

*Etude des pathovars de *Pseudomonas syringae* epiphytes et pathogène du Poirier et du Pommier*

Présentée par : Mohamed Kerdoud

M^{lle} LOUANCHI, Chergé de rechercheExamineur
M. SABAOU, ProfesseurExamineur
INA /2001 Année Universitaire : 2001

M. PAULIN, Directeur de recherchesDirecteur de thèse Devant le jury : M. BOUZNAD,
ProfesseurPrésident M. BAKOUR, ProfesseurExamineur

Table des matières

Remerciements . .	5
Résumé . .	6
Abstract . .	7
ص غلجلا . .	8
CHAPITRE I : ETUDE DE <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PV. <i>SYRINGAE</i> BACTERIE EPIPHYTE PATHOGENE DU POIRIER ET DU POMMIER . .	9
1.lesbacteries phytopathogenes et les <i>Pseudomonas</i> . .	9
2.Le genre <i>Pseudomonas</i> . .	10
2.1.Révision du genre <i>Pseudomonas</i> et redéfinition des espèces . .	11
2.2.Les <i>Pseudomonas</i> du groupe LOPAT 1 . .	14
3.Caractéristiques des pathovars de <i>Pseudomonas syringae</i> . .	18
3.1.Caractères sérologiques . .	18
3.2.Conditions d'infection . .	19
3.3.Composantes du pouvoir pathogène . .	20
3.4.Les gènes d'hypersensibilité et d'avirulence . .	24
4.Aptitude épiphyte de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i> . .	30
4.1.Phase épiphyte . .	30
4.2.Localisation des bactéries épiphytes . .	30
4.3.Modification de l'environnement de la surface de la feuille . .	31
4.4.Localisation au-delà de la surface de la feuille . .	32
5. Détection de <i>Pseudomonas syringae</i> par voie génotypique . .	33
5.1.L'approche génotypique . .	33
5.2.La PCR . .	33
5.3.Choix des séquences . .	34
6.Méthodes de lutte contre les <i>Pseudomonas</i> . .	34
6.1.Lutte chimique . .	35
6.2.Lutte biologique . .	35
7.Maladies à <i>P. syringae</i> des maloideae . .	37
7.1.Maladie à <i>P. s. pv. syringae</i> : Dessèchement bactérien du Poirier . .	37
7.2.Maladies à <i>P. s. pv. papulans</i> : tache vésiculaire de la pomme, . .	38
8.Problème posé . .	39
CHAPITRE II : DYNAMIQUE DES POPULATIONS DE <i>P. S. PV. SYRINGAE</i> EPIPHYTES . .	40
Introduction . .	40
1.Materiel et methodes . .	40
1.1.Matériel végétal . .	40
1.2.Prélèvements . .	41
1.3.Techniques utilisées . .	43
1.4.Estimation des populations bactériennes . .	43
1.5.Caractérisation . .	44
1.6.Analyses statistiques . .	45
2.Resultats . .	45

2.1.Dynamique des populations de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (PSS) dans les différents sites étudiés en 1997. . .	45
2.2.Comparaison des populations en fonction des organes colonisés dans les vergers sains (periode 97) . .	48
2.3.Dynamique des populations épiphytes de PSS du Poirier 1997/ 1998 . .	49
2.4.Analyse de la dynamique des populations de <i>Pseudomonas</i> en fonction des conditions climatiques . .	51
3.Discussion . .	52
CHAPITRE III :CARACTERISATION DES PSS EPIPHYTES DU POIRIER ET DU POMMIER . .	57
Introduction . .	57
1. Etude du Pouvoir pathogène des isolats de PSS èpiphytes . .	57
1.1.Matériel et méthodes . .	58
1.2.Resultats . .	61
1.3.Discussion . .	64
2.Caractérisation phénotypique des isolats epiphytes du poirier et du pommier . .	66
2.1.Materiel et Methodes . .	67
2.2.Resultats . .	70
2.3.Discussion . .	80
3.Conclusion . .	80
CHAPITRE IV : PRESENCE EPIPHYTE DE PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. PAPULANS (ROSE) SANS PRESENCE DE SYMPTOME NATUREL DE LA MALADIE . .	82
Introduction . .	82
1.Caracterisation des isolats de <i>P. s.</i> pv. <i>papulans</i> . .	83
1.1.Materiel et Methodes . .	83
1.2.Resultats . .	89
1.3.Discussion . .	96
2.Developpement d'un outil moléculaire pour le diagnostic et l'identification de <i>P. s.</i> pv. <i>papulans</i> . .	100
Introduction . .	100
2.1.Matériel et Méthodes . .	101
2.2.Resultats . .	105
2.3.Discussion . .	108
Discussion générale – Conclusion . .	111
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES . .	114
Annexe . .	132
Annexe 1 : Composition des milieux de culture . .	132
Annexe 2 :Tampons et solutions utilisés en biologie moléculaire . .	132

Remerciements

La réalisation de ce travail de thèse a été possible grâce au support de ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique (MESRS) par octroie d'une formation alternée à distance par le biais de l'Institut agronomique de Chelf. Je remercie Monsieur Minh, professeur de l'Institut Agronomique de Chelf d'avoir accepté la responsabilité d'encadrement de ma thèse.

Ce travail de recherche a été réalisé à la station de pathologie végétale à l'INRA d'Angers sous la direction de Monsieur J.P. Paulin que je remercie d'avoir accepté de m'accueillir dans son unité.

Je tiens à exprimer mes remerciements et mon profond respect à Monsieur Z. Bouznad professeur de l'INA d'El Harrach qui a accepté d'être le président du jury.

Mes remerciements vont à Mademoiselle Louanchi et à Monsieur Sabaou d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur malgré leur emploi du temps chargé ainsi qu'à Monsieur Bakour d'avoir accepté de jiger ce travail.

Ma gratitude va aussi à Louis Gardan, qui m'a permis de venir à l'INRA d'Angers qu'il soit ici remercié pour son accueil chaleureux et ses précieux conseils.

Mes remerciements vont également à tous les chercheurs et le personnel de la station pour leur aide technique et plus particulièrement Régine Samson pour sa disponibilité, ses conseils scientifiques fructueux et sa gentillesse.

Je remercie Charles Manceau qui m'a fait bénéficier de son expérience il a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation d'une partie importante de mon travail.

Je suis enfin heureux de pouvoir exprimer ma sympathie et mon amitié à Marie Noëlle Brisset, Sophie Cesbron, Roland Chertier, Michel Ménar, Jean Stéphane Venisse et Mohamed Faize pour leur soutien, leur amitié et leur appréciable compagnie. Sans oublier Joel Bernard et Paul Horeau, je les remercie plus particulièrement pour leur aide technique.

Mes remerciements vont aussi à Alain Huard, pour son soutien sympathique et son talent d'artiste dans les réalisations informatiques.

Je remercie également tous les sourires sympas qui se reconnaîtront.

Je ne peut terminer sans remercier particulièrement ma famille qui a toujours été présente, qui m'a encouragé et soutenu de long de la

réalisation de ce travail.

Résumé

Les bactéries de l'espèce *Pseudomonas syringae* sont impliquées dans des maladies de nombreuses plantes cultivées, par exemple le dessèchement bactérien fréquemment observé dans les principales zones de production de poires. Bien que n'entraînant qu'exceptionnellement la mort de son hôte, cette bactérie, de type nécrogène, est néanmoins responsable de nombreuses lésions nécrotiques sur bourgeons, fleurs, feuilles et fruits. Le pathovar *syringae* de cette espèce apparaît comme une composante permanente de la microflore épiphyte, qui peut atteindre des niveaux de population élevés et exprimer son pouvoir pathogène sous certaines conditions (sensibilité des plantes, conditions climatiques). Pour déterminer le rôle éventuel de *P. s. pv. syringae* (PSS) dans certains dégâts atypiques observés en verger ces dernières années, les populations bactériennes épiphytes d'arbres de vergers sains et de vergers ayant montré des dégâts importants ont été étudiées. Des variations quantitatives des populations épiphytes de PSS ont été observées au cours de l'étude, toutefois les niveaux de populations sont restés faibles et comparables dans les deux situations. La caractérisation phénotypique, pathologique et sérologique des isolats de *Pseudomonas* fluorescents collectés à partir de la microflore montre l'existence d'une variabilité qualitative forte de cette population et une présence limitée des pathovars de *P. syringae*. PSS est souvent présent sur Poirier, mais ne semble pas associé aux dégâts signalés malgré la présence d'isolats potentiellement pathogènes.

L'étude étendue à la microflore du Pommier a permis de déceler des isolats particuliers de *P. syringae* appartenant au pathovar papulans (PSP). Cette bactérie est connue comme responsable de la tache vésiculaire ou papule (blister spot) de la pomme, maladie qui affecte particulièrement les pommes du cultivar Mutsu, dans la région Est des Etats Unis d'Amérique, au Canada et en Italie. En France cette maladie n'a jamais été décelée. La caractérisation phénotypique, sérologique et moléculaire (BOX-PCR, ERIC-PCR et REP-PCR) de ces isolats a montré une grande similitude avec les souches de PSP isolées de taches vésiculaires de pommes originaires des Etats Unis d'Amérique, du Canada et d'Italie. De plus, des symptômes identiques ont été obtenus avec nos isolats, et avec les souches de PSP, après inoculation de fruits immatures du cultivar Fuji, et après infiltration de jeunes feuilles des cultivars Fuji, Mutsu, Gala et Golden Delicious. Les isolats réobtenus à partir du symptôme caractéristique de papule développé sur pommes et sur feuilles au laboratoire ont satisfait au postulat de Koch. Nous avons également développé un outil de diagnostic basé sur la méthode PCR, par l'identification de séquences nucléotidiques spécifiques en comparant les séquences des gènes *hrp* de PSP et de différents pathovars de *P. syringae*. La sonde identifie uniquement nos isolats et les souches de PSP. Ainsi, de nouveaux critères d'identification ont été définis dans notre étude. A la suite de nos travaux il a été possible de confirmer que des symptômes observés en Allemagne sur la variété Delbarestivale sont bien dus à PSP

Mot clés : *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, bactérie épiphyte, pouvoir pathogène, Poirier, *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, tache vésiculaire, blister spot, Pommier, gènes *hrp*, Amorces spécifiques, PCR.

Abstract

Bacteria of the species *Pseudomonas syringae* are implied in diseases of many crop plants, such as the bacterial wilt frequently observed in the main zones of pear production. Although exceptionally resulting in the death of its host, this necrogenic bacterium is nevertheless responsible for many necrotic lesions on buds, flowers, leaves and fruits. The pathovar *syringae* of this species seems a permanent component of the epiphytic microflora, which can reach high levels of population and express its pathogenic capacity under some conditions (susceptibility of the plants and climatic conditions). In order to determine the possible role of *P. s. pv. syringae* (PSS) in some atypical damages observed in orchard these last years in France, the epiphytic bacterial populations of trees of healthy orchards and of orchards having shown significant damage, were studied. Quantitative variations of the epiphytic populations of PSS were observed during the study. However the population levels remained low and similar in both situations. The phenotypic, pathological and serologic characterisation of the fluorescent isolates of *Pseudomonas* collected from the microflora showed the existence of a high qualitative variability of this population and a limited presence of *P. syringae*. PSS was often present on Pear tree, but did not seem related to the assessed damage.

The study, extended to the microflora of the Apple tree, made it possible to detect particular isolates of *P. syringae* similar to strains of the pathovar *papulans* (PSP). PSP is known as responsible of blister spot of apple, a disease which affects particularly apples of the cultivar Mutsu, in the USA (East areas), Canada, and Italy. In France, this disease was never reported. The phenotypic, serologic and molecular characterisation (BOX-PCR, ERIC-PCR and REP-PCR) of these isolates showed a great similarity with the strains of PSP isolated from apple blister spots originating from the affected countries. Moreover, symptoms obtained with our isolates, were identical to those caused by the strains of PSP after immature fruit inoculation of the cultivar Fuji, and after infiltration of young leaves of the cultivars Fuji, Mutsu, Gala and Golden Delicious. The isolates from the typical blister spots obtained on apple fruits and leaves after inoculation satisfied the Koch's postulate. We also developed a tool for diagnosis based on PCR method. We identified a specific nucleotidic sequence by comparing the sequences of PSP *hrp* genes to *hrp* genes of different pathovars of *P. syringae*. The probe identified only our isolates and the PSP strains. Thus, new identifying information were defined in our study. As an application of the results of this work, we could confirm the diagnosis of PSP in symptoms observed on Delbarestivale apple cultivar, in Germany.

Key words : *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, epiphytic bacterium, pathogenicity, Pear tree, *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, blister spot, Apple tree, *hrp* genes, specific primer, PCR.

ص خل مل ا

تصيب بكتريا الفروع *Pseudomonas syringae* في العديد من امراض النباتات المزروعة مثل البقاع البكتيري الموسوم في اقلية مناطق إنتاج الأمانس مع انه لا يصيب هذه في موت النبات الكامل إلا ان هذه البكتريا البكتريولوجية مسؤولة عن تدهور وقت الحصاد في الفواكه الأخرى والأوراق والفواكه *Pathovar syringae* لها الفروع تدهور وكثيرا تركيبة خاصة للكثافات المجهريه القليلة الهوائية التي يمكنها ان تصل الي مسويات عالية من المجموعات و إظهار فروعها القليلة تحت ظروف جيدة (مما يثبت الثبات الطويل المتأخر) لتتعد دور (PSS) *P. s. Pv. syringae* في بعض المصادر فلا تعطيه لشخصه في المساقن في السنوات الأخيرة وقد تم دراسة التجمعات البكتيرية الهوائية لاكتشاف المساقن السطحية و التسمية فكان هناك اختلاف كيمي التجمعات الهوائية أن PSS، و مع ذلك بحيث مسويات التجمعات منخفضة و متغيرة في تلك المناطق دراسة التوسيف المظهري، الأمانس و المسلي للفروع الشبيهة *Pseudomonas* المجموعة بواسطة الكثافات المجهريه القليلة بين وجود ذابن نوصي فوي عند هذه المجموعة و يوجد مصدر أن *Pathovar syringae* (PSS) عند ما يتواجد عند الأمانس و لكن على ما يبدو فهو غير مرتبط بالمصادر المصنوعة على الرغم من تواجد عزل ذات قدرة ايرانية. دراسة التوسيف للكثافات المجهريه القليلة للفواكه كانت من الكثاف من عزل مينة من *Pseudomonas syringae* مينة أن *Pathovar PSS*. هذه البكتريا معروفة بتسببها في القيع الفكري للفواكه و هو مرض يصيب حاداً تصف *Mutua* في الجهة الغربية للولايات المتحدة الأمريكية، كما و إيطاليا، أما في فرنسا فلم يتم الكشف عن هذا المرض. دراسة التوسيف المظهري، المسلي و الجزيئي (REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR) لهذه العزل حيث اكتشافه الكبير مع عزل PEP المسؤولة من القيع الفكري للفواكه من الولايات المتحدة الأمريكية، كما و إيطاليا أصف إلى ذلك قد تم التوسيف على امراض متعلقة مع العزل المتضمنة في هذه الدراسة و مع عزل PEP و ذلك بعد تدوير الفواكه التي طرحة لتصف *Fuji, Mutua, Gala, Golden Delicious* العزل المتضمن عليها من خلال الأمانس الموسومة و الفاكهة و المينة عند القيع و فوق الأوراق في المسور كانت كافية لفرعية *Koch*. وقد تمنا أيضاً من خلال هذه الدراسة بتطوير أداة للتوسيف تحت على PCR بالتعرف على التثاقبات البكتريولوجية الخاصة و ذلك بمقارنة التوسيفات *http* أن PSS و العديد من *serotype P. syringae pathovar* المتضمنة يمكن من التعرف على عزلها و عزل PEP و هكذا تم تعريف مصطلح جديدة من خلال هذه الدراسة و تمنا الدراسات التي تمنا بها كان بإمكان التأكيد على الأمراض المتضمنة بالمعنا عند التصف *Delfbarestirale* بالمعنى منسوبة من PEP.

الكلمات المفتاحية:

Pseudomonas syringae pv. *syringae*, بكتريا فواكه، قدرة ايرانية، أمانس، *Pseudomonas syringae* pv. *populans*، قدرة الفواكه، قيع موزة *http*، بيانات خاصة، PCR

CHAPITRE I : ETUDE DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* BACTERIE EPIPHYTE PATHOGENE DU POIRIER ET DU POMMIER

1. les bactéries phytopathogènes et les *Pseudomonas*

Les bactéries pathogènes des plantes ont existé, à côté de celles qui sont responsables de maladies chez l'homme et les animaux, sous une forme endémique régulée par un écosystème équilibré. Le transport du matériel végétal, éventuellement facilité ou réalisé par l'activité humaine est probablement le facteur le plus important dans leur propagation et leur dissémination dans l'espace et dans le temps. En effet, le transport de graines, de boutures, de greffons, de fruits et de plantes entières a permis aux bactéries des plantes de changer d'environnement et d'exprimer leur potentiel épidémique.

A la fin du dix-neuvième siècle, plusieurs espèces bactériennes phytopathogènes ont été décrites telles que *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* et celles qui sont actuellement connues sous le nom de *Ralstonia solanacearum*. L'importance économique des maladies bactériennes des plantes a été mise en évidence le plus souvent à la suite de l'intensification de la production agricole, de l'introduction et de l'utilisation de variétés nouvelles sensibles et de changements dans les itinéraires techniques. Plus de 250 espèces de bactéries phytopathogènes sont dénombrées, appartenant aux genres *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Brenneria*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*,

Ralstonia, *Rhodococcus*, *Xanthomonas* et *Xylophilus*, Figure 1

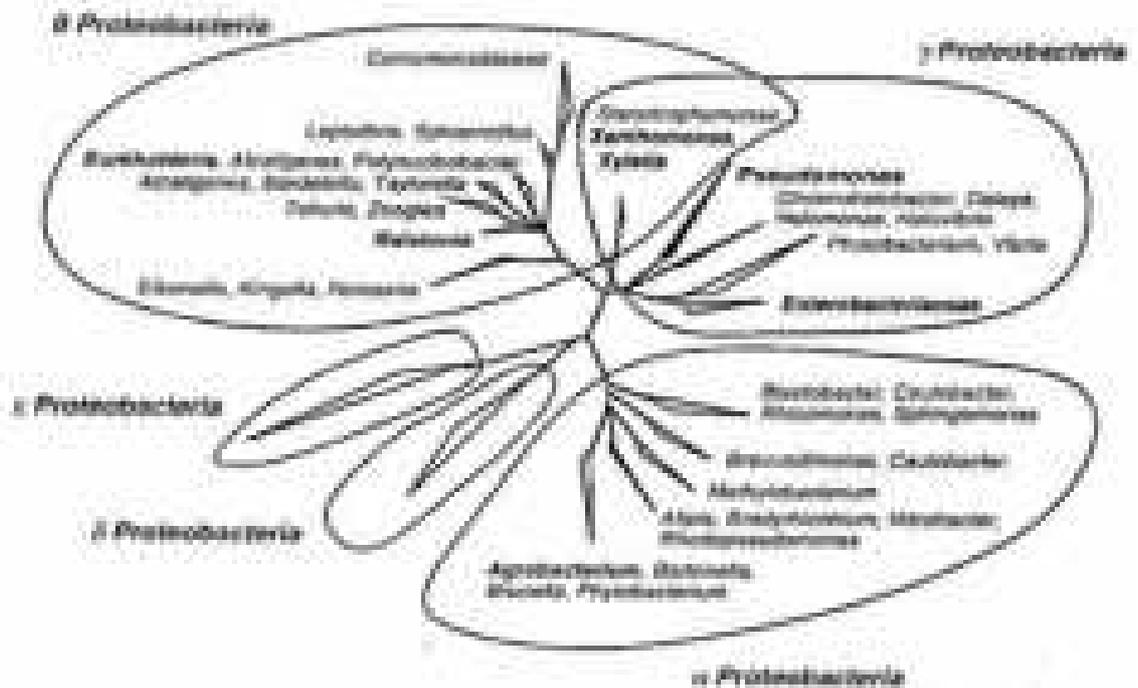


Figure1 : relation phylogénétique entre cinq groupes de protéobactéries et position des bactéries phytopathogènes(Kerstens et al .1996)

2.Le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas*, créé en 1894 par Migula, compte de nombreuses espèces associées à un grand nombre de plantes. Les bactéries de ce genre se présentent comme des colonisateurs de différents milieux : le sol, la rhizosphère, la surface des plantes, les tissus végétaux et l'eau. Il existe également des espèces pathogènes des animaux et de l'homme (Prévot, 1961).

Les *Pseudomonas* appartiennent au groupe des Proteobactéries (Gram négatif non photosynthétiques), à l'ordre des Eubactériales (Buchanan, 1917), à la famille des *Pseudomonadaceae* (Winslow et al., 1917) et à la tribu des *Pseudomonadae* (Kluger et Van Niel, 1936). La famille des *Pseudomonadaceae* est constituée de quatre genres : *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Fraxinella* et *Zoogloea*.

Les éditions 6 et 7 du Bergey's Manual pour la détermination des bactéries (Doudoroff et Palleroni, 1974 ; Palleroni, 1984) ont repris la définition du genre *Pseudomonas* d'après Stanier et al. (1966). Les bactéries de ce genre se présentent sous forme de bâtonnets à Gram négatif, droits ou incurvés, mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires. Elles sont aérobies strictes, chimio-organotrophes, et possèdent une catalase. Les *Pseudomonas* sont caractérisés par un métabolisme exclusivement oxydatif, certaines espèces sont capables de réduction du nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-) ou sous forme gazeuse (N_2) (Palleroni, 1984).

2.1. Révision du genre *Pseudomonas* et redéfinition des espèces

Les études taxonomiques actuelles sur les espèces du genre *Pseudomonas* se basent essentiellement sur les hybridations ADN/ADN et ARNr (Palleroni *et al.*, 1973 ; De Vos et De Ley, 1983 ; Palleroni, 1984; De Vos *et al.*, 1985). Cette approche s'appuie sur le fait que les ARN ribosomiques présentent de fortes contraintes évolutives. Ils présentent une facilité d'hybridation avec l'ADN génomique de différents isolats car les séquences homologues sont très conservées et nombreuses dans le génome. En particulier, l'ARN 16S qui présente des régions très conservées permet la comparaison des bactéries phylogénétiquement éloignées. La présence de régions variables permet de comparer des espèces très proches (Raue *et al.*, 1988).

Tableau 1. Caractères biochimiques du LOPAT chez *Pseudoenonas* fluorescents (d'après Lelliott *et al.*, 1966).

Groupes	Espèces	L	O	P	A	T
Ia	<i>P. syringae</i> , <i>P. Pisi</i> , <i>P. tomato</i>	+	-	-	-	+
Ib	<i>P. savastanoi</i> , <i>P. delphinii</i> , <i>P. papulans</i>	-	-	-	-	+
II	<i>P. viridiflava</i>	-	-	+	-	+/-
III	<i>P. cichorii</i> , <i>P. agarici</i>	-	+	-	-	+
IVa	<i>P. marginalis</i> , <i>P. fluorescens pectinolytique</i>	+	+	+	+	-
IVb	<i>P. fluorescens</i>	-	+	+	+	-
Va	<i>P. talaasii</i> , certains <i>Pseudomonas saprophytes</i>	-	+	-	+	-
Vb	<i>P. fluorescens</i> , certains <i>Pseudomonas saprophytes</i>	+	+	-	+	-

L : Levane

O : cytochrome c oxydase

P: activité pectinolytique

A: argentine dihydrolase

T : hypersensibilité sur tabac

Les études sur l'homologie ARNr/ADN et la comparaison des ARN 16S ont permis de montrer une hétérogénéité génomique importante parmi toutes les bactéries classées *Pseudomonas* en 1984 (Palleroni *et al.*, 1973 ; Willems *et al.*, 1992 ; Kersters *et al.*, 1996).

Le genre *Pseudomonas sensu stricto* se situe dans la branche □ des *Proteobacteria* (figure 1.1)(Kersters *et al.*, 1996). Il est constitué principalement par des espèces fluorescentes et plusieurs espèces non fluorescentes. Ce genre contient des *Pseudomonas* fluorescents ayant une cytochrome c oxydase (ox+) comme *P. cichorii*, *P. marginalis* et *P. tolaasi* (Young *et al.*, 1992) qui sont phytopathogènes et aussi des bactéries non pathogènes des plantes comme *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* et *P. aeruginosa*. Il renferme aussi des espèces fluorescentes phytopathogènes n'ayant pas d'oxydase (ox-) : *P. syringae* et *P. viridiflava*, ainsi que des bactéries non fluorescentes telles que *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* et *P. pseudoalcaligenes* (Kersters *et al.*, 1996).

La définition des espèces, classiquement basée sur la caractérisation phénotypique établie sur l'étude des caractères physiologiques et biochimiques, ne permettait pas l'identification des espèces de *Pseudomonas*. Les travaux de Stanier *et al.* (1966) sur le groupe des bactéries oxydase-positives et de Lelliott *et al.* (1966) sur les oxydase-négatives ont permis un progrès dans la caractérisation. Ainsi le test LOPAT (Lelliott *et al.*, 1966) a

permis de distinguer 5 groupes à l'aide de cinq critères. Il s'agit de la présence de la levane sucrase (L), la cytochrome c oxydase (O), les pectinases (P) et l'arginine dihydrolase (A) ainsi que le développement de réaction d'hypersensibilité sur tabac (T) (Klement, 1963). Dans le groupe LOPAT 1, on trouvait : *P. syringae*, *P. pisi*, *P. tomato*, *P. papulans*, *P. morsprunorum* par exemple (Tableau1 1).

L'hybridation ADN/ADN permet de mesurer les homologies entre génomes entiers. Les degrés d'homologie obtenus sont donc très peu affectés par les insertions, les mutations ou les délétions des séquences d'ADN de petites tailles (Johnson, 1984). Les études menées sur l'hybridation ADN/ADN ont révélé une redistribution des individus d'un même groupe

Tableau 2. Nouvelle classification des espèces bactériennes anciennement dénommées *Pseudomonas*.

**CHAPITRE I : ETUDE DE PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. SYRINGAE BACTERIE EPIPHYTE
PATHOGENE DU POIRIER ET DU POMMIER**

Groupes d'homologie ADN/ARNr	Anciens noms des espèces	Nom de genre actuels
	<i>P. aeruginosa</i>	
	<i>P. aureofaciens</i>	
	<i>P. agarici</i>	
	<i>P. alcaligenes</i>	
	<i>P. asplenii</i>	
	<i>P. capricapapaye</i>	
	<i>P. chlororaphis</i>	
	<i>P. cichorii</i>	
	<i>P. corrugata</i>	
Groupe I	<i>P. fluorescens</i> bv.	Pseudomonas
	<i>P. fuscovagina</i>	
	<i>P. marginalis</i>	
	<i>P. mendocina</i>	
	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	
	<i>P. putida</i> bv.	
	<i>P. syringae</i> pv.	
	<i>P. stutzeri</i>	
	<i>P. tolaasii</i>	
	<i>P. viridiflava</i>	
	<i>P. washingtoniae</i>	
	<i>P. andropogonis</i>	
	<i>P. caryophylli</i> , <i>P. Cepacia</i>	
	<i>P. gladioli</i>	
Groupe II	<i>P. glumae</i>	Burkholderia
	<i>P. mallei</i>	
	<i>P. picketti</i>	
	<i>P. pseudomallei</i>	
	<i>P. rubrisubalbicans</i>	
	<i>P. woodsii</i>	
	<i>P. solanacearum</i>	<i>Ralstonia</i>
	<i>P. delafieldii</i>	<i>Acidovorax</i>
	<i>P. facilis</i>	
	<i>P. acidovorans</i>	Comamonas
Groupe III	<i>P. testosteroni</i>	
	<i>P. flava</i>	
	<i>P. palleronii</i>	<i>Hydrogenophaga</i>
	<i>P. pseudoflava</i>	
	<i>P. saccharophila</i>	
	<i>P. diminuta</i>	
Groupe IV	<i>P. vesicularis</i>	<i>Brevundimonas</i>
	<i>P. betle</i>	
	<i>P. gardneri</i>	<i>Xanthomonas</i>
	<i>P. hibiscola</i> = <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
Groupe V	<i>P. maltophilia</i> = <i>Stenotrophomonas</i>	
	<i>P. mangiferaeindicae</i> = <i>Stenotrophomonas</i>	

Les groupes d'homologie ADN/ARNr mentionnés sont ceux définis par Palleroni en 1984. Le genre *Pseudomonas* au sens strict ne correspond plus qu'au groupe I. La liste des espèces mentionnées est non exhaustive (De Vos *et al.*, 1989 ; Palleroni, 1992).

Références : Burkholderia : Yabuuchi *et al.*, 1992 , Brevundimonas : Segers *et al.*, 1994, Xanthomonas : Swings *et al.*, 1983 ; Van den Mooter et Swings, 1990, Acidovorax, Comamonas et Hydrogenophaga appartiennent à la famille des Comamonadaceae : Willems *et al.*, 1991

ARNr/ADN en plusieurs sous-groupes (Palleroni *et al.*, 1973). A leur suite, un certain nombre d'auteurs ont fait progresser la définition des espèces chez les *Pseudomonas*.

2.2. Les *Pseudomonas* du groupe LOPAT 1

2.2.1. *P. syringae* : fusion en une seule espèce subdivisée en pathovars

La taxonomie de *Pseudomonas syringae* et des bactéries phytopathogènes qui lui sont proches a évolué suite à un long débat au cours des années passées (Young *et al.*, 1992).

Young *et al.* (1978) rapporte que compte tenu des exigences du code de nomenclature, Skerman, dans l'élaboration de la liste approuvée prévue pour 1980, menaçait de ne pas reconnaître les 45 espèces du groupe LOPAT 1(a et b) décrit par Lelliott *et al.* (1966). Dans sa conclusion, cet auteur argue qu'il faut des caractères biochimiques différents pour permettre de distinguer les espèces les unes des autres. Young *et al.* (1978) puis Dye *et al.* (1980) ont proposé de créer une subdivision en pathovars pour accueillir toutes ces bactéries dont la distinction était nécessaire aux phytopathologistes. Ainsi chacune des espèces du groupe 1 (a et b) défini antérieurement par Lelliott *et al.* (1966) a été renommée en pathovars d'une seule espèce *P. syringae*. Cette définition est entérinée en 1984 par le Bergey's Manual de la systématique bactérienne et reprise en 1986 par Bradbury dans le guide des bactéries phytopathogènes.

L'espèce *P. syringae* compterait ainsi 50 pathovars définis en fonction de leur capacité à produire un type de symptôme sur une plante donnée. Schaad (1982), soutient que le pouvoir pathogène doit être un critère majeur dans la classification et la définition d'une sous-espèce, en partant du principe que le pouvoir pathogène est un caractère dépendant directement ou indirectement d'un grand nombre de gènes du génome bactérien.

Le pouvoir pathogène et le spectre d'hôtes peuvent varier considérablement d'un pathovar à un autre. Certains pathovars sont spécifiques d'une seule espèce végétale, comme le pathovar *persicae* sur pêcher, le pathovar *pisi* sur pois et le pathovar *phaseolicola* sur haricot. Alors que d'autres sont signalés sur un grand nombre de plantes comme le pathovar *syringae* qui a été isolé de 177 espèces végétales différentes. Les inoculations artificielles sur une gamme de 133

plantes ligneuses, par l'utilisation d'une souche de *P. syringae* pv. *syringae* isolée du Lilas, ont permis de reproduire des symptômes sur 74 d'entre elles (Kagiwata *et al.*, 1990). Gross *et al.* (1984) avaient avancé l'hypothèse que *P. s.* pv. *syringae* est un assemblage de groupes de souches caractérisés par un spectre d'hôte bien défini. L'hétérogénéité observée aussi bien au niveau du spectre d'hôtes qu'au niveau des variétés des symptômes induits a une origine historique. En effet, les difficultés rencontrées dans le classement des *Pseudomonas* pathogènes des plantes au sein des autres pathovars ont été le précurseur de leur assimilation à *P. s.* pv. *syringae*. En revanche, le pouvoir pathogène sur l'hôte commun (Lilas) n'a pas été reproduit pour toutes les souches (Young, 1991). Les résultats

obtenus par Yessad (1992) lors des test du pouvoir pathogène de *P. s. pv. syringae* montrent la présence de souches non pathogènes sur l'hôte d'origine. De nombreux travaux signalent également qu'une grande proportion de souches de *P. syringae* isolées d'un hôte donné ne sont pas pathogènes sur cet hôte (Gross *et al.*, 1983, Hirano *et al.*, 1983 ; Lindemann *et al.*, 1984).

2.2.2. Eclatement du groupe *P. syringae* en espèces génomiques

L'espèce est définie par rapport aux similitudes structurales, morphologiques, métaboliques, biochimiques et génétiques qui existent entre un ensemble de souches (Young *et al.*, 1992). Les nouvelles approches qui s'appuient sur les techniques moléculaires ont permis d'établir une définition génomique de l'espèce par l'utilisation de l'hybridation ADN/ADN comme technique de référence (Stackebrandt *et al.*, 1988). Deux bactéries appartiennent à la même espèce génomique quand le pourcentage de réhybridation de leur ADN est supérieur ou égal à 70% et quand les températures de dénaturation de leur génome (*T_m*) ne diffèrent pas plus de 5°C (Wayne *et al.*, 1987).

A l'aide de l'hybridation ADN/ADN effectuée sur 56 souches représentant 20 espèces de *Pseudomonas* fluorescents, quatre groupes ont été clairement définis. *P. cichorii* et *P. viridiflava* constituent respectivement deux groupes différents. Les deux autres groupes rassemblent différents pathovars actuels de *P. syringae* (Pecknold et Grogan, 1973).

Les travaux de Palleroni *et al.* (1973) et Palleroni (1984) ont permis la mise à jour de 5 groupes d'homologie, dont le groupe I renferme les différents pathovars de *P. syringae*. Ainsi, les différents pathovars de *syringae* se trouvent associés au sein du même groupe ADN/ADN

Tableau 3. Répartition des espèces de *Pseudomonas* et de pathovars de *P. syringae* dans les espèces génomiques définies par Gardan *et al.*, (1999). Hôtes d'isolement des souches de références pour les divers pathovars de *P. syringae* (Glickman, 1996).

Etude des pathovars de *Pseudomonas syringae* epiphytes et pathogène du Poirier et du Pommier

Nom (pathovars ou espèces)	Hôte commun (nom français)	Symptômes de la maladie
Genospecies 1 : <i>P. syringae</i>		
<i>P. s. pv. syringae</i>	<i>Syringa vulgaris</i> (lilas)	variés : taches foliaire, etc...
<i>P. s. pv. aptata</i>	<i>Beta vulgaris</i> (betterave)	taches nécrotiques sur feuilles
<i>P. s. pv. aceris</i>	<i>Acer sp.</i> (érable)	taches foliaires
<i>P. s. pv. atrofaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i> (blé)	taches et pourritures des tiges
<i>P. s. pv. dysoxyli</i>	<i>Dysoxylum spectabile</i> (arbre famille meliacéae)	taches foliaires lésions sur tiges
<i>P. s. pv. japonica</i>	<i>Hordeum vulgare</i> (orge)	zébrures et nœuds
<i>P. s. pv. lapsa</i>	<i>Triticum aestivum</i> (blé)	pourritures des tiges
<i>P. s. pv. panici</i>	<i>Panicum sp.</i> (panic, graminée)	stries foliaires
<i>P. s. pv. papulans</i>	<i>Malus sylvestris</i> (pommier)	taches foliaires et chancre (fruits et branches)
<i>P. s. pv. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i> (pois)	taches humides et brunes
Genospecies 2		
<i>P. s. pv. savastanoi</i>	<i>Olea europea</i> (olivier)	tumeurs
<i>P. s. pv. aesculi</i>	<i>Aesculus indica</i> (marronnier)	taches foliaires
<i>P. s. pv. ciccaronei</i>	<i>Ceratonia siliqua</i> (caroubier)	taches nécrotiques sur feuilles
<i>P. s. pv. dendropanacis</i>	<i>Dendropanax trifidus</i> (arbre ornamental)	galles sur tronc et rameaux
<i>P. s. pv. eriobotryae</i>	<i>Eriobotrya japonica</i> (famille des rosaceae)	dessèchement des bourgeons, chancres
<i>P. s. pv. glycinea</i>	<i>Glycine max</i> (soja)	dessèchement
<i>P. s. pv. hibisci</i>	<i>Hibiscus japonica</i> (hibiscus)	
<i>P. s. pv. lachrymans</i>	<i>Cucumis sativus</i> (concombre)	nécroses sur fruits avec exsudats
<i>P. s. pv. mellea</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabac)	petites taches foliaires rousses
<i>P. s. pv. mori</i>	<i>Morus alba</i> (mûrier)	taches foliaires, chancre sur bois
<i>P. s. pv. morsprunorum</i>	<i>Prunus domestica</i> (prunier)	chancre sur les troncs
<i>P. s. pv. myricae</i>	<i>Myrica rubra</i> (myrica, arbuste)	tumeurs
<i>P. s. pv. phaseolicola</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (haricot)	taches huileuses avec halo
<i>P. s. pv. photiniae</i>	<i>Photinia glabra</i> (famille des rosaceae)	taches foliaires, dessèchement des jeunes tiges
<i>P. s. pv. sesami</i>	<i>Sesamum indicum</i> (sésame)	taches foliaires
<i>P. s. pv. tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabac)	taches nécrotiques avec halo
<i>P. s. pv. ulmi</i>	<i>Ulmus sp.</i> (orme)	taches sur feuilles et tiges
<i>P. amygdali</i>	<i>Prunus amygdalis</i> (amandier)	chancres avec boursoufflures sur branches
<i>P. ficuserectae</i>	<i>Ficus erecta</i> (figuier)	taches foliaires, dessèchement des tiges
<i>P. meliae</i>	<i>Melia azedarach</i> (arbre, famille des meliaceae)	tumeurs
Genospecies 3		
<i>P. s. pv. tomato</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	taches brunes avec halo jaune
<i>P. s. pv. antirrhini</i>	<i>Antirrhinum majus</i> (muflier)	taches marrons et lésions sur tiges
<i>P. s. pv. apii</i>	<i>Apium graveolens</i> (céleri)	taches foliaires et parfois le pétiole
10 <i>P. s. pv. berberidis</i>	<i>Berberis sp.</i> (épine-vinette)	taches foliaires grasses noirâtres avec halo
<i>P. s. pv. delphinii</i>	<i>Delphinium sp.</i> (pied d'alouette)	taches noires sur feuilles, fleurs, bourgeons
<i>P. s. pv. maculicola</i>	<i>Brassica oleracea</i> (chou potager)	nombreuses petites taches foliaires noires
<i>P. s. pv. passiflorae</i>	<i>Passiflora edulis</i> (passiflore)	taches nécrotiques (feuille, tige, fruits)

avec *P. cichorii*, *P. agarici*, *P. viridiflava* et *P. asplenii* (Tableau 1.2). Johnson et Palleroni (1989), par l'élargissement de l'hybridation ADN/ADN à un grand nombre d'espèces, montrent que les espèces du genre *Pseudomonas* n'ont que peu d'homologie entre elles, ce qu'ils attribuent au caractère ubiquiste des *Pseudomonas*.

