

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université 08 Mai 45 Guelma Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de : Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biologie Moléculaire des Procaryotes

Thème

Isolement et identification classique des bacteries phytopathogènes

Présenté par :

- KHESSIB Imen
- KEDJEDJA Hadda

Devant le jury composé de :

Président : BENBELKACEM. S

(M.A.B.Univ de Guelma)

Examineur : AMRIS

(M.A.B.Univ de Guelma)

Promoteur : BOUMAZA. A

(MA.A.Univ de Guelma)

Juin 2013

REMERCEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon **DJEU** qui m'a donné le courage et la Volonté d'achever ce travail.

Nous voudrions témoigner notre reconnaissance à Mme **BOUMAZA A** pour avoir encadré ce mémoire. Nous la remercions particulièrement pour sa rigueur scientifique, son exigence, sa disponibilité et ses encouragements, en nous faisant partager son expérience et ses connaissances scientifiques.

Nous exprimons ensuite notre estime et nos remerciements aux membres de jury :

A madame **BENBELKACEM S**, maitre assistant au département d'écologie, d'avoir accepté de juger ce modeste travail

A madame **AMRJ S**, maitre assistant au département de biologie, de nous avoir accordé le privilège de participer à ce jury.

Je souhaite également remercier très chaleureusement tous les membres du laboratoire, et plus particulièrement : **Wafa, Hassiba, Ratiba, Ghania et Mouna**

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail dédié aux :

Chers Grands parents Ali et Fatiha;

Chers Parents ;

Mon Frère;

Toute la famille Khessib et Ayat ;

Tous les amis ;

Pour leur présence dans tous les instants,

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté.

Avec toute mon affection et ma reconnaissance

Imen

TABLE DES MATIERES

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

.....

Revue bibliographique

1-La définition de la phytopathologie.....	01
2-Définition d'une maladie de plante.....	01
2-1-Les différents types des maladies.....	01
3- Les agents pathogènes.....	01
3-1-Caractères généraux	01
3-2- La reconnaissance de l'agent pathogène.....	02
3-2-1-Reconnaissance non spécifique.....	02
3-2-2-Reconnaissance spécifique et concept gène-pour-gène.....	02
4- Les types des agents pathogènes.....	03
5- Les sources d'inoculum.....	04
6- Les symptômes.....	05
6-1-Les types des taches sur la feuilles.....	05
6-1-1- Les taches bactériennes.....	05
6-1-2-Chancres bactérienne.....	06
6-1-3 Moucheture bactérienne.....	07
7- Comment agissent les bactéries phytopathogènes ?	07
8- Stratégies utilisées par les pathogènes.....	09
9- Mécanisme.....	09
10- Résistances variétales : mécanismes et durabilité.....	11
10-1 Résistance variétales.....	11
10-1-1 Définition.....	11
10-2 Mécanismes.....	12
11- Le dialogue moléculaire entre la plante et l'agent pathogène.....	14

11-1 Comment induire ces mécanismes de défense ?.....	14
12- La lutte.....	15
12-1- Les méthodes de lutte.....	16

Matériel et méthodes

1-Matériel végétal symptomatique.....	18
2-Isolement et identification des bactéries.....	18
2-1- Isolement.....	18
2-2- Purification.....	19
2-3-Identification classique.....	20

Résultats et Discussion

1-Isolement et purification.....	22
2-Identification.....	22

Conclusion et perspectives

.....

Références bibliographiques

.....

Résumé

Annexes

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AE : Les agents éliciteurs

Avr : gène d'avirulence

GN : Gélose nutritive

HR : Hypersensitive Response

INRA : Institut national de la recherche agronomique

LAR: Local Acquired Resistance

ONPG: Orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside

PCR : polymerases chain reaction

PR : Phytoalexines protéines

QTL : Quantitative Trait Loci

R : gène de résistance

RSI : Résistance systémique induite

SAR: Systemic Acquired Resistance

SDP : Les stimulateurs de défense de la plante

T3SS : Système de sécrétion de type III

T-AND: Transfert DNA

Ti : Tumor inducing

TSI : Triple Sugar Iron

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Les différents types des taches sur les feuilles	05
02	Taches des lésions bactériennes sur les feuilles	06
03	Symptômes du chancre bactérien sur une foliole de tomate	06
04	Lésions de la moucheture bactérienne sur des feuilles de tomates	07
05	Vue au microscopie électronique de balayage de bactéries pénétrant au niveau de la lésion	09
06	Mécanisme de défense d'une cellule résistante	14
07	le matériel végétal utilisé	17
08	protocole d'isolement	18
09	protocole de la coloration de Gram	19

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Les différents types des maladies des plantes	01
02	Fourchettes de températures optimales pour la croissance des agents responsables des maladies bactériennes de la plante	02
03	Forces évolutives impliquées dans l'adaptation des agents pathogènes	13
04	Symptômes et types de bactéries isolées	21
05	Résultats des tests biochimiques pour les souches E et F	22

Les plantes constituent la principale source énergétique dont dépendent directement ou indirectement l'homme et les animaux. Elles sont également les seuls organismes supérieurs ayant le pouvoir de convertir et de stocker l'énergie lumineuse sous forme de glucides, lipides et protéines (énergie chimique).

Les plantes sont constamment entourées d'un grand nombre de microorganismes phytopathogènes (Bactéries, champignons, protozoaires ou virus) et, malheureusement, lorsqu'une plante est atteinte d'une maladie, sa croissance, sa fertilité et sa productivité sont affectées. Des symptômes se développent et tout ou partie de l'organisme peut mourir ce qui peut provoquer de graves dégâts économiques et/ou écologiques.

