

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
13 janvier 2011 (13.01.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/003984 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/20 (2006.01) *C07K 16/12* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) *C12R 1/38* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2010/059833

(22) Date de dépôt international :
8 juillet 2010 (08.07.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
09 54734 8 juillet 2009 (08.07.2009) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CLAUDE [FR/FR]; Rue Louis Saillant, Zi La Motte,
F-26800 Portes-les-Valences (FR). **INSTITUT
NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE** [FR/FR]; 147 rue de l'Université,
F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
MANCEAU, Charles [FR/FR]; 7 rue Jacques Brel,
F-49240 Avrillé (FR). **GIRONDE, Sophie** [FR/FR]; 15
rue du Bac, F-49000 Ecouflant (FR). **BRIAND, Bérénice**
[FR/FR]; 9 allée de Vienne, F-49460 Montreuil Juigne
(FR). **LYBEERT, Hubert** [FR/FR]; Route de Baume de
Transit, F-84600 Valreas (FR).

(74) Mandataire : **CABINET PLASSERAUD**; 235 cours
Lafayette, F-69006 Lyon (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : MEANS AND METHODS FOR DETECTING AND IDENTIFYING A NOVEL BACTERIUM RESPONSIBLE FOR PHYTOSANITARY DISORDERS IN PLANTS (ZUCCHINI) AND NOVEL RESISTANT PLANTS

(54) Titre : MOYENS ET METHODES DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE BACTERIE RESPONSABLE D'AFFECTIONS PHYTOSANITAIRES SUR DES PLANTES (COURGETTES) ET NOUVELLES PLANTES RESISTANTES

(57) Abstract : The invention relates to a novel bacterium named *Pseudomonas syringaea peponis*, filed with the National Collection of Cultures of Microorganisms under number CNCM I-4159. The invention also relates to a molecular marker, to various nucleotide primers, and to an immunological means for detecting and identifying said novel *Pseudomonas syringaea peponis* bacterium.

(57) Abrégé : L'invention concerne une nouvelle bactérie nommée *Pseudomonas syringaea peponis* déposée auprès de la Collection Nationale de Culture de MicroOrganismes sous le numéro CNCM I-4159. L'invention concerne également un marqueur moléculaire, différentes amorces nucléotidiques ainsi qu'un moyen immunologique permettant de détecter et d'identifier cette nouvelle bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*.



WO 2011/003984 A1

**MOYENS ET METHODES DE DETECTION ET D'IDENTIFICATION D'UNE
NOUVELLE BACTERIE RESPONSABLE D'AFFECTIONS PHYTOSANITAIRES
SUR DES PLANTES (COURGETTES) ET NOUVELLES PLANTES
RESISTANTES**

5

Le domaine de l'invention est celui de la détection des infections (notamment bactériennes) sur des plantes, et en particulier sur des courgettes.

Plus précisément, l'invention concerne des moyens, des méthodes et des kits de détection et d'identification des bactéries provoquant lesdites infections, ces moyens, méthodes et kits relevant de la biologie moléculaire et/ou de l'immunologie et/ou de la microbiologie.

L'invention vise également une nouvelle bactérie responsable d'infections (notamment bactériennes) sur des plantes, et en particulier sur des courgettes.

L'invention a trait par ailleurs à des méthodes d'identification et de création de plantes résistantes à cette nouvelle bactérie.

15

La distribution et le commerce de semences implique pour les sociétés semencières la nécessité de fournir des semences exemptes, à certains seuils définis, de pathogènes et des maladies y associées, qu'ils soient d'origine virale, fongique ou bactérienne.

En effet, la contamination d'une semence dans un lot peut éventuellement et rapidement déclencher une épidémie dans la serre ou dans le champ où les plantes issues de ces semences sont cultivées. Cette épidémie peut, selon les cas, ravager la culture du champ ou de la serre et induire des pertes considérables de rendement et donc d'exploitation pour l'agriculteur. Ainsi par exemple la bactérie *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis* qui peut être présente sur les semences de tomate. Elle est transmise mécaniquement ou par les eaux d'irrigation et peut anéantir tout un champ de production en provoquant des flétrissements des plantes.

Afin d'éviter ou de ralentir la propagation territoriale de certains pathogènes, le commerce international des semences est régulé, notamment par la nécessité de fournir des certificats phytosanitaires pour le transit des graines d'un territoire à l'autre. La qualité sanitaire des semences est donc un critère majeur pour leur commercialisation des semences et pour la gestion de la qualité sanitaire des cultures.

Il est donc important de connaître l'état sanitaire des graines. Ainsi, les lots de semences contaminées, peuvent être soit traités ou décontaminés, soit détruits.

La transmission de bactéries par la semence est une étape critique dans l'écologie de nombreuses bactéries phytopathogènes (micro-organismes ayant une écologie liée aux végétaux et qui sont capables d'attaquer des plantes) mais également dans l'épidémiologie des maladies qu'elles occasionnent. Les bactéries survivent dans les semences pendant des durées très longues pouvant même être supérieures à la durée de vie de la semence. Dans

certaines circonstances dépendant des agents pathogènes et des régimes climatiques, la semence contaminée représente l'unique source d'inoculum dans une culture. Pouvoir contrer cette source d'inoculum représente donc un enjeu majeur pour lutter efficacement contre les bactéries phytopathogènes.

5 La lutte contre ces bactéries passe par leur détection et leur identification.

Les techniques traditionnelles de détection et d'identification de bactéries phytopathogènes sur semences se répartissent généralement en deux catégories :

1) les techniques « classiques » d'isolement des souches sur des milieux sélectifs, suivies de test de pathogénicité consistant en des inoculations de souches isolées sur plantes
10 témoin saines.

2) les autres techniques développées récemment basées sur des réactions immunologiques de type ELISA qui sont rapides, simples d'utilisation et peu coûteuses.

15 Le document WO 00/77214 décrit également une technique de détection de médicaments antifongiques par l'administration d'une substance test et l'analyse de l'expression différentielle de certains gènes de levure. Pour ce faire, des sondes d'ADN marquées sont utilisées.

20 Par ailleurs, il est important de pouvoir rapidement diagnostiquer, dans une serre ou dans un champ, l'apparition d'un pathogène afin de pouvoir prendre les mesures de sauvegarde adéquates de la culture. Plus l'identification est rapide et précise, plus les actions de lutte seront efficaces. Des mesures rapides permettent généralement de diminuer les doses des traitements appliqués sur la culture. Ces traitements ayant un coût économique et environnemental, leur diminution est importante pour l'agriculteur.

25

Les plantes particulièrement visées par l'invention sont les courgettes et les infections bactériennes susceptibles de les affecter. Plus précisément, on s'intéresse dans ce qui suit à la courgette *Cucurbita pepo* qui est une plante annuelle à tige courte, à port dressé dans ses premiers stades de développement, sans ramification, à feuilles de grande dimension,
30 longuement pétiolées, découpées et rugueuses. La plante est monoïque, à grandes fleurs jaunes et à fruit de couleur et de morphologie très variables (J.Y. Péron 2006 Lavoisier: économie de la courgette 327-328).

En France, la production de courgette est concentrée dans le sud est qui représente 60% des surfaces, tant en production de serre que de plein champs. La production de 2008
35 représente environ 134 000 tonnes, en production de frais et en production pour la transformation.

Si la France exporte environ 20 000 tonnes de courgettes, elle en importe surtout 100 000 tonnes, principalement de l'Espagne, du Maroc et d'Italie qui sont aussi des pays de production (Note Agreste Conjoncture, Novembre 2008).

Les graines et plantes de courgettes peuvent subir divers types d'agression de pathogènes, qu'ils soient de nature virale, fongique ou bactérienne.

Dans ce contexte, l'un des objectifs essentiels de l'invention est de comprendre et d'identifier les causes des affections phytosanitaires des plantes et des semences, et en particulier des courgettes.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de mettre au point des moyens, des méthodes et des kits efficaces, fiables, rapides, spécifiques et économiques de détection et d'identification des agents pathogènes, notamment des bactéries, responsables de ces affections phytosanitaires.

Un autre objectif essentiel de l'invention est que ces moyens, des méthodes et des kits de détection et d'identification puissent être mis en œuvre sur des échantillons, de préférence végétaux, et, plus préférentiellement encore sur des graines (semences), des plantes entières, des parties de plantes, ou sur les sols de culture (en plein air ou sous abri) afin de vérifier son éventuelle contamination par ladite bactérie.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de mettre au point des moyens et des méthodes performants de lutte contre ces affections phytosanitaires, telles que des moyens et des méthodes d'identification, voire de création, de plantes résistantes à ces affections phytosanitaires.

DESCRIPTION SOMMAIRE DE L'INVENTION

S'étant fixé ces objectifs, parmi d'autres, il est du mérite de la demanderesse d'avoir récemment identifié dans des lots de semences et sur des plants de courgettes *Cucurbita pepo* une nouvelle bactérie pathogène responsable de symptômes, qui, jusqu'alors, n'étaient pas corrélés à une bactériose. Cette nouvelle bactérie pathogène provoque des nécroses sur les cotylédons des plantules, des décolorations sur les jeunes feuilles, un rabougrissement de la plante et le blocage de son développement. Une attaque plus tardive dans le développement de la plante provoque des nécroses sur les feuilles, nécroses brunes entourées d'un halo jaune et dans ce cas l'incidence sur la production est seulement mineure.

Cette nouvelle bactérie a été identifiée et caractérisée par les inventeurs comme étant une bactérie du type *Pseudomonas syringae*, nommée *Pseudomonas syringae* pv. *Peponis*, en raison de sa spécificité sur les courgettes.

Pseudomonas syringae est une bactérie gram négative, pathogène des plantes et dont les souches sont définies suivant leur capacité à attaquer certains hôtes. Des souches

spécifiques ont été définies sur plus de 50 espèces végétales qu'elles sont susceptibles d'attaquer. Les *Pseudomonas* sont un groupe large et très ubiquiste.

Forts de cette avancée, les inventeurs ont également développé de nouvelles techniques de détection et d'identification de ces bactéries phytopathogènes et donc de diagnostic des maladies phytosanitaires subséquentes.

Les objectifs susvisés, parmi d'autres, sont ainsi atteints par la présente invention qui concerne tout d'abord une nouvelle bactérie responsable des symptômes évoqués ci-dessus, à savoir la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* isolée et déposée le 19.05.2009 auprès de la Collection Nationale de Culture de MicroOrganismes sous le numéro CNCM I-4159.

Cette bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* a été identifiée et caractérisée par des techniques faisant appel notamment:

- à la biologie moléculaire,
- à l'immunologie,
- à la microbiologie,
- à des tests comparatifs sur des cultures comprenant des témoins positifs contaminés voire des témoins négatifs sains.

Cela a ouvert l'accès à de nouvelles techniques de détection et d'identification qui allient sensibilité, spécificité et facilité d'utilisation et qui sont applicables sur des échantillons de type sol, semences, plante entière ou partie de plante.

Les techniques de biologie moléculaire sont notamment l'hybridation de sondes spécifiques de séquences de nucléotides de ladite bactérie ou l'amplification génétique. C'est ainsi qu'ont été mis au point des tests de détection PCR (Polymerase Chain Reaction) sur des bactéries du haricot (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) et sur des bactéries de la tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*).

Les techniques immunologiques sont par exemple de type ELISA.

Les techniques microbiologiques sont notamment des cultures cellulaires et des études biochimiques et morphologiques.

L'invention a également pour objet:

- Des nouveaux moyens (ou outils) de biologie moléculaire, à savoir des marqueurs moléculaires (sondes et amorces) spécifiques de la nouvelle bactérie identifiée *Pseudomonas syringae* pv. *Peponis*; (par exemple sonde formée par tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°11 ou SEQ ID N°12 et amorces par exemple choisies parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°9 ou SEQ ID N°10).
- De nouveaux anticorps aptes à reconnaître et à se lier de manière spécifique à la nouvelle bactérie identifiée *Pseudomonas syringae* pv. *Peponis*.
- De nouvelles méthodes d'identification et de détection de cette nouvelle bactérie dans un échantillon donné. Ces méthodes peuvent être mises en œuvre à l'aide de divers

techniques et moyens susvisés de biologie moléculaire, d'immunologie, de microbiologie et de cultures comparatives de plantes.

- Des nouveaux kits de détection de la nouvelle bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* comprenant au moins un desdits moyens (outils) susmentionnés pour la mise en œuvre d'au moins une desdites méthodes de d'identification et de détection de la nouvelle bactérie.

- L'utilisation de l'une des méthodes et/ou de l'un des outils de la présente invention pour identifier la présence de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* dans un lot de graine, sur une plante, sur une plantule, sur une partie de plante, voire dans un sol.

- Une nouvelle méthode d'identification de plantes résistantes à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* comprenant l'inoculation d'au moins une plante avec la bactérie et l'identification de la plante qui ne présente pas les symptômes de sensibilité à la bactérie.

- Une nouvelle méthode d'inoculation d'un échantillon avec une bactérie, caractérisée en ce que l'inoculum mis en œuvre comprend la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis*.

- Une nouvelle méthode de création de plante résistante à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* comprenant l'identification d'une première plante résistante à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis*, son croisement avec une plante sensible à ladite bactérie et l'identification dans la descendance de ce croisement de plante résistante à la bactérie.