Denny *et al.* (1988) ont montré que *P. s. pv. tomato* formait un groupe d'hybridation distinct de celui de la souche type de *P. syringae*. En effet, le pathovar *tomato* s'hybride faiblement avec le pathovar *syringae* (37 à 47%). Les souches de *P. s. pv. savastanoi* isolées à partir de différents hôtes forment un groupe ADN distinct de *P. syringae* au sens strict. Ils constituent donc une espèce à part appelée *P. savastanoi* (Gardan *et al.*, 1992) avec le pathovar *phaseolicola* et le pathovar *glycinea*. Des études polyphasiques récentes incluant des hybridations ADN/ADN ont reclassé *P. s. pv. avellanae* comme *P. avellanae* (Janse *et al.*, 1996).

Des travaux récents d'hybridation ADN/ADN entrepris sur les *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes, et en particulier sur les pathovars de *P. syringae*, ont permis d'identifier neuf espèces génomiques différentes dont la sixième est constituée par *P. viridiflava* (Shafik, 1994 ; Gardan *et al.*, 1999). Le tableau 1.3 illustre la répartition des différents pathovars de *P. syringae* à l'intérieur des 9 espèces génomiques :

- l'espèce génomique 1 “ *P. syringae* ”
- l'espèce génomique 2 “ *P. savastanoi* ”
- l'espèce génomique 3 “ *P. tomato* ”
- l'espèce génomique 4 “ *P. porri* ”
- l'espèce génomique 5 “ *P. tremae* ”
- l'espèce génomique 6 “ *P. viridiflava* ”
- l'espèce génomique 7 “ *P. helianthi* ”
- l'espèce génomique 8 “ *P. avellanae* ”
- l'espèce génomique 9 “ *P. cannabina* ”

Espèce génomique	Hostes	Groupe LORNT	Lentis	Cytob	Protein	Arginin	Tétra	nitrobl	nitrobl	nitrobl	L-arab	D-xylos	D-L-arab	inchaos	polyctat	polyctat	R
1	<i>P. syringae</i> pv. <i>psa</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+
1	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+
1	<i>P. syringae</i> pv. <i>papaosa</i>	1b	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+
2	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinis</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	.
2	<i>P. syringae</i> pv. <i>nicotianae</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	.
2	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	.
2	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	1b	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	.
2	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+
3	<i>P. syringae</i> pv. <i>delphinii</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	.
3	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	.
6	<i>P. viridiflava</i>	1b	.	.	+	.	+	+	+	+	.	+	+	.	.	.	+
7	<i>P. syringae</i> pv. <i>heliconiae</i>	1a	+	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	.
	<i>P. cichorii</i>	1b	.	+	.	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+
	<i>P. fluorescens</i>	1b	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+
	<i>P. fluorescens</i>	1b	+	+	.	+	.	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.
	<i>P. putida</i>	1b	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.

V : réaction variable
 Espèces génomiques d'après Gardan *et al.* (1999)
 Caractères d'après Lelliott *et al.* (1966) et Pfaller *et al.* (1973)

Tableau 4. Principaux caractères biochimiques de quelques *Pseudomonas* fluorescents

Désormais *P. syringae* pv. *syringae* (PSS) appartient à l'espèce génomique 1 (Gardan *et al.*, 1999), au groupe I d'ARNr (Palleroni *et al.*, 1973), au groupe 1a (Lelliott *et al.*, 1966) (Tableau 1.4) et à la branche □ des Proteobactéries (Stackebrand *et al.*, 1988).

3. Caractéristiques des pathovars de *Pseudomonas syringae*

3.1. Caractères sérologiques

Les bactéries sont caractérisées par la présence de deux types d'antigènes externes : les antigènes O et les antigènes H. Ces derniers sont situés au niveau des flagelles. Chez les *P. syringae*, il existe deux types de flagelles: le type H1 et le type H2 (Guillorit-Rondeau *et al.*, 1996). Malandrin et Samson (1999) ont montré que les types flagellaires séparent les *Pseudomonas* phytopathogènes en deux grands groupes d'espèces génomiques (Gardan *et al.*, 1999) : le premier constitué par les espèces génomiques 1, 4 et 7 dont tous les pathovars présentent des flagelles H1 et le deuxième renfermant les espèces génomiques 2, 3, 6, 8, et 9 dont tous les pathovars présentent des flagelles H2.

Les antigènes O sont d'origine somatique et sont portés par la paroi bactérienne. Ils sont situés sur les chaînes polysaccharidiques du LPS (Lipopolysaccharide) (Guillorit et Samson, 1993).

Après les huit sérogroupes O décrits par Samson et Saunier en 1987, 23 ont été définis dans les travaux sur le groupe des *P. syringae* - *P. viridiflava*, par Saunier *et al.* (1996). Les

sérogroupe sont obtenus par un profil de réaction de souches testées en immunodiffusion avec une série de sérums dérivant des références sérologiques définies par Samson *et al.* (1987) (tableau 1.5).

La sérologie permet de montrer une certaine variabilité au sein de l'espèce *Pseudomonas syringae*. L'utilisation de différentes techniques sérologiques révèle une grande hétérogénéité de PSS, dont les souches testées se répartissent dans différents sérogroupe. La souche type CFBP 1392 de PSS appartient au sérogroupe PERSAVTOM1 (Samson et Saunier, 1987).

3.2. Conditions d'infection

PSS, agent de dessèchement bactérien, possède un cycle biologique caractérisé par deux phases successives : une phase parasitaire et une phase épiphyte. La manifestation parasitaire de

N° CFBP	pathovars	Sérums P ¹												sérogroupe-O		
		250 254	113 254	103 192	206	223	224 222	206	207 205	147 205	196	203	132			
1390	phacelivora	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PER
1450	monosyringae	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MOPI
2111	monosyringae	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MOPI
2004	monosyringae	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MOPI
1752	silvestrii	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	REL1
2149	silvestrii	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	REL2
802	syringae	-	-	-	++	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	ITBI
1417	spica	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	APPEI
2100	spica	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	APPEI
2106	silva	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	TAB
1470	savastanoi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	PERSAVTOM1
2015	delphinii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	DEL
1452	syringae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	ITBI

++ identité totale, ++ identité réactionnelle, ++ identité partielle

Tableau 5. Réactions en immunodiffusion définissant 12 sérogroupe-O parmi des pathovars de *P. syringae* et *P. savastanoi*

(D'après Saunier et al., 1996)

PSS est fortement conditionnée par les facteurs de l'environnement, les niveaux de l'inoculum, et la disponibilité des voies de pénétration (Lindemann *et al.*, 1984 ; Wimalajeewa et Flett, 1985 ; Rouse *et al.*, 1985 ; Hirano *et al.*, 1988 ; Hirano et Upper, 1990).

· Pénétration

Les investigations menées pour déterminer les voies empruntées par les bactéries pour s'introduire dans les tissus ont permis de dégager plusieurs possibilités : les naturelles (stomates, lenticelles, trichomes) (Crosse, 1966), les lésions naturelles (plaies pétiolaires et pédonculaires) (Vigouroux, 1970 ; Luisetti *et al.*, 1984), ou à travers une blessure (la taille, la grêle, la gelée, les insectes...) (Panagopoulos et Crosse, 1964; Samson *et al.*, 1988). Mansvelt et Hattingh (1987 a et b) ont montré que les bactéries pénètrent dans les tissus après s'être multipliées à la surface des feuilles de Poirier par la base ouverte des trichomes et par les fissures microscopiques présentes dans les dépressions de la couche cuticulaire.

· Facteurs climatiques et infection

L'apparition des symptômes est tributaire des facteurs climatiques tels que la température et l'humidité relative. Young, (1991) a montré que la température optimale favorable à

l'expression des symptômes de PSS sur Lilas au laboratoire est de 25°C. Calzolari *et al.* (1992) rapportent que la multiplication bactérienne et la manifestation des symptômes sont favorisées par une température de 12 à 15°C. Les températures négatives peuvent aussi intervenir sur le développement des maladies bactériennes des plantes, soit en créant des conditions favorables à la pénétration, soit en augmentant la sensibilité des tissus de la plante hôte. Une température inférieure à 0°C intervient comme élément déterminant dans le processus du pouvoir glaçogène de PSS (Lindow, 1983). Luisetti et Paulin (1972) ont constaté sur Poirier, que les infections graves de PSS sont engendrées toujours après des gelées printanières tardives, cette particularité étant liée au caractère glaçogène de nombreux *P. syringae*.

Au même titre que la température, l'humidité relative semble être indispensable au déclenchement de la phase parasitaire. Une humidité relative élevée crée un film d'eau à la surface des organes de la plante et permet aux bactéries de se diriger vers les sites de

pénétration. Elle favorise aussi leur dispersion et l'infection (Crosse, 1963 ; Panagopoulos et Crosse, 1964 ; Leben, 1988 ; Hattings *et al.*, 1989).

3.3. Composantes du pouvoir pathogène

Pour comprendre les phénomènes de la pathogénèse des bactéries épiphytes, il faut définir les interactions bactérie/plante à la surface de la plante, puis dans l'espace intercellulaire. Les bactéries épiphytes, pendant leur survie et leur multiplication à la surface des organes végétaux, peuvent utiliser des nutriments organiques ou/et inorganiques qui sont exsudés par les cellules épidermiques. Cette phase est définie comme une interaction passive puisqu'elle n'engendre aucune influence perceptible sur les cellules végétales. L'interaction réelle entre les cellules bactériennes et les cellules végétales s'observe à partir du moment où la bactérie se trouve dans l'espace intercellulaire ou dans le système vasculaire.

PSS, comme la majorité des bactéries phytopathogènes nécrogènes, se multiplie et colonise l'apoplaste des cellules de la plante hôte (Rudolph *et al.*, 1989 ; Gopalan et He, 1996). L'interaction se fait par l'intermédiaire de signaux moléculaires qui franchissent la paroi de la cellule végétale. Une fois dans les tissus, les bactéries phytopathogènes établissent un contact physique avec les cellules de la plante, en adhérant à la surface cellulaire dans l'espace intercellulaire pour établir un contact qui diffère suivant la situation :

- En situation compatible (virulence / sensibilité), la bactérie se multiplie, colonise l'espace intercellulaire et progresse dans les tissus de l'hôte.
- En situation incompatible (avirulence / résistance ou sensibilité; virulence / résistance ou / non-hôte), la bactérie déclenche le phénomène d'hypersensibilité : apparition d'une nécrose localisée au point d'infection (mécanismes de défense des plantes) (Klement et Goodman, 1967a et b).

Facteurs de la pathogénèse de *P. syringae* pv. *syringae*

Le développement de la maladie chez une plante est l'expression simultanée des produits géniques de la pathogénèse induits par la bactérie et de la répression des gènes de résistance dans la plante. Cette combinaison assure la compatibilité et les conditions pour une rapide

multiplication avec une forte activité métabolique qui permet à la bactérie de coloniser les tissus de la plante.

**CHAPITRE I : ETUDE DE PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. SYRINGAE BACTERIE EPIPHYTE
PATHOGENE DU POIRIER ET DU POMMIER**

L'utilisation de mutants altérés au niveau des fonctions supposées intervenir dans le pouvoir pathogène et de mutants altérés dans le pouvoir pathogène sans a priori sur les fonctions touchées, a permis de mettre en évidence le rôle des différents facteurs intervenant dans les mécanismes de pathogénèse (Keen et Stasckawicz, 1988).

· Production de phytotoxines

Les métabolites bactériens considérés comme des toxines sont ceux qui possèdent la faculté d'induire un effet toxique à faible concentration directement sur la cellule hôte (Graniti; 1972). La plupart des toxines décrites chez les bactéries phytopathogènes appartiennent au genre *Pseudomonas* (Tableau I.6).

Tableau 6 : Les phytotoxines produites par les *Pseudomonas* (d'après Bender *et al.*, 1999)

Toxine	Organismes producteurs	Classe chimique ou origine biosynthétique
Coronatine	<i>P.syringae</i> pv. <i>atropurpurea</i> , <i>glycinea</i> , <i>maculicola</i> , <i>morsprunorum</i> , <i>tomato</i>	polypeptide
Corpeptine	<i>P. corrugata</i>	Lipodepsipeptide
Fuscopeptine	<i>P. fuscovaginae</i>	Lipodepsipeptide
Persicomycines	<i>P. syringae</i> pv. <i>persicae</i>	Acide gras
Phaseolotoxine	<i>P.syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> , <i>phaseolicola</i>	Sulfodiaminophosphinyl peptide
Rhizobitoxine	<i>P. andropogonis</i>	Vinylglycine
Syngomycines ^a	<i>P. syringae</i> pvs. <i>syringae</i> , <i>aptata</i> , <i>atrofaciens</i> <i>P. fuscovaginae</i>	Lipodepsinonapeptide
Syngopeptines	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Lipodepsipeptide
Tabtoxine	<i>P. syringae</i> pvs. <i>tabaci</i> , <i>coronafaciens</i> , <i>garcae</i>	B-lactame
Tagetitoxine	<i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	Inconnu
Tolaasine	<i>P. tolaasii</i>	Lipodepsipeptide
Viscosine	<i>P. marginalis</i> (<i>P. fluorescens</i>)	Lipodepsipeptide

Dans les syngomycines sont inclus la syngotoxine, la syngostatine et la pseudomycine

La majeure partie des souches de PSS produisent des syngomycines composées de trois types de toxines (pseudomycine, syngotoxine et syngostatine).

Les syngomycines sont des phytotoxines de la classe des lipopsinonapeptides cycliques composés par un peptide polaire et une terminaison constituée d'acide gras (3-hydroxy) hydrophobe (Segre *et al.*, 1989 ; Fukuchi *et al.*, 1992). Trois formes de syngomycines sont produites. Elles diffèrent uniquement par la longueur de leur acide gras terminal (acide decanoïque, acide dodecanoïque et l'acide tétradecanoïque). La syngotoxine et la syngostatine sont des lipopsinonapeptides produits par des souches isolées respectivement de *Citrus* et du Lilas (Fukuchi *et al.*, 1992 ; Ballio *et al.*, 1994). Les syngomycines sont de faible poids moléculaire. Les gènes responsables de leur production (gènes *syr*) correspondent à un fragment d'environ de 7 kb situé sur le chromosome bactérien (Zhang *et al.*, 1995).

Les toxines sont produites par un nombre de souches isolées d'hôtes variés. Elles perturbent les fonctions physiologiques de l'hôte localisées au sein des membranes

plasmiques des cellules hôtes et induisent des nécroses des tissus des plantes (Gross et Cody, 1985). Ziegler *et al.* (1994) ont démontré que les syringotoxines ont la capacité de dépolariser la membrane lipidique en induisant la formation de canaux ioniques au niveau de la membrane plasmique de la cellule végétale. Hutchison *et al.* (1995) rapportent que la structure lipopeptidique des syringomycines leur permet de s'insérer entre les bicouches lipidiques des membranes pour former des pores qui sont très perméables aux cations. L'insertion de ces toxines dans la membrane plasmique de la cellule végétale provoque des interférences dans le transport des ions au travers des plasmalèmes. Ceci se traduit par la production d'une hyperpolarisation de la membrane, avec une rapide sortie des ions K^+ , ainsi que la stimulation de la pompe à protons de l'ATPase qui semble être due à l'activation d'une protéine-kinase, provoquant la phosphorylation des protéines de la membrane. Cette situation au niveau de la membrane est similaire à celle qui se produit dans le cas d'une réaction d'hypersensibilité (Ziegler *et al.*, 1994).

Il semble que la syringomycine intervienne dans le développement de la pathogénèse provoquant la sortie de potassium de la cellule végétale neutralisant le pH acide de l'espace intercellulaire. Cette interaction induit l'accumulation de saccharose, d'acides aminés et d'ions inorganiques dans l'espace intercellulaire, qui sont utilisés par le pathogène comme nutriments,

créant ainsi un environnement favorable pour la multiplication bactérienne (Gross, 1991 ; Che *et al.*, 1992).

L'obtention de symptômes par l'inoculation de souches de PSS non productrice de syringotoxine (tox-) et l'incapacité d'un mutant PSS hrp-, tox+ à induire la maladie suggère que les toxines constituent une composante importante du pouvoir pathogène, mais non essentielle (Yessad, 1992).

· Production de protéines glaçogènes

PSS possède la capacité d'initier la prise en glace de l'eau à des températures négatives proches de 0 °C (-5 à -1), alors que l'eau ultra pure ne se cristallise qu'à partir de -40 °C. Cette caractéristique est restreinte à quelques bactéries associées aux végétaux : certains pathovars de *P. syringae*, *Pseudomonas fluorescens* et *Erwinia (Pantoea) herbicola* (Lindow, 1983 ; Lindow *et al.*, 1985, 1987, 1988 ; Andersen, 1991).

La capacité de catalyser la formation de cristaux de glace joue un rôle important dans le pouvoir pathogène. En effet, les cristaux de glace formés sur la surface des plantes engendrent des microlésions qui constituent des voies de pénétration pour les bactéries ainsi que l'initiation de gelée qui peut provoquer des dégâts très graves. Les travaux réalisés sur la présence des bactéries glaçogènes et le degré des dégâts du gel montrent l'existence d'une corrélation positive entre ces deux éléments (Lindow, 1983). La température tolérée par les feuilles et les fleurs d'une plante est inversement proportionnelle au logarithme du niveau de population des bactéries glaçogènes (Lindow *et al.*, 1978 ; Hirano *et al.*, 1985).

Des bactéries responsables de la rupture de la surfusion de l'eau ont été isolées de presque toutes les plantes (herbacées, ligneuses et ornementales). Panagopoulos et Crosse (1964) ont observé que les bourgeons de Poirier gèlent à des températures situées entre -5 et -2 °C. Montesinos et Vilardell (1991) ont constaté que les boutons floraux de Poirier durant la dormance hivernale, gèlent à des températures variant de -2,7 à -6 °C en fonction de la taille de la population de *P. syringae* présente sur et dans le bouton. Luisetti *et al.* (1991) ont aussi montré que les dégâts du gel sur vigne sont associés à la présence de population de *P. syringae* pv. *syringae* dans les bourgeons de vigne.

L'aptitude de *P. syringae* pv. *syringae* à induire la rupture de la surfusion de l'eau est due à la présence d'une protéine pariétale de 120 kD, composée de plusieurs séquences répétées d'acides aminés. Cette propriété est codée par un fragment porté par le chromosome, d'environ de 3,5 à 4,5 kb (gène *Ice*) (Orser *et al.*, 1983 et 1985).

· Production de pyoverdines

La production de pigments fluorescents est une caractéristique taxonomique des *Pseudomonas* fluorescents. Chez PSS, ces pigments sont des pyoverdines. Leur mise en évidence se fait sur milieu B de King, riche en phosphate et en peptone mais pauvre en fer (King *et al.*, 1954).

Les pigments fluorescents produits par *P. syringae* lui permettent de capter le fer ferrique du milieu ambiant afin de le réduire et l'utiliser dans son activité métabolique ; ils sont donc des sidérophores. Les pyoverdines sont en effet des chélateurs puissants du fer (Orser *et al.*, 1983 ; Lindow, 1982). Cody et Gross (1987a et b) ont montré que sur milieu pauvre en fer, PSS synthétise neuf protéines de poids moléculaire compris entre 74 et 80 kD. Ces protéines sont absentes chez les PSS mutés dans la production de pyoverdines..

La mobilisation du fer par ces sidérophores et son transfert dans l'espace intercellulaire souligne le rôle que peut jouer ce facteur dans l'expression du pouvoir pathogène de la bactérie, compte tenu de l'importance du fer dans le métabolisme de la cellule bactérienne. En effet, Rudolph *et al.* (1994) rapportent que la présence de ces substances contribue à la création de conditions favorables pour la prolifération et l'extension de la bactérie dans l'espace intercellulaire.

· Production d'exopolysaccharides

Les polysaccharides produits par les bactéries à Gram négatif se trouvent associés étroitement à la bactérie sous forme d'une capsule (CPS) ou relâchés dans le milieu, d'où le nom d'exopolysaccharides (EPS). L'agressivité de certaines bactéries phytopathogènes est conditionnée par la production de polysaccharides. De nombreux travaux sur les EPS montrent

leur implication dans l'inter-action plante/bactérie. De par sa structure hydratée, l'EPS possède d'abord un rôle protecteur, prévenant la dessiccation des bactéries. Il bloque aussi l'accès de molécules comme les agglutinines (Panagopoulos *et al.*, 1984). Il intervient dans le maintien des nutriments à proximité de la bactérie en assurant un micro-environnement favorable lors de l'infection et de l'occupation de l'espace intercellulaire (Leigh et Coplin, 1992). Il peut être à l'origine du symptôme de flétrissement des plantes, par obstruction des vaisseaux conducteurs dans le cas de bactéries vasculaires systémiques (*R. solanacearum*) (Leigh et Coplin, 1992).

Les *Pseudomonas* produisent généralement deux types de polymères : le levane et l'alginate (Fett *et al.*, 1989 ; Fialho *et al.*, 1990). Kasapsis *et al.* (1994) suggèrent que le levane produit par *P. syringae* pv. *phaseolicola* aurait pour rôle d'empêcher la reconnaissance du pathogène par la plante en évitant la mise en contact direct des cellules de la bactérie et de la plante.

L'exopolysaccharide est responsable de la formation du symptôme de la tache aqueuse " water soaking ", caractéristique des étapes précoces de l'interaction compatible chez différents *Pseudomonas* (Rudolph *et al.*, 1989) et chez les bactéries nécrogènes en général. Fett et Dunn (1989) ont montré que les souches de différents pathovars de *Pseudomonas syringae* induisant le " water soaking " sur leurs hôtes produisent de l'EPS

sous forme d'acide alginique. En revanche, les souches n'induisant pas de taches aqueuses synthétisent de très faibles quantités d'acide alginique (à l'état de trace).

· Les enzymes

Les enzymes constituent le facteur de pathogénèse le plus étudié. Les bactéries phytopathogènes produisent des enzymes extracellulaires qui dégradent les composants des parois des cellules végétales. Parmi ces enzymes, on trouve des pectinases, des cellulases, des hemicellulases, des amylases, des phospholipases et des protéases. Hildebrand (1971) a noté que peu de pathovars de *P. syringae* produisent des enzymes pectolytiques, parmi ceux-ci on note les pathovars *tabaci*, *lachrymans*, *sesami*, et *mori*. dans le cas de PSS, des xylanases sont produites. Ces enzymes sont capables de dégrader le xylane (Fahy et Lloyd, 1983), cependant leur rôle dans le pouvoir pathogène n'a pas été étudié. Magro *et al.* (1994) ont mis en évidence la présence d'enzymes pectolytiques (polygalacturonase et pectate lyase) chez *P. s.pv.*

glycinea et ils suggère l'implication des ces enzymes dans le pouvoir pathogène par l'occupation et le développement du pathogène dans l'espace intercellulaire.

3.4. Les gènes d'hypersensibilité et d'avirulence

Le pouvoir pathogène des bactéries est composé par un ensemble de facteurs qui régissent l'expression de la virulence (facteur qualitatif) et de l'agressivité (facteur quantitatif). Il est associé au déploiement de moyens biochimiques (bagage enzymatique, métabolites) et de moyens moléculaires complexes qui sont gouvernés en particulier par les gènes *hrp* et *dsp*.

3.4.1. Rôle des gènes *hrp*

L'interaction bactérie / plante, qu'elle soit compatible ou incompatible, est fréquemment contrôlée par un groupe de gènes situés sur le chromosome bactérien ou sur un plasmide appelé gènes *hrp* (*hrp* : hypersensitive response and pathogenicity) (Lindgren *et al.*, 1986). Ce sont les travaux menés sur la perte simultanée de la capacité à provoquer une réaction d'hypersensibilité (HR) sur plante non-hôte et à produire la maladie sur plante hôte par des mutants obtenus par transposition chez différentes bactéries phytopathogènes (nécrogènes), qui ont permis de mettre en évidence le contrôle génique. Lindgren *et al.* (1986) ont nommé mutants *hrp*, les mutants qui ont perdu à la fois la capacité à induire une HR sur tabac et la maladie sur l'hôte. Ils ont cloné et identifié un fragment de 25 kb qui renferme le cluster des gènes *hrp* de *P. s. pv. phaseolicola*. Lindgren *et al.*, (1988), par des hybridations avec l'ADN d'autres pathovars de *P. syringae* ont montré la présence de gènes homologues aux gènes *hrp* de *P. s. pv. phaseolicola* qui sont interchangeable et fonctionnels dans les différents pathovars de *P. syringae*. Les gènes *hrp* sont localisés dans une région du chromosome bactérien allant de 22 à 41 kb (Gopalan *et al.*, 1996). Chez *Ralstonia solanacearum*, les gènes *hrp* sont situés sur un mégaplasmide de plus de 200 kb (Boucher *et al.*, 1987). Dans certains

types d'interactions bactéries / plantes (macergène, oncogène) les genes *hrp-dsp* n'ont pas été impliqués.

Les gènes *hrp* sont actuellement identifiés chez un nombre important de bactéries phytopathogènes, notamment chez d'autres pathovars de *P. syringae* (Anderson et Mils, 1985 ; Lingren *et al.*, 1986 ; Baker *et al.*, 1987 ; Cuppels, 1986 ; Huang *et al.*, 1988 ; Niepold *et al.*

1985 ; Rahme *et al.*, 1991; Yessad, 1992). Les gènes *hrp* des bactéries pathogènes des plantes présentent des homologies avec des gènes identifiés chez les pathogènes des animaux tels que *Yersinia* et *Shigella* (Gough *et al.*, 1992). L'organisation génétique du système de sécrétion du type III chez différentes bactéries, représentée dans la figure 1.2, montre les niveaux d'homologie entre les bactéries des animaux et celles des végétaux (Hueck, 1998).

Les mutants *hrp* ne semblent pas altérés dans les fonctions trophiques puisqu'ils peuvent pousser sur un milieu minimum, donc ces gènes ne codent pas pour les produits indispensables au métabolisme général. L'expression des gènes *hrp* peut être obtenue *in vitro* quand les bactéries sont cultivées sur milieu minimum particulier renfermant comme source de carbone certains sucres ou alcools sucrés (Huynh *et al.*, 1989 ; Xiao, 1994). Donc, l'activation des gènes *hrp* semble être due à des facteurs externes. PSS possède un système de régulation composé de 3 gènes : *hrpS*, *hrpR* et *hrpL* (figure 1.3 et 1.4). La présence de la bactérie dans les tissus de l'hôte semble déclencher l'expression des *hrpS* et *hrpR* qui génèrent des produits qui activent *hrpL*. Les protéines codées par ce dernier interviennent dans l'activation des promoteurs des autres gènes *hrp* et de certains gènes d'avirulence (Gopalan *et al.*, 1996).



Figure 2 : Représentation de l'organisation génétique du système de sécrétion *hrp* type III et les homologies que représentent les gènes *hrp* des bactéries pathogènes des animaux avec ceux des bactéries phytopathogènes (Hueck. 1998).

Les gènes *hrp* codent pour des protéines impliquées dans un système de sécrétion vers le milieu extérieur. Trois types de système existent chez les bactéries :

Système du type I : il permet la sécrétion de molécules protéiques ou non protéiques. Les protéines sécrétées n'ont pas de séquence signal N-terminale, en revanche une séquence C-terminale non clivée joue le rôle de signal de la sécrétion.

Système du type II : Ce système représente la voie générale de sécrétion des protéines. Il ne permet la sécrétion que de protéines. Les protéines exportées possèdent toutes un peptide signal en position N-terminal qui est clivé au cours du transport à travers la paroi (Pugsley, 1993).

Système du type III : Il permet la sécrétion de protéines dépourvues de peptide signal. Ce système est bien étudié chez *Yersinia*. La sécrétion semble se faire par " injection " directe dans les cellules hôtes grâce un complexe transmembranaire appelé Ysc (Petterson

et al., 1996). Les protéines sécrétées *via* ce système jouent un rôle dans l'interaction hôte/ pathogène

(Van Gijsegem *et al.*, 1995).

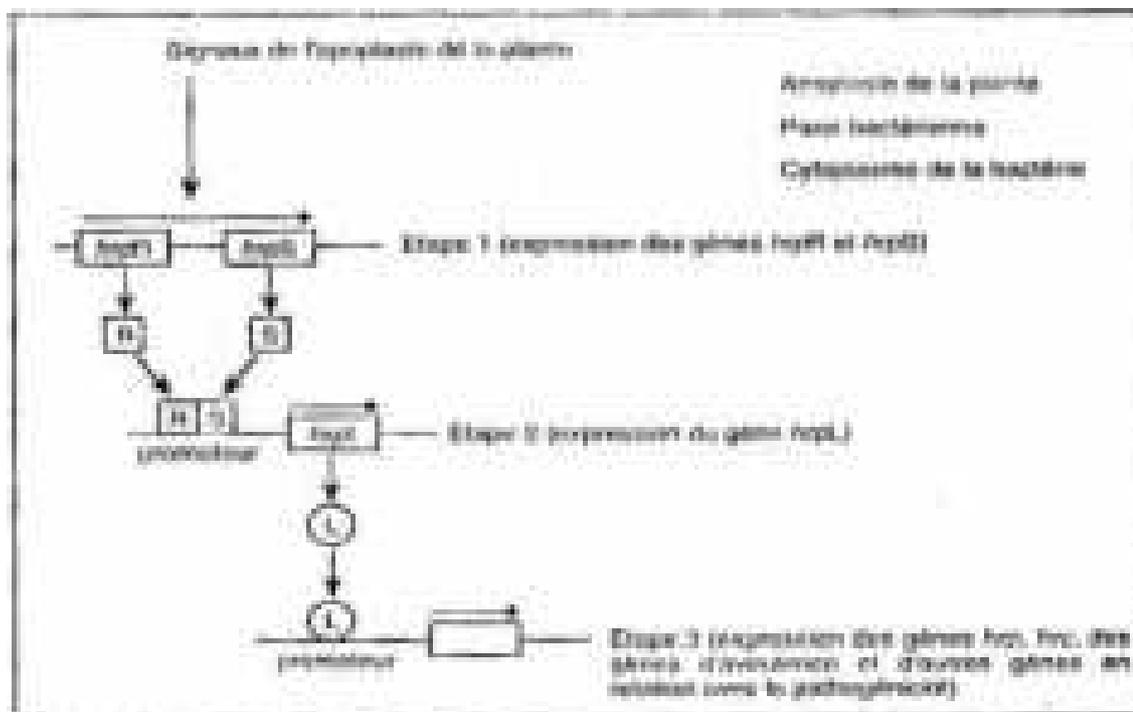


Figure 3 : Régulations des gènes systèmes hrp de *pseudomonas syringae* (après Goplan et HE. 1996)

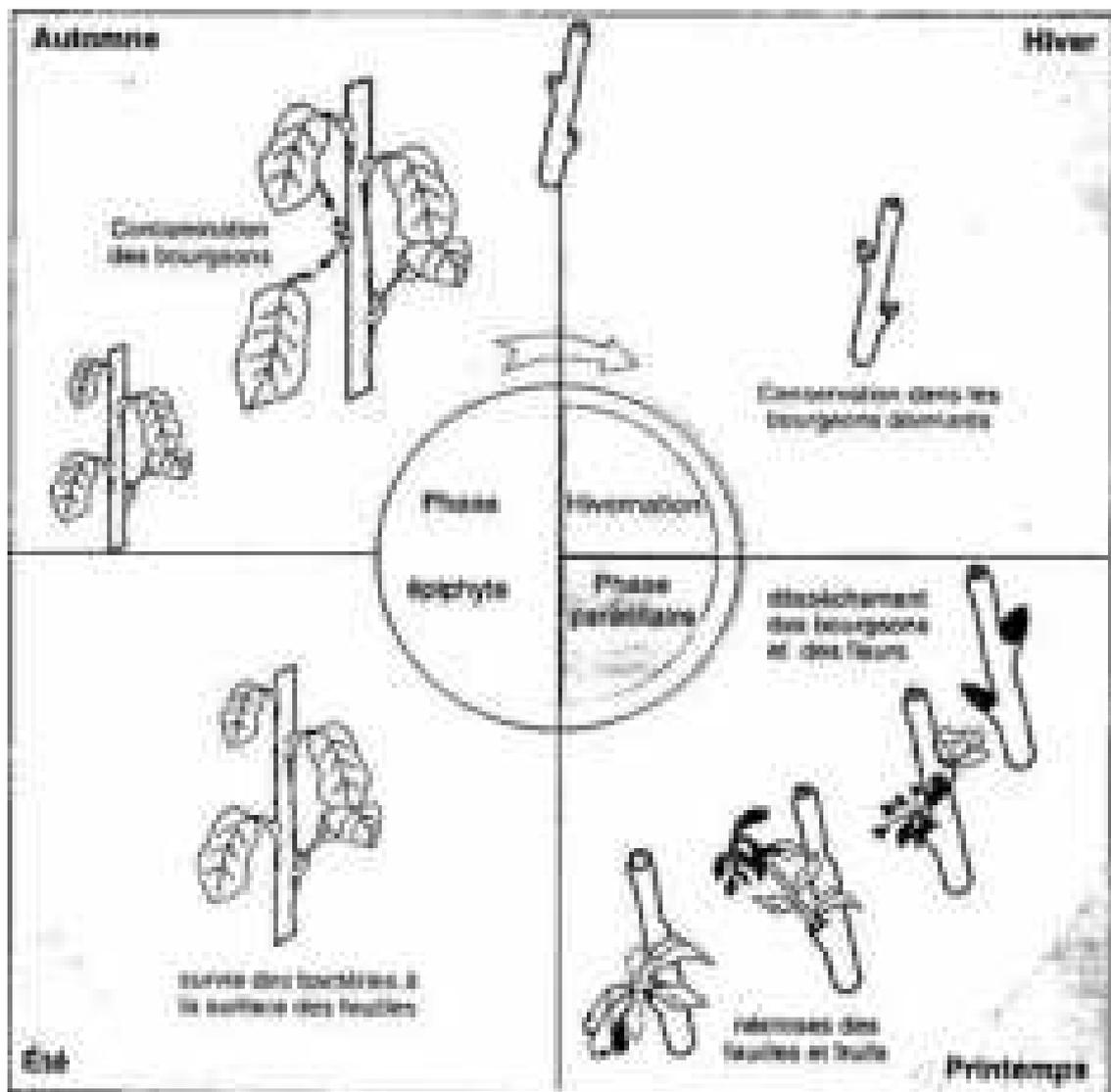


Figure 5 : Cycle biologique de *pseudomonas syringae*, agent du dessèchement bactérien du poirier.

gène de résistance chez la plante (Ellingboe, 1984). Staskawicz *et al.* (1984) ont identifié le premier gène d'avirulence *avr A* chez *P. s. pv. glycinea*. Les produits des gènes *avr* sont reconnus par la plante, ce qui déclenche les mécanismes d'incompatibilité (Keen et Staskawicz, 1988). La présence des gènes *avr* chez une bactérie et leur expression différentielle sur les différents cultivars d'une espèce végétale permet de la subdiviser en "races", caractérisées par leur spectre d'hôte.

Des études récentes ont permis l'identification de plusieurs autres gènes d'avirulence chez les bactéries phytopathogènes : *avrA*, *avrB*, *avrC* et *avrPto* chez *P. s. pv. tomato* (Kobayaschi

et al., 1989 ; Ronald *et al.*, 1992).

4. Aptitude épiphyte de *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*

4.1. Phase épiphyte

L'analyse du cycle biologique des *Pseudomonas* montre la présence de deux phases alternatives : une phase épiphyte et une phase pathogène (figure 1.5). La détection de *P. s. pv. syringae* à la surface des organes aériens sains des plantes fut une découverte importante pour l'épidémiologie des *Pseudomonas* phytopathogènes. Crosse (1959) est le premier à démontrer que *P. s. pv. morsprunorum* est présent à la surface des feuilles saines de Cerisier. Depuis, de nombreuses études ont été orientées sur l'analyse de la microflore de surface des plantes ; elles ont permis de remarquer la prédominance des bactéries à Gram négatif appartenant en particulier aux genres *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Flavobacter* et *Xanthomonas* (Schuster et Coyne, 1974).

Leben (1981) définit les bactéries épiphytes comme étant les microorganismes capables de se multiplier à la surface des organes aériens des plantes sans occasionner de symptômes. Il y a deux types de bactéries épiphytes : celles qui sont résidentes, dotées du pouvoir pour se multiplier et survivre sur la surface des plantes ; les autres sont appelées occasionnelles, incapables de proliférer sur les plantes, elles disparaissent dès que les conditions deviennent défavorables. Hirano et Upper (1983), par contre, désignent sous le nom de flore épiphyte tous les microorganismes qui sont recueillis par lavage des parties aériennes, sans faire de différence entre bactéries résidentes et occasionnelles. La phase épiphyte des bactéries phytopathogènes est associée à la multiplication de leur population sur une plante sans symptôme visible. Elle assure la continuité de leur cycle biologique et participe à la gravité de la phase parasitaire (Crosse, 1959 et 1963 ; Luisetti et Paulin, 1972). Toutes les espèces végétales ont une microflore épiphyte, mais seulement quelques genres de bactéries phytopathogènes renferment des espèces épiphytes. En effet, la surface des organes aériens des plantes saines est fréquemment colonisée par des populations épiphytes de bactéries pathogènes des végétaux.

4.2. Localisation des bactéries épiphytes

A priori, il semble que les feuilles par leur structure généralement étalée, offrent un plus grand espace habitable pour les bactéries épiphytes comparées aux fleurs ou aux bourgeons. Néanmoins, une empreinte de feuille réalisée à la surface d'un milieu gélosé, révèle une hétérogénéité dans la distribution des bactéries épiphytes. L'étude des feuilles de poirier montre que ce sont les nervures qui semblent être les plus fortement colonisées, alors que les espaces internervaires apparaissent inoccupés (Mansvelt et Hattingh, 1987a et 1987b).

Les bactéries résidentes se localisent préférentiellement au niveau des sites présentant une certaine richesse en nutriments comme les dépressions des tissus foliaires, dans les cavités substomatiques et aussi le long des nervures. Young (1978) avait suggéré que *P. s. pv. syringae* se maintient dans des sites de protection sur ou dans les feuilles. L'utilisation de la microscopie électronique à balayage a permis de montrer clairement que les bactéries colonisent des sites sur la plante qui leur offrent une protection contre les agressions abiotiques (les dépressions de la cuticule, les ouvertures à la base des trichomes, les cristaux de cire épicuticulaire) (Leben 1988).

En général, un grand nombre de bactéries est trouvé sur la face inférieure par comparaison à la face supérieure (Cafati et Saettler, 1980 ; Leben, 1988 ; Surico, 1993). Cette particularité est due sans doute à la présence en grand nombre de stomates ou de trichomes sur la face inférieure (Miles *et al.*, 1977 ; Daub et Hagedorn, 1979 ; Mansvelt et Hattingh, 1987a ; Surico, 1993), ou encore à la structure mince de la couche cuticulaire (Beattie et Lindow, 1999).