Dans notre étude, nous sommes intéressés des infections bactériennes touchant des cultures à intérêt économique et nutritionnel : les oliviers et les agrumes. Donc, l'objectif du travail entrepris dans ce mémoire est d'isoler et identifier, selon les moyens disponibles, les bactéries phytopathogènes responsables de certains symptômes observés sur les feuilles des agrumes et des oliviers en adoptant le plan de travail suivant :

- Isolement de bactéries à partir des tissus infectés.
- Purification puis identification des isolats en passant par une observation macroscopique, observation microscopique puis des tests biochimiques préliminaires utilisés pour l'identification classique.

1-La définition de la phytopathologie

Elle se définit comme la discipline scientifique qui étudie les micro-organismes pathogènes (champignons, bactéries, virus) et les facteurs environnementaux qui induisent des maladies chez les plantes, mais aussi les mécanismes par lesquels ces différents éléments agissent, ainsi que les méthodes de prévention et de contrôle des maladies. [Delaunay-Cesbron, 2009]

2-Définition d'une maladie de plante

Une maladie de plante peut-être définie par une succession de réponses invisibles et visibles des cellules et des tissus d'une plante, suite à l'attaque d'un micro-organisme ou à la modification d'un facteur environnemental qui provoquent des bouleversements de forme, de fonction ou d'intégrité de la plante. Ces réponses peuvent induire une altération partielle voire la mort de la plante ou de certaines de ses parties. [Akram, 2008]

2-1-Les différents types des maladies

On peut classer les maladies des plantes comme suit : [Tableau 1]

Tableau 1 : Les différents types des maladies des plantes. [Johnson et Sekhar, 2012]

Maladies infectieuses (biotiques)	Maladies non infectieuses (abiotiques)
Des champignons	Températures trop basses ou trop hautes
Des procaryotes (bactéries et mollicutes)	Manque ou excès d'humidité
Des nématodes	Manque ou excès de lumière
Des protozoaires	Acidité ou alcalinité du sol

3- Les agents pathogènes

3-1-Caractères généraux : Avant d'envisager une lutte contre une maladie de plante, il est nécessaire d'identifier le pathogène responsable et de connaître son écologie, son cycle de développement et ses modes de dissémination et de maintien dans l'environnement. La crête de croissance et d'infectiosité d'un agent pathogène s'observe à l'intérieur d'une fourchette de températures précise [Tableau 2]. En dehors de cette fourchette, les agents pathogènes se multiplient beaucoup plus lentement. [INRA, 2011]

Tableau 2 : Fourchettes de températures optimales pour la croissance des agents responsables des maladies bactériennes de la plante. [Toussaint, 2009]

Maladie	Organisme responsable	Températures optimales
Tache bactérienne	<i>Xanthomonas campestris . Vesicatoria</i>	24°C- 30°C
Moucheture bactérienne	<i>Pseudomonas syringae. Tomato</i>	18°C- 24°C
Chancre bactérien	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	24°C- 32°C

3-2- La reconnaissance de l'agent pathogène

La reconnaissance des agents pathogènes chez les plantes fait intervenir deux types de perception. Le premier type de reconnaissance «non race spécifique» met en jeu des molécules appelées éliciteurs généraux, le deuxième qui est «race spécifique». Ces deux mécanismes de reconnaissance constituent les deux branches du système d'immunité inné chez les plantes [Jones et Dangl, 2006].

3-2-1-Reconnaissance non spécifique

La reconnaissance non-spécifique est méditée par des éliciteurs dits non spécifiques ou généraux. Le terme éliciteur a été initialement utilisé pour décrire les molécules capables d'induire la production des phytoalexines [Keen, 1975], il est maintenant utilisé pour l'ensemble des molécules qui induisent des réactions de défense chez les plantes [Montesano et al, 2003].

3-2-2-Reconnaissance spécifique et concept gène-pour-gène

Ce concept a été développé pour la première fois par [Flor, 1955], il indique que la présence simultanée et spécifique d'un gène de résistance dans le génome de la plante et d'un gène d'avirulence correspondant dans celui du parasite conduit à une résistance spécifique. [Cazaux, 2009]

4- Les types des agents pathogènes

On peut classer les agents pathogènes comme suit :

- **Les agents subcellulaires** : comme les virus et les viroïdes,
- **les agents cellulaires** dont on cite :

a- Les Bactéries : (~ 200 espèces) procaryotes, génome porté par un chromosome bactérien appelé nucléoïde et par des plasmides pouvant être transmis horizontalement entre individus d'espèces identiques ou non (transmission de gènes de résistance). Les plasmides portent parfois les gènes impliqués dans l'interaction du pathogène et de la plante (*Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*). Les mécanismes de pathogénèse sont très variés : synthèse de toxines (certaines *Corynébactéries*), d'antibiotiques. Les infections bactériennes provoquent des symptômes variés (déperissements pourritures, tumeurs, nécroses, chancres, flétrissements) et leur identification repose sur l'isolement et l'observation en microscopie (morphologie, Gram, présence de flagelles...etc), les tests biochimiques, sérologiques et moléculaires (hybridation, PCR ...etc). Six genres bactériens sont principalement impliqués dans les maladies des plantes parmi ces genres on a :

- *Erwinia* : feu bactérien des pomoides (*E. amylovora*), flétrissement des cucurbitacées (*E. tracheiphila*). [Hélène, 2010]