- Une nouvelle méthode de sélection ou d'identification d'un lot de semences caractérisé en ce qu'il met en œuvre au moins l'une des méthodes et/ou au moins l'un des outils de diagnostics selon la présente invention pour identifier la contamination dudit lot de semence par la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis*.

Il est bien évident que les méthodes de détection de la nouvelle bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* peuvent être utilisés séparément ou bien de manière combinée. Ainsi la nouvelle bactérie identifiée peut être détectée au moyen de techniques de biologie moléculaire et/ou au moyen de techniques d'immunologie et/ou de microbiologie et/ou au moyen d'un milieu de culture spécifique.

Ces nouveaux moyens et méthodes permettent de déterminer si les graines (semences) ou les plantes sont infectées par cette nouvelle bactérie et donc affectées par la maladie correspondante.

Selon un aspect particulier de l'invention, la plante est une plante de la famille des cucurbitacées, de manière préférée une plante du genre *cucurbita* ou du genre *cucumis* tel que notamment *cucumis melo* (melon) ou *cucumis sativus* (concombre), de manière encore préférée une plante de courgette *cucurbita pepo*.

DEFINITIONS

Afin de mieux comprendre l'invention, il convient tout d'abord de rappeler ou de donner quelques définitions. Au sens de la présente demande :

5 - Par plante, on entend par exemple un végétal à quelque stade de développement que ce soit, notamment : graine, embryon, ou tout autre stade plantule ou de la plante adulte.

- Par courgette, on entend par exemple une plante du genre *Cucurbita*. La courgette est notamment un ensemble de cultivars de l'espèce *Cucurbita pepo* et de la sous-espèce *Cucurbita pepo ssp. pepo*.

10 - Par marqueur moléculaire, on entend par exemple un fragment spécifique d'une séquence d'ADN pouvant être identifiée au sein du génome d'un individu et pouvant être notamment utilisée pour localiser un gène d'intérêt, vérifier si un individu a hérité d'une caractéristique particulière d'un parent ou différencier des individus. Il peut s'agir ou non d'une séquence codante. Le marqueur peut être dominant, co-dominant. La détection du
15 marqueur moléculaire, ou sa non-détection, permet de sélectionner les individus présentant le gène d'intérêt ou la caractéristique particulière, ou au contraire, de ne pas sélectionner les individus ne présentant pas le gène d'intérêt ou la caractéristique particulière. Dans la présente invention, les marqueurs moléculaires permettent de tester rapidement les bactéries, les graines, les plantes ou les parties de plantes et d'identifier les bactéries
20 comme étant ou pas des bactéries *Pseudomonas Syringae pv. peponis*, et/ou de diagnostiquer la présence ou l'absence de cette bactérie sur les graines, les plantes ou les parties de plantes analysées.

Un marqueur moléculaire spécifique selon la présente invention sera un marqueur moléculaire identifiant spécifiquement la bactérie *Pseudomonas Syringae pv. peponis*. Il
25 permet de différencier cette bactérie d'autres bactéries, notamment d'autres bactéries *Pseudomonas*. Le marqueur 4Ba est un tel marqueur moléculaire spécifique.

- Par partie de plante on entend notamment le pollen, les ovules, les embryons, les feuilles, les anthères, les tiges, les pétioles, les racines, les fruits, les graines, les fleurs, les bourgeons, les protoplastes, les cals, les cellules et tissus cellulaires.

30 - Par résistance d'une plante à la bactérie *Pseudomonas syringae pv. peponis* on entend par exemple la capacité d'une plante à restreindre la croissance et le développement de la bactérie et/ ou les dommages qu'ils occasionnent, en comparaison avec des plantes sensibles et dans des conditions similaires, environnementales et de pression de cette bactérie. Les plantes résistantes peuvent exprimer quelques symptômes de la maladie ou
35 quelques dommages en cas de forte pression de la bactérie.

- Par sensibilité d'une plante à la bactérie *Pseudomonas syringae pv. peponis*, on entend par exemple l'incapacité d'une plante à restreindre la croissance et le développement de la bactérie, développant alors les symptômes de nécroses sur les cotylédons des plantules, de

décolorations sur les jeunes feuilles, de rabougrissement de la plante et du blocage de son développement.

- Par gène de ménage on entend par exemple des gènes qui interviennent dans les métabolismes principaux, gènes communs à toutes les bactéries, codant pour des fonctions essentielles

- Par amorce, on entend une séquence artificielle d'ADN, courte (de 4 à 30 paires de bases) complémentaire d'un des brins du fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ou que l'on souhaite séquencer.

10 DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Les inventeurs ont donc levé le voile sur un problème phytosanitaire lié aux cultures de courgettes *Cucurbita pepo*. Ce problème se manifeste principalement par les nécroses foliaires sur jeunes plantules. En conditions de basse température, les symptômes peuvent devenir systémiques, provoquant des éclaircissements sur jeunes feuilles et un blocage des plantes. Une attaque tardive sur plantes adultes se manifestera par la présence de nécroses entourées d'un halo jaune sur les feuilles, sans grand dommage sur le rendement. C'est au niveau jeune plant que les dommages sont les plus marqués et aussi à ce stade que la transmission de plantules à plantules est la plus dangereuse. Ce problème affectant largement le rendement des plantes, il est apparu indispensable aux inventeurs d'identifier cette nouvelle bactérie et de fournir des procédés d'identification, de caractérisation de celle-ci mais aussi de fournir des procédés permettant de détecter la présence ou l'absence de cette bactérie sur un échantillon donné, de préférence un échantillon de plante ou de graine donnée, de préférence de courgette.

L'identification d'un nouveau problème phytosanitaire sur des cultures de courgettes manifesté par des symptômes de nécrose foliaires encore jamais vus sur de jeunes plantules a conduit les présents inventeurs à identifier une nouvelle bactérie déposée auprès de la Collection Nationale de Culture de MicroOrganismes sous le numéro CNCM I-4159. Cette nouvelle bactérie a été identifiée par les présents inventeurs comme une bactérie *Pseudomonas syringae*, et, de part sa présence sur des graines de courgettes, a été nommée *Pseudomonas syringae peponis*.

Selon un autre objet de l'invention, la bactérie *Pseudomonas syringae peponis* comprend au moins une séquence de nucléotides sélectionnée parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°5, SEQ ID N°6, SEQ ID N°9, SEQ ID N°10, SEQ ID N°11, SEQ ID N°12 et SEQ ID N°13.

La qualité sanitaire des semences étant un caractère majeur pour la commercialisation des semences et pour la gestion de la qualité sanitaire des cultures, il est capital de pouvoir

disposer de moyens d'identification de la présence ou de l'absence d'une bactérie dans un échantillon, que cet échantillon soit une graine, une plante, une partie de plante, voire éventuellement un sol d'un champ ou de serre.

Les présents inventeurs ont donc développé divers moyens et méthodes d'identification et de détection de la bactérie *Pseudomonas syringae peponis* ainsi que les moyens (outils) permettant la mise en œuvre desdites méthodes.

Moyens d'identification et de détection relevant de la biologie moléculaire

Sondes:

La présente invention a pour objet :

- Un marqueur moléculaire 4Ba de la bactérie *Pseudomonas syringae peponis* telle que définie ci-dessus.
- Un marqueur moléculaire 4Ba caractérisé en ce qu'il est défini par le couple d'amorces nucléotidiques constitué d'une part, par la séquence SEQ ID N°9 et/ou au moins une séquence comprenant au moins 8 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°9, de préférence au moins 11 nucléotides, et d'autre part, par la séquence SEQ ID N°10 et/ou au moins une séquence comprenant au moins 8 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°10.
- Un marqueur moléculaire 4Ba caractérisé en ce que sa séquence nucléotidique comprend tout ou partie de la SEQ ID N°11, de préférence au moins 11 nucléotides de la SEQ ID N°11, ou tout ou partie de la séquence SEQ ID N°12 (séquence complémentaire de SEQ ID N°11).

Un des objets de la présente invention concerne également la séquence de nucléotides isolée consistant en tout ou partie de la séquence SEQ ID N°11, de préférence au moins 11 nucléotides de la SEQ ID N°11, ou tout ou partie de la séquence SEQ ID N°12, caractérisée en ce qu'elle permet la détection de la bactérie *Pseudomonas syringae peponis*.

Cette séquence de nucléotides permet de réaliser au moins une sonde de nucléotides spécifique de ce marqueur 4 Ba et en particulier de tout ou partie de SEQ ID N°11, de préférence au moins 11 nucléotides de la SEQ ID N°11, ou tout ou partie de SEQ ID N°12.

Ces sondes sont des séquences d'ADN ou d'ARN marquées (par un composé fluorescent, un radioisotope, ou une enzyme ou tout autre molécule adaptée) que l'on utilise pour détecter des séquences homologues (complémentaires) par hybridation in situ ou in vitro avec leur séquence nucléotidique complémentaire. Elles permettent alors la détection et/ou la localisation du marqueur 4Ba et par conséquent de la bactérie *Pseudomonas syringae peponis*, objet de la présente demande. De préférence, selon la présente invention, on préférera les sondes d'ADN. La réalisation et l'utilisation des sondes marquées faisant

appel à des techniques largement connues de l'homme de l'art, elles ne seront pas rappelées dans le présent exposé.

Amorces:

- 5 La présente invention a pour objet une (ou plusieurs) amorce(s) nucléotidique(s) pour la détection et l'identification de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend
- 10 a. de 10 à 30 nucléotides dont au moins 8, de préférence au moins 11 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°9, et, de préférence, la séquence SEQ ID N°9 intégrale;
 - b. de 10 à 30 nucléotides dont au moins 8 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°10, et, de préférence, la séquence SEQ ID N°10 intégrale;
 - 15 c. de 8 à 30 nucléotides de la séquence SEQ ID N° 11, de préférence d'au moins 11 nucléotides de la SEQ ID N°11;
 - d. de 8 à 30 nucléotides de la séquence SEQ ID N° 12; ou
 - e. un couple d'amorces comportant une première amorce (a) et/ou (c) et une seconde amorce (b) et/ou (d).
- 20 Dans une variante de réalisation, les amorces nucléotidiques pour la détection et l'identification de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie ci-dessus, comprend :
- 25 a. de 10 à 30 nucléotides dont au moins 9, ou au moins 10, ou au moins 11, ou au moins 12, ou au moins 13, ou au moins 14, ou au moins 15, ou au moins 16, ou au moins 17, ou au moins 18, ou au moins 19, ou au moins 20, ou au moins 21, ou au moins 22, ou au moins 23, ou au moins 24, ou au moins 25, ou au moins 26, ou au moins 27, ou au moins 28, ou au moins 29, ou 30 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°9, et, de préférence, la séquence SEQ ID N°9 intégrale;
 - 30 b. de 10 à 30 nucléotides dont au moins au moins 9, ou au moins 10, ou au moins 11, ou au moins 12, ou au moins 13, ou au moins 14, ou au moins 15, ou au moins 16, ou au moins 17, ou au moins 18, ou au moins 19, ou au moins 20, ou au moins 21, ou au moins 22, ou au moins 23, ou au moins 24, ou au moins 25, ou au moins 26, ou au moins 27, ou au moins 28, ou au moins 29, ou 30 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°10, et, de préférence, la séquence SEQ ID N°10 intégrale;
 - 35 c. de 8 à 30 nucléotides de la séquence SEQ ID N° 11 dont au moins 8, ou au moins 9, ou au moins 10, ou au moins 11, ou au moins 12, ou au moins 13,

- ou au moins 14, ou au moins 15, ou au moins 16, ou au moins 17, ou au moins 18, ou au moins 19, ou au moins 20, ou au moins 21, ou au moins 22, ou au moins 23, ou au moins 24, ou au moins 25, ou au moins 26, ou au moins 27, ou au moins 28, ou au moins 29, ou 30 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°11;
- 5 d. de 8 à 30 nucléotides de la séquence SEQ ID N° 12 dont au moins 8, ou au moins 9, ou au moins 10, ou au moins 11, ou au moins 12, ou au moins 13, ou au moins 14, ou au moins 15, ou au moins 16, ou au moins 17, ou au moins 18, ou au moins 19, ou au moins 20, ou au moins 21, ou au moins 22, ou au moins 23, ou au moins 24, ou au moins 25, ou au moins 26, ou au moins 27, ou au moins 28, ou au moins 29, ou 30 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°12; ou
- 10 e. un couple d'amorces comportant une première amorce (a) telle que définie ci-dessus et/ou (c) telle que définie ci-dessus, et une seconde amorce (b) telle que définie ci-dessus et/ou (d) telle que définie ci-dessus.
- 15

De manière encore plus préférée, l'amorce nucléotidique comprend la séquence SEQ ID N°9 ou la séquence SEQ ID N°10.

20 Méthodes d'identification et de détection relevant de la biologie moléculaire

La présente invention a pour objet une méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie supra, dans un échantillon, à l'aide d'un moyen de biologie moléculaire choisi dans le groupe comprenant au moins l'un des marqueurs susdéfinis et/ou au moins une amorce susdéfinie.

25 De préférence, le moyen de biologie moléculaire comprend:

- une sonde d'ADN spécifique de tout ou partie de la séquence SEQ ID N° 11 ou de la SEQ ID N° 12 permettant une hybridation, et/ou
- un couple d'amorces (e) tel que défini supra permettant une amplification en chaîne par polymérase (PCR Polymerase Chain Reaction).