Des différences quantitatives importantes dans l'abondance des bactéries sont observées sur de petites portions de feuilles. En effet Kinkel *et al.* (1995) ont noté que la population bactérienne varie d'un facteur supérieur à 100 sur un petit segment (9 mm²) de feuille de pomme de terre et que cette variation a été bien décrite par une distribution log normale. Morris *et al.* (1997) ont récemment décrit la présence d'agrégats de population bactérienne sur une variété de plantes étudiées en plein champ, de tels agrégats ont souvent une localisation précise, avec peu d'autres bactéries dans leur voisinage immédiat.

Les conditions défavorables, telles que les fluctuations des températures, le rayonnement ultraviolet, et les faibles taux d'humidité relative font de la surface de la feuille plutôt un environnement hostile pour les bactéries épiphytes (Henis et Basham, 1986). Donc, la préférence pour des sites particuliers semble se présenter comme une stratégie (" instinct de conservation ") adoptée pour résister au stress de l'environnement tant nutritionnel que physique. La stratégie de survie réside dans les échanges dynamiques entre la population externe vivant à la surface des feuilles et une population " endophyte " localisée au niveau des cavités sous-stomatiques, comme l'ont observé au microscope à balayage sur feuilles de cerisier Ross et Hattingh (1983).

4.3.Modification de l'environnement de la surface de la feuille

- L'induction du relargage de nutriments

Il paraît évident que les bactéries peuvent modifier l'environnement des surfaces foliaires afin de pouvoir le coloniser, notamment par l'augmentation de la concentration en nutriments à la surface de la plante, par l'action d'inducteurs. Par exemple, l'étude menée sur l'acide indol acétique (AIA) produit par certaines bactéries et qui est le même que celui synthétisé par les plantes (Fett *et al.*, 1987 ; Glickmann *et al.*, 1998 ; Lindow *et al.* 1998), révèle que l'AIA produit par les bactéries peut jouer ce rôle d'inducteur (Leben, 1981 ; Brandl et Lindow, 1998). Les travaux de Brandl et Lindow (1998), montrent que des populations épiphytes d'une souche de *Pantoea agglomerans* (syn : *Erwinia herbicola*) productrices d'AIA, se développent deux fois plus que celles de son mutant déficient en AIA. La coinoculation à une proportion de 1 : 1 de la souche parentale et de son mutant a permis à ce dernier de se développer comme la souche productrice d'AIA, durant la période de croissance de la plante. La production d'AIA est aussi associée à la survie de la bactérie (*Pantoea agglomerans*) sur les feuilles exposées à des conditions de stress sévère (Manulis *et al.*, 1998). L'étude de mutants déficients en AIA de *Pseudomonas syringae* montre aussi des différences dans les dynamiques de croissance sur des plants de haricot conduits sous serre. L'application d'auxines exogènes stimule la libération de monosaccharides et d'oligosaccharides à partir des cellules épidermiques des plantes (Goldberg, 1975 ; Fry, 1989,).

- Production d'EPS extracellulaire

Les bactéries peuvent aussi modifier leur environnement par la production d'une couche d'EPS à la surface des feuilles. La microscopie à balayage révèle des fragments de matériel

amorphe qui provient des cellules bactériennes présentes sur les plantes (Ross et Hattingh, 1983 ; Timmer *et al.*, 1987 ; Mansvelt et Hattingh, 1989 ; Davis et Brlansky, 1991 ; Mariano et McCarter, 1993 ;). La présence d'EPS est particulièrement évidente sur des images publiées récemment qui montrent parfaitement des agrégats de bactéries à la surface des plantes (Morris *et al.*, 1997). Les bactéries sont enveloppées de près et clairement scellées dans du matériel amorphe que l'on pense être de l'EPS d'origine bactérienne (Morris *et al.*, 1997). Comme dans les espaces intercellulaires l'EPS peut fixer les cellules bactériennes, prévenir leur dessiccation (Leben, 1981) et modifier leur environnement direct en créant des conditions très favorables à la croissance et la survie.

Ce matériel amorphe se présente comme une matrice qui peut être analogue à celle des biofilms rencontrés chez plusieurs microorganismes aquatiques. Les biofilms peuvent concentrer des nutriments à partir des sources diluées. Il constitue un moyen de protection contre les prédateurs, les enzymes lytiques, les antibiotiques et d'autres composés inhibiteurs (Costerton *et al.*, 1995).

Comportement dépendant de la densité

C'est une étrange évidence que le comportement des bactéries à la surface varie en fonction de leur densité. En effet, la survie d'une souche de *P. syringae*, qui est exposée au stress de la dessiccation sous des conditions contrôlées, est étroitement dépendante de la densité de la population bactérienne appliquée à la surface. Les bactéries inoculées à une forte concentration montrent une survie sur les feuilles 100 fois plus importante que celles inoculées à faible concentration (Wilson et Lindow, 1994). Une corrélation positive a été remarquée entre la taille de la population d'une souche de *P. syringae* et celle de la population totale (toutes les souches de *P. syringae*), après inoculation sur des plantes dans une parcelle d'étude et l'analyse des feuilles individuelles durant la saison de croissance (Hirano et Upper, 1993). De tels résultats

suggèrent que les feuilles colonisées par les bactéries fournissent un habitat qui diffère de celui des feuilles non colonisées. La modification de la surface par les microorganismes épiphytes facilite la colonisation des feuilles et semble aussi bénéfique pour les immigrants sur la même feuille.

4.4. Localisation au-delà de la surface de la feuille

De nombreux travaux rapportent que, souvent, seulement la fraction de la population bactérienne qui se développe sur les feuilles peut être détachée. En revanche, l'autre fraction se trouve dans des sites qui empêchent sa délocalisation où elle adhère fortement à la surface par la matrice de matériau amorphe. L'analyse de taille de population plusieurs jours après l'inoculation de souches résistantes à la rifamycine de *X. campestris* pv. *vesicatoria* ou de *P. syringae* montre que seulement 1 à 30% de la population totale sont récupérés par lavage des feuilles (sous condition humide en plein champ) (Cafati et Saettler, 1980 ; Stadt et Saettler, 1981). L'étude de la dynamique de souches de différents pathovars de *P. syringae* Rif résistants inoculées sous des conditions contrôlées montre qu'uniquement 20 à 24% de la population totale est retrouvée dans la solution de lavage (O'Brien et Lindow, 1989).

De nombreuses études signalent que la stérilisation des feuilles n'élimine pas la totalité des bactéries associées aux feuilles, ce qui suppose qu'une certaine partie résiderait dans des sites protégés. Par exemple, après la désinfection à l'hypochlorite de sodium, des surfaces d'organes aériens d'une plante ayant été au préalable contaminés par pulvérisation

de divers pathogènes, une population variant entre 10^2 et 10^7 bactéries par feuille a été réisolée (Henis *et al.*, 1980 ; Bashan *et al.*, 1981 ; Bashan *et al.*, 1982 ; Schultz et Gabrielson, 1986). Des résultats similaires ont été observés par l'application de solution d'éthanol (Spurr, 1979 ; Timmer *et al.*, 1987), de peroxyde d'hydrogène, de chloroforme (Niknejad, 1998) et l'exposition des feuilles aux radiations UV (Barnes, 1965 ; Pennycook et Newhook, 1982 ; Haefele et Lindow, 1987).

5. Détection de *Pseudomonas syringae* par voie génotypique

Malgré les problèmes de classification et d'identification des pathovars de *P. syringae*, diverses méthodes de détection sont couramment utilisées. Historiquement, la démarche d'identification d'un micro-organisme pathogène passait par son isolement préalable puis sa caractérisation : observation, tests biochimiques ou sérologiques (Lelliott et Stead, 1987). Depuis quelques années, les progrès en immunologie et en biologie moléculaire ont eu un impact important sur le diagnostic en permettant la détection des organismes dans les échantillons infectés (Walker et Dougan, 1989)

Les outils de diagnostic doivent être spécifiques : capables d'identifier l'ensemble d'une population de l'agent pathogène (espèce, pathovar) en évitant de reconnaître d'autres organismes, et particulièrement les non pathogènes (flore d'accompagnement). D'autres aspects pratiques sont importants : facilité d'exécution, capacité de traiter de nombreux échantillons, rapidité et coût.

5.1.L'approche génotypique

L'hybridation des acides nucléiques a été appliquée à des fins de diagnostic dans le domaine médical et ensuite en phytopathologie (Miller et Martin, 1988 ; Amann *et al.*, 1990).

Une sonde nucléique ne représente qu'une partie du génome d'un organisme et peut être constituée d'ADN ou d'ARN. Le fait de pouvoir choisir une sonde plus ou moins longue confère une grande plasticité d'utilisation (Miller et Martin, 1988)

L'usage des sondes nucléiques nécessite le passage par un marquage radioactif. D'une manière générale, l'utilisation de la radioactivité pour la détection en routine ne paraît guère envisageable (habilitation des locaux, formation de personnel utilisateur, gestion des déchets, risques pour la santé, période courte de conservation des marqueurs performants ^{32}P ...). De plus les révélations nécessitent des temps souvent longs (un à plusieurs jours). Devant ces problèmes, des marqueurs non radioactifs des acides nucléiques (sondes froides) ont été développés (Guesdon *et al.*, 1991). Cependant, une perte de sensibilité d'un facteur de 20 à 50 a souvent été observée avec les marquages froids par rapport aux marquages radioactifs (Larzul, 1989)

5.2.La PCR

Le développement de la technique d'amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN (Saiki *et al.*, 1988), telle que la PCR (polymerase chain reaction) qui permet l'amplification spécifique,

en quelques heures, d'une séquence nucléique à des taux considérables, a permis de résoudre les problèmes de sensibilité et aussi de s'affranchir dans certains cas de la phase de multiplication bactérienne.

5.3.Choix des séquences

Pour l'utilisation de la PCR, la première étape consiste à définir au sein d'une séquence cible les deux amorces oligonucléotidiques spécifiques nécessaires pour l'amplification. En l'absence de telles séquences cibles, il faudra tout d'abord repérer une région de l'ADN susceptible de pouvoir être utilisée en PCR, l'isoler et la séquencer entièrement ou en partie. Le choix des amorces pourra ensuite être effectué.

Le choix de séquences cibles se fera entre :

- séquences correspondant à des fonctions communes : structure, métabolisme de base
- séquences codant certains ARN ribosomiques (Grimont *et al.*, 1989) comme les opérons 16S et 23S
- séquences de gènes spécifiques : résistance spécifique à certaines molécules ou production de molécules impliquées spécifiquement dans le pouvoir pathogène.

De tels gènes, codant des protéines impliquées dans le pouvoir pathogène, présentent l'avantage de pouvoir être spécifiques de l'agent pathogène qui les possède tandis que leur absence chez certaines souches peut être corrélée avec la perte du pouvoir pathogène. Ainsi, les analyses du polymorphisme effectuées à partir d'une sonde de grande taille isolée du génome de *P. s. pv. tomato*, ont permis, par comparaison des profils obtenus des souches du pathovar *tomato* et des souches du pathovar *syringae*, d'isoler un fragment d'ADN spécifique de *P. s. pv. tomato* (Denny, 1988). Une sonde contenant le gène de la phaséolotoxine a été utilisée pour la détection spécifique de *P. s. pv. phaseolicola* (Schaad *et al* 1989).

Depuis, un certain nombre d'amorces spécifiques pour la détection et l'identification de bactéries phytopathogènes par PCR sont proposées, dont le choix a été fait à partir de séquences spécifiques : plasmides présents chez les bactéries virulentes comme *Agrobacterium tumefaciens* (Picard *et al.*, 1992) ou de plasmides constamment présents chez les bactéries comme le pCS1 de *Clavibacter michiganensis* *pv. sepedonicus* (Hu *et al.*, 1995). Elles proviennent de séquences de gènes plasmidiques codant pour la toxine comme celui de la coronatine (Bereswill *et al.*, 1994), de gènes chromosomiques comme celui de la phaséolotoxine (Prosen *et al* 1993), ou des gènes *hrp* comme pour *Xanthomonas campestris* *pv. vesicatoria* (Leite *et al.*, 1995).

6.Méthodes de lutte contre les *Pseudomonas*

La mise au point d'une stratégie de lutte repose essentiellement sur une bonne connaissance de l'effet des facteurs de l'environnement, des stades phénologiques sensibles, des organes les plus vulnérables et des variétés prédisposées. Dans certains cas, les méthodes de lutte s'appuient sur la connaissance du mode d'action du pathogène.

Dans le cas de PSS, deux aspects sont à considérer : la phase épiphyte qui constitue le réservoir essentiel d'inoculum et le pouvoir glaçogène. Donc, l'objectif d'une lutte doit être la prévention de la formation de gel par la bactérie en utilisant des produits antigels et aussi la réduction au-dessous du seuil de nuisibilité des populations épiphytes. Il s'agit toujours d'une lutte préventive qui consiste à intervenir quand la bactérie est accessible.

6.1. Lutte chimique

Pour la majorité des maladies bactériennes des plantes, le recours au moyen chimique s'impose, cependant la liste des produits utilisables reste très restreinte. En effet, la lutte chimique contre *P. syringae* est basée essentiellement sur l'application préventive de composés cupriques et d'antibiotiques (Luisetti *et al.*, 1983 ; Jones et Aldwinckle, 1990 ; De Waard *et al.*, 1993 ; Montesinos et Lopez, 1996). L'utilisation de tels produits se trouve limitée par les problèmes de phytotoxicité sur les plantes aux doses efficaces, et à l'apparition de souches

résistantes chez le pathogène (Andersen *et al.*, 1991 ; De Waard *et al.*, 1993 ; Schek, 1996). L'utilisation des antibiotiques est interdite dans plusieurs pays d'Europe sur les plantes cultivées.

De nouvelles matières actives telle que le phosetyl Aluminium, produit systémique dérivant des phosphonates, ont été utilisées dans le contrôle de certains agents de maladies cryptogamiques (*Phytophthora* et *Pythium*), et semblent donner des résultats satisfaisants. Un tel produit a été testé sur certaines bactéries phytopathogènes comme *Erwinia chrysanthemi*, *P. chicori*, *X. campestris* (Chase, 1993), *X. campestris* pv. *citri* (Mc Guire, 1988), *Erwinia amylovora* (Paulin *et al.*, 1990) et *P. s. pv. syringae* (Calzolari *et al.*, 1992). Dans la majorité des cas, il a été montré une efficacité appréciable mais irrégulière. Elle semble dépendre fortement des conditions de l'environnement, de la période et du nombre d'applications.

Le mode d'action du phosetyl Aluminium est bien étudié principalement dans le contrôle des maladies fongiques (Bompeix, 1989 ; Guest et Grant, 1991 ; El-Hamalawi *et al.*, 1995). Les travaux de Bompeix (1989) montrent que c'est un produit systémique qui semble intervenir directement dans l'interaction hôte/pathogène, en activant les réactions de défense de la plante, par l'intensification du phénomène de reconnaissance, provoquant l'incompatibilité. D'autres molécules systémiques sont testées pour leur capacité à induire les réactions de défense des plantes (inducteur de SAR). Ces produits pourraient être d'un grand intérêt dans la lutte contre les bactéries phytopathogènes.

6.2. Lutte biologique

La lutte biologique consiste à utiliser des organismes antagonistes du pathogène. L'antagonisme intervient par différents mécanismes comme la compétition pour les nutriments, la modification de l'environnement par la production d'acide et aussi par la production de bactériocines (Riggle *et al.*, 1972 ; Lindow, 1985,).

Les bactéries les plus connues pour leur activité antagoniste sont *P. fluorescens* et *E. herbicola*. Lindow *et al.* (1983) ont montré que l'application de souches d'*E. herbicola* non glaçogènes sur des plants de maïs a permis de réduire l'installation d'autres micro-organismes

épiphytes. La pulvérisation de souches antagonistes non glaçogènes, réduits les dégâts du gel de 80 à 100% (Lindow, 1982 et 1987 ; Lindow et Panogopoulos, 1988).

Les rhizobactéries sont des promotrices de la croissance des plantes (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Elles sont capables d'induire la résistance systémique chez plusieurs espèces végétales. Ainsi, l'inoculation des plantules de Radis et d'Arabidopsis par les PGPR a permis une protection vis à vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* et d'*Alternaria brassicicola* (Hoffland *et al.*, 1996). L'utilisation des PGPR contre le *P.savastanoi* pv. *phaseolicola* montre une diminution appréciable des symptômes avec des niveaux de population réduits sur les feuilles (Alström, 1995).

L'utilisation de mutants altérés dans certaines fonctions de leur pouvoir pathogène semble donner une nouvelle dimension à la lutte biologique (Orser *et al.*, 1985 ; Lindow, 1987). Les travaux de Lindow (1987) montrent que l'utilisation de mutant *ice-* de souches épiphytes de *P. syringae* permet de réduire les populations de bactéries glaçogènes à la surface des organes aériens du Poirier. Cet auteur a également montré que les feuilles et les fleurs de Poirier ainsi que les poires immatures sont fortement colonisées par une souche de *P. syringae ice⁻*, ce qui a nettement réduit la colonisation par des souches de *P. syringae ice⁺* ainsi que par des souches d'*Erwinia amylovora*.

Des travaux récents sur mutant *hrp* de *Erwinia amylovora* ont montré que l'utilisation de mutants de régulation *hrpL*, *hrpS* confèrent une protection dans différentes situation : une protection locale et une protection à distance. Une protection est obtenue à la suite d'une co-inoculation (mutant avirulent / souche sauvage) à des concentrations situées entre $10^5/10^4$ et $10^6/10^5$ mais pas avec des rapports élevés. Cette protection est expliquée par une compétition entre le mutant et la souche virulente pour les sites d'infection ou d'adhésion au niveau des cellules. Une protection à distance est obtenue quand le mutant de régulation *hrpS* est infiltré à de fortes concentrations (10^{10} ufc/ml). Une concentration faible ne donne pas de protection, ce qui suggère la nécessité d'un niveau minimum de la concentration de la souche inductrice (Faize, 2000).

Plantes fruitières	Plantes herbacées	Plantes aromatiques
Avocatier (<i>Persea indica</i>)	Bettencore (<i>Beta vulgaris</i>)	Fenouil (<i>Foeniculum vulgare</i>)
Banane (<i>Musa paradisiaca</i>)	Carotte (<i>Daucus carota</i>)	Fraise (<i>Fragaria vesca</i>)
Cardon (<i>Coffea arabica</i>)	Fève (<i>Vicia faba</i>)	Glycine (<i>Glycine max</i>)
Citronnier (<i>Citrus sp</i>)	Haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Laurier rose (<i>Nerium oleander</i>)
Mangoustan (<i>Mangifera indica</i>)	Lotus (<i>Nelumbo lotus</i>)	Laurier sauce (<i>Laurus nobilis</i>)
Pois (<i>Asplara regia</i>)	Maïs (<i>Zea mays</i>)	Lilas (<i>Syringa sp</i>)

Tableau 7. : Liste des végétaux sur lesquels *P. syringae* pv. *syringae* a été signalé (Bradbury, 1986)

De même, certains micro-organismes peuvent conférer à la plante une résistance systémique acquise (SAR). La SAR peut être aussi activée par l'application exogène de traitements chimiques (Mauch - Mani et Matraux, 1998, Brisset *et al.*, 2000)

7. Maladies à *P. syringae* des maloïdeae

7.1. Maladie à *P. s. pv. syringae* : Dessèchement bactérien du Poirier

7.1.1 Importance

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (PSS) est une bactérie épiphyte présente sur un ensemble important de plantes cultivées et spontanées. Elle possède la capacité de se multiplier à la surface de ses plantes hôtes avant de pénétrer dans les tissus (Lindow *et al.*, 1978 ; Lindemann *et al.*, 1984 ; Malvick et Moore, 1988 ; Yankofsky *et al.*, 1988 ; Hirano *et al.*, 1995).

Elle a été reconnue comme l'agent causal de diverses maladies nécrogènes, sur 200 espèces végétales (Bradbury, 1986) dont les arbres fruitiers (Poirier, Prunier, Cerisier, Pommier, Agrume) et des espèces ornementales et herbacées (Tableau 1.7). Sur le Poirier, elle est décrite comme agent du dessèchement bactérien (bacterial blast of pear). Elle est signalée dans toutes les régions de production de la poire : en France (Ridé et Sutic, 1957), en Angleterre (Baker et Grove, 1914), aux Etats Unis d'Amérique (Wilson, 1936), en Nouvelle Zélande (Dye, 1956), en Grèce (Cameron, 1962), en Italie (Ercolani, 1967), en Australie (Fahy et Lloyd, 1983) en Afrique du Sud (Mansvelt et Hattingh, 1986), et en Espagne (Lopez et Montesinos, 1996).

7.1.2. Symptomatologie du dessèchement bactérien du Poirier

La nécrose bactérienne du Poirier se manifeste par différents symptômes en fonction de l'organe touché et du stade végétatif. Les premiers symptômes rencontrés au moment du débourrement sont le brunissement, le dessèchement, puis le noircissement des bourgeons à fleurs ou du bois, les rameaux portant ensuite de nombreux bourgeons nécrosés.

Au cours de la floraison, l'infection se développe à partir du pédoncule, gagne les fleurs, puis le corymbe se dessèche et noircit. Le gel et certaines carences peuvent provoquer des symptômes analogues ; seule l'analyse microbiologique des lésions peut confirmer l'origine bactérienne des dégâts.

Sur les jeunes fruits, on observe des petites taches noires déprimées et sèches qui peuvent confluer. La tache, lorsqu'elle est de taille limitée, peut être cernée par un halo rougeâtre. Ainsi nécrosés, certains jeunes fruits restent sur l'arbre. Ils prendront plus tard un aspect côtelé et se dessècheront sur place.

Sur les feuilles peuvent apparaître des taches noires cernées d'un halo rougeâtre. Lorsqu'elles sont suffisamment nombreuses, les taches confluent et la nécrose s'étend à la pousse par progression vasculaire. On assiste à un noircissement total de la pousse herbacée et les feuilles se dessèchent sur le rameau. On observe au cours de l'été des dessèchements de rameaux. Ils ne sont pas la conséquence d'attaques estivales, mais de l'évolution lente de lésions apparues au printemps.

Les symptômes de dessèchement bactérien du Poirier peuvent se classer en deux catégories : ceux qui ont une incidence directe sur la récolte (mort des bourgeons à fleur, dessèchement de corymbes, chute prématurée des fruits, flétrissement tardif des poires) et ceux qui entraînent un affaiblissement des parties végétatives de l'arbre (mort des pousses latérales et formation de chancres)

7.2. Maladies à *P. s. pv. papulans* : tache vésiculaire de la pomme,

7.2.1. Importance

Pseudomonas syringae pv. *papulans* est l'agent causal de la tache vésiculaire (blister spot) de la pomme (*Malus pumila*). Cette bactériose a été décrite pour la première fois, dans le Missouri aux Etats Unis d'Amérique par Rose en 1916. Ce n'est qu'à la fin des années 70 que Dhanvantari (1977), Burr et Hurwitz (1979) respectivement signalent la gravité des dégâts provoqués dans les vergers de pommiers du cultivar Mutsu par l'agent de la tache vésiculaire

dans les états de l'Ontario (Canada), de New York et du Michigan (Etats Unis). En Europe, cette maladie bactérienne de la Pomme Mutsu a été signalée pour la première fois en Italie par Bazzi et Calzolari en 1983. En France, le *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* n'a jamais été décelé. Les dégâts de la maladie ont une importance économique certaine, due à la dépréciation de la qualité commerciale provoquée par la présence de taches vésiculaires à la surface des fruits. Ce qui affecte sérieusement le développement du cultivar Mutsu (Burr et Hurwitz, 1979). Cette bactériose est prédominante sur le cultivar Mutsu. Cependant, il semble qu'elle ne soit pas limitée uniquement à ce cultivar, mais qu'elle puisse affecter d'autres cultivars, tels que les cvs. Golden Delicious, Delicious, Idared et Rome Beauty (Burr et Hurwitz, 1981). Sholberg et Bedford (1995) ont identifié un isolat de *Pseudomonas syringae* comme appartenant au pathovar *papulans*, isolé d'un verger de Pommier de l'Etat de la Colombie-Britannique (Canada). Cet isolat semble très virulent sur la variété Fuji la plus cultivée dans cette région. Les tests de pathogénicité sur d'autres cultivars ont montré une induction de plus de dix lésions par fruit pour les cultivars Braeburn, Gala, Jogland et Mutsu.

7.2.2. Symptômes de la maladie

Les symptômes sur fruits se présentent sous forme de petites taches à la surface des pommes. Elles prennent au cours de leur développement la forme de taches vésiculaires (papules) (appelée en anglais 'blister spot'). Elles sont de couleur brune, de 1 à 5 mm de diamètre. Le nombre de lésions peut varier de quelques unes à deux cents par fruit (Burr, 1982; Bazzi et Calzolari, 1983). Les fruits semblent sensibles à l'infection pendant la période de croissance. Les travaux de Burr et Hurwitz (1981) ont montré que les fruits présentent une sensibilité importante deux semaine à deux semaine et demi après la chute des pétales. Ces auteurs rapportent aussi que la bactérie pénètre par les stomates

Sur les jeunes feuilles du cultivar Mutsu, le *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* provoque l'apparition de nécroses sur la nervure principale, accompagnées d'un dessèchement du bord du limbe (Bonn et Bedford, 1986). Les bourgeons dormants semblent être le site d'hivernation de la bactérie et peuvent aussi montrer des nécroses semblables à celles engendrées par le *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Burr et Katz, 1982 et 1984) Les travaux de Burr et Katz (1984) ainsi que ceux de Bedford et al. (1988) ont montré la survie en épiphyte de cette

bactérie au niveau des bourgeons, des boutons floraux, des feuilles et des fruits, sur la variété Mutsu. Les populations épiphytes de la bactéries au niveau des bourgeons constituent probablement la source d'inoculum la plus importante (Burr et Katz, 1982 ; Bedford et *al.*, 1988).

8.Problème posé

Décrite en France en 1957 par Ridé et Sutic, la nécrose bactérienne du Poirier à *P. s. pv. syringae* a fait l'objet de plusieurs études tant sur le plan épidémiologique que pathologique. Toutefois, la diversité pathologique et biochimique de cette bactérie peut être à l'origine de son expression sporadique, elle-même influencée par les conditions édaphiques et environnementales.

La nécrose bactérienne est souvent signalée dans les vergers de Poiriers et Pommiers. Les conditions de l'arboriculture moderne font peut être qu'elle se manifeste davantage depuis quelques années. La gravité des dégâts constatés inquiète les arboriculteurs, qui prêtent une attention plus soutenue aux affections bactériennes et restent souvent frappés par le caractère épisodique de leurs manifestations. Dans ce contexte un projet est lancé par CTIFL en 1996, alerté par la recrudescence des dégâts de mortalité des bourgeons dans les vergers de Poirier. Le laboratoire de pathologie végétale de l'INRA était chargé de déterminer l'éventuelle origine pathologique des symptômes, ce qui est à l'origine de mon intégration dans ce projet.

Afin d'étudier l'hypothèse du rôle de *P. s. pv. syringae* dans les pertes observées, nous avons adopté une démarche basée sur la recherche de :

- la présence de *P. syringae* sur les organes aériens du Poirier et du Pommier
- l'existence parmi *P. syringae* de souches plus agressives pour Poirier ou Pommier
- l'établissement d'une relation entre la présence de *P. syringae* agressifs dans la microflore, et l'importance des dégâts observés dans chaque verger.

Dans cette optique, nous avons analysé quantitativement et qualitativement les populations bactériennes épiphytes sur les organes aériens du Poirier et du Pommier. Deux vergers ont été

choisis dans deux sites géographiques, un verger ayant manifesté des symptômes de dépérissement et l'autre étant resté sain. Différents critères ont été mis en œuvre pour caractériser les isolats de cette population épiphyte : de nombreux critères phénologiques analysables en taxonomie numérique, des tests de pouvoir pathogène sur plusieurs espèces végétales, et enfin une caractérisation génétique.

Nous verrons successivement :

- les variations quantitatives des populations de *P. s. pv. syringae* en verger au fur et à mesure du développement des organes des arbres,
- l'analyse de la diversité de ces populations,
- la caractérisation d'un pathovar particulier de *P. syringae*, lepv. *papulans* que nous avons signalé pour la première fois en France ainsi que le développement d'un outil moléculaire de détection de ce pathovar.

CHAPITRE II : DYNAMIQUE DES POPULATIONS DE *P. S. PV. SYRINGAE* EPIPHYTES

Introduction

Certaines bactéries phytopathogènes sont dotées d'une aptitude à survivre et à se multiplier à la surface des organes aériens des plantes. Il existe des bactéries qui sont occasionnellement à la surface des plantes, incapables de se multiplier et finissent par disparaître dès que les conditions deviennent peu clémentes. En revanche, des bactéries pathogènes des plantes sont capables de se développer et se maintenir sur la surface des végétaux durant toute l'année avec des niveaux de populations qui varient en fonction des saisons et des espèces.

Pseudomonas syringae pv. *syringae* appartient à un groupe de bactéries qui colonisent les organes aériens des plantes. Il est aussi impliqué dans le dessèchement de bourgeons fréquemment observé en verger de Poirier. Cette bactérie apparaît comme une composante permanente de la microflore des organes aériens. Elle peut atteindre des niveaux de population importants et exprimer son pouvoir pathogène sous certaines conditions, notamment lors de gels printaniers suivis par des conditions de température et d'humidité relative optimales. Les auteurs rapportent que la taille des populations de *P. s. pv. syringae* sur les plantes pérennes est généralement plus élevée au printemps qu'en été (Wimalajeewa et Flett, 1985 ; Roos et Hatting, 1987 ; Hirano et Upper, 1990 ; Manceau et al., 1990).

Depuis quelques années, des problèmes de dessèchement de bourgeons sont souvent signalés dans les vergers de Poirier. Ils conduisent à des pertes de rendement variables selon les années, qui peuvent compromettre la presque totalité de la récolte.

Afin de déterminer le rôle que pourraient jouer les bactéries de *P. s. pv. syringae* dans les dégâts observés sur les bourgeons de poiriers, nous avons recherché la présence de cette bactérie au sein de la microflore épiphyte. Cette analyse est effectuée par comparaison des populations bactériennes épiphytes à la surfaces des organes aériens à différents stades phénologiques (bourgeon, fleur et feuille) de vergers sains et de vergers ayant subi des dégâts importants l'année précédente. Les vergers étudiés se trouvent dans deux sites différents par leur conditions climatiques.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal

La variété de Poirier “Doyenne du Comice” est choisie à cause d’une assez forte manifestation de dégâts avant 1996. Les observations faites en 1996 ont permis de définir quatre sites de prélèvement :

- Deux en Maine et Loire (49) : un verger sain (1S) situé à Angers (Laureau) et un verger malade (1M) localisé à Varennes sur Loire (Foret).
- Deux en Dordogne (24) : un verger sain (2S) à Lanxade (CTIFL) et un verger malade (2M) situé à La Monzie St Martin.
- verger sain: verger n’ayant jamais manifesté de symptôme de dessèchement de bourgeons
- verger malade: verger présentant souvent des dégâts de dessèchement de bourgeons

Des prélèvements complémentaires ont été effectués dans des vergers ne présentant aucun symptôme, appartenant au domaine de l’INRA d’Angers, sur deux cultivars de Poirier (Comice et Williams) ainsi que sur trois cultivars de Pommier (Golden Delicious, Idared et Gala).

1.2.Prélèvements

Le suivi des populations bactériennes a été effectué sur : les bourgeons, les fleurs et les feuilles. A chaque prélèvement, 20 échantillons de matériel végétal (20 organes pour les feuilles, 10 pour les bourgeons et les fleurs) sont récoltés sur chaque site retenu aux dates résumées dans le tableau 2.1. Les organes prélevés sont mis dans des sacs en plastique et stockés à 4°C jusqu’à l’analyse.

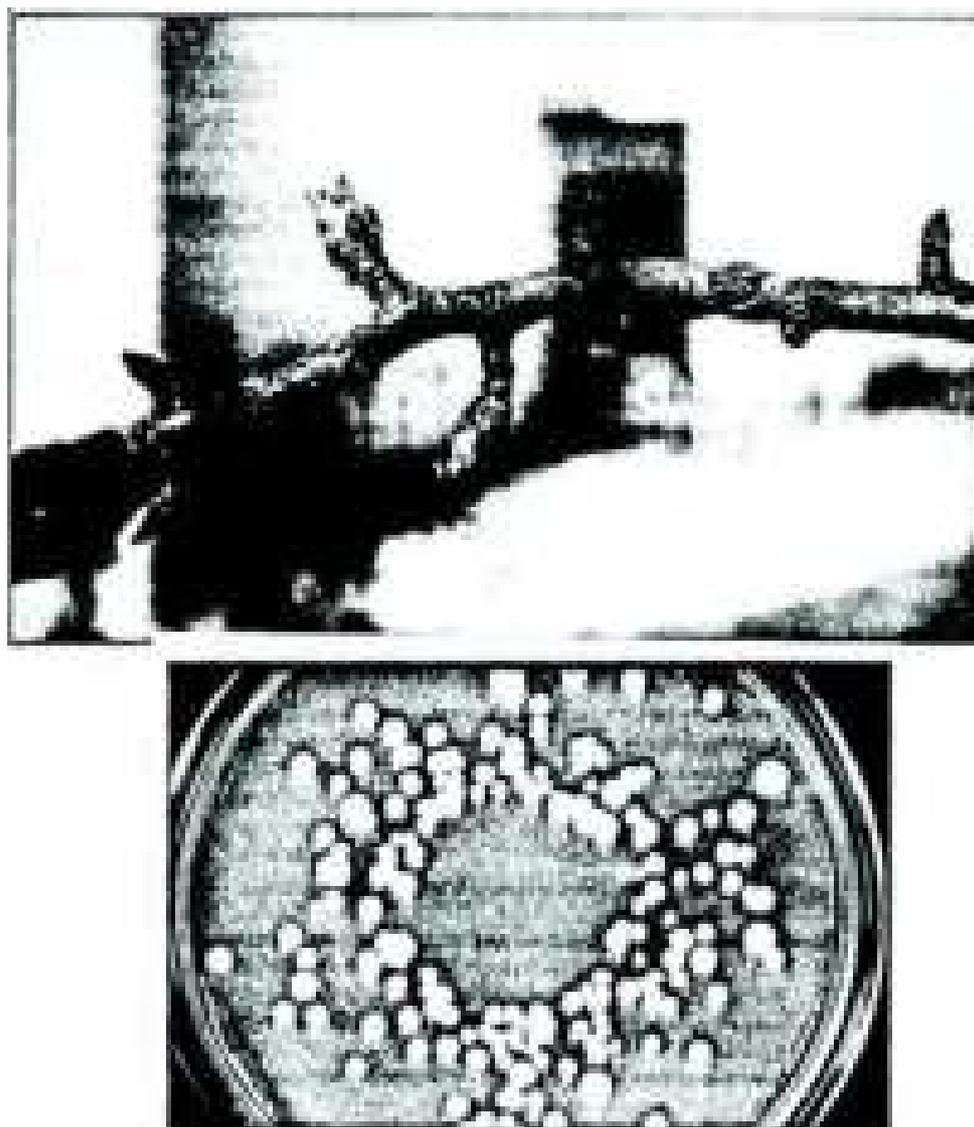


Figure 6 : 1. Bourgeons nécrosés et sains sur rameau de poirier 2. Isolement de bactérie par étalement au spirale à partir de broyats de bourgeons

Organes	Prélèvements et analyse	
	Année 1997	Année 1998
Bourgeons	25 février	28 février
Fleurs	25 mars	25 mars
Feuilles 1	22 avril	9 avril
Feuilles 2	27 mai	14 mai
Feuilles 3	15 juillet	16 juillet
Feuilles 4	02 septembre	03 septembre
Feuilles 5	14 octobre	10 octobre

Tableau 8. Dates de prélèvement des échantillons

Le suivi des populations bactériennes pour l'année 98 n'a été effectué que sur les deux vergers du Maine et Loire (1S et 1M)

1.3. Techniques utilisées

Pour récupérer l'ensemble des bactéries épiphytes nous avons opté pour le broyage des organes. Les bourgeons et les fleurs sont broyés à l'aide d'un Ultra Turrax, les 10 organes qui constituent l'échantillon sont placés dans un tube avec 10 ml d'eau stérile. Pendant le broyage, le tube est placé dans un bac de glace pour le refroidissement.

Les échantillons de feuilles sont par contre broyés dans 100 ml d'eau stérile à l'aide d'un broyeur à couteaux (waring blender).

1.4. Estimation des populations bactériennes

Les suspensions de broyages sont transvasées dans des tubes à essai, et ensuite placées dans un bac à glace. Chaque suspension est diluée au 1/10^{ème}, 1/100^{ème} et 1/1000^{ème}. Cinquante microlitre de la solution mère de chaque dilution sont étalés à l'aide d'un ensemencur '.

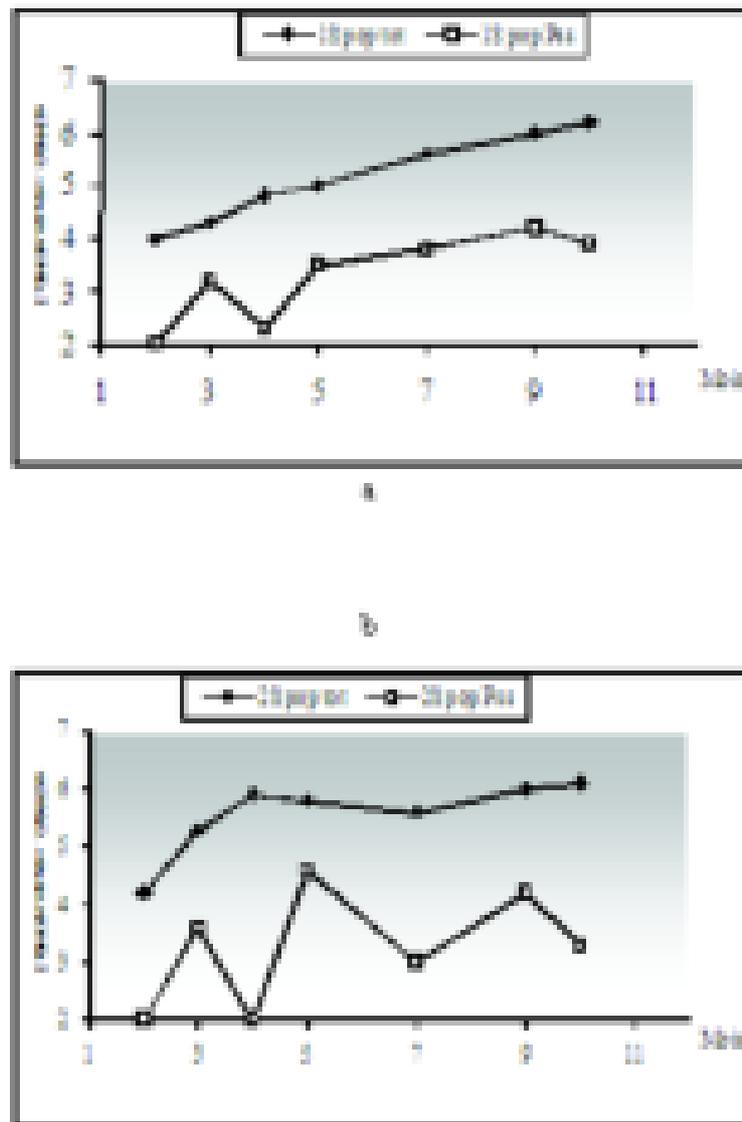


Figure 7. Evolution des populations épiphytes de PSS dans les vergers sains de Poirier: a) dans le site 1, b) dans le site 2

spirale' à la surface du milieu B de King gélosé additionné de 50 mg par litre de cycloheximide (antifongique). Trois répétitions sont effectuées par dilution, les boîtes de Petri sont mises à incuber à 23°C. La lecture des boîtes est faite après 48 h et 72 h par dénombrement dans un premier temps de toutes les colonies qui constituent la population totale, puis dans un second temps par comptage sous un éclairage aux ultra violets des colonies fluorescentes, qui représentent la fraction de *Pseudomonas* fluorescents (dont certains peuvent être des *P. syringae*) (Figure 2.1).

