou encore *Xanthomonas* (Van Sluys *et al.*, 2002). Elles comprennent le plus souvent des gènes impliqués dans les mécanismes généraux de la pathogénie, tels que les gènes codant pour les systèmes de sécrétion, mais également des gènes spécifiques d'espèces, de pathovars, voire de souches. Ces caractéristiques sont certainement, en partie du moins, liées aux différences phénotypiques observées entre les différents pathogènes de plantes.

Chez *X. albilineans*, les travaux menés à ce jour sur la composante essentielle du pouvoir pathogène, l'albicidine, ont conduit à l'identification des gènes impliqués dans la biosynthèse de cette toxine. En revanche, aucune étude n'a encore permis d'identifier ou de montrer le rôle d'autres gènes impliqués dans la pathogénie de cette bactérie. Cette synthèse bibliographique a pour objectif de fournir les éléments de base pour la recherche et l'étude de gènes impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans* qui ont fait l'objet de la deuxième partie de cette étude.

Mis à part le contexte scientifique visant à l'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques régissant l'interaction entre *X. albilineans* et sa plante hôte, la canne à sucre, cette étude se justifie également par un intérêt agronomique, et économique, visant au contrôle durable de la maladie de l'échaudure des feuilles en Guadeloupe. En effet, dans cette région, comme dans d'autres régions du monde, une recrudescence de la maladie a été observée depuis plusieurs années. Des travaux de recherche basés essentiellement sur l'étude de la diversité de *X. albilineans* ont été réalisés, afin i) de comprendre l'origine de cette recrudescence et ii), à terme, d'adapter les outils de diagnostic et de maintien du contrôle de la maladie de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Une description plus détaillée du contexte scientifique et agronomique à l'origine de cette étude est fournie dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

CHAPITRE II.

Contexte scientifique et enjeu agronomique de l'étude

CHAPITRE II. Contexte scientifique et enjeu agronomique de l'étude

Au cours des deux dernières décennies, une recrudescence ainsi que de nouvelles épidémies de l'échaudure des feuilles ont été signalées dans plusieurs aires de production de la canne à sucre. Dans les zones géographiques initialement indemnes de la maladie, telles que le Guatemala (Ovalle *et al.*, 1995), la Louisiane (Grisham *et al.*, 1993), Taiwan (Chen *et al.*, 1993) ou encore le Texas (Isakeit et Irvine, 1995), les nouvelles épidémies ont pu être attribuées à une première introduction de l'agent pathogène associée à la culture de cultivars de canne à sucre sensibles à l'échaudure des feuilles. En revanche, dans d'autres zones géographiques (Cuba, Floride, Guadeloupe ou Maurice) où la maladie était déjà présente depuis plusieurs années, et où elle était sous contrôle notamment grâce à la culture de variétés résistantes, l'apparition d'une nouvelle souche de l'agent pathogène, par mutation ou importation, a été suggérée (Comstock et Shine, 1992; Rott *et al.*, 1994b; Autrey *et al.*, 1995b; Diaz *et al.*, 2001). L'existence d'une variation de la pathogénie au sein de l'espèce *X. albilineans* a déjà été évoquée en introduction de ce manuscrit de thèse. Pour renforcer cette hypothèse, la recrudescence de l'échaudure des feuilles dans certaines zones géographiques a coïncidé avec la détection d'une contamination par voie aérienne et la capacité de survie épiphyte de *X. albilineans*, suggérant ainsi une évolution du pouvoir pathogène au sein de l'espèce. L'étude de diversité génétique menée par Davis *et al.* (1997) avec 218 souches de *X. albilineans* originaires de 31 zones géographiques distinctes, et utilisant la technique RFLP-PFGE, a permis de montrer que l'ensemble des souches de l'agent pathogène isolées dans des zones géographiques liées à une recrudescence ou à de nouvelles épidémies de la maladie appartenaient à un seul groupe génétique, PFGE B (Davis *et al.*, 1997). Ce groupe comprenait par ailleurs plusieurs variants génétiques (ou haplotypes) de *X. albilineans*. De plus, un essai réalisé sous serre avec des souches bactériennes du groupe PFGE B et des souches d'un autre groupe génétique (PFGE A) et isolées bien avant la recrudescence de la maladie, a permis de conforter l'hypothèse d'une plus grande capacité des souches du groupe PFGE B à se propager par voie aérienne (Davis *et al.*, 1997). L'évolution du pouvoir pathogène de *X. albilineans* asso-

ciée à la capacité de dissémination aérienne de la bactérie, serait ainsi liée à une variation génétique intraspécifique de cet agent pathogène. A ce jour, la relation entre la variabilité génétique observée et la variabilité, ou l'évolution phénotypique, en terme de pouvoir pathogène, demeure cependant inexpliquée.

L'albicidine joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans*, notamment dans la production des symptômes foliaires de la maladie grâce à son activité phytotoxique. Elle pourrait aussi être impliquée dans la capacité de la bactérie à coloniser la tige de canne à sucre, grâce à son activité antibiotique. L'origine de la variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*, en terme de sévérité de la maladie, d'intensité de colonisation de la tige de canne à sucre ou encore de mode de transmission de l'agent pathogène, demeure inconnue. Parmi les techniques décrites précédemment pour l'exploration et la caractérisation des bases génétiques du pouvoir pathogène chez les bactéries phytopathogènes, la production de mutants d'insertion pour l'étude d'un caractère donné s'avère être une technique efficace (Titarenko *et al.*, 1997; Dow *et al.*, 2000). Elle a été utilisée avec succès chez *X. albilineans* pour identifier les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine (Rott *et al.*, 1996). Cette procédure a été d'autant plus efficace qu'un bio essai *in vitro* a permis de cribler rapidement et facilement un grand nombre de mutants non producteurs d'albicidine. Le séquençage et le clonage récents de l'ensemble des gènes impliqués, ou potentiellement impliqués, dans la biosynthèse de l'albicidine constituent un nouvel outil extrêmement intéressant et très facilement utilisable pour étudier la variation de ces gènes associée à la variation du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. A partir de cet outil et des connaissances scientifiques sur le pouvoir pathogène de *X. albilineans*, un certain nombre d'objectifs ont pu être définis qui ont fait l'objet des premiers travaux de cette thèse et qui sont présentés dans le chapitre III intitulé "Variation des gènes de biosynthèse de l'albicidine et variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*".

Par ailleurs, en Guadeloupe comme dans la majorité des aires de culture de la canne à sucre, les conséquences économiques de l'échaudure des feuilles peuvent être très graves lorsque des variétés sensibles sont atteintes : diminution de rendement, perte de clones prometteurs en cours de sélection, perte de géniteurs utilisés pour la création variétale,... Les seuls moyens de lutte déjà évoqués sont préventifs et impliquent une protection des frontières, des techniques de multiplication et de

distribution des plants parfaitement contrôlées ainsi qu'une sélection sévère des nouvelles variétés conduisant à la plantation de variétés résistantes. Or, la durabilité de la résistance est très souvent limitée par la variabilité de l'agent pathogène et son évolution. La connaissance de cette variabilité en Guadeloupe est donc essentielle pour une sélection efficace de variétés de canne à sucre résistantes à long terme. De plus, la comparaison de la variabilité de *X. albilineans* en Guadeloupe à celle de l'agent pathogène dans d'autres zones géographiques (dont la Caraïbe) permettra d'appréhender les risques liés à l'apparition éventuelle ou l'introduction accidentelle de nouvelles souches de l'agent pathogène en Guadeloupe. Pour cela, l'identification de marqueurs génétiques associés au pouvoir pathogène de cette bactérie a pour objectif le développement d'outils de diagnostics moléculaires fiables et peu onéreux pouvant venir en appui au schéma de sélection variétal, ainsi qu'à la veille phytosanitaire en Guadeloupe. Dans la deuxième partie de cette étude, plusieurs techniques ont été mises en place pour comprendre l'origine de la variation du pouvoir pathogène de *X. albilineans* en Guadeloupe et tenter d'identifier des marqueurs génétiques ou physiologiques associés à cette variabilité. Ces travaux sont présentés dans le chapitre IV du manuscrit intitulé "Vers l'identification de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans* en Guadeloupe".

CHAPITRE III.

Variation des gènes de biosynthèse de l'albicidine et variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*

CHAPITRE III. Variation des gènes de biosynthèse de l'albicidine et variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*

L'objectif des travaux qui font l'objet de ce chapitre était d'étudier la relation entre la variation des gènes de biosynthèse de l'albicidine, la variation de composantes du pouvoir pathogène de *X. albilineans* et enfin la variation de la quantité d'albicidine produite *in vitro*.

Les essais et expérimentations qui ont été mis en place ont consisté à i) explorer et caractériser la variabilité des gènes de biosynthèse de l'albicidine au sein d'une collection de 137 souches de *X. albilineans* d'origines géographiques diverses, grâce à la technique RFLP, ii) mesurer et caractériser la quantité d'albicidine produite *in vitro* par ces 137 souches grâce au bio essai basé sur la capacité de l'albicidine à inhiber la croissance d'*E. coli*, et enfin iii) caractériser la variation de la sévérité de la maladie en se basant sur l'intensité des symptômes foliaires et l'intensité de colonisation de la tige (densités de populations bactériennes) après inoculation d'un cultivar de canne à sucre sensible à la maladie (H70-144) avec 20 souches de *X. albilineans* représentatives de la variabilité génétique et de la production d'albicidine révélées au cours de cette étude.

RESUME

Quatorze haplotypes et deux groupes génétiques majeurs ont été identifiés, ALB-RFLP-A et ALB-RFLP-B, et toutes les souches qui ont été isolées après la recrudescence de l'échaudure des feuilles appartenaient au groupe ALB-RFLP-B. Cependant, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre cette variabilité et la quantité d'albicidine produite *in vitro* par *X. albilineans*. La diversité génétique observée pour les gènes de biosynthèse de l'albicidine était très similaire à celle décrite précédemment au niveau de l'ensemble du génome de cette bactérie. Trois groupes de pathogénie ont été identifiés parmi les 20 souches de *X. albilineans*, mais aucune relation n'a pu être mise en évidence entre la variabilité des gènes de biosynthèse de l'albicidine, la quantité d'albicidine produite *in vitro* et la variation du pouvoir pathogène de *X. albili-*

neans. Ces résultats sont en faveur de l'implication d'autres gènes dans la pathogénie de cette bactérie.

Ces travaux sont présentés ci-après sous la forme d'un article qui a été soumis et publié dans la revue *Phytopathology* :

Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Girard, J.-C., Royer, M., and Rott., P. C. 2006. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 96:33-45.

Variation in Albicidin Biosynthesis Genes and in Pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the Sugarcane Leaf Scald Pathogen

P. Champoiseau, J.-H. Daugrois, J.-C. Girard, M. Royer and P. C. Rott

First and second authors: CIRAD-CA, UPR Multiplication Végétative, Station de Roujol, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies; third, fourth and fifth authors: UMR 385 AGRO.M-CIRAD-INRA Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, TA 41/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Accepted for publication 3 September 2005.

Corresponding author: P. Rott; E-mail address: philippe.rott@cirad.fr

ABSTRACT

Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Girard, J.-C., Royer, M., and Rott, P. C. 2006. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 96:33-45.

Total genomic DNA from 137 strains of *X. albilineans* from worldwide locations was hybridized with two DNA probes that together harbor the entire 49-kb albicidin biosynthesis gene cluster and two additional 3-kb genomic regions required for albicidin production. Fourteen haplotypes and two major genetic groups (albicidin [ALB]-restriction fragment length polymorphism [RFLP] A and ALB-RFLP B) were identified, and strains that were isolated after recent outbreaks of leaf scald disease belonged to group ALB-RFLP B. Albicidin genetic diversity was very similar to the previously described genetic diversity of the pathogen based on the whole genome. No relationship was found between variability of albicidin biosynthesis genes and the amount of albicidin produced in vitro by *X. albilineans*. Leaf scald-susceptible sugarcane cv. H70-144 was inoculated with 20 strains of the pathogen belonging to different ALB-RFLP haplotypes. Among them, 10 strains from Guadeloupe belonged to the same

ALB-RFLP group but differed in the amount of albicidin produced in vitro. Strains were distributed in at least three different pathogenicity groups based on symptom severity and pathogen population density in the stalk. These two pathogenicity factors varied concurrently; however, no relationship between variation in albicidin biosynthesis genes, variation in the amount of albicidin produced in vitro, and variation in pathogenicity of *X. albilineans* was found. Further investigation is necessary to identify other genes involved in pathogenicity of *X. albilineans*.

INTRODUCTION

Xanthomonas albilineans is a systemic, xylem-invading pathogen that causes leaf scald of sugarcane (*Saccharum* interspecific hybrids). This disease occurs in at least 66 countries in the world and can cause severe yield losses (48). Leaf symptoms vary from a single, white, narrow, sharply defined stripe to complete wilting and necrosis of infected leaves, leading to the plant death in the most susceptible cultivars. A common symptom in mature cane is the abnormal development of side shoots on stalks (48). Observation of symptoms on leaves and of stalk side shoots generally is used to assess disease severity and resistance after artificial inoculation of sugarcane (17,19,33,50).

A major toxic compound called albicidin, specifically produced by *X. albilineans*, plays a key role in pathogenicity (4,6,7,58,59). Albicidin-deficient mutants no longer incite disease symptoms and genetically modified sugarcane plants expressing an albicidin-detoxifying gene are resistant to leaf scald (59). In plants, albicidin inhibits DNA replication of proplastids, thus blocking plastid development (7). Albicidin also has antibiotic activity and inhibits replication of several Gram positive and Gram negative bacteria, including *Escherichia coli* (5).

Recently, the entire 49-kb albicidin biosynthesis gene cluster was cloned and sequenced from *X. albilineans* strain Xa23R1 from Florida (47,51). This cluster, included in a genomic region named XALB1, contains three large polyketide synthase (PKS) and nonribosomal peptide synthase (NRPS) genes as well as several putative modifying, regulatory and resistance genes. Two additional 3-kb regions of the genome of *X. albilineans* strain Xa23R1, namely XALB2 and XALB3, also were

found to be involved in albicidin production. XALB2 contains a single gene coding for a phosphopantetheinyl transferase which is required for posttranslational activation of PKS or NRPS enzymes (29,51). XALB3 contains a single gene coding for HtpG protein for which the role in albicidin production has not been elucidated (57).

The sugarcane leaf scald pathogen is spread mainly in infected sugarcane cuttings (48). However, aerial transmission of *X. albilineans* has also been shown to occur in Florida (11), Guadeloupe (17,32), and Mauritius (2). In Guadeloupe, two strains of *X. albilineans* differed in their capacity to colonize the sugarcane leaf surface and subsequently to cause disease (17). In addition to colonization of the leaf canopy, colonization of the sugarcane stalk is another critical step in disease progress. Leaf scald symptoms are associated with high population densities of *X. albilineans* in the stalk, and disease severity is correlated to population densities in the apex of the stalk (45,50). The capacity of *X. albilineans* to colonize sugarcane stalks or to cause symptoms varies according to the strain of the pathogen, indicating the existence of different pathotypes within the species (17,38). Interactions between sugarcane cultivars and strains of the pathogen suggests the occurrence of races within *X. albilineans* (1,38).

For the last two decades, leaf scald outbreaks have occurred in several geographical locations such as in Cuba (21), Florida (12), Guadeloupe (49), Guatemala (41), Louisiana (26), Mauritius (2), Taiwan (10), and Texas (30). Most, if not all, of these outbreaks were attributed to genetic variants of *X. albilineans* identified by restriction fragment length polymorphism with pulse-field gel electrophoresis (RFLP-PFGE) (19). Eight PFGE groups (A to H) were described. Most strains associated with new outbreaks belonged to PFGE group B. Strains isolated in Florida after the outbreak of leaf scald, belonging to PFGE group B, had greater propensity for aerial transmission than strains belonging to PFGE group A, isolated prior to disease reemergence (19). More recently, strains belonging to PFGE group B also were classified in a single genetic group, AFLP III, by amplified fragment length polymorphism (AFLP) with a worldwide collection of 162 strains of *X. albilineans* (42). However, no relationship has yet to be identified between genetic variation of the pathogen and variation in pathogenicity.

The objective of our study was to characterize the genetic variation of *X. albilineans* with respect to genes involved in albicidin production, and to identify any relationship between this variation and variation in pathogenicity of *X. albilineans*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. The 137 strains (74 from worldwide locations and 63 from Guadeloupe) of *X. albilineans* used in this study are listed in Tables 1 and 2. Bacterial strains stored at -20°C as turbid water suspensions were retrieved by plating on modified Wilbrink's (MW) agar medium for 3 days at 28°C (46). Serological characteristics of strains from Guadeloupe were determined as described by Rott et al. (49). For short-term storage between experiments, bacterial strains routinely were plated on MW agar medium and stored at 5°C.

Escherichia coli DH5 α strain (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) was stored at -20°C as a turbid water suspension supplemented with 15% glycerol (vol/vol) and grown on Luria-Bertani (LB) agar medium for 24 h at 37°C before use (52). Between short-term experiments, *E. coli* cultures were stored on LB agar at 5°C.

TABLE 1. Characteristics of *Xanthomonas albilineans* strains from worldwide locations used in this study.

Strain	Origin	Year	Author	Haplotype PFGE ^w	Albicidin production group ^{x,y}	Haplotype RFLP ^{571(y)}	Haplotype RFLP ^{K7(y)}	Combined haplotype ^Y
BRB101	Barbados	1992	P. Rott	B-01	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
BLZ102	Belize	1992	P. Rott	B-10	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
BLZ103	Belize	1992	P. Rott	B-15	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
BLZ105	Belize	1992	P. Rott	B-19	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
BRA050	Brazil	1988	R. Neto	B-11	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
BRA051	Brazil	1988	R. Neto	B-09	M	H ⁵⁷¹ -B1	H ^{K7} -B1	HB1
BRA115	Brazil	1993	C. O. Cordaso	B-11	M	H ⁵⁷¹ -B1	H ^{K7} -B1	HB1
BRA118	Brazil	1993	C. O. Cordaso	B-10	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
BRA120	Brazil	1993	C. O. Cordaso	B-21	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
HVO005	Burkina Faso	1980	M. Chatenet	F-01	M	H ⁵⁷¹ -A5	H ^{K7} -A4	HA7
HVO031	Burkina Faso	1984	M. Chatenet	C-02	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
HVO082	Burkina Faso	1989	M. Granier	C-04	H	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
CMR029	Cameroun	1984	P. Rott	C-02	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
CMR041	Cameroun	1986	M. Granier	C-02	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
TCD228	Chad	1997	M. Chatenet	...	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
COL217	Colombia	1996	J. I. Victoria	...	H	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
DOM096	Dominican Rep.	1991	M. J. Davis	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
DOM097	Dominican Rep.	1991	M. J. Davis	A-01	...	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
FJI079	Fiji	1961	D. W. Dye	E-01	M	H ⁵⁷¹ -A2	H ^{K7} -A5	HA8
FJI080	Fiji	1961	D.W. Dye	E-02	M	H ⁵⁷¹ -A2	H ^{K7} -A5	HA8
FJI106	Fiji	1961	D. W. Dye	E-02	M	H ⁵⁷¹ -A2	H ^{K7} -A2	HA3
GUF215	French Guyana	1996	J.-H. Daugrois	...	M	H ⁵⁷¹ -A2	H ^{K7} -A5	HA8
GLP007	Guadeloupe	...	M. Chatenet	E-01	M	H ⁵⁷¹ -A2	H ^{K7} -A5	HA8

(Continued on next page)

TABLE 1. (continued from preceding page)

Strain	Origin	Year	Author	Haplotype PFGE ^w	Albicidin		Haplotype RFLP ^{K7(y)}	Combined haplotype ^y
					production group ^{x,y}	Haplotype RFLP ^{571(y)}		
GLP012	Guadeloupe	...	L. Féréol	B-01	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GLP043	Guadeloupe	1987	J. Montillet	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GLP056	Guadeloupe	1988	P. Rott	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GLP057	Guadeloupe	1988	P. Rott	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GLP059	Guadeloupe	1989	M. Granier	B-01	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GLP094	Guadeloupe	1991	P. Rott	B-06	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GLP229	Guadeloupe	1998	J.-H. Daugrois	...	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GLP230	Guadeloupe	1998	J.-H. Daugrois	...	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
CIV039	Ivory Coast	1986	P. Rott	C-02	H	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
CIV040	Ivory Coast	1986	M. Granier	C-02	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
KEN006	Kenya	...	M. Chatenet	D-11	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
MTQ032	Martinique	1932	J. A. Spence	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
MTQ058	Martinique	1989	P. Rott	I-01 ^z	M	H ⁵⁷¹ -A2	H ^{K7} -A6	HA9
MTQ078	Martinique	1957	J. A. Spence	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
MUS062	Mauritius	1956	G. Orian	B-13	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
PNG130	Papua New Guinea	1993	T. Shigaki	H-01 ^z	L	H ⁵⁷¹ -A4	H ^{K7} -A7	HA10
REU008	Reunion	1983	F. Léoville	D-01	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU009	Reunion	1983	J.-C. Girard	D-07	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU100	Reunion	1992	J.-H. Daugrois	C-01	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
REU148	Reunion	1992	J.-H. Daugrois	D-03	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU172	Reunion	1995	J.-C. Girard	D-15 ^z	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU173	Reunion	1995	J.-C. Girard	D-17 ^z	N	H ⁵⁷¹ -A3	H ^{K7} -A3	HA6
REU175	Reunion	1995	J.-C. Girard	D-16 ^z	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU176	Reunion	1995	J.-C. Girard	D-18 ^z	H	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU185	Reunion	1995	J.-C. Girard	D-15 ^z	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU189	Reunion	1995	J.-C. Girard	...	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU200	Reunion	1995	J.-C. Girard	D-01 ^z	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU207	Reunion	1995	J.-C. Girard	D-15 ^z	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A3	HA5
REU209	Reunion	1995	J.-C. Girard	J-01 ^z	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
LKA070	Sri Lanka	1962	A. C. Hayward	G-01	M	H ⁵⁷¹ -A2	H ^{K7} -A1	HA4
TWN052	Taiwan	1988	C. T. Chen	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B3	H ^{K7} -B1	HB3
TWN107	Taiwan	1993	C. T. Chen	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B3	H ^{K7} -B1	HB3
TWN109	Taiwan	1993	C. T. Chen	B-01	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
TWN110	Taiwan	1993	C. T. Chen	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
TWN111	Taiwan	1993	C. T. Chen	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
INC002	Unknown	...	D. C. Harris	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
USA081	USA	...	H. Koike	...	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2
USA083	USA, Florida	1990	M. Davis	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
USA129	USA, Florida	1993	J. Comstock	B-01	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
USA135	USA, Florida	1993	J. Comstock	B-01	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
Xa23R1	USA, Florida	1996	P. Rott	...	H	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A1	HA1
HAW073	USA, Hawaii	1965	H. Koike	A-01	M	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A1	HA1
HAW112	USA, Hawaii	1993	S. Schenck	A-05	H	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A1	HA1
USA156	USA, Texas	1993	T. Isakeit	B-01	H	H ⁵⁷¹ -B4	H ^{K7} -B1	HB4
USA165	USA, Texas	1994	T. Isakeit	B-08	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
USA167	USA, Texas	1993	T. Isakeit	B-01	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
USA169	USA, Texas	1993	T. Isakeit	B-01	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
VNM235	Vietnam	1998	P. Rott	...	M	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
VNM236	Vietnam	1998	P. Rott	...	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
VNM237	Vietnam	1998	P. Rott	...	H	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
ZIM071	Zimbabwe	1965	R. A. Lelliot	C-04	H	H ⁵⁷¹ -A1	H ^{K7} -A2	HA2

^w Data from Davis et al. (19); PFGE = pulse-field gel electrophoresis.

^x Grouping is based on growth inhibition ring (GIR) and on Student-Newman-Keuls test of least square means comparison with six GIR values. Abbreviations: H = highly producing group (GIR > 15.0 mm), M = medium-producing group (GIR = 10.1 to 15.0 mm), L = low-producing group (GIR = 0.1 to 10.0 mm), and N = no albicidin production (GIR = 0 mm). Strains of L and H albicidin-producing groups are significantly different at *P* = 0.05. With a few exceptions, strains of albicidin-producing group M are not significantly different at *P* = 0.05 from strains of groups H and L.

^y This study; RFLP = restriction fragment length polymorphism.

^z P. Rott (unpublished data).

TABLE 2. Characteristics of *Xanthomonas albilineans* strains from Guadeloupe used in this study.

Strain ^x	Origin	Sampling date	Sugarcane cultivar	Isolated from ^y	Haplotype RFLP ^{571(z)}	Haplotype RFLP ^{K7(z)}	Combined haplotype ^z
GPEDC2, GPEDC23, GPEDC27	Duclos	November 1999	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEDC35, GPEDC38	Duclos	January 2000	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEF1, GPEF4, GPEF5, GPEF6	Duclos	December 2000	B69566	Leaf symptom	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEDC61, GPEDC62, GPEDC63, GPEDC64	Duclos	December 2000	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEDC80, GPEDC81	Duclos	July 2001	B69566	Stalk	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEDC76, GPEDC77, GPEDC79	Duclos	October 2001	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEDC82, GPEDC84, GPEDC88	Duclos	January 2002	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEG7, GPEG8	Godet	December 1999	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEG5, GPE11, GPEG15, GPEGK9	Godet	December 1999	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPET16	Godet	May 2000	B69566	Stalk	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEG39, GPEG40, GPEG43, GPEG44	Godet	July 2001	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEG37	Godet	September 2001	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEDC2b	Roujol	February 2002	B69566	Leaf symptom	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPE53, GPE55, GPE57, GPE60, GPE61	Roujol	February 2002	B69566	Leaf symptom	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPE47, GPE48	Saint-Jean	October 1999	B69566	Leaf symptom	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPE49	Saint-Jean	October 1999	B8008	Leaf symptom	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPESJ2, GPESJ3	Saint-Jean	November 1999	B8008	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPESJ11	Saint-Jean	January 2000	B8008	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPESJ16	Saint-Jean	January 2000	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPEO8B, GPEP14B, GPEQ13B	Saint-Jean	April 2001	B69566	Stalk	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPESJ28, GPESJ31	Saint-Jean	September 2001	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPESJ34, GPESJ36	Saint-Jean	September 2001	B8008	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPESJ37, GPESJ41, GPESJ42, GPESJ43, GPESJ45	Saint-Jean	September 2001	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPESJ46, GPESJ47	Saint-Jean	October 2001	B8008	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2
GPESJ49, GPESJ51, GPESJ53	Saint-Jean	October 2001	B69566	Leaf surface	H ⁵⁷¹ -B2	H ^{K7} -B1	HB2

^x Single colonies were isolated on selective agar medium (XAS) after 5 days of growth at 28°C (18). All strains belong to serovar I.

^y Leaf surface: isolated from water droplets sampled from the leaf surface of sugarcane plants.

^z This study; RFLP = restriction fragment length polymorphism.

RFLP analysis of albicidin biosynthesis genes. The restriction enzymes *HincII* and *PstI* (Promega Corp., Madison, WI) were used for RFLP analysis because they generated reliable and easily identifiable DNA fingerprints in preliminary experiments (data not shown).

Two DNA plasmids covering the entire 49-kb albicidin biosynthesis gene cluster and the genomic regions XALB2 and XALB3 were used as probes for RFLP analysis. Plasmid pALB571 harbors a 37-kb part of the albicidin biosynthesis gene cluster including the three large PKS and NRPS genes (47,51). Plasmid pBKS/K7 harbors the other 12-kb part of the albicidin biosynthesis gene cluster and two 3-kb DNA fragments corresponding to XALB2 and XALB3 genomic regions, respectively (E. Vivien, *personal communication*).

Total genomic DNA was extracted from 3-day-old cultures of *X. albilineans* grown from single colonies in 5 ml MW broth for 48 h at 28°C using a Qiagen extraction DNeasy Tissue kit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. DNA concentrations were adjusted to 60 to 80 ng/μl before enzymatic restriction. DNA was restricted for 3 h at 37°C in a 20-μl reaction mixture (1x buffer, RNase a 10 μg/ml, 4 mM spermidine and DNA at 60 to 80 ng/μl) containing 10 units of enzyme. Restriction products were separated by gel electrophoresis in 0.5x Tris-borate-EDTA buffer at 5.1 V cm⁻¹ for 5 h, stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination. Southern transfer of DNA fragments onto nitrocellulose membranes was performed as recommended by the manufacturer (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.). Plasmids pALB571 and pBKS/K7 were labeled and used as probes using the random priming technique of the Megaprime hybridization kit and ³²PdCTP (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.). DNA fragments that hybridized with radiolabelled probes were visualized by exposure of radiographic films for 1 to 3 days, depending on radioactive intensity.

Reliability of the technique was controlled by comparing the experimental RFLP patterns of strain Xa23R1 with the theoretical RFLP patterns of the same strain based on the nucleotide sequences of XALB1, XALB2 and XALB3 DNA regions (accessions nos. AJ586576, AJ586577 and AM039379, respectively). The theoretical RFLP patterns were determined with DNA Strider software (version 1.0; Institut de Recherche Fondamentale, Commissariat à l'Energie Atomique, Paris). DNA banding patterns obtained with the four enzyme/plasmid combinations (*HincII*/pALB571, *HincII*/pBKS/K7, *PstI*/pALB571 and *PstI*/pBKS/K7) were determined separately by visual analysis. Binary scores were attributed based on the presence or absence (1 or 0, respectively) of DNA bands. Binary matrices were used to calculate similarity between paired haplotypes with Dice's similarity index (22). Cluster analysis of the distance matrix was conducted by the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) procedure (54). Similarity calculations and cluster analyses were performed with DARwin program (version 4.0; CIRAD-FLHOR, Montpellier, France).