30

Selon un mode préféré de la présente invention, la méthode d'identification et de détection de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* dans un échantillon est caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en œuvre d'un marqueur moléculaire spécifique de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*. Ce marqueur moléculaire est amplifié dans le génome de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* alors qu'il ne l'est pas dans le génome des autres bactéries *Pseudomonas syringaea*.

35

Moyens et méthodes d'identification et de détection relevant de l'immunologie

L'invention a également pour objet un anticorps apte à reconnaître la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie supra et une méthode immunologique de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* dans un échantillon à l'aide de cet anticorps.

Selon une variante possible, la méthode de détection immunologique comprend une première étape de traitement d'un échantillon en vue d'en extraire d'éventuelle(s) bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis*, puis la mise en contact dudit échantillon traité avec un anticorps spécifique de ladite bactérie.

Moyens et méthodes d'identification et de détection relevant de la microbiologie

Un autre objet de la présente invention concerne une méthode de détection et d'identification de la bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* dans un échantillon, caractérisé en ce qu'elle consiste à mettre en œuvre un milieu de culture spécifique LBCA additionné ou non de lincomycine.

Ce milieu de culture permet d'une part d'inhiber la croissance de la plupart des autres souches bactériennes se trouvant dans l'échantillon à analyser et d'autre part d'identifier la bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* grâce à son caractère levane parmi les éventuelles souches bactériennes qui pourraient croître dans le milieu.

Moyens et méthodes d'identification et de détection relevant de cultures comparées de plantes

Un autre objet de la présente invention concerne une méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie ci-dessus, dans un échantillon végétal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (1) le traitement dudit échantillon, de préférence par broyage ou macération, en vue d'extraire d'éventuelle(s) bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis*,
- (2) l'inoculation de plantes ou de graines exemptes de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* avec l'extrait obtenu en (1),
- (3) la culture desdites plantes ou graines inoculées issues de l'étape (2),
- (4) la comparaison morphologique des plantes ou graines issues de l'étape (3) avec des plantes issues de plantes ou de graines inoculées avec la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*, pour en déduire l'infection ou la non-infection de l'échantillon objet de la détection et de l'identification.

De préférence, l'échantillon est issu d'une plante sélectionnée parmi les plantes de la famille des cucurbitacées, une plante du genre *cucurbita* ou du genre *cucumis* et une plante de courgette *cucurbita pepo*.

5 Combinaisons

Une variante de la présente invention consiste à combiner les moyens et/ou les méthodes de détection de la *Pseudomonas syringaea peponis*.

L'invention vise donc une méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie ci-dessus, dans un échantillon, caractérisée en ce qu'elle combine au moins deux méthodes choisies dans le groupe comprenant :

- i. La méthode relevant de la biologie moléculaire;
- ii. La méthode relevant de l'immunologie ;
- iii. La méthode relevant de la microbiologie;
- 15 iv. La méthode relevant de cultures comparées de plantes.

Une variante préférée de l'invention consiste en une méthode de détection et d'identification de la bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* dans un échantillon, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en œuvre d'un milieu de culture sélectif LBCA additionné ou non de lincomycine combinée avec la mise en œuvre d'un moyen de biologie moléculaire pour la détection et l'identification de la bactérie. Ainsi, la nature des bactéries qui se développent sur le milieu sélectif et qui présentent le caractère levane est confirmé par l'analyse de marqueur moléculaire et/ou d'une sonde spécifique d'une séquence génétique de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*.

25 De manière alternative, une autre variante préférée de l'invention consiste en une méthode de détection et d'identification de la bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* dans un échantillon, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en œuvre d'un milieu de culture sélectif LBCA additionné ou non de lincomycine combinée avec la mise en œuvre d'un moyen immunologique pour la détection de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*. Ainsi, la nature des bactéries qui se développent sur le milieu sélectif et qui présentent le caractère levane est confirmé par la reconnaissance de l'anticorps apte à reconnaître la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*.

35 De manière encore alternative, une autre variante préférée de l'invention consiste en une méthode de détection de la bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* dans un échantillon, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en œuvre d'un moyen immunologique selon un des aspects de la présente invention et la mise en œuvre d'un moyen de biologie moléculaire selon un des aspects de la présente invention pour la

détection de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*. Dans ce dernier cas, la mise en œuvre du moyen immunologique peut suivre ou bien précéder la mise en œuvre du moyen de biologie moléculaire.

5 Echantillons

La détection de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* selon les différents aspects de la présente invention peut être réalisée sur graine, une plante, une partie de plante ou un sol. La détection peut être réalisée sur la graine notamment lorsqu'il s'agit de déterminer l'état sanitaire d'un lot de graine, c'est-à-dire sa contamination éventuelle par la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*. La détection peut être réalisée sur une plante, sur une plantule ou sur une partie de plante notamment avant un transfert de la plante et ou de la plantule entre deux localisation, par exemple entre une serre ou la plantule se développe initialement et un champ ou elle est transplantée pour achever sa croissance et porter des fruits. La détection peut aussi être faite sur une plante, sur une plantule ou sur une partie de plante lorsque l'infection par la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* est suspectée, que des symptômes soient déjà présent ou pas encore. L'identification la plus rapide et la plus précise de la contamination d'une graine, d'une plante ou d'une plantule permet de prendre les mesures de sauvegarde adéquates, qu'il s'agisse de décontaminer les graines ou de traiter la plante ou la plantule. La détection peut encore être envisagée sur un échantillon de sol, par exemple dans un champ ou dans une serre dans lequel une culture de plante sensible à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* est envisagée. En cas de contamination avérée du lieu de culture envisagée, une autre plante pourra être semée, par exemple une plante résistante à la bactérie, ou les moyens de luttés mis en œuvre très rapidement, avant même l'apparition des premiers symptômes.

Avantageusement, la détection de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* selon les différents aspects de la présente invention est réalisée sur une graine, une plante, une partie de plante d'une plante de la famille des cucurbitacée, de manière préférée d'une plante du genre *cucurbita* ou du genre *cucumis* tel que notamment *cucumis melo* (melon) ou *cucumis sativus* (concombre), de manière encore préférée une plante de courgette *cucurbita pepo*.

30 Kits

La présente invention concerne également un kit pour la détection et l'identification de la bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 35 - un moyen de biologie moléculaire choisi dans le groupe comprenant au moins l'un des marqueurs susdéfinis et/ou au moins une amorce susdéfinie,
- et/ou au moins un anticorps susdéfini,
- et/ou au moins un milieu de culture LBCA additionné ou non de lincomycine.

Identification de plantes résistantes

La présente invention vise également une méthode d'identification de plantes résistantes à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- l'inoculation d'au moins une plante, d'au moins une graine ou d'au moins une partie de plante avec cette bactérie, puis
- l'identification de la ou des plante(s) résistante(s) ne présentant pas les symptômes de sensibilité à cette bactérie.

Un autre objet de l'invention peut être la méthode d'inoculation d'un échantillon avec une bactérie, caractérisée en ce que l'inoculum mis en œuvre comprend la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la présente demande.

Avantageusement, cette plante résistante à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* est une plante de la famille des cucurbitacées, de manière préférée une plante du genre *cucurbita* ou du genre *cucumis* tel que notamment *cucumis melo* (melon) ou *cucumis sativus* (concombre), de manière encore préférée une plante de courgette *cucurbita pepo*

Création de plantes résistantes

La présente invention concerne encore une méthode de création de plantes résistantes à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (1) l'identification d'une plante résistante à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*,
- (2) le croisement de cette plante résistant avec une plante sensible à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*, et
- (3) l'identification de plante résistante dans la descendance de la plante issue de l'étape (2).

Avantageusement, la plante identifiée comme résistante à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* est une plante de la famille des cucurbitacées, de manière préférée une plante du genre *cucurbita* ou du genre *cucumis* tel que notamment *cucumis melo* (melon) ou *cucumis sativus* (concombre), de manière encore préférée une plante de courgette *cucurbita pepo*. La plante sensible à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* est une plante de la famille des cucurbitacées, de manière préférée une plante du genre *cucurbita* ou du genre *cucumis* tel que notamment *cucumis melo* (melon) ou *cucumis sativus* (concombre), de manière encore préférée une plante de courgette *cucurbita pepo*. Selon un mode préféré de l'invention le croisement de la plante résistante avec la plante sensible est réalisée entre des plantes de même espèce, par exemple un croisement entre deux plantes de *cucurbita pepo*, entre deux plante de *cucumis melo* voire entre deux plantes de *cucumis sativus*. Toutefois, le croisement peut aussi avoir lieu au sein du même genre, par exemple

entre une plante *cucurbita pepo* et une plante *cucurbita moschata*. La mise en œuvre et la réalisation de ces croisements est connue de l'homme du métier.

Sélection d'un lot de semence

5 Selon un autre aspect, la présente invention concerne une méthode de sélection d'un lot de semence caractérisée en ce qu'elle met en œuvre :

- la méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie ci-dessus, dans un échantillon, selon laquelle on met en œuvre au moins l'une des méthodes choisies dans le groupe
- 10 comprenant :

- i. La méthode relevant de la biologie moléculaire;
- ii. La méthode relevant de l'immunologie
- iii. La méthode relevant de la microbiologie;
- iv. La méthode relevant de cultures comparées de plantes,

- 15
- et/ou la méthode d'identification d'une plante résistante susdéfinie,
 - et/ou le kit de détection et d'identification susdéfini.

Par sélection d'un lot de semence, on entendra l'identification d'un lot de semence qui puisse être directement vendu, transféré, que ses graines soient mises en culture dès que le

20 lot sera identifié et diagnostiqué comme non contaminé par la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* alors qu'un autre lot devra être soit décontaminé soit détruit lorsqu'il sera diagnostiqué contaminé par la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*.

Bien évidemment, la méthode de sélection d'un lot de semence selon l'invention peut

25 combiner au moins deux des méthodes i., ii., iii. et iv. évoquées ci-dessus.

Cette méthode de sélection d'un lot de semence peut mettre en œuvre au moins le marqueur moléculaire 4 Ba tel que défini précédemment, et/ou au moins une amorce spécifique du marqueur moléculaire 4Ba telle que définie précédemment, et /ou au moins l'anticorps apte à reconnaître la bactérie selon l'invention tel que défini précédemment,

30 et/ou le kit de détection de la bactérie, et/ou au moins l'une des méthodes de détection telles que mentionnées ci-dessus.

EXEMPLES :**I/ Identification d'une nouvelle souche bactérienne:**5 **1/ Analyse biochimique de la souche bactérienne inconnue.**

Les présents inventeurs ont identifié différents lots de graines de courgettes *Cucurbita pepo* contaminés par une bactérie dont les symptômes de nécrose foliaires sur les jeunes plantules qui sont issues de ces graines sont, jusqu'à présent, inconnus. Les bactéries sont extraites des semences de courgette par broyage avec un broyeur à marteau de type

10 Stomacher durant 10 minutes dans un sachet prévu à cet effet. Les souches de bactéries issues des différents échantillons de graines de courgettes contaminés sont nommées de A à F.

La caractérisation de ces bactéries est réalisée par différents tests biochimiques qui permettent de vérifier si la bactérie a un métabolisme oxydatif ou fermentatif, s'il y a

15 formation d'un acide à la suite de l'utilisation d'un hydrate de carbone (sorbitol), si un composé particulier est utilisé comme seule source de carbone, si un acide aminé peut être transformé (arginine), si un enzyme particulier peut être présent (oxydase) ou si des molécules complexes peuvent être dégradées (gélatine): Ces différents test sont bien connus de l'homme de l'art lors de l'identification de bactéries. Ces derniers permettent

20 d'identifier la bactérie inconnue comme une bactérie du type *Pseudomonas syringaea* (cf. tableau 1).

Tableau 1 : tests biochimiques pour déterminer la nature des bactéries inconnues

Souche	gram	arginine	Oxydase	gélatine	Nitrate	Levane	King B	tabac
Souche A	-	-	-	+	-	+	-	+
Souche B	-	-	-	+	-	+	-	+
Souche C	-	-	-	+	-	+	-	+
Souche D	-	-	-	+	-	+	-	+
Souche E	-	-	-	+	-	+	-	+
Souche F	-	-	-	+	-	+	-	+
Souche	esculine	pectine	saccharose	DL lactose	L+ tartrate	D-tartrate	érythritol	Mannitol
Souche A	+	-	+	+	-	-	+	+
Souche B	+	-	+	+	-	-	+	+
Souche C	+	-	+	+	-	-	+	+
Souche D	+	-	+	+	-	-	+	+
Souche E	+	-	+	+	-	-	+	+
Souche F	+	-	+	+	-	-	+	+

Souche	sorbitol	Tween 80	Dnase	PP pH5	PP pH8	H&L
Souche A	+	+	-	-	-	oxydatif
Souche B	+	+	-	-	-	oxydatif
Souche C	+	+	-	-	-	oxydatif
Souche D	+	+	-	-	-	oxydatif
Souche E	+	+	-	-	-	oxydatif
Souche F	+	+	-	-	-	oxydatif

PP signifie polypectate.

Au vu des résultats obtenus sur les différents tests pratiqués et répertoriés dans le tableau 1 ci-dessus, la bactérie inconnue a pu être identifiée comme une bactérie du type
5 *Pseudomonas syringaea*.