1.5.Caractérisation

Une première identification est effectuée pour les souches fluorescentes par l'utilisation du LOPAT (Lelliott *et al.*, 1966), pour différencier *P. syringae* des autres *Pseudomonas* fluorescents. Une caractérisation plus complète sera présentée dans le chapitre " caractérisation des isolats "

1.6. Analyses statistiques

Les effectifs qui correspondent au nombre de bactéries obtenues par broyage sont alors exprimés en ufc (unité formant colonie) par organe (ou nombre de bactéries par organe) et ensuite transformés en logarithme décimal de nombre de bactéries par organe. Chaque fois que l'on ne détectait aucune colonie sur la boîte de Petri, nous avons attribué à l'échantillon la valeur correspondant à la moitié du seuil de détection. Les données ont été soumises à une analyse de la variance. Les moyennes ont été comparées soit par le test de Duncan quand les variances étaient homogènes, soit par une statistique d'ordre quand les variances étaient hétérogènes.

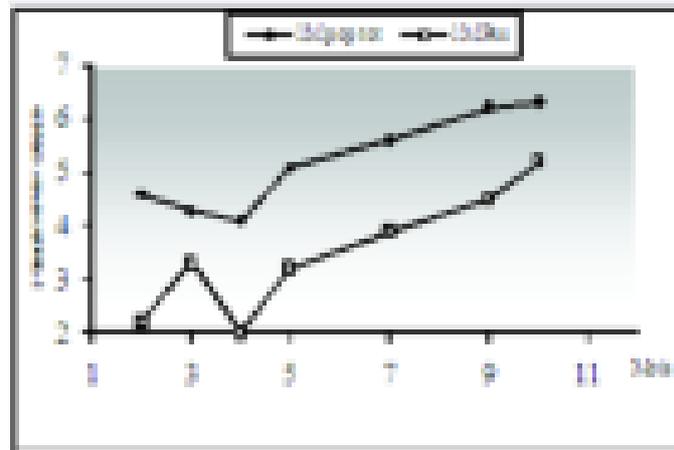
2. Resultats

2.1. Dynamique des populations de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (PSS) dans les différents sites étudiés en 1997.

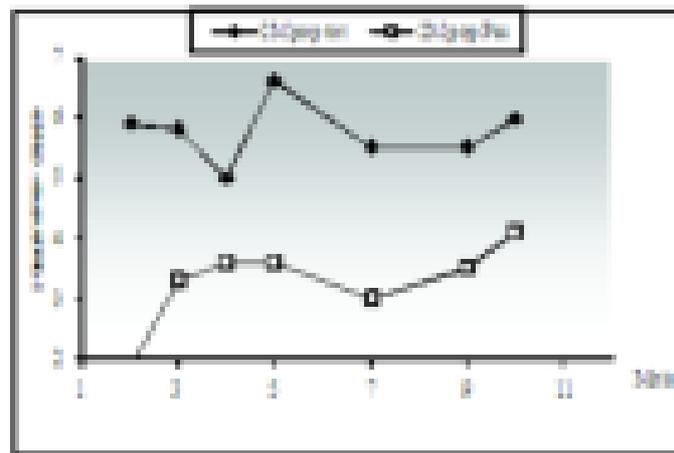
2.1.1. Vergers sains

- Site 1

La population de PSS n'a pas été détectée dans le prélèvement du mois de février. Cependant elle apparaît au mois de mars avec un niveau de 10^3 bactéries par fleur (Figure 2.2a).



a



b

Figure 8. Evolution des populations épiphytes de PSS dans les vergers malades : dans le site 1, b) dans le site 2

Une chute brutale de son effectif a été enregistrée pour le mois d'avril. Le niveau de population de PSS a atteint son maximum en septembre avec 10^4 par feuille. La population totale a été tout le temps supérieure à celle de PSS. Elle a subi une augmentation continue, en passant de 10^3 ufc/ organe pour atteindre 10^6 au mois d'octobre.

Site 2

Une population de PSS de 10^3 bactéries par bourgeon est enregistrée au mois de mars, alors qu'elle était à la limite de détection en février (Figure 2.2b). Après un passage au dessous du seuil de détection en avril, une population fluctuante est enregistrée ($10^4 - 10^3$ ufc/feuille). Deux maximums de 10^4 bactéries par feuille sont atteints, le premier au mois de mai et le second en septembre. La population totale présente des effectifs plus élevés avec une dynamique différente de celle des PSS.

2.1.2. Vergers malades

- Site 1

Dans le verger ayant présenté des dégâts de dessèchement de bourgeons en 1996, la population de PSS au mois de février 97 est à la limite de détection ($2 \cdot 10^2$ bactéries/bourgeon) (Figure 2.3a). Elle atteint 10^3 ufc/fleur en mars. En avril, elle se trouve au dessous du seuil de détection. En revanche, la population de PSS est détectée avec un niveau de 10^3 ufc/feuille au mois de mai et reste en évolution progressive pour atteindre un maximum de 10^5 bactéries par feuille. La population bactérienne totale évolue de 10^4 à 10^6 ufc/organe (février - octobre).

- Site 2

Au mois de février, la moyenne du nombre de bactéries par bourgeon pour la population de PSS était située à un niveau voisin de la limite de détection (Figure 2.3b). Cependant , à partir du mois de mars et pour une période allant jusqu'au mois de septembre, des effectifs oscillant entre 10^3 et 10^4 bactéries par organe ont été dénombrés. Le maximum de population est atteint au mois de septembre (10^4 ufc/feuille).

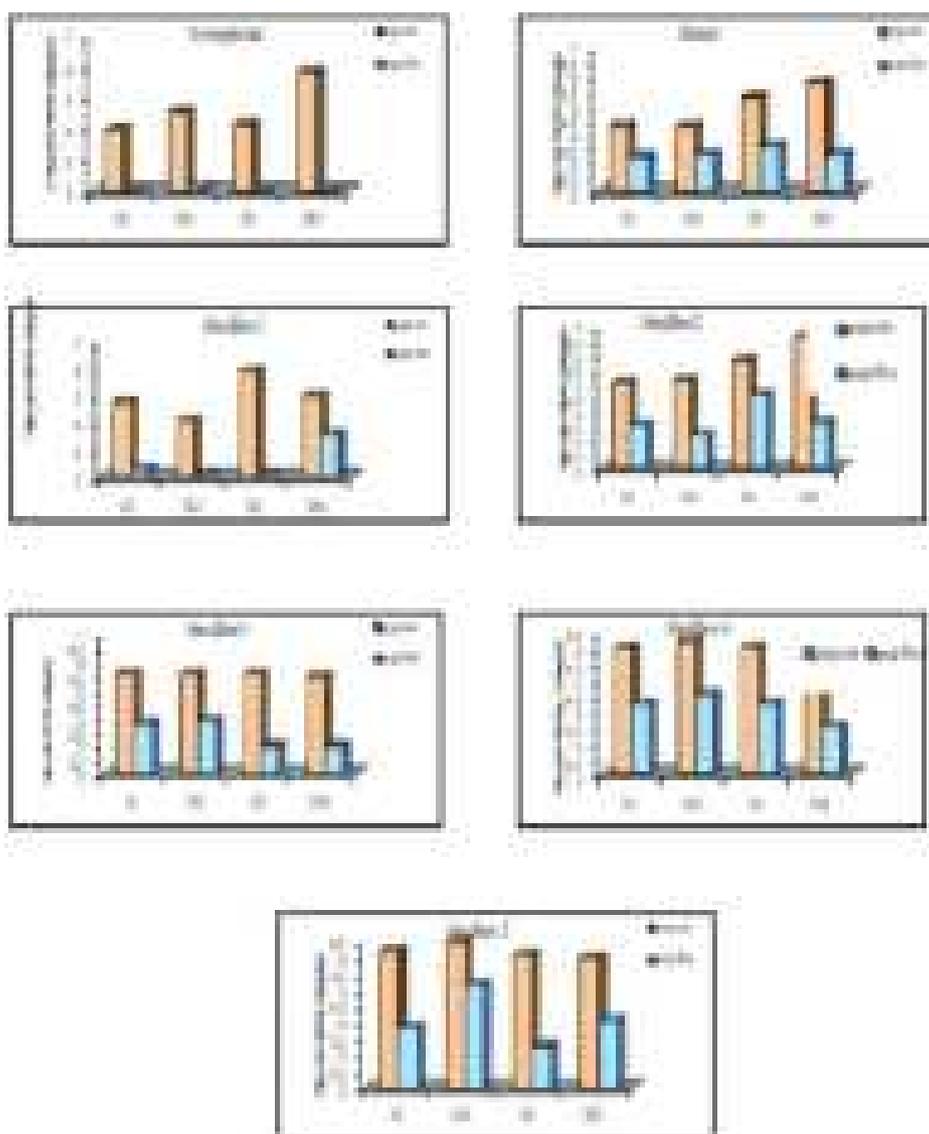


Figure 9. Populations bactériennes (PSS et populations totales) en fonction des organes colonisés (verger sain et malade, site 1 et 2) en 1997

2.2.Comparaison des populations en fonction des organes colonisés dans les vergers sains (période 97)

2.2.1 Les bourgeons

Les niveaux de la population totale bactérienne obtenus dans les bourgeons sont de $9 \cdot 10^3$ ufc/bourgeon pour 1S et $1,5 \cdot 10^4$ ufc/bourgeon pour 2S. La population de PSS montre des niveaux très faibles car elle se situe à la limite ou en dessous du seuil de détection. Le même résultat est obtenu dans les vergers malades (Figure 2.4).

2.2.2.Les fleurs

Une différence est enregistrée pour la population de *Pseudomonas* chez les fleurs par rapport à celle des bourgeons (Figure 2.4). En effet, les niveaux moyens pour les fleurs passent du simple au double (1S et 2S) sont de : $1,5 \cdot 10^3$ ufc/fleur (1S) et $4 \cdot 10^3$ ufc/fleur(2S), alors qu'ils étaient à la limite du seuil de détection dans les bourgeons. Les niveaux de populations de PSS des vergers sains et malades sont du même ordre. Les populations totales oscillent entre 10^4 à 10^5 ufc/fleur.

2.2.3. Les feuilles

Les résultats obtenus pour le premier prélèvement de feuilles révèlent la présence de PSS avec de faibles effectifs dans les vergers 1S ($2 \cdot 10^2$ ufc/feuille), ou non détectables dans le verger 2S (Figure 2.4). La population totale présente une colonisation de l'ordre de 10^4 à 10^5 ufc/feuille, similaire à celle observée sur les fleurs. Les niveaux de PSS obtenus au cours de la période allant de mai à octobre affichent des valeurs qui oscillent entre 10^3 et 10^4 (pour 1S et 2S), avec un maximum de $4 \cdot 10^4$ pour 2S et de $1,7 \cdot 10^4$ ufc/feuille pour 1S. La population totale varie entre 10^5 à 10^6 ufc par feuille.

Les populations de PSS dans les vergers sains ne montrent pas de différence significative entre elles. La population de PSS du verger 2S présente des fluctuations dans le temps qui oscillent entre 10^3 et 10^4 ufc/feuille. Le niveau plus élevé de la population de PSS est observé dans le verger malade (1M) au mois d'octobre (10^5 ufc/feuille)

2.3. Dynamique des populations épiphytes de PSS du Poirier 1997/1998

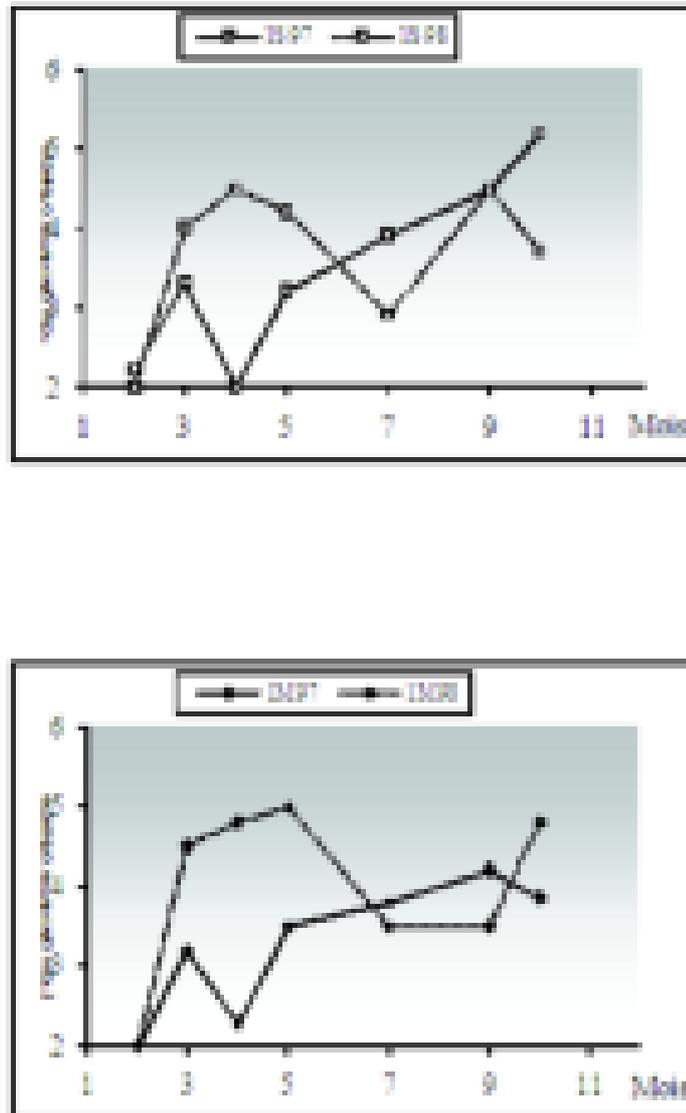


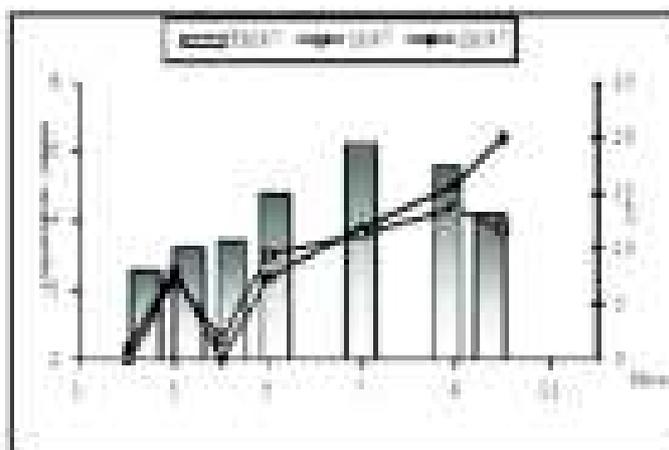
Figure 10. Comparaison des populations de PSS dans les vergers sains (1997 et 1998) et les vergers malades (1997 et 1998) dans le Maine et Loire (site 1)

La comparaison des niveaux de populations de PSS obtenus en 1997 et 1998, a montré que les effectifs de PSS pendant la saison printanière 98 sont plus importants que ceux de 97, dans les deux situations (sain/malade) (figure 2 5a et b). En effet, les populations enregistrées en mars, avril et mai 97, oscillent entre 10^3 ufc/organe et le seuil de détection, alors que celles de la même période en 98 se situent entre 10^4 et 10^5 ufc/organe. Une régression des populations de PSS a été observée en juillet 98 dans les vergers 1S et 1M. La période allant de juillet à octobre a montré une augmentation continue des PSS dans un verger sain en 97 et une fluctuation variable en 98. Pour la même période (juillet-octobre), la population de PSS de verger malade en 1997 présente une augmentation jusqu'au mois de septembre suivie d'une chute en octobre. Par contre celle obtenue en 98 montre une stagnation en septembre suivie d'une élévation en octobre. La période estivale est marquée par des fluctuations variables des populations de PSS dans les deux situations (sain et malade)

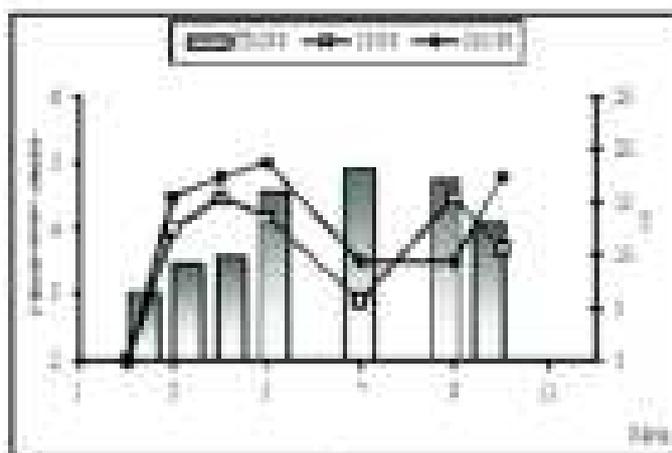
2.4. Analyse de la dynamique des populations de *Pseudomonas* en fonction des conditions climatiques

Pour l'analyse de la dynamique des populations de PSS en fonction des conditions de l'environnement, nous présentons uniquement la dynamique dans le verger sain du site 1, et ce pour des raisons de disponibilité des données climatiques (Figures 2.6 et 2.7).

Les courbes de l'évolution des populations de PSS pour les périodes 97 et 98 décrivent des fluctuations en fonction de la température. En février 97 et 98, les populations de PSS n'ont pas été détectées (températures variant entre -2 et 12 C). Cependant, pour une élévation de la température associée à une pluviométrie de 27 mm, on observe l'apparition des PSS avec un niveau de 10^3 bactéries par organe, au mois de mars 1997. En revanche, pour une chute de température (7,4 C) et une faible précipitation (3 mm), le niveau de population de PSS enregistré se trouve à la limite de détection ($2 \cdot 10^2$ ufc/organe en avril 1997), alors que la population totale se maintient en progression (10^4 ufc/organe). Une population maximale de PSS (10^4 ufc/organe) est dénombrée au mois d'avril 1998 (T: 10 C, Pmm : 154 mm). Un deuxième maximum est enregistré au mois de septembre 1998 pour une température de 17,2°C



a



b

Figure 11. Evolution des populations des PSS dans les vergers sain/malade et de la température moyenne (TM) pour les périodes : a) 1997, b) 1998

et une pluviométrie de 121 mm. On constate une population printanière faible en 1997 et élevée en 1998. Une chute estivale est observée en 1998.

3. Discussion

Le moyen de récupération des bactéries, par l'utilisation du broyage des organes, ne permet pas de rendre compte de la localisation des bactéries sur ou dans l'organe étudié. Cependant, c'est le moyen le plus efficace pour récolter les bactéries cultivables associées à un organe végétal (Yessad, 1992, Niknejad, 1998). Les effectifs bactériens enregistrés correspondent donc à des bactéries épiphytes au sens défini par Hirano et Upper (1988) et Gaignard et Luisetti (1993).

Des populations de PSS ont été révélées dans les deux sites étudiés et dans les différentes situations (vergers sains et malades). Cependant, une évolution variable des populations de PSS est observée aussi bien entre vergers sains qu'entre vergers malades. Cette différence de dynamique peut avoir une origine climatique. En effet, la comparaison de l'évolution des populations de PSS entre le verger sain et verger malade dans un même site ne montre pas de différence appréciable.

La comparaison entre la dynamique des populations de PSS obtenues de février à octobre en 1997 et 1998 dans le site Maine et Loire (site 1), montre :

- une variation saisonnière, avec des effectifs en PSS plus importants au printemps suivie d'une chute estivale (verger sain et malade en 1998)
- des effectifs élevés de PSS pendant la saison favorable à l'infection (mars à mai) dans le verger sain et malade (1998). En 1997, de faibles niveaux sont enregistrés au printemps , alors que des effectifs relativement importants sont notés au cours de la saison défavorable à l'infection (sain et malade)

Les conditions de température ne montrent pas de différences au cours de la période mars-mai des années 97 et 98, en revanche, une différence de précipitations entre les deux années est enregistrée pour la période mars-mai. Ceci peut probablement expliquer les effectifs

importants de PSS obtenus au printemps 98.

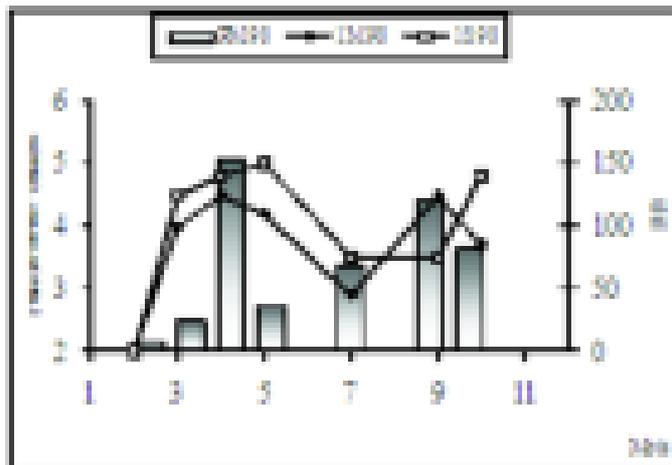
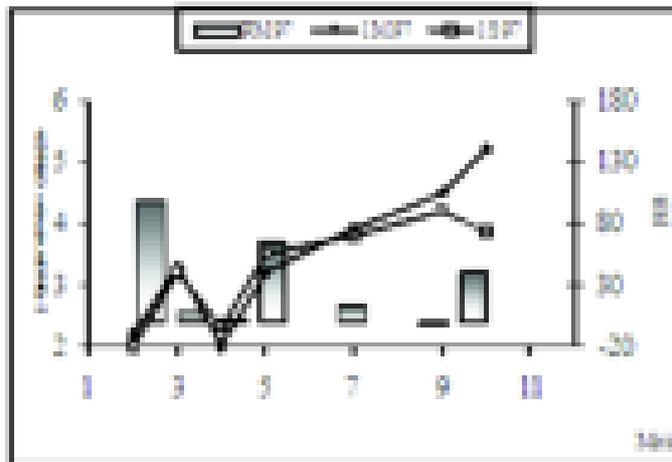


Figure 12. Variations de PSS comparées aux fluctuations des précipitations mensuelles (PM) pour l'année 1997 et 1998

Les populations de *P. syringae* dans et sur les bourgeons ont été estimées entre 0 et 10^2 bactéries par bourgeon, alors que la population totale était de l'ordre de 10^3 à 10^5 cfu / bourgeon. Les faibles températures enregistrées au cours du mois de février, qui variaient entre -2 et 12 C (1997 et 1998) peuvent être à l'origine des faibles niveaux observés. En effet, la température optimale pour la croissance de *P. s. pv. syringae* est située à 28 C (Young, 1991). Néanmoins, il est capable de se développer dans une gamme de température large. Ainsi en-dessous de cet optimum les populations de la bactérie ont une croissance plus lente mais il semble que certaines voies métaboliques soient favorisées. La température intervient aussi comme un facteur déterminant dans la mise en place du pouvoir glaçogène (Henis et Bashan, 1986 ; Hirano et Upper, 1990).

Les niveaux de population de *Pseudomonas* relevés sur les fleurs sont différents de ceux qui ont été notés chez les bourgeons. Cependant, il faut tenir compte du fait qu'un bourgeon génère un bouquet floral (3-7 fleurs) et que les effectifs des bactéries par

fleur varie de 10^3 à 10^4 . Donc dans ce cas on peut estimer l'accroissement réel des populations entre le stade bourgeon et le stade fleur (l'effectif au stade fleur est égal au nombre de bactéries par fleur multiplié par le nombre de fleurs par bouquet). Quand les conditions abiotiques ne sont pas limitantes, les bactéries trouvent un support idéal pour leur développement dans les fleurs par la disponibilité de nutriments (les produits des nectaires). Aucune différence notable n'a été notée entre les vergers malades ou sains. En revanche, une différence est observée pour la population bactérienne totale entre les vergers situés en Dordogne (site 2) et ceux de Maine et Loire (site 1). Ceci peut s'expliquer probablement par des conditions climatiques plus favorables en Dordogne.

La colonisation de la surface des feuilles par les populations bactériennes résidentes a montré une évolution croissante (passant de 10^3 à 10^5 bactéries par organe) dans le temps, favorisée par les conditions de température et une humidité relative favorable (T: 9,9 à 21,3 C, HR: 44 et 100%). Une chute de niveau de population estivale est observée (de 10^5 à 10^2) pour le mois de juillet en 1997 et 1998. Cette dernière ne semble pas être causée par la température (15,8 et 21°C) ni par l'humidité (50 et 100%) mais probablement par l'action du rayonnement ultra-violet. En effet, l'exposition des feuilles aux radiations UV à des doses tolérables pour les plantes, permet une élimination totale des populations pathogènes épiphytes sur la surface. Néanmoins, la présence de sites protégés des rayonnements à la surface foliaire permet aux bactéries épiphytes d'échapper à l'éradication totale (Barnes, 1965 ; Henis et Bashan, 1986 ; Haefele et Lindow, 1987)

Il apparaît clairement que l'étude de la dynamique des populations bactériennes peut se révéler intéressante dans la mesure où on considère tous les facteurs qui interagissent entre eux. Ainsi, les effectifs des populations bactériennes épiphytes de *Pseudomonas syringae* qui sont observés montrent des fluctuations faibles. Cependant, il semble difficile de faire une interprétation précise étant donné que les effectifs peuvent subir des variations importantes d'un jour à l'autre, et même d'une heure à l'autre sous l'influence des conditions de l'environnement (Hirano, 1989 et 1991). Pour une meilleure évaluation de la dynamique des populations bactériennes épiphytes, il serait judicieux d'analyser plusieurs échantillons représentatifs par mois et de réaliser l'enregistrement des données climatiques au niveau des parcelles .

La présence d'une population totale à des niveaux importants montre que les bactéries commensales n'ont pas les mêmes besoins que celles de PSS.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de conclure que *P. syringae* fait partie de la composante de la microflore épiphyte des organes aériens du Poirier, même si les niveaux de population n'étaient pas élevés. Des fluctuations en fonction des saisons ont été aussi observées, ce qui sous-entend que les facteurs climatiques peuvent jouer un rôle déterminant. Une augmentation sensible des populations de PSS est enregistrée après des périodes de précipitation, ce qui confirme le rôle de l'humidité dans la colonisation du phylloplan par les bactéries épiphytes. Sur Haricot, Hirano *et al* (1991) ont observé qu'une forte augmentation des populations PSS était précédée souvent par des périodes pluvieuses. Ils ont également comparé l'évolution du rapport souches pathogènes/souches non pathogènes du Haricot parmi les populations de PSS et ils ont observé une augmentation de ce rapport, dont la cause a été attribuée à la vitesse de multiplication importante des souches pathogènes sur leur propre plante hôte.

Yessad (1992), par le travail réalisé sur la dynamique des populations des bactéries installées artificiellement sur Poirier, a montré que deux bactéries de capacités épiphytes

différentes se distinguent non seulement par leur aptitude à se multiplier en conditions favorables mais par leur aptitude à survivre aux conditions d'environnement défavorables, en particulier à une faible humidité relative. Les souches pathogènes de PSS homologues apparaissent les plus aptes à résister aux conditions défavorables donc à se maintenir et à se multiplier à la surface de l'hôte.

Les gènes *hrp* semblent impliqués dans la vie épiphyte des bactéries. En effet, un mutant *hrp*⁻ (PS 88.1) de PSS obtenu par transposition a montré une aptitude réduite à la colonisation de feuilles de Poirier comparé à celle de la souche pathogène (Yessad 1992). L'inoculation de plants de tomate par des souches de *P. s. pv. tomato* et PSS (GMI 8209 et CFBP 3077) ainsi que par leurs mutants *hrp* respectifs (GMI 8209 et PS 88.1) a montré que les niveaux de colonisation des souches sauvages sont supérieurs à ceux des mutants (Niknejad, 1998).

La caractérisation plus approfondie des isolats collectés au cours de cette étude et la détermination de leur aptitude pathogène va nous permettre d'identifier la composante en *Pseudomonas* épiphytes potentiellement pathogènes du Poirier.

CHAPITRE III : CARACTERISATION DES PSS EPIPHYTES DU POIRIER ET DU POMMIER

Introduction

L'étude de la dynamique des populations épiphytes des organes aériens de Poirier et de Pommier, a montré la présence de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (PSS) en phase épiphyte. Une caractérisation poussée de ces isolats a été menée de façon à dégager une compréhension de l'ensemble de leur structuration.

Au cours de ce troisième chapitre nous étudierons :

1. le pouvoir pathogène des isolats pour déterminer le potentiel infectieux de la population épiphyte de PSS sur diverses plantes hôtes (Poirier, Pommier, Lilas, Citrus et Haricot),
2. la diversité phénotypique des isolats sur la base de: 19 tests conventionnels et l'assimilation des 99 sources de carbone de la galerie Biotype 100,
3. la production de syringomycines, l'activité glaçogène et les groupes sérologiques auxquels appartiennent les souches.

Une bactériothèque de 138 isolats a été constituée à partir des isolements effectués au cours du suivi des populations de *Pseudomonas* fluorescents épiphytes pour les années 1997 et 1998. Cette collection provient des sites décrits dans le chapitre II. Les bactéries ont été isolées après broyage de bourgeons (5%), de fleurs (25%) et de feuilles (70%). Les isolats sont retenus sur la base d'une première caractérisation par la production de pigment fluorescent, l'absence de cytochrome-c oxydase et la production de réaction d'hypersensibilité sur feuille de tabac. Les isolats ont été conservés soit par lyophilisation, soit par congélation à -80 C. Pour les différents tests, les bactéries ont été cultivées sur Milieu B de King (King *et al.*, 1954).

1. Etude du Pouvoir pathogène des isolats de PSS épiphytes

Les souches de *P. s. pv. syringae* sont pathogènes sur un grand nombre de plantes : plus de 180 espèces végétales appartenant à des genres de familles botaniques différentes (Bradbury, 1986). Dans une interaction compatible pathogène/plante hôte, les symptômes qu'elles induisent se manifestent sous forme de nécroses des tissus parenchymateux, des fleurs, des feuilles et des tiges. Pour déterminer le potentiel infectieux de la population épiphyte de PSS, nous avons étudié le pouvoir pathogène des isolats sur diverses plantes

hôte de PSS (Lilas , Poirier, Pommier, Haricot, Citrus). Différents tests de mise en évidence du pouvoir pathogène ont été utilisés.

1.1. Matériel et méthodes

1.1.1. Matériel végétal

Le pouvoir pathogène, a été testé sur deux types de matériel végétal : plantes entières issues de semis, et feuilles détachées.

- Semis de Poirier

Les semis de Poirier de la variété Kirschensaler sont obtenus en serre à partir de graines du commerce. Pour la levée de la dormance, les graines sont maintenues à 4 C sous humidité saturante pendant 90 jours. Après la levée, les jeunes plantes sont repiquées en pots au stade deux à trois feuilles. Les plants de semis sont inoculés au stade 8 à 10 feuilles.

- Semis de Pommier

Les graines du cultivars Golden Delicious, issues d'une pollinisation ouverte, sont utilisées pour l'obtention de plant de semis selon le même protocole que celui suivi pour la production des semis de Poirier. Les jeunes plantes sont aussi utilisées au stade 8 à 10 feuilles.

- Plant de Lilas

Les plants de Lilas ont été produits en serre à partir de graines de la variété " Mme Lemoine ". La dureté des graines a nécessité un traitement thermique pour la levée de la

Tableau 9. Liste des souches de *P s. pv. syringae* de collection utilisées pour les tests du pouvoir pathogène

PSS	Date d'isolement	origine	Origine d'isolement
CFBP 311	1962	France	<i>Pyrus communis</i>
CFBP 602	1964	France	<i>Malus sylvestris</i>
CFBP 1147	1962	France	<i>Pyrus communis</i>
CFB P 1392	1950	Royaume Uni	<i>Syringa vulgaris</i>
CFBP 1779	1962	Grèce	<i>Citrus sinensis</i>
CFBP 3077	1992	France	<i>Pyrus communis</i>
Dan 86-4 PSY 88-1 hrp	1986 1992	Etats Unis France	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Pyrus communis</i>

dormance. Après la levée, les jeunes plants de semis sont repiqués dans des pots et inoculés au stade 8 à 10 feuilles.

- Semis de Citrus

Des semis de citronnier sont obtenus en serre à partir de graines du récupérées à partir des fruit. Pour la levée, les graines sont maintenues sous humidité saturante. Après la levée, les jeunes plantes sont repiquées en pot au stade deux à trois feuilles. Les plants de semis sont inoculés au stade 8 à 10 feuilles. Des feuilles provenant d'orangers (variété Thomson navel) cultivés en conteneur sous serre ont été utilisées pour le test du pouvoir pathogènes sur feuilles détachées.

- Gousses de Haricot

Pour l'obtention des gousses, des graines de haricot de la variété " Michelet " sont semées en pots en serre. Les plantes sont cultivées jusqu'à formation des gousses. Ces dernières sont récoltées au début du stade du grossissement des graines pour être inoculées.

1.1.2. Bactéries

Le pouvoir pathogène est testé sur une sélection de 65 isolats issus de la microflore du Poirier et Pommier. Six souches de la collection appartenant au pathovar *syringae* sont utilisées comme témoin : une souche isolée de Poirier (CFBP 3077), une souche isolée de Pommier (CFBP 602), une souche type du pathovar isolée de Lilas (CFBP 1392), une souche isolée de Citrus (CFBP 1779), une souche isolée de Haricot (Dan 86-4) et un mutant *hrp*⁻ (88-1) de la souche CFBP 3077 (Yessad, 1992) (Tableau 3.1).

1.1.3. Méthode d'inoculation

1.1.3.1. Inoculation par blessure

- Inoculation plants de Lilas, semis de Poirier, de Pommier, de Haricot et de Citrus

Les semis de Poirier, Pommier, plant de Lilas et de Citrus sont inoculés par dépôt d'une goutte de 20 µl de suspension bactérienne sur une blessure faite sur la nervure principale, à l'aide d'un scalpel. La suspension est préparée au préalable à partir d'une culture bactérienne de 24 h ayant poussé sur un milieu B de King. Trois concentrations d'inoculum ont été testées : 10⁶, 10⁸, et 10⁹ ufc/ml et deux concentrations seulement 10⁶ et 10⁹ ufc/ml pour le Citrus et le Lilas.

L'incubation du matériel végétal est réalisée dans des mini serres placées dans une chambre de culture à une température de 19-20°C. Les symptômes sont notés après 3 et 7 jours. La notation est faite sur l'observation de l'apparition de la nécrose au niveau de la blessure et sa progression le long de la nervure principale ainsi que sur le limbe.

- Inoculation de feuilles détachées

De jeunes feuilles sont prélevées à partir de plants de semis, lavées dans de l'eau à 2% d'hypochlorite de sodium et rincées trois fois dans de l'eau distillée stérile (Figure 3.1). Elles sont inoculées en suivant la méthode décrite précédemment avec 20 µl de suspension bactérienne ajustée à 10⁶ et 10⁸ bactéries par ml. Pour chaque souche, cinq feuilles sont

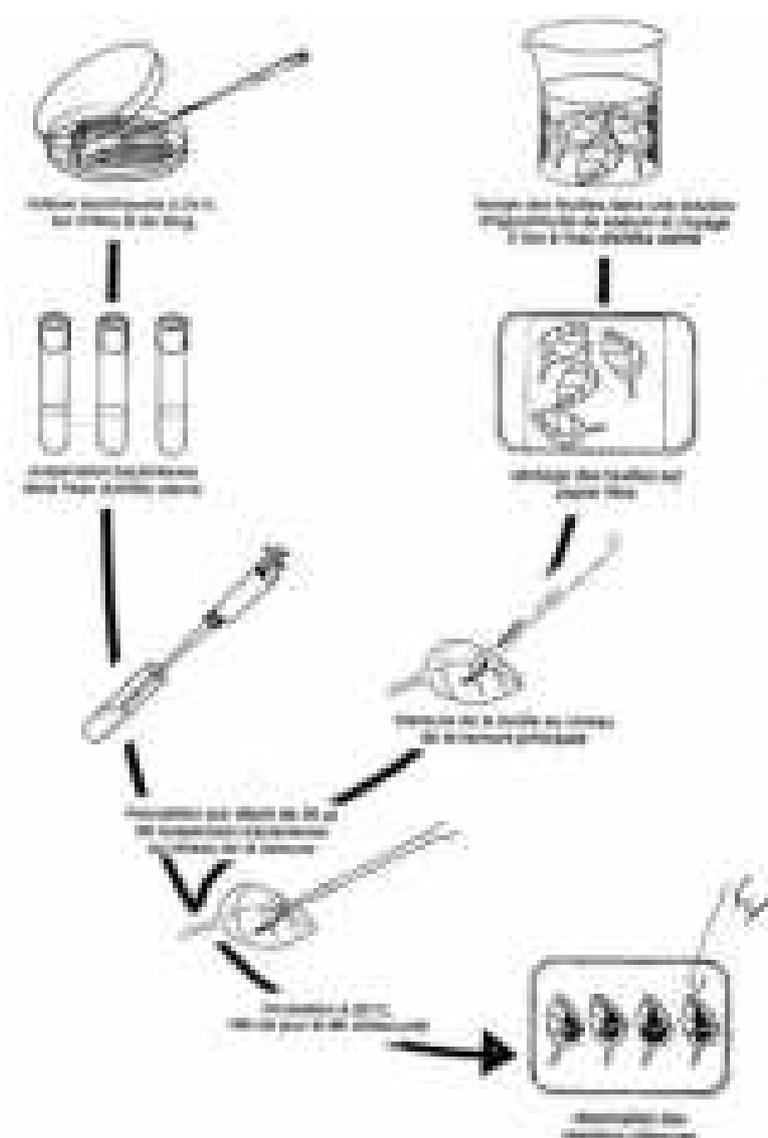


Figure 13 : protocole d'inoculation des feuilles détaché lors du testes de pouvoir pathogène de *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*

inoculées et placées dans des boîtes de Petri, sur des disques de papier filtre stérile déposés à la surface d'un milieu solide d'eau gélosée. Ce dernier va assurer une humidité saturante. Les boîtes de Petri sont scellées par un parafilm. Les boîtes ainsi préparées sont incubées dans une chambre de culture pendant 10 jours à une température de 24 C le jour et 20 C la nuit. La photopériode est de 16 h de jour et 8 h d'obscurité.