Albicidin production assay. Albicidin production was quantified in vitro by a microbiological assay as described by Birch and Patil (5). Briefly, 10 μl of a 10⁹ CFU/ml suspension of *X. albilineans* was spotted in the center of a petri dish containing sucrose-peptone-agar (SPA) medium (sucrose at 20 g/liter, peptone at 5 g/liter,

and agar at 15 g/liter, pH 6.8 to 7.0) and incubated at 28°C. After 5 days of growth, the *X. albilineans* culture and the agar medium were overlaid with 3 ml of 1.5% agar medium containing 10 µl of an *E. coli* overnight culture (optical density at 540 nm = 0.56). The plates then were incubated at 37°C for 24 h. Albicidin production was quantified by calculating the width of the *E. coli* growth inhibition ring (GIR): $(D - d)/2$ where D = diameter of the *E. coli* growth inhibition ring and d = diameter of the *X. albilineans* culture. Three plates were inoculated per strain and experiment. Two separate experiments, assay 1 and assay 2, were conducted with strains from worldwide locations and strains from Guadeloupe, respectively. Both assays were replicated (trials 1 and 2 of each assay) and a third trial (trial 3) was performed with 10 strains from Guadeloupe, to confirm albicidin production results obtained in assay 2 and to identify different albicidin production groups.

Pathogenicity assay. A replicated greenhouse experiment was set up in Montpellier (France) to assess pathogenicity of 20 strains of *X. albilineans* by measuring disease severity on leaves and stalk colonization by the pathogen. Of these 20 strains, 10 originated from worldwide locations and were representative of the genetic diversity of albicidin biosynthesis genes identified in this study: BLZ103, BRA115, HVO082, DOM097, FJI080, MTQ078, PNG130, TWN052, TWN107 and Xa23R1 (Table 1). Ten strains from Guadeloupe were chosen based on their variable albicidin production measured in this study: GPEDC23, GPEDC38, GPEF4, GPEDC61, GPEG5, GPET16, GPE48, GPESJ2, GPEP14B and GPESJ47 (Table 3). The experiment was conducted with disease-free tissue-cultured plants of sugarcane cultivar H70-144 which is susceptible to leaf scald (50). Plants were propagated in vitro and transferred to the greenhouse as described by Feldmann et al. (23). Four-week-old greenhouse plantlets were individually planted in 6-liter pots containing a mixture of peat, compost, and volcanic rock (2:1:2, vol/vol/vol). During plant growth, secondary shoots were systematically removed to keep a single stalk per plant.

Inoculum of the pathogen was prepared from 3-day-old cultures on MW agar at 28°C. Four-month-old plants were inoculated with 10^8 CFU/ml bacterial suspensions by the decapitation technique as described by Rott et al. (50). Control plants inoculated with sterile distilled water were included in the experiment to evaluate any naturally occurring cross contamination (19). After inoculation, plants were distributed in the greenhouse using a randomized complete block design with nine replications of

one plant each. Trial A and trial B were duplications of the experiment in two separate greenhouses.

TABLE 3. In vitro albicidin production by *Xanthomonas albilineans* as determined with a microbiological assay^x.

GIR (in mm)	Assay 1			Assay 2			
	Trial 1	Trial 2	Mean	Trial 1	Trial 2	Mean	
Mean (N) ^z	13.9 (63)	13.8 (71)	13.8	13.2 (56)	14.2 (61)	13.7	
Variance	9.3	9.4	...	30.2	3.5	...	
Maximum	21	19.5	...	27	19.5	...	
Minimum	0	0	...	0.5	8	...	
<i>t</i> test	<i>P</i> = 0.83	<i>P</i> = 0.04	
<i>Variance analysis</i> ^y		Mean square	<i>F</i> Value		Mean square	<i>F</i> Value	<i>P</i> > <i>F</i>
Source	DF			DF			
Strain (error)	72 (58.9)	45.3 (4)	11.3	60 (53)	50.1 (40.3)	1.2	0.211
Trial (error)	1 (59.3)	0.00016 (3.9)	0	1 (53)	92.7 (40.1)	2.3	0.134
Strain x trial	59	4	7.9	53	40.4	107.9	0.0001
Error	260	0.5	...	219	0.4

^x Growth inhibition ring (GIR) of 73 strains from worldwide locations (Assay 1) and 61 strains from Guadeloupe (Assay 2) was measured in two separate and duplicated experiments. Trials 1 and 2 are independent replications of each experiment.

^y Statistical analysis was performed with a mixed model of variance analysis considering the strain-trial interaction as random source of variation.

^z Calculated for *N* strains with mean values of three plates for each strain.

Disease severity was assessed as described by Rott et al. (45), with a few modifications. Briefly, disease symptoms were recorded on noninoculated leaves 4, 6, 8, 10 and 15 weeks after inoculation using a symptom severity scale ranging from 0 to 5, where 0 = no symptoms, 1 = one or two pencil-line streaks, 2 = more than two pencil-line streaks, 3 = leaf chlorosis or bleaching, 4 = leaf necrosis, and 5 = death of the plant. Inoculated plants were rated individually based on the score of the leaf showing the most severe symptom. Disease severity was expressed as $DS = 100 [(1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4 + 5 \times N_5)/5N_T]$ where N_i = number of plants with score i and N_T = total number of plants. It was used to calculate the area under disease progress curve (AUDPC) for statistical analysis (8).

Pathogen populations were determined 15 weeks after plant inoculation in three different locations on the stalk: SL_0 , SL_{-4} and SL_{+10} . SL_0 corresponded to the location of two to three shortened stalk internodes that showed reduced growth after mechanical plant inoculation (cut leaves above the growing point). These internodes were attached to the inoculated leaves and, therefore, were considered to be the entry point of the pathogen into the sugarcane stalk. SL_{-4} corresponded to the fourth internode below SL_0 and SL_{+10} to the tenth internode above SL_0 . Stalks were sampled individually and cut at the soil level with pruning shears. The rind of stalk fragments comprising SL_0 , SL_{-4} , or SL_{+10} was cleaned with absorbent paper and flamed with alcohol to

ensure external sterilization. Each stalk location was cut transversally, in the middle, with pruning shears. Cut sections were pressed firmly on *X. albilineans* selective growth medium (18) for several seconds. The stalk fragment then was re-cut 0.5 cm below the first section and the new section was processed in the same manner as the first one. Pruning shears were systematically flamed with alcohol between each sample. Growth of *X. albilineans* was recorded after 5 days of incubation of agar plates at 28°C. Pathogen population densities were assessed using a 0-to-4 scale, where 0 = no bacterial colony in the stalk imprint, 1 = 1 to 10 colonies in the stalk imprint, 2 = more than 10 colonies or confluent growth of bacteria in less than 25% of the stalk imprint, 3 = confluent growth of bacteria in 25 to 75% of the stalk imprint, 4 = confluent growth of bacteria in more than 75% of the stalk imprint. Visual identification of *X. albilineans* colonies or confluent growth was verified randomly by serology (49). The average score of the two sections per stalk location was used for statistical analysis of data.

Statistical analysis. All statistical analyses were performed with SAS (version 8.2; SAS Institute Inc., Cary, NC). The GIR values were analyzed by ANOVA to compare albicidin production by the different strains of *X. albilineans*. When the null hypothesis in ANOVA was rejected, groupings were determined based on pairwise multiple comparison procedure using the test of Student-Newman-Keuls (SNK). Disease severities and stalk colonization intensities each were compared with the General Linear Models procedure after data rank transformation (13). Groupings were identified with the mean comparison test of SNK.

RESULTS

Variability in albicidin biosynthesis genes. The experimental Xa23R1 banding patterns were in agreement with the theoretical restriction profiles assuming (i) predicted DNA fragments differing in size by less than 28 bp were not distinguishable on experimental banding patterns and (ii) fragments below 0.4 or 0.7 kb were not observed with pBKS/K7 and pALB571 probes, respectively (Fig. 1).

Banding patterns were observed for all strains when the total genomic DNA of the 137 strains of *X. albilineans* was hybridized with probes pALB571 and pBKS/K7 after

HincII and *PstI* restriction. Banding patterns varied with strains of *X. albilineans* and each banding pattern was assigned to a haplotype. Following restriction with *HincII*, nine haplotypes (H^{571} -A1 to A5 and H^{571} -B1 to B4) and eight haplotypes (H^{K7} -A1 to A7 and H^{K7} -B1) were obtained with probes pALB571 and pBKS/K7, respectively (Tables 1 and 2).

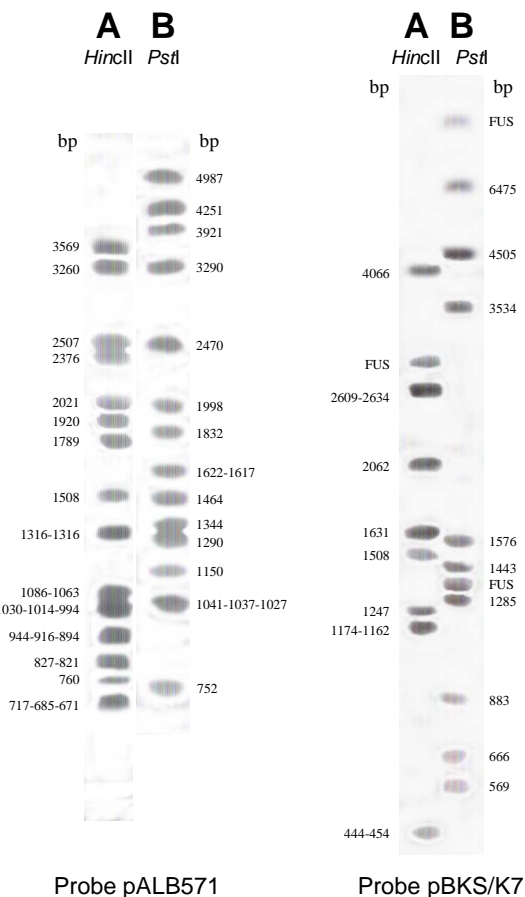


Fig. 1. Experimental restriction fragment length polymorphism banding patterns and corresponding sizes (in bp) of theoretical DNA fragments of *Xanthomonas albilineans* strain Xa23R1 after hybridization with molecular probes pALB571 and pBKS/K7, following restriction of total genomic DNA with A, *HincII* and B, *PstI* enzymes. Molecular probes pALB571 and pBKS/K7 cover together the entire 49-kb albicidin biosynthesis gene cluster and two additional 3-kb genomic regions required for albicidin biosynthesis (all cloned from *X. albilineans* strain Xa23R1). DNA fragments below the size of the smallest fragments shown in the figure were not observed experimentally. FUS are DNA fragments of unpredictable size (unknown flanking sequences).

The *HincII* banding patterns obtained with the two probes were combined for each strain, and 14 combined haplotypes (HA1 to HA10 and HB1 to HB4) were generated. These combined haplotypes were distributed into two major genetic groups (ALB-RFLP A and ALB-RFLP B) by cluster analysis (Fig. 2). Similarity among the 74 strains from worldwide locations ranged from 20 to 100%. Group ALB-RFLP A (combined haplotypes HA1 to HA10) included 36 strains that showed strain similarity higher than 75%. Group ALB-RFLP B (combined haplotypes HB1 to HB4) included 38 strains that showed strain similarity higher than 85%. The 63 strains from Guadeloupe that were isolated from 1999 to 2002 had 100% similarity. They all showed the

profile of combined haplotype HB2 and, therefore, were ranked in genetic group ALB-RFLP B.

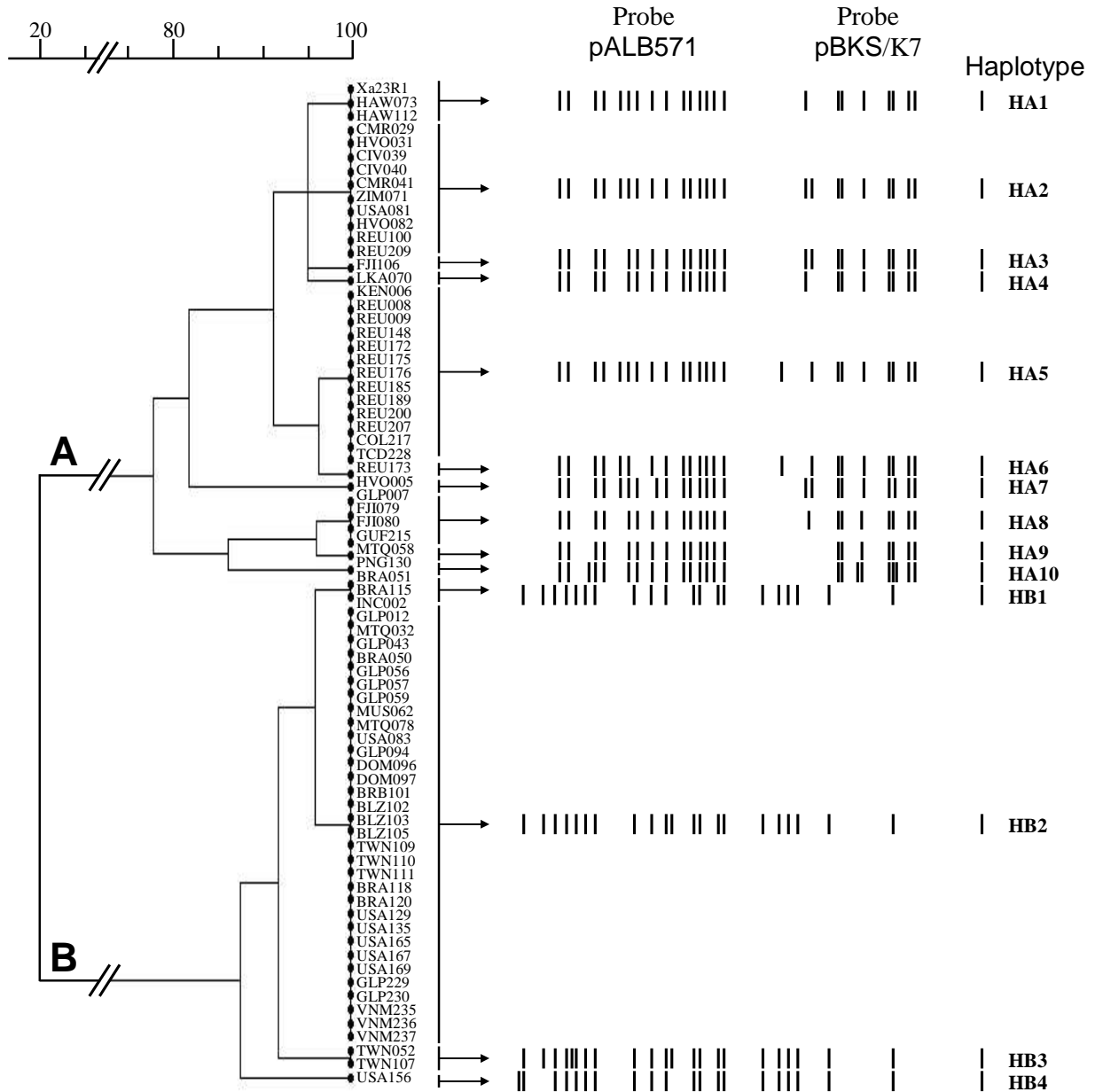


Fig. 2. Genetic relatedness of 74 *Xanthomonas albilineans* strains from worldwide locations based on restriction fragment length polymorphism (RFLP). After restriction with enzyme *HincII*, total genomic DNA was hybridized with DNA probes pALB571 and pBKS/K7. These two probes together cover the entire 49-kb albicidin biosynthesis gene cluster and two additional 3-kb genomic regions required for albicidin biosynthesis (all cloned from *X. albilineans* strain Xa23R1). Banding patterns obtained with the two probes were combined in 14 linearly combined haplotypes (HA1 to HA10 and HB1 to HB4). Combined haplotypes were used for hierarchical cluster analysis by the unweighted pair group method with arithmetic means. Genetic groups ALB-RFLP A and B were resolved at the 0.75 similarity level (see scale bar at the top left of the figure).

After restriction of genomic DNA of the 137 strains of *X. albilineans* with *Pst*I, 10 haplotypes (P⁵⁷¹-A1 to A4 and P⁵⁷¹-B1 to B6) and 6 haplotypes (P^{K7}-A1 to A6) were obtained with probes pALB571 and pBKS/K7, respectively. In all, 12 combined haplotypes were identified (data not shown). Cluster analysis based on *Pst*I-combined haplotypes resulted in the same genetic groups as those described above for *Hinc*II: ALB-RFLP A and ALB-RFLP B.

Variability in albicidin production. The *E. coli* GIR for 73 strains of *X. albilineans* from worldwide locations and 61 strains from Guadeloupe varied between strains from 0 to 21 mm and from 0.5 to 27 mm, respectively (Table 3). GIR mean values were very similar between the two groups of strains and between the two duplications of each experiment (trials 1 and 2). No significant difference between GIR means and variances of trials 1 and 2 was found for worldwide strains ($P = 0.83$). In contrast, a significant difference ($P = 0.04$) was found for the strains from Guadeloupe because of high differences in variances among trials (Table 3). For each group of strains, preliminary analysis revealed high significant differences in albicidin production between strains ($P < 0.0001$). Additionally, occurrence of significant strain-trial interaction ($P < 0.0001$) suggested random or uncontrolled variability of albicidin production by several strains between trials (data not shown). For these reasons, the strain effect in variation source of GIR was analyzed under GLM procedure by a mixed model ANOVA, considering strain-trial interaction as a random source of variation (Table 3). No strain effect ($P = 0.211$) was found for the strains from Guadeloupe, probably because of a high level of strain-trial variation.

In contrast, the strain effect of strains from worldwide locations was highly significant ($P = 0.0001$) and three albicidin production groups were identified (Table 1): a high production group of 23 strains (group H) with GIR mean values ranging from 15.2 to 19.9 mm, an intermediate production group of 48 strains (group M) with GIR mean values ranging from 10.4 to 15 mm, and a low or weak production group formed by only one strain (group L) with a GIR mean value of 9.5 mm. No albicidin production was measured for strain REU173 (group N) in any of the trials.

A third albicidin production trial was performed with 10 strains from Guadeloupe representative of the variability of albicidin amount produced in trials 1 and 2 of assay 2. Mean GIR values obtained in the three trials were analyzed, and high significant

trial effect ($P < 0.0001$) and strain effect ($P = 0.0072$) were found. The 10 strains were distributed in three different groups of albicidin production based on mean GIR. However, additional differences exist within groups as shown by statistical data (Table 4).

TABLE 4. In vitro albicidin production by 10 strains of *Xanthomonas albilineans* from Guadeloupe as determined with a microbiological assay^v.

Strains	Albicidin production (GIR)			Exp. Mean ^y	Group ^z
	Mean (square mean) ^w				
	Trial 1	Trial 2	Trial 3		
GPEF4	26.3 (0.4)	15.4 (0.9)	25.7 (1.8)	22.5 a	H
GPEDC38	16.0 (0)	16.5 (0.3)	29.7 (0.9)	20.7 b	H
GPEG5	11.5 (0)	14.9 (0.1)	25.5 (0.7)	17.3 c	H
GPESJ47	13.7 (0.2)	11.1 (0.3)	26.7 (0.6)	17.1 c	H
GPET16	9.0 (1.3)	13.3 (0.3)	25.5 (0.3)	15.9 d	H
GPEDC61	11.2 (0.2)	14.5 (0)	16.7 (0.2)	14.1 e	M
GPE48	5.7 (0.4)	13.1 (0.1)	22.8 (1.2)	13.9 e	M
GPEDC23	8.5 (0.7)	13.5 (0)	18.2 (0.2)	13.4 e	M
GPEP14B	5.7 (0.8)	8.5 (0.5)	12.2 (0.9)	8.8 f	L
GPESJ2	1.0 (0.3)	12.2 (0.3)	12.8 (0.6)	8.7 f	L
<i>Variance analysis</i> ^x					
Source	DF	Mean square	F Value	$P > F$	
Strain (error)	9 (18)	175.9 (45.7)	3.8	0.0072	
Trial (error)	2 (18)	940.4 (45.6)	20.6	< 0.0001	
Strain x trial	18	45.9	59.6	< 0.0001	
Error	58	0.8			

^v Growth inhibition ring (GIR) was measured in an experiment with three independent replications (trials 1, 2 and 3).

^w Values are the means of three plates for each strain.

^x Statistical analysis was performed with a mixed model of variance analysis considering the strain-trial interaction as a source of variation.

^y Experiment mean of the three trials. Values followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to the test of Student-Newman-Keuls.

^z Albicidin production group. Grouping is based on experiment mean GIR value, where H = highly producing group (GIR > 15.0 mm), M = medium-producing group (GIR = 10.1 to 15.0 mm), and L = low-producing group (GIR = 0.1 to 10.0 mm).

Variability in pathogenicity based on disease severity. The first leaf scald symptoms were observed on inoculated sugarcane leaves 2 to 4 weeks after inoculation of cv. H70-144 in the greenhouse experiment (trials A and B). However, only symptoms that subsequently appeared on noninoculated leaves were recorded to differentiate strains of the pathogen. The first leaf scald symptoms on noninoculated leaves were recorded 4 weeks after inoculation. At the end of trial A, 15 weeks after stalk inoculation, 5 of 10 strains from worldwide locations and 9 of 10 strains from Guadeloupe had incited disease symptoms on the leaves (Fig. 3). Great differences in disease severity also were observed 15 weeks after inoculation and disease sever-

ity ranged from 0 to 84 and 0 to 78 for strains from worldwide locations and strains from Guadeloupe, respectively (Fig. 3).

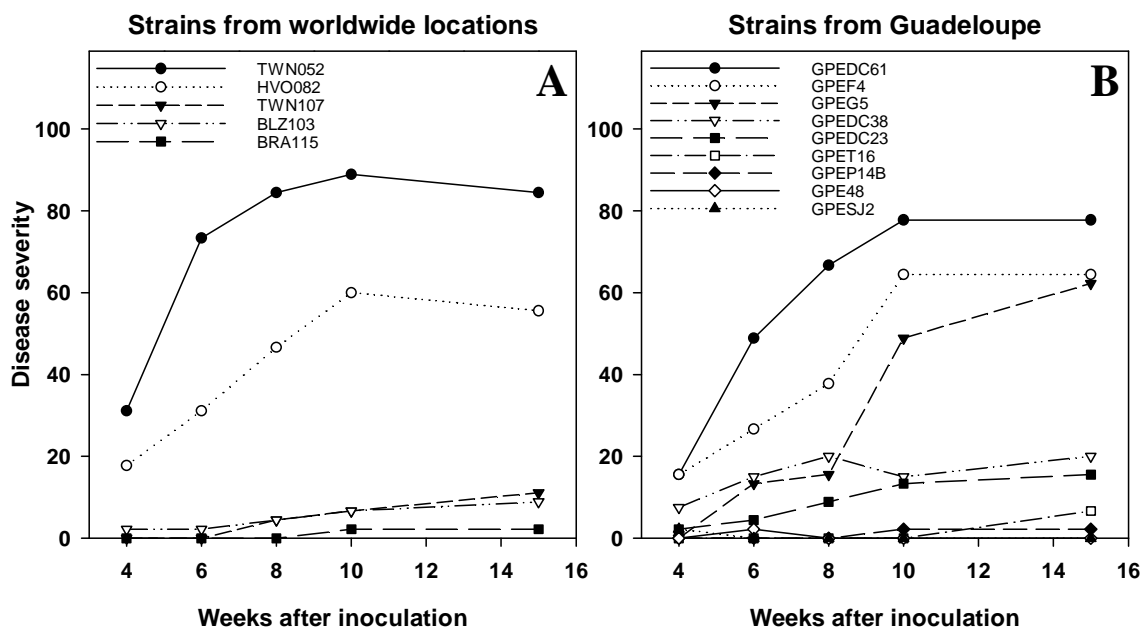


Fig. 3. Disease progress curves in sugarcane cv. H70-144 as determined by disease severity on leaves after inoculation with 20 strains of *Xanthomonas albilineans*: A, 10 strains from worldwide locations and B, 10 strains from Guadeloupe. The experiment was set up in Montpellier (France) in a greenhouse using a randomized complete block design with nine replications of one plant each. Foliar symptoms were scored 4, 6, 8, 10 and 15 weeks after inoculation on noninoculated leaves with a 0-to-5 scale. Each point of disease severity corresponds to the mean score of nine plants. Strains that did not incite any symptom in inoculated plants were not represented on the figure: strains Xa23R1, FJI080, MTQ078, DOM097 and PNG130 (worldwide origin) and strain GPESJ47 (Guadeloupe). The experiment was duplicated once but only results of trial A are shown in the figure.

Disease progress patterns were different among strains, and three disease severity groups were identified based on AUDPC values (Table 5). The first group contained the most aggressive strains for which disease severity increased rapidly up to 10 weeks after inoculation, and then only slightly changed up to 15 weeks after inoculation. At the end of the experiment, 15 weeks after inoculation, disease severity of the most aggressive strains varied from 56 to 84. The second group, the intermediate group, consisted of less aggressive strains. At the end of the experiment, disease severity of these strains ranged from 9 to 20. The third group contained nonaggressive or weakly aggressive strains for which symptoms were never or only occasion-

ally recorded during the experiment. Disease severity of strains from this group was mostly nil and never exceeded a value of 7.

TABLE 5. Disease severity on leaves and intensity of stalk colonization in sugarcane cv. H70-144 after inoculation with 10 strains of *Xanthomonas albilineans* from worldwide locations (I) and 10 strains from Guadeloupe (II)^v.

Strain	Disease severity: AUDPC (rank) ^w				Group	Intensity of stalk colonization: bacterial population density (rank) ^x				Colonization group
	Trial A		Trial B			Trial A		Trial B		
I. Worldwide ^y										
TWN052	465.6 (85.4)	a	222.2 (78.1)	a	H	3.2 (74.8)	a	3.9 (78.4)	a	H
HVO082	278.9 (77.6)	a	135.0 (61.6)	b	H-I	2.6 (65.2)	a	3.9 (79.1)	a	H
TWN107	30.0 (50.8)	b	42.8 (49.2)	bc	I-L	2.2 (61.2)	ab	2.3 (57.9)	bc	I-L
BLZ103	32.8 (54.1)	b	15.0 (44.1)	c	I-L	0.3 (37.7)	c	1.4 (47.8)	c	I
BRA115	6.7 (34.6)	c	0 (35.0)	c	L	0 (33.5)	c	0.1 (34.4)	d	L
PNG130	0 (30.5)	c	3.3 (39.1)	c	L	0 (33.5)	c	0 (31.0)	d	L
DOM097	0 (30.5)	c	2.8 (39.0)	c	L	1.2 (48.7)	bc	0 (31.0)	d	I-L
MTQ078	0 (30.5)	c	2.2 (38.9)	c	L	0 (33.5)	c	0 (31.0)	d	L
FJI080	0 (30.5)	c	0 (35.0)	c	L	0 (33.5)	c	0 (31.0)	d	L
Xa23R1	0 (30.5)	c	0 (35.0)	c	L	0 (33.5)	c	0 (31.0)	d	L
II. Guadeloupe ^z										
GPEDC61	372.2 (82.7)	a	54.4 (63.9)	ab	H	2.8 (65.5)	a	3.9 (70.6)	a	H
GPEF4	281.1 (74.5)	b	107.2 (75.4)	a	H	2.6 (63.7)	a	3.2 (56.9)	ab	H
GPEG5	192.2 (68.5)	b	39.4 (51.3)	bc	H-I	2.8 (65.2)	a	3.6 (61.2)	ab	H
GPEDC38	108.8 (56.8)	c	54.4 (54.0)	abc	I	1.0 (45.9)	ab	3.6 (64.2)	ab	H-I
GPEDC23	59.4 (49.6)	c	11.1 (39.8)	bc	I	2.0 (56.3)	a	2.7 (50.1)	b	H-I
GPET16	8.3 (28.5)	d	27.2 (47.3)	bc	I-L	0.4 (36.5)	b	2.2 (48.0)	b	I-L
GPEP14B	6.7 (23.9)	d	0 (27.0)	c	L	0 (30.5)	b	0.4 (26.5)	c	L
GPE48	3.3 (23.6)	d	6.7 (33.3)	c	L	0 (30.5)	b	0 (20.5)	c	L
GPESJ2	2.2 (22.8)	d	11.1 (35.9)	c	L	0 (30.5)	b	0 (20.5)	c	L
GPESJ47	0 (20.5)	d	0 (27.0)	c	L	0 (30.5)	b	0 (20.5)	c	L

^v The experiment was set up in a greenhouse in Montpellier (France), using a randomized complete block design with nine replications of one plant each. Trial A and trial B are independent duplications of the experiment. Correlation (R^2) between AUDPC and bacterial population density values was 0.83 (trial A) and 0.91 (trial B) for strains from worldwide locations and 0.88 (trial A) and 0.74 (trial B) for strains from Guadeloupe. Disease severity and colonization groups are based on AUDPC and bacterial population density values, respectively, obtained in trial A and trial B. Abbreviations: H = highly aggressive group, I = intermediate aggressive group, and L = low or nonaggressive group.

^w Area under disease progress curve (AUDPC) was calculated with the scores (0-to-5 scale) of foliar symptoms on noninoculated leaves determined at 4, 6, 8, 10 and 15 weeks after inoculation. Each value of AUDPC corresponds to the mean value of nine plants. Statistical analysis was performed after rank transformation of AUDPC values (13), and each rank value corresponds to the mean value of nine plants. In each column, values followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to the test of Student-Newman-Keuls (SNK).

^x Bacterial population densities were determined at three different locations of the sugarcane stalk: SL_0 (considered as the entry point of the pathogen into the sugarcane stalk), SL_4 (fourth internode below SL_0) and SL_{+10} (tenth internode above SL_0), following a 0-to-4 scale. Only results at SL_{+10} are presented in the table. In each column, values followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to the test of SNK.