L'année suivante, 10 nouveaux lots de graines de courgettes contaminés par la bactérie inconnue sont identifiés par les inventeurs et les bactéries contaminantes isolées. :

A partir de plantes présentant des symptômes (nécroses) sur cotylédons ou feuilles, les
10 isolements pour identification sont réalisés ; un prélèvement des nécroses est réalisé et cette partie du tissu végétal est dilacérée dans l'eau et en condition stérile. Un extrait du liquide où la bactérie est supposée présente est étalé dans une boîte de Pétri contenant un milieu artificiel classique permettant une croissance bactérienne. Ces boîtes sont positionnées dans une étuve à 30°C favorable à la croissance bactérienne. Le
15 développement et l'isolement de colonies bactériennes sont le point de départ de l'identification plus précise par la suite des tests biochimiques.

Ces dernières sont nommées de PsW1 à PsW10.

Les premières expériences ayant orienté l'identification des bactéries inconnues vers des
bactéries de type *Pseudomonas syringae*, des analyses biochimiques spécifiques à
20 l'analyse des bactéries *Pseudomonas syringae* sont réalisées afin de confirmer la nature des bactéries PsW1 à PsW10. Ces tests LOPAT sont la production de levane (la polymérisation du fructose en polyfructose), la présence d'oxydase (la détermination de la présence de l'enzyme cytochrome C oxydase), la dégradation de la pectine (la détermination de la présence de pectinases), la présence d'arginine déshydrolase (la transformation de
25 l'arginine par l'arginine déshydrolase) et l'hypersensibilité au tabac (la mise en évidence du pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac). Une analyse sur milieu Hugh et Leifson (H&L) permet de déterminer la voie métabolique du glucose. Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : tests LOPAT pour confirmer la nature des bactéries inconnues

Souche	Levane	Oxydase	Pectine	Arginine	tabac	H&L
PsW1	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW2	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW3	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW4	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW5	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW6	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW7	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW8	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW9	+	-	-	-	+	oxydatif
PsW10	-	-	-	-	-	fermentatif

Les analyses confirment que les souches de la bactérie inconnue PsW1 à PsW9 sont bien des souches de bactéries *Pseudomonas syringae* ayant les mêmes caractères que les six souches initiales A à E. Seule la souche PsW10 présente des différences et ne correspond donc pas à une souche de bactérie *Pseudomonas syringae*.

Une vérification morphologique est alors réalisée au moyen d'un microscope sur des bactéries à l'état frais (bactéries en pleine croissance ; isolée sur un milieu artificiel en boîte de Pétri, généralement à 30°C, après 48h): toutes les souches sont morphologiquement identiques sauf la souche PsW10. La microscopie montre, pour les souches PsW1 à PsW9, des bacilles long à moyen, isolés ou plus rarement groupés par deux, mobiles et ayant un déplacement aléatoire. La souche PsW10, quant à elle, est un bacille très court ovoïde (cocobacille), statique donc non flagellé, groupé souvent par 2.

Ces différentes analyses permettent de confirmer que la nouvelle bactérie inconnue est du type *Pseudomonas syringae*.

2/ Analyse de la séquence nucléotidique du gène rrs codant l'ARN16S :

Résultat du séquençage et de l'analyse du gène rrs codant l'ARN 16S (SEQ ID N°13) :

GTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGA
GTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGC
TAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCT
ATCAGATGAGCCTAGGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGAC
ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG
AAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAG

CACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTA
 CCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGA
 GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTG
 TTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTG
 5 GCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATAC
 TGACACTGAGGTGCGAAAGCGTNNANAGCAAACAGNNTTAGATACCCTGGTA
 GTNNACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTG
 GCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAA
 10 ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
 CGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACCTTCCAGA
 GATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
 GCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCT
 TAGTTACCAGCACATTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACC
 15 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTA
 ATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA
 AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG
 GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAG
 20 CTAGTCTAACCTTCGGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGG

La recherche de séquences homologues dans les banques de données de séquences
 nucléiques par le logiciel BLASTn a abouti à trouver une homologie très forte avec des
 séquences de *Pseudomonas fluorescent oxydase-négatif*. La première séquence affichée est
 25 celle de *P. s. pv. glycinea* (1417 sur 1426 bases analogues). Ce gène n'est cependant pas
 suffisamment discriminant pour conclure sur l'identité de l'espèce bactérienne et a fortiori
 du pathovar auquel appartient la souche.

3/ Analyse de la diversité génomique des souches :

30

Pour étudier la diversité génomique des souches et préciser leur identité phylogénétique,
 les présents inventeurs ont choisi deux gènes de ménage *gyrB* qui code pour la sous unité β
 de la gyrase bactérienne et *rpoD* qui code pour le facteur sigma de l'ARN polymérase tels
 qu'identifiés en 2000 par S. Yamamoto *et al.* dans « Phytogeny of the genus *Pseudomonas*
 35 / intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD*
 genes » Microbiology (2000), 146, 2385-2394.

L'ADN est extrait selon la méthode décrite par Llop et al. Journal of Microbiological
 Method (1999), 37, 23-31, les gènes étant amplifiés par PCR classique suivant la méthode

et avec les amorces décrites par Yamamoto. Le séquençage des amplifications est réalisé par la société Genescreen.

Pour le gène *gyrB*

UP-1E: 5' CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNNGGNGGNAARTTYRA 3' (SEQ ID N°1)

APrU: 5' TGTAACACGACGGCCAGTGCNNGGRTCYTTYTCYTGRCA 3' (SEQ ID N°2)

M13: 5' TGTAACACGACGGCCAGT 3'

M13R: 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'

Pour le gène *rpoD*

Amorce sens (ou F pour Forward) 70F :

5' ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT 3' (SEQ ID N°3)

Amorce anti-sens (ou R pour Reverse) 70R :

5' ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT3' (SEQ ID N°4)

Les séquences nucléotidiques obtenues sont identiques pour toutes les souches de la bactérie inconnue (de la souche A à la souche F), tant pour le gène *gyrB* que pour le gène *rpoD*.

Séquence consensus du gène *rpoD* de la bactérie *Pseudomonas* responsable de la maladie sur courgette (SEQ ID N°5):

CGAAATCGCCAAACGTATCGAAGAAGGCATCCGTGAAGTGATGGGCGCAATC
GCGCACTTCCCAGGCACGGTTGACCACATTCTCTCCGAATACACACGCGTCAC
CAGTGAAGGCGGTTCGCTTTCCGATGTTCTGAGTGGCTATATCGACCCGGACG
ACGGCATTGCGCCGCCTGCCGAAGTCCCGCCGCCTGTCGACCCCAAGGCCGTC
AAGGCCGAAGGTGCCGATGACGACGAGGAAGAGTCGGCAGACGCCAGCGACG
AAGAAGACGAAGTCGAGAGCGGTCCTGATCCGGTCATCGCCCAGCAGCGCTTC
GGTGCGGTTTCCGATCAAATGGAAATCACCCGCAAGGCCCTGAAGAAATTTGG
TCGCGACGACAAGCACGCCATTGCCGAAATGGTTGCACTGGCCGAAGTGTTC
TGCCGATCAAATGGTTCCAAAACAGTTTGAAGGCCTGGTGGAGCGTGACGC
GGTGCCCTTGAGCGTCTTCGTGCCAGGAACGCGCCATCATGCAGCTGTGTGT
ACGTGATGCACGTATGCCGCGCGCCGACTTCCTGCGCCAGTTCCCGGGCAACG
AAGTTGACGAAAGCTGGACTGACGCACTGGCCAAGGGCAAGAGCAAATACGC
CGAAGCCATCGGTTCGCTGCAGCCTGACATCCAGCGTTGCCAGCAGAAGCTGT

CCGCACTGGAAGAAGAGACCGGCCTGAAAATCGCCGAGATCAAGGACATCAA
CCGTCGCATGTCGATCGGTGAGGCCAAGGCCCGCCGCGCGAA

Séquence consensus du gène *gyrB* de la bactérie *Pseudomonas* responsable de la maladie sur courgette (SEQ ID N°6):

5 GCGATATCCAGTGCGCCTTTACGACGGGTCATCTCACGCGCCTTGCGCGCAGC
TTCACGGGCACGGGCTGCGTCGATCATCTTGCCGACAACCGCTTTGGCTTCATT
CGGGTTTTCCAACAGGAAGTCGGAGAAGTACTTGCCCATTTCTGTTCGACAG
CCGTTTTGACTTCGGACGAAACCAGCTTGTCCTTGGTCTGCGAGCTGAACTTTG
10 GATCAGGCACCTTGACCGAAATGATCGCCGTCAGACCTTCACGCGCGTCATCG
CCAGTGGTCGCGACCTTGTGCTTCTTGGCCAGACCTTCCTGCTCGATGTAGTTG
TTCAGGTTGCGCGTCAACGCAGAACGGAAACCCACCAGGTGAGTACCGCCATC
ACGCTGCGGGATGTTGTTGGTGAAGCACAGCAGGTTCTCGTTGAAGCTGTCGT
TCCACTGCAGAGCAATTTTCGACACCGATACCGTCATCACGCTGAATGTTGAAG
15 TGGAACACTTCGTTGACCGGCGTTTTATTGGTGTTCAGGTACTCAACGAACGCG
CGCAGACCGCCTTCGTATTTGAACAATTCTTCCTTACCGCTGCGCTCATCCTTG
AGGACAATGCCGACACCGGAGTTCAGGAAGGACAGTTCACGAATCCGCTTGGC
CAGAATGTCCAGCTGAAGTGGATGTTCTTGAACGTTTCAGCGGAAGGCTTGA
AGTGGATCTGAGTGCCTGTGCTGTCACTTTCACCGACGATCTTCATCGGTTCTT
20 GTGGAACACCATGAACATAGGTCTGTTCCAGATCTTGCCGCTGCGGCGAACC
GTCAGCAACAGAAGCTCTGAAAGGGCGTTAACCACAGAGACACCTACACCGT
GCAAAC

25 Une analyse d'homologie de séquences est réalisée au moyen du programme BLASTn sur le serveur du NCIMB (<http://www.ncimb.nlm.nih.gov>) afin d'identifier des souches bactériennes présentant des homologies de séquences avec la bactérie inconnue. Les résultats sont présentés dans les deux tableaux suivants (Tableaux 3 et 4). Le pourcentage d'identité est calculé sur la longueur nucléotidique présentant le maximum d'identité entre les deux séquences comparées

30

*Tableau 3 : Résultats des analyses d'homologies pour le gène *rpoD* :*

La séquence du gène *rpoD* de la bactérie inconnue est comparée aux séquences du gène *rpoD* d'autres souches bactériennes. En fonction des informations disponibles sur les séquences de ces autres souches bactériennes la comparaison se fait sur toute la longueur
35 de la séquence du gène *rpoD* de la bactérie inconnue (780 nucléotides) ou moins.

Souche	Longueur (nt)	Identité	Pourcentage d'identité
CFBP2356dysoxylIPTG1corrpoD2	809	777/780	(99%)
CFBP2353theaeG8corrpoD2	809	775/779	(99%)
CFBP1754papulansPTG1cor_rpoD2	809	775/779	(99%)
CFBP2339acerisPTG1corrpoD2	809	768/780	(98%)

Tableau 4 : Résultats des analyses d'homologies pour le gène *gyrB* :

Souche	Longueur (nt)	Identité	Pourcentage d'identité
CFBP1731lapsaPT_G1cor_gyrB2	890	847/859	(98%)
CFBP2105pisiPT_G1cor_gyrB2	890	842/859	(98%)
CFBP2896japonicaPT_G1cor_gyrB2	888	841/859	(97%)
CFBP2213atrofaciensPT_G1cor_gyrB2	890	839/859	(97%)
CFBP1617aptataPT_G1cor_gyrB2	887	839/859	(97%)

- 5 Les séquences nucléotidiques des gènes *gyrB* et *rpoD* des bactéries *Pseudomonas syringae* isolés des lots de graines de courgette contaminées par la bactérie inconnue ont été comparées avec les séquences nucléotidiques des gènes *gyrB* et *rpoD* d'autres bactéries *Pseudomonas syringae*. La plus forte homologie de séquence est retrouvée entre les séquences nucléotidiques des gènes *gyrB* et *rpoD* de la bactérie inconnue et celles de la
- 10 bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* n°CFBP1392. D'autres bactéries *Pseudomonas syringae* montrent aussi des homologies proches, il s'agit de *Pseudomonas syringae* pv. *lapsa*, pv. *pisi* et pv. *aptata*. On peut en conclure que la bactérie inconnue est une souche de *Pseudomonas syringae*.
- 15 **4/ Mise au point d'un milieu de culture adapté à l'isolement de la bactérie phytopathogène de type *Pseudomonas syringae***

Afin de pouvoir conduire des expérimentations nécessaires à l'étude de cette nouvelle bactérie *Pseudomonas syringae* responsable de la bactériose sur courgette, les inventeurs

20 ont dû identifier un milieu de culture adéquat à la bactérie.

a) Détermination du spectre d'antibiorésistance des souches d'études:

Dans une première étape, les inventeurs ont déterminé le spectre d'antibiorésistance des souches de la bactérie *Pseudomonas syringae* inconnue, en la testant sur une gamme

25 d'antibiotique couramment utilisé en phytobactériologie. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : résultats des tests de résistance aux antibiotiques par détermination de la concentration minimum inhibitrice (CMI) des antibiotiques.