1.1.3.2 Inoculation par infiltration sous vide

La technique d'infiltration sous vide a été préconisée pour tester les isolats qui ont présenté différentes réactions sur le matériel végétal testé par l'inoculation avec blessures (Faize, 2000). Avant l'infiltration, les semis sont placés dans des mini-serres avec une humidité saturante afin de favoriser l'ouverture des stomates qui facilitera l'infiltration. La technique consiste à plonger les jeunes feuilles de semis dans un bêcher contenant une suspension bactérienne et à placer le dispositif dans une cloche dans laquelle on réalise un vide de

8.10^{-3} Pa pendant 5 min. La rupture brutale du vide permet l'aspiration de la suspension bactérienne dans les espaces intercellulaire des feuilles de Poirier et de Pommier. Les plants de semis infiltrés sont incubés dans une chambre de culture à une température de 22 C le jour et 19 C la nuit avec une

Tableau 10. Pouvoir pathogène de 65 isolats de PSS épiphytes de Poirier et Pommier

Hôte	Symptômes évolutifs	Réaction localisée	Pas de réaction	Total
Lilas	15 (23 %)	10 (15 %)	40 (62 %)	65
Poirier	23 (35 %)	14 (22 %)	28 (43 %)	65
Haricot	25 (45 %)		20 (55 %)	45
Pommier	4 (6 %)	14 (22 %)	47 (72 %)	65
Citrus	3 (13 %)	5 (11 %)	37 (82 %)	45

Tableau 11. Détail du pouvoir pathogène sur semis de Poirier : selon les plantes d'origine des PSS

Origine des isolats	Noircissement évolutif du limbe	Nécrose progressive des nervures	Réaction localisée	Pas de réaction	Total
Poirier	10 (22 %)	9 (19 %)	10 (22 %)	17 (37 %)	46
Pommier	0	4 (21 %)	4 (21 %)	11 (57 %)	19
Total	10 (15,5 %)	13 (20 %)	14 (21,5 %)	28 (43 %)	65 (100 %)

humidité relative de 90%. La notation des symptômes est effectuée après 3 et 7 jours d'incubation.

1.2. Resultats

Dans les différents tests du pouvoir pathogène, les souches de collection ont été utilisées sur leur hôte d'origine à titre de référence positive sur l'exécution du test en homologue.

1.2.1. Inoculation du lilas

Parmi les 65 isolats étudiés, 15 souches issues de Poirier montrent une réaction positive sur Lilas, par des symptômes évolutifs qui se développent le long des nervures, et finissent par recouvrir tout le limbe (tableau 3.2). Parfois, leur développement se poursuit jusqu'à la tige. Une réaction localisée autour de la blessure est donnée par 15% des isolats testés. En revanche, 62% isolats n'ont révélé aucun symptôme. Les isolats obtenus à partir de la microflore épiphyte du Pommier n'ont pas exprimé de pouvoir pathogène sur le Lilas.

1.2.2. Inoculation du Poirier

Blessure de semis de Poirier

Parmi les 65 isolats inoculés sur semis de Poirier 23 isolats donnent des symptômes dont 10 induisent des nécroses évolutives (Tableaux 3.2 et 3.3) caractérisées par le noircissement du limbe. Treize isolats ont provoqué des nécroses progressant le long de la nervure principale et des nervures secondaires dont trois avaient une réaction négative avec une concentration d'inoculum de 10^6 ufc/ml. Quatorze ont provoqué une réaction nécrotique

localisée autour de la blessure. Les isolats restants n'ont donné aucun symptôme visible quelle que soit la dose d'inoculum utilisée.

· Blessure de feuille détachée de semis de Poirier

Les isolats présentant des réactions sur feuilles détachées ont été inoculés sur semis de Poirier par blessure. Le même type de réaction est obtenu sur feuilles détachées est que sur semis de Poirier. Le premier groupe induit le noircissement évolutif du limbe partir de la blessure, le second provoque des nécroses évolutives le long de la nervure principale et des nervures secondaires, le troisième induit des nécroses localisées et le dernier est celui qui ne donne

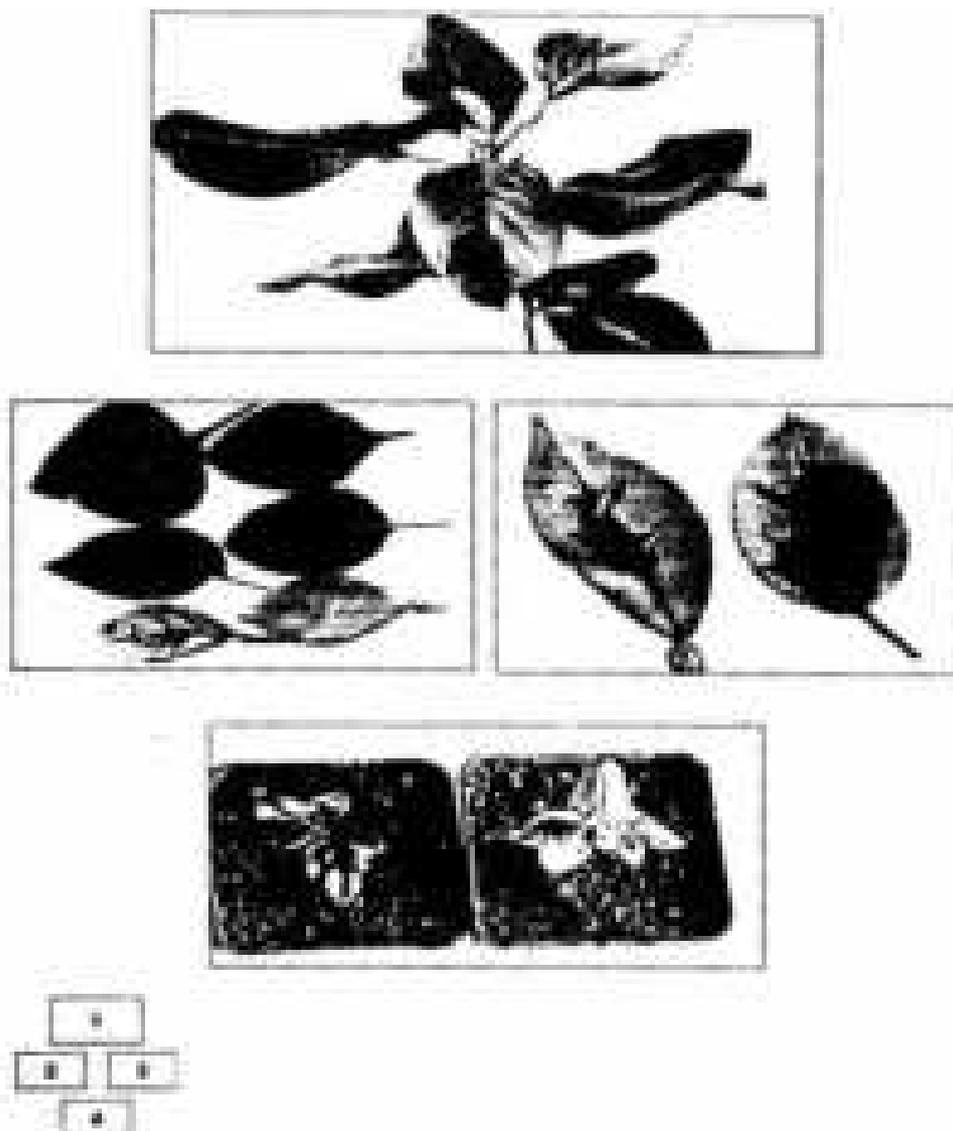


Figure 14 : 1-Plant de semis de Poirier inoculés par blessure. 2- Apparition de réaction nécrotique sur feuille détachée de Lilas, poirier et Citrus. 3- Comparaison d'une réaction nécrotique sur Citrus et Poirier. 4- Plant de semis de Poirier et de Pommier inoculé par infiltration sous vide.

aucun symptôme. Les souches CFBP 311, CFBP 1147 (isolées de Poirier) et le mutant 88.1 n'induisent pas de symptômes sur Poirier (ni semis, ni feuille détachées). Les souches 1392^T et 3077 provoquent une réaction de noircissement évolutif du limbe.

- Infiltration sous vide

L'inoculation par infiltration sous vide a montré que les isolats induisant une nécrose évolutive provoquent une nécrose des nervures aboutissant au noircissement de toute la feuille.

1.2.3. Inoculation du Pommier

- Sur semis de Pommier

Sur les 65 souches testées 4 souches provoquent des lésions qui apparaissent autour de la blessure et qui sont évolutives (Tableau 3.2). Quatorze isolats induisent une nécrose localisée au niveau de la blessure à forte dose d'inoculum (10^8 - 10^9 ufc/ml). Le reste (72%) des isolats ne donne aucune réaction apparente quelle que soit la dose de bactéries inoculée. Les isolats dont la réponse était négative sur blessure n'induisent aucune réaction lors de leur infiltration sous vide.

- Sur feuille détachée

L'inoculation des feuilles détachées de Pommier donne les mêmes résultats que ceux obtenus sur semis. L'inoculation sous vide des isolats ayant donné des nécroses localisées sur feuille détachée, provoque des taches nécrotiques réparties sur l'ensemble de la feuille infiltrée.

1.2.4. Inoculation sur Haricot

Parmi les 45 isolats inoculés sur gousses de Haricot, toutes les réactions nécrotiques obtenues sont évolutives (25 isolats) (tableau 3.2). Les autres isolats testés ainsi que la souche de *P. s. pv. syringae* CFBP 1392, n'induisent aucune réaction visible. Par contre, les souches de *P. s. pv. syringae* CFBP 3077 isolée du Poirier et Dan 86-4 isolé de Haricot provoquent une réaction évolutive.

1.2.5 Inoculation des Citrus

Pour l'ensemble des 45 isolats testés, 3 souches induisent des nécroses évolutives et 5 isolats ont provoqué une réaction nécrotique localisée au niveau de la blessure (Tableau 3.2). Le reste (82 %) des isolats ne provoque aucun symptôme. L'infiltration sous vide n'a pas révélé les mêmes réactions que celle obtenue par l'inoculation par blessure car les feuilles de Citrus ont montré une résistance à l'infiltration sous vide.

1.2.6. Pathotypage des isolats

L'expression ou non de symptômes sur la gamme d'hôtes testée a permis de répartir les isolats étudiés en six pathotypes différents. Tous les isolats testés développent une réaction d'hypersensibilité (RH) sur feuilles de Tabac (Tableau 3.4).

Pathotype 1 : est caractérisé par l'expression de réaction sur Lilas, Poirier et Haricot. Il regroupe 15 isolats (23%)

Pathotype 2 : est défini par la production de nécrose sur Poirier et Haricot. Il est constitué de 10 isolats (15%)

Pathotype 3 : se caractérise par l'expression de réaction sur Poirier. Il regroupe 5 isolats (8%).

Pathotype 4 : se définit par le développement de symptômes sur Poirier, Pommier et le Haricot. Il est constitué de 4 isolats (7%).

Pathotype 5 : est caractérisé par l'expression du pouvoir pathogène sur Lilas, Poirier et Citrus. Il regroupe 3 isolats (5%)

Pathotype 6 : Ce dernier caractérise les isolats non pathogènes sur notre gamme d'hôtes mais qui développent une réaction d'hypersensibilité Tabac. Il renferme la majorité des isolats

(28) soit 43% de l'effectif total des isolats testés.

Pathotypes	Plantes testées					Nombre d'isolats(%)
	Lilas	Poirier	Haricot	pommier	Citrus	
P1	+	+	+	-	-	15 (22%)
P2	-	+	+	-	-	10 (15%)
P3	-	+	-	-	-	5 (8%)
P4	-	+	+	+	-	4 (6%)
P5	+	+	-	-	+	3 (5%)
P6	-	-	-	-	-	28 (43%)
Total						65 (100%)

Tableau 12. Différents pathotypes des isolats de PSS.

1.3.Discussion

L'inoculation de jeunes plants issus de semis, cultivés en conditions contrôlées, permet d'obtenir des réponses rapides et fiables. L'inoculation par blessure de la nervure principale de feuilles différencie nettement les souches en fonction de leur agressivité. Cette technique conduit à l'expression du même type de réaction sur feuilles attachées ou détachées. Cependant, l'utilisation des feuilles détachées est plus pratique d'une part, par leur disponibilité (semis en serre, arbre au champ) et d'autre part la facilité d'inoculation.

L'utilisation de différentes techniques d'inoculation a permis de montrer qu'il existe trois types de symptômes sur feuilles de Poirier : une nécrose évolutive de couleur noire caractéristique de la maladie naturelle due à *P. s. pv. syringae*, une nécrose progressive le long des nervures et enfin une nécrose localisée au point d'inoculation. Cependant, un faible pourcentage des isolats de la microflore épiphyte du Poirier provoque la réaction typique de la maladie (22%). Le pourcentage d'isolats (22%) qui induit des lésions nécrotiques localisées est aussi faible par rapport au nombre de souches qui ne donnent aucune réponse

après inoculation (37%). L'infiltration sous vide des isolats à l'origine de nécrose localisée ne révèle pas de différence de réaction ce qui laisse penser que ce type de manifestation peut être une réaction de défense de l'hôte sous forme d'hypersensibilité.

Parmi les isolats testés sur gousses de Haricot, certains ont montré une réaction nécrotique. En revanche, nous n'avons pas noté d'isolats de PSS responsables de lésion vitreuse. Chang *et al.* (1989) ont montré que le symptôme de la tache vitreuse est spécifique des souches responsables de la maladie des " taches brunes " du Haricot.

Nous avons constaté que malgré un phénotype identique, les isolats de PSS peuvent présenter un pouvoir pathogène différent. Cependant, le pathovar *syringae* selon la définition taxonomique de Young (1991) doit être pathogène du Lilas. Sur l'ensemble des isolats testés, un quart seulement est pathogène du Lilas (23%). Yessad (1992) avait observé un pourcentage plus élevé (63%) de PSS pathogènes sur Lilas. Un problème de nomenclature se pose donc pour attribuer un pathovar aux pathogènes sur Poirier et en même temps sur Haricot ou Citrus, si on se base sur le principe de Young (1991).

La caractérisation du pouvoir pathogène de nos isolats a permis de constater l'existence d'une variabilité de son expression. En effet, les résultats obtenus pour les isolats testés montrent la présence de six pathotypes différents. Le pathotypage des isolats nous a permis de montrer que le Poirier qui est le support d'origine, peut héberger aussi bien des souches qui lui sont pathogènes que les souches n'induisant aucune réaction (non virulentes). Le pathotype majoritaire est représenté par 43% des isolats qui ne provoquent aucun symptôme sur tout le matériel végétal testé (Lilas, Poirier, Pommier, Haricot et Citrus).

Les résultats des tests du pouvoir pathogène sur Poirier ont montré que des isolats n'induisent qu'une réaction localisée, d'autre ne provoquant aucun symptôme apparent et des isolats qui établissent une réaction compatible par la production de la maladie. Ces résultats suggèrent l'existence, d'une part, d'une spécificité dans le développement de la réaction évolutive et d'autre part des isolats non pathogènes du Poirier, qui peuvent provenir d'autres plantes sur lesquelles ils seraient pathogènes. Ces derniers peuvent être considérés comme des populations épiphytes occasionnelles du Poirier. En effet, de nombreux travaux rapportent qu'une importante proportion d'isolats de *P. syringae*, isolée à partir d'un hôte donné, n'exprime pas de pouvoir pathogène sur cet hôte (Gross *et al.*, 1983 ; Hirano et Upper, 1983 ; Lindeman *et al.*, 1984). Gross *et al.* (1984) ont suggéré que le pathovar *syringae* est constitué par un groupe de souches caractérisé par une spécificité vis à vis d'un spectre d'hôtes.

Des travaux réalisés sur la spécificité du pouvoir pathogène ont montré que lorsqu'une souche est pathogène, elle a la potentialité de donner des symptômes sur d'autres plantes hôtes. C'est un phénomène qui semble largement répandu chez *P. s. pv. syringae* (Latorre et Jones, 1979 ; Gross *et al.*, 1984 ; Endert et Ritchie, 1984 ; Bacca et Moore, 1987 ; Malvick et Moore, 1988 et Yessad, 1992).

Les résultats de l'étude du pouvoir pathogène des isolats de PSS issus de la population épiphyte du Poirier, nous permettent donc de conclure qu'il existe une grande diversité dans l'expression du pouvoir pathogène. En effet, il existe au sein de la population *P. s. pv. syringae* des souches pathogènes et des souches non pathogènes sur les plantes testées, mais capables de produire une réaction d'hypersensibilité sur Tabac. Les isolats pathogènes diffèrent

Strain	Host	Isolation	Geographical origin	Pathovar
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				
51				
52				
53				
54				
55				
56				
57				
58				
59				
60				
61				
62				
63				
64				
65				
66				
67				
68				
69				
70				
71				
72				
73				
74				
75				
76				
77				
78				
79				
80				
81				
82				
83				
84				
85				
86				
87				
88				
89				
90				
91				
92				
93				
94				
95				
96				
97				
98				
99				
100				

Tableau 13 : liste des souches utilisé dans la taxonomie numérique

donc les uns des autres par leur virulence : certains pathogènes d'un seul hôte et d'autres induisant des symptômes sur plusieurs hôtes (Poirier/Lilas, Poirier/Lilas/Citrus, Poirier/Pommier/Haricot, Poirier/Lilas/Haricot). Ceci mériterait une redistribution des souches actuellement attribuées au pathovar syringae en de nouveaux pathovars en fonction de la spécificité parasitaire.

2.Caractérisation phénotypique des isolats epiphytes du poirier et du pommier

Pour caractériser de façon poussée les *P. syringae* appartenant aux populations épiphytes isolées des organes aériens du Poirier et du Pommier, nous avons fait appel aux techniques suivantes :

- les caractères biochimiques et nutritionnels
- la production de syringomycines
- l'activité glaçogène
- la sérologie.

2.1. Matériel et Méthodes

2.1.1. Les bactéries

138 isolats de *Pseudomonas* fluorescents renfermant 71 isolats de Poirier et 67 isolats de Pommier ont été étudiés vis à vis des caractères biochimiques. Une sélection de 36 isolats représentative de la collection par leurs origines (sites et situation des vergers) a été caractérisée.

Les souches de collection CFBP représentant tous les pathovars et les espèces connus du groupe *P. syringae-viridiflava* (58 souches) ont été inclus dans la taxonomie numérique. Par ailleurs, pour apprécier la distribution des isolats étudiés au niveau du groupe *P. syringae*, nous avons inclus dans notre étude deux souches de référence du pathovar *syringae* (CFBP 1392^T et CFBP 1543) qui présente une certaine distance l'une de l'autre. D'après Gardan *et al.* (1991), la souche CFBP 1543, par sa position centrale, serait le bon représentant du pathovar *syringae* comparée à la position marginale de la souche type CFBP 1392.

2.1.2. Caractérisation biochimique

2.1.2.1. Tests conventionnels

Vingt tests conventionnels ont été utilisés. La plupart des techniques, à l'exception de la mise en évidence de l'activité pectolytique (Prunier et Kaiser, 1961), ont été empruntées à Lelliott *et al.* (1966) : production de levane, présence d'une cytochrome oxydase et d'arginine dihydrolase, induction de réaction d'hypersensibilité sur feuille de tabac, production d'acide à partir de saccharose, sorbitol, érythritol, mannitol, réduction des nitrates, lipolyse à partir du tween 80, et hydrolyse de l'esculine. De plus, nous avons recherché la formation de puits sur gel de polypectate à pH5 et pH8 (Hildebrand, 1971), l'assimilation des acides organiques DL-lactate, L(+)-tartrate, D(-)-tartrate (Schaad, 1988), et la présence de DNase sur DNAgar.

Les substrats testés sont préparés stérilement par filtration et sont ajoutés au milieu Ayers (Ayers *et al.*, 1919) contenant un indicateur de pH, puis sont répartis soit en tubes à raison de 3 ml/tube, soit en boîte de Petri (20 ml/boîte). L'utilisation de la source de carbone par la bactérie se traduit par l'acidification du milieu pour les sucres et alcools ou l'alcalinisation dans le cas des sels d'acides organiques.

Pour les tests en tube, les bactéries sont ensemencées par piqûre et la lecture est faite par observation dans un délai de dix jours. En boîte de milieu gélosé, l'ensemencement est réalisé par dépôt d'une goutte de 20 µl d'une suspension bactérienne ajustée au préalable à 10⁸ ufc/ ml ou par dépôt à l'anse de culture bactérienne. Deux répétitions sont effectuées pour chaque isolat testé. La lecture des résultats est faite sur le changement de coloration, la croissance bactérienne ainsi que la formation de puits sur le gel de polypectate pH 5 ou pH 8 (Hildebrand, 1971).

Test " Biotype 100 "

L'assimilation de 99 différentes sources de carbone (sucres, alcools, acides organiques et acides aminés) a été testée par l'utilisation de galeries Biotype 100 (BioMérieux, La Balme -Les Grottes, France). Des suspensions bactériennes ajustées à 10^7 ufc/ml sont préparées à partir d'une culture de 24 h dans des tubes contenant 4,5 ml d'eau stérile. Deux millilitres de suspension sont ajoutés à 60 ml de milieu minéral de base (milieu 1, fourni avec les galeries) et

400 µl de milieuensemencé sont distribués dans chaque microtube de la galerie à l'aide d'une pipette automatique de 5000 µl (Proline Electronic Monocanal 5000, Biohit, Bonnelles, France). Les galeries sont incubées à 25 C et la lecture est faite par la constatation d'une opacité du milieu, ou d'un changement de couleur en fonction du substrat. Ces mesures sont effectuées 2, 4, et 6 jours après l'ensemencement.

2.1.2.2.Taxonomie numérique

Les résultats des 19 caractères conventionnels, associés à ceux des 99 caractères des Biotypes 100, vont permettre de réaliser des dendrogrammes des distances des isolats par l'utilisation de la taxonomie numérique. Les coefficients de capacité de diagnostic (ccd), obtenus après détermination des niveaux de coupures satisfaisants, permettent de déterminer les caractères distinctifs entre les différents groupes de souches.

2.1.3.Production de syringomycines

Pour la mise en évidence de la production de syringomycines *in vitro* nous avons utilisé la technique décrite par Zhang et Takemoto (1987) qui consiste dans l'utilisation comme micro-organisme indicateur de la levure *Rhodotorula pillimanae*.

Des suspensions bactériennes des isolats étudiés sont préparées dans du bouillon PDB (annexe I) à une concentration de 10^8 ufc/ml. Des membranes de filtration de 47 mm de diamètre et d'une porosité de 0,22 µm sont placées au préalable à la surface d'un milieu gélosé PDA (annexe I). Cent microlitres de suspension à tester sont déposés au centre de chacune des membranes. Après cinq jours d'incubation des boîtes de Petri à 25°C, les membranes sont retirées et une suspension de 10^7 ufc/ml de *Rhodotorula pillimanae* est étalée sur la surface. Les boîtes sont ensuite remises à incuber pendant 48h à 25°C. Des zones d'inhibition de la levure apparaissent au niveau de l'emplacement de la culture bactérienne indiquant la production de syringomycine.

2.1.4.Détermination de l'activité glaçogène

Pour chaque isolat, des suspensions bactériennes sont préparées dans des tubes à essai contenant 4,5 ml d'eau distillée stérile à partir de culture de 24 h et à des concentration de 10^4 ,

10^6 et 10^8 ufc/ml. Deux tubes contenant de l'eau distillée stérile sont utilisés comme témoin. Dans une première étape, les tubes sont plongés pendant 15 minutes dans un cryostat (bain thermostaté refroidi) dont la température a été réglée à 0°C. La deuxième étape consiste à abaisser la température graduellement jusqu'à -11°C, degré par degré en respectant un palier de 5 minutes (adaptation de la méthode décrite par Lindow et Staskawicz, 1981). La température à laquelle le contenu de chaque tube est cristallisé est notée.

2.1.5. Détermination des groupes sérologiques

Les sérogroupe-O sont déterminés conformément à la méthode de Saunier *et al.* (1996). Les réactions sérologiques des lipopolysaccharides (LPS) sont révélées par la méthode de double diffusion d'Ouchterlony.

2.1.5.1. Préparation des antigènes cellules entières

Des suspensions bactériennes très denses (10^{10} ufc/ml) sont préparées dans l'eau distillée pour servir d'antigène dans la réaction sérologique.

2.1.5.2. Anticorps

Les sérums utilisés ont été fournis par l'unité d'accueil (laboratoire de pathologie végétale). Ils avaient été produits par des lapins après injection intraveineuse de cellules bactériennes entières. Cinq injections sont réalisées en deux semaines suivies d'un repos de deux semaines, reprise des injections et la ponction est réalisée six jours après la dernière injection. Ils sont utilisés pour l'immunodiffusion dilués au demi.

Caractères	138 isolats	
	71 isolats de Poirier	67 isolats de Pommier
Production d'un pigment fluorescent	100	100
Nitrate	0	0
Levure	100	70
Coydase	0	0
Pectine	0	0
Arginine	0	0
Hypersensibilité aux Tubes	100	100
Escalase	100	100
Gélatine	98	97
Saccharose	100	100
DL lactate	85	93
L (+) tartrate	0	0
D (-) tartrate	27	40
Erythritol	90	99
Sorbitol	97	100
Mannitol	100	100
Tween 80	95	95
Polypectate		
pH 5	0	3
pH 8	0	0

Tableau 14: Taux des caractères positifs des 138 isolats de *P. syringae* issus de la microflore de Poirier et de Pommier

Biovars	arabitol	erythritol	DL lactate	D(-) tartarate	Poirier Nombre isolats	Pommier Nombre isolats
B1	+	+	+	-	43 (60%)	33 (58%)
B2	+	+	+	+	14 (20%)	18 (31%)
B3	+	+	-	-	6 (8%)	4 (7%)
B4	+	-	-	+	4 (6%)	1 (2%)
B5	+	-	+	-	1 (1,5%)	1 (2%)
B6	+	-	+	+	1 (1,5%)	0
B7	-	-	+	-	1 (1,5%)	0
B8	-	+	-	-	1 (1,5%)	0
Total					71 (100%)	57 (100%)

Tableau 15. Biovars rencontrés chez les isolats de PSS épiphytes testés

2.1.5.3. Technique sérologique

L'immunodiffusion est réalisée dans un gel d'agarose coulé sur une lame de verre dans lequel des puits d'une contenance de 22 µl sont découpés selon un format de rosace. Le puits centrale est rempli de sérum et les puits périphériques reçoivent les antigènes. La réaction de précipitation LPS-antisérum se traduit par la présence d'une bande unique, et révèle une identité totale ou partielle avec les références sérologiques testées. L'observation des bandes se fait 24 à 48 h, sur fond noir en éclairage latéral.

2.2. Resultats

2.2.1. Caractérisation biochimique

2.2.1.1. Isolats de Poirier

71 isolats provenant de la microflore des bourgeon , des fleurs et des feuilles ont les caractères suivants : fluorescence sur milieu B de King, production de levane, absence d'hydrolyse de la pectine, d'arginine dihydrolase, de nitrate réductase et produisent une réaction d'hypersensibilité sur tabac

La majorité des isolats de Poirier s'apparente au groupe Ia défini par Lelliott *et al.* (1966) suivant le LOPAT et ils sont identifiés à PSS par l'ensemble des tests conventionnels (Hildebrand et Schroth, 1972). Cependant, deux ont montré une réaction négative vis à vis de la gélatine et du sorbitol. Tous les isolats assimilent le saccharose, le mannitol et possèdent une α glucosidase (Tableau 3.6).

2.2.1.2. Isolats du Pommier

Parmi les 67 isolats du Pommier, dix ne produisent pas de levane sur milieu hypersaccharosé. La majorité des isolats s'identifie d'après le LOPAT au groupe Ia et les autres au groupe Ib de Lelliott *et al.* (1966).

2.2.1.3. Distribution en Biovars

En plus du LOPAT, la comparaison de l'assimilation de certains sucres (sorbitol et erythritol) et sels d'acides organiques(DL-lactate, L(+) tartrate et D(-) tartrate) a permis de répartir les isolats de *P. s. pv. syringae* en huit biovars différents (Tableau 3.7).

Le biovar 1, représente le biotype majoritaire. Il est caractérisé par l'assimilation de 3 substrats : le sorbitol, l'erythritol et le DL-lactate. Il regroupe 43 isolats soit 60% des bactéries de *P.s. pv. syringae* isolées de la surface aérienne du Poirier et 33 isolats (58%) issus du Pommier.

Le biovar 2 est défini par l'assimilation du D(-) tartrate , en plus des 3 substrats utilisés par le biovar 1. Il renferme 20% des isolats de Poirier et 31% issus de Pommier

Le biovar 3 est caractérisé par l'assimilation de deux substrats sur quatre: sorbitol et erythritol. Il comprend 6 isolats (8%) de Poirier et 4 isolats (7%) de Pommier

Le biovar 4 est caractérisé aussi par l'assimilation de 2 substrats : sorbitol et D(-) tartrate. Il est composé de 4 isolats (6%) obtenus à partir de Poirier et un isolat du Pommier.

Le biovar 5 est défini par l'utilisation du sorbitol et du DL lactate. Il est constitué par 2 isolats issus respectivement du Poirier et Pommier.

Le biovar 6 se caractérise par l'assimilation du sorbitol, du DL-lactate et D(-) tartrate. Il renferme uniquement un isolat (1,5%) issu de la microflore du Poirier

Le biovar 7 est défini par l'utilisation du DL lactate. Il est constitué par 1 isolat issu du Poirier

Le biovar 8 se caractérise par l'assimilation de l'érythritol. Il renferme uniquement un isolat (1,5%) issu de la microflore du Poirier

.Discussion

Les isolats obtenus de Pommier présentent une variabilité moindre que ceux isolés du Poirier. La majorité des isolats appartient au groupe la de Lelliott et al. (1966). Le Classement en

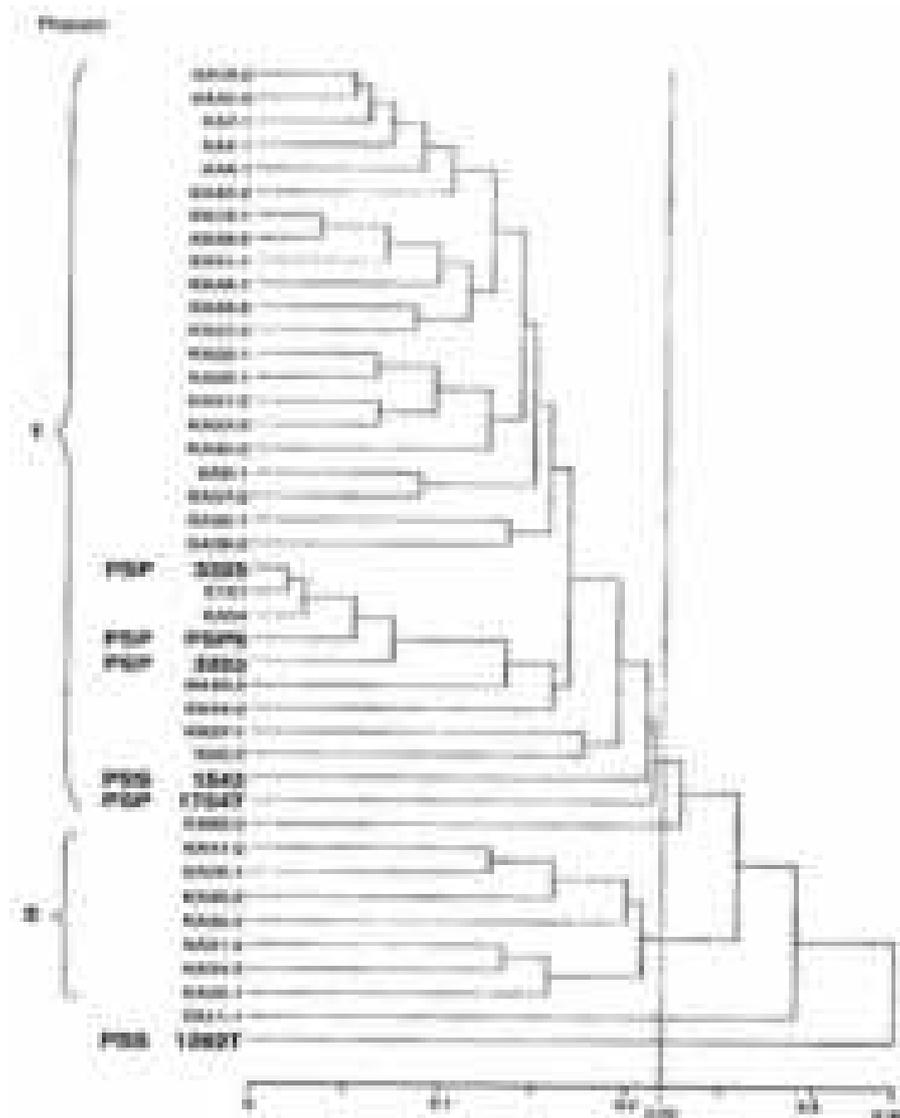


Figure 15: Dendrogramme des distances obtenues pour 36 isolats epiphytes du Poirier et du Pommier , 2 souches de *P. syringae* et 4 souches de PSP. Représentation des phénons à une coupure de 0.22. PSS : *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, PSP : *Pseudomonas syringae* pv. *populans*.

.biovar a permis de montrer l'existence d'un biovar dominant. Ce biovar majoritaire est caractérisé par l'assimilation du sorbitol, de l'erythritol et du DL-lactate. Il correspond au profil caractéristique de PSS défini par Hildebrand et Schroth (1972). Toutefois une certaine variabilité existe puisque 8 biovars ont été mis en évidence. Yessad (1992) a aussi montré l'existence de 9 biovars (biotypes) dans une collection de souches de PSS issues de différents hôtes. Le biovar majoritaire se caractérise par l'assimilation du sorbitol, inositol, erythritol, et le DL lactate. Il n'est pas spécifique des souches isolées de Poirier mais il regroupe des bactéries de PSS isolées d'hôtes variés. Cottin (1989) avait montré que des souches de PSS isolées de la surface de feuilles de Laurier palme se répartissent en 10 biovars différents, avec la présence d'un biotype majoritaire. Ce dernier est défini par l'assimilation du sorbitol, de l'erythritol, le DL lactate et le D(-)tartrate.

Le biovar majoritaire renferme tous les pathotypes (P1, P2, P3, P5 et P6), dont le dominant est le P6 (non pathogène sur les plantes testées). Une variabilité du pouvoir pathogène est observée entre les isolats qui le composent.

Les biovars 4, 5 et 6 sont constitués également d'isolats non pathogène (P6) sur notre gamme d'hôtes. Les isolats de PSS issus de la microflore épiphyte des organes aériens montrent une hétérogénéité sur le plan biochimique et pathologique. Aucune corrélation n'a été observée entre l'origine des isolats (sites) et le pouvoir pathogène.

2.2.1.4. Etude des 119 caractères biochimiques et nutritionnels

-Une première analyse

La taxonomie numérique est faite sur une sélection de 36 isolats de PSS appartenant à tous les biovars et issus des différents organes (bourgeons, fleurs et feuilles), de Poirier et Pommier, deux souches de PSS (CFBP 1392^T et CFBP 1543) et quatre souches de références de PSP (CFBP 1754^T, CFBP 3323, CFBP 3325 et PSP6)

La coupure réalisée à une distance satisfaisante de 0,22 laisse apparaître 2 phénons et 3 phénotypes isolés (Figure 3.3). Huit substances peuvent caractériser ces classes (Tableau 3.8)

Le phénon 1 est constitué par les 32 souches isolées de la microflore du Poirier et du Pommier ainsi que deux souches de la collection CFBP (CFBP 1543 et CFBP 1754).

Le phénon 2 renferme 7 isolats épiphytes des organes aériens dont 6 sont issus de Poirier et un isolat provient de la microflore du Pommier.

Les trois phénotypes isolés sont représentés par les isolats KA65.2 (Pommier), KA11.1 (Poirier) et la souche CFBP 1392. Ces trois souches semblent donc différentes des autres par leurs profils biochimiques.

L'analyse des profils biochimiques des caractères distinctifs montre :

Tableau 16. Profil biochimique des différents phénons définis par la taxonomie numérique sur les isolats du Poirier et Pommier (coupure à 0,22).

Phénons	1	2			
Substrats	(32 isolats)	(7 isolats)	KA 65.2 ^a	KA 11.1 ^a	CFBP 1392 ^a
Céto-D-glutarate	-	+	-	+	-
D-galacturonate	+	+	-	+	-
Trans-aconitate	+	+	+	-	-
Myo-inositol	+	+	+	+	+
D-saccharate	+	+	+	-	+
D-glucuronate	+	+	+	+	-
Erythritol	+	+(57%)	-	-	+
Trigonelline	+(62%)	-	+	-	+

^a phénotype isolé

le phénon 1 se distingue du phénon 2 uniquement par la Trigonelline(positif) et le céto-D-glutarate (positif). En revanche, il se différencie du phénon isolé représenté par la souche de PSS CFBP 1392 par trois caractères : l'utilisation du D galacturonate, du trans-aconitate et du D glucuronate

Deuxième analyse

Les 36 isolats ont ensuite été comparées aux 72 souches de la collection collection CFBP (représentant les différents pathovars de *P. syringae* et espèce de *Pseudomonas* (Tableau 3.5) La coupure réalisée au niveau 0,13 sur le dendrogramme des distances obtenus sur les 119

caractères phénotypique a permis de dégager 13 phénons et 61 phénotypes isolés (Figure 3.4). 18 substances peuvent caractériser les différents phénons (Tableau 3.9).

Le phénon 1 est composé de 12 isolats soit 33% des isolats testés et qui sont caractérisés d'après les 20 tests conventionnels comme étant des *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* représentants du groupe la défini par Lelliott *et al* (1966).

Le phénon 2 renferme 5 souches dont 2 isolats (KA54 et E121) sont issus de la microflore de Pommier obtenus au cours de ce travail et 3 souches du pathovar *papulans* (CFBP : 3323, 3325 et CFBP 5043). Le phénon 2 se singularise du premier par l'absence de levane sucrase (groupe Ib de Lelliott *et al.* (1966) de liquéfaction de la gélatine, d'assimilation de la trigonelline et par la production de puits sur gel de polypectate pH5.