^y Variance analysis was performed after rank transformation of AUDPC. Disease severity: strain, $DF = 9$, $P > F = <0.0001$ for trials A and B; bloc, $DF = 8$, $P > F = 0.741$ and 0.299 for trials A and B, respectively; error, $DF = 72$. Intensity: strain, $DF = 9$, $P > F = <0.0001$ for trials A and B; bloc, $DF = 8$, $P > F = 0.109$ and 0.979 for trials A and B, respectively; error, $DF = 72$.

^z Variance analysis was performed after rank transformation of bacterial population density data. Disease severity: strain, $DF = 9$, $P > F = <0.0001$ for trials A and B; bloc, $DF = 8$, $P > F = 0.057$ and 0.974 for trials A and B, respectively; error, $DF = 72$. Intensity: strain, $DF = 9$, $P > F = <0.0001$ for trials A and B; bloc, $DF = 8$, $P > F = 0.369$ and 0.023 for trials A and B, respectively; error, $DF = 72$.

In greenhouse trial B, 7 of 10 strains from worldwide origins and 8 of 10 strains from Guadeloupe incited symptoms on noninoculated leaves of cv. H70-144. At the end of the experiment, 15 weeks after inoculation, disease severity differed among

strains and ranged from 0 to 60 and 0 to 24 for the strains from worldwide locations and strains from Guadeloupe, respectively. Although disease severity values of trial B were lower than those of trial A, similar disease progress patterns and groupings were obtained, with a few differences (Table 5). Strain GPEG5 from Guadeloupe belonged to the intermediate aggressive group in trial B and to the most pathogenic group in trial A. Strains GPEDC38 from Guadeloupe and BLZ103 from Belize were distributed in the intermediate aggressive group in trial A but in the most aggressive and nonaggressive groups, respectively, in trial B. Strain GPET16 from Guadeloupe was ranked in the nonaggressive group in trial A and in the intermediate group in trial B. Additionally, a few symptoms of leaf scald were recorded for strains DOM097 from Dominican Republic and PNG130 from Papua New Guinea in trial B, but none in trial A. In contrast, strain GPEP14B from Guadeloupe incited a few symptoms in plants of trial A but none in plants of trial B. However, the correlation of data obtained for all strains in trial A and trial B was high ($R = 0.88$), indicating reliability of these results.

Variability in pathogenicity based on stalk colonization. Fifteen weeks after plant inoculation, population densities of the pathogen were determined at three different locations of the sugarcane stalk (SL_0 , SL_{-4} , and SL_{+10}). The first location (SL_0) was the entry point of the pathogen into the stalk. The second location (SL_{-4}) was situated below SL_0 , at the lower part of the stalk. The third location (SL_{+10}) was situated above SL_0 , at the top of the stalk. SL_0 populations of *X. albilineans* were determined to control efficiency of plant inoculation and colonization of stalks by the pathogen after colonization of inoculated leaves. In trials A and B, SL_0 was colonized by all strains of the pathogen. Control plants did not show any symptoms and were free of *X. albilineans*, as determined by the measurement of pathogen population densities at different stalk locations.

In trial A, populations of *X. albilineans* at SL_{-4} differed between strains from worldwide locations ($P = 0.029$) and between strains from Guadeloupe ($P < 0.0001$). In trial B, these populations differed again between strains from Guadeloupe ($P < 0.0001$) but not between strains from worldwide locations ($P = 0.072$). Correlation of data obtained in the two trials was low, 0.51 and 0.23 for strains from Guadeloupe and strains from worldwide locations, respectively.

In trial A and in trial B, populations of *X. albilineans* at SL₊₁₀ differed between strains from worldwide locations ($P < 0.0001$) and between strains from Guadeloupe ($P < 0.0001$) (Table 5). Correlation of data obtained in the two trials was 0.91 and 0.85 for strains from worldwide locations and strains from Guadeloupe, respectively. At the end of trial A, 15 weeks after stalk inoculation, 5 of 10 strains from worldwide locations and 6 of 10 strains from Guadeloupe had colonized SL₊₁₀ (Fig. 4).

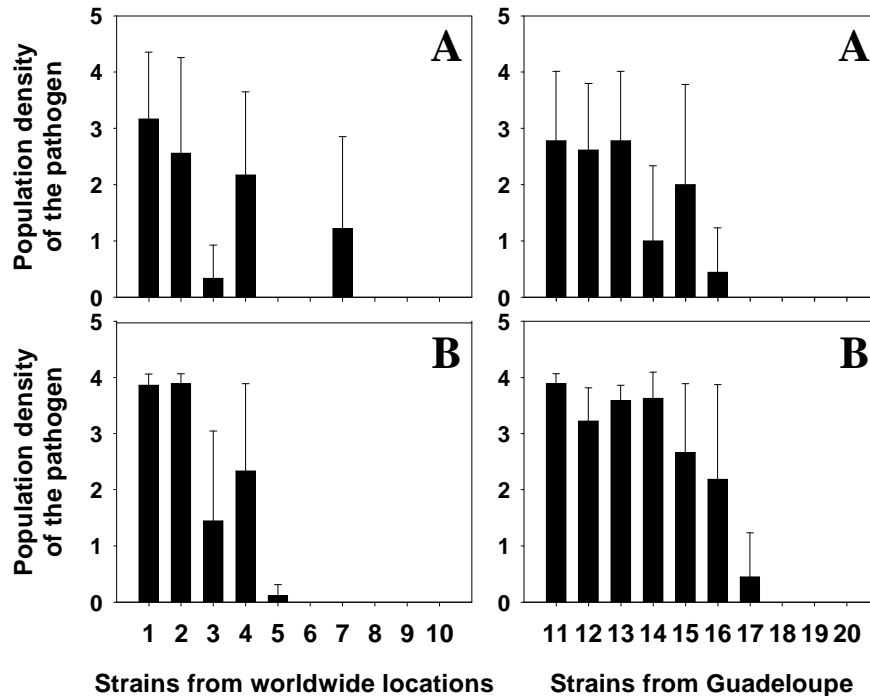


Fig. 4. Population densities of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane stalks of cv. H70-144 determined 15 weeks after inoculation with 10 strains from worldwide locations and 10 strains from Guadeloupe. The experiment was set up in a greenhouse in Montpellier (France) using a randomized complete block design with nine replications of one plant each. Population densities of the pathogen were determined with a 0-to-4 scale at three different locations of the sugarcane stalk: SL₀ (considered as the entry point of the pathogen into sugarcane stalk), SL₋₄ (fourth internode below SL₀), and SL₊₁₀ (tenth internode above SL₀). Only results at SL₊₁₀ are shown in the figure. Each bar corresponds to the mean value of nine stalks, and error bars refer to mean square. Strains: 1 = TWN052, 2 = HVO082, 3 = BLZ103, 4 = TWN107, 5 = BRA115, 6 = PNG130, 7 = DOM097, 8 = MTQ078, 9 = FJI080, 10 = Xa23R1 (worldwide origins); strains: 11 = GPEDC61, 12 = GPEF4, 13 = GPEG5, 14 = GPEDC38, 15 = GPEDC23, 16 = GPET16, 17 = GPEP14B, 18 = GPE48, 19 = GPESJ2, and 20 = GPESJ47 (Guadeloupe). Trial A and trial B are two independent duplications of the experiment.

The 10 strains from worldwide locations and the 10 strains from Guadeloupe were distributed in three and two different groups, respectively, based on pathogen population densities (Table 5). At the end of trial B, 5 of 10 strains from worldwide locations and 7 of 10 strains from Guadeloupe had colonized SL₊₁₀ (Fig. 4). The 10 strains from worldwide locations and the 10 strains from Guadeloupe were distributed in four and three different groups, respectively, based on pathogen population densities (Table 5).

Genetic and pathogenic characterization of 20 strains of *X. albilineans*. Genetic variability of albicidin biosynthesis genes, amount of albicidin produced in vitro, disease severity, and intensity of stalk colonization were compared for 10 strains from worldwide locations and 10 strains from Guadeloupe (Table 6).

TABLE 6. Summary of genetic and pathogenic characteristics of 10 strains of *Xanthomonas albilineans* from worldwide locations and 10 strains of *X. albilineans* from Guadeloupe^w.

Strain	Combined haplotype ^x	Albicidin production group ^y	Disease severity Group ^z	Colonization Group ^z
I. Worldwide				
TWN052	HB3	M	H	H
HVO082	HA2	H	H-I	H
BLZ103	HB2	M	I-L	I-L
TWN107	HB3	M	I-L	I
BRA115	HB1	M	L	L
PNG130	HA10	L	L	L
DOM097	HB2	...	L	I-L
MTQ078	HB2	M	L	L
FJI080	HA8	M	L	L
Xa23R1	HA1	H	L	L
II. Guadeloupe				
GPEDC61	HB2	M	H	H
GPEF4	HB2	H	H	H
GPEG5	HB2	H	H-I	H
GPEDC38	HB2	H	I	H-I
GPEDC23	HB2	M	I	H-I
GPET16	HB2	H	I-L	I-L
GPEP14B	HB2	L	L	L
GPE48	HB2	M	L	L
GPESJ2	HB2	L	L	L
GPESJ47	HB2	H	L	L

^w Abbreviations: H = high, M = medium, I = intermediate, and L = low.

^x Data from Fig. 2.

^y Data from Tables 1 and 4 for locations worldwide and from Guadeloupe, respectively.

^z Data from Table 5I and II for locations worldwide and from Guadeloupe, respectively.

High variability in the amount of albicidin produced in vitro (albicidin groups L to H) was shown for strains that shared the same haplotype, particularly for strains from

Guadeloupe (combined haplotype HB2). Additionally, strains from worldwide locations (combined haplotypes HA1, HA2, HA8, HA10, HB1, HB2, and HB3) appeared randomly distributed in different albicidin production groups (albicidin groups L to H). The different disease severity and colonization groups (L to H) correlated very well for either strains from worldwide locations or strains from Guadeloupe. Additionally, strains from Guadeloupe (combined haplotype HB2) and strains from worldwide locations (combined haplotypes HA1, HA2, HA8, HA10, HB1, HB2, and HB3) were distributed in at least three disease severity or colonization groups, regardless of haplotype and albicidin group.

DISCUSSION

The recent description and sequencing of genes involved in albicidin production provided the first tools to study variation of genes involved in pathogenicity of *X. albilineans* and variation in disease caused by this sugarcane pathogen. In this study, we explored genetic diversity of genes involved in albicidin production by *X. albilineans* in relation to variation of pathogenicity that was assessed by albicidin production, disease severity on leaves, and pathogen population densities in the stalk.

Variability in albicidin biosynthesis genes was explored by RFLP and reliability of the technique was shown after comparison of strain Xa23R1 experimental banding patterns with theoretical banding patterns obtained from XALB1, XALB2 and XALB3 nucleotide sequences of this strain. The presence of fragments of unpredictable size (FUS) (Fig. 1) in experimental banding patterns resulted from unknown nucleotide sequences flanking regions XALB1, XALB2, and XALB3 in the genome of *X. albilineans*. RFLP characterization of the albicidin gene cluster of 137 strains of *X. albilineans* (representative of the genetic diversity already described within the species) with probes pALB571 and pBKS/K7 resulted in the identification of 14 combined haplotypes and two major genetic groups (ALB-RFLP A and ALB-RFLP B). The combined haplotypes correlated to the haplotypes of the genetic groups previously identified by Davis et al. (19) and Pilet et al. (42). In group ALB-RFLP A, combined haplotypes HA3, HA4, HA7, HA9, and HA10 are shared by single strains that belong to PFGE groups E, G, F, I and H, respectively; combined haplotype HA1 is shared by 3 strains, 2 belonging to PFGE group A and 1 of undetermined PFGE group; combined

haplotype HA2 is shared by 10 strains, 8 belonging to PFGE group C, 1 belonging to PFGE group J, and 1 of undetermined PFGE group; combined haplotype HA5 is shared by 13 strains, 10 belonging to PFGE group D and 3 of undetermined PFGE group; HA6 is shared by only 1 strain belonging to PFGE group D; and HA8 is shared by 4 strains, 3 belonging to PFGE group E and 1 of undetermined PFGE group. In genetic group ALB-RFLP B, combined haplotype HB1 is shared by 2 strains, HB2 by 96 strains (including 63 strains from Guadeloupe), HB3 by 2 strains, and HB4 belongs to a single strain. Ninety five of these strains belong to PFGE group B, 5 are of undetermined PFGE group and 1 strain, DOM097 (haplotype HB2), belongs to PFGE group A. All strains that were isolated after the recent outbreaks of leaf scald disease in several locations in the world, such as Cuba (21), Florida (12), Guadeloupe (49), Louisiana (26), Taiwan (10), and Texas (30) belong to ALB-RFLP and PFGE groups B. Therefore, our results, based on albicidin biosynthesis genes, confirm previous data which showed that recent outbreaks of the disease in several locations were associated with particular genetic variants of *X. albilineans* (19,21). Similar variation exists in genes involved in pathogenicity and other regions of the genome of *X. albilineans*, such as in repetitive DNA sequences (21). RFLP-based techniques have been used successfully to explore genetic variability specifically associated with pathogenicity, at species or pathovar level, of different phytopathogenic bacteria (14,20,24,34,40). However, polymerase chain reaction (PCR)-RFLP analysis of the *hrp* gene region of *Ralstonia solanacearum* showed phylogenetic relationships among strains of the pathogen that were similar to those identified by genomewide RFLP analysis (43). Similarly, pathovar-associated strains of *Pseudomonas syringae* could be identified by either specific probes carrying toxin-producing genes or a PCR-based technique, with primers amplifying enterobacterial repetitive intergenic consensus regions of the genome (36).

In Guadeloupe, the 63 strains of *X. albilineans* isolated between 1999 and 2002 in three sugarcane fields located in different climatic environments (Duclos, Godet and Saint-Jean) all belonged to ALB-RFLP group B. Bacteria were sampled from symptomatic sugarcane stalks and leaves or from water droplets at the surface of both symptomatic and asymptomatic sugarcane leaves, as described by Daugrois et al. (17). In Guadeloupe, disease leaf symptoms and sugarcane stalk infections can result from epiphytic populations of *X. albilineans* (16,17), and most of the 63 strains of

the pathogen were considered to originate from aerial contamination because they all were isolated from sugarcane fields established with disease-free tissue-cultured plants (17). Therefore, recent populations of *X. albilineans* in Guadeloupe appear genetically homogeneous, although several genetic variants, serovars and pathotypes have been reported in the past on this island (17,19,49).

The origin of the genetic polymorphism revealed in this study could not be clearly identified due to complex banding patterns and the absence of several DNA fragments that could not be observed in our experimental conditions. However, it can be hypothesized that haplotype differentiation based on one or several polymorphic bands within and between ALB-RFLP groups was due to a single nucleotide mutation affecting the recognition site of the restriction enzymes. Different haplotypes of *X. albilineans* produced similar albicidin amounts *in vitro*. Additionally, RFLP in albicidin biosynthesis genes was not related to variation in albicidin production. The ubiquitous presence of syringomycin in genetically heterogeneous strains of *P. syringae* pv. *syringae* also was reported (36). These results strongly suggest that mutations in albicidin biosynthesis genes are silent mutations or mutations that do not affect the activity of biosynthesis enzymes or that occurred in noncoding regions, assuming that most of the toxin biosynthesis genes are highly conserved in phytopathogenic bacteria and that single nonsilent mutations in toxin-producing genes mostly resulted in nontoxic phenotypes (Tox-) (3,27). Because the two albicidin probes hybridized with the genomic DNA of all strains of *X. albilineans*, no large rearrangements, deletions or insertions occurred in these strains of the pathogen. Additionally, the strains from Guadeloupe which belong to the same haplotype varied in albicidin production.

One strain of *X. albilineans* (REU173) did not produce any detectable albicidin. In this strain, a single nonsilent mutation in one (or more) albicidin gene(s) may be responsible for nontoxigenicity, as reported for toxins produced by other pathogenic bacteria (3) or fungi (55).

Variability in disease severity and intensity of stalk colonization was shown among the 10 strains from worldwide locations and the 10 strains from Guadeloupe, confirming the existence of different pathotypes within *X. albilineans* (1,17,38). Interestingly, very similar levels of variation in symptom severity and pathogen population density in the sugarcane stalk were observed among strains of *X. albilineans* from different

geographical origins and among strains that were isolated recently in a single geographic location (Guadeloupe). Additionally, for both sets of strains, a strong relationship was found between disease severity groups (based on symptom severity on leaves) and stalk colonization groups (based on pathogen population density in the upper part of the sugarcane stalk). This strong relationship was established with 20 different strains of *X. albilineans* and a single sugarcane cultivar. It confirmed the previous correlation between disease severity and stalk population in the upper part of the sugarcane stalk demonstrated with only a single strain of the pathogen and several cultivars differing in resistance to leaf scald (50).

Considerable diversity within the *syr* gene region and gene subclusters involved in syringomycin biosynthesis appeared to be involved in specific qualities relevant to plant-pathogen interactions (44). However, with most strains of *X. albilineans*, no obvious relationship was observed between variation in pathogenicity (disease severity or stalk colonization) and either albicidin genetic diversity or variability in albicidin production. Indeed, several weak pathogenic strains (disease severity and colonization groups L) produced low amounts of albicidin (albicidin production group L), but other weak pathogenic strains produced high amounts of the toxin *in vitro* and were expected to have better propensity to systemically colonize the sugarcane stalk (4). Additionally, strains belonging to either group ALB-RFLP A or B were found in each of the three disease severity groups, and high variability in disease severity was observed for genetically closely related strains from Guadeloupe. Similar variation in aggressiveness of genetically related strains of *R. solanacearum* isolated in a single geographic location was found by different DNA-based methods (28,31). Finally, strain REU173 of *X. albilineans*, that did not produce any detectable albicidin, was able to colonize the sugarcane stalk without inducing appearance of disease symptoms (data not shown).

The role of phytotoxins in the pathogenicity of *P. syringae* has been widely studied and led to contrasted observations. Syringomycin production did not stimulate bacterial growth *in planta*, whereas coronatine production resulted in significantly higher bacterial populations in mature lesions (27). Syringomycin hyperproducers were either indistinguishable from the wild type or markedly reduced in virulence (27). It is now largely assumed that variation in toxin production is regulated by sophisticated mechanisms in relation to the nutrient environment of phytopathogenic bacteria

(9,27,44,56). It was recently shown that variation in syringomycin production by *P. syringae* pv. *syringae* was regulated by genes located outside the toxin biosynthesis gene cluster (37). Another possible feature of these complex mechanisms is the coordinated control of other virulence factors (extracellular polysaccharides and a variety of extracellular enzymes) by the toxin-associated genes (3,27). Similarly, variability in albicidin production and in pathogenicity of *X. albilineans* could not be related to variation in albicidin biosynthesis genes. This variability may be correlated to either albicidin regulation genes not identified so far or to other genes involved in pathogenicity, and particularly stalk colonization by the pathogen. Additionally, the possible existence of races of the pathogen that was reported by several authors (1,38) may affect strains gathering or classification in the different disease severity or stalk colonization groups identified herein. Therefore, inoculation of sugarcane cultivars differing in resistance to the disease would be of interest to look for relationships between variation in pathogenicity and variation in albicidin production or variability of albicidin biosynthesis genes.

The role of toxins to act as virulence factors to increase disease severity or exhibit a function necessary for plant pathogenicity has been reported in different pathogenic bacteria (25,27). In *X. albilineans*, no *hrp* or *avr* genes have been found up to now (15,35). These genes, coding for essential pathogenicity factors of many plant-pathogenic bacteria, were not identified either in the recently sequenced genomes of two xylem-limited bacteria, *Xylella fastidiosa* and *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, pathogenic to citrus and sugarcane, respectively (39,53). In these pathogens, genes coding for plant cell-wall-degrading factors, exopolysaccharides, extracellular enzymes, adhesion, or other virulence factors probably play major roles in pathogenicity.

The role of albicidin in pathogenicity of *X. albilineans* was confirmed herein. However, variations in albicidin production and in pathogenicity of this pathogen were not related, exclusively, to the diversity of albicidin biosynthesis genes. Therefore, albicidin is necessary but not sufficient for leaf scald development, and it appears to be a virulence factor acting coordinately with other virulence factors. Identification of genes coding for these virulence factors and studying the contribution of these factors to pathogenicity, along with albicidin production, will be the next step in the comprehension of the molecular mechanisms involved in pathogenicity of *X. albilineans*.

AKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the “Conseil Régional de Guadeloupe” and the “Fonds Social Européen”. We thank R. Boisne-Noc, S. Duplan, I. Pieretti, J.-F. Bousquet, S. Joseph, R. Habas, M. Muller and E. Vivien for technical assistance and advices, X. Perrier for guidance in statistical analysis and M. J. Davis for critical reviewing of the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Autrey, L. J. C., Saumtally, S., Dookun, A., and Médan, H. 1995. Studies on variation in the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 21:485-497.
2. Autrey, L. J. C., Saumtally, S., Dookun, A., Sullivan, S., and Dhayan, S. 1995. Aerial transmission of leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 21:508-526.
3. Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, and biosynthesis by peptide and polyketide synthases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:266-292.
4. Birch, R. G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. Mol. Plant Pathol. 2:1-11.
5. Birch, R. G., and Patil, S. S. 1985. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 131:1069-1075.
6. Birch, R. G., and Patil, S. S. 1987. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. Physiol. Mol. Plant Pathol. 30:199-206.
7. Birch, R. G., and Patil, S. S. 1987. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. Physiol. Mol. Plant Pathol. 30:207-214.
8. Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Temporal analysis of epidemics. I: description and comparison of disease progression curves. Pages 161-202 in: Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons, New York.
9. Chatterjee, A. K., and Vidaver, A. K. 1986. Genetics of pathogenicity factors: application to phytopathogenic bacteria. Pages 1-224 in: Advances in Plant Pathology. Vol. 4. D. S. Ingram, P. H. Williams, eds. Academic, London.

10. Chen, C. T., Lin, C. P., and Liang, Y. G. 1993. Leaf scald of sugarcane in Taiwan. Taiwan Sugar 40:8-16.
11. Comstock, J. C. 2001. Foliar symptoms of sugarcane leaf scald. Sugar Journal 64:23-32.
12. Comstock, J. C., and Shine, J. M. 1992. Outbreak of leafscald of sugarcane, caused by *Xanthomonas albilineans*, in Florida. Plant Dis. 76:426.
13. Conover, W. J., and Iman, R. L. 1982. Analysis of covariance using the rank transformation. Biometrics 38:715-724.
14. Cook, D., Barlow, E., and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 2:113-121.
15. Costet, L., Gagnevin, L., Notaise, J., and Rott, P. 2002. Diversité génétique et variabilité du pouvoir pathogène des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre à la Réunion. Page 67 in: Résumés des Cinquièmes Rencontres de Phytobactériologie. CNRS/INRA, Aussois, France.
16. Daugrois, J. H., Champoiseau, P., and Rott, P. 2005. Epiphytic colonisation and infection by *Xanthomonas albilineans* of two sugarcane cultivars differing in resistance to leaf scald disease. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 25:678-685.
17. Daugrois, J.-H., Dumont, V., Champoiseau, P., Costet, L., Boisne-Noc, R., and Rott, P. 2003. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. Europ. J. Plant Pathol. 109:445-458.
18. Davis, M. J., Rott, P., Baudin, P., and Dean, J. L. 1994. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. Plant Dis. 78:78-82.
19. Davis, M. J., Rott, P., Warmuth, C. J., Chatenet, M., and Baudin, P. 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. Phytopathology 87:316-324.
20. Denny, T. P., Gilmour, M. N., and Selander, R. K. 1988. Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. J. Gen. Microbiol. 134:1949-1960.
21. Diaz, M., Peralta, E. L., Iglesia, A., Pazos, V., Carvajal, O., Perez, M. P., Giglioti, E. A., Gagliardi, P. R., Wendland, A., and Camargo, L. E. A. 2001. *Xanthomonas albilineans* haplotype B responsible for a recent sugarcane leaf scald disease outbreak in Cuba. Plant Dis. 85:334.
22. Dice, L. R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26:297-302.

23. Feldmann, P., Sapotille, J., Grédoire, P., and Rott, P. 1994. Micropropagation of sugarcane. Pages 15-17 in: *In Vitro Culture of Tropical Plants*. C. Teisson, ed. La Librairie du Cirad, Montpellier, France.
24. Gottwald, T. R., Alvarez, A. M., Hartung, J. S., and Benedict, A. A. 1991. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* strains associated with epidemics of citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries: correlation of detached leaf, monoclonal antibody, and restriction fragment length polymorphism assays. *Phytopathology* 81:749-753.
25. Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* 88:442-445.
26. Grisham, M. P., Legendre, B. L., and Comstock, J. C. 1993. First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Louisiana. *Plant Dis.* 77:537.
27. Gross, D. C. 1991. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29:247-278.
28. Horita, M., and Tsuchiya, K. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91:399-407.
29. Huang, G., Zhang, L., and Birch, R. G. 2000. Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. *Gene* 258:193-199.
30. Isakeit, T., and Irvine, J. E. 1995. First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Texas. *Plant Dis.* 79:860.
31. Jaunet, T. X., and Wang, J.-F. 1998. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* 89:320-327.
32. Klett, P., and Rott, P. 1994. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. *J. Phytopathol.* 142:283-291.
33. Koike, H. 1965. The aluminium cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* 55:317-319.
34. Lazo, G. R., Roffey, R., and Gabriel, D. W. 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment length polymorphisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:214-221.
35. Leite, R. P., Minsavage, G. V., Bonas, U., and Stall, R. E. 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1068-1077.
36. Little E. L., Bobstock, R. M., and Kirkpatrick, B. C. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3818-3823.

37. Lu, S.-E., Scholz-Schroeder, B. K., and Gross, D. C. 2001. Characterization of the *salA*, *syrF*, and *syrG* regulatory genes located at the right border of the syringomycin gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:43-53.
38. Mohamed, I. S., Rott, P., Davis, M. J., and Chatenet, M. 1996. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains based on multiplication of the pathogen in sugarcane varieties. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 22:486-492.
39. Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Van Sluys, M. A., Kitajima, J. P., Truffi, D., do Amaral, A. M., Harakava, R., de Oliveira, J. C. F., Wood, D., de Oliveira, M. C., Miyaki, C., Takita, M. A., da Silva, A. C. R., Furlan, L. R., Carraro, D. M., Camarotte, G., Almeida N. F. Jr., Carrer, H., Coutinho, L. L., El-Dorry, H. A., Ferro, M. I. T., Gagliardi, P. R., Giglioti, E., Goldman, M. H. S., Goldman, G. H., Kimura, E. K., Ferro, E. S., Kuramae, E. E., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Mauro, S. M. Z., Machado, M. A., Marino, C. L., Mench, C. F., Nunes, L. R., Oliveira, R. C., Pereira, G. G., Siqueira, W., de Souza, A. A., Tsai, S. M., Zanca, A. S., Simpson, A. J. G., Brumbley, S. M., and Setúbal, J. C. 2004. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:827-836.
40. Mundt, C. C., Nieva, L. P., and Vera Cruz, C. M. 2002. Variation for aggressiveness within and between lineages of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant. Pathol.* 51:163-168.
41. Ovalle, W., Comstock, J., Juarez, J., and Soto, G. 1995. First report of leaf scald of sugarcane (*Xanthomonas albilineans*) in Guatemala. *Plant Dis.* 79:212.
42. Pilet, F., Clerc, F., Royer, M., Chatenet, M., Trigalet-Demery, D., and Rott, P. 2000. Différenciation des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre par RFLP et AFLP. Page 48 in: Résumés des Quatrièmes Rencontres de Phytobactériologie. CNRS/INRA, Aussois, France.
43. Poussier, S., Vanderwalle, P., and Luisetti, J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2184-2194.
44. Quigley, N. B., and Gross, D. C. 1994. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:78-90.
45. Rott, P., Abel, M., Soupa, D., Feldmann, P., and Letourmy, P. 1994. Population dynamics of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane plants as determined with an antibiotic-resistant mutant. *Plant Dis.* 78:241-247.

46. Rott, P., Chatenet, M., Granier, M., and Baudin, P. 1988. L'échaudure des feuilles de la canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. II. Diagnostic et spectres d'hôtes de l'agent pathogène en Afrique tropicale. *Agron. Trop.* 43:244-252.
47. Rott, P., Costet, L., Davis, M. J., Frutos, R., and Gabriel D. W. 1996. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J. Bacteriol.* 178:4590-4596.
48. Rott, P., and Davis, M. J. 2000. Leaf scald. Pages 38-44 in: *A Guide to Sugarcane Diseases*. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft and A. S. Saumtally, eds. La librairie du Cirad, Montpellier, France.
49. Rott, P., Davis, M. J., and Baudin, P. 1994. Serological variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Pathol.* 43:344-349.
50. Rott, P., Mohamed, I. S., Klett, P., Soupa, D., de Saint-Albin, A., Feldmann, P., and Letourmy, P. 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology* 87:1202-1213.
51. Royer, M., Costet, L., Vivien, E., Bes, M., Cousin, A., Damais, A., Pieretti, I., Savin, A., Megessier, S., Viard, M., Frutos, R., Gabriel, D. W., and Rott, P. C. 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:414-427.
52. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
53. Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bové, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A., Camargo, L. E. A., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C. R., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A. P., Ferreira, A. J. S., Ferreira, V. C. A., Ferro, J. A., Fraga, J. S., França, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C. C., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Madeira, H. M. F., Marino, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A. L., Martins, E. M. F., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F. M., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteiro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L. T. O., Netto, L. E. S., Nhani, A., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., de Oliveira, M. C., de Oliveira, R. C., Palmieri, D. A., Par-

- is, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A. G., Pereira, H. A., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., de M. Rosa, A. J., de Rosa, V. E., de Sá, R. G., Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., da Silva, A. C. R., da Silva, A. M., da Silva, F. R., Silva, W. A., da Silveira, J. F., Silvestri, M. L. Z., Siqueira, W. J., de Souza, A. A., de Souza, A. P., Terenzi, M. F., Truffi, D., Tsai, S. M., Tshako, M. H., Vallada, H., Van Sluys, M. A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A. L., Zago, M. A., Zatz, M., Meidanis, J., and Setubal, J. C. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-157.
54. Sneath, P. H. A., and Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
 55. Van der Broek, P., Pittet, A., and Hajjaj, H. 2001. Aflatoxin and the aflatoxigenic potential of Koji moulds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:192-199.
 56. Von Bodman, S. B., Bauer, W. D., and Coplin, D. L. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 41:455-482.
 57. Vivien, E., Megessier, S., Pieretti, I., Cociancich, S., Frutos, R., Gabriel, D. W., Rott, P. C., and Royer, M. 2005. *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* 251:81-89.
 58. Wall, M. K., and Birch, R. G. 1997. Genes for albicidin biosynthesis and resistance span at least 69 kb in the genome of *Xanthomonas albilineans*. *Lett. Applied. Microbiol.* 24:256-260.
 59. Zhang, L., Xu, J., and Birch, R. G. 1999. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nat. Biotechnol.* 17:1021-1024.