	Concentration inférieure/ Concentration supérieure (mg/L)	Souche A (mg/L)	Souche B (mg/L)	Souche C (mg/L)	Souche D (mg/L)	Souche E (mg/L)	Souche F (mg/L)
nitrofurantoïne		>128	>128	>128	>128	>128	>128
bacitracine	2/2	>128	>128	>128	>128	>128	>128
colistine	2/2	≤0,5	1	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
oxytétracycline	4/8	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
Tétracycline	4/8	1	1	1	1	1	1
Céfalexine	8/32	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Céfalogtine	8/32	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Céfuroxime	8/32	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Kasugamycine		4	4	4	4	4	4
Gentamicine	4/8	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
Spectinomycine	64/64	1	1	1	1	1	≤0,5
Kanamycine	8/16	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
Streptomycine	8/16	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
néomycine	8/16	4	4	4	4	4	4
Lincomycine	2/8	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Rifampicine	4/16	8	2	4	16	2	8
Rifamycine SV		32	32	8	32	32	32
Pénicilline G	0,25/16	128	64	64	64	128	64
Carbénicilline	128/128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Ampicilline	4/16	32	32	32	32	32	32
Triméthoprim	4/8	>128	>128	>128	>128	>128	>128
A. nalidixique	8/16	4	4	4	4	4	4
A. oxolinique	2/4	1	1	1	1	1	1
Vancomycine	4/16	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Chloramphénicol	8/16	32	32	32	16	32	32
Novobiocine	2/16	128	128	128	128	128	128
Tellurite		32	32	32	32	32	32
Azide Na		4	2	4	2	2	2

La concentration inférieure signifie qu'à partir de cette concentration donnée d'antibiotique, un effet sur la croissance de la bactérie est observé.

La concentration supérieure signifie qu'au-delà de cette concentration d'antibiotique, la bactérie ne se développe plus.

A une concentration d'antibiotique située entre la concentration inférieure et la concentration supérieure, une croissance moyenne de la bactérie est observée.

Pour la bacitracine, la colistine, la spectinomycine et la carbénicilline, la concentration inférieure est identique à la concentration supérieure ce qui signifie qu'il s'agit d'un "tout ou rien" : en dessous de la concentration inférieure donnée d'antibiotique, la bactérie, objet de la présente invention, se développe et, au dessus de cette même concentration dudit antibiotique, ladite bactérie ne se développe pas.

Les tests ont été effectués à partir de dépôts de 2 μ L de suspensions bactériennes à 10^6 UFC/mL, soit 10^3 UFC. Les lectures ont été réalisées après 2, 3, 4,5 et 6 jours de cultures à 27°C. La concentration minimum inhibitrice des antibiotiques est mesurée en mg/l.

Les antibiotiques bacitracine, colistine et lincomycine sont dosés aux concentrations respectives de 5,104 U/mg, 21,03 U/mg et 863 U/mg.

Les résultats de concentration minimum inhibitrice indiquent que les 6 souches de la bactérie inconnue étudiées sont résistantes à plusieurs des antibiotiques testés. La céfalexine, la céfalotine et la céfuroxime étant de la même famille et ayant le même mode, un seul sera conservé pour les étapes suivantes. Les antibiotiques conservés pour la mise au point d'un milieu de culture sélectif à l'agent causal de la maladie sur courgette sont donc la nitrofurantoïne, la bacitracine, la céfalexine, la lincomycine, la carbénicilline, le triméthoprime, la vancomycine et la novobiocine.

b/ Mise au point du milieu de culture.

Dans la littérature et en particulier dans les trois publications suivantes :

- Plant Pathogenic Bacteria. Third edition. N.W. Schaad, J.B. Jones and W. Chun,

- S.K. Mohan and N.W. Schaad. *An improved agar plating assay for detecting Pseudomonas syringae pv. syringae and P.s. pv. phaseolicola in contaminated bean seed.* Phytopathology 77 : 1390-1395, et

- Schaad N.W., et al. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BioPCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extract. *Phytopathology* 85 : 243-2,

sont décrits plusieurs milieux de culture donnés comme sélectifs ou adaptés aux *Pseudomonas syringae* comme par exemple les milieux KBC, BCBVB, MSP et LBCA.

Ces milieux sont à base de King B (KBC, BCBVB) ou se basent sur un caractère biochimique pour une reconnaissance morphologique facile (MSP : caractère levane, à

savoir la croissance bombée des bactéries et fluorescence bleu ; LBCA : caractère levane mis en évidence).

- D'après les résultats de concentration minimum inhibitrice obtenus et en se basant sur les milieux connus dans la littérature, différents milieux à base de King B et de LBCA additionné d'antibiotiques sont testés (cf. Tableau 6).

Tableau 6 : Milieux de culture testés pour la culture de la bactérie inconnue :

- KB sans antibiotique
- KBC + carbénicilline + bacitracine
- KBC + carbénicilline + lincomycine + novobiocine
- KBC + nitrofurantoïne + novobiocine
- KBC + lincomycine + bacitracine
- KBC + lincomycine + nitrofurantoïne + triméthoprim
- KBC
- KBC + vancomycine + carbénicilline
- KBC + vancomycine + novobiocine
- KBC + bacitracine + vancomycine + carbénicilline
- LBCA + novobiocine
- LBCA + bacitracine
- KBC + carbénicilline + novobiocine
- KBC + carbénicilline + lincomycine + nitrofurantoïne
- KBC + carbénicilline + lincomycine + bacitracine
- KBC + nitrofurantoïne + triméthoprim
- KBC + lincomycine + nitrofurantoïne + novobiocine
- MSP
- BCBVB
- KBC + bacitracine + vancomycine
- KBC + vancomycine + novobiocine + carbénicilline
- LBCA
- LBCA + lincomycine
- LBCA + triméthoprim

10 Description des milieux :

Les antibiotiques sont ajoutés à 100mg/L (concentration finale dans le milieu) sauf la vancomycine, la bacitracine et la novobiocine qui sont à 20mg/L, la céfalexine à 80mg/L et la carbénicilline, la lincomycine et le triméthoprim qui sont à 50mg/L.

King B

	Protéose peptone	20g
	Glycérol	10mL ou 12.6g
5	K ₂ HPO ₄	1.5g
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	1.5g
	Agar	15g
	q.s.p.	1L

10 BCBRVB

King B 950mL

Après autoclave, ajouter le mélange d'antibiotique suivant dans 10mL d'éthanol + 40mL d'eau distillée : bacitracine (10mg), vancomycine (6mg), rifampicine (0.5mg), cycloheximide (75mg) et bénomyl (0.25mg)

15 KBC

King B 900mL

Après autoclave, ajouter 100 ml d'acide borique stérile 1.5% en solution aqueuse, 8mL de céfalexine 10mg/mL et 2 mL de cycloheximide 100mg/mL

20 MSP

	Saccharose	20g
	Peptone	5g
	K ₂ HPO ₄	0.5g
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	25.0mg

25 Agar 20g

Ajuster le pH à 7.2-7.4, autoclaver puis ajouter 8mL de céfalexine 10mg/mL, 2mL de cycloheximide 100mg/mL, 1mL de vancomycine 10mg/mL et 1mL de BBT 15mg/mL

30 LBCA

	Levure	2g
	Bacto-peptone	5g
	Saccharose	50g
	Acide borique	1.5g
35	Agar	15g
	q.s.p.	1L
	NaOH	2mL

Autoclaver puis ajouter 8mL de céfalexine 10mg/mL et 2mL de cycloheximide 100mg/mL.

5 Ces milieux sont initialement testés sur des isolats de souche bactérienne afin d'identifier lesquels permettent une croissance de la bactérie inconnue. 8 milieux sont sélectionnés, les autres inhibant de façon plus ou moins conséquente la croissance de la bactérie pathogène.

Milieu 1 : KBC additionné de bacitracine et de vancomycine

Milieu 2 : KBC additionné de vancomycine et de novobiocine

10 Milieu 3 : KBC

Milieu 4 : MSP

Milieu 5 : BCBRVB

Milieu 6 : LBCA

Milieu 7 : LBCA additionné de lincomycine

15 Milieu 8 : LBCA additionné de novobiocine

Ces milieux sont alors utilisés non plus sur des isolats de la souche bactérienne inconnue, mais directement sur des macérats de graines contaminées avec la souche bactérienne inconnue (le macérat est la phase liquide obtenue après mise en présence d'un échantillon de semences dans une quantité d'eau, obtenu généralement après agitation, voir un
20 broyage). Comme les graines ne sont pas uniquement porteuses de la bactérie inconnue mais aussi contaminées par d'autres bactéries qui constituent une flore saprophyte, il est nécessaire que le milieu choisi favorise la croissance de la bactérie inconnue mais pas celle des autres bactéries. Les tests sur macérât de graines contaminées montrent que les milieux à base de King B n'ont pas un pouvoir inhibiteur suffisant car d'autres souches
25 bactériennes, différentes de la souche bactérienne inconnue croissent malgré les antibiotiques. Ces milieux sont donc éliminés. De manière similaire, le milieu MSP n'inhibe pas assez la flore saprophyte qui se trouve dans les macérats de graines et est éliminé pour les mêmes raisons.

Les milieux à base de LBCA présentent un avantage par rapport aux milieux à base de
30 King B puisque le LBCA permet de différencier la souche d'étude par un caractère biochimique, le caractère levane : les *Pseudomonas* ont un aspect légèrement nacré et les colonies sont très bombées, rondes. De plus, la concentration en saccharose étant très élevée dans ces milieux, (50g/L) elle inhibe la croissance de la flore saprophyte.

Ainsi, lorsque du macérât de graine contaminé par la bactérie inconnue est testé sur les
35 milieux à base de LBCA, on observe après 48h d'incubation sur boîte quelques colonies à la morphologie très remarquable et spéciale aux bactéries *Pseudomonas*. Il subsiste encore quelques colonies de la flore saprophyte mais elles sont facilement reconnaissables grâce au caractère levane.

On notera que le milieu LBCA additionné de novobiocine inhibait légèrement la croissance de la bactérie *Pseudomonas* et a été écarté par précaution ; sur des lots à très faible contamination, il aurait été possible de ne pas identifier la contamination.

- 5 D'après les résultats obtenus lors des différents tests, les milieux LBCA et LBCA additionné de lincomycine (LBCAL) (50mg/L) sont les mieux adaptés pour tester la qualité sanitaire des semences de courgettes et la présence de la bactérie inconnue.

5/ Mise au point d'un test de pouvoir pathogène

- 10 La bactérie inconnue pouvant être maintenant cultivée et maintenue sur un milieu de culture, les inventeurs ont mis au point un test de pouvoir pathogène afin de vérifier sa pathogénicité.

- Une suspension de bactérie à 10^8 CFU/ml est réalisée à partir d'une culture fraîche de bactéries à tester (24 heures de culture sur milieu gélosé approprié LBCA). Des graines de courgette saines sont ajoutées à la suspension et laissées macérées pendant 1h30 à 2h en agitation constante, puis récupérées et semées en pots. Un témoin est aussi réalisé avec des graines baignant dans de l'eau. Il faut alors compter 6 à 8 jours pour observer les premières nécroses sur cotylédons des plantules. On observe aussi de façon récurrente un éclaircissement nervaire au bout de 10 à 14 jours, variant suivant la virulence des souches testées). Les graines des plantes macérées avec les bactéries à tester mettent plus de temps à lever que les graines macérées dans l'eau et les cotylédons sortent déformés, enroulés ; les feuilles ne sont pas symétriques et on observe une crispation de la plante après la deuxième feuille.

- 20 Cette méthode permet l'expression de symptômes typiques et quantifiables. Ce test peut être utilisé pour mesurer la virulence de souches bactériennes et pour mesurer la sensibilité de génotype de courgette. Selon le protocole décrit ci-dessus, ce test de pouvoir pathogène mis en œuvre sur des semences de melon *cucumis melo* a permis de montrer que, pour certaines souches, les graines ne germent pas.

- 30 Ce test peut aussi être utilisé pour identifier la présence de la bactérie. Enfin, il permet une quantification de la virulence des souches et de la sensibilité des plantes. Ainsi, il permet d'identifier des plantes résistantes à la bactériose induite par la bactérie inconnue.

6 / Identification phénotypique de l'agent pathogène par l'étude du pouvoir pathogène sur Cucurbita pepo

35

Le pouvoir pathogène de différentes souches de bactéries de type *Pseudomonas* est testé selon la description faite précédemment. Les résultats sont présentés de façon succincte dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : Etude du pouvoir pathogène de bactéries *Pseudomonas*

Genre	Espèce	Pathovar	Isolé de	Nombre de souches testées	Pathogène sur courgette
<i>Pseudomonas</i>	<i>congelans</i>		<i>Graminés</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Syringae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Lapsa</i>		1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>atrofaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Japonica</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Aptata</i>	<i>Cucumis melo</i>	3	+ (a)
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Panici</i>	<i>Panicum sp.</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Aceris</i>	<i>Acer sp.</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Dysoxili</i>	<i>Dysoxylum spectabile</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Papulans</i>	<i>Malus sylvestris</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>lachrymans</i>	<i>Cucumis sativus</i>	1	-
Entérobactérie				1	-
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i> *			50	+ (b)

(*) Cinquante isolats de la bactérie inconnue sont isolés à partir de différentes graines, plantes et partie de plante de courgette *Cucurbita pepo* contaminés.

5 (a) provoquant des symptômes atypiques tels que nécroses centrales sur cotylédons mais qui n'empêche pas la plante de continuer sa croissance.