Le phénon 3 est constitué de 5 isolats, qui se différencient du premier par les caractères suivants : putrescine et glutarate positifs et DL-glycerate négative. Ce dernier substrat n'est utilisé que par 41% des isolats de ce phénon.

Le phénon 4 regroupe quatre souches représentants 4 pathovars de *Pseudomonas syringae* CFBP 1686 : pv. *strifaciens* (espèce génomique notée e.g. 4) ; CFBP 3228 : pv. *oryzae* (e.g. 4); CFBP 2216 : pv. *coronafaciens* (e.g. 4) ; CFBP 2346 : pv. *passiflora* (e.g. 3)

Le phénon 5 est composé de trois pathovars de *Pseudomonas syringae* : CFBP 2897 : pv. *myricae* (e.g. 2) ; CFBP 2899 : pv. *photinia* (e.g. 2) CFBP 2894 : pv. *aesculi* (e.g. 2).

Le phénon 6 est formé par trois pathovar de *P. syringae* : CFBP 2213 :pv. *atrofaciens* (e.g1) ; CFBP 2339 : pv. *aceris* (e.g 1) ; CFBP 1660 : pv. *primulae* (e.g 3).

Le phénon 7 regroupe trois pathovars : CFBP 2106 :pv. *tabaci* (e.g 2) CFBP 2344 :pv. *mellea* (e.g 2) ; CFBP 2895 : pv. *hibisci* (e.g 2).Le phénon 8 est constitué de deux souches

isolées du poirier : KA41.2 et KA 11.1.

Le phénon 9 renferme deux souches qui correspondent au pathovar *helianthi* (e.g 7) (CFBP 2067) et *morsprunorum* (e.g 2) (CFBP 2116).

Le phénon 10 est composé de deux pathovars de *P. syringae* : CFBP 1617 : pv. *aptata* (e.g1) et CFBP1620 : pv. *anthirriini* (e.g 3)

Le phénon 11 composé par deux pathovars : CFBP 1657 : pv. *maculicola* (e.g 3) et CFBP 2212 : pv. *tomato* (e.g 3)

Le phénon 12 formé par deux souches CFBP 1754 et CFBP 2345 correspondant respectivement aux pathovars *papulans* et *panici* (e.g 1).

Le phénon 13 renferme deux isolats de la microflore épiphyte du Poirier : KA 2.1 et KA 47.2.

Parmi les 61 phénotypes isolés, on trouve 13 isolats appartenant à la microflore du Pommier et du Poirier.

-Discussion

Le niveau de coupure à 0,22 a permis de voir que la majorité des souches isolées de Poirier et de Pommier se regroupent dans le même phénon 1, aussi bien avec la souche de PSS CFBP 1543 que des souches du pathovar *papulans* (CFBP : 3323, 3325, 1754^T). La présence du pathovar *papulans* dans cette classe peut s'expliquer son appartenance au même groupe génomique que *P. s. pv. syringae* défini par Gardan *et al.* (1999).

La séparation des deux pathovars n'est visible que pour un niveau de coupure plus faible qui dégage des caractères plus discriminants tels que le levane, la trigonelline et le polypéctate à pH5.

Le phénon 2 présente un biotype très proche de celui du phénon 1. En effet, ils ne se différencient que par l'utilisation du céto-D-gluconate.

Les deux isolats (KA 65.2 et KA 11.1) qui se trouvent marginalisés en phénotypes isolés, diffèrent entre eux par 5 caractères, et du phénon 1 par l'assimilation au moins 3 substrats.

La deuxième analyse effectuée avec une coupure à 0,13 a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité phénotypique. En effet, les isolats de PSS étudiés se répartissent dans 3 phénons et 13 phénotypes isolés. Les isolats de PSP ainsi que les souches de référence se

Phénon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	CFBP 1543	CFBP 1754
Tétramine	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
α-D-Glucose	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D.L. Serine	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
Tétramine	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Epinephrine	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Trigonelline	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D.L. Glycine	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Polysaccharide	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Tétramine	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
L-Proline	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
D. Serine	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Levane	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Polysaccharide	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triglycérates	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Caproïne	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-

Tableau 17. Caractères distinctifs des phénons regroupant des isolats de PSS obtenu au cours de notre étude et les autres phénons à une coupure du dendrogramme des distances à 0,13.

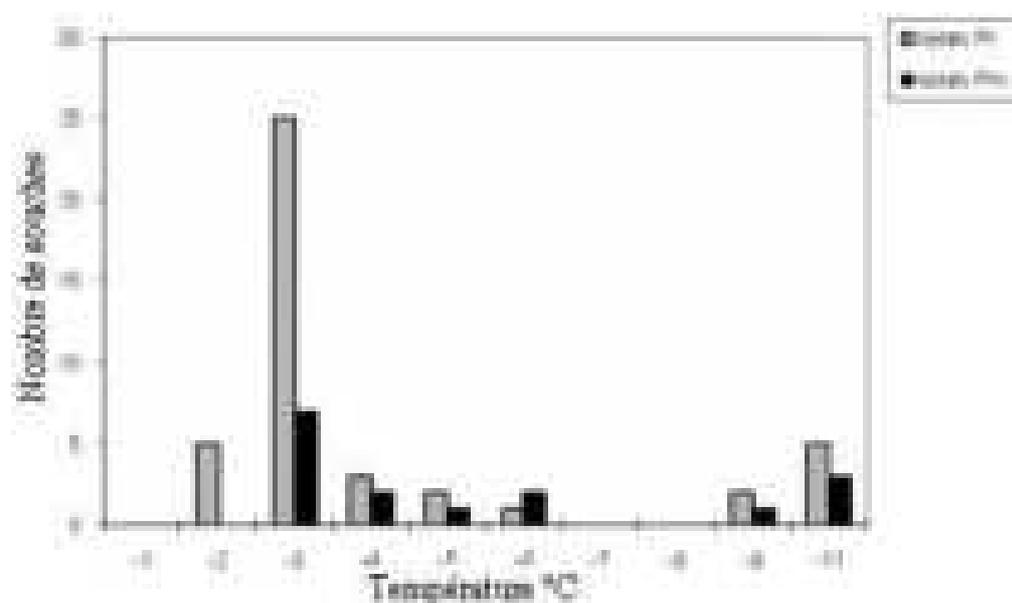


Figure 16. Répartition des isolats suivant la température de prise en glace (Pr : Poirier ; Pm : Pommier)

Tableau 18. Nombres d'isolats PSS producteurs de toxine (test d'inhibition de la croissance de *Rhodotorula pillimanae*)

Production de toxine	Isolats		Total
	Poirier	Pommier	
positive	25 (62,5 %)	10 (59 %)	35
négative	15 (37,5 %)	7 (41 %)	22
Total	40 (70 %)	17 (30 %)	57 (100 %)

Tableau 19. Répartition des 35 isolats de PSS de Poirier et de Pommier producteur de toxine dans les trois classes d'inhibition de la croissance de *Rhodotorula pillimanae*

Isolats	Inhibition		
	+	++	+++
Poirier	10 (40 %)	12 (48 %)	3 (12 %)
Pommier	8 (80 %)	2(20 %)	0

+ : faible ; ++ : moyenne, +++ forte

Tableau 20. Répartition des isolats de PSS dans les différents sérogroupes O

Classes	Nombre d'isolats	Sérogroupe
1	9	PHA
2	3	APTPIS
3	2	PST1
4	3	PST3
5	2	MOP1
6	1	MOP2
7	1	MOP4
8	2	MOP5
9	3	MOP6
10	2	MOP7
11	2	SYR5
12	1	HEL2
13	1	HEL3
14	1	RIB
Total 14	32	

trouvent groupées dans un seul sous-phénon. Il n'existe pas de lien entre la répartition des isolats dans les sous-phénons et leur origines (organes, sites, sain/malades). Cependant, on constate une différence dans la composition des phénons en fonction du pouvoir pathogène.

2.2.2.Pouvoir glaçogène

La majorité des isolats obtenus à partir de la microflore épiphyte des organes aériens du Poirier et Pommier ont une activité de prise en glace à des températures situées entre -3 et -6°C (phénotype ice +) (Figure 3.5). Un faible taux d'isolats est glaçogène à partir de -2 C. Ces derniers sont isolés de bourgeons et de fleurs de verger sain et verger malade tous sites confondus. En revanche, il existe aussi des isolats qui ne possèdent pas cette capacité, qui proviennent des différent sites étudiés. Des travaux de Paulin et Luisetti (1978) ont montré que certaines souches de PSSn'expriment pas de pouvoir de prise en glace quand elles sont exposées à des températures négatives allant de -1 à -9 C.

Nous n'avons pas trouvé de corrélation, entre l'activité glaçogène et l'origine des souches (verger sain / malade / site de prélèvement). Cependant, il semble que les isolats issus de bourgeons et de fleurs soient glaçogènes à faible température négative (-2 C).

2.2.3.La production de syringomycines

La technique basée sur l'utilisation *Rhodotorula pilimanae* a révélé que la majorité des isolats que nous avons testés provoquent l'inhibition de la croissance du micro-organisme indicateur (phénotype tox+). Ce qui représente un pourcentage de 61 % sur un total de 57 isolats dont 25 isolats sont issus de Poirier et dix isolés de Pommier (Tableau 3.10). Suivant l'intensité d'inhibition, il existe trois classes d'isolats (Tableau 3.11). Une relation semble exister entre la production de syringomycine et le développement de nécroses évolutives. En effet, les isolats à faible intensité d'inhibition provoquent une réaction nécrotique évolutive le long des nervures ; par contre les isolats à forte inhibition produisent des nécroses évolutives sur l'ensemble du limbe.

2.2.4.Groupes sérologiques

La technique de la double diffusion de Ouchterlony a permis de déterminer les groupes sérologiques selon la méthode décrite par Saunier *et al.* (1996). Les résultats obtenus montrent que les isolats de la microflore sont répartis dans 14 sérogroupe sans la présence de sérotype majoritaire (Tableau 3.12). Nos résultats rejoignent ceux trouvés dans d'autres travaux qui mentionnent que les souches de *P. s. pv. syringae* sont hétérogènes sur le plan sérologique (Saunier, 1992)

2.2.5. Distribution des isolats en fonction des caractères étudiés

L'analyse de la distribution des isolats épiphytes dans les différents groupes (une coupure à 0,11) en fonction des caractères de biovars (Figure 3.6).

Le groupe 1 est constitué de six isolats dont quatre appartiennent au biovar B2 et deux au B1. Ils sont tous glaçogènes et produisent la syringomycine. Ils sont caractérisés par les pathotypes : P1 (un isolat) , P2 (un isolat), P3 (2 isolats) et P6(2 isolats).

Le groupe 2 renferme quatre isolats appartenant tous au biovar B1. Ils sont tox+ , ice+ et se distribuent dans les différents variants du sérogroupe MOP (MOP1, MOP5 (2 isolats) et MOP6). Deux isolats se trouvent dans le même pathotype (P1).

Le groupe 3 contient deux isolats qui présentent le même pathotype (P5), mais ils diffèrent par leur biovar (B3 et B1), les caractères tox et ice ainsi que par leur origine (Pommier et Poirier). Ils ne se placent dans aucun sérogroupe connu.

Le groupe 4 est constitué de quatre isolats dont un est issu de Pommier et trois du Poirier, tous appartiennent au biovar B1. Deux isolats ont les caractères (P2, PHA, tox+ et ice-). Les deux autres ont le même sérogroupe (PST3) mais diffèrent par leur pathotype (P5, P6), la production de toxine (tox) et l'activité glaçogène (ice).

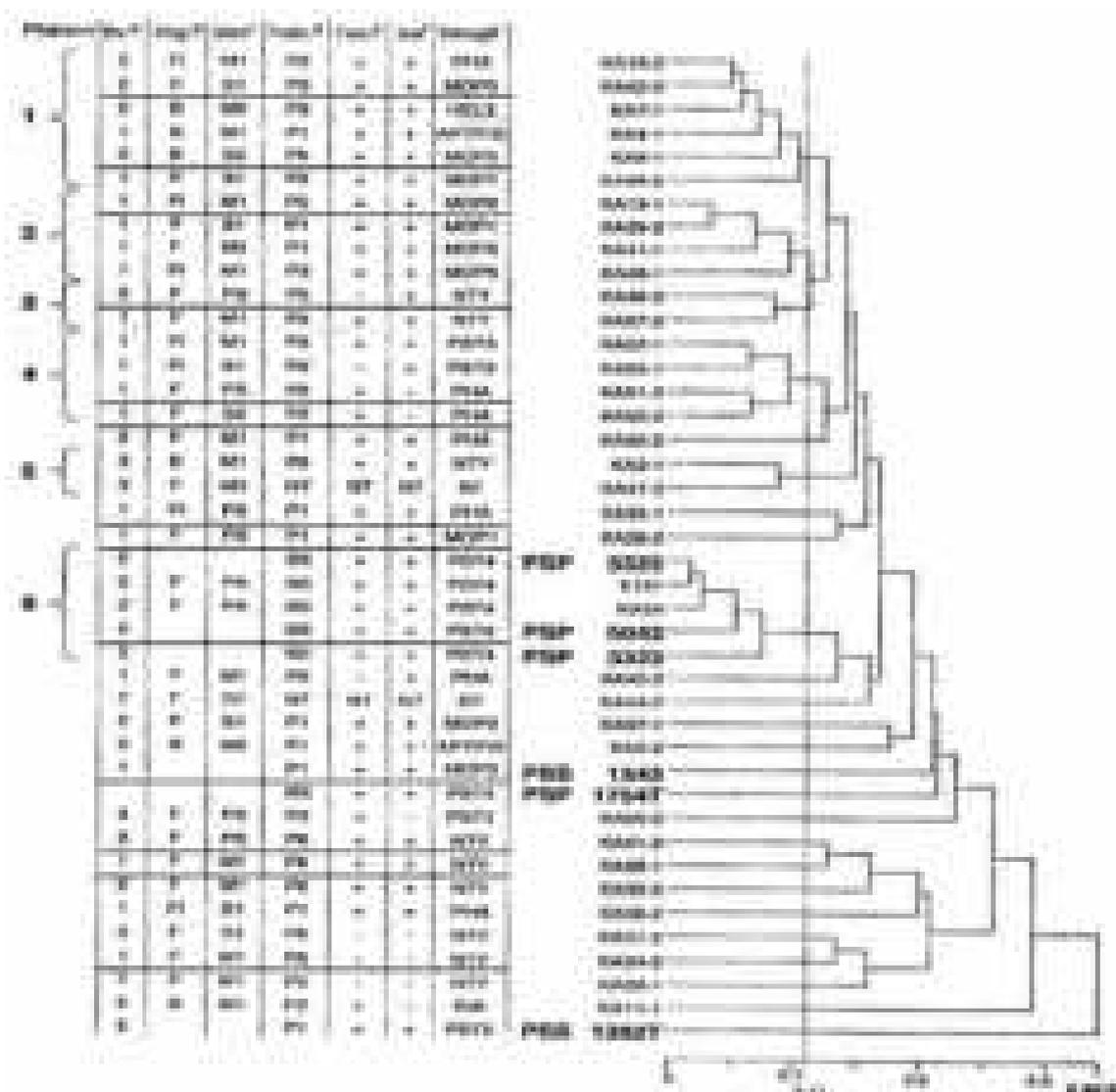


Figure 17: Dendrogramme des distances obtenues par taxonomie numérique (119 caractères) pour 36 isolats épiphytes du Poirier et du Pommier, 2 souches de *P. syringae* et 4 souches de PSP. Représentation des phénons à une coupure de 0.11. **a** Biovars. **b** Organe : Fl= fleur, F= feuille. **c** Site : M= malade, S= sain, 1= site 1, 2= site 2, PS= Pommier sain (origine INRA Angers). **d** Pathotype. **e** Production de Syringomicine. **f** activité glaçogène. **g** Sérogroupe

Le groupe 5 comprend deux isolats ayant le même biovar (B3). Tous les deux sont issus de verger malade mais de site différent. Le premier isolat (KA 2.1) est caractérisé par : P6, tox+, ice+ et non typé en sérologie. Cependant, le deuxième a été perdu au cours de la conservation.

Le groupe 6 se singularise par son homogénéité, comprend cinq isolats ayant les mêmes caractères (Biovar : B2, sérogroupe : PST4, Tox+, ice +, pouvoir pathogène : Blister spot). Ce groupe est constitué de trois souches de PSP de collection (CFBP 3323, 3325, 5043) et deux isolats issus de Pommier (KA 54 et E121).

Les isolats restants présentent des phénotypes différents par leur appartenance à des biovars variés. Cependant, la majorité des ces isolats sont non virulents sur la gamme de plante inoculée à l'exception de : KA 37.1 , KA 5.2 , KA 65.2, KA 36 et KA11.1.

2.3.Discussion

La majorité des isolats testés est associée au groupe la de Lelliott *et al.* (1966). La distribution en biovar des isolats a permis de montrer l'existence d'un biovar dominant chez PSS. Il regroupe 60% des souches du Poirier et 58 % de celles isolées du Pommier. Ce biovar majoritaire est caractérisé par l'assimilation du sorbitol, de l'érythritol et du DL lactate. Le biovars 1 correspond au profil caractéristiques de *P. s. pv. syringae* défini par Hildebrand et Schroth, (1972). Toutefois, une certaine variabilité existe puisque 8 biovars ont été mis en évidence. En effet Forestier (1989) a montré la présence de 5 biotypes (biovars) avec un biotype dominant pour les souches provenant de la microflore du Poirier et il a suggéré que les souches de PSS appartenant au biovar majoritaire sont spécifique du Poirier. Yessad (1992) a montré l'existence de différents biovars (9 biovars) dans une collection de souches de PSS issues de différents hôtes. Cependant, les résultats obtenus montrent que le biovar majoritaire n'est pas spécifique de souches isolées de Poirier mais qu'il regroupe des souches isolées d'hôtes variés.

La coupure réalisée à la distance 0,22 au niveau du dendrogramme des distances obtenu par taxonomie numérique a permis de montrer que les isolats étudiés sont en majorité concentrés dans un seul phenon (1) proche de la souche CFBP 1543 de *P. s. pv. syringae* et la souche CFBP1754 de *P. s. pv. papulans*. Ceci montre que les isolats étudiés appartiennent à l'espèce *P. syringae*. Par contre, la souche type de PSS (CFBP 1392) se trouve en phénotype isolé. Cette dernière se différencie des souches composant le phenon 1 par trois caractères (D-galacturonate, Trans-aconitate et D-glucuronate). Deux isolats se distinguent des autres par leur présence en phénotypes isolés.

L'utilisation de la taxonomie numérique montre que les souches isolées de la microflore épiphyte du Poirier et identifiées à PSS sont en majorité concentrées dans un même phenon ainsi que cinq souches du pathovar *papulans*. Il s'avère que ce pathovar est très proche du pathovar *syringae* sur le plan biochimique. Cependant la souche de *P. s. pv. syringae* CFBP1392 n'est pas à priori la meilleur représentante du pathovar *syringae*, si on se base sur le dendrogramme des distances. En revanche la souche CFBP 1543 semble plus proche de nos isolats et des autres souches représentant de différents pathovars de *Pseudomonas syringae*. Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Gardan *et al.* (1991).

3.Conclusion

Les différents techniques d'inoculation utilisées ont permis l'obtention de l'expression du pouvoir pathogène des isolats de PSS épiphytes sur le matériel végétal testé. La technique des feuilles détachées inoculées par blessure semble plus adaptée pour le test du pouvoir pathogène de PSS (bactérie nécrogène). Cette technique permet d'obtenir des réponses rapides.

La caractérisation du pouvoir pathogène des isolats étudiés, par l'utilisation d'une gamme hôte variée montre une variabilité dans l'expression du pouvoir pathogène. En effet, six pathotypes (P) ont été mis en évidence, avec un pathotype majoritaire (P6) constitué par

les isolats non virulents (42%) sur nos plantes hôtes, mais capable de produire une réaction d'hypersensibilité sur Tabac. Toute fois le pathotype P1 qui correspond au profil de PSS selon la définition de Young (1980) est représenté par 23% des isolats testés. L'origine des isolats (organe, situation sain/malade et site géographique) ne semble être corrélée avec leur distribution dans les différents pathotypes.

La caractérisation phénotypique a montré que la majorité des isolats provenant de la microflore épiphyte est associée au groupe la défini par Lelliott *et al.* (1966). Le biotypage montre l'existence un biovar dominant chez les isolats de PSS, qui regroupe 60 et 58% des isolats testés issus respectivement du Poirier et du Pommier. Cependant une variabilité existe puisque 8 biovars ont été définis. Le biovar majoritaire renferme des souches isolées des différents organes et sites étudiés.

La taxonomie numérique a montré que les isolats étudiés se regroupent en majorité dans un seul phénon à côté de la souche de PSS CFBP 1543 et la souche de PSP CFBP 1754^T. La coupure du dendrogramme des distances à 0,13 a permis l'obtention de 5 sous-phénon. Une variabilité phénotypique se dégage par la répartition des isolats dans 4 sous-phénons. Cependant, il existe un phénon dominant qui renferme 35 % des isolats testés (ce phénon est composé d'isolats appartenant aux pathotypes : P1, P2, P3, P5 et P6).

Par comparaison à d'autres microflores, l'activité de prise en glace semble élevée pour les isolats des populations épiphytes du Poirier et du Pommier (Luisetti et Gaignard, 1985 ; Baca et Moore, 1987 ; Montisenos et Vilardell, 1991). Les isolats obtenus à partir des bourgeons et fleurs semblent plus glaçogènes que ceux issus des feuilles. La non manifestation de la bactérie par la production de symptômes est probablement liée l'absence de gel printanier. L'abaissement de température en dessous de 0 C voire plus bas est nécessaire à l'activité glaçogène de PSS. De nombreux travaux ont montré que les blessures dues au gel prédisposent les bourgeons au dessèchement bactérien causé par PSS (Paulin et Luisetti, 1978 ; Cross *et al.*, 1983).

Le sérogroupage permet, comme les caractères nutritionnels, de montrer la diversité des isolats étudiés. En effet , 14 sérogroupes ont été identifiés pour la collection d'isolats testés. Ces résultats rejoignent ceux obtenu par différents auteurs sur l'extrême variabilité du LPS du pathovars *syringae*, par opposition l'homogénéité sérologique des autres pathovars du groupe (Samson et Saunier, 1987, Saunier, 1992 ; Saunier *et al.*, 1996).

CHAPITRE IV : PRESENCE EPIPHYTE DE PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. PAPULANS (ROSE) SANS PRESENCE DE SYMPTOME NATUREL DE LA MALADIE

Introduction

L'étude phénotypique réalisée sur la collection d'isolats issus des populations épiphytes a révélé la présence d'isolats particuliers de *P. syringae* appartenant au pathovar *papulans*. Cette bactérie est connue comme responsable de la "tache vésiculaire de la pomme" (*blister spot*), maladie importante qui affecte spécialement les pommes du cultivar Mutsu aux Etats Unis dans les régions Est, au Canada et en Italie. En France, cette maladie n'a jamais été décelée. Pour cela, il nous a paru important d'aborder la caractérisation de ces isolats particuliers.

L'objectif de ce chapitre est :

1. confirmer l'appartenance de ces isolats à *P. syringae* pv. *papulans*, par la comparaison des caractères phénotypiques, du pouvoir pathogène, des caractères sérologiques et moléculaires (rep-PCR), des isolats obtenus en France et d'une large collection de *P. syringae* pv. *papulans* de diverses origines.
2. développer un outil moléculaire de diagnostic, par l'identification de séquences nucléotidiques spécifiques, en se basant sur les gènes *hrp* dont les séquences sont connues.

Une partie de ce travail est présentée sous forme de publication (Epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* (Rose) in France, where blister spot has never been seen) European Journal of Plant Pathology 106 :481-485, 2000. Le texte intégral est présenté ci-dessous (texte de l'article en annexes)

Souches et isolats	Source
KA54	France, <i>M. syringae</i> cv. Golden Delicious, this study 1997
E121	France, <i>M. syringae</i> cv. Golden Delicious, this study 1999
<i>P. syringae</i> pv. <i>populans</i> 1754 ¹	Canada, <i>M. syringae</i> (B.N. Dhanvantari); 1973 (CFBP)
3324	Canada, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (B.N. Dhanvantari); 1968 (CFBP)
P 8828	Canada, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (W.G. Boss)
P 8811	Canada, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (W.G. Boss)
10739	Canada, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (W.G. Boss)
3323	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (A. Jones) (CFBP)
PSP5	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (T.J. Burr); 1977
PSP6	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (T.J. Burr); 1978
PSP7	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (T.J. Burr); 1981
PSP8	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (T.J. Burr); 1979
PSP9	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (T.J. Burr); 1981
PSP19	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (T.J. Burr); 1980
PSP24	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (T.J. Burr); 1980
PSP32	USA, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (T.J. Burr); 1985
IPV-BO 1511	Italy, <i>M. syringae</i> cv. Mutsu (C. Burr); 1981 (NCFPB 3262)
Lb 10396	Italy, <i>M. syringae</i> cv. Golden Delicious (L. Lindert) 1998
Lb 1069	Italy, <i>M. syringae</i> cv. Golden Delicious (L. Lindert) 1999
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 602	France, <i>M. syringae</i> (M. Rahn); 1964 (NCFPB 2715) (CFBP)
1392 ²	UK, <i>Syringa vulgaris</i> (K.A. Sebati); 1950 (NCFPB 281) (CFBP)
3077	France, <i>Syriza communis</i> (C. Maceval); 1983 (CFBP)

¹ souches pathotypes ; ² souches type

Tableau 21. Souches bactériennes de *Pseudomonas syringae* utilisées pour les tests phénotypiques, pathologiques, sérologiques

1. Caractérisation des isolats de *P. s. pv. papulans*

1.1. Matériel et Méthodes

1.1.1. Matériel bactérien

Deux isolats KA54 et E121 sont obtenus, au cours de l'étude de la microflore de surface présentée au chapitre II. Ces isolats sont comparés avec une collection de souches de *Pseudomonas syringae* pv. *papulan* (PSP) originaires des USA, du Canada et de l'Italie ainsi qu'avec des souches types de pathovars de *Pseudomonas syringae*, issues de la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP) (Tableau 4.1).

1.1.2. Tests biochimiques et physiologiques

Les techniques à l'exception de la mise en évidence de l'activité pectolytique (Prunier et Kaiser, 1961), ont été empruntées à Lelliott *et al.* (1966). Les tests biochimiques et physiologiques utilisés pour la caractérisation phénotypique sont décrits dans le chapitre III paragraphe 1.1.2.

1.1.3. Test sérologique

Les O-sérogroupe sont déterminés conformément à la méthode de Saunier *et al.* (1996). Les réactions sérologiques des lipopolysaccharides (LPS) sont révélées par la méthode de double diffusion d'Ouchterlony selon le protocole décrit dans le chapitre III (paragraphe 1.5.3).

1.1.4. Test de pouvoir pathogène

1.1.4.1. Matériel végétal

- Des jeunes plants des cultivars Mutsu, Fuji, Gala, et Braeburn sont obtenus par greffage et sont élevés en pots en serre jusqu'au stade 8 à 10 feuilles pour être utilisés.
- Des semis de Pommier et de Poirier sont issus respectivement de graines du cultivar Golden Delicious.
- Des pommes immatures en phase de croissances sont récoltées 24 h avant leur inoculation et stockées au froid à 4°C. Le calibre est choisi en fonction des besoins de l'expérience.
- Des plants de Lilas sont produits à partir de graines de la variété " Mme Lemoine ". Leur inoculation est réalisée au stade 5 à 8 feuilles.

1.1.4.2. Méthode d'inoculation

- Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir d'une culture bactérienne de 24 h sur milieu B de King à une température de 25 C. Les concentrations sont ajustées à 10^6 , 10^8 et 10^9 ufc/ml. Les témoins sont obtenus par infiltration d'eau distillée stérile.

- Inoculation par blessure

Les feuilles pour l'ensemble du matériel végétal testé sont inoculées par coupure au niveau de la nervure principale à l'aide d'un scalpel. Ensuite une goutte de 20 µl de suspension bactérienne (10^6 , 10^8 , ou 10^9 ufc/ml) est déposée à l'endroit de la blessure. Dix plants sont inoculés par souche. Après inoculation, les plants sont transférés dans une chambre climatique pour l'incubation avec un cycle de 16 h de jour à 22 C et de 8 h d'obscurité à 19 C. La lecture débute à partir de l'apparition des symptômes.

- Inoculation par piqûres

Pour la reproduction du symptôme atypique provoqué par le PSP sur les feuilles du cultivar Mutsu (Bonn et Bedford, 1986), de jeunes feuilles attachées sont inoculées par infiltration d'une suspension bactérienne de 10^8 ufc/ml à l'aide d'une seringue au niveau du pétiole. Les plants infiltrés sont placés dans les mêmes conditions que les feuilles inoculées par blessure.

Les pommes immatures de différents cultivars testés sont désinfectées par lavage dans une solution à 2% d'hypochlorite de sodium suivie de trois rinçages dans de l'eau distillée stérile. L'infiltration est faite par piqûres à l'aide d'une seringue. Les fruits ainsi inoculés sont incubés dans une chambre de culture à une température de 25°C et une photopériode de 16 h/

8 h durant quatre semaines.

· Inoculation par infiltration sous vide

Devant la difficulté rencontrée pour reproduire les symptômes de la tache vésiculaire avec la souche de référence CFBP1754^{Dt} et du fait que le PSP est une bactérie de quarantaine, ce qui ne permet pas de la tester en vergers, nous avons mis au point une méthode d'inoculation par infiltration sous vide, aussi bien de fruits immatures que de feuilles, pour tester le pouvoir pathogène.

Les pommes sont désinfectées en suivant le même protocole que pour l'inoculation par blessure. Dans un bœcher contenant une suspension bactérienne, on plonge 3 à 4 pommes en fonction du calibre, le tout est placé dans une cloche ou on applique un vide de $8 \cdot 10^{-3}$ Pa pendant 5 minutes. Le vide est rompu brutalement pour permettre une bonne infiltration des fruits. Les pommes infiltrées sont ensuite placées dans un bac, aspergées d'eau distillée stérile à l'aide d'un pulvérisateur et le tout est recouvert d'un film pour garder une humidité saturante. Quatre fruits sont infiltrés par souche avec 2 doses d'inoculum (10^4 et 10^7 ufc/ml). L'incubation est réalisée dans les conditions décrites pour les expériences précédentes. Les symptômes sont notés après trois semaines d'incubation.

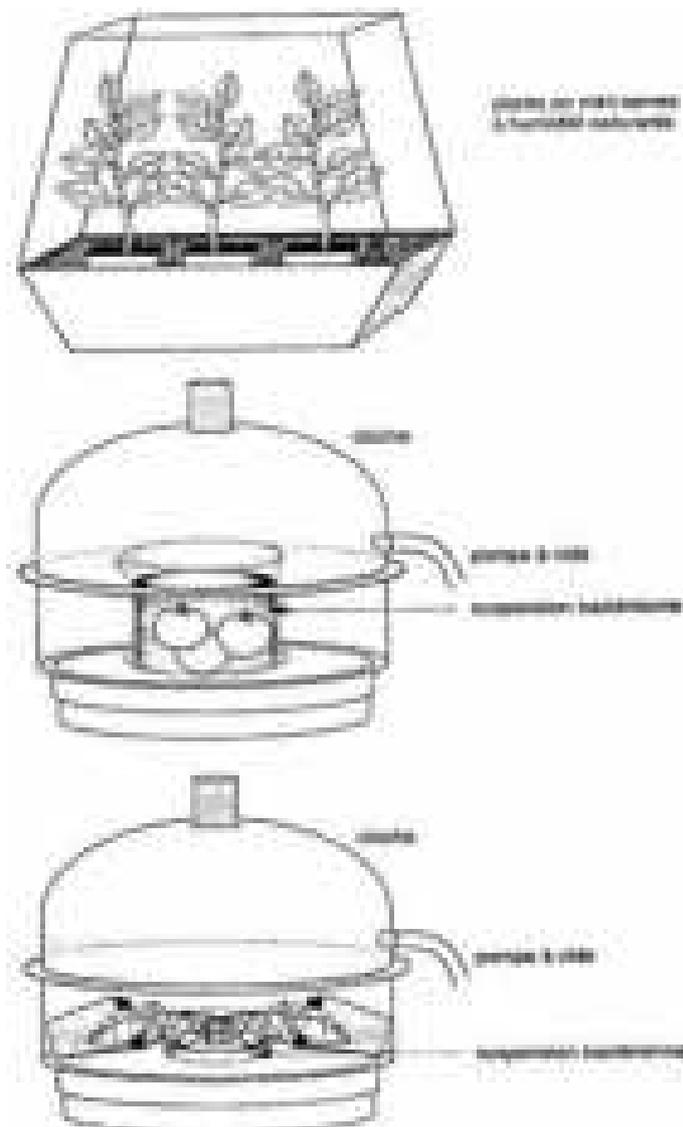


Figure 18 : Protocole d'inoculation des feuilles et fruits par infiltration sous vide

Les feuilles sont infiltrées de la même manière que les fruits. Trois plants sont infiltrés par souche à 10^6 et 10^8 ufc / ml. Les plants sont incubés dans des mini-serres avec une humidité relative de 100%, placés dans une chambre de culture à une température de 23 C avec une photopériode de 16 / 8h. La lecture se fait pendant les 4 semaines d'incubation.

1.1.5.Mise en évidence de la polygalacturonase (PG)

1.1.5.1.Recherche de l'activité polygalacturonase

Au cours de notre étude, nous avons recherché la présence d'une activité pectinolytique sur gel de polypectate pH 5. Afin de déterminer le type d'enzyme pectinolytique à l'origine de la formation de puits sur gel de polypectate, nous avons recherché l'activité polygalacturonase chez les souches de PSP. Des souches de *Pseudomonas* spp. et des pathovars de *P. syringae* ainsi que *Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* et *Agrobacterium vitis* ont été testés.

1.1.5.2. Production d'activité polygalacturonase exocellulaire

La mise en évidence de la polygalacturonase (PG) est réalisée selon la technique décrite par Ried et Collmer (1985). La technique consiste à réaliser des spots de culture bactérienne sur un gel en boîte de Petri, contenant 0,1 % d'acide galacturonique préparé dans un tampon acétate de potassium 0,05M et EDTA 0,01M à pH 4,5, additionné de 1 % d'agarose. Le milieu obtenu est coulé en couche mince (5 ml / boîte de Petri). Après 24h d'incubation à 25 C, la boîte de Petri est rincée à l'eau distillée et colorée au rouge de Ruthenium (0,05 %). Après 20 mn, le colorant est enlevé et la boîte est rincée à l'eau distillée. Le milieu est coloré en rouge et les spots de bactéries ayant produit de la PG apparaissent sous forme de halo clair, indiquant la dégradation du substrat (acide polygalacturonique) par la PG.

1.1.6. Caractérisation par rep-PCR

La rep-PCR, nouvelle méthode de diagnostic qui se base sur le principe de l'amplification des séquences répétées d'ADN présentes dans le génome des bactéries. C'est un ensemble de trois techniques nommées : BOX-PCR, REP-PCR et ERIC-PCR (Rademark et Bruijn, 1997)

1.1.6.1. Souches bactériennes

huit souches de PSP incluant l'isolat KA 54 sont ajoutées 7 souches appartenant au large groupe *P. syringae-viridiflava* (CFBP 1670, CFBP 1427, CFBP 1634, CFBP 3229, CFBP 2107, CFBP 1694 et CFBP 2353) Un total de 15 souches représentant 8 des 9 espèces génomiques décrites récemment (Gardan *et al*, 1999) a été utilisé dans la comparaison par rep-PCR.

1.1.6.2. Extraction de l'ADN

Après culture des bactéries sur milieux B de King à 25 C pendant 24 h, une suspension bactérienne est préparée dans de l'eau distillée stérile et ajustée à 10^7 ufc/ml. La suspension bactérienne ainsi préparée est répartie en fractions de 2 ml en cryotubes et gardée à -20°C. Pour leur utilisation, les suspensions sont décongelées à température ambiante. L'extraction de l'ADN est obtenue par lyse des cellules par passage dans un bain Marie bouillant pendant 15 mn. Puis, les tubes sont plongés dans la glace en attente de leur utilisation.

Caractères	PSP				PSS
	KA54	E121	DTSP	DPY-BO E111	3007
Levure	-	-	-	-	+
Erythrol	+	+	-	+	+
Pathotype					
Coléopte	-	-	-	-	+
Cercos	-	-	-	-	+
D(+) Tartrate	+	+	+	-	-
Polysaccharide pHE	+	+	+	+	-
Pathogénicité					
Bactérie de Poirier	ns	ns	ns	ns	ns
Bactérie de Pommier ^a	+ns	+ns	+ns	+ns	ns
Pommier ^a	+ns	+ns	+ns	+ns	ns

^a Bactérie pathogène ; ^b Bactérie type

ns : réaction négative, ns : réaction non visible (v. Fig)

ns : réaction sérologique, ns : isolat spot

Tableau 22 . Caractères différenciant KA54, E121, *Pseudomonas syringae* pv. papulans (PSP) et *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (PSS).

1.1.6.3. Conditions de réalisation de la rep-PCR

Le mélange réactionnel correspond à un volume final de 25 µl constitué de 2µM pour l'amorce BOX ou 50pM pour les couples d'amorces ERIC ou REP ; 200µM de dnTP (dATP, dGTP et dTTP) (Bioprobe Systems/Quantum), 75 mM de Tampon Taq (10X) contenant 1,5mM de MgCl₂ , 1,5 unités de Taq ADN polymérase (Appligen-Oncor, France) et 5 µl de suspension bactérienne (ADN). L'amplification est réalisée au thermocycleur (MJ Research, Inc. PTC-100) avec le programme correspondant à chaque type de rep-PCR (BOX, REP, ERIC) (programme d'amplification en annexe).

La migration des amplifiats est réalisée sur gel d'agarose à 1,4 % dans un tampon TBE (Tris-Borate-EDTA). Les produits d'amplification sont visualisés sous lumière UV, après leur passage dans un bain de bromure d'éthidium (BET à 1,25g/l). Les images des gels sont numérisées et imprimées.

1.1.6.4. Analyse des profils

Les profils obtenus sont comparés entre eux sur la base de l'échelle du marqueur de la taille moléculaire, par l'utilisation du logiciel de traitement de l'image de gel (Logiciel Gel Analyst, Clara Vision, France). La comparaison des souches (profils) est effectuée par le coefficient de similitude de Jaccard (Sneath et Sokal, 1973) et une classification hiérarchique ascendante, par la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages). Les dendrogrammes obtenus sont interprétés individuellement.