La transmission et la conservation des bactéries se fait par les débris et les organes végétaux morts et souillés. Les pratiques culturelles (récoltes, irrigation...etc), les échanges internationaux (semences et organes de propagation végétative), les insectes, les nématodes, la pluie et le vent sont autant de sources possibles de dissémination des bactéries phytopathogènes. [Hélène, 2010]

b- Mollicutes : Procaryotes strictement endophytes (liber). Il s'agit de bactéries ayant subi une évolution régressive à partir de bactéries à Gram positif ayant perdu la capacité de former une paroi par réduction du génome. [Nyengani, 2008]

c- Champignons (~ 8000 espèces). Ce sont des eucaryotes présentant une très grande variété taxonomique du fait de l'organisation complexe de l'appareil végétatif et de leur mode de reproduction. Les symptômes observés sont multiples, variés et atteignent tous les organes du végétal : pourritures, nécroses des fleurs, des fruits, des tiges, des feuilles ; chancres sur les tissus de protection ; déperissements, flétrissements des vaisseaux du bois.

Les champignons sont à eux seuls responsables de 70% des pathologies végétales. [Selosse et Gibert, 2011]

d- Protozoaires (~ quelques dizaines). On connaît quelques protozoaires phytopathogènes qui appartiennent au genre *Phytomonas* et provoquent des maladies en zone tropicales (flétrissement létal du cocotier, nécrose du phloème du caféier). [Nyengani, 2008]

e- Nématodes (~ 500 espèces). Ce sont des eucaryotes pluricellulaires. Leur sécrétions salivaires dans les tissus végétaux sont responsables de nécroses, déformations, tumeurs. [Nyengani, 2008]

5- Les sources d'inoculum

Avant même que la maladie puisse se développer, il est nécessaire que la bactérie responsable soit introduite au champ. Les diverses sources à partir desquelles peuvent provenir la bactérie sont communément appelées

- **La semence** il est important de préciser qu'un très faible taux de contamination de la semence par une bactérie pathogène suffit au développement de la maladie La bactérie responsable du chancre bactérien peut également survivre 10 mois sur **des pièces de bois contaminées**. Cette donnée démontre, que dans les serres servant à la production de transplants, il est essentiel de désinfecter les structures de serre et tout le matériel utilisé pour la production de transplants. [Lacroix, 2012]

La bactérie peut être introduite dans un champ par **des transplants** ne présentant aucun symptôme de la maladie. En effet, des transplants produits sous des conditions non favorables à l'expression des symptômes (température non adéquate et humidité relative basse), peuvent contenir des quantités importantes de bactéries bien que leur apparence extérieure soit normale. Ainsi, ces transplants seront mis au champ et lorsque les conditions seront idéales pour la maladie, les symptômes se développeront. [Lemattre, 2006]

- **Le sol et les résidus de culture** représentent une autre source d'inoculum .Le sol est un milieu dans lequel il y a une multitude d'organismes dont certains entrent en compétition avec les bactéries phytopathogènes. Il est donc avantageux pour une bactérie phytopathogènes de se retrouver dans des résidus de culture car elle est en quelque sorte protégée des autres organismes du sol. De plus, si les **résidus de culture** sont enfouis, plutôt que laissés à la surface du sol, ils se décomposent plus

rapidement puisqu'ils sont en contact avec divers organismes assurant leur dégradation. [Lemattre, 2006]

- **Les mauvaises herbes** comme la Morelle noire et le Chénopode blanc peuvent également servir de réservoirs pour le maintien des bactéries pathogènes. [Lacroix, 2012]

6- Les symptômes

6-1-Les types des taches sur la feuilles

Les différentes **tâches et altérations** observées sur les feuilles des plantes ont été classées dans cinq grandes catégories de symptômes qui tiennent compte de leurs dimensions mais aussi de leur apparence :

- Taches plutôt petites et/ou nécrotiques sur feuilles
- Taches à plages marron souvent en bordure des feuilles
- Taches huileuses sur feuilles (jaunissant et se nécrosant ultérieurement)
- Taches jaunes sur feuilles
- Taches poudreuses blanches, fauves ... [Lacroix, 2012b]

Exemples de taches observées sur feuilles : (figure 1)

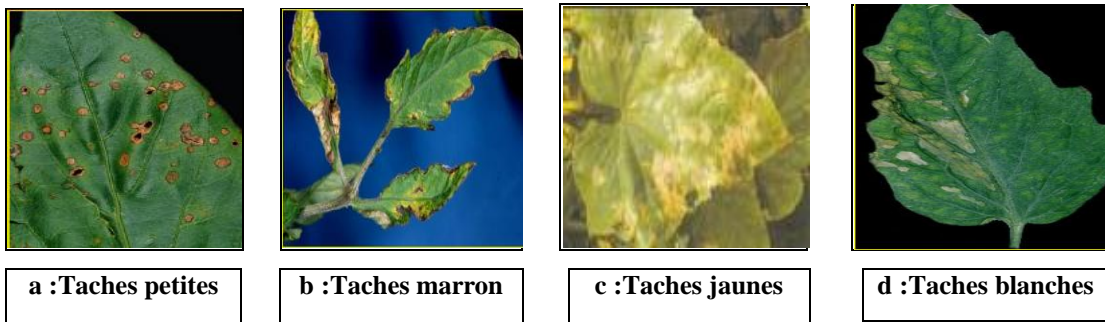


Figure 1 : Les différents types des taches sur les feuilles. [Anonyme ; 2011]