CHAPITRE IV.

**Vers l'identification de gènes impliqués
dans le pouvoir pathogène
de *X. albilineans***

CHAPITRE IV. Vers l'identification de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans*

Dans la première partie de cette étude, nous avons effectué des recherches pour tenter d'expliquer l'origine de la variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans* en se basant sur les gènes impliqués dans la biosynthèse d'une de ses composantes majeures, l'albicidine. Les résultats obtenus, qui ont fait l'objet de la discussion du chapitre II, ont certes permis de confirmer des mécanismes déjà connus de la pathogénie de *X. albilineans*, mais ont surtout apporté de nouveaux éléments de recherche pour la compréhension de ces mécanismes génétiques et moléculaires. En effet, il est apparu que la variabilité des gènes de biosynthèse de l'albicidine ou la variation de la production de la toxine ne pouvaient expliquer, à elles seules, la variation de virulence ou d'agressivité de *X. albilineans*. D'autres facteurs, codés par d'autres gènes encore indéterminés, doivent jouer un rôle important dans l'expression et la variation de cette pathogénie, et notamment la capacité de colonisation de la tige de canne à sucre.

Ce quatrième chapitre de thèse décrit la seconde partie de cette étude au cours de laquelle un ensemble de techniques moléculaires et physiologiques ont été mises en œuvre dans le but d'identifier et de caractériser de nouveaux gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans*, à partir d'une collection de souches génétiquement proches et différentes de par leur agressivité.

RESUME

Une grande variabilité du pouvoir pathogène (intensité de colonisation de la tige et sévérité de la maladie) parmi 9 souches de *X. albilineans* a été identifiée après inoculation du cultivar de canne à sucre B69566, sensible à la maladie, et 4 groupes de colonisation (SCG1 à SCG4) ont été décrits. Une grande homogénéité génétique a été observée parmi ces 9 souches grâce à une analyse RFLP sur l'ensemble du génome (haplotype B-02) et au niveau des gènes de biosynthèse de l'albicidine (haplotype HB2). En revanche, une faible variabilité et 2 groupes génétiques (AFLP-A et

AFLP-B) ont été identifiés grâce à une analyse AFLP, mais aucune relation entre ces groupes génétiques et les groupes de colonisation de tige n'a pu être mise en évidence.

Quarante couples d'amorces ont été utilisés pour amplifier, par PCR, des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de bactéries proches de *X. albilineans*, et seulement 3 gènes (*pilB*, *rpfA*, et *xpsE*) ont pu être identifiés chez *X. albilineans*. Par ailleurs, la comparaison de séquences nucléotidiques partielles de ces 3 gènes et de 2 gènes de ménage (*efp* et *ihfA*) n'a révélé aucune variabilité parmi les 9 souches de Guadeloupe dont le pouvoir pathogène était différent. Une analyse phylogénétique basée sur les séquences de ces gènes a montré que *X. albilineans* se trouvait sur une route évolutive entre *Xylella fastidiosa*, une autre bactérie phytopathogène du xylème, et un groupe formé par d'autres *Xanthomonas*.

Ce travail est présenté sous la forme d'un article qui a été soumis et accepté dans la revue *Phytopathology* :

Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Pieretti, I., Cociancich, S., Royer, M., and Rott, P. 2006. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology*. Accepté le 01 mai 2006.

High Variation in Pathogenicity of Genetically Closely Related Strains of *Xanthomonas albilineans*, the Sugarcane Leaf Scald Pathogen, in Guadeloupe

P. Champoiseau, J.-H. Daugrois, I. Pieretti, S. Cociancich, M. Royer and P. Rott

First and second authors: CIRAD département Cultures annuelles, UPR Multiplication Végétative, Station de Roujol, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies; third, fourth, fifth and sixth authors: UMR 385 Agro.M-CIRAD-INRA Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, TA 41/K, Campus International de Bailarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Accepted for publication 01 May 2006.

Corresponding author: P. Rott; E-mail address: philippe.rott@cirad.fr

ABSTRACT

Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Pieretti, I., Cociancich, S., Royer, M., and Rott., P. 2006. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology* 96:XXX-XXX.

Pathogenicity of 75 strains of *X. albilineans* from Guadeloupe was assessed by inoculation of sugarcane cv. B69566, which is susceptible to leaf scald, and 19 of the strains were selected as representative of the variation in pathogenicity observed based on stalk colonization. In vitro production of albicidin varied among these 19 strains, but the restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern of their albicidin biosynthesis genes was identical. Similarly, no genomic variation was found among strains by pulse-field gel electrophoresis (PFGE). Some variation among strains was found by amplified fragment length polymorphism (AFLP), but no relationship between this genetic variation and variation in pathogenicity was found. Only three (*pilB*, *rpfA* and *xpsE*) of 40 genes involved in pathogenicity of bacterial species

closely related to *X. albilineans* could be amplified by polymerase chain reaction (PCR) from total genomic DNA of all nine strains tested of *X. albilineans* differing in pathogenicity in Guadeloupe. Nucleotide sequences of these genes were 100% identical among strains, and a phylogenetic study with these genes and housekeeping genes *ihfA* and *efp* suggested that *X. albilineans* is on an evolutionary road between the *Xanthomonas campestris* group and *Xylella fastidiosa*, another vascular plant pathogen. Sequencing of the complete genome of *X. albilineans* could be the next step in deciphering molecular mechanisms involved in pathogenicity of *X. albilineans*.

INTRODUCTION

Xanthomonas albilineans is a systemic, xylem-invading pathogen that causes leaf scald of sugarcane (*Saccharum* interspecific hybrids). This disease occurs in at least 66 countries in the world and can cause severe yield losses (38). Leaf symptoms vary from a single, white, narrow, sharply defined stripe to complete wilting and necrosis of infected leaves, leading to plant death in the most susceptible cultivars. A common symptom in mature cane is the abnormal development of side shoots on stalks (38). Observation of symptoms on leaves or determination of bacterial population density in sugarcane stalk are generally used to assess disease severity and resistance after artificial inoculation of sugarcane (15,17,26,40).

The sugarcane leaf scald pathogen is mainly spread in infected sugarcane cuttings (38), and colonization of the sugarcane stalk is a critical step in disease progress. Pathogenicity of *X. albilineans*, based on the capacity of the pathogen to colonize sugarcane stalks and/or to cause symptoms varies according to the strain of the pathogen, indicating the existence of different pathotypes within the species (12,15,28). A major toxic compound, called albicidin and specifically produced by *X. albilineans*, plays a key role in pathogenicity (4,7,8,53). Albicidin inhibits DNA replication of proplastids, thus blocking plastid development (8). Albicidin also inhibits DNA replication of *Escherichia coli* and has antibiotic activity against several gram-positive and gram-negative bacteria (5,6). Albicidin also confers hypothetically an advantage for sugarcane stalk colonization and disease development (4). However, no relationship was found between variation in toxin biosynthesis and variation in pathogenicity of *X. albilineans* (12). Another important feature in pathogenicity of *X. albilineans* is the ability

of the pathogen to colonize the sugarcane leaf surface, and subsequently to cause disease (15). Aerial transmission of the pathogen has been shown to occur in several geographic locations in the world, and was associated to recent outbreaks of the disease (2,13,15). In Guadeloupe, two strains of *X. albilineans* differed in their capacity to colonize the sugarcane leaf surface (15).

In *X. albilineans*, high variability has been shown for many different characteristics, such as colony and cell morphology, whole-cell proteins, fatty acid methyl esters, bacteriophage reaction and immunological properties (serovars) (37). More recently, several genetic variants of the pathogen (haplotypes) and different albicidin production groups (albivars) were identified within the species (12,17,31). Most, if not all, of the disease outbreaks that occurred in the last two decades were attributed to genetic variants of *X. albilineans* identified by restriction fragment length polymorphism with pulse-field gel electrophoresis (RFLP-PFGE) or by repetitive-sequence-based (rep)-PCR (17,18). Ten PFGE groups (A to J) were described and strains associated with new outbreaks all belonged to PFGE group B. Strains belonging to PFGE group B were also ranked in single genetic groups by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and after hybridization of total genomic DNA of *X. albilineans* with DNA probes that harbor albicidin biosynthesis genes (12,31). However, no relationship has been found between genetical, physiological and serological variability and variation in pathogenicity of the pathogen from different geographic locations, including Guadeloupe (12). Absence of relationship between variation in albicidin biosynthesis genes and variation in pathogenicity strongly suggested that other virulence factors must play a key role, concurrently with albicidin production.

Mutagenesis by random insertion of transposon Tn5 into genomic DNA has been used successfully for detection and characterization of pathogenicity related genes in several phytopathogenic bacteria (19,36,46). Similarly, AFLP technique was useful to identify bacterial pathogenicity islands, genes involved in pathogenic fitness and regulators of virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, after excision, amplification, cloning and sequence homology analysis of polymorphic bands from AFLP gels (22). Screening of large number of transposon mutants of *X. albilineans* in sugarcane plants would be tedious, and consume much time and space since sugarcane is a relatively large plant and disease symptoms appear only several weeks after plant inoculation.

The objective of this study was to investigate the variability in pathogenicity of *X. albilineans* from a single location (Guadeloupe), and to identify putative pathogenicity associated markers in this pathogen. Various molecular biology methods were investigated, such as RFLP, AFLP, and PCR amplification of known pathogenicity genes, along with physiological tests regarding factors involved in pathogenicity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and DNA preparation. Seventy-five isolates of *X. albilineans* were collected in 2003 in Guadeloupe from different sugarcane growing locations. Single colonies were isolated on selective agar medium (XAS) after 5 days of growth at 28°C (16). Bacterial strains were stored at -20° C as turbid water suspensions immediately after isolation and retrieved on modified Wilbrink's (MW) agar medium for 3 to 5 days at 28°C just before inoculum preparation (35). Serological characteristics of strains were determined as described by Rott et al. (39). For each strain, albidin production was quantified in vitro by a microbiological assay as described by Champoiseau et al. (12). *X. albilineans* strain Xa23R1 from Florida (36), *X. campestris* pv. *campestris* strain CFBP 5251 (E. Vivien, personal communication), *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 91-118 (1) and *X. arboricola* pv. *pruni* strain CFBP 6653 (9) were grown on MW agar for 3 days at 28°C.

Escherichia coli strain DH5 α (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) was grown on Luria-Bertani (LB) agar medium for 24 h at 37°C (42).

Total genomic DNA of bacterial strains was extracted using the Qiagen extraction DNeasy Tissue kit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations, and adjusted to a final concentration of 20-25 ng/ μ l.

Pathogenicity assays. Two greenhouse experiments were set up in Guadeloupe to assess pathogenicity of *X. albilineans* strains by measuring disease severity on leaves and stalk colonization by the pathogen. The experiments were conducted with disease-free tissue-cultured plants of sugarcane cv. B69566 which is susceptible to leaf scald (40). Plants were propagated in vitro and transferred to the greenhouse as described by Feldmann et al. (20). Four-week-old plants were individually grown in a greenhouse in 4-liter pots containing an equal volume of field soil and volcanic rock.

During plant growth, secondary shoots were systematically removed to keep a single stalk per plant.

Four-month-old plants were inoculated with 108 CFU/ml bacterial suspensions by the decapitation technique as described by Rott et al. (40).

In the first trial (trial A), plants were inoculated with 75 strains of *X. albilineans* (Table 1). Plants were then distributed in the greenhouse using a randomized complete block design with five replications of one plant each. The second trial (trial B) was set up four months after trial A, and plants were inoculated with 19 strains of *X. albilineans* that were representative of the variability in pathogenicity identified in trial A (Table 2). After inoculation, plants were distributed in the greenhouse using a randomized complete block design with four replications of four plants each. Control plants inoculated with sterile distilled water were included in both trials to evaluate any naturally occurring cross contamination (17).

TABLE 1. Characteristics of *Xanthomonas albilineans* strains from Guadeloupe used in this study.

Strain ^x	Origin	Sampling date	Sugarcane		Albicidin production:
			host cv.	Isolated from ^y	GIR (in mm) ^z
GPEPC1	Roujol, Petit-Bourg	Jan. 2003	HJ5741	Leaf surface	2.3 (0.4)
GPEPC5	Roujol, Petit-Bourg	Jan. 2003	HJ5741	Stalk	2.3 (0.2)
GPEPC7	Roujol, Petit-Bourg	Jan. 2003	HJ5741	Stalk	2.3 (0.4)
GPEPC9	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B60182	Leaf symptom	2.8 (0.6)
GPEPC11	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B60233	Leaf symptom	3.3 (0.4)
GPEPC13	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B61337	Leaf symptom	2.8 (0.9)
GPEPC15	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B64217	Leaf symptom	1.0 (0.3)
GPEPC17	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B64277	Leaf symptom	2.5 (0.3)
GPEPC19	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B721	Leaf symptom	2.2 (0.2)
GPEPC20	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B711001	Leaf symptom	0.5 (0)
GPEPC21	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B74125	Leaf symptom	2.0 (0)
GPEPC23	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B73520	Leaf symptom	2.5 (0.3)
GPEPC25	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B67215	Leaf symptom	1.2 (0.6)
GPEPC30	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B73146	Leaf symptom	3.0 (0.3)
GPEPC32	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B75548	Leaf symptom	4.2 (0.6)
GPEPC33	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B7678	Leaf symptom	0.5 (0)
GPEPC34	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B76345	Leaf symptom	0.8 (0.2)
GPEPC36	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B79222	Leaf symptom	3.0 (0)
GPEPC37	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B78172	Leaf symptom	2.7 (0.2)
GPEPC39	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	B83127	Leaf symptom	3.0 (0.3)
GPEPC42	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	R84379	Leaf symptom	3.5 (0)
GPEPC44	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	R832065	Leaf symptom	2.8 (0.2)
GPEPC46	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	BBZ8108	Leaf symptom	2.3 (0.2)
GPEPC49	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	Beqa	Leaf symptom	2.8 (0.6)
GPEPC50	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	BISCUIT	Leaf symptom	0.3 (0.2)
GPEPC52	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	BJ7938	Leaf symptom	3.3 (0.4)
GPEPC53	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	BJ84135	Leaf symptom	0.2 (0.2)

(Continued on next page)

TABLE 1. (continued from preceding page)

Strain ^x	Origin	Sampling date	Sugarcane		Albicidin production:
			host cv.	Isolated from ^y	GIR (in mm) ^z
GPEPC54	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	BJ82119	Leaf symptom	4.0 (0)
GPEPC55	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	BNSxSES4	Leaf symptom	0.0 (0)
GPEPC57	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	BR6223	Leaf symptom	0.0 (0)
GPEPC59	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	BT7716	Leaf symptom	2.2 (1.1)
GPEPC61	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	CB4013	Leaf symptom	3.8 (0.2)
GPEPC64	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	D61107	Leaf symptom	2.7 (0.4)
GPEPC65	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	DB62639	Leaf symptom	4.0 (0.3)
GPEPC67	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	EROS	Leaf symptom	2.5 (0.3)
GPEPC68	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	F 148	Leaf symptom	2.0 (0)
GPEPC71	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	FR90771	Leaf symptom	3.2 (0.4)
GPEPC73	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	H 631418	Leaf symptom	0.0 (0)
GPEPC75	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	IAC58-480	Leaf symptom	3.0 (0)
GPEPC77	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	LF610003	Leaf symptom	3.2 (0.8)
GPEPC79	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	M377/56	Leaf symptom	0.0 (0)
GPEPC80	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	PR1116	Leaf symptom	3.5 (0)
GPEPC81	Roujol, Petit-Bourg	Feb. 2003	ONO	Leaf symptom	1.3 (0.2)
GPEPC83	St. Jean, Petit-Bourg	March 2003	FR90714	Leaf symptom	...
GPEPC84	St. Jean, Petit-Bourg	March 2003	SP71-6168	Leaf symptom	3.2 (0.2)
GPEPC86	Meynard, Petit-Bourg	March 2003	B69566	Leaf symptom	2.0 (0)
GPEPC87	Meynard, Petit-Bourg	March 2003	B69566	Leaf symptom	2.7 (0.2)
GPEPC89	G. Montagne, Lamentin	March 2003	B69566	Leaf symptom	0.5 (0)
GPEPC90	P. Canal, Port-Louis	March 2003	B69566	Leaf symptom	1.7 (0.2)
GPEPC91	P. Canal, Port-Louis	March 2003	B69566	Leaf symptom	0.5 (0)
GPEPC92	P. Canal, Port-Louis	March 2003	B69566	Leaf symptom	1.5 (1.0)
GPEPC94	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	0.8 (0.4)
GPEPC101	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf surface	0.0 (0)
GPEPC103	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	2.0 (0)
GPEPC106	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	1.5 (0.3)
GPEPC109	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	2.3 (0.2)
GPEPC112	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	1.2 (0.4)
GPEPC117	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	...
GPEPC120	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	...
GPEPC125	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	0.8 (0.4)
GPEPC126	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	0.0 (0)
GPEPC127	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	2.2 (0.2)
GPEPC128	Dormoy, Capesterre B. Eau	March 2003	B69566	Leaf symptom	2.8 (0.2)
GPEPC131	Christophe Ouest, Goyave	March 2003	B69566	Leaf symptom	3.3 (0.2)
GPEPC133	Christophe Ouest, Goyave	March 2003	B69566	Leaf symptom	3.5 (0.7)
GPEPC135	St. Louis, Marie-Galante	March 2003	B69566	Stalk	1.0 (0.7)
GPEPC137	St. Louis, Marie-Galante	March 2003	B69566	Stalk	...
GPEPC139	St. Louis, Marie-Galante	March 2003	B69566	Leaf symptom	2.7 (0.2)
GPEPC140	St. Louis, Marie-Galante	March 2003	B69566	Stalk	0.5 (0)
GPEPC141	St. Louis, Marie-Galante	March 2003	B69566	Leaf symptom	0.5 (0)
GPEPC142	Cluny, Sainte-Rose	March 2003	B69566	Leaf symptom	4.3 (0.2)
GPEPC143	Cluny, Sainte-Rose	March 2003	B69566	Leaf symptom	4.3 (0.2)
GPEPC145	Cluny, Sainte-Rose	March 2003	B69566	Leaf symptom	0.0 (0)
GPEPC146	Cluny, Sainte-Rose	March 2003	B69566	Leaf symptom	2.3 (0.2)
GPEPC148	Roujol, Petit-Bourg	March 2003	NCo 376	Stalk	0.8 (0.4)

^x All strains belonged to serovar I as described by Rott et al. (40).

^y Strains from the leaf surface were isolated from water droplets collected from the leaf surface of symptomless sugarcane plants. Strains from the stalk were isolated from stalk tissue sampled from diseased sugarcane stalks. Strains from leaf symptoms were isolated from leaves showing necrosis.

^z Albicidin production was determined as described by Champoiseau et al. (12).

Growth inhibition ring (GIR) of *Escherichia coli* values are the means of three plates for each strain of *X. albilineans*. Values in brackets are square means.

TABLE 2. Disease severity on leaves and extent of stalk colonization of sugarcane cv. B69566 after inoculation with 19 strains of *Xanthomonas albilineans* from Guadeloupe.

Strain ^x	Disease severity ^y				Extent of stalk colonization ^z			
	Trial A		Trial B		Trial A		Trial B	
	Mean (square mean)		Mean (square mean)		Mean (square mean)		Mean (square mean)	
GPEPC17	0	(0)	0	(0)	0	(0)	12.2	(14.5)
GPEPC23	0	(0)	1.3	(2.5)	3.8	(6.0)	7.5	(7.6)
GPEPC52	28.0	(33.6)	52.7	(27.8)	34.1	(27.3)	63.3	(26.2)
GPEPC73	52.0	(25.6)	78.8	(6.9)	81.3	(9.4)	93.4	(7.6)
GPEPC75	16.0	(21.6)	26.3	(25.3)	51.0	(20.8)	60.8	(23.7)
GPEPC79	26.0	(31.2)	40.0	(22.5)	30.5	(17.8)	67.2	(19.4)
GPEPC80	8.0	(12.8)	14.7	(17.6)	4.0	(6.4)	48.0	(21.2)
GPEPC81	0	(0)	2.5	(4.4)	32.6	(28.9)	16.6	(15.6)
GPEPC83	0	(0)	2.5	(4.4)	54.5	(18.6)	42.8	(25.9)
GPEPC84	4.0	(6.4)	0	(0)	3.3	(5.3)	12.2	(10.5)
GPEPC86	0	(0)	0	(0)	0	(0)	18.2	(16.6)
GPEPC87	28.0	(17.6)	36.9	(26.5)	61.3	(29.1)	74.2	(16.7)
GPEPC91	0	(0)	28.1	(26.6)	23.3	(25.7)	56.7	(27.6)
GPEPC101	0	(0)	0	(0)	5.0	(8.0)	4.9	(5.1)
GPEPC106	0	(0)	0	(0)	6.7	(10.7)	16.8	(11.8)
GPEPC125	0	(0)	3.1	(5.9)	3.0	(4.8)	10.2	(10.1)
GPEPC142	8.0	(12.8)	18.8	(21.1)	39.7	(27.6)	42.3	(16.5)
GPEPC143	50.0	(24.0)	44.4	(16.3)	63.4	(5.7)	73.2	(8.7)
GPEPC145	20.0	(8.0)	43.8	(15.8)	55.8	(10.3)	69.1	(11.4)

Variance analysis								
Source	DF	<i>P</i> > <i>F</i>	DF	<i>P</i> > <i>F</i>	DF	<i>P</i> > <i>F</i>	DF	<i>P</i> > <i>F</i>
Strain	18	< 0.0001	18	< 0.0001	18	< 0.0001	18	< 0.0001
Bloc	4	0.137	3	0.383	4	0.287	3	0.566
Strain x bloc	54	0.544	54	0.246
Error	72	...	225	...	71	...	228	...

^x The experiment was set up in a greenhouse in Guadeloupe (French West Indies), using a randomized complete block design with 5 replications of one plant each in trial A and 4 replications of 4 plants each in trial B. Only data of the 19 strains common to both trials were used for statistical analysis.

^y Disease severity was calculated with the scores (0 to 5 scale) of foliar symptoms on non-inoculated leaves determined at 12 weeks after inoculation. Each value corresponds to the mean value of 5 and 16 plants for each strain in trial A and trial B, respectively.

^z Extent of stalk colonization (ESC) of the sugarcane stalk was determined with bacterial population densities in every two internodes above SL₀ in trial A and in all internodes above SL₀ in trial B (SL₀ was considered the entry point of the pathogen into the sugarcane stalk after inoculation of the stalk by the decapitation technique). ESC was determined using a 0 to 4 scale and expressed as $100 [(1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4) / 4 \times N_7]$ where N_i = number of internodes with score i and N_7 = total number of internodes.

Disease severity was assessed as described by Champoiseau et al. (12). Briefly, symptoms were recorded on non-inoculated leaves using a symptom severity scale ranging from 0 to 5, where 0 = no symptoms, 1 = one or two pencil-line streaks, 2 = more than two pencil-line streaks, 3 = leaf chlorosis or bleaching, 4 = leaf necrosis, and 5 = death of the plant. Inoculated plants were rated individually based on the score of the leaf showing the most severe symptom. Disease severity was expressed as $DS = 100 [(1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4 + 5 \times N_5) / 5 \times N_7]$ where N_i = number

of plants with score i and N_T = total number of plants. Symptoms were recorded 12 weeks after inoculation in trial A and trial B.

Pathogen populations in different stalk locations were determined 17 and 16 weeks after plant inoculation in trial A and trial B, respectively, by the stalk blot inoculation technique with XAS selective medium, as previously described (12). In both trials, pathogen populations were determined at SL_0 to control efficiency of plant inoculation. SL_0 corresponded to the location of 3 shortened stalk internodes that showed reduced growth after mechanical plant inoculation (cut leaves above the growing point). These internodes were attached to the inoculated leaves and were therefore considered to be the entry point of the pathogen into the sugarcane stalk. In trial A, pathogen populations were also determined in every 2 internodes above SL_0 (SL_{+2} , SL_{+4} , ..., SL_{+X} , where X = last even numbered internode near the apex of the sugarcane stalk). In trial B, pathogen populations were determined in every internode below SL_0 (SL_{-1} , SL_{-2} , ..., SL_{-Y} , where Y = first internode of the sugarcane stalk near the soil level) and in every internode above SL_0 (SL_{+1} , SL_{+2} , ..., SL_{+Z} , where Z = last internode near the apex of the sugarcane stalk). Pathogen population densities were assessed in the two trials using a 0 to 4 scale, where 0 = no bacterial colony in the stalk imprint, 1 = 1 to 10 colonies in the stalk imprint, 2 = more than 10 colonies or confluent growth of bacteria in less than 25% of the stalk imprint, 3 = confluent growth of bacteria in 25 to 75% of the stalk imprint, 4 = confluent growth of bacteria in more than 75% of the stalk imprint. Visual identification of *X. albilineans* colonies or confluent growth was verified arbitrarily by serology (39).

Extent of stalk colonization (ESC) was expressed as $ESC = 100 [(1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4)/4 \times N_T]$, where N_i = number of internodes with score i and N_T = total number of internodes.

RFLP analysis of total genomic DNA. Pulse-field gel electrophoresis was used for RFLP analysis of the 19 strains of *X. albilineans* selected herein (Table 2), after restriction of total genomic DNA with the rare cutting site enzyme *SpeI*, as described by Davis et al. (17). Strain Xa23R1 from Florida (41) was used as the reference strain.

RFLP analysis of albicidin biosynthesis genes. Two DNA plasmids (pALB571 and pBKS/K7), which cover all 3 genomic regions involved in albicidin biosynthesis,

were used as probes for RFLP analysis of the 19 strains of *X. albilineans* selected herein (Table 2), as described by Champoiseau et al. (12). Strain Xa23R1 from Florida was used as the reference strain.

AFLP analysis. Template DNA, enzymes for restriction, specific adaptors for ligation and primers for selective amplification were designed based on a preliminary study by Pilet et al. (31). Eighty to 100 ng DNA were digested for 2 h at 37°C (followed by 10 min at 65°C) in a 25- μ l reaction mixture with 6/6.4 units of *MspI*/*SacI* enzyme combination (Promega Corp., Madison, WI), and ligated with specific adaptors. Double stranded DNA adaptors were prepared by 15 min denaturation at 75°C and overnight renaturation of the two oligonucleotides in a reaction mixture containing 1x enzyme buffer and 20 μ M of each oligonucleotide. *MspI* adaptor (5'-GACGATGAGTCCTGAA-3' and 3'-GCTACTCAGGACTTGC-5') and *SacI* adaptor (5'-CTCGTAGACTGCGTACAAGCT-3' and 3'-GCATCTGACGCATGT-5') were ligated to restricted DNA for 2.5 h at 14°C in 50- μ l reaction mixture (25 μ l restricted DNA, 1x ligase buffer, 4.2 units T4 DNA ligase [Promega Corp., Madison, WI], 2x BSA, 50 pmol *MspI* adaptor, and 5 pmol *SacI* adaptor). The ligation solution was diluted 2.5-fold in water and stored at -20°C before selective amplification.

The following combinations of selective primers were used for AFLP analysis because they generated reliable and easily identifiable DNA fingerprints in preliminary experiments (data not shown): *SacI* + G (5'-TAGACTGCGTACAAGCTCG-3') / *MspI* + Y (5'-CGATGAGTCCTGAACGGY-3'), where Y = A, T, G or CT. *SacI* selective primer was labeled with ³³P ATP using the T4 kinase according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen, Carlsbad, CA), and used for amplification. Five microliters of the ligation solution were amplified in a 20- μ l reaction mixture (1x enzyme buffer, 2 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP, 0.1 μ M ³³P labeled *SacI* primer, and 1 μ M *MspI* primer) containing 1 unit of Taq DNA polymerase (Eurobio, Paris, France). PCR amplifications were performed in an automated thermal cycler with initial cycle at 94°C for 30 s, 65°C for 30 s and 72°C for 60 s, followed by 12 cycles with subsequent reduction of annealing temperature by 0.7°C per cycle, and 23 cycles at 94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 60 s. After amplification, 20 μ l of sequencing dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.025% xylene cyanol, and 0.025% bromophenol blue) were added to each reaction mixture, and the final solution was heated at 94°C for 3 min and kept warm at 70°C during loading of the electrophoresis gel. A 6- μ l aliquot of

each sample was separated on a 5% polyacrylamide denaturing gel containing 7.5 M urea and 0.5x TBE running buffer (Qbiogene, Illkirch, France) at 55 W for 1.8 to 2.0 h, in a 30 x 40 cm sequencing apparatus. After electrophoresis, gels were covered with Saran Wrap, transferred to Whatman 3 mm chromatography paper, dried under vacuum at 80°C for 30 min and exposed to radiographic films for 12 to 24 h. Duplicated AFLP fingerprints were obtained for each strain and each selective primer combination with two different DNA preparations. Only reproducible and strong DNA bands observed in both duplications were scored for DNA analysis.