(b) provoquant des symptômes typiques de la bactérie inconnue : nécroses en bordures de feuille et/ou cotylédons avec halo jaune, éclaircissements nervaire, blocage de la croissance à un stade avancé de la maladie.

10

Ces résultats de test de pouvoir pathogène, conduisent les inventeurs à conclure que seules les souches de bactéries *Pseudomonas syringae* isolées de courgette provoquent une maladie typique et gênante pour la croissance des plantules de courgette. Les bactéries *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* provoquent des nécroses mais n'ont aucune incidence

15 sur le bon développement de la plante.

Puisque toutes les souches isolées de courgette provoquent un type de symptômes singulier sur *Cucurbita pepo*, qui se différencie de ceux causés par les souches de *Pseudomonas*

syringae pv. *aptata*, les inventeurs proposent de nommer la bactérie inconnue provoquant les symptômes typiques sur courgette *Pseudomonas syringae* pv. *peponis*.

II/ Recherche de signature génétique utilisable pour l'identification de la nouvelle souche bactérienne *Pseudomonas syringae* *peponis*:

Les inventeurs ont réalisé un nouveau séquençage et une analyse de l'homologie des séquences des gènes *gyrB* et *rpoD* de *Pseudomonas syringae* *peponis* comparées à d'autres bactéries de type *Pseudomonas* et plus particulièrement celles présentées dans le tableau 7 précédent. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8 : résultats des tests d'homologie des séquences des gènes *gyrB* et *rpoD* de *Pseudomonas syringae* *peponis* comparées à d'autres bactéries de type *Pseudomonas*

Genre	Espèce	Pathovar	Homologie sur <i>gyrB</i> avec <i>P. s. pv. peponis</i>	Homologie sur <i>rpoD</i> avec <i>P. s. pv. peponis</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>congelans</i>		832/859	760/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Syringae</i>	850/859	768/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Lapsa</i>	847/859	764/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>atrofaciens</i>	839/859	766/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Japonica</i>	841/859	767/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Panici</i>	833/859	766/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Aceris</i>	831/859	768/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Dysoxyl</i>	802/859	777/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Aptata</i>	839/859	762/775
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Papulans</i>	802/859	775/779
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Pisi</i>	842/859	765/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>lachrymans</i>	769/833	749/780
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	<i>Tabaci</i>	789/857	748/780

Les niveaux d'homologie identifiés laissent très peu de place au polymorphisme dans ces séquences. Une zone à l'intérieur du gène *gyrB* de la souche *Pseudomonas syringae* *peponis* pourrait toutefois présenter un intérêt car une succession de trois nucléotides forme une combinaison unique au sein du groupe génomique 1 des bactéries *Pseudomonas syringae*.

La figure 1 illustre dans un rectangle cette séquence particulière dans le gène *gyr B* de la bactérie *Pseudomonas syringae* *peponis*

Recherche de marqueurs moléculaires spécifiques de la bactérie pathogène sur courgette *Pseudomonas syringae* *peponis*.

5 Au sein du gène *rpoD*, aucune séquence spécifique à la souche *Pseudomonas syringae* *peponis* ne peut être isolée, aucune zone de ce gène n'étant spécifique de celle-ci. Le gène *rpoD* est donc exclu pour le dessin d'amorces spécifique.

Néanmoins le gène *gyrB* présente une zone (voir encadré dans la figure 1) qui pourrait être suffisamment spécifique de la souche *Pseudomonas syringae* *peponis*, même si le nombre de sites polymorphes reste insuffisant pour obtenir de manière sûre une amplification
10 spécifique. Le marqueur PsCo est défini par le couple d'amorces de séquences nucléotidiques suivantes :

Amorce sens (ou F pour Forward) PsCoF :

5' CTTCACGCGCGTCATCGCCA 3' (SEQ ID N°7)

Amorce anti-sens (ou R pour Reverse) PsCoR :

15 5' CGCCGGTCAACGAAGTGTTC 3' (SEQ ID N°8)

Une amplification par réaction en chaîne (PCR) est réalisée afin d'amplifier le marqueur PsCo chez la bactérie *Pseudomonas syringae* *peponis*.

20 Préparation du mélange réactionnel pour la PCR :

Produits	Concentration finale	Volume (µl) dans 20 µl
Eau Stérile MilliQ		9
5x Tampon coloré	1x	4
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM	1,2
dNTP (2,5 mM)	0,2 mM	1,6
Amorce 4BaF (20 µM)	0,5 µM	0,5
Amorce 4BaR (20 µM)	0, 5 µM	0,5
Taq Polymérase (5U/µl)	0,05U	0,2
ADN		3

Programmes pour le couple d'amorce PsCoF/PsCoR.

Programme d'amplification pour PCR classique :

25 1x 95°C 04 : 00
 30x 95°C 00 : 30
 72°C 00 : 30
 1x 72°C 07 : 00
 15°C ∞

La figure 2 montre les résultats de cette PCR.

L'amplifiât du marqueur PsCo est de 252 paires de bases. Comme la figure 2 le montre, ce marqueur défini par le couple d'amorce PsCoF/ PsCoR n'est pas spécifique de la bactérie *Pseudomonas syringae. pv. peponis* (NF8, NC8, EN5, Co9A, Nm2) car il amplifie aussi
 5 des séquences génétiques différentes de celles de la souche d'étude, à savoir des séquences génétiques de bactéries *Pseudomonas syringae pv. aptata* (5428, 1617 et 5429), *Pseudomonas syringae pv. pisi* (2105), *Pseudomonas syringae pv. atrofaciens* (2213) et *Pseudomonas syringae pv. lapsa* (1731).

Les inventeurs se sont alors tournés vers un autre couple d'amorces utilisé au laboratoire
 10 pour différencier des souches de *Xanthomonas arboricola*, basés sur l'amplification d'une séquence comprise dans un opéron codant une NRPS (non ribosomal peptide synthesis). Ce couple d'amorce n'avait jamais été testé chez *Pseudomonas*. Le marqueur 4BaF est défini par le couple d'amorces de séquences nucléotidiques suivantes :

Amorce sens (ou forward) 4BaF : 5'GAACAGCAGCCAGTTACG 3' (SEQ ID N°9)

15 Amorce anti-sens (ou reverse) 4BaR : 5'TACGCAGTCGATGAGTCC 3' (SEQ ID N°10)

Une amplification par réaction en chaîne (PCR) est réalisée afin d'amplifier le marqueur 4Ba chez la bactérie *Pseudomonas syringae peponis*.

Le mélange réactionnel est identique à celui utilisé pour le marqueur PsCo, mais les
 20 conditions de PCR sont les suivantes :

Programme d'amplification pour PCR classique :

1x	95°C	04 : 00
30x	95°C	00 : 30
	56°C	00 : 30
	72°C	00 : 30
1x	72°C	07 : 00
	15°C	∞

30 La figure 3 montre les résultats de cette PCR.

L'amplifiât du marqueur 4Ba est de 198pb. De manière surprenante, alors que ce marqueur défini par le couple d'amorces 4BaF/4BaR a été spécifiquement créé pour différencier des souches de *Xanthomonas campestris*, une bactérie spécifiquement pathogène des crucifères, il montre une spécificité vis-à-vis du *Pseudomonas syringae pv. peponis*
 35 puisque seules les souches d'intérêt (Nm2, Clug, NF8, NC8, EN5, Co9A) sont amplifiées (voir figure 3). Aucune autre des souches de *Pseudomonas syringae* du groupe 1 testées ne sont pas amplifiées.

Ce marqueur moléculaire 4Ba a pu être séquencé grâce à ces amplifications. Les séquences sens et anti-sens de ce marqueur spécifique de *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* sont les suivantes :

Séquence du marqueur moléculaire 4B (SEQ ID N°11):

5 5'GAACAGCAGCCAGTTACGACGCTCGGCAGGCGACGCACAGTCGATCGAGAG
GTAGCACGCACCGGCTTTGAGTACGCCCAAGAGCGCTGCAACCTGCCACTCGG
AGCGCATCATGCAGATACCGACGACATACCGGGCTGCACATCCTTGCGAAGC
AATATGTCGGCAATTTTGTCTGGCGGACTCATCGACTGCGTA3'

10 Séquence du brin complémentaire du marqueur moléculaire 4B (SEQ ID N°12):

5'TACGCAGTCGATGAGTCCGCCGACAAAATTGCCGACATATTGCTTCGCAAGG
ATGTGCAGCCCGGTGATGTCGTCGGTATCTGCATGATGCGCTCCGAGTGGCAG
GTTGCAGCGCTCTTGGGCGTACTCAAAGCCGGTGCCTGCTACCTCTCGATCGAC
TGTGCGTCGCCTGCCGAGCGTCGTAAGTGGCTGCTGTTC3'

15

Les résultats des tests de spécificité des marqueurs moléculaires PsCo et 4Ba sont résumés dans le tableau 9

Tableau 9 : Test de spécificité des marqueurs moléculaires

Souches	Nombre de souches testées	PsCoF/PsCoR	4BaF/4BaR
<i>P. congelans</i>	1	-	-
<i>P.s.pv. syringae</i>	3	-	-
<i>P.s.pv. lapsa</i>	1	+	-
<i>P.s.pv. atrofaciens</i>	1	+	-
<i>P.s.pv. panici</i>	1	-	-
<i>P.s.pv. japonica</i>	1	-	-
<i>P.s.pv. aceris</i>	1	-	-
<i>P.s.pv. dysoxylis</i>	1	-	-
<i>P.s.pv. aptata</i>	3	+	-
<i>P.s.pv. papulans</i>	1	-	-
<i>P.s.pv. pisi</i>	1	+	-
<i>P.s.pv. lachrymans</i>	1	-	-
<i>P.s.pv. tabaci</i>	1	-	-
Entérobactérie	1	-	-
<i>P.s.pv. peponis</i>	50	+	+

Ainsi le marqueur 4Ba défini par le couple d'amorces 4BaF et 4BaR montre une spécificité vis-à-vis de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* puisque seules les souches de cette bactérie sont amplifiées (voir figure 3). Les autres souches de *Pseudomonas syringae* du groupe 1 ne sont pas amplifiées.

5

III/ Mise au point de procédures de détection de la bactérie à partir d'échantillons

Les auteurs de la présente invention ont mis au point deux procédures de détection de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis*, à savoir une technique de Bio-PCR et une
10 technique de Seed-PCR. Ces deux techniques combinent une amplification biologique de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* à une amplification spécifique de l'ADN par réaction PCR. Toutefois ces deux méthodes se différencient par le milieu d'amplification biologique de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis*. L'amplification biologique présente un intérêt non négligeable par rapport à d'autres
15 techniques de PCR visant à identifier par exemple des lots de semences contaminées : en effet l'amplification biologique permet de s'assurer que les lots sont contaminés par des bactéries vivantes alors qu'une simple PCR pourrait révéler comme contaminé un lot dans lequel les bactéries pathogènes sont mortes et ne sont donc plus un danger pour la culture. Pour la Bio-PCR, les milieux de culture utilisés sont ceux sélectionnés dans les exemples 3
20 à 5, à savoir le LBCA et le LBCAL. Le temps d'incubation optimal des bactéries est de 48 heures, mais 24 heures suffisent pour l'apparition des premières colonies détectables en PCR.

En ce qui concerne la Seed-PCR l'amplification biologique se fait sur les graines en germination. Il a été montré qu'un pathogène présent dans une graine augmente sa
25 population en même temps que la germination cette même graine (thèse de M. Niknejad-Kasempour, 1998). Ainsi en faisant germer des semences de courgette contaminées dans des conditions optimales pour le pathogène, la population de bactérie augmente, la graine en germination correspond au milieu de culture (il n'y a pas de milieu de culture spécifique, le macérât de germination des semences constitue le milieu de culture).
30 L'amplification biologique pour la Seed-PCR se fait en boîte de germination 48h à 27°C, les graines étant alors lavées 1h30 dans de l'eau distillée en erlen pour en extraire toutes les bactéries pathogènes comme saprophytes : les graines germées ont les téguments ouverts ce qui facilite la sortie des bactéries, une simple macération suffit dans le cas des semences germées pour en extraire les bactéries.

35

Des tests préliminaires ont montrés que lorsque une PCR était faite directement après lavage de boîtes (pour Bio-PCR) ou lavage de graines germées (pour Seed-PCR) en faisant simplement bouillir les suspensions, aucun signal n'est détecté ; trop d'inhibiteurs de PCR

sont contenus dans les semences et un nombre trop important de cellules sont présentes dans le tube de réaction. Il est donc nécessaire de réaliser une extraction d'ADN sur les échantillons issus de l'amplification biologique, que ce soit pour la technique de BIO-PCR ou de SEED PCR.

5

1/ Procédure de détection de *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* dans les semences par Bio-PCR.

10 Différents sous échantillons de 100 graines d'un lot initial de 500 graines sont transférés dans des sacs Stomacher avec membrane filtrante et y sont ajoutés 50 mL d'eau distillée stérile. Les sacs sont ensuite fermés hermétiquement pour éviter toute fuite de broyât. Les échantillons sont broyés uns à uns pendant dix minutes.

Les broyats de chaque sous échantillon sont ensuite récupérés puis étalés sur milieu LBCA et LBCAL. Les boîtes sont mises à incuber à 27°C pendant 24h.