6-1-1- Les taches bactériennes

L'agent pathogène responsable de la tache bactérienne peut produire des lésions sur toutes les parties aériennes de la plante (feuilles, tiges, fleurs et fruits). Il est difficile en se fiant uniquement aux signes visibles de la maladie, de distinguer avec certitude la tache bactérienne de la moucheture bactérienne, surtout dans ses premières manifestations [Dugé T, 2009]

La tache bactérienne se manifeste d'abord par de petites lésions sombres circulaires ou de forme irrégulière, qui sont entourées d'une auréole jaune. Les lésions ont tendance à se concentrer sur le pourtour et aux extrémités des feuilles. Elles peuvent atteindre un diamètre de 3-5 mm. Les feuilles infectées peuvent paraître roussies. Quand les taches sont nombreuses, le feuillage jaunit et finit par mourir, ce qui entraîne la défoliation de la partie inférieure du plant. [Dugé T ,2009] [Figure 2]



Figure 2 : Tâches des lésions bactériennes sur les feuilles [1]

6-1-2-Chancre bactérienne

Le chancre bactérien, qui peut faire suite à une infection primaire (systémique) ou à une infection secondaire (foliaire), se manifeste par un éventail de symptômes. Les infections primaires sont attribuables à des semences infectées ou à l'invasion par les bactéries des tissus vasculaires des plantules [Mohler F, 1987]. Les symptômes, qui ne se manifestent parfois que plusieurs semaines après l'infection, commencent par le flétrissement des feuilles inférieures qui s'enroulent vers le bas. En général, le flétrissement gagne progressivement en hauteur, à moins que le point d'infection ne se situe dans le haut de la plante. [Lacroix, 2012b] [Figure 3]



Figure 3 : Symptômes du chancre bactérien sur une foliole de tomate [1]

6-1-3 Moucheture bactérienne

Les lésions de la moucheture bactérienne peuvent apparaître n'importe où sur le feuillage, les tiges ou les fruits. Les symptômes sont très difficiles à différencier de ceux qui sont causés par la tache bactérienne. Ils ressemblent aussi beaucoup aux premiers symptômes de la brûlure alternarienne. Sur les feuilles, la moucheture bactérienne se manifeste par de petits points noirs qui, habituellement, ne font pas plus de 2 mm de diamètre et sont entourés d'une auréole jaune [Chauv et Jonathan, 2000]. Les mouchetures déforment parfois les feuilles en restreignant l'expansion des tissus foliaires. Souvent, les lésions sont concentrées près du pourtour des feuilles qui, dans certains cas, est totalement brûlé comme s'il s'agissait d'un chancre bactérien. En grand nombre, les mouchetures finissent par se fondre et faire mourir toute la foliole. Les plantules gravement infectées rabougrissent. [Mohler F, 1987]

Seuls les fruits verts de moins de 3 cm de diamètre sont sensibles aux infections par l'agent responsable de la moucheture bactérienne. Sur le fruit, la maladie se manifeste par l'apparition de petites taches noires (de moins de 1-3 mm), légèrement surélevées et souvent cernées d'une fine auréole allant du vert au jaune [1]. Les lésions, habituellement superficielles, peuvent être détachées avec l'ongle. Une fois que les fruits sont rouges, ils ne sont plus vulnérables aux infections, car ils sont alors dépourvus de soies [Ayres AJ, 2001] Celles-ci, en se brisant, offrent en effet une porte d'entrée aux bactéries. Sur les fruits déjà infectés, des lésions noires apparaissent après le mûrissement. [Figure 4]



Figure 4 : Lésions de la moucheture bactérienne sur des feuilles de tomates [1]

7- Comment agissent les bactéries phytopathogènes ?

Deux types de relation peuvent s'établir : **biotrophe** (le parasite exploite la cellule végétale sans la tuer) ou **necrotrophe** (destruction de la cellule végétal).

Avant l'établissement de la relation parasitaire, le dialogue moléculaire qui s'engage entre parasite et plante aboutit à deux situations :

a-Réaction compatible : Le pathogène l'emporte, se multiplie de façon active et l'hôte qui développe des symptômes plus ou moins prononcés en fonction de l'agressivité du parasite et de la résistance de la plante. [Bouteau H, 2010]

b-Réaction incompatible : Les réactions de défense de la plantes sont efficaces et stoppent assez rapidement la multiplication du parasite [Djebali N, 2008]. Trois types de résistances sont caractérisés :

* **La résistance non-hôte** : incompatibilité d'espèce des deux parties. [Bouteau H, 2010]

* **La résistance générale (horizontale)** : polygénique, partielle, elle conduit à une compatibilité plus ou moins marquée. [Bouteau H, 2010]

* **La résistance spécifique (verticale)** : souvent monogénique, elle entre dans le cadre du modèle gène à gène. [Djebali N, 2008]

Elles ont sélectionné, au cours de l'évolution, des outils adaptés à leurs stratégies d'infection et d'invasion des tissus végétaux vivants, afin de survivre et de se protéger des compétitions microbiennes. Mais l'établissement de la maladie résultera de la compatibilité entre la bactérie et la plante-hôte. Pour beaucoup d'entre elles, la compatibilité bactérie-plante s'établit à la suite de la sécrétion de protéines par le microorganisme [INRA, 2009]. Une fois pénétrée dans la plante, la bactérie va se multiplier entre les cellules, provoquant de proche en proche leur mort, conférant cet aspect translucide désigné par le terme de "graisse" [Djebali N, 2008]. La production de toxines par certains germes est associée à l'apparition de nécroses et de flétrissement.