Binary scores were attributed based on the presence or absence (1 or 0, respectively) of DNA bands. Binary matrices were used to calculate similarity between paired haplotypes with Jaccard's similarity index (45). UPGMA dendrograms showing cluster analysis of the distance matrix were constructed with DARwin program version 4.0 (CIRAD-FLHOR, Montpellier, France).

PCR-identification of pathogenicity related genes. Total genomic DNA of 9 strains of *X. albilineans* differing in pathogenicity in Guadeloupe (GPEPC17, GPEPC73, GPEPC75, GPEPC84, GPEPC86, GPEPC87, GPEPC101, GPEPC142 and GPEPC143) and *X. albilineans* strain Xa23R1 from Florida was used as template DNA to amplify partial pathogenicity related genes by PCR. Eighty oligonucleotide primers were designed to amplify 40 gene fragments (Table 3). One microliter of genomic DNA was used as template in a 50- μ l reaction mixture (1x enzyme buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 0.3 μ M of each primer) containing 2.5 units of Taq DNA polymerase (Eurobio, Paris, France). PCR products were separated by electrophoresis in a 1% agarose gel in 0.5x TBE buffer (Qbiogene, Illkirch, France), stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination. ProMega-Marker Lambda Ladder 1 kb (Promega Corp., Madison, WI) was used as molecular weight marker.

Total genomic DNA of *X. campestris* pv. *campestris* strain CFBP 5251, *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 91-118 or *Xylella fastidiosa* strain Temecula1 was systematically used as template DNA for a positive or negative control in all PCR amplification series.

TABLE 3. Expected sizes of DNA fragments amplified from pathogenicity related genes (I) and housekeeping genes (II) and characteristics of the oligonucleotides used as primers for PCR amplification.

DNA Fragment ^w		Primer sequences (5' > 3') ^x		Protein	
Name	Size (bp)	Forward Reverse	From	GenBank accession no. ^y or reference	Function ^z
I. Pathogenicity related genes					
adh	731	GAAGTGTTCGGTAGGTGATG CTGATAACCCACACCTGCAC	Xf9a5c, Xftem	AAF84783	Surface protein
cbas	437	GATATCGGCCATTCCGGCT CTCTGATTGCACCARTTGCC	Xac, Xcc, Xoo	AAM42804	1,4-beta-cellobiosidase
clas	353	CGGCTCSGGCTAYTKKGGC GCACCTGGATCGCSGCCCA	Xac, Xoo	AAM42805	Cellulase
gumB	596	CTGGGCGCTTGCAGCACC TCCAGCATGGTGCACAACC	Xac, Xcc, Xoo	AAA86370	Gum B
gumD	1447	GCTTTTGGCAGACTTGAGTAGC ACGCGGTCTTCTGTCCGAGC	Xac, Xcc, Xoo	AAA86372	Gum D
gumE	616	ACTGGCAGATCGACCCCAAG CCCATCGTGGTGTCTGGT	Xac, Xcc, Xoo	AAA86373	Gum E
gumF	736	GGCTGGCTGCCGGTTATG GCCAAGGCCGCAACACC	Xac, Xcc, Xoo	AAA86374	Gum F
gumH	795	CGTGTGTTACCGATC GGCAAGCCGCACGAA	Xac, Xcc, Xoo	AAA86376	Gum H
gumI	615	GCAGCTGACCGGCAC GCATCGAACTCGCCTTC	Xac, Xcc, Xoo	AAA86377	Gum I
gumJ	941	GTGCAGTTCGGCGGC GCCGTCGGGAAGATACC	Xac, Xcc, Xoo	AAA86378	Gum J
gumK	596	CGCGAGTTCGACCGCG TCGGTGGTGTCCGACC	Xac, Xcc, Xoo	AAA86379	Gum K
gumL	608	TGTTCTGGTGGCAGCCC GTAGTAGTCGTCTACTTG	Xac, Xcc, Xoo	AAA86380	Gum L
gumP	792	TGCGAACGCATGGTGC GC CCACTCCGGTTGATAACGG	Xac, Xcc, Xoo	AAM41716	Gum P
hemag1	727	CGCGCCCAACTCATATTGC GGTTGTCCAGGTGTTGGGTC	Xf9a5c, Xftem	AAO29937	Hemagglutinin-like secreted protein
hemag2	734	CACCCACACCGACCTCAGC CGGTGGTGGTGCCGAGGC	Xf9a5c, Xftem	AAO29937	Hemagglutinin-like secreted protein
pect	435	ACTATGTCAAGGCACTTAC GCGAGGTGCCGTTGACG	Xcc, Xoo	AAM41544	Pectinesterase
hrp1	840	AGGCCCTGGAAGGTGCCCTGGA ATCGCACTGCGTACCGCGCGCA	Xcv	Leite et al. (27)	HrcL and HrcN proteins
hrp2	355	AATACGCTGGAAGTCTG GGCACTATGCAATGACTG	Xcv	Leite et al. (27)	HrcN and HrpB7 proteins
pgI	662	GGCCTGGGCACCTGCGGC CGCACGGCGATATGGCGCAT	Xac, Xcc, Xoo	AAM41545	Polygalacturonase
pilB	684	CGCCGGTGGTGAAGTTCGTG CCGCCTTGATCGCAATCTCG	Xac, Xcc, Xoo	AAP43029	Pilus biogenesis protein B
pilD	603	TCGACCAGCATCCCGGTCTC CTTCCTTGCCGGTGAGCTGC	Xac, Xcc, Xoo	AAP43033	type IV pre-pilin leader peptidase
pilG	331	GCGGGTGGGAAGTTCGAG GCTTGGTCAGATATTGCTCGG	Xac, Xcc, Xoo	AAM42197	Pilus
pilH	308	TTGATCGAGGACTCGCCAC TCGCGCGGGCGGCTTGACG	Xac, Xcc, Xoo	AAM42196	PilH
pilJ	598	ATCAGCTCGCTCGGTGAGGG GGTTCGCACTGGAGGTGCG	Xac, Xcc, Xoo	AAM42194	Pilus biogenesis protein
rpfA1	947	ATGAGCGATTCTTTCCAC GGGAAGATGCCGAGGTG	Xac, Xcc, Xoo	AAM41149	Aconitase
rpfA2	1140	CTGCATCGGCAACTCCGGC CCGTGCTGAAGTACTCCAC	Xac, Xcc, Xoo	AAM41149	Aconitase
rpfB	1129	ACAGTTCGGCAAGACC CCCTTCATCACCTGCGG	Xac, Xcc, Xoo	AAM41147	RpfB protein
rpfC	698	GGCAATGCGGTCAAGTTC TCGGCGCTGAGCACCAC	Xac, Xcc, Xoo	AAM41145	RpfC protein
rpfG	1041	GATTGAACATCGTCATTGTC CCGATGCGGTGGAGAAC	Xac, Xcc, Xoo	AAM41143	Response regulator protein
xad	914	ACCGAAGGCACCGATGCG TCACCCACGCCCACTG	Xac, Xcc	AAM39974	Outer membrane protein
xpsE	570	CGTGCTGGTGGGAAGGCGAAG AGCGGGACTGGATCGCGAT	Xac, Xcc, Xoo	AAM39976	General secretion pathway protein E
xpsF	675	CATCAACATGGTGC GCGCGG GTGTCGGCGGTCTTGAGCAG	Xac, Xcc, Xoo	AAM39977	General secretion pathway protein F

(Continued on next page)

TABLE 3. (continued from preceding page)

DNA Fragment ^w		Primer sequences (5' > 3') ^x		Protein	
Name	Size (bp)	Forward Reverse	From	GenBank accession no. ^y or reference	Function ^z
xpsG	291	CAGGCCGGCATGAGCTTGCT GTATTCGATGGYGTGGCCCA	Xac, Xcc, Xoo	AAM39978	General secretion pathway protein G
xpsI	369	TGATCGAAGTGATCGTCGCCT TGGCSGYCACCAGCCGCAA	Xac, Xcc, Xoo	AAM39980	General secretion pathway protein I
xsaA	631	CTGGCGCGCACCGCCATTT CGTGTTCGTCGAGGATGACG	Xac, Xcc, Xoo	AAM43343	Xylosidase/Arabinosidase
xsaB	772	TGTCGGTCCGGCTCGGATTTTC TAGCTGCTGCTCCTCACTCGGT	Xac, Xcc	AAM43196	Beta-xylosidase
xylA1	615	TCCCCGGCATCGGCAAGATC CCATGTTGTCCGTCTCGCGC	Xac, Xcc, Xoo	AAM41049	Xylose isomerase
xylA2	482	TGAAGCGCAGCAGGACAACA CGCGTCCATGCCGCGATG	Xac, Xcc, Xoo	AAM41049	Xylose isomerase
xynA	486	ACCAACTGGGTGCAGCGCGT CTTGTCTCGCGTTGCGCCAG	Xac, Xcc	AAM43336	Endo-1,4-beta-xylanase A
xynB	294	TGGGGCAACCAGCAGCCGG GGTGATGCTGTAGTCGTTGATC	Xac, Xcc, Xoo	AAM43339	Xylanase
II. Housekeeping genes					
efp	491	TCATCACCGAGACCGAAT TCCTGGTTGACGAACAG	Xac, Xcc	S. Boudon (personal communication)	Elongation factor P
ihfA (gumA)	289	TGACGAAAGCGGAGATGGCCG TGCCCGGATCCAGCATAAGCC	Xac, Xcc, Xoo	AAA86369	Integration host factor A (Gum A)

^w DNA fragments correspond to partial genes.

^x Primer sequences were designed based on multiple sequence alignments of nucleotide or protein sequences (degenerated primers) of genes involved or potentially involved in pathogenicity of the following phytopathogenic bacteria: *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 (Xac), *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913 (Xcc), *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (27), *X. oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10331 (Xoo), or *Xylella fastidiosa* strain 9a5c (Xf9a5c) and strain Temecula1 (Xftem). PCR amplification was performed in an automated thermocycler with the following program: 95°C for 5 min, 30 cycles that included 94°C for 1 min, annealing temperature for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min.

^y GenBank accession no. refer to *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913 and *Xylella fastidiosa* strains 9a5c or Temecula1.

^z Protein names are as described on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) internet site.

Nucleotide sequence analysis of housekeeping genes. Total genomic DNA of 9 strains of *X. albilineans* differing in pathogenicity in Guadeloupe and *X. albilineans* strain Xa23R1 was used as template DNA to amplify, by PCR, partial housekeeping genes *efp* and *ihfA*. Oligonucleotides used as primers for PCR amplifications are listed in Table 3 and PCR amplifications were performed as described above.

Total genomic DNA of *X. campestris* pv. *campestris* strain CFBP 5251 and *X. arboricola* pv. *pruni* strain CFBP 6653 was used as template DNA for a positive control in all PCR amplifications series.

Phylogenetic analysis. Thirty microliters of amplicons obtained after PCR amplification of housekeeping genes *efp* and *ihfA*, and pathogenicity related genes *pilB*, *rpfA* and *xpsE* genes were sequenced by Genome Express (Meylan, France) using the same primers as used for PCR amplifications. Sequences were aligned and analyzed with DNAMAN Sequence Analysis Software (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Cana-

da). The 5' and 3' end sequences of *pilB*, *rpfA1*, and *xpsE* PCR fragments were not obtained for all bacterial strains, and so the phylogenetic analyses were performed with the largest sequences common to all strains (644 bp, 859 bp, and 539 bp, respectively). Complete PCR sequences of *efp* and *ihfA* PCR fragments were obtained for all bacterial strains and phylogenetic analyses were performed after removal of the primer sequences leaving 455 bp and 245 bp, respectively. Jukes-Cantor's model was used to correct distances for multiple substitutions and phylogenetic trees were constructed with the neighbor-joining method (25). Robustness of nodes of the phylogenetic trees was assessed from 1,000 bootstrap re-samplings.

Production of diffusible signal molecules. Biosensors *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZLR4) (11) and *X. campestris* pv. *campestris* B24-B6 (32), and respective control strains, were used to detect potential production of different diffusible molecules, *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) and PigB diffusible factor (DF) by *X. albilineans* strains. Biosensors were obtained from and were used as described by the respective authors (11,32).

Statistical analysis. Values of disease severity (DS) and values of extent of stalk colonization (ESC) were each compared with the General Linear Models procedure of SAS software version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Cluster analysis based on Euclidean distance was conducted by the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) procedure (45,51). Similarity calculations, cluster analyses and dendrogram constructions were performed with DARwin program version 4.0 (CIRAD-FLHOR, Montpellier, France).

RESULTS

Characteristics of the collection of *X. albilineans* strains used in this study. The 75 strains of *X. albilineans* were sampled from 45 sugarcane cultivars and different geographic locations in Guadeloupe. All strains belonged to serovar I as determined by Rott et al. (39), and albicidin production varied among strains of the pathogen (Table 1).

Variation in pathogenicity of *X. albilineans* strains in Guadeloupe. In trial A, 10 weeks after plant inoculation, disease severity varied between 0 (46 strains) and 52

(strain GPEPC73) for plants inoculated with the 75 strains. At the end of the experiment, 17 weeks after plant inoculation, the extent of stalk colonization (ESC) varied between 0 (7 strains) and 81.3 (strain GPEPC73). Nineteen strains representative of this variability were arbitrarily selected for subsequent testing in a second pathogenicity trial (trial B) with more plants inoculated per strain, and statistical analysis of data obtained in both trials (Table 2).

In trial A, 11 out of the 19 strains incited symptoms of the disease on non-inoculated leaves. No disease symptoms were scored for eight strains at any time on any of the five inoculated plants. Twelve weeks after inoculation, disease severity varied greatly between strains of the pathogen ($P < 0.0001$) and ranged from 0 to 52 (Table 2). Similarly, 17 weeks after plant inoculation, ESC was significantly different between strains ($P < 0.0001$) (Table 2). Four groups of colonization were identified by cluster analysis based on ESC values (Fig. 1): a first group (SCG1) contained non-aggressive or weakly aggressive strains for which ESC varied from 0 (GPEPC17 and GPEPC86) to 6.7 (GPEPC106). A second group (SCG2) consisted of moderately aggressive strains for which ESC ranged from 23.3 (GPEPC91) to 39.7 (GPEPC142). A third group (SCG3) included highly aggressive strains with ESC values varying from 51 (GPEPC75) to 63.4 (GPEPC143). The fourth group (SCG4) contained the most aggressive strain with an ESC value of 81.3 (GPEPC73).

In trial B, 14 out of the 19 strains of the pathogen incited symptoms of the disease on non-inoculated leaves. Five strains did not incite disease symptoms at any time on any of the 16 inoculated plants. Twelve weeks after inoculation DS varied significantly between strains of the pathogen ($P < 0.0001$) and ranged from 0 to 78.0 (Table 2).

Sixteen weeks after plant inoculation, stalk colonization varied greatly between strains of the pathogen (Table 2). As in trial A, four groups were identified by cluster analysis based on ESC values (Fig. 1): a first group (SCG1) included weakly aggressive strains with ESC values ranging from 5 (GPEPC101) to 18 (GPEPC86). A second group (SCG2) contained moderately aggressive strains for which ESC ranged from 42 (GPEPC142) to 48 (GPEPC80). A third group (SCG3) included highly aggressive strains for which ESC values varied from 57 (GPEPC91) to 74 (GPEPC87). A fourth group consisted of the most aggressive strain with an ESC value of 93 (GPEPC73).

Correlation of disease severity values ($R = 0.91$) and ESC values ($R = 0.85$) obtained for the 19 strains in trial A and in trial B was high and indicated very good reliability of these results. Additionally, the 19 strains of *X. albilineans* were distributed in 4 disease severity groups that were similar to the 4 stalk colonization groups (Data not shown).

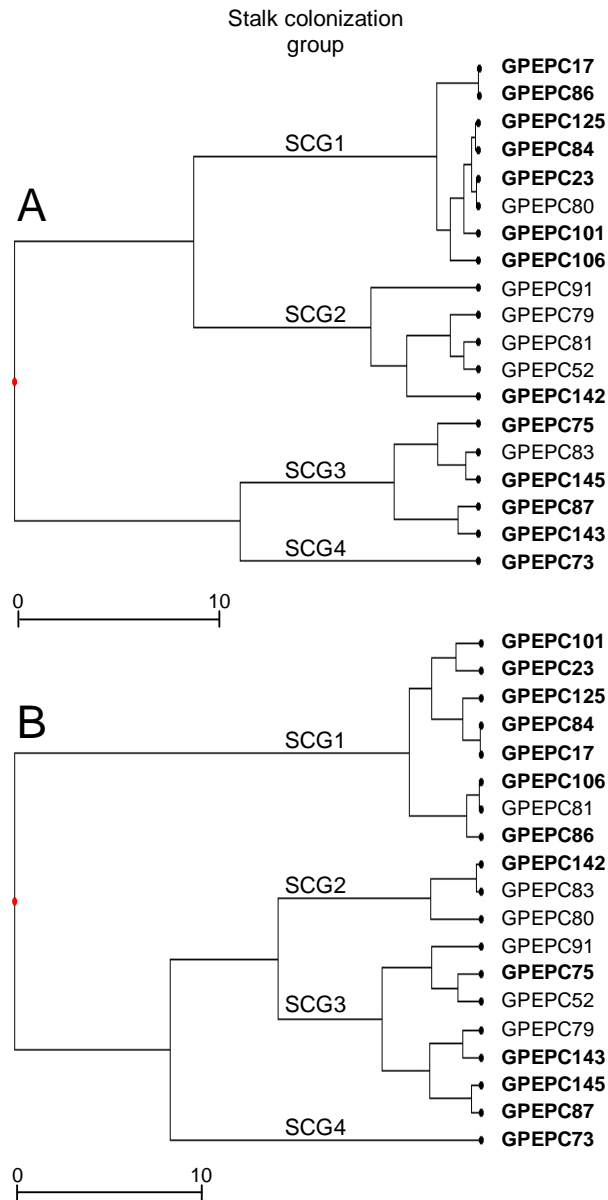


Fig. 1. UPGMA dendrograms showing similarity between 19 strains of *Xanthomonas albilineans* based on extent of sugarcane stalk colonization (ESC), 17 weeks after inoculation of sugarcane cv. B69566. ESC was calculated with bacterial population densities that were determined in every other internode and in all internodes above SL_0 in A, trial A and in B, trial B, respectively. SL_0 corresponded to the location of the three shortened stalk internodes that showed reduced growth after mechanical plant inoculation (cut leaves above the growing point). SCG1 through SCG4 refer to different groups of increasing extent of stalk colonization that were identified in this study. Strain names in bold indicate strains of *X. albilineans* that were distributed in the same groups of stalk colonization in trial A and trial B. Scale bar represents Euclidean distance between strains based on ESC values.

Genetic variation in *X. albilineans* from Guadeloupe analyzed by PFGE and Southern hybridization with albicidin biosynthesis genes. Banding patterns were observed for all 20 strains of *X. albilineans* (19 strains from Guadeloupe tested in

pathogenicity trials A and B and strain Xa23R1 from Florida) when total genomic DNA was separated by pulse-field gel electrophoresis after enzymatic restriction with *SpeI*. A single banding pattern, corresponding to haplotype B-02 described by Davis et al. (17), was obtained for all strains from Guadeloupe. Banding pattern of strain Xa23R1 was different and corresponded to haplotype A-01 described by Davis et al. (17). Banding patterns were also observed for all strains when total genomic DNA was hybridized with probes pALB571 and pBKS/K7 harboring the albicidin biosynthesis genes, following enzymatic restriction with *HincII*. A single pattern was observed for the 19 strains from Guadeloupe which differed from the pattern of strain Xa23R1: 15 DNA bands (ranging from 0.67 to more than 5.0 kb) and 7 DNA bands (ranging from 0.57 to more than 6.5 kb) were obtained with probes pALB571 and pBKS/K7, respectively. These banding patterns corresponded to combined haplotype HB2 as described by Champoiseau et al. (12). Banding patterns of Xa23R1 were different and corresponded to combined haplotype HA1.

Genetic variation in *X. albilineans* from Guadeloupe analyzed by AFLP. Nine strains of *X. albilineans* (GPEPC17, GPEPC73, GPEPC75, GPEPC84, GPEPC86, GPEPC87, GPEPC101, GPEPC142 and GPEPC143) from Guadeloupe that were distributed in the same colonization groups in trial A and trial B, and representative of the variability of pathogenicity revealed in this study, were used to study genetic variation of the pathogen by AFLP (Tables 1 and 2). Banding patterns were observed for all strains and these patterns varied according to the strain of *X. albilineans* following PCR amplification of total genomic DNA with all four selective primer combinations (data not shown). The polymorphic band positions obtained with the four primer combinations were scored and combined for each strain, and 6 combined haplotypes were defined. These combined haplotypes were distributed into 2 major genetic groups (AFLP A and AFLP B) by cluster analysis (Fig. 2). In each of these two groups, strains of *X. albilineans* originated from different locations in Guadeloupe and belonged to different groups of stalk colonization (Fig. 1). Similarly, strains belonging to a single haplotype (GA2 or GB3) differed in pathogenicity.

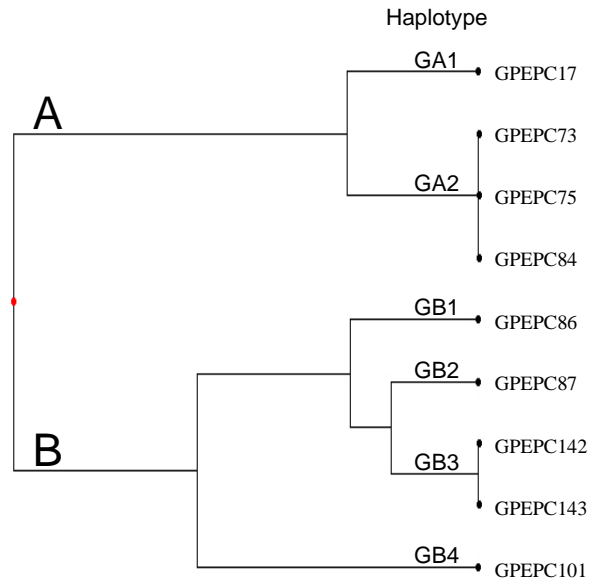


Fig. 2. Genetic relatedness of nine strains of *Xanthomonas albilineans* from Guadeloupe based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). After enzymatic restriction with *SacI* and *MspI*, total genomic DNA was ligated with specific adapters and amplified by PCR with the selective primer combinations *SacI* + *G/MspI* + A, *SacI* + *G/MspI* + T, *SacI* + *G/MspI* + G, *SacI* + *G/MspI* + CT. Banding patterns obtained with the four primer combinations were combined in six linearly combined haplotypes (GA1, GA2 and GB1 to GB4). Combined haplotypes were used for hierarchical cluster analysis by the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) and two AFLP groups (A and B) were distinguished.

PCR-amplification of pathogenicity-related genes from *X. albilineans*. Single DNA bands of expected sizes were obtained after PCR amplification of total genomic DNA from *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* or *Xylella fastidiosa* strains, used as positive controls, with 40 primer sets (Table 3). Only three DNA fragments (*pilB*, *rpfA1*, and *xpsE*) could be amplified with these primers from total genomic DNA of 9 strains of *X. albilineans* from Guadeloupe, differing in pathogenicity, and strain Xa23R1 from Florida. No variation was observed in the nucleotide sequence of these DNA fragments among the strains from Guadeloupe, but eight single synonymous nucleotide mutations (SNM), 5 SNM and 1 single non-synonymous mutation, and 4 SNM were found between the 9 Guadeloupean strains and Floridian strain Xa23R1 for DNA fragments *pilB*, *rpfA1*, and *xpsE*, respectively.

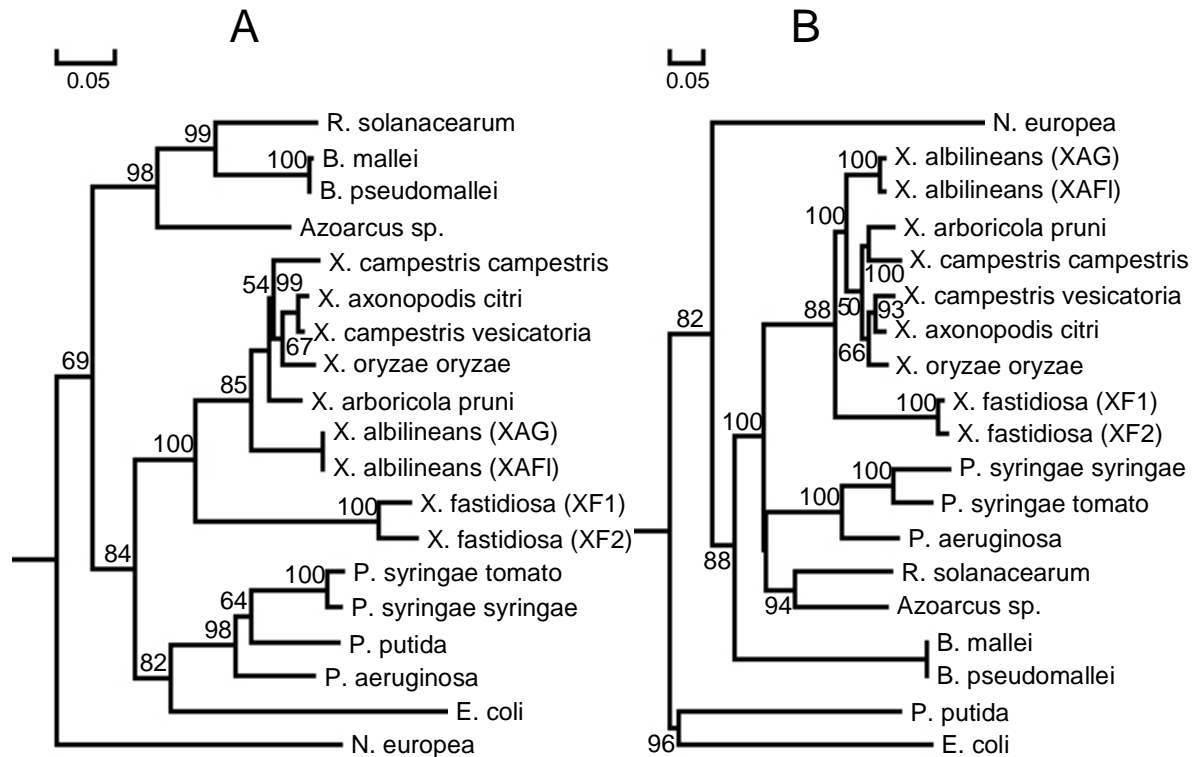


Fig. 3. Neighbor-joining tree of A, fragment *ihfA* (245 bp partial sequence of gene *ihfA*) and B, fragment *pilB* (644 bp partial sequence of gene *pilB*) nucleotide sequences of 10 strains of *X. albilineans* and 17 other bacterial strains (including 1 non pathogenic and 16 pathogenic strains). DNA fragments from *X. albilineans* strains from Guadeloupe (XAG = GPEPC17, GPEPC73, GPEPC75, GPEPC84, GPEPC86, GPEPC87, GPEPC101, GPEPC142 and GPEPC143), *X. albilineans* strain Xa23R1 (XAFI) from Florida, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strain CFBP 6653, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913 and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strain 91-118 were PCR-amplified from total genomic DNA. Nucleotide sequence from other strains are from GenBank (accession no.; position): *Azoarcus* sp. strain EbN1 (A, CR555306, 504922-504611; B, CR555306, 2574125-2572410), *Burkholderia mallei* strain ATCC 23344 (A, CP000010, 1133153-1133557; B, CP000010, 2635324-2636583), *Burkholderia pseudomallei* strain K96243 (A, BX571965, 2309571-2309224; B, BX571965, 3584982-3586241), *Escherichia coli* strain K-12 MG1655 (A, U00096, 1793576-1793277; B, U00096, 117099-115714), *Nitrosomas europea* ATCC 19718 (A, BX321859, 116386-116078; B, BX321861, 195575-193884), *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 (A, AE004702, 1576-1274; B, AE004866, 9737-11437), *Pseudomonas putida* strain KT2440 (A, AE016783, 101086-101388; B, AE016793, 185393-187066), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B728a (A, CP000075, 2522380-2522682; B, CP000075, 905203-903509), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strain DC3000 (A, AE016853, 2634012-2634314; B, AE016853, 1006981-1005287), *Ralstonia solanacearum* strain GMI1000 (A, AL646065, 87590-87904; B, AL646072, 26520-28247), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306 (A, AE011899, 1068-769; B, AE011969, 10306-8570), *Xyllela fastidiosa* strain 9a5c (XF1) (A, AE003916, 5155-5454; B, AE004061, 3126-4859), *Xyllela fastidiosa* strain Temecula1 (XF2) (A, AE012560, 134145-133856; B, AE012560, 153609-155342), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain KACC10331 (A, AE013598, 3417819-3417520; B, AE013598, 1628312-1630099). Bootstrap values for 1,000 re-samplings are shown as percentage. Similar phylogenetic tree were obtained with the nucleotide sequences from *efp*, *rpfA*, and *xpsE* partial genes (Data not shown). Scale bar units are in number of substitutions per nucleotide.

Phylogenetic relationship between *X. albilineans* and other pathogenic and non-pathogenic bacteria. DNA fragments *efp* and *ihfA* were amplified from housekeeping genes *efp* and *ihfA* (Table 3). No variation was observed in the nucleotide sequence of these DNA fragments among the 9 strains from Guadeloupe and strain Xa23R1 from Florida. All these strains were grouped into a single phylogenetic cluster by phylogenetic analysis with sequences of housekeeping genes *efp* and *ihfA*, and pathogenicity related genes *pilB*, *rpfA*, and *xpsE* (Fig. 3). Percentage identity of the *X. albilineans* strains varied between 85.6 and 90.0% with the cluster containing all the other xanthomonads, and between 74.4 and 79.3% with the two strains of *X. fastidiosa* (Table 4).