15 A noter que de manière facultative, les broyats peuvent être dilués dans le but d'effectuer un dénombrement de *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* dans le broyât brut. Ainsi, une gamme de dilution de raison 10 peut être préparée jusqu'à une dilution au millième ; 100µL de chaque dilution sont ensuite étalés sur LBCA et LBCAL au râteau et mis à incuber à 27°C. La lecture du dénombrement se fera ensuite après 48h d'incubation, par
20 dénombrement visuel des colonies développées.

Après 24h d'incubation à 27°C, les boîtes de broyât brut sont lavées avec 2 mL d'eau distillée stérile à l'aide d'un râteau stérile. 1,5mL de ce lavât est récupéré pour l'extraction d'ADN. Après centrifugation de 5 minutes à 13000 tours par minutes (rpm.), le surnageant est jeté et le culot repris dans 750µL de tampon d'Edwards (200mM TrisHCl pH 7,5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP 360) avant incubation 1h à température
25 ambiante sous agitation douce. Une nouvelle centrifugation de 5 min. à 10000rpm permet de récupérer 700µL de surnageant qui est transféré dans un tube Phase Lock Gel® (Eppendorf). 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (700µL) est ajouté dans le tube qui est mélangé doucement pendant 1 minute puis centrifugé 15 minutes à
30 14000rpm. Le surnageant est transféré dans un tube ordinaire (1,5mL) ou l'on ajoute 0,6 volume d'isopropanol (420µL) avant de mélanger doucement par inversion et placer le tube à -20°C pendant 20 à 25 minutes. Une nouvelle centrifugation 2 minutes à 14000rpm et 4°C permet d'obtenir un culot qui est lavé dans 500µL d'alcool 70° conservé à -20°C et une nouvelle fois centrifugé 2 minutes à 14000rpm et 4°C. Le culot est séché 15 minutes à
35 60°C et resuspendu dans 50µL d'eau ultrapure stérile pour être conservé à -20°C.

Le mélange réactionnel pour la PCR est préparé dans un volume final de 20 µl selon le tableau 8 ci-dessus. La PCR est réalisée dans des tubes appropriés à raison de 17µl du

mélange réactionnel et 3 µl de l'ADN cible. Le programme d'amplification de la PCR classique est réalisé à l'aide d'un thermocycleur (icycler BioRAD).

5	1x	95°C	04 : 00
	30x	95°C	00 : 30
		56°C	00 : 30
		72°C	00 : 30
	1x	72°C	07 : 00
		15°C	∞

Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE 0,5 X préparé selon :

I. Préparation du tampon TBE 5x :

Produits	1 litre
Tris base	54g
Acide borique	27,5g
EDTA	4,65g

II. Préparation de 2% de gel agarose pour l'électrophorèse :

Produits	100 ml
Agarose	2g
Tampon TBE 0,5x	100 ml

III. Préparation du bromure d'éthidium :

Produits	1 litre
bromure d'éthidium (10 mg /ml)	200 µl
Eau distillée stérile	1000 ml

Le gel est chargé, dans chaque puit, avec 8 µl de chaque produit amplifié auxquels sont ajoutés 8 µl de marqueur de poids moléculaire 100 paires de bases (pb) (au moins 1 par gel). L'ensemble est soumis à une électrophorèse sous un voltage constant (100 V) et la migration des produits amplifiés est visualisée à l'aide d'un transilluminateur à UV, après coloration au bromure d'éthidium (BET) et rinçage.

La figure 4 illustre les résultats de cette PCR.

A, B, C et D sont des échantillons d'ADN extraits de quatre lots de semence de courgette différents, A, B et C étant contaminés par *Pseudomonas syringae peponis*, D étant un lot non contaminé par la bactérie. « 1 » est un témoin positif constitué par une amplification d'ADN d'une souche pure de *Pseudomonas syringae peponis* pathogène sur courgette. « 4 » est un témoin négatif de PCR qui est faite avec de l'eau stérile.

Pour les trois échantillons contaminés A, B et C, la bande à 200 paires de bases est bien présente, de même d'ailleurs que pour le témoin positif « 1 » alors que pour le lot D non contaminé, aucune bande n'est présente. Ceci confirme bien que le marqueur 4 Ba est bien spécifique de la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae pv. Peponis* et que celle-ci est détectable avec la technique de Bio-PCR.

2/ Procédure de détection de *Pseudomonas syringaea. pv. peponis* dans les semences par Seed-PCR.

Les produits et appareillages pour réaliser la Seed-PCR sont identiques à ceux de la Bio-PCR. Il n'y a toutefois pas besoin de préparer un milieu de culture, seules sont nécessaires des boîtes de germination et du papier plissé ou buvard afin de faire germer les graines.

La taille des échantillons et des sous échantillons analysés sont les mêmes que pour la Bio-PCR à savoir des échantillons de 500 graines divisés en 5 sous échantillons de 100 graines pour l'analyse.

Chaque boîte de germination contient un papier buvard dans le fond et un papier plissé de 25 plis. Chaque boîte contiendra un sous-échantillon de 100 graines. 4 graines sont réparties par plis et 30mL d'eau stérile sont ajoutés. Les boîtes de germination sont mises à incuber à 27°C en étuve pendant 48h. Après cette incubation, des radicules d'environ 2cm

sont visibles avec quelques fois des racines secondaires. Les semences sont récupérées et transvasées dans un erlenmeyer de 250mL auquel sont ajoutés 50mL d'eau distillée stérile.

Les graines sont lavées 1 heure à température ambiante et sous agitation constante (agitateur à plateau universel). 1,5mL de macérât sont récupérés en tubes de 2mL pour l'extraction d'ADN. Les protocoles d'extraction d'ADN ainsi que les protocoles des PCR sont identiques à ceux mis en œuvre pour la Bio-PCR.

De même, l'interprétation des résultats se fera exactement de la même façon. Dans les cas de la Seed-PCR, seule la partie amplification biologique change par rapport à la Bio-PCR.

IV/ Procédure de détection de *Pseudomonas syringaea. pv. peponis* dans les semences par test sérologique

Même si les test sérologiques présentent certains problèmes de spécificité en ce qui concerne la reconnaissance de la bactérie d'intérêt par rapport à d'autres bactéries pouvant

se trouver sur la graine, la plante ou sur une partie de plante, des tests de type Elisa et ses variantes DAS/TAS (double and triple antibody sandwich) peuvent se révéler utiles car ils sont généralement simples d'utilisation et peu coûteux.

Ces test peuvent se faire au laboratoire, mais les dernières années ont aussi vu la mise au point de tests utilisables directement dans les champs, dans les serres, basés sur ces techniques d'immunologies : une bandelette comporte un ou plusieurs anticorps qui vont fixer la bactérie dont l'absence/présence veut être confirmée. Si la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *peponis* est présente dans l'échantillon soumis (un broyat ou une macération de feuille, de partie de plante ou de graine), elle sera révélée par l'ajout d'un second anticorps auquel un enzyme est généralement liés et dont l'ajout du substrat déclenche une réaction enzymatique révélant, généralement par une coloration spécifique, la présence de la bactérie d'intérêt.

Les anticorps peuvent être préparés par les techniques connues de l'homme du métier, à savoir par exemple des antisérums préparés chez le lapin et le poulet. L'immunisation peut être pratiquée chez le lapin par injection par voie intraveineuse d'une suspension de cellules vivantes de la bactérie *Pseudomonas syringae* *peponis* selon, par exemple, le protocole décrit par Trigalet et al en 1978. Les prélèvements de sérums s'effectuent ainsi après le 4^e rappel.

Chez le poulet, l'immunisation peut se faire par voie souscutanée avec une suspension de cellules vivantes additionnée d'adjuvant complet de Freund, par exemple 0,5 ml d'adjuvant pour 1,5 ml de suspension bactérienne. Les injections peuvent être faites à raison d'une piqûre par semaine pendant 3 semaines, le prélèvement étant fait 6 jours après la dernière piqûre et après 3 rappels. Les immunoglobulines peuvent être extraites de ces sérums par chromatographie d'affinité par exemple sur des colonnes de Sépharose 4B. Leur élution de la colonne d'affinité peut être obtenue avec un tampon HCl - glycine 0,1 M pH 2,8. Après neutralisation et concentration par ultrafiltration sur membrane Amicon PM 10, les immunoglobulines peuvent être stockées au congélateur. La concentration de la solution est déterminée d'après la valeur de la densité optique à 280 nm.

Les immunoglobulines qui seront utilisées comme anticorps secondaire peuvent par exemple être couplées à la phosphatase alcaline type III R (Sigma EC n° 3.1-3.1) par l'intermédiaire du glutaraldéhyde (méthode en un temps) selon le procédé décrit par VASRAMEA et al., en 1978.

Le test ELISA (acronyme de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) peut être réalisé par exemple suivant la méthode sandwich d'après les travaux de Clark et Adams (1976) ou encore selon la méthode de double couche d'après Scherrer & Bernard (1977). Les réactions peuvent être réalisées à loisir en microplaques ou en cuves.

Si le test ELISA est un test immunologique destiné généralement à détecter une protéine dans un liquide biologique, il peut être toutefois aussi utilisé pour détecter la présence de

bactéries, notamment de la bactérie *Pseudomonas syringae peponis* identifiée par les auteurs de la présente invention.

- Les immunoglobulines (300 µl à 10 µg/ml) peuvent être réparties dans les micropuits des microplaques. L'adsorption sera faite 5 h à 37 °C ou 1 nuit à 4 °C. Après 3 lavages avec le
- 5 liquide physiologique, le dépôt de l'échantillon (un broyat ou une macération de feuille, de partie de plante ou de graine sont déposée dans les puits) est réalisé à raison de 200 µl par micropuit et l'incubation se fait 2 h à 28 °C. Après élimination de l'échantillon par lavage au liquide physiologique, 250 µl du couplage anticorps-enzyme (anticorps secondaire) peut être ajouté et laissés 4 h à 37 °C. La révélation de la réaction sera obtenue avec 0,8 mg/ml
- 10 de p- nitrophényl phosphate dans un tampon Tris-HCl 0,05 M, NaCl 1 M pH 8,0 A(REGN & mELrrrHaL, 1960). La lecture s'opérant, pour cette réaction, par exemple à 405 nm au spectrophotomètre Beckman DBG. Dans chaque série de test figurent des témoins de réaction (bactérie *Pseudomonas syringae peponis* et tampon comme témoins positifs/négatifs)
- 15 La phosphatase alcaline catalysant la transformation du p-nitrophényl phosphate incolore en p-nitrophenol jaune, la présence de la bactérie *Pseudomonas syringae peponis* dans l'échantillon est révélée lorsque l'ajout du substrat de l'enzyme entraîne un changement de la couleur dans le puit. Eventuellement, la réaction peut même être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues de
- 20 bactéries puisque le nombre de molécules d'anticorps secondaires fixées dépend du nombre de bactéries immobilisées par l'anticorps primaire.

REVENDICATIONS

1. Bactérie *Pseudomonas syringaea peponis*, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence de nucléotides sélectionnée parmi les séquences de nucléotides
5 SEQ ID N°5, SEQ ID N°6, SEQ ID N°9, SEQ ID N°10, SEQ ID N°11, SEQ ID N°12 et SEQ ID N°13.
2. Bactérie selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a été isolée et déposée le 19.05.2009 auprès de la Collection Nationale de Culture de MicroOrganismes
10 sous le numéro CNCM I-4159.
3. Marqueur moléculaire 4Ba de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est défini par le couple d'amorces nucléotidiques constitué d'une part, par la séquence SEQ ID N°9 et/ou
15 au moins une séquence comprenant au moins 8 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°9, et d'autre part, par la séquence SEQ ID N°10 et/ou au moins une séquence comprenant au moins 8 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°10.
- 20 4. Marqueur moléculaire 4Ba selon la revendication 3, caractérisé en ce que sa séquence nucléotidique comprend tout ou partie de la SEQ ID N°11 ou de la séquence SEQ ID N°12.
- 25 5. Amorce(s) nucléotidique(s) pour la détection et l'identification de la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend :
 - a. de 10 à 30 nucléotides dont au moins 11 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°9, et, de préférence, la séquence SEQ ID N°9 intégrale;
 - b. de 10 à 30 nucléotides dont au moins 8 nucléotides consécutifs de la
30 séquence SEQ ID N°10, et, de préférence, la séquence SEQ ID N°10 intégrale;
 - c. de 11 à 30 nucléotides de la séquence SEQ ID N° 11;
 - d. de 8 à 30 nucléotides de la séquence SEQ ID N° 12; ou
 - e. un couple d'amorces comportant une première amorce (a) et/ou (c) et une seconde amorce (b) et/ou (d).
- 35 6. Méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, dans un échantillon, à l'aide d'un moyen de biologie moléculaire choisi dans le groupe comprenant au moins

l'un des marqueurs selon l'une des revendications 3 ou 4 et/ou au moins une amorce selon la revendication 5.