Les déséquilibres en phytohormones se traduisent par l'apparition de tumeurs et de modifications, associées à des proliférations désordonnées des cellules végétales (on parle d'hyperplasie), dans les pathologies à *Agrobacterium* en particulier, mais également dans des maladies provoquées par d'autres germes, par exemple *Rhodococcus fascians* [Dugé, 2009]

Les enzymes produites par les bactéries de macération, comme *Erwinia carotovora*, agent de la pourriture de l'iris, digèrent le ciment, pectine et cellulose, des parois des cellules végétales, désintégrant ainsi les tissus et les organes envahis [Djebali N, 2008]. Les mécanismes d'infection sont complexes et mettent en jeu des métabolites bactériens très divers [Figure 5].

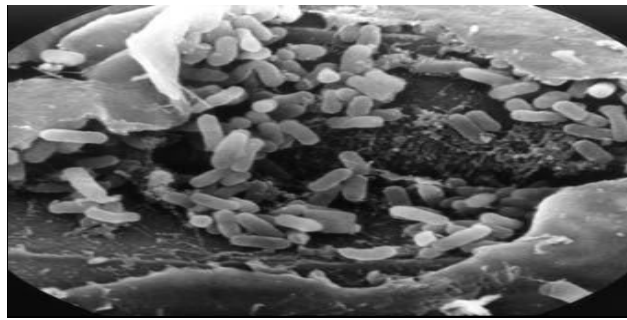


Figure 5 : Vue au microscopie électronique de balayage des bactéries pénétrant au niveau de la lésion produite par l'extrusion d'une racine [Mazurier, 2012]

8- Stratégies utilisées par les pathogènes

***Nécrotrophes** : enzymes dégradant la paroi, destruction du tissu, macération, spectre d'hôte large, ex: *Erwinia, botrytis*. [Mbaye et al, 2008]

***Biotrophes** : contact intracellulaire avec les cellules végétales, les cellules restent vivantes, spectre d'hôte étroit parfois une seule espèce, ex: rouilles fongiques, virus, nematodes endoparasites, *Pseudomonas*. [Viollet, 2010]

***Hemibiotrophes** : Phase biotrophe initiale puis nécrotrophe, spectre intermédiaire, *Phytophthora infestans*. [Mandroux, 2012]

9- Mécanisme

La dynamique épidémique des maladies bactériennes se traduit par plusieurs évènements qui constituent le cycle infectieux de base : phase de conservation de l'inoculum, la phase d'infection et la phase de dispersion.

a- La phase de conservation

Les bactéries peuvent se conserver entre deux phases d'infection dans des débris végétaux (malades ou résidus de culture), dans des chancres ou bien dans les semences. Pour bon nombre d'espèce et notamment d'organismes de quarantaine, les semences constituent d'ailleurs le principal acteur de la dissémination longue distance. [Jourdan E, 2008]

b- La phase d'infection

L'infection se fait le plus souvent de façon aléatoire en utilisant des ouvertures naturelles comme les stomates, les lenticelles, les hydathodes ou par les blessures occasionnées par des insectes phytophages ou lors de tailles. Le sol et la rhizosphère (la

zone proche des racines) constitue un milieu de survie pour de nombreuses bactéries phytopathogènes. [Jourdan E, 2008]

Le comportement nécrogène repose essentiellement sur la capacité de certaines bactéries à élaborer un système de sécrétion de type III (T3SS) et à injecter, au moyen de ce système de sécrétion, des effecteurs protéiques dans l'apoplaste ou dans le cytoplasme des cellules hôtes. Ces effecteurs perturbent le métabolisme des cellules hôtes et provoquent d'une façon ou d'une autre leur mort; mort qui permet le relargage de composés dans l'apoplaste permettant aux bactéries présentes dans les espaces intercellulaires de s'entourer d'un environnement riche, favorable à leur croissance [Mazurier, 2012]

Les agents nécrogènes ne sont pas des nécrotrophes ! Ils provoquent la mort des cellules hôtes mais ne se multiplient pas dans les tissus en décomposition. Certaines bactéries nécrogènes utilisent également des toxines telles que la coronatine (*Pseudomonas syringae*pv. *tomato*, agent de la moucheture de la tomate) ou la phaseolotoxine (*Pseudomonas savastanoi*pv *phaseolicola*, agent de la graise à halo du haricot) [Viollet, 2010]. Parmi les bactéries nécrogènes se situent également des espèces appartenant au genre *Xanthomonas*, *Ralstonia* et *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien.

Le pouvoir pathogène des bactéries macergènes est lié principalement à la production d'enzymes dégradant les parois cellulaires végétales tels que les pectates lyases et des polygalacturonases. Ces bactéries sont responsables de pourritures molles. [Mazurier, 2012]

Les bactéries oncogènes: l'espèce type est *Agrobacterium tumefaciens*, responsable de la galle du collet d'un grand nombre d'espèces végétales, principalement dicotylédones. Cette bactérie est capable de modifier génétiquement les plantes qu'elle infecte. En effet, elle dispose d'un système moléculaire lui permettant de transférer un grand fragment d'ADN (appelé T-DNA, pour transfert-DNA) contenant plusieurs gènes présent sur l'un de ses plasmides (appelé plasmide Ti, pour tumor-inducing) vers l'ADN génomique de la plante. [Mazurier, 2012]

Ce transfert est assuré par un système de sécrétion de type IV complexe. Le T-DNA originel contient des gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse d'auxines et de cytokinines, des hormones végétales et de substrats particuliers, les opines. L'expression de ces gènes provoque des dérèglements hormonaux dans les tissus

infectés qui se mettent à proliférer pour former une tumeur. Cette tumeur constitue une niche favorable à la multiplication de la bactérie. [Mazurier, 2012]

c- La phase de dispersion. Tous les moyens sont bons :

- La pluie joue un rôle très efficace dans la dispersion de bactéries présente sur les feuilles ou sur le sol.
- Les exsudations bactériennes muqueuses peuvent sécher et se transmettre par le vent.
- Les insectes pollinisateurs peuvent transmettre les bactéries quand celles-ci attaquent les fleurs (cas du feu bactérien chez les poiriers). Les insectes piqueurs jouent le rôle de vecteurs des bactéries qui vivent dans les tissus conducteurs.
- Les machines agricoles peuvent également transmettre les bactéries en remuant le sol.