Table 4. Nucleotide sequence identity (%) within and among groups of strains of six xanthomonads and *Xylella fastidiosa*.

Groups of strains ^y	Xa	Xantho	Xf
I. Fragment <i>efp</i>			
Xa	100
Xantho	86.1 – 87.6	94.1 – 98.2	...
Xf	76.2 – 77.0	76.6 – 79.4	98.2
II. Fragment <i>ihfA</i>			
Xa	100
Xantho	88.6 – 90.0	92.7 – 98.6	...
Xf	74.4 – 76.1	73.4 – 78.5	94.1
III. Fragment <i>pilB</i>			
Xa	98.8 – 100
Xantho	87.9 – 89.6	91.6 – 96.0	...
Xf	78.6 – 79.3	78.7 – 80.5	97.7
IV. Fragment <i>rpfA1</i> ^z			
Xa	99.4 – 100
Xantho	85.6 – 86.6	91.5 – 97.2	...
Xf	78.7 – 79.3	78.5 – 79.8	98.6
V. Fragment <i>xpsE</i> ^z			
Xa	99.3 – 100
Xantho	88.3 – 89.6	93.7 – 97.2	...
Xf	75.3 – 75.7	74.8 – 76.6	97.0

^y Xa = 9 strains of *X. albilineans* from Guadeloupe and strain Xa23R1 from Florida; Xantho = strains *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, and *X. oryzae* pv. *oryzae*; Xf = *X. fastidiosa* strain 9a5c and *X. fastidiosa* strain Temecula1 (for further details see Fig. 3).

^z Sequence of this fragment was not available for *X. arboricola* pv. *pruni*.

Production of diffusible signals. No *N*-acylhomoserine lactone (AHL) activity was detected in the supernatant of 5-day-old liquid cultures of the 9 strains of *X. albilineans* from Guadeloupe, differing in pathogenicity, and strain Xa23R1 from Florida.

No PigB diffusible factor (DF) was detected in cultures of the same ten *X. albilineans* strains, nine days after inoculation of agar plates with biosensor B24-B6. However, AHLs and DF were detected with the respective *A. tumefaciens* and *X. campestris* pv. *campestris* positive controls (Data not shown).

Relationship between variation in pathogenicity and genetic or physiological variation of 9 strains of *X. albilineans* from Guadeloupe. Extent of stalk colonization, disease severity, genetic variability of the whole genome (by RFLP and AFLP), genetic variability of albicidin biosynthesis genes, nucleotide sequence of two housekeeping genes and three pathogenicity related genes were compared for nine strains of *X. albilineans* from Guadeloupe (Table 5).

TABLE 5. Summary of genetic and pathogenic characteristics of nine strains of *Xanthomonas albilineans* from Guadeloupe.

Strain ^v	Stalk colonization group ^w	Haplotype RFLP-PFGE ^x	Combined haplotype ALB-RFLP ^y	Combined haplotype AFLP ^z
GPEPC17	SCG1	B-02	HB2	GA1
GPEPC73	SCG4	B-02	HB2	GA2
GPEPC75	SCG3	B-02	HB2	GA2
GPEPC84	SCG1	B-02	HB2	GA2
GPEPC86	SCG1	B-02	HB2	GB1
GPEPC87	SCG3	B-02	HB2	GB2
GPEPC101	SCG1	B-02	HB2	GB4
GPEPC142	SCG2	B-02	HB2	GB3
GPEPC143	SCG3	B-02	HB2	GB3

^v Origin and characteristics of strains are shown in Table 1. All strains showed an identical nucleotide sequence for housekeeping genes *efp* and *ihfA*, and pathogenicity related genes *pilB*, *rpfA* and *xpsE*.

^w Data from Fig. 1. Disease severity groups were similar to stalk colonization groups.

^x From this study and Davis et al. (17).

^y From this study and Champoiseau et al. (12).

^z This study.

High variation in pathogenicity and four groups of colonization (stalk colonization groups SCG1 to SCG4) were identified. All strains shared the same haplotypes B-02 and HB2 previously identified by RFLP on the whole genome (17) and with albicidin biosynthesis genes (12), respectively, thus confirming genetic homogeneity of *X. albilineans* strains in Guadeloupe. In contrast, small variation and two genetic groups (AFLP-A [combined haplotypes GA1 and GA2] and AFLP-B [combined haplotypes GB1 to GB4]) were identified by AFLP. However, no relationship between this variation and variation in stalk colonization groups was found. Comparison of nucleotide sequence of two housekeeping genes (*efp* and *ihfA*) and three partial pathogenicity

related genes (*pilB*, *rpfA*, and *xpsE*) revealed no differences between the nine strains from Guadeloupe, but phylogenetic studies confirmed that *X. albilineans* belongs to the *Xanthomonas* genus.

DISCUSSION

In this study, we explored genetic and physiological variability of strains of *X. albilineans* differing in pathogenicity aiming to identify specific markers associated with different pathotypes of this pathogen. High variation in pathogenicity of 75 strains of *X. albilineans* from Guadeloupe was shown, confirming the existence of different pathotypes of *X. albilineans* in this geographical location (12,15). Surprisingly, most of the 75 strains incited no or only weak disease symptoms after inoculation of sugarcane cv. B69566 which is susceptible to leaf scald. Almost all these strains were sampled from necrotic symptoms on leaves (and different sugarcane cultivars) that were associated with aerial contamination by the pathogen, and that may occur without systemic colonization of the sugarcane stalk (13,15). These data suggested that different mechanisms are involved in the capacity of the pathogen to colonize the leaf surface, with subsequent penetration into the host, and in the capacity to systemically colonize the sugarcane stalk, with subsequent systemic disease symptoms.

Disease severity and extent of stalk colonization were further characterized for 19 of the 75 strains of the pathogen. Thirteen of the 19 strains were distributed among the same stalk colonization groups (groups SCG1 to SCG4) in two independent greenhouse experiments, indicating reliability of results (Fig. 1). Strains from a single geographic (field) location or isolated from the same sugarcane cultivar were distributed in different stalk colonization or disease severity groups. In contrast, strains from different geographic locations or sugarcane cultivars were distributed in the same stalk colonization or disease severity groups. Large differences in pathogenicity of *X. albilineans* can therefore exist among strains of the pathogen, not only between different countries or geographical areas (12) but also within a single sugarcane field.

No genetic variation was identified among 19 pathogenic variants of *X. albilineans*, isolated in 2003 in Guadeloupe, by RFLP based on the whole genome or on albicidin biosynthesis genes. This result confirmed genetic homogeneity of recent populations

of *X. albilineans* in Guadeloupe, although several genetic variants, serovars and pathotypes have been reported in the past on this island (12,15,17). Similar variation in pathogenicity or aggressiveness of genetically related strains was found by different DNA-based methods in several other plant pathogenic bacteria (24,29,30). In contrast, different strains of *Ralstonia solanacearum* were differentiated by AFLP, and especially strains that were not distinguished by RFLP-based technique (33). Additionally, AFLP was used successfully to identify bacterial pathogenicity islands, genes involved in pathogenic fitness and regulators of virulence of the bacterial pathogen *X. axonopodis* pv. *manihotis* after excision, amplification, cloning and sequence homology analysis of polymorphic bands from AFLP gels (22). In this study, AFLP primer combinations *SacI* + *G/MspI* + A, *SacI* + *G/MspI* + T, *SacI* + *G/MspI* + G, *SacI* + *G/MspI* + CT were also efficient in identifying genetic variability within *X. albilineans* in Guadeloupe. Differences in gel resolution and number of polymorphic bands were observed between the 2 independent replications of the AFLP assay. However, the number of haplotypes and strain assignment to these haplotypes did not vary, indicating reliability of the technique (Data not shown). Six combined haplotypes and two major genetic groups, AFLP-A (combined haplotypes GA1 and GA2) and AFLP-B (combined haplotypes GB1 to GB4) were obtained, but no relationship with the stalk colonization groups or disease severity groups was found (Table 5).

Single nucleotide variations in the sequence of pathogenicity related genes has been shown to be responsible for variation in virulence or aggressiveness in several pathogenic microorganisms (3,47,52). In bacterial plant pathogens, a wide range of pathogenicity related genes have been identified and analyzed. These genes code for secretion system constitutive proteins, exopolysaccharides, virulence factors, toxins, plant cell-wall degrading enzymes, cell mobility and motility factors or adhesion factors (21,48). PCR amplification with specific or degenerate primers has been used successfully to identify homologous gene sequences at pathovar or even generic levels in *Pseudomonas* and *Xanthomonas* species (23,27,43). However, of 40 pathogenicity related genes from several xanthomonads or *Xylella fastidiosa*, only three (*pilB*, *rpfA*, and *xpsE*) were amplified in *X. albilineans*. These genes are all involved in general pathogenicity mechanisms. Gene *pilB* codes for the type IV pilus biogenesis protein B involved in twitching motility, *rpfA* encodes an aconitase involved in the regulator system of pathogenicity factor, and *xpsE* codes for the type II secretion sys-

tem biogenesis protein E involved in general secretory pathway in several plant pathogens (10,14,19,44). Additionally, among nine strains of *X. albilineans* differing in pathogenicity, no variation was found in the nucleotide sequence of these fragments. This result confirmed, at nucleotide sequence level, the genetic uniformity of this pathogen in Guadeloupe. Absence of amplification with 37 primer combinations suggested that the corresponding genes involved in pathogenicity are either absent in *X. albilineans* or differ from those existing in other closely related pathogens. No amplification in *X. albilineans* of *hrcL*, *hrcN*, and *hrpB7* genes coding for essential components of the common type III secretion system in plant pathogenic bacteria, confirmed previous results (27).

Housekeeping genes are highly conserved genes and are therefore very useful for phylogenetic studies of a pathogen (9). The nucleotide sequence of housekeeping genes *efp* and *ihfA* did not vary among nine strains of Guadeloupe differing in pathogenicity. However, the phylogenetic study of 26 bacterial species (including *X. albilineans*) with these two housekeeping genes and pathogenicity gene *pilB*, *rpfA*, and *xpsE* confirmed that *X. albilineans* was closest to the *X. campestris* group (34), but showed also that *X. albilineans* was related to *X. fastidiosa*, another xylem pathogen that does not possess any *avr* nor *hrp* genes either (44). Very little information is available presently regarding genes involved in pathogenicity of *Xylella fastidiosa* but, based on their phylogenetic positions, it can be hypothesized that *X. albilineans* and this pathogen share common genetic features, including those involved in pathogenicity.

Autoinduction, or quorum sensing, is a feature of virulence of plant pathogenic bacteria that involves secretion and detection of small, diffusible signal molecules that permit cell-cell communication and allows bacteria to assess their local population density and/or physical confinement (49). Traits regulated by quorum sensing include the production of extracellular polysaccharides, degradative enzymes, antibiotics, siderophores, and pigments, as well as Hrp protein secretion, Ti plasmid transfer, motility, biofilm formation, and epiphytic fitness (49). *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) are the most commonly reported type of quorum sensing signals. No evidence of AHL production was detected in nine strains of *X. albilineans* from Guadeloupe differing in pathogenicity. Similarly, no AHL production was found in two and seven different pathovars of *X. oryzae* and *X. campestris*, respectively (11). However,

it can not be excluded that other quorum sensing or cell-cell communication diffusible signal molecules play a role in the regulation of several pathogenicity traits in *X. albilineans*. These molecules may explain, at least in part, variation in pathogenicity of *X. albilineans*, as it was shown recently for *X. campestris* pv. *campestris* (50).

In conclusion, the origin of variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *X. albilineans* remains to be deciphered. Genetic uniformity of strains of this pathogen differing in pathogenicity was observed at different genetic levels, from the whole genome to specific nucleotide sequences. However, only a small part of the genome has been investigated in details. Results obtained suggest that, part from complex non-genetic regulatory systems not identified so far in *X. albilineans*, single nucleotide mutations, in one or more genes involved in pathogenicity of *X. albilineans*, are responsible for variation in pathogenicity of this pathogen. Analysis of the complete genome sequence of *X. albilineans*, and comparison with genome sequences of other phytopathogenic bacteria, might therefore be the next step in the identification of pathogenicity genes in this pathogen. Sequencing of the genome of *X. albilineans* strain GPEPC73, isolated in this study, is in progress at Genoscope (Evry, France). Obtaining the entire genome sequence of this pathogen will lead to a significant break through in the characterization of the molecular mechanisms involved in the sugarcane-*X. albilineans* interaction.

AKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the “Conseil Régional de Guadeloupe” and the “Fonds Social Européen”. We thank R. Boisne-Noc, S. Duplan, S. Joseph, L. Toubi, and E. Vivien for technical assistance and advices, S. Boudon for supplying *efp* oligonucleotides, S. K. Farrand for supplying AHL biosensor strains, D. W. Gabriel for supplying *Xylella fastidiosa* DNA, A. R. Poplawsky for supplying PigB DF biosensor strains, and M. J. Davis for critical reviewing of the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Astua-Monge, G., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Davis, M. J., Bonas, U., and Jones, J. B. 2000. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:911-921.
2. Autrey, L. J. C., Saumtally, S., Dookun, A., Sullivan, S., and Dhayan, S. 1995. Aerial transmission of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 21:508-526.
3. Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F., and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:266-292.
4. Birch, R. G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant Pathol.* 2:1-11.
5. Birch, R. G., and Patil, S. S. June 1985. Antibiotic and process for the production thereof. U. S. patent 4,525,354.
6. Birch, R. G., and Patil, S. S. 1985. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1069-1075.
7. Birch, R. G., and Patil, S. S. 1987. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane pathogen. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:199-206.
8. Birch, R. G., and Patil, S. S. 1987. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:207-214.
9. Boudon, S., Manceau, C., and Nottéghem, J.-L. 2005. Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology* 95:1081-1088.
10. Cao, H., Baldini, R. L., and Rahme, L. G. 2001. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39:259-284.
11. Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P. D., and Farrand, S. K. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1119-1129.
12. Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Girard, J.-C., Royer, M., and Rott, P. 2006. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 96:33-45.
13. Comstock, J. C. 2001. Foliar symptoms of sugarcane leaf scald. *Sugar J.* 64:23-32.

14. Da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M. C., do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E. A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M. B., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J. S., Ferreira, R. C. C., Ferro, M. I. T., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F. M., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T. M., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A. D., Silva, C., de Souza, R. F., Spinola, L. A. F., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I. D., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C., and Kitajima, J. P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas pathogens* with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.
15. Daugrois, J. H., Dumont, V., Champoiseau, P., Costet, L., Boisne-Noc, R., and Rott, P. 2003. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *Europ. J. Plant Pathol.* 109:445-458.
16. Davis, M. J., Rott, P., Baudin, P., and Dean, J. L. 1994. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 78:78-82.
17. Davis, M. J., Rott, P., Warmuth, C. J., Chatenet, M., and Baudin, P. 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 87:316-324.
18. Diaz, M., Peralta, E. L., Iglesias, A., Pazos, V., Carvajal, O., Perez, J., Gigliotti, E. A., Gagliardi, P. R., Wendland, A., and Camargo, L. E. A. 2001. *Xanthomonas albilineans* haplotype B responsible for a recent sugarcane leaf scald disease outbreak in Cuba. *Plant Dis.* 85:334.
19. Dow, J. M., Feng, J.-X., Barber, C. E., Tang, J.-L., and Daniels, M. J. 2000. Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. *Microbiology* 146:885-891.
20. Feldmann, P., Sapotille, J., Grédoire, P., and Rott, P. 1994. Micropropagation of sugarcane. Pages 15-17 in: *In vitro Culture of Tropical Plants*. C. Teisson, ed. La Librairie du Cirad, Montpellier, France.
21. Genin, S., and Boucher, C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 42:107-134.

22. Gonzalez, C., Restrepo, S., Tohme, J., and Verdier, V. 2002. Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. FEMS Microbiol. Lett. 215:23-31.
23. Gropp, S. J., and Guttman, D. S. 2004. The PCR amplification and characterization of entire *Pseudomonas syringae* hrp/hrc clusters. Mol. Plant Pathol. 5:137-140.
24. Horita, M., and Tsuchiya, K. 2000. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 91:399-407.
25. Jukes, T. H., and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Pages 21-132 in: Mammalian Protein Metabolism. H. N. Munro, ed. Academic Press, New York, USA.
26. Koike, H. 1965. The aluminium cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. Phytopathology 55:317-319.
27. Leite, R. P. J., Minsavage, G. V., Bonas, U., and Stall, R. E. 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by identification of DNA sequences related to the hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Appl. Environ. Microbiol. 60:1068-1077.
28. Mohamed, I. S., Rott, P., Davis, M. J., and Chatenet, M. 1996. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains based on multiplication of the pathogen in sugarcane varieties. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 22:486-492.
29. Mundt, C. C., Nieva, L. P., and Vera Cruz, C. M. 2002. Variation for aggressiveness within and between lineages of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant Pathol. 51:163-168.
30. Nelson, R. J., Baraoidan, M. R., Vera Cruz, C. M., Yap, I. V., Leach, J. E., Mew, T. W., and Leung, H. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial pathogen of rice. Appl. Environ. Microbiol. 60:3275-3283.
31. Pilet, F., Clerc, F., Royer, M., Chatenet, M., Trigalet-Demery, D., and Rott, P. 2000. Différenciation des *Xanthomonas pathogènes* de la canne à sucre par RFLP et AFLP. Page 48 in: Résumés des Quatrièmes Rencontres de Phytobactériologie. CNRS/INRA, Aussois, France.
32. Poplawsky, A. R., and Chun, W. 1997. *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and Xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. J. Bacteriol. 179:439-444.
33. Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., and Trigalet, A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. Microbiology 146:1679-1692.

34. Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and de Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95:1098-1111.
35. Rott, P., Chatenet, M., Granier, M., and Baudin, P. 1988. L'échaudure des feuilles de la canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. II. Diagnostic et spectres d'hôtes de l'agent pathogène en Afrique tropicale. *L' Agro. Trop.* 43:244-252.
36. Rott, P., Costet, L., Davis, M. J., Frutos, R., and Dean, G. 1996. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J. Bacteriol.* 178:4590-4596.
37. Rott, P., and Davis, M. J. 1996. Recent advances in research on variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 22:498-504.
38. Rott, P., and Davis, M. J. 2000. Leaf scald. Pages 38-44 in: *A Guide to Sugarcane Diseases*. B. J. Croft and A. S. Saumtally, eds. La librairie du Cirad, Montpellier, France.
39. Rott, P., Davis, M. J., and Baudin, P. 1994. Serological variability in *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane. *Plant Pathol.* 43:344-349.
40. Rott, P., Mohamed, I. S., Klett, P., Soupa, D., de Saint-Albin, A., Feldmann, P., and Letourmy, P. 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology* 87:1202-1213.
41. Royer, M., Costet, L., Vivien, E., Bes, M., Cousin, A., Damais, A., Pieretti, I., Savin, A., Megessier, S., Viard, M., Frutos, R., Gabriel, D. W., and Rott, P. 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:414-427.
42. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York.
43. Seal, S. E., Jackson, L. A., and Daniels, M. J. 1992. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3751-3758.
44. Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., Barros, M. H., Bonaccorsi, E. D., Bordin, S., Bové, J. M., Briones, M. R. S., Bueno, M. R. P., Camargo, A. A., Camargo, L. E. A., Carraro, D. M., Carrer, H., Colauto, N. B., Colombo, C., Costa, F. F., Costa, M. C. R., Costa-Neto, C. M., Coutinho, L. L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena,

- C., El-Dorry, H., Facincani, A. P., Ferreira, A. J. S., Ferreira, V. C. A., Ferro, J. A., Fraga, J. S., França, S. C., Franco, M. C., Frohme, M., Furlan, L. R., Garnier, M., Goldman, G. H., Goldman, M. H. S., Gomes, S. L., Gruber, A., Ho, P. L., Hoheisel, J. D., Junqueira, M. L., Kemper, E. L., Kitajima, J. P., Krieger, J. E., Kuramae, E. E., Laigret, F., Lambais, M. R., Leite, L. C. C., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Lopes, S. A., Lopes, C. R., Machado, J. A., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Madeira, H. M. F., Marino, C. L., Marques, M. V., Martins, E. A. L., Martins, E. M. F., Matsukuma, A. Y., Menck, C. F. M., Miracca, E. C., Miyaki, C. Y., Monteiro-Vitorello, C. B., Moon, D. H., Nagai, M. A., Nascimento, A. L. T. O., Netto, L. E. S., Nhani, A., Nobrega, F. G., Nunes, L. R., Oliveira, M. A., de Oliveira, M. C., de Oliveira, R. C., Palmieri, D. A., Paris, A., Peixoto, B. R., Pereira, G. A. G., Pereira, H. A., Pesquero, J. B., Quaggio, R. B., Roberto, P. G., Rodrigues, V., de M. Rosa, A. J., de Rosa, V. E., de Sá, R. G., Santelli, R. V., Sawasaki, H. E., da Silva, A. C. R., da Silva, A. M., da Silva, F. R., Silva, W. A., da Silveira, J. F., Silvestri, M. L. Z., Siqueira, W. J., de Souza, A. A., de Souza, A. P., Terenzi, M. F., Truffi, D., Tsai, S. M., Tshako, M. H., Vallada, H., Van Sluys, M. A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A. L., Zago, M. A., Zatz, M., Meidanis, J., and Setubal, J. C. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-157.
45. Sneath, P. H. A., and Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification, W. H. Freeman and Co., San Francisco.
46. Titarenko, E., Lopez-Solanilla, E., Garcia-Olmedo, F., and Rodriguez-Palenzuela, P. 1997. Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *J. Bacteriol.* 179:6699-6704.
47. Van den Broek, P., Pittet, A., and Hajjaj, H. 2001. Aflatoxin genes and the aflatoxigenic potential of Koji moulds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:192-199.
48. Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P., and Simpson, A. J. 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 40:169-189.
49. Von Bodman, S. B., Bauer, W. D., and Coplin, D. L. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 41:455-482.
50. Wang, L.-H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y.-H., He, C., Wang, S. X., Weng, L.-X., Xu, J.-L., Tay, L., Fang, R. X., and Zhang, L.-H. 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.* 51:903-912.
51. Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Am. Stat. Assoc. J.* 58:236-244.

52. Weiland, J. J., and Edwards, M. C. 1996. A single nucleotide substitution in the α a gene confers oat pathogenicity to barley stripe mosaic virus strain ND18. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:62-67.
53. Zhang, L., Xu, J., and Birch, R. G. 1999. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nat. Biotechnol.* 17:1021-1024

CHAPITRE V.

Conclusions et perspectives

CHAPITRE V. Conclusions et perspectives

Les études réalisées au cours de cette thèse avaient pour objectif initial d'identifier, de comprendre et de caractériser l'origine de la variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*, agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Il s'agissait notamment : i) d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes génétiques, moléculaires et physiologiques impliqués dans la pathogénie de cette bactérie phytopathogène originale, associée au xylème, capable de se propager par voie aérienne et qui produit une pathotoxine unique, l'albicidine, ii) de comprendre les nouvelles apparitions ou les recrudescences de cette maladie dans plusieurs zones géographiques à travers le monde, et enfin iii) de disposer d'éléments de connaissances indispensables au développement d'outils ou de stratégies pour un contrôle efficace et durable de cette maladie, notamment en Guadeloupe.

Les différents travaux de recherche mis en place au cours de cette thèse ont été élaborés sur la base des connaissances générales des mécanismes de pathogénie chez les bactéries phytopathogènes, mais aussi des connaissances spécifiques et des outils génétiques et moléculaires disponibles à ce jour chez *X. albilineans*, et notamment des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine. Les résultats obtenus, qui ont déjà été discutés à l'issue de chacune des deux études réalisées (chapitres III et IV de ce manuscrit), ont permis de confirmer certains éléments déjà connus de la pathogénie de *X. albilineans* mais aussi d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes d'interactions de cet agent pathogène avec sa plante hôte, notamment sur les bases génétiques de sa pathogénie.

En se basant sur les connaissances disponibles à l'issue de ce travail, ce dernier chapitre a pour objectif de présenter les études et les techniques complémentaires qui pourront être mises en place afin de poursuivre l'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*, en liaison avec le contexte scientifique d'aujourd'hui. En parallèle, il a également pour objectif de discuter des applications possibles qui découlent de cette étude pour un meilleur contrôle de la maladie de l'échaudure des feuilles en Guadeloupe.

Etant donnée la complémentarité des deux études réalisées au cours de cette thèse et la similitude de certains des résultats obtenus, les discussions et perspectives sont présentées par thème, plutôt que par étude, afin d'en présenter une vision plus générale et synthétique.

La variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans*.

Dans les différents essais de pathogénie réalisés au cours de cette thèse en Guadeloupe et à Montpellier, une forte variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans* a été mise en évidence, sur la base de l'intensité des symptômes foliaires et des densités de populations bactériennes dans la tige de canne à sucre. Ces résultats confirment ceux obtenus par d'autres chercheurs avec cet agent pathogène mais avec un nombre beaucoup plus restreint de souches bactériennes (Autrey *et al.*, 1995a; Mohamed *et al.*, 1996; Daugrois *et al.*, 2003). Au cours de ce travail, en revanche, une forte variabilité de la pathogénie a été décrite pour la première fois chez des souches de *X. albilineans* très proches génétiquement, et à l'échelle d'une seule zone géographique comme la Guadeloupe. Cette homogénéité génétique a été observée au sein de deux collections de souches distinctes, récoltées dans des zones géographiques et climatiques différentes de l'île, et à partir de différents niveaux de la plante hôte (intérieur de la tige, intérieur et surface de la feuille de canne à sucre). Elle a été observée sur l'ensemble du génome de la bactérie mais aussi, pour la première fois, au niveau de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans*, à savoir les gènes qui codent la biosynthèse de l'albicidine. Aucun marqueur génétique associé à cette variabilité de pathogénie n'a pu être identifié au cours de nos recherches. Il est néanmoins fort probable que cette variabilité est liée à la modification (substitution ou délétion) d'un seul ou de quelques nucléotides dans la séquence de gènes associés à la pathogénie (ou la régulation de la pathogénie) de *X. albilineans*, comme cela a été montré chez d'autres microorganismes (Weiland et Edwards, 1996; Bender *et al.*, 1999; Van den Broek *et al.*, 2001). Outre les perspectives scientifiques et de recherche qui en découlent, et qui seront abordés un peu plus loin dans ce chapitre, ces résultats représentent une donnée importante pour l'évolution du suivi épidémiologique et du criblage des variétés résistantes à l'échaudure des feuilles en cours de sélection, notamment en Guadeloupe. En effet, au re-

gard de ces derniers résultats, le développement d'outils génétiques (tels que des sondes moléculaires ou des amorces PCR par exemple) utilisables pour la veille phytosanitaire et l'identification des souches bactériennes les plus agressives ne semble pas envisageable à ce jour.

L'albicidine dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans*.

Au cours de la première partie de cette thèse, il a été vérifié que la capacité des souches de *X. albilineans* à produire l'albicidine était une condition indispensable pour le développement des symptômes foliaires de l'échaudure des feuilles, notamment lorsqu'elle était associée à la colonisation du sommet (apex) de la tige de la canne à sucre. En effet, les souches de l'agent pathogène ayant produit de l'albicidine *in vitro*, mais qui n'ont pas colonisé l'apex de la tige de canne à sucre, n'ont pas induit de symptômes foliaires de la maladie. Réciproquement, certaines souches ont été capables de coloniser l'apex de la tige même en absence de production d'albicidine *in vitro*. Ces résultats suggèrent que la capacité à coloniser le sommet de la tige de canne à sucre implique un ou plusieurs facteurs différents de l'albicidine. Ils confirment ceux obtenus par d'autres chercheurs avec des mutants de la bactérie ne produisant plus d'albicidine (mutants naturels spontanés, ou mutants sélectionnés après un traitement aux UV ou après l'intégration d'un transposon) et qui sont toujours capables de coloniser la tige de canne à sucre (Birch et Patil, 1987a ; Rott *et al.*, 1996). Au cours de cette étude, nous avons orienté nos travaux vers l'étude de la variabilité quantitative de l'activité antibiotique de l'albicidine et sa relation avec la variation de pathogénie. Mais il est possible qu'une variabilité de la structure de la toxine, qui ne modifierait pas son activité antibiotique mais qui modifierait sa capacité à induire des symptômes chez la canne à sucre, puisse également jouer un rôle dans la variation du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. Cependant, des travaux de recherche récents n'ont pas permis de montrer de différence (non synonyme) dans la séquence nucléotidique des gènes qui codent les domaines d'adénylation des modules des enzymes de biosynthèse de l'albicidine chez 16 souches de *X. albilineans* à pathogénie variable (Renier, 2004). L'homogénéité de ces modules, responsables de l'incorporation spécifique des résidus acides aminés et acyle CoA, suggère une conservation de la structure du squelette de base de la toxine. Cependant, des modi-

fications ultérieures de ce squelette (réduction, méthylation,...), associées à l'activité de gènes de modification, pourraient jouer un rôle dans l'activité et donc la toxicité de l'albicidine. En effet, il a été montré que des gènes de régulation jouent un rôle primordial dans l'activité d'autres toxines de bactéries phytopathogènes, notamment chez *P. syringae* pv. *syringae* (Morgan et Chatterjee, 1988; Penaloza-Vazquez et Bender, 1998; Bender *et al.*, 1999). Par ailleurs, les études quantitatives réalisées *in vitro* ne reflètent peut-être pas les mécanismes de régulation de la production de toxine qui existent *in planta*, et qui pourraient modifier la capacité de la bactérie à induire des symptômes de la maladie.