1.2. Resultats

1.2.1. Caractérisation phénotypique

Caractérisation par les tests conventionnels

Une grande similitude dans les caractères phénotypiques est observée entre les isolats KA54, E121 et les souches de *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* (PSP) d'origines diverses (Tableau 4.2). Nos isolats et PSP ne produisent pas de levane sur milieu hypersaccharosé, ne possèdent pas de cytochrome oxydase, ne dégradent pas la pectine, ne possèdent pas d'arginine dihydrolase, induisent une réaction d'hypersensibilité sur tabac et produisent une

Souches bactériennes	Anticécine				sérogroupes-O
	196	287	292	294	
	gripesole contre				
	1670 [†]	2545	2215 ^{††}	2348 ^{††}	
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 1670 [†]	++	-	-	-	PERSAVTOM 1
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> 2545	++	++	++	-	PERSAVTOM 2
<i>P. syringae</i> pv. <i>delphoides</i> 2215 ^{††}	-	+	++	-	DEL
<i>P. syringae</i> pv. <i>ribicola</i> 2348 ^{††}	-	-	-	++	RIB
PSP6, P0010	-	-	-	++	RIB
PSP32	-	++	-	-	PERSAVTOM 3
1754 ^{††}	++	++	-	-	PERSAVTOM 4
PSP (13 souches)	++	++	-	-	PERSAVTOM 4

[†] Souche type ; ^{††} pathotype

Tableau 23 . Réactions sérologiques des souches de *P. s. pv. papulansobtenues par double diffusion d'Ouchterlony selon Saunier et al., (1996)*

fluorescence bleue sur milieu B de King. Ils hydrolysent l'aesculine et ne liquéfient pas la gélatine. Tous produisent de l'acide à partir du saccharose, du sorbitol, du mannitol et de l'érythritol à l'exception de 2 souches de PSP (PSP5 et 1754^T). Toutes les souches testées réagissent négativement pour le L(+)tartrate et positivement pour le D(-)tartrate et le DL-lactate, sauf la souche IPV-BO1511 (PSP) qui n'utilise pas le D(-)tartrate. Enfin tous les PSP et les isolats KA54 et E121 ont une activité pectolytique, qui se traduit par la formation de puits sur gel de polypectate à pH5.

1.2.2.Caractérisation sérologique

Les réactions sérologiques entre les antisérums et les souches de PSP testées ont permis de définir les O-sérogroupe pour les 20 souches de PSP étudiées selon la méthode décrite par Saunier *et al.* (1996). Deux nouveaux sérogroupe, PST3 et PST4, sont créés à l'intérieur du groupe PERSAVTOM sur la base des réactions croisées qui sont différentes de celles des groupes existants PST1 et PST2 (Tableau 4.3).

La majorité des souches de PSP réagissent dans le groupe PERSAVTOM 4. En effet, dix sept souches de PSP incluant la souche-type et nos isolats KA54 et E121 présentent les mêmes caractéristiques sérologiques. Une souche de PSP (PSP32) se classe dans le groupe PERSAVTOM 3 et deux souches appartiennent au groupe RIB qui accueille les souches dépourvues de LPS.

1.2.3.Test du pouvoir pathogène

- Inoculation par blessure

Le test du pouvoir pathogène effectué sur l'ensemble du matériel végétal (feuilles et fruits) par l'utilisation de la technique d'inoculation par blessure n'a pas permis l'expression de symptôme. Nos résultats se trouvent en accord avec ceux obtenus par de nombreux auteurs qui rapportent que le PSP ne produit de symptômes que sur les fruits en place sur l'arbre.

- Inoculation par piqûres

Les feuilles infiltrées par piqûre à la seringue ont développé des lésions caractérisées par la nécrose de la nervure principale, la présence de déformations du limbe et par la nécrose de l'extrémité du limbe (Figure 4.2.5). Ce symptôme atypique de l'agent du blister spot observé

Tableau 24. Réaction des souches de PSP, et autres bactéries sur gel polypectate et production de polygalacturonase

**CHAPITRE IV : PRESENCE EPIPHYTE DE PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. PAPULANS (ROSE)
SANS PRESENCE DE SYMPTOME NATUREL DE LA MALADIE**

Souches	Polypectate		Polygalacturonase pH5
	pH 5	pH 8	
15 souches de PSP	+	-	+
PSP CFBP1754 ^T	+	-	+
PSS CFBP 1392 ^T	-	-	-
<i>P. sava. pv. phaseolicola</i> CFBP 1390 ^{pt} <i>P. s. pv. tomato</i> CFBP 2212 ^{pt} <i>P.</i> <i>s. pv. lachrymans</i> CFBP 1644 ^{pt}	+ + -	- - +	+ + -
<i>P. viridiflava</i> CFBP 2107 ^T	-	+	-
<i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>chrysanthemi</i> CFBP 2048	+	-	+

(+) production de polygalacturonase , (-) non production de polygalacturonase



Figure 19 : Lésions de taches vésiculaires reproduites sur feuille de Pommier (cv. Mutsu).



Figure 20 : Détail d'une tache vésiculaire au premier stade (le développement).



Figure 21 : Pustule desséchée avec l'ormation d'un orifice.



Figure 22 : Réaction d'hypersensibilité obtenue par réaction non compatible (PSS).



Figure 23: Reproduction de symptômes atypiques provoqués par PSP sur les feuilles (cv. Mutsu).

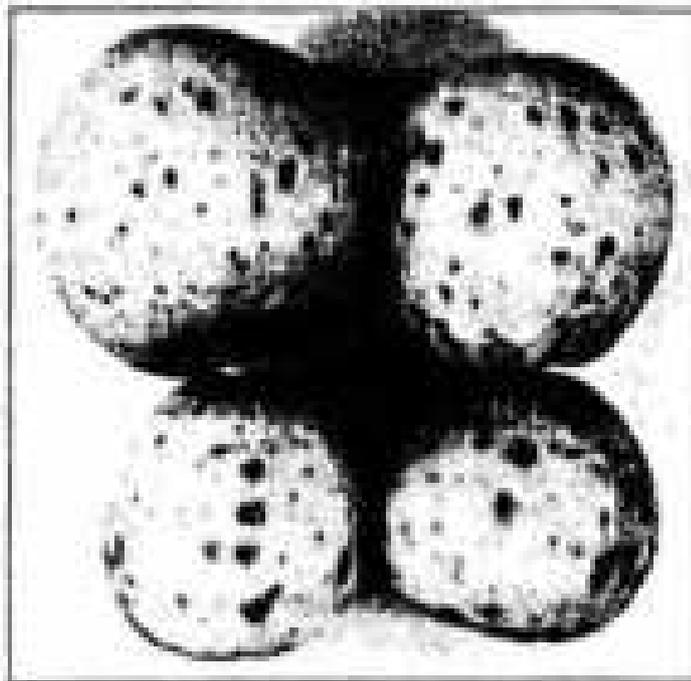


Figure 24 : Symptômes de la tache vésiculaire de la pomme (blister spot) obtenus sur pommes Golden Delicious



Figure 25 :Détail de section de pomme (65x) : développement bactérien dans les pustules

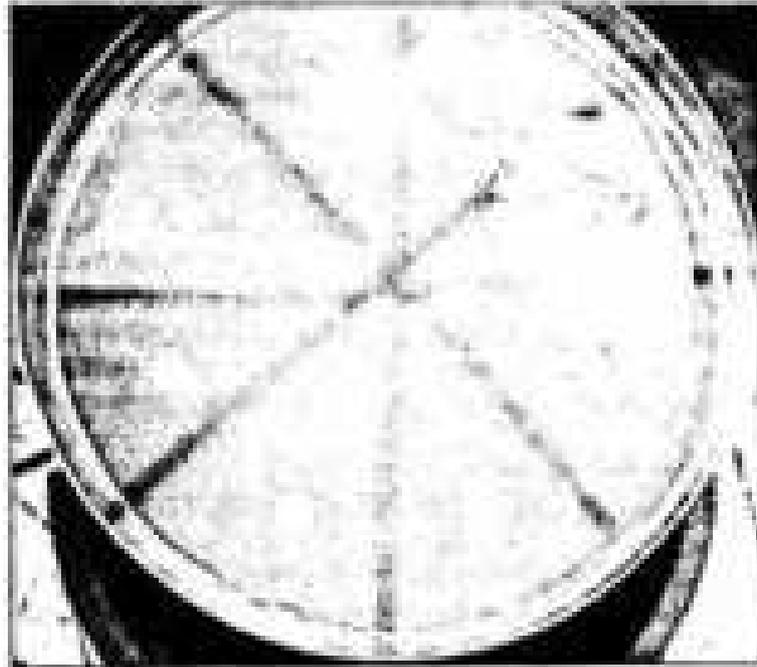


Figure 26 : Formation de puits sur gel de polypectate pH 5 (activité pectinolytique des souches de *Pseudomonas syringae* pv. *Pt/pu/ans*)

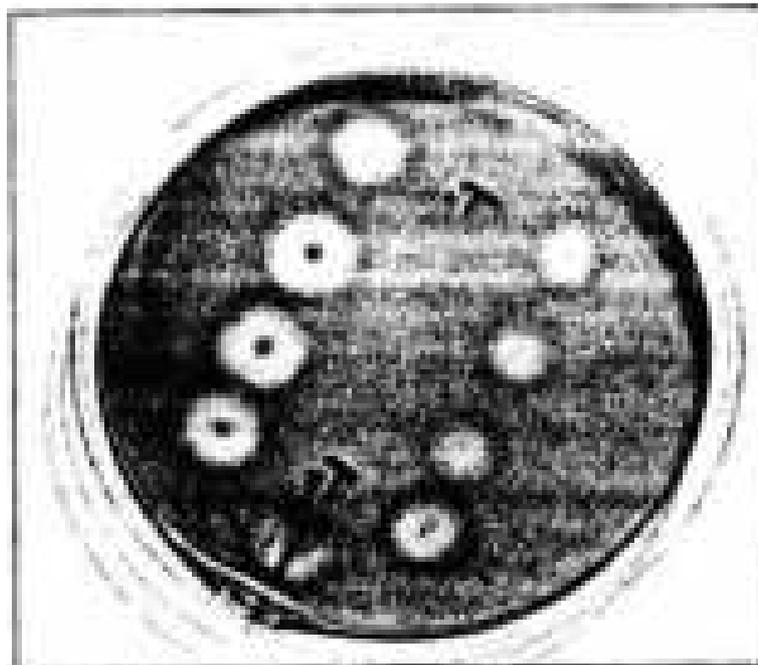


Figure 27 : Activité polygalacturonase des souches de *Pseudomonas syringae* pv. *Pupulans* sur milieu à base d'acide polygalacturonique. "témoin négatif" : *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ; témoin positif : *Agrobacterium vitis*.

par Bonn et Bedford (1986), a été reproduit par les souches de PSP de référence (1754^T et 3323) et les isolats obtenus en France (KA 54 et E121).

· Inoculation par infiltration sous vide

L'inoculation sous vide nous a permis d'obtenir les lésions de la tache vésiculaire de la pomme. Les isolats KA54 et E121 produisent des symptômes sur les pommes des cv. Fuji, Golden Delicious, Braeburn, identiques à ceux obtenus par les souches de PSP de référence, CFBP 1754 et 3323 et qui sont caractéristiques de la tache vésiculaire (Figure 4.3.1). Les lésions provoquées par les souches de PSP et les isolats KA54 et E121 (Figure 4.2.1) sont clairement différentes des nécroses de la réaction d'hypersensibilité induites par les souches de PSSCFBP 1392^T et 3077 (Figure 4.2.4). Des coupes pratiquées dans les lésions des pommes montrent l'évolution de la bactérie PSP dans les tissus du fruit. Pour le PSS, on observe une manifestation nécrotique limitée au niveau de la zone d'infiltration (Figure 4.3.2).

Des symptômes ont été aussi reproduits après inoculation sous vide sur jeunes feuilles des cv. Mutsu, Fuji, Golden Delicious et Gala. Les lésions se présentent sous forme de taches chlorotiques, qui évoluent en vésicules (papules) ayant un aspect bombé de couleur brune. Certaines papules laissent apparaître une ouverture au centre (Figure 4.2.3). Ces symptômes sur fruits et sur feuilles sont identiques à ceux induits par les isolats de référence de PSP (1754^T et 3323).

Des réisolements effectués au niveau des lésions reproduites artificiellement 1 et 2 mois après l'inoculation, ont permis de satisfaire au postulat de Koch.

1.2.4. Production de la polygalacturonase

L'utilisation de milieux à base d'acide polygalacturonique a permis de montrer que l'activité pectinolytique obtenue sur gel de polypectate pH5 (Hildebrand, 1971) est due à la production de la polygalacturonase. Les résultats obtenus montrent que tous les PSP testés (y compris KA54 et E121) ainsi que *P.s. pv. tomato*, *P. savastanoi* *pv. phaseolicola* et *E. ch. pv. chrysanthemi*, produisent la polygalacturonase (Figure 4.4)

1.2.5. Comparaison des profils rep-PCR

La comparaison des profils de rep-PCR, montre une grande similitude des souches de PSP entre elles et avec l'isolat KA 54, mais une différence vis à vis des souches du large groupe *P. syringae-viridiflava*. En effet, les dendrogrammes obtenus montrent une grande homogénéité des profils des souches de PSP. Les souches de PSP présentent un niveau de similitude de 96 % en BOX-PCR (Figure 4.5), 95 % en la REP-PCR (Figure 4.6) et de 74 % en ERIC-PCR (Figure 4.7). Les souches de *P. savastanoi*, *P. viridiflava* et les pathovars de *syringae*, *tomato*, *garceae*, *tremae*, *tagetis* et *thaeae*, représentant les autres espèces génomiques se séparent à des niveaux inférieurs. Au niveau de similitude de 100% les groupes se subdivisent :

1. pour BOX-PCR, il se subdivise en 2 sous-groupes (1a et 1b). L'isolat obtenu en France se situe dans le sous-groupe 1a à côté de souches canadiennes de PSP (P 8810, P 8811), le 1b contient des souches italiennes et canadiennes
2. pour REP-PCR, le groupe principal se subdivise en 3 sous-groupes (1a, 1b, 1c). La souche française se trouve dans le sous-groupe 1a avec les souches italiennes ; les sous-groupes 1b et 1c contiennent les souches canadiennes
3. pour ERIC-PCR, il est constitué de quatre sous-groupes (1a, 1b, 1c et 1d) et 2 souches isolées. L'isolat français se positionne dans le sous-groupe 1a avec les souches canadiennes, le sous-groupe 1b regroupe 2 souches italiennes. Les souches

isolés sont représentés par une souche canadienne (1c) et une souche italienne (1d).

apparaît clairement dans notre étude que c'est la technique BOX-PCR qui semble la mieux adaptée pour caractériser les souches bactériennes appartenant à un même pathovar.

1.3.Discussion

Les caractères phénotypiques montrent que les isolats KA54 et E121 sont identiques aux souches de PSP, et se trouvent dans le groupe 1b des *Pseudomonas* selon le schéma de Lelliott *et al.* (1966). Par rapport au PSS, les isolats se différencient par la production d'une fluorescence bleue, l'absence de production de levane, et par l'incapacité à liquéfier la gélatine, caractères connus pour différencier PSP de PSS. En revanche, la présence de l'activité sur gel de polypectate révélée à pH5, caractérise les souches de PSP et nos isolats.

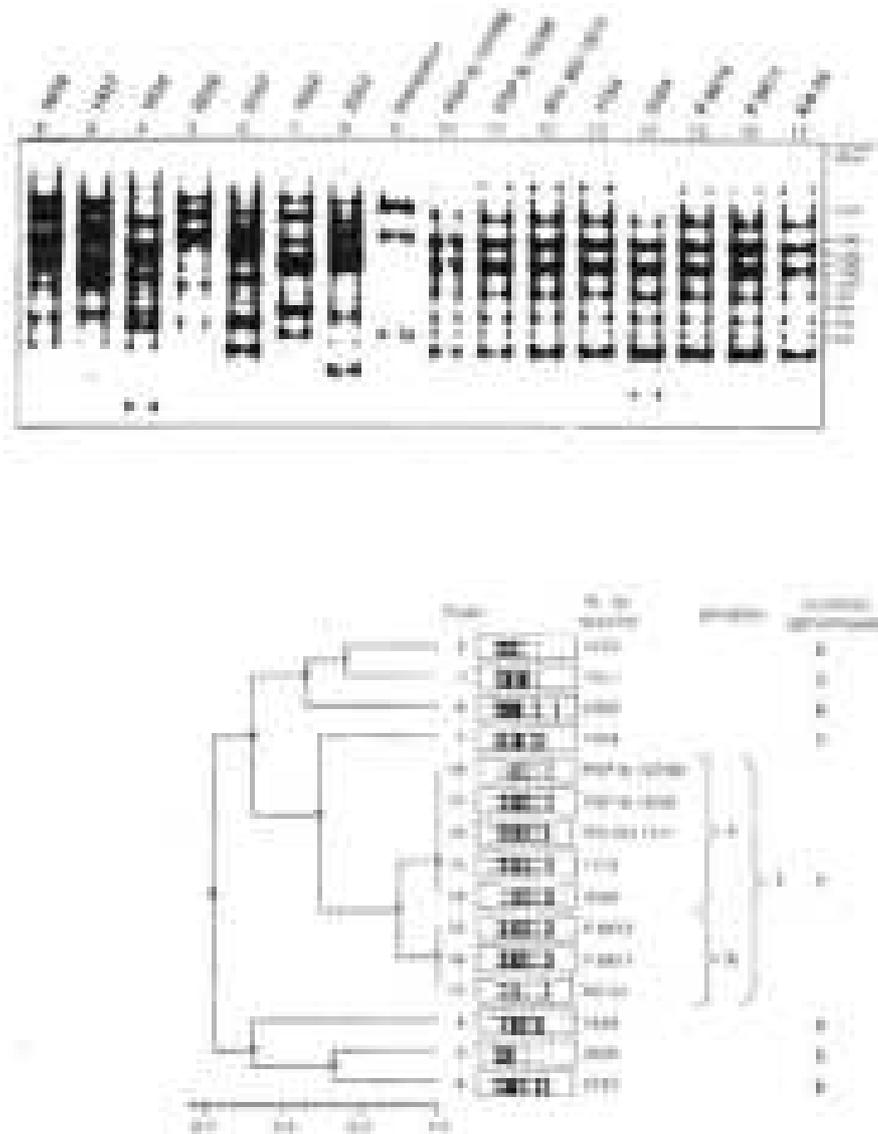


Figure 28 : Profils des souches de PSP et des souches appartenant à différents pathovars de *P. syringae* obtenus par ERIC-PCR. Dendrogramme

obtenu par comparaison des profils ERIC-PCR de 8 souches de PSP et 7 souches appartenant à différents pathovars de *P. syringae* représentant 7 espèces génomiques

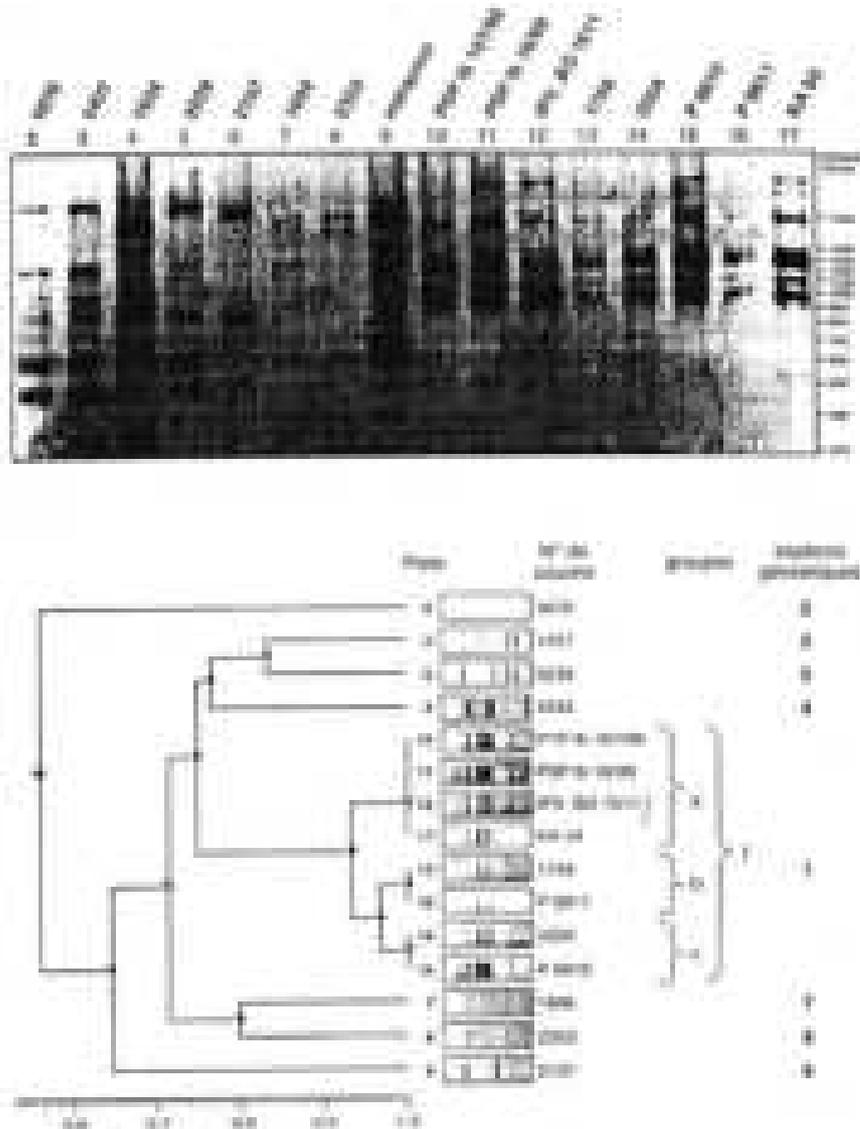


Figure 29: Profils des souches de PSP et des souches appartenant à différents pathovars de *P. syringae* obtenus par REP-PCR. Dendrogramme obtenu par comparaison des profils REP-PCR de 8 souches de PSP et 7 souches appartenant à différents pathovars de *P. syringae* représentant 7 espèces génomiques

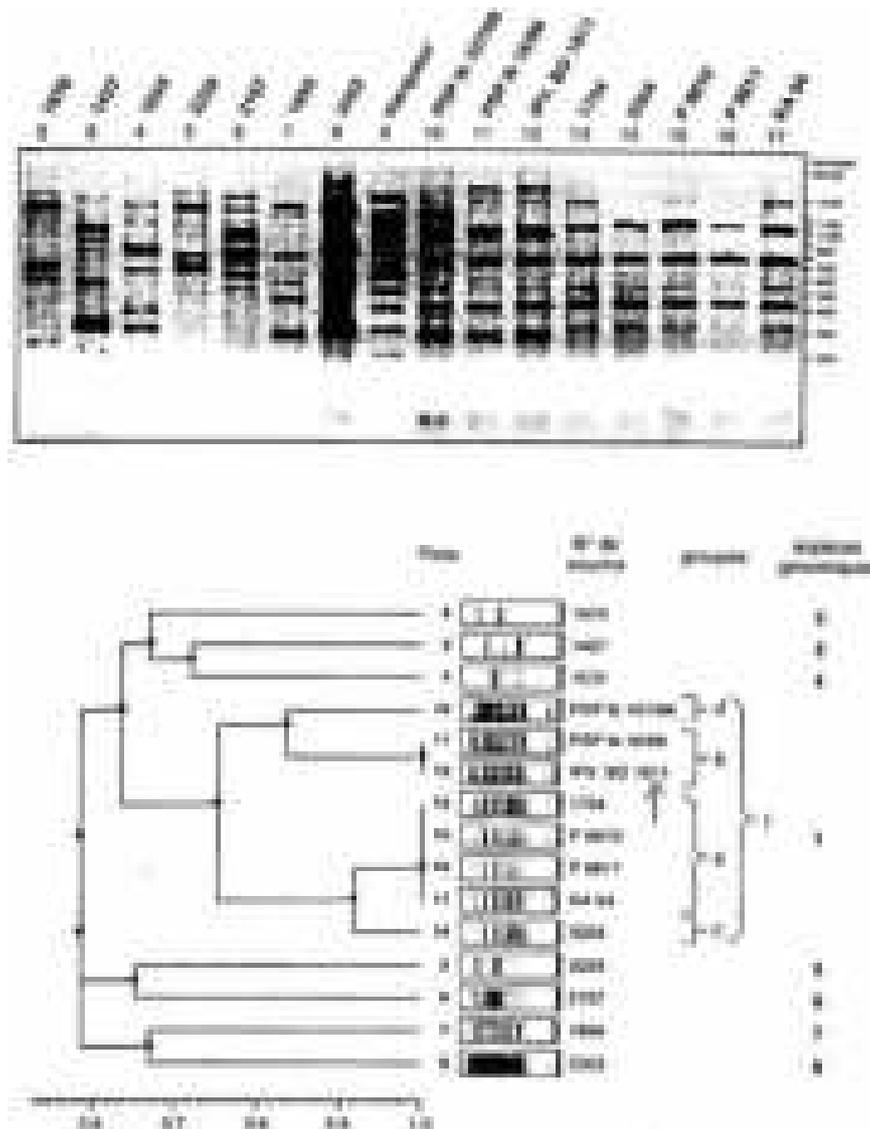


Figure 30 : Profils des souches de PSP et des souches appartenant à différents pathovars de *P. syringae* obtenus par ERIC-PCR, Dendrogramme obtenu par comparaison des profils ERIC-PCR de 8 souches de PSP et 7 souches appartenant à différents pathovars de *P. syringae* représentant 7 espèces génomiques

Ce nouveau caractère discriminant entre les PSP et les PSS n'avait pas encore été noté. L'utilisation de l'acide polygalacturonique comme substrat a permis de montrer que l'enzyme produite par les PSP est la polygalacturonase. D'après Magro *et al.* (1984), la polygalacturonase peut jouer un rôle dans le pouvoir pathogène, en favorisant l'occupation et le développement de la bactérie dans l'espace intercellulaire.

L'étude du comportement sérologique des différentes souches de PSP réunies pour notre investigation a révélé la présence d'un sérotype-O principal (PERSAVTOM 4) qui rassemble la majorité des souches de PSP. Ceci constitue un critère discriminant pour différencier les pathovars *papulans* et *syringae* dont les souches de référence testées sont dans le sérotype PERSAVTOM 1.

L'inoculation des fruits et feuilles détachés respectivement par piqûres et par blessures n'a pas permis de reproduire les symptômes typiques du 'blister spot'. Ce résultat est en accord avec ceux de Burr et Hurwitz (1979) et de Bazzi et Calzolari (1983). Seule, l'utilisation de la technique d'infiltration sous vide a montré que les isolats obtenus en France induisent des symptômes remarquablement similaires aux symptômes provoqués par des PSP de référence, aussi bien sur fruits détachés que sur plantes entières inoculées sur feuilles. Les taches vésiculaires obtenues par les PSP sont nettement différentes des réactions nécrotiques localisées (hypersensibilité) provoquées par les PSS.

Les différentes amorces, utilisées pour les techniques d'empreintes génétiques (BOX, REP ERIC-PCR) ont donné des profils qui permettent de placer les souches PSP étudiées dans le même groupe. Les profils BOX-PCR montrent moins de variations entre les souches PSP que les deux autres types d'amorces. En effet, la REP-PCR semble fournir un nombre restreint de bandes mais en revanche, elle détecte plus de polymorphisme (Louws *et al.*, 1995, Latour *et al.*, 1996), tandis que la BOX-PCR semble donner plus de bandes avec moins de variations au sein d'un groupe (Vera Cruz *et al.*, 1996). Ces techniques sont utilisées pour étudier la diversité génétique, mais aussi pour identifier les bactéries. Louws *et al.*, (1994) ont utilisé REP et ERIC pour distinguer les pathovars de *Xanthomonas campestris* et *P. syringae*. Une étude effectuée par l'utilisation de la BOX-PCR sur 88 souches appartenant à 31 pathovars a permis d'obtenir 11 groupes BOX dont 9 groupes rassemblent très exactement les neuf espèces génomiques définies par Gardan *et al.* (1999), (Marques, 2000).

Les profils BOX-PCR montrent une spécificité élevée, confirmant la technique comme un outil potentiel de diagnostic rapide. Les profils REP et surtout ERIC génèrent plus de polymorphismes permettant d'identifier des marqueurs épidémiologiques de PSP.

Les caractères phénotypiques, le test de pouvoir pathogène, le test sérologique et la technique rep-PCR montrent que les isolats KA54 et E121 sont bien des PSP. Donc, cette bactérie est présente en France, bien que les symptômes naturels n'aient jamais été signalés. La présence de cette bactérie phytopathogène peut s'expliquer, d'une part, par ses aptitudes à une survie en épiphyte. En effet, les travaux de Burr et Hurwitz (1981) ont montré la présence de populations épiphytes de PSP sur les feuilles de Golden Delicious. D'autre part, Burr et Katz (1984) ont observé une colonisation des bourgeons sains (sans nécrose visible) par PSP et PSS, avec une taille de population élevée pour les PSP dans les bourgeons de Mutsu, et une prédominance de PSS sur PSP dans les bourgeons de Golden Delicious. Les travaux de Burr (1982) montrent que le PSP, même s'il est prédominant sur le cultivar Mutsu, peut se trouver sur d'autres cultivars comme Golden Delicious.

Bazzi et Calzolari (1987) rapportent que même si le cultivar Mutsu est le seul à subir des dommages économiques considérables, cette maladie peut devenir un problème phytosanitaire pour d'autres variétés. D'autres travaux ont montré aussi que le cultivar Mutsu n'est pas le seul à être contaminé par l'agent de la tache vésiculaire de la pomme. Les tests du pouvoir pathogène réalisés sur une gamme variée de cultivars ont montré qu'on obtient le développement de symptômes par inoculation artificielle, sur les cultivars comme : Golden Delicious, Idared et Rome Beauty, même s'ils ne sont pas donnés comme naturellement sensibles à la maladie.

Sholberg et Bedford (1997) ont montré qu'il existe un isolat identifié à PSP qui est 5 fois plus virulent sur Fuji que sur Mutsu. Bazzi et Calzolari (1983) ont observé dans la vallée de Venosta des fruits infectés par le PSP dans les jeunes vergers (2 à 3 ans) du cultivar Smoothee (Golden Delicious est le clone standard). Ils signalent que le matériel végétal a

été importé de l'Europe du Nord et suggèrent que la propagation du matériel peut jouer un rôle épidémiologique important dans la dissémination du pathogène.

2. Développement d'un outil moléculaire pour le diagnostic et l'identification de *P. s. pv. papulans*

Introduction

La présence de PSP, même si les symptômes de la maladie ne sont pas observés, nécessite une surveillance afin de faire face à une éventuelle épidémie. Par ailleurs, il est important de rappeler que les études menées sur le pouvoir pathogène de cette bactérie montrent qu'elle est susceptible d'affecter d'autres cultivars en plus du cultivar le plus sensible (Mutsu), tel que Golden Delicious, Gala, Rome Beauty. De plus, la capacité de ce pathogène à survivre en épiphyte même sur le cultivar Golden, justifie l'intérêt de l'étude de cette bactériose.

L'identification de cette bactérie sur la base des caractères phénotypique et sérologique est une démarche lourde. Le moyen le plus sûr pour différencier les pathovars de *P. syringae* reste le test du pouvoir pathogène sur leurs plantes hôtes, ce qui est long et onéreux.

L'identification des *Pseudomonas* phytopathogènes peut théoriquement se faire, en plus des critères biochimiques, par l'hybridation ADN/ADN. Cette technique se révèle intéressante, mais n'est pas destinée à être utilisée en routine dans les tests de détection (utilisation de sondes radioactives qui nécessitent une logistique adaptée).

Les gènes codant les ARN ribosomiques, en particulier le 16S (*rrs*) et le 23S (*rrl*) peuvent être utilisés pour l'identification des bactéries et l'étude de leur phylogénie, car ils sont constitués de séquences conservées dans le monde vivant (Grimont et Grimont, 1986 ; Grimont *et al.*, 1989 ; Brygoo, 1991). Les gène *rrs* codent la synthèse de l'ARN de structure de la petite sous unité des ribosomes (Woese, 1987). En général, les séquences des gènes *rrs* paraissent évoluer lentement et peuvent être utilisées pour étudier des organismes assez éloignés. Les régions intergéniques semblent évoluer plus rapidement et peuvent varier au sein d'une même population (genre, espèce....) (White *et al.*, 1990). Les séquences conservées bordant une région variable constituent un bon moyen pour étudier la diversité au sein de l'espèce. Les travaux réalisés sur la diversité génétique par PCR/RFLP ont montré l'existence

de différences au niveau génomique chez les pathovars de *Pseudomonas syringae* (Manceau et Horvais, 1997).

Les données sur les gènes (*hrp*) impliqués dans le pouvoir pathogène sont récentes. Les travaux sur les gènes *hrp* ont montré que cette région est constituée de plusieurs gènes aux fonctions spécialisées, certains ont un rôle de régulation, comme *hrpL* et d'autres un rôle dans la sécrétion, et enfin dans la production de protéines élicitrices (Gopalan *et al.*, 1996, Alfano et Collmer, 1997). Les travaux de Leite *et al.* (1995), ont montré que les *Xanthomonas* phytopathogènes peuvent être différenciés par PCR/RFLP des gènes *hrp*. Le pouvoir pathogène parfois le seul moyen pour différencier les pathovars d'une espèce donnée, l'existence de différences de structure des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène paraît une bonne approche pour la recherche et l'identification de séquences nucléotidiques discriminantes.

Dans cette partie du chapitre 4, nous avons recherché dans le fragment *hrpL* la présence de séquences spécifiques pour développer un outil moléculaire pour l'identification et le diagnostic de *P. s. pv. papulans*, en utilisant la technique de PCR.

2.1. Matériel et Méthodes

2.1.1. Matériel bactérien

Aux souches de *P. s. pv. papulans* et de *P. s. pv. syringae* étudiées dans la première partie de ce chapitre (IV), s'ajoutent des souches d'espèces et de pathovars appartenant au large groupe *P. syringae-viridiflava*, qui sont listées dans le tableau 4.1, selon les neuf espèces génomiques décrites par Gardann *et al.* (1999).

Au terme de ce travail nous avons été sollicité par la protection des végétaux Allemande pour confirmer identité de quatre souches isolées à partir de symptômes sur pomme de la variété Delbarestivale.

2.1.2. Extraction de l'ADN bactérien

Les souches bactériennes sont cultivées sur milieu B de King pendant 24h à 23°C. La préparation des suspensions bactériennes et la lyse des bactéries pour l'extraction d'ADN sont réalisés selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.6.2 (chapitre IV).

2.1.3. Identification du gène *hrpL*

Le fragment *hrpL* est recherché par PCR chez les souches de PSP ainsi que chez les souches des pathovars de *Pseudomonas syringae* par l'utilisation du couple d'amorces *hrpL*₁ et *hrpL*₂. Les oligonucléotides synthétisés par Eurogentec S.A. (Belgique) ont été dessinés à partir de l'analyse des séquences du gène *hrpL* de *Pseudomonas syringae* disponible dans GenBank (N° d'accès U03854)

Les conditions d'amplification sont les suivantes : le premix est composé de 10 µl de tampon 10 X (Appligène, qui apporte 1,5 mM de MgCl₂), 10 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM de chaque), 1 µl de chaque amorce (*hrpL*₁ et *hrpL*₂), 0,9 µl de Taq-DNA-polymérase (Appligène) à 5 U/µl et 64,1 µl d'eau ultrapure. On ajoute ensuite un volume de 10 µl de suspension bactérienne bouillie à 90 µl de prémix préalablement répartis dans des tubes Eppendorf de 0,5 ml. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Amplifon ®, Thermolyne, Dubuque, USA). Le programme de température utilisé est le suivant : un pré-cycle à 92°C (1mn), 35 X [(92°C (1mn), 52°C (1mn) et 72°C (1mn)], enfin le produit PCR est maintenu à 4°C jusqu'à l'intervention.

Des aliquots de 10 µl d'amplificats, additionnés de 2 µl de tampon de charge ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose à 2% pour subir une électrophorèse (100 Volts pendant environ 30 mn) dans du tampon TBE 1X. Les fragments amplifiés sont révélés par le bromure d'éthydiu et photographiés sous lumière UV.

2.1.4. PCR/RFLP du gène *hrpL*

Après l'identification du fragment *hrpL* par l'utilisation du couple d'amorces *hrpL*₁ et *hrpL*₂. L'ADN amplifié de chaque souche a été concentré par une précipitation à l'éthanol et resuspendu dans l'eau distillée stérile, 15µl d'ADN concentré ont été digérés séparément par 2 µL de divers enzymes de restriction (Bsp 143 I, Hae III, Hha I, Mse I, Msp I, Sau 96,

Tsp 509 I, et Taq I) (Eurogentec SA), dans leurs tampons respectifs. Toutes les digestions ont été faites selon les conditions suivantes : 37 °C pendant 2 heures, puis 65 °C pendant 10 minutes, à l'exception de Taq I dont la température de réaction est de 70 °C. Les fragments ainsi digérés ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose Nuseive à 3%. Un marqueur de poids moléculaire de 100 pb déposé sur le gel parallèlement aux échantillons d'ADN, a permis de mesurer la longueur des fragments de restriction générés pour chacun des fragments *hrpL*, et de visualiser les niveaux d'hétérogénéité entre les souches pour le gène *hrpL*.

2.1.5.Séquençage du fragment *hrpL* de *P. s. pv. papulans*

Pour séquencer le fragment *hrpL* certaines étapes sont nécessaires à l'extraction d'ADN correspondant aux gènes après électrophorèse, le clonage dans un vecteur et le séquençage à partir de l'insert introduit sur le plasmide pGEM-T easy de *Escherichia coli* (Kit pGEM-T easy Vector System de Promega).

2.1.5.1.Extraction de l'ADN du gène *hrpL*

Après avoir repéré sous UV la bande correspondant au fragment d'ADN que l'on désire cloner, amplifiée par PCR, on découpe au scalpel la portion du gel renfermant le fragment. L'ADN contenu dans le gel est alors extrait grâce au Kit de purification d'ADN (Gen-apex, de Promega)

La bande découpée est placée dans un Eppendorf et pesée, en considérant que la masse de 1g correspond à un volume de 1mL. On y ajoute 1/2 volume de TBE melt et 4,5 volume de sel (solution de chlorure de sodium), afin d'augmenter la molarité du mélange, ce qui après chauffage (5 mn à 55 C) va entraîner la liquifaction du gel d'agarose. Une fois cette étape terminée, on ajoute 10 µl de BIND (de la silice). La molarité élevée du mélange va permettre à l'ADN de se fixer sur la silice (5 mn à température ambiante). Une centrifugation (5 sec dans une centrifugeuse de paillasse) est effectuée puis le surnageant est éliminé, le culot est resuspendu dans 1 mL de Wash (NaCl, Tris-EDTA), puis centrifugé pendant 5 sec. Le surnageant est éliminé et le culot qui ne contient que le complexe silice-ADN est repris dans 20 µl d'eau. L'addition de l'eau va entraîner la libération de l'ADN par la silice par abaissement de la molarité (5 min à température ambiante). Une centrifugation de 1 min entraîne le dépôt de silice, le surnageant contenant l'ADN est récupéré et conservé à 4°C pour l'étape suivante (la ligation).