10- Résistances variétales : mécanismes et durabilité

10-1 Résistance variétales

10-1-1 Définition

La résistance recouvre un ensemble de processus qui vont permettre à la plante de limiter ou d'arrêter le développement d'un agent pathogène. Ceci se manifeste dès la phase de l'infection et réduit ensuite le développement de l'agent pathogène sur la plante. L'effet de la résistance est mesurable au niveau de l'expression des symptômes ou du développement de l'épidémie [Dangl, 2001]. Nous aborderons ici la résistance comme **effet de la plante sur l'agent pathogène**, et n'aborderons pas les mécanismes d'évitement (qui empêchent le contact entre l'hôte et l'agent pathogène) et de tolérance (capacité de la plante à subir une maladie sans effet fort sur le rendement ni la qualité. [Durrant, 2004]

La génétique de la résistance des plantes face aux agressions des agents pathogènes a été formalisée par Van der Planck (1963), avec deux concepts explicatifs du pouvoir pathogène :

- La virulence : faculté du parasite d'attaquer un hôte (composante qualitative)
 - L'agressivité : quantité de maladie que le parasite peut induire (composante quantitative).
- [Giniaux et Hugues, 2011]

A ces deux facteurs sont associés deux comportements chez l'hôte : la résistance qualitative (aussi appelée majeure ou spécifique) qui s'oppose à la virulence ; la résistance quantitative (ou partielle) qui s'oppose à l'agressivité.

a- La résistance spécifique

La résistance spécifique correspond à une interaction gène pour gène entre le bioagresseur et son hôte (la plante) : elle est basée sur une reconnaissance spécifique entre la plante et l'agent pathogène qui déclenche une cascade de réactions de défense et empêche ainsi l'infection de se développer. Cette résistance est de support mono-génique et son expression est de type "tout ou rien", soit nulle, soit totale : l'infection de la plante est complètement empêchée dès lors que la plante possède le gène de résistance (noté R) correspondant au gène d'avirulence du bioagresseur (noté Avr).

La relation entre la plante et son hôte est alors dite « incompatible » : la croissance du parasite et la colonisation de la plante seront arrêtées très tôt lors du processus d'infection, en particulier par le déclenchement d'une mort cellulaire très localisée, et il n'y aura donc ni développement épidémique ni dommage causé à la culture. [INRA, 2010]

b. La résistance quantitative

Cette résistance est à effet partiel et basée sur un support génétique polygénique dans la grande majorité des cas. Elle est gouvernée par plusieurs gènes dont les effets sont cumulatifs et que l'on décrit en général sous la forme de QTL (Quantitative Trait Loci), chaque QTL étant supposé contenir un gène déterminant un effet particulier sur le développement de l'agent pathogène. [INRA, 2010]

Si une variété est uniquement porteuse de résistance quantitative (absence de gène de résistance spécifique), tous les individus pathogènes ont la capacité de l'infecter, mais la résistance quantitative permettra de diminuer leur agressivité. Cela se traduira :

- Chez l'agent pathogène : par une perte de performance sur une ou plusieurs composantes du cycle de développement, efficacité d'infection, période de latence, sporulation.

- Chez la plante : par une diminution de la quantité de symptômes. Quelle que soit la composante du cycle du parasite affectée, la résistance quantitative limitera donc les dommages provoqués par l'agent pathogène sur la plante. [INRA, 2010]

10-2 Mécanismes

a- Mécanismes de contournement des résistances spécifiques

Le contournement d'une résistance spécifique est dépendant de la structure génétique et de la taille des populations pathogènes, ainsi que de caractéristiques de la biologie de l'agent pathogène telles que l'existence d'une reproduction sexuée. La capacité d'évolution du parasite est gouvernée par les cinq forces évolutives classiques : la

mutation, la dérive génétique, la migration, la recombinaison et la sélection [McGuinness et al, 2003]. La mutation et la recombinaison sexuée génèrent de la variabilité génétique dans les populations pathogènes. En particulier, la mutation est directement responsable du contournement des résistances spécifiques. La dérive génétique, la sélection et la migration influencent la distribution de la diversité génétique. [Burch et al, 2007] (Tableau3)

Tableau 3 : Forces évolutives impliquées dans l'adaptation des agents pathogènes.
[Djebali, 2008]