En se basant sur ces observations, les études suivantes peuvent être envisagées afin d'approfondir les connaissances des mécanismes moléculaires de la régulation de la production d'albicidine chez *X. albilineans* : i) caractérisation du rôle des gènes de régulation et de modification de la toxine déjà décrits à ce jour (Royer *et al.*, 2004) grâce, notamment, à des techniques récentes de biologie moléculaire, telle que la mutagenèse dirigée qui permet l'inactivation ciblée de ces gènes (Kingsley *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1998; Castaneda *et al.*, 2005), ii) caractérisation de la variabilité du niveau d'expression des gènes majeurs impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine, grâce à la mesure de l'activité de leurs promoteurs dans des systèmes rapporteurs, de type luciférase ou lacZ, couramment utilisés en biologie moléculaire (Sambrook *et al.*, 1989), ou encore iii) la recherche de molécules "signal" qui sont impliquées dans des mécanismes de régulation généraux de pathogénie, et notamment dans la régulation de la production de toxines chez plusieurs bactéries phytopathogènes (Barber *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2001; Von Bodman *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2004). Au cours de travaux préliminaires, nous avons confirmé l'absence de production du facteur diffusible PigB (Poplawsky et Chun, 1997) ou de molécules de type *N*-acylhomoserine lactones déjà signalée chez *X. albilineans* (Cha *et al.*, 1998). Cependant, l'identification récente de nouvelles molécules "signal" diffusibles (de cellule à cellule), associées à la régulation de facteurs de la pathogénie chez deux espèces bactériennes du genre *Xanthomonas*, ouvre une nouvelle voie qu'il reste à explorer pour la recherche des mécanismes de régulation chez *X. albilineans*. Ainsi, la production d'acide *cis*-11-méthyle-2-dodécanoïque, un acide gras α,β insaturé, a été rapportée récemment chez cette espèce bactérienne (Wang *et al.*, 2004).

Les bases génétiques du pouvoir pathogène de *X. albilineans*.

Les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse nous ont permis de vérifier l'hypothèse que d'autres facteurs de pathogénie, codés par des gènes autres que ceux impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine, doivent jouer un rôle dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans*. Les techniques AFLP et PCR mises en œuvre dans la seconde partie de la thèse n'ont pas permis d'identifier de marqueurs génétiques associés à la variation du pouvoir pathogène chez *X. albilineans*. La technique de mutagenèse par insertion aléatoire du transposon Tn5, suivie du criblage des mutants vis-à-vis d'un caractère donné, a été utilisée avec succès pour l'identification de gènes associés à la pathogénie de plusieurs bactéries phytopathogènes (Boucher *et al.*, 1987; Titarenko *et al.*, 1997; Dow *et al.*, 2000), y compris les gènes codant pour l'albicidine chez *X. albilineans* (Rott *et al.*, 1996). L'utilisation de cette technique chez *X. albilineans* pour la recherche d'autres gènes de pathogénie n'est pas évidente car : i) les composantes du pouvoir pathogène de cette bactérie sont très variables (grande diversité des symptômes et des densités de populations bactériennes dans la tige de canne à sucre), ii) des contraintes sont liées au mode d'inoculation des plantes en conditions semi contrôlées (hétérogénéité des plantes au moment de l'inoculation, nombre limité des répétitions par souche bactérienne en fonction de l'espace confiné nécessaire, risque de contaminations croisées par des souches différentes,...) et iii) le criblage des mutants non pathogènes est long et fastidieux (évaluation des populations bactériennes dans la tige quatre à cinq mois après inoculation des plantes, forte influence des conditions environnementales sur l'expression des symptômes, forte influence de l'état physiologique des plantes sur la multiplication des bactéries,...). Le développement d'une technique simple et rapide pour le criblage de mutants non pathogènes de *X. albilineans* pourrait s'avérer très utile dans le cadre de l'utilisation de la technique de mutagenèse aléatoire. Ainsi, l'inoculation de plants de canne à sucre cultivés *in vitro*, en conditions contrôlées, pourrait s'avérer une méthode de choix (Rott et Chagvardieff, 1987).

L'observation d'une forte variabilité du pouvoir pathogène entre souches de *X. albilineans* très proches génétiquement constitue une information importante pour la recherche et l'identification des gènes impliqués dans la pathogénie de cette bactérie. En effet, ce résultat suggère que la variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans* est liée à de simples modifications nucléotidiques à l'intérieur de certains gènes et

non pas uniquement à d'éventuels évènements d'acquisition ou de délétion de plus grandes portions d'ADN dans le génome comme ceux qui sont impliqués dans l'acquisition ou l'évolution de la pathogénie chez de nombreuses bactéries (Hacker et Kaper, 2000; Van Sluys *et al.*, 2002). La poursuite de cette étude avec les techniques déjà utilisées (PCR, AFLP ou RFLP), ou encore inexploitées chez *X. albilineans*, comme l'hybridation soustractive suppressive (SSH pour "*suppression subtractive hybridization*") ou l'analyse de différence représentationnelle (RDA pour "*representational difference analysis*"), et qui ont été utilisées avec succès pour comparer les génomes de souches pathogènes et non pathogènes chez d'autres bactéries (Tinsley et Nassif, 1996; Calia *et al.*, 1997; Janke *et al.*, 2001; Harakava et Gabriel, 2003), ne semble pas une orientation de recherche appropriée chez cet agent pathogène. En revanche, ce résultat permet d'émettre l'hypothèse de l'existence de systèmes de régulation de nature épigénétique chez *X. albilineans*. Des travaux pourront être envisagés afin de rechercher des acétylations ou des méthylation de l'ADN génomique associées à la variabilité du pouvoir pathogène de cette bactérie.

Une autre information déterminante issue de nos travaux réside dans la position phylogénétique de *X. albilineans*. En effet, les analyses phylogénétiques réalisées avec des gènes de pathogénie et des gènes de ménage ont permis de montrer que *X. albilineans* est situé entre un groupe de divers *Xanthomonas* (et notamment *X. campestris* pv. *campestris*) et un groupe formé par deux souches de *Xylella fastidiosa*. Ce résultat constitue un atout essentiel pour orienter les recherches sur les gènes de pathogénie de *X. albilineans* dès que la séquence du génome entier de la souche GPEPC73 décrite dans cette thèse sera connue (séquençage en cours au Genoscope à Evry) (Genoscope, 2006). En effet, des gènes jouant un rôle prépondérant dans le pouvoir pathogène d'autres *Xanthomonas* et de *Xylella fastidiosa* ont pu être identifiés (Chou *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 2002; Gabriel, 2005) suite au séquençage de leur génome entier. Une fois la séquence du génome entier de *X. albilineans* connue, plusieurs études pourront être envisagées :

- i) Recherche de gènes candidats par homologie de séquences. Des gènes impliqués dans la pathogénie d'autres bactéries phytopathogènes, et notamment *X. campestris* pv. *campestris* et *X. fastidiosa* pourront être recherchés par analyse des homologies de séquence entre leurs génomes respectifs. Il sera également possible de comparer la séquence du génome de *X. albilineans*

avec les séquences des génomes d'autres agents pathogènes animaux, humains ou végétaux afin d'identifier des gènes de virulence/avirulence. Cette méthode a été utilisée récemment avec succès pour étudier les différences génétiques entre souches de *R. solanacearum* et identifier des gènes uniques impliqués dans la pathogénie de cette bactérie (Gabriel *et al.*, 2006).

- ii) Mutagenèse dirigée. Une fois identifiés, les gènes candidats pourront être mutés individuellement, ou de façon combinée, dans une souche très pathogène de *X. albilineans*, grâce à des techniques de mutagenèse dirigée comme celles utilisées récemment pour d'autres genres de *Xanthomonas* (Kingsley *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1998; Castaneda *et al.*, 2005). L'importance respective de chacun des gènes mutés dans la pathogénie de *X. albilineans* pourra ensuite être analysée et confirmée par des études de complémentation.
- iii) Mutagenèse aléatoire suivie du clonage et du séquençage des gènes candidats. Plusieurs centaines de mutants d'une souche très pathogène de *X. albilineans* pourraient être produits grâce à l'insertion aléatoire du transposon Tn5, méthodologie déjà utilisée pour l'identification des gènes de biosynthèse de l'albicidine chez cette bactérie (Rott *et al.*, 1996; Royer *et al.*, 2004) et la production de banques de mutants pour la détection de gènes de pathogénie chez d'autres *Xanthomonas* (Sun *et al.*, 2003). Les mutants bactériens pourront ensuite être criblés par inoculation de plants de canne à sucre et analyse de leur capacité à coloniser la tige de canne à sucre et/ou à induire les symptômes foliaires de la maladie. Grâce à la séquence du génome complet de *X. albilineans*, les sites d'insertion du transposon Tn5 chez les mutants affectés dans leur pathogénie pourront facilement être identifiés et les séquences complètes des gènes mutés pourront être obtenues par criblage d'une banque de gènes de *X. albilineans* ou par amplification à partir de la souche sauvage. Par ailleurs, ces séquences pourront être comparées avec celles disponibles dans les banques de gènes publiques afin d'identifier leurs rôles putatifs. Comme précédemment, le rôle de ces gènes devra ensuite être vérifié grâce à des études de complémentation.
- iv) Elaboration de puces à ADN. A partir de la séquence de l'ensemble des gènes du génome de *X. albilineans*, des puces à ADN ou "*microarrays*" pourront être

élaborées afin d'identifier des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de cette bactérie. En effet, cette technique permet l'analyse du profil d'expression des gènes bactériens, au niveau transcriptionnel, à un stade physiologique donné (premiers stades de l'infection de la plante par exemple) ou en réponse à des conditions particulières du milieu environnant (Ye, 2001; Schoolnik, 2002). Elle a déjà été utilisée avec succès chez différentes espèces de *Xanthomonas* pour l'étude des profils d'expression et l'identification de gènes de pathogénie (De Oliveira *et al.*, 2002; Astua-Monge *et al.*, 2005).

Le récent décryptage des premiers gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans*, à savoir les gènes codant pour la biosynthèse de la toxine albicidine, a permis de commencer l'analyse du support génétique de la pathogénie et de sa variabilité chez cette bactérie (Royer *et al.*, 2004; Vivien *et al.*, 2005; Champoiseau *et al.*, 2006a; Champoiseau *et al.*, 2006b;). De plus, il a conduit à une orientation des travaux de recherche vers l'identification d'autres gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *X. albilineans* grâce aux techniques et aux outils de biologie moléculaire disponibles à ce jour. Les données obtenues ont aussi permis de confirmer l'originalité du modèle "*X. albilineans*" qui est à l'origine du séquençage du génome complet de la souche GPEPC73 originaire de Guadeloupe. La disponibilité très prochaine de la séquence de ce génome représente un atout considérable vers une meilleure compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires associés au pouvoir pathogène de *X. albilineans*. Grâce à ces recherches, on peut espérer, qu'à court terme, de nouveaux outils pourront être développés en appui à la sélection de nouvelles variétés de canne à sucre résistantes à l'échaudure des feuilles et à l'amélioration du suivi phytosanitaire de cette maladie en Guadeloupe, et dans le monde.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexander, A. G. 1973.** Sugar cane physiology. Elsevier Scientific Publishing Company, New-York, U. S., 752 p.
- Anonyme1. 2006.** Type IV secretion system.
<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/ot/ot03080.html>. Accédé le 02/03/06.
- Anonyme2. 2006.** Indole-3-acetic acid derivatives.
<http://wiz2.pharm.wayne.edu/module/pha413.html>. Accédé le 02/03/06.
- Ashby, S. F. 1929.** The bacterium which causes gumming disease of sugarcane with notes on two other bacterial diseases of the same host. *Tropical Agriculture* 6:135-138.
- Astua-Monge, G., Freitas-Astua, J., Bacocina, G., Roncoletta, J., Carvalho, S. A. et Machado, M. A. 2005.** Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of Bacteriology* 187:1201-1205.
- Autrey, L. J. C., Saumtally, A. S., Dookun, A. et Médan, H. 1995a.** Studies on variation in leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists* 21:485-497.
- Autrey, L. J. C., Saumtally, S., Dookun, A., Sullivan, S. et Dhayan, S. 1995b.** Aerial transmission of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists* 21:508-526.
- Barber, C. E., Tang, J.-L., Feng, J.-X., Pan, M. Q., Wilson, T. J. G., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P. et Daniels, M. J. 1997.** A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology* 24:555-566.
- Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F. et Gross, D. C. 1999.** *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:266-292.
- Birch, R. G. 2001.** *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Molecular Plant Pathology* 2:1-11.
- Birch, R. G. et Patil, S. S. 1983.** The relation of blocked chloroplast differentiation to sugarcane leaf scald disease. *Phytopathology* 73:1368-1374.
- Birch, R. G. et Patil, S. S. 1985.** Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 131:1069-1075.

- Birch, R. G. et Patil, S. S. 1987a.** Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 30:199-206.
- Birch, R. G. et Patil, S. S. 1987b.** Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 30:207-214.
- Birch, R. G., Pemberton, J. M. et Basnayake, W. V. S. 1990.** Stable albicidin resistance in *Escherichia coli* involves an altered outer membrane nucleoside uptake system. *Journal of General Microbiology* 136:51-58.
- Blackburn, F. 1984.** Sugar Cane. *Tropical Agriculture*. Longman Group, Harlow, U. K., 414 p.
- Boucher, C. A., van Gijsegem, F., Barberis, P. A., Arlat, M. et Zischek, C. 1987.** *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *Journal of Bacteriology* 169:5626-5632.
- Brelles-Marino, G. et Bedmar, E. J. 2001.** Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. *Journal of Biotechnology* 91:197-209.
- Buell, C. R., et al. 2003.** The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:10181-10186.
- Bugnicourt, M. 1998.** Dictionnaire de microbiologie générale: la vie racontée par les bactéries. Ellipses Marketing, Paris, France, 991 p.
- Calia, K. E., Waldor, M. K. et Calderwood, S. B. 1997.** Use of representational difference analysis to identify genomic differences between pathogenic strains of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* 66:849-852.
- Cao, H., Baldini, R. L. et Rahme, L. G. 2001.** Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annual Review of Phytopathology* 39:259-284.
- Casadesus, J. et Torreblanca, J. 1996.** Methylation-related epigenetic signals in bacterial DNA. P. 141-153 *in*: *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. V. E. A. Russo, R. A. Martienssen et A. D. Riggs, eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Casadevall, A. et Pirofski, L. 1999.** Host-pathogen interactions: redefining the basis concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity* 67:3703-3713.
- Casadevall, A. et Pirofski, L. 2001.** Host-pathogen interactions: the attribute of virulence. *The Journal of Infectious Diseases* 184:337-344.
- Castaneda, A., Reddy, J. D., El-Yacoubi, B. et Gabriel, D. W. 2005.** Mutagenesis of all eight *avr* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one *avr* gene affected race specificity. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 18:1306-1317.

- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P. D. et Farrand, S. K. 1998.** Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:1119-1129.
- Champoiseau, P. 2001.** Diversité génétique et capacité colonisatrice de *Xanthomonas albilineans*, agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre (*Saccharum* spp.). Rapport de DEA. Université Montpellier II - Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, Montpellier, France, 26 p.
- Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Girard, J.-C., Royer, M. et Rott, P. 2006a.** Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 96:33-45.
- Champoiseau, P., Daugrois, J.-H., Pieretti, I., Cociancich, S., Royer, M. et Rott, P. 2006b.** High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*. Accepté le 01 mai 2006.
- Chang, J. H., Goel, A. K., Grant, S. R. et Dangl, J. L. 2004.** Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 7:11-18.
- Chatterjee, A. K. et Vidaver, A. K. 1986.** Genetics of pathogenicity factors: Application to phytopathogenic bacteria. P. 1-224 *in*: *Advances in Plant Pathology*. Vol. 4. D. S. Ingram et P. H. Williams, eds. Academic Press, London, U. K.
- Chen, C. T., Lin, C. P. et Liang, Y. G. 1993.** Leaf scald of sugarcane in Taiwan. *Taiwan Sugar* 40:8-16.
- Chou, F. L., Chou, H. C., Lin, Y. S., Yang, B. Y., Lin, N. T., Weng, S. F. et Tseng, Y. H. 1997.** The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233:265-269.
- CIRAD. 2002.** Rapport annuel canne à sucre. La Librairie du Cirad, Montpellier, France, 83 p.
- Clerc, F. 1997.** Diversité génétique des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre. Maîtrise en bioingénieries. Université de Toulouse III, Toulouse, France, 20 p.
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk, K. et Alfano, J. R. 2000.** *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:8770-8777.
- Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D. J. et Alfano, J. R. 2002.** Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends in Microbiology* 10:462-469.

- Comstock, J. C. 1992.** Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. *Plant Disease* 76:1033-1035.
- Comstock, J. C. 2001.** Foliar symptoms of sugarcane leaf scald. *Sugar Journal* 64:23-32.
- Comstock, J. C. et Irey, M. S. 1992.** Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA, and isolation techniques. *Plant Disease* 76:1033-1035.
- Comstock, J. C. et Shine, J. M. 1992.** Outbreak of leafscald of sugarcane, caused by *Xanthomonas albilineans*, in Florida. *Plant Disease* 76:426.
- Costacurta, A. et Vanderleyden, J. 1995.** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 21:1-18.
- Costet, L., Gagnevin, L., Notaise, J. et Rott, P. 2002.** Diversité génétique et variabilité du pouvoir pathogène des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre à la Réunion. Cinquièmes Rencontres Plantes-Bactéries. Janvier 2002, Aussois, France, p. 67.
- Da Silva, A. C. R., et al. 2002.** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.
- Dame, R. T. 2005.** The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Molecular Microbiology* 56:858-870.
- Daniels, J. et Roach, B. T. 1987.** Taxonomy and evolution. P. 7-84 *in*: Sugarcane Improvement Through Breeding. D. J. Heinz, ed. Elsevier Press, Amsterdam, Holland.
- Daugrois, J.-H., Champoiseau, P. et Rott, P. 2005.** Epiphytic colonisation and infection by *Xanthomonas albilineans* of two sugarcane cultivars differing in resistance to leaf scald disease. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists* 25:678-684.
- Daugrois, J.-H., Dumont, V., Champoiseau, P., Costet, L., Boisne-Noc, R. et Rott, P. 2003.** Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two strains of *Xanthomonas albilineans*. *European Journal of Plant Pathology* 109:445-458.
- Davis, M. J. 1992.** Increased incidence of leaf scald disease in Florida associated with a genetic variant of *Xanthomonas albilineans*. *Sugar y Azucar* 87:34.
- Davis, M. J., Rott, P. et Astua-Monge, G. 1998.** Nested, multiplex PCR for detection of both *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. Abstracts of the 7th International Congress of Plant Pathology Abstract 3.3.4.
- Davis, M. J., Rott, P., Baudin, P. et Dean, J. L. 1994.** Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Disease* 78:78-82.
- Davis, M. J., Rott, P., Warmuth, C. J., Chatenet, M. et Baudin, P. 1997.** Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 87:316-324.

- Davis, M. J., Warmuth, C. J. et Rott, P. 1993.** Genetic variation in *Xanthomonas albilineans*. Abstracts of papers presented at the 6th International Congress of Plant Pathology. July 28-August 6, Montréal, Canada, p. 35.
- De Oliveira, R. C., Yanai, G. M., Muto, N. H., Leite, D. B., de Souza, A. A., Coletta Filho, H. D., Machado, M. A. et Nunes, L. R. 2002.** Competitive hybridization on spotted microarrays as a tool to conduct comparative genomic analyses of *Xylella fastidiosa* strains. FEMS Microbiology Letters 216:15-21.
- Delepelaire, P. 2004.** Type I secretion in gram-negative bacteria. Biochimica et Biophysica Acta 1694:149-161.
- Delepelaire, P. et Wandersman, C. 1990.** Protein secretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. Journal of Biological Chemistry 265:17118-17125.
- Denny, T. P., Carney, B. F. et Schell, M. A. 1990.** Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. Molecular Plant-Microbe Interaction 3:293-300.
- Diaz, M., Peralta, E. L., Iglesias, A., Pazos, V., Carvajal, O., Perez, J., Gigliotti, E. A., Gagliardi, P. R., Wendland, A. et Camargo, L. E. A. 2001.** *Xanthomonas albilineans* haplotype B responsible for a recent sugarcane leaf scald disease outbreak in Cuba. Plant Disease 85:334.
- Dow, J. M. et Daniels, M. J. 2000.** *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. Yeast 17:263-271.
- Dow, J. M., Feng, J.-X., Barber, C. E., Tang, J.-L. et Daniels, M. J. 2000.** Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. Microbiology 146:885-891.
- Dow, J. M., Osbourn, A. E., Wilson, T. J. et Daniels, M. J. A. 1995.** A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. Molecular Plant-Microbe Interaction 8:768-777.
- Dowson, W. J. 1943.** On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. Transactions of the British Mycology Society 26:1-14.
- Dye, D. W. et Lelliott, R. A. 1974.** Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. P. 224-249 in: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. R. E. Buchanan et N. E. Gibbons, eds. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, U. S.
- F.A.O. 2004.** FAOSTAT database gateway. URL: <http://faostat.fao.org/>. Accédé le
- Fauconnier, R. 1991.** La canne à sucre. Le technicien d'agriculture tropicale. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 165 p.
- Fauconnier, R. et Bassereau, D. 1970.** La canne à sucre. Techniques agricoles et productions tropicales. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 468 p.

- Feldmann, P., d'Hont, A., Guiderdoni, E., Grivet, L. et Glaszmann, J. C. 1997.** La canne à sucre. P. 197-215 *in*: L'Amélioration des Plantes Tropicales. A. Charrier, M. Jacquot, S. Hamon et D. Nicolas, eds. CIRAD et ORSTOM, Montpellier, France.
- Feldmann, P., Sapotille, J., Grédoire, P. et Rott, P. 1994.** Micropropagation of sugarcane. P. 15-17 *in*: *In Vitro Culture of Tropical Plants*. C. Teisson, ed. La Librairie du Cirad, Montpellier, France.
- Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A. et Denny, T. P. 1997.** Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* 26:251-259.
- Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., O'Callaghan, D. et Ramuz, M. 2002.** Systèmes de sécrétion des protéines de type IV et virulence bactérienne. *Médecine Sciences* 18:439-447.
- Fuqua, C., Parsek, M. R. et Greenberg, E. P. 2001.** Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics* 35:439-468.
- Gabriel, D. W. 2005.** Role of type I secretion in Pierce's Disease. University of Florida, Gainesville, Florida U. S., 4 p.
- Gabriel, D. W., et al. 2006.** Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 19:69-79.
- Gardan, L., David, C., Morel, M., Glickmann, E., Abu-Ghorrah, M., Petit, A. et Dessaux, Y. 1992.** Evidence of a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1780-1783.
- Gendrel, A. V. et Colot, V. 2005.** Arabidopsis epigenetics: when RNA meets chromatin. *Current Opinion in Plant Biology* 8:142-147.
- Genin, S. et Boucher, C. 2004.** Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 42:107-134.
- Genoscope. 2006.** *Xanthomonas albilineans*: Séquençage aléatoire global. URL: http://www.genoscope.cns.fr/externe/Francais/Projets/Projet_PY/PY.html. Accédé le 02/03/06.
- Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A. et Dessaux, Y. 1998.** Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11:156-162.
- Goodner, B., et al. 2001.** Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294:2323-2328.
- Gopalan, S. et He, S. Y. 1996.** Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. *Plant Disease* 80:604-610.
- Greenberg, J. T. et Vinatzer, B. A. 2003.** Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opinion in Microbiology* 6:20-28.

- Grisham, M. P., Legendre, B. L. et Comstock, J. C. 1993.** First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Louisiana. *Plant Disease* 77:537.
- Gross, D. C. 1991.** Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annual Review of Phytopathology* 29:247-278.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C. et Grandi, G. 1998.** Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster: a link between procaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *Journal of Biological Chemistry* 273:32857-32863.
- Guilhabert, M. R. et Kirkpatrick, B. C. 2005.** Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:858-868.
- Hacker, J. et Kaper, J. B. 2000.** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology* 54:641-679.
- Harakava, R. et Gabriel, D. W. 2003.** Genetic differences between two strains of *Xylella fastidiosa* revealed by suppression subtractive hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1315-1319.
- Harding, N. E., Cleary, J. M. et Ielpi, L. 1995.** Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. P. 495-514 *in*: *Food Biotechnology Microorganisms*. Y. H. Hui et G. Khachatourians, eds. VCH Publisher, New York, U. S.
- Henderson, I. R. et Nataro, J. P. 2001.** Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and Immunity* 69:1231-1243.
- Hu, N.-T., Hung, M.-H., Chanhan Chen, D. et Tsai, R.-T. 1998.** Insertion mutagenesis of XpsD, an outer membrane protein involved in extracellular protein secretion in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiology* 144:1479-1486.
- Huang, G., Zhang, L. et Birch, R. G. 2000.** Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. *Gene* 258:193-199.
- Huang, Q. et Allen, C. 1997.** An exo-poly-alpha-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 179:7369-7378.
- Huang, Q. et Allen, C. 2000.** Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:77-83.
- Hueck, C. J. 1998.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:379-433.
- Isakeit, T. et Irvine, J. E. 1995.** First report of leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*, of sugarcane in Texas. *Plant Disease* 79:860.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. et Antoine, R. 2001.** Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Molecular Microbiology* 40:306-313.

- Jacques, M. 1996.** Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends in Microbiology* 4:408-410.
- Janke, B., Dobrindt, U., Hacker, J. et Blum-Oehler, G. 2001.** A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655. *FEMS Microbiology Letters* 199:61-66.
- Julien, M. H. R., Irvine, J. E. et Benda, G. T. A. 1989.** Sugarcane anatomy, morphology and physiology. P. 1-20 *in*: Diseases of Sugarcane: Major Diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie et C. G. Hughes, eds. Elsevier Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands.
- Kang, Y., Huang, J., Mao, G., He, L. Y. et Schell, M. A. 1994.** Dramatically reduced virulence of mutants of *Pseudomonas solanacearum* defective in export of extracellular proteins across the outer membrane. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 7:370-377.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M. A. et Denny, T. P. 2002.** *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology* 46:427-437.
- Kao, C. et Sequeira, L. 1991.** A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 173:7841-7847.
- Katzen, F., Ferreira, D. U., Oddo, C. G., Ielmini, M. V., Becker, A., Pühler, A. et Ielpi, L. 1998.** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *Journal of Bacteriology* 180:1607-1617.
- Kingsley, M. T., Gabriel, D. W., Marlow, G. C. et Roberts, P. D. 1993.** The *opsX* locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *Journal of Bacteriology* 175:5839-5850.
- Kingsman, J. 2004.** Sugar trading manual. Woodhead Publishing, Cambridge, England, 648 p.
- Klett, P. et Rott, P. 1994.** Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. *Phytopathology* 142:283-291.
- Kobayashi, I., Nobusato, A., Kobayashi-Takahashi, N. et Uchiyama, I. 1999.** Shaping the genome-restriction-modification systems as mobile genetic elements. *Current Opinion in Genetics & Development* 9:649-656.
- Koike, H. 1965.** The aluminium cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* 55:317-319.
- Leach, J. E. et White, F. F. 1996.** Bacterial avirulence genes. *Annual Review of Phytopathology* 34:153-179.
- Lee, B.-M., et al. 2005.** The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research* 33:577-586.
- Leigh, J. A. et Coplin, D. L. 1992.** Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology* 46:307-346.

- Leite Jr, R. P., Minsavage, G. V., Bonas, U. et Stall, R. E. 1994.** Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by identification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1068-1077.
- Liu, H., Kang, Y., Genin, S., Schell, M. A. et Denny, T. P. 2001.** Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology* 147:3215-3229.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M. A. et Denny, T. P. 2005.** Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall degrading enzymes contribute to virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:1296-1305.
- Lopes, S. A., Damann, K. E. et Grelen, L. B. 1998.** Comparison of methods for identification of the sugarcane pathogen *Xanthomonas albilineans*. *Summa Phytopathologica* 24:114-119.
- Low, D. A., Weyand, N. J. et Mahan, M. J. 2001.** Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infection and Immunity* 69:7197-7204.
- MacNab, R. M. 1996.** Flagella and motility. P. 123-145 *in: Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 1. 2nd ed. F. C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin et H. E. Umbarger, eds. ASM Press, Washington D. C. , U. S.
- Marinus, M. G. 1996.** Methylation of DNA. P. 782-791 *in: Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. F. C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter et H. E. Umbarger, eds. ASM Press, Washington D. C. , U. S.
- Martin, J. P. et Robinson, P. E. 1961.** Leaf scald. P. 79-101 *in: Sugarcane Diseases of the World*. J. P. Martin, E. V. Abbott et C. G. Hughes, eds. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, Netherlands.
- Matzke, M., Matzke, A. J. M. et Kooter, J. M. 2001a.** RNA: guiding gene silencing. *Science* 293:1080-1083.
- Matzke, M. A., Matzke, A. J. M., Pruss, G. et Vance, V. 2001b.** RNA-based silencing strategies in plants. *Current Opinion in Genetics & Development* 11:221-227.
- Matzke, M. A., Mette, M. F. et Matzke, A. J. M. 2000.** Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Molecular Biology* 43:401-415.
- McGowan, S., Sebaihia, M., Jones, S., Yu, S., Bainton, N., Chan, P. F., Bycroft, B., Stewart, G. S., Williams, P. et Salmond, G. P. 1995.** Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiology* 141:541-550.
- Meselson, M., Yuan, R. et Heywood, J. 1972.** Restriction and modification of DNA. *Annual Review of Biochemistry* 41:447-466.