- 5 7. Méthode selon la revendication 6, caractérisée en ce que le moyen de biologie moléculaire comprend:
- une sonde d'ADN spécifique de tout ou partie de la séquence SEQ ID N° 11 ou de la SEQ ID N° 12 permettant une hybridation, et/ou
 - un couple d'amorces (c) tel que défini dans la revendication 5 permettant une amplification en chaîne par polymérase (PCR Polymerase Chain
- 10 Reaction).
8. Anticorps apte à reconnaître la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, dans un échantillon.
- 15 9. Méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, dans un échantillon, à l'aide d'au moins un anticorps tel que défini dans la revendication 8.
- 20 10. Méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, dans un échantillon, caractérisée en ce qu'elle consiste à mettre en œuvre un milieu de culture spécifique LBCA additionné ou non de lincomycine.
- 25 11. Méthode selon la revendication 10 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre la mise en œuvre d'un moyen de biologie moléculaire tel que défini dans la revendication 6.
- 30 12. Méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, dans un échantillon végétal, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- (1) le traitement dudit échantillon, de préférence par broyage ou macération, en vue d'extraire d'éventuelle(s) bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis*,
 - (2) l'inoculation de plantes ou de graines exemptes de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* avec l'extrait obtenu en (1),
 - (3) la culture desdites plantes ou graines inoculées issues de l'étape (2),
 - (4) la comparaison morphologique des plantes ou graines issues de l'étape (3) avec des plantes issues de plantes ou de graines inoculées avec la bactérie

Pseudomonas syringaea peponis, pour en déduire l'infection ou la non-infection de l'échantillon objet de la détection et de l'identification.

- 5 13. Méthode selon l'une des revendications 6, 7, 9 à 12, caractérisée en ce que l'échantillon est issu d'une plante sélectionnée parmi les plantes de la famille des cucurbitacées, une plante du genre *cucurbita* ou du genre *cucumis* et une plante de courgette *cucurbita pepo*.
- 10 14. Méthode de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, dans un échantillon, caractérisée en ce qu'elle combine au moins deux méthodes choisies dans le groupe comprenant :
- 15 i. La méthode telle que définie dans la revendication 6 ou 7;
 ii. La méthode telle que définie dans la revendication 9 ;
 iii. La méthode telle que définie dans la revendication 10;
 iv. La méthode telle que définie dans la revendication 12.
- 20 15. Kit de détection et d'identification de bactérie(s) *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend :
- 25 - un moyen de biologie moléculaire choisi dans le groupe comprenant au moins l'un des marqueurs tels que définis dans l'une des revendications 3 à 4 et/ou au moins une amorce telle que définie dans la revendication 5,
 - et/ou au moins un anticorps tel que défini dans la revendication 8,
 - et/ou au moins un milieu de culture LBCA additionné ou non de lincomycine.
- 30 16. Méthode d'identification de plantes résistantes à la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- l'inoculation d'au moins une plante, d'au moins une graine ou d'au moins une partie de plante avec cette bactérie, puis
 - l'identification de la ou des plante(s) résistante(s) ne présentant pas les symptômes de sensibilité à cette bactérie.
- 35 17. Méthode d'inoculation d'un échantillon avec une bactérie, caractérisée en ce que l'inoculum mis en œuvre comprend la bactérie *Pseudomonas syringaea peponis* telle que définie dans la revendication 1 ou 2.

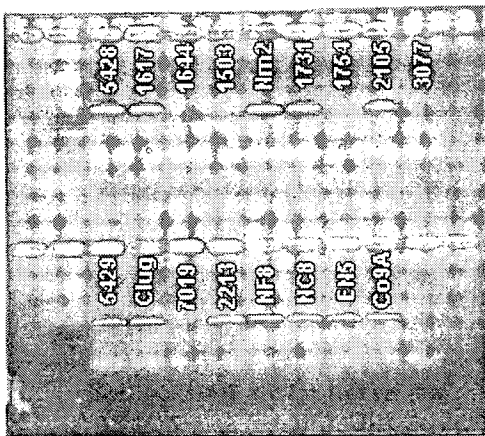
18. Méthode de création de plantes résistantes à la bactérie *Pseudomonas syringaea* *peponis* caractérisée en ce qu'elle comprend :
- 5 (1) l'identification d'une plante résistante à cette bactérie *Pseudomonas syringaea* *peponis* selon la méthode de la revendication 16,
- (2) le croisement de la plante résistante identifiée en étape 1) avec une plante sensible à cette bactérie,
- (3) l'identification de plante résistante dans la descendance de la plante issue de l'étape (2) selon la méthode de la revendication 16.
- 10 19. Méthode de sélection d'un lot de semence caractérisée en ce qu'elle met en œuvre la méthode de détection et d'identification telle que définie dans au moins l'une des revendications 6, 7, 9-12 et 14 et/ou la méthode d'identification telle que définie dans la revendication 17 et/ou le kit tel que défini dans la revendication 15.

Figure 1

7019congel	CGAGCTGAAC	TTCGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGTCG	ATCATCGCCG	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
2339Taceri	CGAGCTGAAC	TTCGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCCGTCAGAC	CTTCACGCGC	ATCGTCGCGG	GTGGTCGCAA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
4888syrinl	CGAGCTGAAC	TTAGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGCGC	GTCATCGCCG	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
1731Tlapsl	CGAGCTGAAC	TTTGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGCGC	ATCATCGCCA	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
1392Tsyrl	CGAGCTGAAC	TTTGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCCGTCAGAC	CTTCACGCGC	GTCATCGCCG	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
ps_gyrB	CGAGCTGAAC	TTTGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCCGTCAGAC	CTTCACGCGC	GTCATCGCCA	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
2105Tpisil	CGAGCTGAAC	TTCGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGCGC	ATCATCGCCA	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
2345Tpanil	CGAGCTGAAC	TTCGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGCGC	ATCGTCGCGG	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
2896Tjapol	CGAGCTGAAC	TTCGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGCGC	ATCGTCGCGG	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
2213Tatrol	CGAGCTGAAC	TTCGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGCGC	ATCATCGCCA	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
1617Taptal	CGAGCTGAAC	TTCGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGCGC	ATCATCGCCA	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA
Consensus	CGAGCTGAAC	TTCGGATCAG	GCACCTTGAC	CGAAATGATC	GCAGTCAGAC	CTTCACGCGC	aTCaTCGCCg	GTGGTCGCGA	CCTTGCGCTT	CTTGCCAGA

5

Figure 2



10 Figure 3

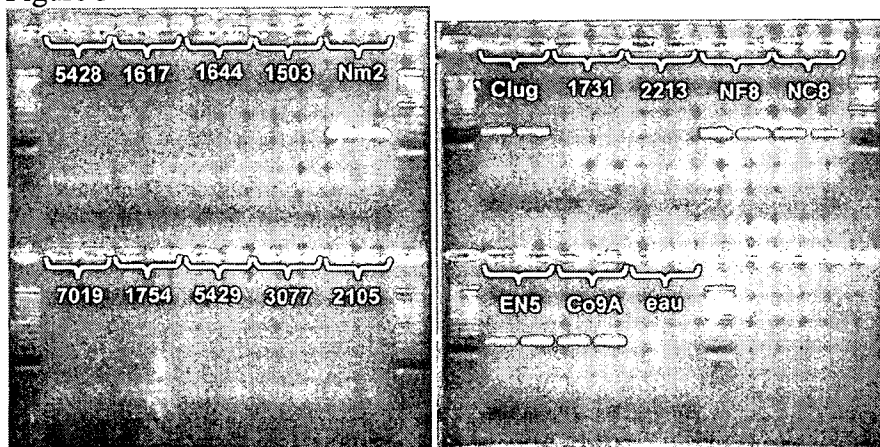
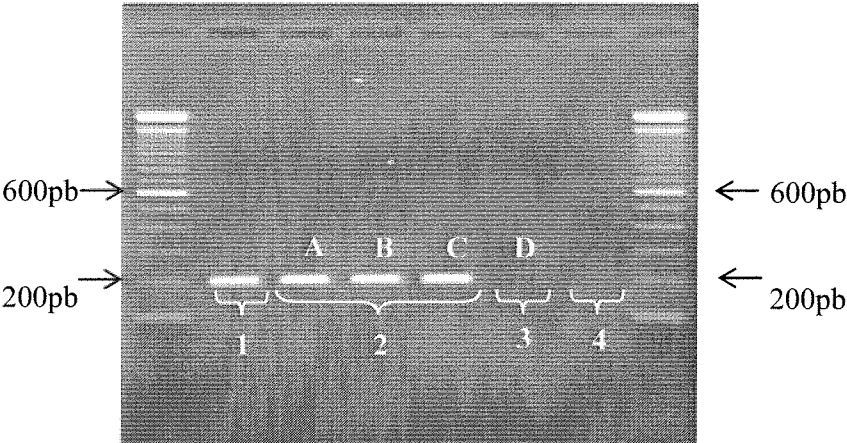


Figure 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/059833

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N1/20 C12Q1/68 C12N15/11 C07K16/12 G01N33/569
ADD. C12R1/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12R C12N C12Q C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/77214 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; VELCULESCU VICTOR [US]; VOGELSTEIN BERT [US];) 21 December 2000 (2000-12-21) sequence 5428	5,15
A	SCORTICHINI M ET AL: "Genetic diversity, presence of the syrB gene, host preference and virulence of Pseudomonas syringae pv. syringae strains from woody and herbaceous host plants." PLANT PATHOLOGY (OXFORD), vol. 52, no. 3, June 2003 (2003-06), pages 277-286, XP002575019 ISSN: 0032-0862	1-19

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2010

Date of mailing of the international search report

24/09/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/059833

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHAAD N W ET AL: "PSEUDOMONAS-PSEUDOALCALIGENES-SSP-CITRULLI NEW-SUBSPECIES" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 28, no. 1, 1978, pages 117-125, XP002575020 ISSN: 0020-7713 -----	1-19
A	FOGLIANO V ET AL: "Immunological detection of syringopeptins produced by Pseudomonas syringae pv. lachrymans" PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, vol. 55, no. 5, November 1999 (1999-11), pages 255-261, XP002575021 ISSN: 0885-5765 the whole document -----	1-19
A	YAMAMOTO SATOSHI ET AL: "Phylogeny of the genus Pseudomonas: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes" MICROBIOLOGY (READING), vol. 146, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 2385-2394, XP002575022 ISSN: 1350-0872 cited in the application -----	1
A	DATABASE EMBL [Online] 23 June 2000 (2000-06-23), "Pseudomonas syringae pv. glycinea gene for 16S rRNA." XP002575023 retrieved from EBI accession no. EMBL:AB001443 Database accession no. AB001443 the whole document -----	1
A	AMREIN HANS ET AL: "Functional analysis of genes involved in the synthesis of syringolin A by Pseudomonas syringae pv. syringae B301D-R." MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 17, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 90-97, XP002575024 ISSN: 0894-0282 the whole document -& DATABASE EMBL [Online] 1 May 2003 (2003-05-01), "Pseudomonas syringae slyABCDE gene and ORF1, ORF7 and ORF8" XP002575025 retrieved from EBI accession no. EMBL:AJ548826 Database accession no. AJ548826 the whole document -----	3-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/059833

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0077214	A2	21-12-2000	
		AU 5485600 A	02-01-2001
		CA 2378512 A1	21-12-2000
		EP 1190044 A2	27-03-2002
		JP 2003516716 T	20-05-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2010/059833

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C12N1/20 C12Q1/68 C12N15/11 C07K16/12 G01N33/569
ADD. C12R1/38

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12R C12N C12Q C07K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 00/77214 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; VELCULESCU VICTOR [US]; VOGELSTEIN BERT [US];) 21 décembre 2000 (2000-12-21) séquence 5428	5, 15
A	SCORTICHINI M ET AL: "Genetic diversity, presence of the syrB gene, host preference and virulence of Pseudomonas syringae pv. syringae strains from woody and herbaceous host plants." PLANT PATHOLOGY (OXFORD), vol. 52, no. 3, juin 2003 (2003-06), pages 277-286, XP002575019 ISSN: 0032-0862	1-19

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 septembre 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/09/2010

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, Robert

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SCHAAD N W ET AL: "PSEUDOMONAS-PSEUDOALCALIGENES-SSP-CITRULLI NEW-SUBSPECIES" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 28, no. 1, 1978, pages 117-125, XP002575020 ISSN: 0020-7713 -----	1-19
A	FOGLIANO V ET AL: "Immunological detection of syringopeptins produced by Pseudomonas syringae pv. lachrymans" PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, vol. 55, no. 5, novembre 1999 (1999-11), pages 255-261, XP002575021 ISSN: 0885-5765 le document en entier -----	1-19
A	YAMAMOTO SATOSHI ET AL: "Phylogeny of the genus Pseudomonas: Intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes" MICROBIOLOGY (READING), vol. 146, no. 10, octobre 2000 (2000-10), pages 2385-2394, XP002575022 ISSN: 1350-0872 cité dans la demande -----	1
A	DATABASE EMBL [Online] 23 juin 2000 (2000-06-23), "Pseudomonas syringae pv. glycinea gene for 16S rRNA." XP002575023 extrait de EBI accession no. EMBL:AB001443 Database accession no. AB001443 le document en entier -----	1
A	AMREIN HANS ET AL: "Functional analysis of genes involved in the synthesis of syringolin A by Pseudomonas syringae pv. syringae B301D-R." MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 17, no. 1, janvier 2004 (2004-01), pages 90-97, XP002575024 ISSN: 0894-0282 le document en entier -& DATABASE EMBL [Online] 1 mai 2003 (2003-05-01), "Pseudomonas syringae slyABCDE gene and ORF1, ORF7 and ORF8" XP002575025 extrait de EBI accession no. EMBL:AJ548826 Database accession no. AJ548826 le document en entier -----	3-5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2010/059833

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0077214	A2	21-12-2000	
		AU 5485600 A	02-01-2001
		CA 2378512 A1	21-12-2000
		EP 1190044 A2	27-03-2002
		JP 2003516716 T	20-05-2003