2.1.5.2.Ligation du fragment dans le vecteur

La ligation consiste à mettre en contact le fragment d'ADN extrait avec un plasmide de manière à ce qu'il s'insère. Elle se réalise grâce à un enzyme T4-DNA-ligase (T4-DNA-ligase du Kit pGEM-Teasy Vector System Promega). Cet enzyme permet d'établir des liaisons phosphodiesters covalentes entre les extrémités 3'OH libres d'un fragment d'ADN et les extrémités 5'P libre d'un autre fragment d'ADN.

Pour une ligation optimale, un ratio de 3 est à respecter entre la quantité d'ADN de l'insert et le vecteur de clonage. Cette quantité est obtenue par la formule suivante :

$$\frac{\text{ng de vecteur} \times \text{kb de l'insert} \times 3}{\text{kb du vecteur}} = Y \text{ ng d'insert}$$

La taille de notre insert est d'environ de 600 pb. Le vecteur utilisé est à 3018 pb (50 ng.l⁻¹). Le protocole adopté recommande l'utilisation de 1 µl de vecteur (50 ng). La quantité d'insert calculé est de 30 ng

Le volume réactionnel d'hybridation contient 5 µl de tampon de ligation de DNA ligase, 1 µl de vecteur (50 ng), 30 ng d'insert, 1 µl de ligase et le volume final est ajusté avec de l'eau stérile pour obtenir 10 µl. Le mélange réactionnel de ligation est incubé à 4 °C pendant une nuit avant de servir à la transformation (incorporation du vecteur dans une bactérie compétente).

2.1.5.3. Transformation des bactéries compétentes

Cette étape consiste à introduire les plasmides recombinants dans le cytoplasme d'une souche compétente d'*E. coli* DH5alpha. La bactérie transformée acquiert un nouveau phénotype.

Deux µl de produit de ligation sont mélangés à 100 µl de la suspension de bactéries compétentes (décongelée au préalable). Les tubes contenant le mélange sont placés dans la glace pendant 30 minutes avant d'effectuer un choc thermique de 50 sec à 42 C, permettant au plasmide vecteur de traverser la membrane bactérienne par les pores transitoires. Après un refroidissement dans la glace (2 mn), 900 µl de milieu LB liquide sont ajoutés dans chaque tube et enfin le tout est incubé à 37 °C pendant 1h 30 mn avec une légère agitation. Après incubation, 100 µl de suspension bactérienne transformée sont étalés sur boîte de Petri contenant un milieu LB sélectif additionné d'ampicilline à 40 µg/l, du X-gal (5-bromo-4-chloro-3 indolyl-D-galactopyranoside) à 10 µg/ml et enfin de l'IPTG (IsoPropylThioGalactoside) à 100 µg/ml. Le reste est centrifugé 10 min à 10 000 g et à 4 C. Les 700 µl de surnageant sont éliminés et le culot est repris dans les 200 µl restant. Enfin, deux boîtes de Petri contenant le milieu sélectif décrit précédemment sontensemencées par étalement à raison de 100 µl par boîte. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 C pendant 24 C.

2.1.5.4. Sélection des clones recombinants

Les clones recombinants sont sélectionnés à partir des colonies ayant poussé sur le milieu LB sélectif. La présence de l'antibiotique assure le maintien du plasmide. L'IPTG et le X-gal présents dans le milieu permettent de sélectionner uniquement les clones recombinants. Le gène Lac Z qui est porté par le plasmide pGEM-Teasy et codant pour le B-galactosidase capable de métaboliser le X-gal (substrat chromogène incolore) en D-galactopyranoside et 5-bromo-4chloro-3indolyl (composé de couleur bleue). Quand l'insert est intégré au niveau du poly-linker du plasmide pGEM-Teasy situé dans le gène Lac Z, l'IPTG ne peut plus induire la synthèse de la B-galactosidase et le X-gal n'est plus métabolisé. Donc les colonies de clones recombinants ont une coloration blanchâtre. En revanche, celles non recombinantes vont avoir une couleur bleue indiquant ainsi que leurs plasmides sont restés intacts. Les colonies blanches recombinantes sont sélectionnées, repiquées sur milieu LB additionné d'ampicilline et incubées à 37 C pendant 24 h.

Vérification de l'insertion

Le fragment d'ADN inséré est recherché par PCR sur l'ADN bactérien par l'utilisation des amorces spécifiques à la séquence du gène *hrpL*. Pour ce faire, on réalise une extraction d'ADN par chauffage, une PCR, une migration par électrophorèse et une visualisation des fragments amplifiés. Les clones recombinants se caractérisent par la présence d'une bande

d'amplification qui correspond à la longueur de l'insert ou à celle de l'insert additionnée des extrémités du vecteur.

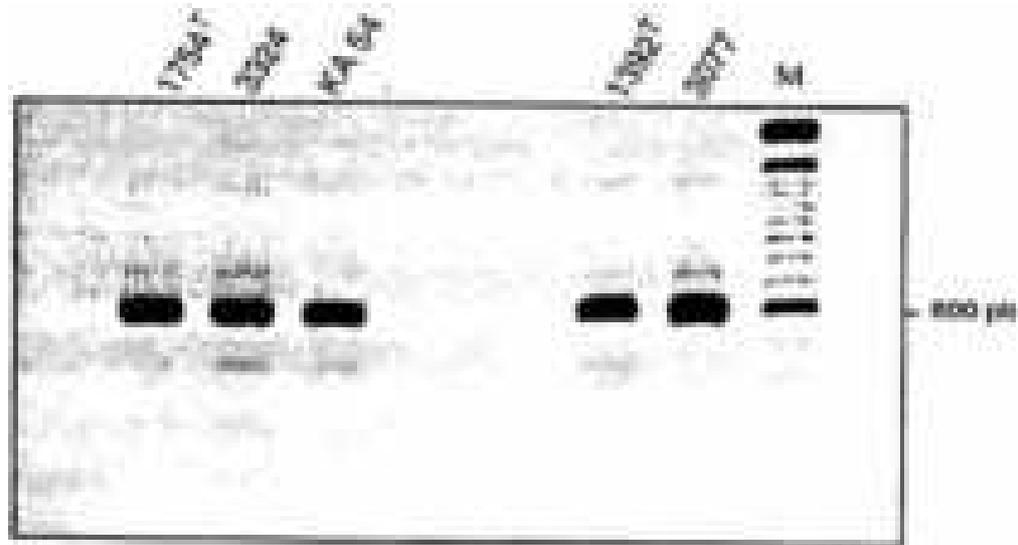


Figure 31: Amplification par PCR du fragment *hrp L* de 600 pb par les amorces *hrpL1* et *hrp L2* chez les souches de PSP (CFBP 3324, CFBP 1754T et KA 54) et PSS (CFBP 3077 et 1392T).

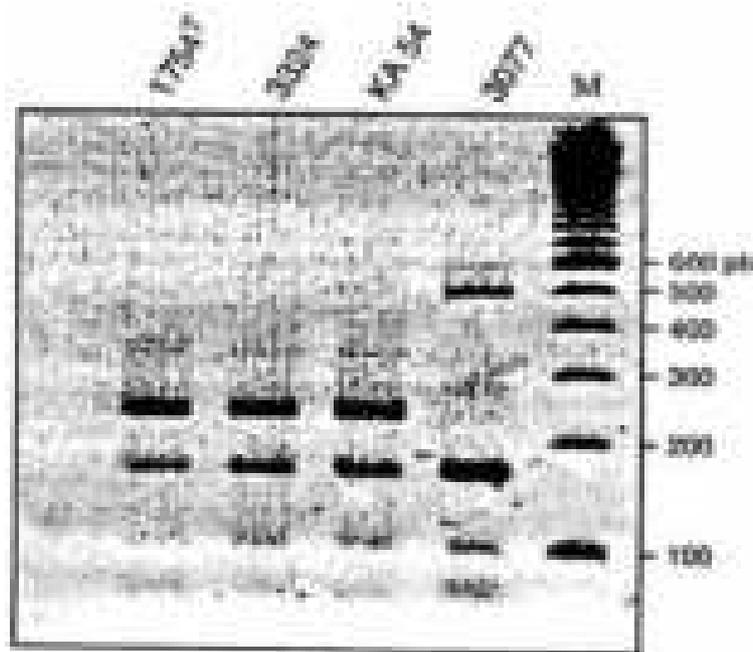


Figure 32 : Profils de digestion obtenus par l'enzyme de restriction *Bsp 1431* du fragment *hrp L* des souches de PSP (CFBP 3324, CFBP 1754T et KA 54) et PSS (CFBP 3077).

· Séquençage du fragment

Le fragment ainsi inséré dans le plasmide qui est introduit dans une bactérie compétente (*E. coli* DH5alpha). Des mini prep sont envoyés à Eurogentec SA (Belgique) qui assure le séquençage.

2.1.6. Identification de la séquence spécifique et développement des amorces

L'identification de séquences nucléotidiques spécifiques est basée sur l'exploitation des différences repérées au niveau des séquences des gènes *hrpL*. La comparaison des séquences du fragment *hrpL* de PSP avec celles des gènes *hrpL* des pathovars de *P. syringae*, publiées et disponibles dans la base de données (Genbank), va nous permettre de dessiner des jeux d'amorces, qui seront testés pour leur spécificité.

2.2. Resultats

2.2.1. Identification du fragment *hrpL*

L'utilisation du couple d'amorces spécifiques du fragment *hrpL* (*hrpL*₁: 5'-TGC-GAG-TTG-GTT-CCA-GAC-AG-3' et *hrpL*₂: 5'-GGT-TAT-CGC-TAT-AGG-GCT-TGC-3'), par amplification en PCR génère un fragment de 600 pb chez les souches de PSP et *P. syringae*. Cependant, chez d'autres pathovars de *P. syringae*, cette bande de 600 pb n'est pas amplifiée (Figure 4.8). Donc le fragment *hrpL*, n'est pas révélé pour toutes les souches de *Pseudomonas* testées (Tableau 4.5).

2.2.2. PCR/RFLP

La digestion du fragment d'ADN correspondant au gène *hrpL* par divers enzymes de restriction utilisés montre l'existence de 3 groupes de PCR/RFLP : *hrpL* A, *hrpL* A' et *hrpL* B.

Le groupe PCR/RFLP *hrpL* A' ne renferme que les souches de PSP, ce groupe est généré par l'enzyme de restriction Bsp 143 I. En effet, l'examen des profils de restriction obtenus par la Bsp 143 I sur les amplifiats d'ADN du *hrpL* de PSP et PSS montre la présence d'un site discriminant, qui est présent chez PSP et absent chez les autres pathovars de *P. syringae* (Figure 4.9)

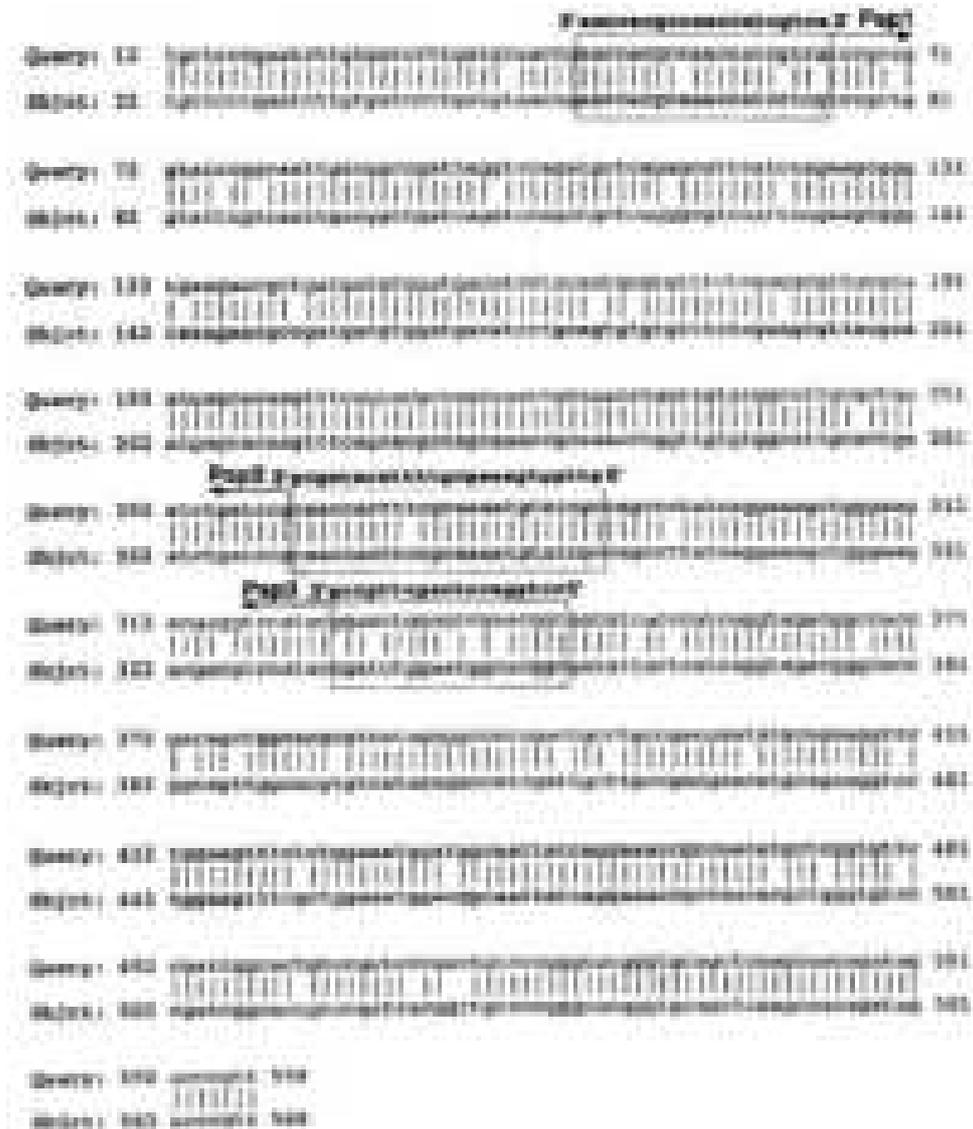


Figure 33: Alignement des séquences des gènes *hrpL* de *Pseudomonas syringae* pv. *papulanset* et de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Localisation des amorces (Pap1, Pap2, Pap3).

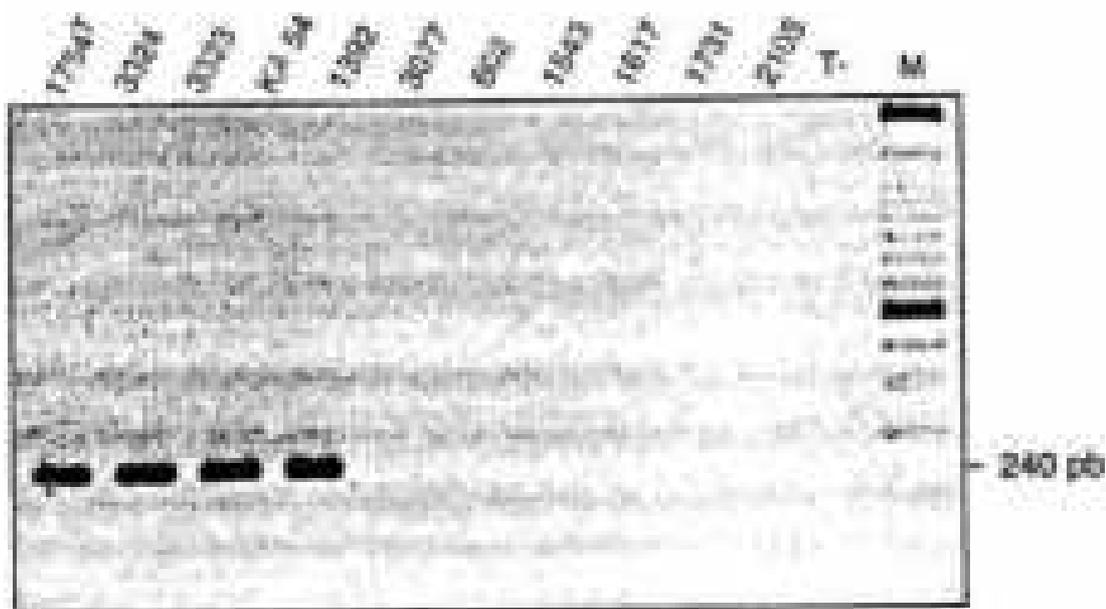


Figure 34 : Fragment d'ADN spécifique (240 pb) à PSP amplifié par PCR avec les amorces spécifiques *Pap1* et *Pap2*

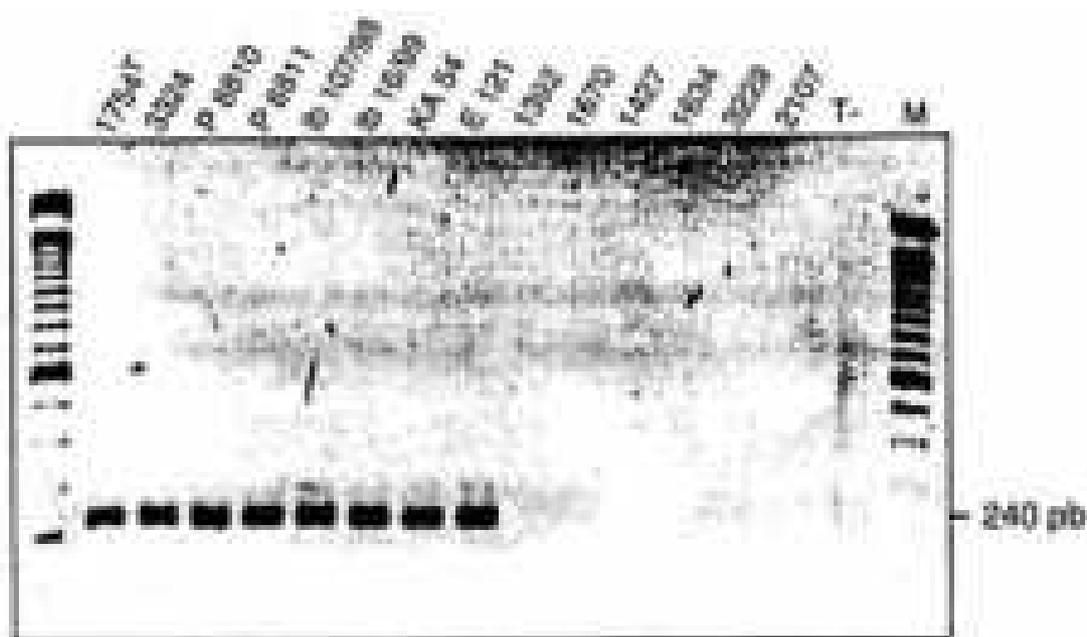


Figure 35: Fragment d'ADN spécifique (240 pb) à PSP amplifié par PCR avec les amorces spécifiques *Pap1* et *Pap2*. Révélation de son absence chez les souches de *Pseudomonas* appartenant à différents groupes génorniques (espèces génorniques 2, 3, 4 et 5).

2.2.3. Identification de séquences spécifiques à PSP sur les séquences des gènes *hrpL*

L'alignement des séquences du gène *hrpL* de *P. s. pv. syringae* (ref U03854 publié dans la banque de gène NCBI) et la séquence *hrpL* obtenue par séquençage à partir de la souche PSP CFBP 3323 (Eurogentec S.A.), nous a permis de repérer les sites de restriction de la Bsp 143 I (GATC) ainsi que la zone du fragment présentant des différences de structure. Le choix des amorces spécifiques est basé sur cette différence entre les 2 fragments *hrpL*. Trois amorces sont dessinées dont le premier couple encadre un fragment de 300 pb (Pap₁/Pap₃), le deuxième couple encadre un segment de 240 pb (Pap₁/Pap₂) (Figure 4.10).

- Pap₁ : 5'-AAC CAC GCC AAC CAT CGT CA-3'
- Pap₂: 5'-CAA CCA CTT TCG CAA AAT GTA TCG C-3'
- Pap₃ 5'-GGA CCT GGA GTC GAA CGG C-3'

2.2.4. Spécificité des amorces

Les amorces ainsi dessinées et synthétisées par Eurogentec S.A. (Belgique) sont testées sur une collection de souches PSP ainsi que sur des souches appartenant à divers *Pseudomonas* et pathovars de *P. syringae*.

Les conditions de PCR sont définies par l'utilisation d'un milieu réactionnel composé de 0,3 µl de Taq appligène (5 U/µl), 5 µl de son tampon (10 x), 3,5 µl de dUTP (10 mM de chaque) 5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de chaque amorce (Pap₁/Pap₂ ou Pap₁/Pap₃). Les conditions de température d'amplification sont : 92C (2mn), 35 cycles (92C (1mn), 64C (30 sec) et 72°C (1mn) et enfin 72C (1mn).

Les produits de la PCR ayant migré sur le gel d'agarose à 2% et coloré au bromure d'éthidium (BET), ont révélé une bande de 300 pb dans le cas des amorces (Pap₁ /Pap₃) (Figure 4.13). et une bande à 240 pb pour le couple Pap₁ /Pap₂ (Figure 4.11). La bande de 300 pb est amplifiée chez presque toutes les souches qui constituent le groupe génomique 1 (renfermant le pv. *papulans*) (Gardan *et al.*, 1999). En revanche, la bande de 240 pb n'est amplifiée que chez les souches de PSP. Ceci a permis de vérifier la spécificité de la séquence nucléotidique identifiée chez le pathovar *papulans* ainsi que la spécificité des amorces dessinées (Figure 4.12)..

2.2.5. Identification d'échantillon

l'amplification d'un fragment de 240 pb par l'utilisation du couple amorces spécifiques (Pap₁ /Pap₂) a permis de confirmer l'appartenance des isolats KA 54 et E121 au pathovar *papulans* et aussi de montrer que les symptômes observés en Allemagne sur le cultivar Delbarestivale sont bien du à *P. s. pv. papulans* (Figure 4.14).

2.3. Discussion

Afin de développer un outil moléculaire permettant l'identification et la détection de l'agent causal de la tache vésiculaire de la pomme, *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, sans passer par les tests conventionnels ni par les techniques lourdes et inadaptées telle que l'hybridation ADN/ADN, nous avons choisi une stratégie basée sur la recherche d'éventuelles séquences spécifiques qui peuvent être situées dans la régions *hrp*

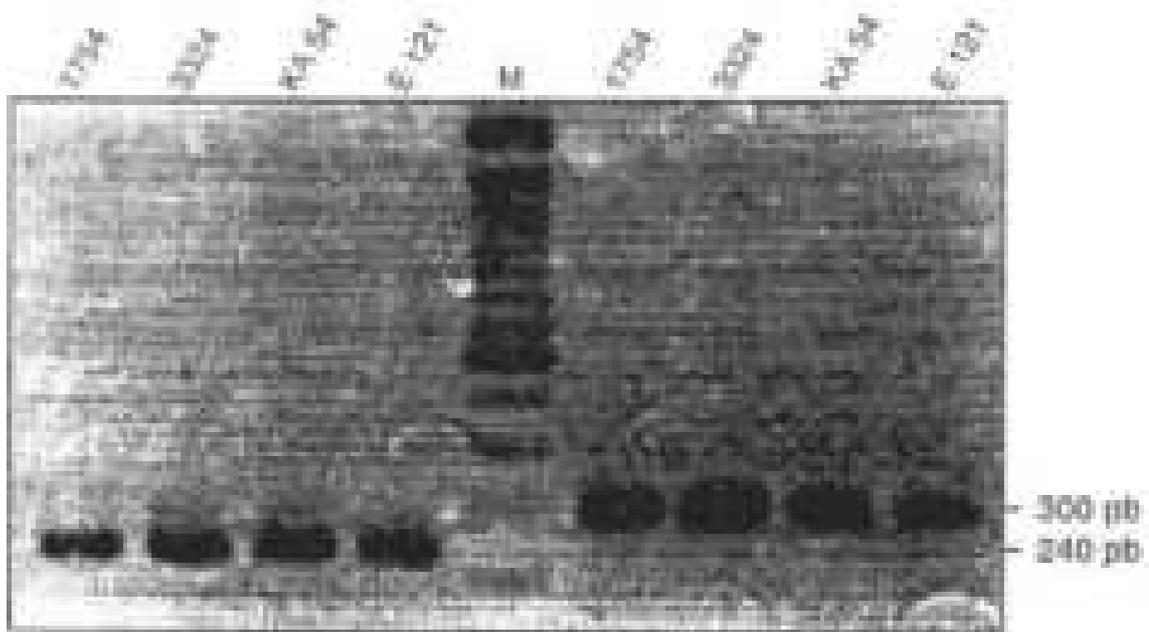


Figure 36 : Amplification par PCR du fragment spécifique de 240 pb et d'un fragment non spécifique de 300 pb, respectivement par les couples d'amorces *Pap1-Pap2* et *Pap1-Pap3*. Ces fragments sont amplifiés chez les souches de PSP (*CFBP 3324*, *CFBP 1754^T*, *KA 54* et *E 121*).

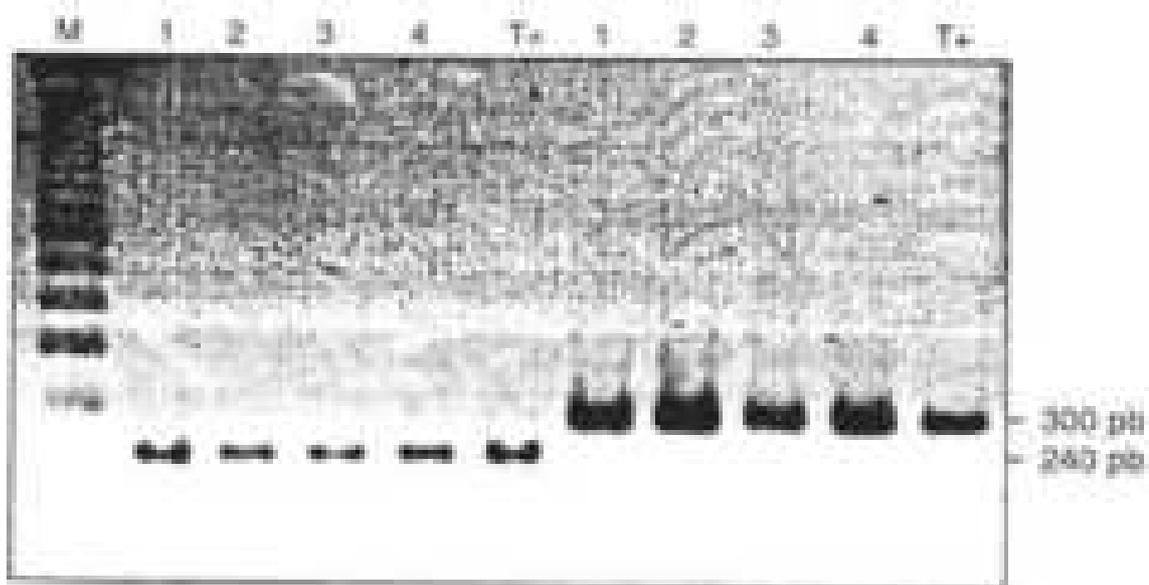


Figure 37 : Amplification par PCR du fragment spécifique de 240 pb et d'un fragment non spécifique de 300 pb, respectivement par les couples d'amorces *Pap1-Pap2* et *Pap1-Pap 3*. L'identification de ces fragments est faite sur les souches provenant de symptômes de PSP observés en Allemagne.

Le couple d'amorces dessinées et synthétisées à partir des séquences du gène *hrpL* disponibles dans la banque de données, nous ont permis de mettre en évidence la présence d'un fragment d'environ 600 pb correspondant au gène *hrpL* de *P.s. pv. syringae*. En revanche les tests PCR avec les amorces *hrpL* sur une collection de souches de *P. syringae*

ont révélé l'absence de *hrpL* chez certains pathovars de *P. syringae*. L'absence du fragment *hrpL* peut constituer un critère de discrimination entre les pathovars. Chez *P. syringae*, trois gènes de régulation du système *hrp* ont été identifiés et nommés *hrpS*, *hrpR*, et *hrpL* (Gopalan et He, 1996). Par ailleurs, Leite *et al.* (1995) ont utilisé les gènes *hrp* pour la détection et l'identification des *Xanthomonas* associés aux graines de poivron et de tomate. D'après ces auteurs, bien que les différents *Xanthomonas* ne sont pas distingués par le fragment d'ADN obtenu avec les amorces de l'opéron *hrpB*, les variations de séquences présentes dans les gènes *hrp* des différentes souches de *Xanthomonas* sont précieuses pour différencier les *Xanthomonas* pathogènes des plantes.

Les essais de spécificité du couple d'amorces Pap₁/Pap₂ ont révélé une amplification différentielle entre les pathovars de *syringae*. Sur l'ensemble des souches testées, seul le *P. s. pv. papulans* génère un signal positif affirmant ainsi la spécificité de la séquence déterminée. De plus, les tests PCR effectués avec un autre couple d'amorces (Pap₁/Pap₃) ont montré une spécificité envers la majorité des pathovars qui constituent le groupe génomique 1 de *P. syringae* (Gardan *et al.*, 1999). Ce couple d'amorces peut représenter un outil intéressant pour la taxonomie des *Pseudomonas*

La technique PCR représente un outil très performant et très adapté pour la détection des bactéries phytopathogènes. Elle permet l'amplification spécifique en quelques heures d'une séquence nucléotidique à des taux considérables. La PCR est un outil d'une grande sensibilité, exprimée en termes de limite de détection. Les estimations se situent à environ 10^2 - 10^3 ufc/ml, soit une détection 1000 fois plus sensible que la technique ELISA (Leite *et al.*, 1995).

En conclusion, il apparaît clairement que les prospections au niveau des gènes *hrp* qui gouvernent l'aspect moléculaire de l'expression du pouvoir pathogène, peut s'avérer intéressante même si l'ensemble des mécanismes reste peu connu. Les variations des séquences présentes dans les gènes *hrp* chez les différentes souches de *Pseudomonas* peuvent constituer un moyen pour différencier les *Pseudomonas* phytopathogènes.

Discussion générale – Conclusion

L'objectif de notre travail était de vérifier l'existence d'une relation entre la présence de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* au sein de la microflore épiphyte du Poirier et son rôle éventuel dans certains dégâts atypiques observés en vergers ces dernières années.

Dans une première partie, par l'étude de la dynamique des populations épiphytes de PSS, nous avons mis en évidence la présence de cette bactérie sur les organes aériens du Poirier avec un niveau de population qui reste faible, contrairement aux tailles de population élevées observées par Luisetti et Paulin (1972). L'ensemble des résultats montre une importante fluctuation des niveaux de populations au cours des deux années d'étude dans les deux sites pour les deux situations (verger sain/malade). La population de PSS dans les bourgeons, se trouve à un niveau très faible (voire non détectable en dessous du seuil de détection : 10^2 ufc/organe). Cette colonisation faible des bourgeons peut être due à l'absence d'opportunité liée aux conditions climatiques qui n'ont pas favorisé le développement de la bactérie. Sur les fleurs, le niveau est nettement supérieur : de l'ordre de 10^4 ufc/ fleur. Les feuilles, présentent les niveaux les plus importants, qui oscillent entre 10^2 et 10^5 ufc/feuille. La présence de populations abondantes dans les fleurs et les feuilles est probablement liée à la qualité du support et aux conditions climatiques plus favorables. En effet, les fleurs, par les produits des nectaires et les feuilles par les nutriments relargués à leur surface (Beattie et Lindow, 1999) offrent les conditions nutritionnelles nécessaires à la multiplication des bactéries (Mercier et Lindow, 2000).

La comparaison entre les dynamiques des populations de PSS obtenues en 1997 et 1998 dans le même site (Maine et Loire), montre une variation saisonnière, avec des niveaux en PSS plus importants au printemps, suivie d'une chute estivale, notamment pour l'année 1998. L'humidité semble jouer un rôle déterminant dans l'évolution des populations épiphytes, ainsi les précipitations enregistrées au cours du printemps 1998 étaient sans doute à l'origine de l'accroissement des populations de PSS pendant cette période. La dynamique des populations de PSS sur les feuilles de Poirier placées dans des conditions d'humidité saturante est caractérisée par une phase de multiplication active (Yessad, 1992). Par ailleurs, de nombreux travaux montrent qu'une humidité relative élevée est favorable à la croissance et la multiplication de *P. syringae*, aussi bien au champ qu'en conditions contrôlées (Latorre *et al.*, 1985). En revanche, un stress hydrique entraîne une baisse des populations de *P. syringae* (Leben, 1965, Yessad, 1992). De fortes pluies entraînent une prolifération importante de la microflore, des précipitations réduites ou inexistantes impliquent une diminution du nombre de bactéries épiphytes. Nous assistons donc à un phénomène réversible. Les températures jouent un rôle plus secondaire, accélérant le processus de prolifération quand elles sont élevées ou le freinant quand elles sont plus basses.

Les niveaux très faibles de PSS dans les bourgeons et l'absence de gel sont probablement à l'origine de l'absence de symptômes. En effet, de nombreux auteurs rapportent que les nécroses des bourgeons apparaissent généralement après des gelées, et suggèrent l'implication des bactéries glaçogènes. Les températures négatives permettent aux bactéries de PSS d'exprimer leur pouvoir glaçogène par l'initiation de noyau formateur

de glace, précurseur de la formation de gel qui provoque la formation de microlésions nécessaire à la pénétration de la bactérie dans les tissus de l'hôte sensible. L'expression du pouvoir glaçogène semble dépendre de la densité des populations de PSS glaçogène et des conditions de températures (Crosse *et al.*, 1984 ; O'Brien et Lindow, 1988 ; Montesinos et Vilardell, 1991).

Une variabilité du pouvoir pathogène est observée chez les isolats épiphytes de PSS du Poirier et du Pommier. Cependant, il existe une spécificité du pouvoir pathogène de PSS du Poirier, car seules certaines souches isolées de Poirier sont capables de reproduire les symptômes caractéristiques du dessèchement bactérien. Ces résultats rejoignent l'observation de Yessad *et al.* (1994), sur 81 souches isolées de 16 hôtes où les seuls isolats pathogènes pour le Poirier proviennent du Poirier. De plus, tous les isolats obtenus à partir de cet hôte ne sont pas capables de provoquer une infection, ce qui rejoint l'hypothèse de Hirano et Upper, (1990) de la présence au sein des populations épiphytes associées à un hôte, d'un mélange de souches pathogènes et non pathogènes.

Le pathotypage des isolats, par les réactions sur les différents hôtes, nous a permis de montrer l'existence au sein de la population de PSS épiphytes de six pathotypes dont la majoritaire est composé de souches capables d'induire une réaction sur : Lilas, Poirier et Haricot. La présence de différents pathotypes composant la population épiphyte de PSS conforte l'hypothèse de Crosse *et al.* (1984) qui ont suggéré que le pathovar *syringae* est composé d'un ensemble de groupes de souches caractérisées par une spécificité du spectre d'hôtes. De même la présence d'une grande proportion de souches de *P. syringae* isolées d'un hôte donné qui ne sont pas pathogènes sur cet hôte, a été signalée par de nombreux auteurs (Gross *et al.*, 1983; Hirano et Upper, 1983 ; Lindemann *et al.*, 1984).

La diversité des isolats de PSS épiphytes dans l'expression du pouvoir pathogène semble suggérer une subdivision du pathovars *syringae* en sous groupes, en fonction de la spécificité parasitaire.

Les souches isolées de la microflore épiphyte du Poirier et du Pommier présentent les caractères conventionnels qui les apparentent à *P. syringae*, d'après les critères définis par Lelliott *et al* (1966). L'utilisation de la taxonomie numérique basée sur les caractères du Biotype 100 a montré que l'ensemble des isolats se regroupe dans un même phénon avec la souche de PSS CFBP 1543. Ceci a permis de constater que les isolats étudiés sont très proche du pathovar *syringae*. Cependant, 4 sous-phénons sont individualisés, représentant l'hétérogénéité au sein des PSS isolés de la microflore épiphyte. Trois groupes sur les quatre sont constitués par des isolats PSS ayant le profil du pathovar *syringae* défini par Young (1980) (produisant une réaction sur Lilas, Poirier et Haricot (P1)) et par des isolats non pathogènes. Le quatrième groupe, par contre contient en majorité des isolats non pathogènes. La présence du pathotype P1 dans les différents groupes du phénon 1 montre qu'il n'existe pas de relation entre l'hétérogénéité phénotypique et le pouvoir pathogène.

La comparaison des isolats en fonction de leur origine définie par le site géographique de prélèvement (Dordogne/Maine et Loire) et le précédent phytosanitaire (verger sain et verger malade) n'a pas permis d'établir une relation entre l'origine des isolats et leur caractéristiques (pouvoir pathogène, phénotypique, et sérologique). L'absence de correspondance entre l'origine et le comportement des isolats nous permet de formuler deux hypothèses.

La première hypothèse serait que les populations de PSS sont constituées de groupes de souches présentant une variabilité : physiologique, écologique et épidémiologique.

Le pathovar *syringae* a été isolé de nombreuses plantes dans différentes régions géographiques (Bradbury, 1986).

La deuxième hypothèse suggèrerait que les bactéries de PSS possèdent des aptitudes à coloniser un support sans avoir les capacités à induire une infection. Ainsi les différentes souches qui constituent les populations épiphytes du Poirier ont probablement des pathosystème différents. En effet, la présence d'une bactérie en épiphyte sur un hôte et la production de réaction par inoculation artificielle n'impliquent pas forcément qu'elle est pathogène sur cet hôte.

Pour être suffisamment appréciable l'exploration de la variabilité doit concerner en plus les caractères phénotypiques les caractères génotypiques. Dans une première étape, l'hybridation ADN/ADN avec la souche type du pathovars *syringae* permettrait de confirmer l'appartenance de ces isolats à la même espèce génomique. Dans une seconde étape, une étude d'hétérogénéité par PCR/RFLP après définition d'une zone de la région ITS de l'opéron ribosomique, pourrait répondre à la diversité des populations épiphytes de PSS.

L'étude étendue aux populations épiphytes de la microflore du Pommier a permis de déceler des isolats particuliers de *P. syringae* appartenant au pathovar *papulans*. Cette bactérie est connue comme responsable de la tache vésiculaire de la pomme (blister spot), qui affecte spécialement les pommes du cultivar Mutsu. La caractérisation de ces isolats montre une grande similitude avec les souches de référence de *P. syringae* pv. *papulans* isolées de taches vésiculaires de pommes originaires des différents pays où la maladie est présente. De plus, les tests du pouvoir pathogène ont permis de reproduire les symptômes typiques du "blister spot" avec les isolats obtenus en France : nous pourrions donc affirmer que nous avons découvert la présence en France de cette bactérie.

Enfin, l'étude de la caractérisation biochimique, sérologique et moléculaire nous a permis de mettre en évidence de nouveaux critères discriminants qui permettent de différencier les pathovars *papulans* et *syringae*, par la formation de puits sur gel de polypectate (production de polygalacturonase), par la création d'un nouveau séro-groupe-O (PERSAVTOM 4) et le développement d'amorces spécifiques pour la détection de PSP par PCR.