- Metzgar, D. et Wills, C. 2000.** Evolutionary changes in mutation rates and spectra and their influence on the adaptation of pathogens. *Microbes and Infection* 2:1513-1522.
- Meyer, J. 1989.** L'histoire du sucre. Les éditions Desjonquières, Paris, France, 335 p.
- Mohamed, I. S. 1995.** Pouvoir colonisateur de *Xanthomonas albilineans* et résistance de la canne à sucre à l'échaudure des feuilles. Thèse de doctorat en sciences. Université Paris XI Orsay, Paris, France, 95 p.
- Mohamed, I. S., Rott, P., Davis, M. J. et Chatenet, M. 1996.** Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains based on multiplication of the pathogen in sugarcane varieties. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists* 22:486-492.
- Monteiro-Vitorello, C. B., et al. 2004.** The genome sequence of the Gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17:827-836.
- Montout, Y. 2003.** Bilan de la campagne sucrière 2003. Chambre d'Agriculture Guadeloupe, CTSR, 24 p.
- Moreira, L. M., de Souza, R. F., Almeida Jr, N. F., Setubal, J. C., Oliveira, J. C. F., Furlan, L. R., Ferro, J. A. et da Silva, A. C. R. 2004.** Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 42:163-184.
- Morgan, M. K. et Chatterjee, A. K. 1988.** Genetic organization and regulation of proteins associated with production of syringotoxin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Bacteriology* 170:5689-5697.
- Murphy, L. D. et Zimmerman, S. B. 1997.** Isolation and characterization of spermidine nucleoids from *Escherichia coli*. *Journal of Structural Biology* 119:321-335.
- Nealson, K. H. 1977.** Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Archives of Microbiology* 112:73-79.
- Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H. et Lindow, S. E. 2004.** Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:1737-1742.
- North, D. S. 1926.** Leaf scald, a bacterial disease of sugarcane. Colonial Sugar Refining Co. Ltd., Sydney, Australia, 80 p.
- Novick, A. et Wiener, M. 1957.** Enzyme induction is an all-or-none phenomenon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 43:553-556.
- Ochman, H. et Moran, N. A. 2001.** Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 292:1096-1099.
- Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikstrom, B., van Doorn, J., Haahtela, K., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Wengelnik, K., Bonas, U. et Korhonen, T. K. 1997.** Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Bacteriology* 179:1280-1290.

- Ophir, T. et Gutnick, D. L. 1994.** A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* 60:740-745.
- Orian, G. 1942.** Artificial hosts of the sugarcane leaf scald organism. *Revue Agricole et Sucrière de l'île Maurice* 21:285-304.
- Ovalle, W., Comstock, J., Juarez, J. et Soto, G. 1995.** First report of leaf scald of sugarcane (*Xanthomonas albilineans*) in Guatemala. *Plant Disease* 79:212.
- Palacios, J. L., Zaror, I., Martinez, P., Uribe, F., Opazo, P., Socias, T., Gidekel, M. et Venegas, A. 2001.** Subset of hybrid proteins is exported by the type I secretion system of *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology* 183:1346-1358.
- Palmer, B. R. et Marinus, M. G. 1994.** The dam and dcm strains of *Escherichia coli*-a review. *Gene* 143:1-12.
- Pan, Y. B., Grisham, M. P., Burner, D. M., Legendre, B. L. et Wei, Q. 1999.** Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant Disease* 83:218-222.
- Pan, Y.-B., Grisham, M. P. et Burner, D. M. 1997.** A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Disease* 81:189-194.
- Panning, B. et Jaenisch, R. 1998.** RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 93:305-308.
- Penalzoza-Vazquez, A. et Bender, C. L. 1998.** Characterization of CorR, a transcriptional activator which is required for biosynthesis of the phytotoxin coronatine. *Journal of Bacteriology* 180:6252-6259.
- Pilet, F., Clerc, F., Royer, M., Chatenet, M., Trigalet-Demery, D. et Rott, P. 2000.** Différenciation des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre par RFLP et AFLP. Troisièmes Rencontres Plantes-Bactéries. Janvier 2000, Aussois, France, p. 48.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R. et Palva, E. 1993.** A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO Journal* 12:2467-2476.
- Poplawsky, A. R. et Chun, W. 1997.** *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and Xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Bacteriology* 179:439-444.
- Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M. et Trigalet, A. 2003.** Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology* 49:991-1003.
- Pühler, A. et Braun, S. 2006.** Genetical and biochemical analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lipopolysaccharides.

<http://www.genetik.uni-bielefeld.de/Genetik/phyto/xccpls.html>. Accédé le 02/06/06.

Ray, S. K., Rajeshwari, R., Sharma, Y. et Sonti, R. V. 2002. A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimal virulence. *Molecular Microbiology* 46:637-647.

Reisenauer, A., Kahng, L. S., McCollum, S. et Shapiro, L. 1999. Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator ? *Journal of Bacteriology* 181:5135-5139.

Renier, A. 2004. Diversité génétique de *Xanthomonas albilineans* et variabilité des enzymes de biosynthèse de l'albicidine, pathotoxine produite par l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre. Rapport de DEA. Université Montpellier II/Agro.M, Montpellier, France, 15 p.

Reverchon, S., Bouillant, M., Salmond, G. et Nasser, W. 1998. Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Microbiology* 29:1407-1418.

Ricaud, C. et Ryan, C. C. 1989. Leaf scald. P. 39 -53 *in*: Diseases of Sugarcane: Major Diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. J. Gillaspie et C. G. Hughes, eds. Elsevier Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands.

Rice, J. C. et Allis, C. D. 2001. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 13:263-273.

Rine, J. 1999. Commentary. On the mechanism of silencing in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:8309-8311.

Rivas, L. A., Mansfield, J., Tsiamis, G., Jackson, R. W. et Murillo, J. 2005. Changes in race-specific virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are associated with a chimeric transposable element and rare deletion events in a plasmid-borne pathogenicity island. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3778-3785.

Roine, E., Raineri, D. M., Romantschuk, M., Wilson, M. et Nunn, D. N. 1998. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11:1048-1056.

Rojas, C. M., Ham, J. H., Deng, W.-L., Doyle, J. J. et Collmer, A. 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:13142-13147.

Rott, P. 1995. L'échaudure des feuilles de la canne à sucre. *Agriculture et Développement* 6:49-55.

- Rott, P., Abel, M., Soupa, D., Feldman, P. et Letourmy, P. 1994a.** Population dynamics of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane plants as determined with an antibiotic-resistant mutant. *Plant Disease* 78:241-247.
- Rott, P., Arnaud, M. et Baudin, P. 1986.** Serological and lysotypical variability of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Journal of Phytopathology* 116:201-211.
- Rott, P., Bailey, R. A., Comstock, J. C., Croft, B. J. et Saumtally, A. S. 2000.** A guide to sugarcane diseases. CIRAD and ISSCT, Montpellier, France, 339 p.
- Rott, P., Bousquet, J. F., Muller, M. et Chatenet, M. 1997a.** La quarantaine de canne à sucre du cirad à Montpellier. *Agriculture et Développement* 13:22-28.
- Rott, P. et Chagvardieff, P. 1987.** In vitro reactions of sugarcane (*Saccharum* SP.) plantlets inoculated with 2 strains of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9:9-18.
- Rott, P., Chatenet, M. et Baudin, P. 1988a.** L'échaudure des feuilles de la canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson: I. Synthèse bibliographique. *L'Agronomie Tropicale* 43:236-242.
- Rott, P., Chatenet, M., Granier, M. et Baudin, P. 1988b.** L'échaudure des feuilles de la canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson: II. Diagnostic et spectre d'hôtes de l'agent pathogène en Afrique tropicale. *L'Agronomie Tropicale* 43:244-251.
- Rott, P., Costet, L., Davis, M. J., Frutos, R. et Dean, G. 1996.** At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Bacteriology* 178:4590-4596.
- Rott, P. et Davis, M. J. 1996.** Recent advances in research on variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists* 22:498-504.
- Rott, P. et Davis, M. J. 2000.** Leaf scald. P. 38-44 *in*: A Guide to Sugarcane Diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft et A. S. Saumtally, eds. CIRAD and ISSCT, Montpellier, France.
- Rott, P., Davis, M. J. et Baudin, P. 1994b.** Serological variability in *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane. *Plant Pathology* 43:344-349.
- Rott, P., Mohamed, I. S., Klett, P., Soupa, D., de Saint-Albin, A., Feldmann, P. et Letourmy, P. 1997b.** Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology* 87:1202-1213.
- Royer, M., Costet, L., Vivien, E., Bes, M., Cousin, A., Damais, A., Pieretti, I., Savin, A., Megessier, S., Viard, M., Frutos, R., Gabriel, D. W. et Rott, P. 2004.** Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS gene present in a

- gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17:414-427.
- Rudolph, K. 1993.** Infection of the plant by *Xanthomonas*. P. 193-264 *in*: *Xanthomonas*. J. G. Swings et E. L. Civerolo, eds. Chapman & Hall, London, U. K.
- Salanoubat, M., et al. 2002.** Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497-502.
- Salmond, G. P. C. 1994.** Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 32:181-200.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T. 1989.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New-York, U. S.
- Sandkvist, M. 2001.** Biology of type II secretion. *Molecular Microbiology* 40:271-283.
- Saumtally, S., Medan, H. et Autrey, L. J. C. 1996.** Evolution of aerial infection of leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in sugarcane. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists* 22:493-497.
- Schoolnik, G. K. 2002.** Microarray analysis of bacterial pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology* 46:1-45.
- Shevchnik, V. E. et Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 1997.** Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* 24:1285-1301.
- Simpson, A. J. G., et al. 2000.** The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-157.
- Soopramanien, G. C. 2000.** Sugarcane morphology, anatomy and physiology. P. 13-20 *in*: *A Guide to Sugarcane Diseases*. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft et A. S. Saumtally, eds. CIRAD and ISSCT, Montpellier, France.
- Stackebrandt, E. 1988.** Phylogenetic relationships vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 34:552-556.
- Sun, Q., Wu, W., Qian, W., Hu, J., Fang, R. et He, C. 2003.** High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. *FEMS Microbiology Letters* 226:145-150.
- Sutherland, I. W. 1997.** Microbial exopolysaccharides - Structural subtleties and their consequences. *Pure and Applied Chemistry* 69:1911-1917.
- Sutherland, I. W. 2001.** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3-9.
- Tang, J.-L., Barber, C. E., Dow, J. M., Wootton, J. C. et Daniels, M. J. 1991.** Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular Genetics and Genomics* 226:409-417.

- Tang, J.-L., Feng, J. X., Li, Q. Q., Wen, H. X., Zhou, D. L., Wilson, T. J., Dow, J. M., Ma, Q. S. et Daniels, M. J. 1996.** Cloning and characterization of the *rpfC* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: involvement in exopolysaccharide production and virulence to rice. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 9:664–666.
- Tans-Kersten, J., Huang, H. et Allen, C. 2001.** *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology* 183:3597-3605.
- Thomas, N. A. et Finlay, B. B. 2003.** Establishing order for type III secretion substrates: a hierarchical process. *Trends in Microbiology* 11:398-403.
- Tinsley, C. R. et Nassif, X. 1996.** Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. *Proceedings of the National Academy of Science* 93:11109-11114.
- Titarenko, E., Lopez-Solanilla, E., Garcia-Olmedo, F. et Rodriguez-Palenzuela, P. 1997.** Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *Journal of Bacteriology* 179:6699-6704.
- Van den Broek, P., Pittet, A. et Hajjaj, H. 2001.** Aflatoxin genes and the aflatoxigenic potential of Koji moulds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:192-199.
- Van Dillewijn, C. 1960.** Botanique de la canne à sucre. Hoveenman et Zonen N. V., Amsterdam, Netherlands, 321 p.
- Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P. et Simpson, A. J. 2002.** Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 40:169-189.
- Varshavsky, A. J., Nedospasov, S. A., Bakayev, V. V., Bakayeva, T. G. et Georgiev, G. P. 1977.** Hostone-like proteins in the purified *Escherichia coli* deoxyribonucleoprotein. *Nucleic Acids Research* 4:2725-2745.
- Vauterin, L., Hoste, B., Yang, P., Alvarez, A., Kersters, K. et Swings, J. 1993.** Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. P. 157-192 in: *Xanthomonas*. J. G. Swings et E. L. Civerolo, eds. Chapman & Hall., London, U. K.
- Vivien, E. 2005.** Biosynthèse de l'albicidine, une pathotoxine produite par *Xanthomonas albi lineans*. Thèse de doctorat en sciences. Université de Montpellier II, Montpellier, France, 123 p.
- Vivien, E., Megessier, S., Pieretti, I., Cociancich, S., Frutos, R., Gabriel, D. W., Rott, P. C. et Royer, M. 2005.** *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiology Letters* 251:81-89.
- Vojnov, A. A., Slater, H., Daniels, M. J. et Dow, J. M. 2001.** Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 14:768-774.

- Von Bodman, S. B., Bauer, W. D. et Coplin, D. L. 2003.** Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41:455-482.
- Wall, D. et Kaiser, D. 1999.** Type IV pili and cell motility. *Molecular Microbiology* 32:1-10.
- Wang, L.-H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y.-H., He, C., Wang, S. X., Weng, L.-X., Xu, J.-L., Tay, L., Fang, R. X. et Zhang, L.-H. 2004.** A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology* 51:903-912.
- Weiland, J. J. et Edwards, M. C. 1996.** A single nucleotide substitution in the alpha a gene confers oat pathogenicity to barley stripe mosaic virus strain ND18. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 9:62-67.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. et Salmond, G. P. 2001.** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25:365-404.
- Withers, H., Swift, S. et Williams, P. 2001.** Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4:186-193.
- Yang, P., Rott, P., Vauterin, L., Hoste, B., Baudin, P., Kersters, K. et Swings, J. 1993.** Interspecific variability of *Xanthomonas albilineans*. *Systematic and Applied Microbiology* 16:420-426.
- Ye, R. W., Wang, T., Bedzyk, L., and Kroker, K.M. 2001.** Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods* 47:257-272.
- Zhang, L. et Birch, R. G. 1995.** Biocontrol of sugar cane leaf scald disease by an isolate of *Pantoea dispersa* which detoxifies albicidin phytotoxins. *Letters in Applied Microbiology* 22:132-136.
- Zhang, L. et Birch, R. G. 1997.** The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94:9984-9989.
- Zhang, L., Xu, J. et Birch, R. G. 1998.** Factors affecting biosynthesis by *Xanthomonas albilineans* of albicidin antibiotics and phytotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 85:1023-1028.
- Zhang, L., Xu, J. et Birch, R. G. 1999.** Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nature Biotechnology* 17:1021-1024.
- Zhang, L.-H. 2003.** Quorum quenching and proactive host defense. *TRENDS in Plant Science* 8:238-244.
- Zhang, Y., Rowley, K. B. et Patil, S. S. 1993.** genetic organization of a cluster of genes involved in the production of phaseolotoxin, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology* 175:6451-6464.

LISTE des ANNEXES

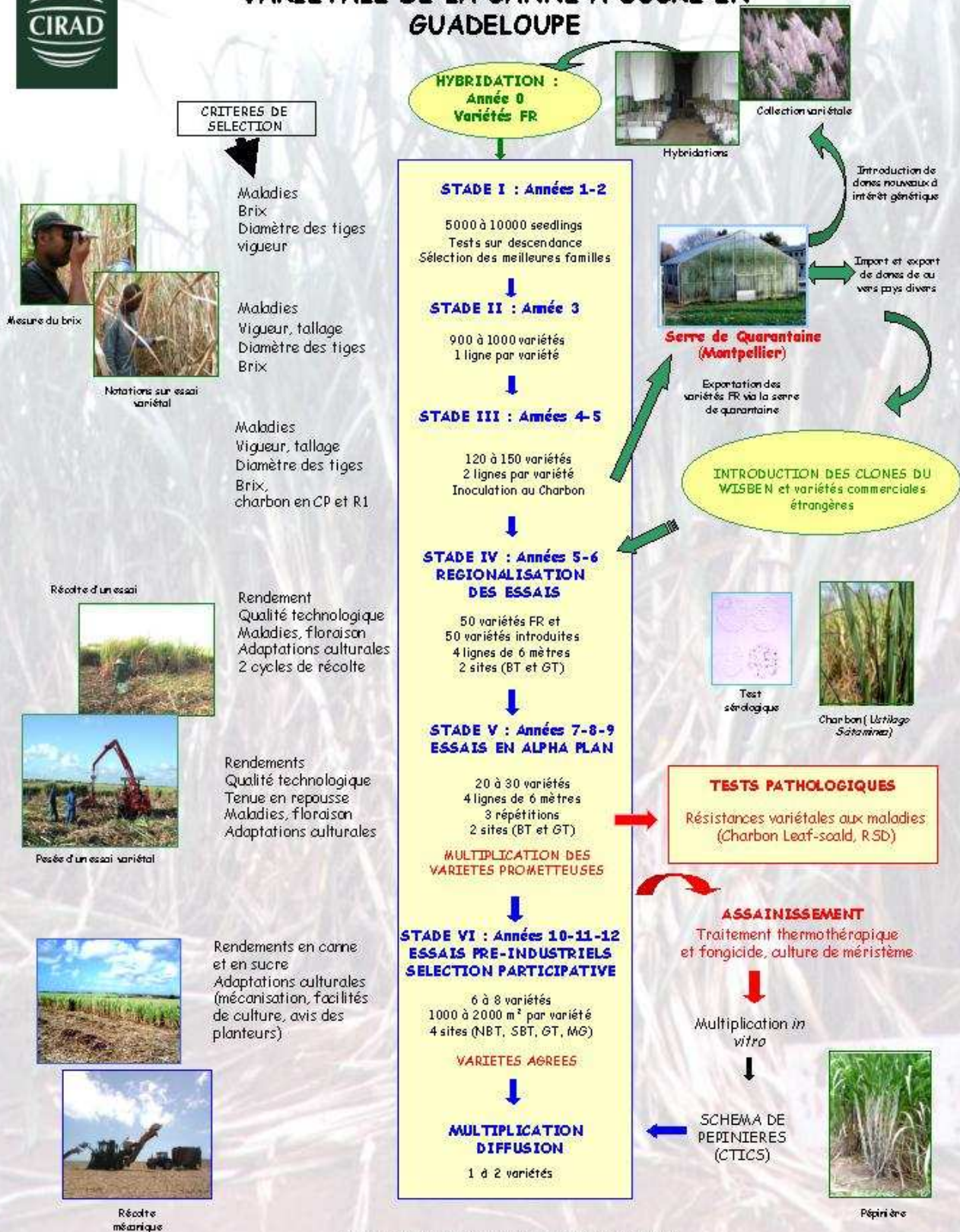
ANNEXES

- Annexe 1.** Le schéma d'amélioration variétale de la canne à sucre en Guadeloupe.....170
- Annexe 2.** Les milieux de culture spécifiques de *Xanthomonas albilineans*.....171



Annexe 1

SCHEMA D'AMELIORATION VARIETALE DE LA CANNE A SUCRE EN GUADELOUPE



(NBT) : Nord BASSE-TERRE, (SBT) : Sud BASSE-TERRE
(GT) : GRANDE-TERRE, (MG) : MARIE-GALANTE

Annexe 2

Les milieux de culture spécifiques de *Xanthomonas albilineans*

Milieu Wilbrink (MW) modifié (Rott *et al.*, 1988b) :

Peptone	5 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	10 g
Sodium sulfite ($\text{Na}_2\text{SO}_3, 7 \text{ H}_2\text{O}$)	0,05 g
Magnésium sulfate ($\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$)	0,25 g
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	0,5 g
Bénomyl	12,5 mg
Agar	15 g
Eau distillée	1 L
pH	6,9-7,0

Sous forme liquide ne pas ajouter l'agar.

Milieu sélectif (XAS; Davis *et al.*, 1994) :

Correspond au milieu Wilbrink modifié complémenté de :

Bénomyl	2 mg
Bromure de potassium (KBr)	5 g

Ajouter après autoclavage :

Cycloheximide ¹	100 mg
Céphalexine ²	25 mg
Novobiocine ²	30 mg
Kasugamycine ²	50 mg

¹ Dissout dans un volume minimum d'alcool à 90°.

² Dissous dans de l'eau stérile filtré sur microfiltre 0,1 µM.

Abstract

Xanthomonas albilineans is the causal agent of sugarcane leaf scald, a disease that occurs in at least 60 geographical locations in the world. Impact of the disease can be very severe (yield losses, plant death) when susceptible sugarcane varieties are infected by the pathogen. During the last two decades, outbreaks of the disease have been reported in several geographical areas, including Guadeloupe. Control of the disease and of the pathogen evolution can be achieved through breeding and screening of resistant sugarcane varieties. However, to insure long-term control of the disease, it is essential to determine the variability of *X. albilineans* and, in particular, the variations in the mechanisms of pathogenicity.

Three main factors involved in pathogenicity of *X. albilineans* have been identified: i) production of a toxin called albicidin, ii) symptom expression on leaves and iii) colonization of the sugarcane stalk. Albicidin plays a key role in symptom incitation by the pathogen. According to several authors, the toxin may also facilitate sugarcane stalk colonization. First studies of the genetic base of albicidin production by strain Xa23R1, from Florida, lead to the identification of three regions of the pathogen's genome. These regions include 22 ORFs (*albI* to *albXX*) involved or potentially involved in biosynthesis of the toxin. So far, no *hrp* or *avr* genes that were identified in most other phytopathogenic bacteria have been found in *X. albilineans*. Therefore, other genes that play a key role in pathogenicity of this pathogen remain to be identified.

In the first part of this thesis, we looked for a relationship between variability of genes involved or potentially involved in albicidin biosynthesis and variability of the factors known to be involved in pathogenicity of *X. albilineans*. Ten haplotypes and 2 major genetic groups, called ALB-RFLP⁵⁷¹-A and ALB-RFLP⁵⁷¹-B, were identified among 137 strains of *X. albilineans* from 27 geographical areas. Almost all strains of the pathogen that were isolated during the last 15 years in geographical areas where leaf scald outbreaks were reported belonged to group ALB-RFLP⁵⁷¹-B. Additionally, a strong relationship was found between these 2 genetic groups and the AFLP and RFLP groups that were previously described for this pathogen. Variability in albicidin produced *in vitro* by *X. albilineans* was shown and albivars were identified among the 139 bacterial strains used in this study. However, no relationship between this variability and genetic groups ALB-RFLP⁵⁷¹-A and ALB-RFLP⁵⁷¹-B was found. Different pathogenicity groups, based on symptom severity (pathotypes) and pathogen population density in the stalk (colovars), were identified among 21 strains of *X. albilineans* which represented different albivars and genetic groups identified in this study. No relationship between these pathogenicity groups and the ALB-RFLP⁵⁷¹-A and ALB-RFLP⁵⁷¹-B groups was found. Nevertheless, these results suggested that sugarcane stalk colonization by *X. albilineans* involves other factors than albicidin, and the research of these factors is described in the second part of this thesis.

In the second part of this thesis, we aimed to identify and to characterize the variability of new genes involved in pathogenicity of *X. albilineans*. Two techniques were used with 19 strains of the pathogen from Guadeloupe, representing different pathotypes (based on intensity of sugarcane stalk colonization and severity of disease symptoms), but that were genetically identical (based on RFLP data of the albicidin biosynthesis genes or the whole bacterial genome):

i) AFLP analysis of the whole genome with 16 selective primer combinations. Variability among strains and 2 major genetic groups were identified, but no relationship between this genetic variability and variability in pathogenicity of *X. albilineans* was found.

ii) PCR amplification of genes involved in pathogenicity of other bacterial plant pathogens closely related to *X. albilineans*, and particularly *X. campestris* pv. *campestris* and *Xylella fastidiosa*. Forty primer combinations representing 40 genes were used, but only three genes (*pilB*, *rpfA* et *xpsE*) could be amplified from *X. albilineans*. No difference in the nucleotide sequence of these genes in 9 strains of *X. albilineans* differing in pathogenicity was found. Phylogenetic study based on sequences of these three genes and two housekeeping genes revealed that *X. albilineans* represents a distinct group between the *X. campestris* group and *Xylella fastidiosa*, another xylem-invading bacterium.

Sequencing of the whole genome of strain GPEPC73, isolated during this thesis, is in progress at Genoscope in Evry/France. Obtaining and deciphering the whole sequence of the genome of *X. albilineans* is the next step for the comprehension of the genetic basis of *X. albilineans* pathogenicity, and for better management of sugarcane resistance against leaf scald disease in Guadeloupe, and in the world.

Key words: Sugarcane, leaf scald, *Xanthomonas albilineans*, pathogenicity, toxin, albicidin, disease severity, stalk colonization, genetic diversity, pathogenicity genes, RFLP, AFLP, PCR.

Résumé

Xanthomonas albilineans est l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre, une maladie présente dans plus de 60 zones géographiques à travers le monde. Cette maladie peut avoir un impact très important (perte de rendement, mortalité des plantes) lorsque des variétés de canne à sucre sensibles sont cultivées. Des recrudescences de la maladie ont été observées au cours des deux dernières décennies dans plusieurs zones géographiques, et notamment en Guadeloupe. La sélection variétale représente le moyen de lutte le plus efficace contre l'échaudure des feuilles et l'évolution de son agent causal. Cependant, pour assurer une gestion et un contrôle durable de la maladie, il est nécessaire de connaître la variabilité de *X. albilineans*, et plus précisément les mécanismes impliqués dans la variabilité de son pouvoir pathogène.

Trois composantes du pouvoir pathogène ont été identifiées chez *X. albilineans* : i) la production d'une toxine, l'albicidine, ii) la capacité à induire des symptômes foliaires et iii) la capacité de colonisation de la tige de canne à sucre. L'albicidine joue un rôle clé dans l'induction des symptômes foliaires de la maladie. Selon certains auteurs, elle pourrait également jouer un rôle dans la colonisation de la tige de canne à sucre. L'étude des bases génétiques de l'albicidine chez la souche Xa23R1, originaire de Floride, a permis d'identifier trois régions du génome regroupant 22 ORFs (*albi* à *albXXII*) potentiellement impliqués dans la production de la toxine. Par ailleurs, contrairement à la plupart des bactéries phytopathogènes, aucun gène *hrp* ou *avr* n'a été mis en évidence chez *X. albilineans* et d'autres gènes jouant un rôle clé dans la pathogénie de cette bactérie restent à identifier.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons analysé les relations entre la variabilité des gènes putatifs impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine et la variabilité des différentes composantes du pouvoir pathogène de *X. albilineans*. Dix haplotypes distincts et 2 groupes génétiques majeurs, nommés ALB-RFLP⁵⁷¹-A et ALB-RFLP⁵⁷¹-B, ont été identifiés à partir de 137 souches de *X. albilineans* originaires de 27 zones géographiques. Presque toutes les souches de *X. albilineans* originaires de zones géographiques où une recrudescence de l'échaudure des feuilles a eu lieu ces quinze dernières années appartiennent au groupe ALB-RFLP⁵⁷¹-B. De plus, il existe une très forte correspondance entre ces deux groupes génétiques et les groupes AFLP et RFLP déjà décrits par ailleurs pour cet agent pathogène. Des variants de production d'albicidine *in vitro* (albivars) ont aussi été identifiés parmi les 139 souches de *X. albilineans* testées, mais aucune relation entre cette variabilité et les groupes génétiques ALB-RFLP⁵⁷¹-A et ALB-RFLP⁵⁷¹-B n'a pu être mise en évidence. Par ailleurs, des groupes de pathogénie ont été identifiés, sur la base de l'intensité des symptômes foliaires (pathotypes) et de l'intensité de colonisation de la tige (colovars), chez 21 souches de *X. albilineans* produisant des quantités d'albicidine différentes et qui sont représentatives de la variabilité génétique révélée au cours de cette étude. Aucune relation n'a pu être mise en évidence entre ces groupes de pathogénie et les groupes génétiques ALB-RFLP⁵⁷¹-A et ALB-RFLP⁵⁷¹-B. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats suggère que la capacité de colonisation de la tige de canne à sucre implique d'autres facteurs que l'albicidine, et leur étude a fait l'objet des recherches décrites dans la deuxième partie de cette thèse.

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons essayé d'identifier et de caractériser la variabilité de nouveaux gènes impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*. Deux approches ont été utilisées avec 19 souches de l'agent pathogène originaires de Guadeloupe, de pathogénie différente (capacité différente à coloniser la tige de canne à sucre et à induire des symptômes de la maladie) et pour lesquelles aucune variabilité n'a été détectée par RFLP au niveau des gènes de biosynthèse de l'albicidine et sur l'ensemble du génome de la bactérie :

i) Analyse AFLP du génome de la bactérie en utilisant 16 combinaisons d'amorces sélectives. Une variabilité entre souches et deux groupes génétiques majeurs ont été identifiés, mais aucune relation entre cette variabilité génétique et la variabilité du pouvoir pathogène de *X. albilineans* n'a pu être montrée.

ii) Amplification par PCR de gènes impliqués dans la pathogénie d'espèces bactériennes proches de *X. albilineans*, et notamment *X. campestris* pv. *campestris* et *Xylella fastidiosa*. Quarante couples d'amorces représentant 40 gènes ont été testés mais seulement trois gènes (*pilB*, *rpfA* et *xpsE*) ont pu être amplifiés chez *X. albilineans*. Aucune différence n'a été observée dans la séquence nucléotidique de ces gènes chez 9 souches de *X. albilineans* à pathogénie variable. Une étude phylogénétique réalisée à l'aide des séquences de ces trois gènes et de deux gènes de ménage a permis de montrer que *X. albilineans* représente un groupe distinct situé entre le groupe *X. campestris* et *Xylella fastidiosa*, une autre bactérie phytopathogène du xylème.

Le génome complet de la souche GPEPC73, isolée au cours de cette thèse, est actuellement séquencé au Genoscope, à Evry. L'obtention et le déchiffrement de la séquence complète du génome de *X. albilineans* constituent la prochaine étape de la caractérisation des bases génétiques de la pathogénie de *X. albilineans* et d'une gestion plus durable de la résistance de la canne à sucre à l'échaudure des feuilles en Guadeloupe, et dans le monde.

Mots clés : Canne à sucre, échaudure des feuilles, *Xanthomonas albilineans*, pouvoir pathogène, toxine, albicidine, intensité de maladie, colonisation de tige, diversité génétique, gènes de pathogénie, RFLP, AFLP, PCR.