Force évolutive	Mécanisme	Conséquence
Mutation	Changement de la séquence nucléotide de certains gènes	Apparition de nouveaux allèles dans les populations
Dérivés génétiques	Fluctuation de la fréquence des gènes dans une population d'effectif limité	Disparition d'allèles
Migration	Flux de gènes ou de génotypes entre les populations d'un gène pathogène	Déplacement des allèles et des génotypes mutants virulents entre les populations
Recombinaison sexuée	Modification des associations d'allèles	Modification de la diversité génétique globale (multilocus)
Sélection	Processeur qui entraîne une reproduction supérieur ou inférieur	Sélection des agents pathogènes les plus adaptés aux conditions locales

b- Une meilleure durabilité pour les résistances quantitatives

Elle serait due à une adaptation des populations pathogènes via une augmentation de l'agressivité des souches pathogènes (exemple, testé expérimentalement, du mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*). [Burch et al, 2007]. Il semble néanmoins que ce type de résistance soit plus durable : en théorie, le caractère polygénique de l'agressivité et la plus faible interaction hôte/agent pathogène réduiraient la pression de sélection induite sur la population de l'agent pathogène, et permettraient ainsi le maintien d'individus moins agressifs [McGuinness et al, 2003]. En pratique, plusieurs études conduites pour l'étude de la résistance quantitative n'ont pas montré sa « non-durabilité » : l'adaptation à la résistance quantitative basée sur plusieurs gènes serait très difficile à mettre en œuvre par les agents pathogènes. [Burch et al, 2007]

Les deux hypothèses couramment proposées pour expliquer la durabilité de ce type de résistance sont :

- ✓ plus le nombre de facteurs de résistance à contourner est grand, plus grand sera le nombre de mutations nécessaires à l'agent pathogène pour devenir virulent et plus faible sera la probabilité de leur occurrence
- ✓ la pression de sélection due aux facteurs de résistance quantitative est plus faible que celle due à la résistance spécifique, ne permettant alors pas l'émergence des mutants virulents à partir de la population pathogène. [Xavier, 2012]

11- Le dialogue moléculaire entre la plante et l'agent pathogène

Lors d'une agression, la plante réagit et répond selon 3 phases. Au niveau cellulaire, les signaux moléculaires produits par le pathogène s'insèrent sur les récepteurs de la cellule (protéines de forme spécifiques reconnaissant le signal). Ils sont ensuite transmis grâce à une enzyme au noyau de la cellule concentrant l'ensemble des gènes dont ceux de défenses. Une ou des modifications métaboliques sont alors déclenchées afin de répondre localement ou de façon systémique au stress subi. Il arrive toutefois que le pathogène puisse contourner ces mécanismes de défense [Figure 6]. [Viollet, 2010]

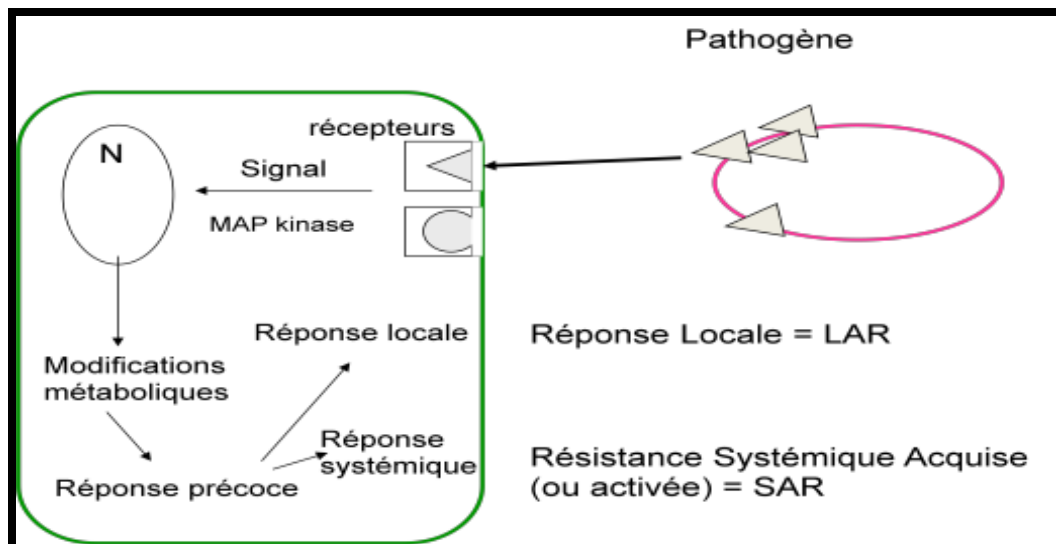


Figure 6: Mécanisme de défense d'une cellule résistante. [Mazurier, 2012]

Trois niveaux de réponses sont identifiés :

*une réaction précoce d'hypersensibilité qui se traduit par l'auto-destruction des cellules dans la zone infectée par le pathogène. Cette réaction s'accompagne d'un renforcement de la paroi cellulaire pour constituer une barrière physique.

*la LAR (réponse locale) qui a lieu sur une zone plus large que la zone infectée et qui se traduit par la synthèse de molécules antimicrobiennes (phytoalexines, protéines PR)

* la SAR (résistance systémique active) qui concerne la plante dans son ensemble et active des gènes de défense. [Mazurier, 2012]

11-1 Comment induire ces mécanismes de défense ?

SDP (Les stimulateurs de défense de la plante) incluent toutes les molécules capables d'augmenter la capacité d' (auto)défense des plantes. Si nous reprenons le schéma précédent, le SDP prend la place du pathogène, induisant de fait les mécanismes de défenses. On distingue deux types de molécules :

*Les éliciteurs qui déclenchent les réactions de défense (agresseur présent ou non)

*Les potentialisateurs qui mettent en veille la plante et déclenchent des réactions de résistance

Les SDP peuvent être d'origine naturelle (silicate, bactérie, les SDP peuvent être d'origine naturelle (silicate, bactérie, algues,...) ou chimique (acides aminés,...). S'ils sont connus depuis plus de trente ans, leur utilisation n'est pas développée à ce jour. Le manque de connaissance sur leur fonctionnement et sur la méthodologie pour étudier leur insertion dans une stratégie de protection de la vigne est le principal frein à leur développement. [Mandrourx, 2012]

12- La lutte

La lutte contre les maladies de plantes est fondée sur la connaissance des partenaires de leurs interactions, et du cycle du pathogène. Différents principes sont à respecter :

- l'utilisation d'organes de propagation et de semences sains
- la culture sur substrat sain en environnement sain
- la diminution des chances de conservation du pathogène dans l'environnement et de ses capacités de multiplication
- la diminution des risques de transport des organes de dissémination
- la culture de variétés résistantes ou tolérantes, de multilignées, ou la succession dans le temps de variétés de sensibilités différentes

- des conditions culturales et écologiques défavorables aux pathogènes et favorables à l'expression des gènes de résistance,
- la protection des cultures par traitements adéquats et modérés.

12-1- Les méthodes de lutte

a-Règlements phytosanitaires : ils visent à surveiller l'état des cultures, empêcher l'introduction, dans une zone donnée, de nouveaux pathogènes, et délivrer des certificats pour l'exportation de produits, de plants, de semences [Lateur M, 2002]

b- Lutte par les pratiques culturales : Les mesures sanitaires permettent donc de réduire l'inoculum primaire et la propagation du pathogène, par l'utilisation de semences saines, le passage ordonné des machines agricoles (terres saines puis infectées, nettoyage et désinfection des outils). Le traitement par le feu des terres contaminées laisse un sol biologiquement vide sensible aux contaminations massives. Les rotations de cultures dans le temps et dans l'espace peuvent avoir un effet bénéfique sur l'état phytosanitaire des cultures. La planification des semis et des plantations influent sur le développement des maladies : il faut semer en évitant que la période de sensibilité de la plante coïncide avec l'arrivée massive du pathogène. [Loqman, 2009]

c-Lutte génétique : Elle est basée sur la culture de variétés résistantes ou tolérantes au pathogène considéré. La résistance spécifique ou verticale, très efficace, peut être contournée par le pathogène par mutation, en particulier lors de cultures successives et prolongées. [Boher, 2008]

d-Lutte chimique : Le plus gros marché est celui des herbicides. Pour lutter contre les pathogènes de plantes, les produits les plus utilisés sont les fongicides (non systémiques, de contact ou systémiques, pénétrants), les insecticides, nématicides qui permettent également une lutte antivirale par élimination du vecteur. L'utilisation des antibiotiques est interdite, seuls quelques composés cupriques sont autorisés. [Loqman, 2009]

e-Lutte biologique : Elle repose sur l'utilisation de nombreux antagonismes existants entre les êtres vivants. Son utilisation se répand de plus en plus. La protection croisée est basée sur l'utilisation de souches peu ou non pathogènes (souches hypo ou avirulentes) qui entrent en compétition avec le pathogène pour l'invasion de l'hôte ou déclenchent son mécanisme de résistance créant une prémuniton. [Loqman, 2009]

f-Lutte physique : La chimiothérapie ne permet pas de lutter contre les virus et la lutte antivirale repose donc sur l'attaque des vecteurs lorsqu'ils existent. Une culture par propagation surveillée permet d'obtenir des plants indemnes de virus, mollicutes ou bactéries. La thermothérapie, la culture de méristèmes et d'embryons permettent de régénérer des plantes saines. [Boher, 2008]

1-Matériel végétal symptomatique

Le matériel végétal utilisé [Annexe1], dans cette étude s'agit de feuilles d'oliviers plantés à Guelma et des feuilles d'agrumes fournis par l'ITGC de Guelma [Figure 7].

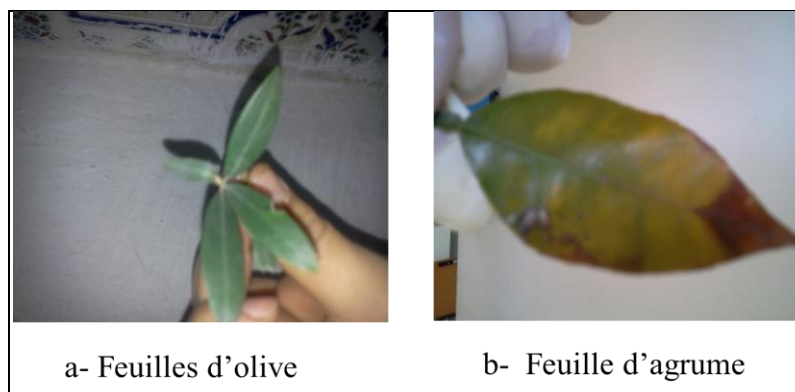


Figure 7 : le matériel végétal utilisé

2-Isolement et identification des bactéries

2-1- Isolement

La première étape consiste à isoler les bactéries des tissus végétaux présentant des symptômes. Les isollements sont réalisés sur gélose nutritive.

Les tissus végétaux présentant des symptômes sont lavés à l'eau de robinet et désinfectés avec du méthanol 70% avant de procéder à l'isolement.

Ensuite, prélever les pièces infectées et les sectionner stérilement en petits morceaux afin de les tremper dans une solution saline (NaCl 0,85%) pendant 2 heures.

Les suspensions correspondant à chaque type de feuille et type de tache sont étalées en adoptant la technique d'épuisement sur gélose nutritive (GN) afin d'obtenir des colonies isolées.

Pour les taches présentant une pourriture molle, il est préférable de diluer à 1/10 la suspension initiale avant de l'étaler sur GN.

Après une incubation de 24-72 heures à 37 °C, vérifier la croissance bactérienne et noter les types et le nombre des colonies [Figure 8].

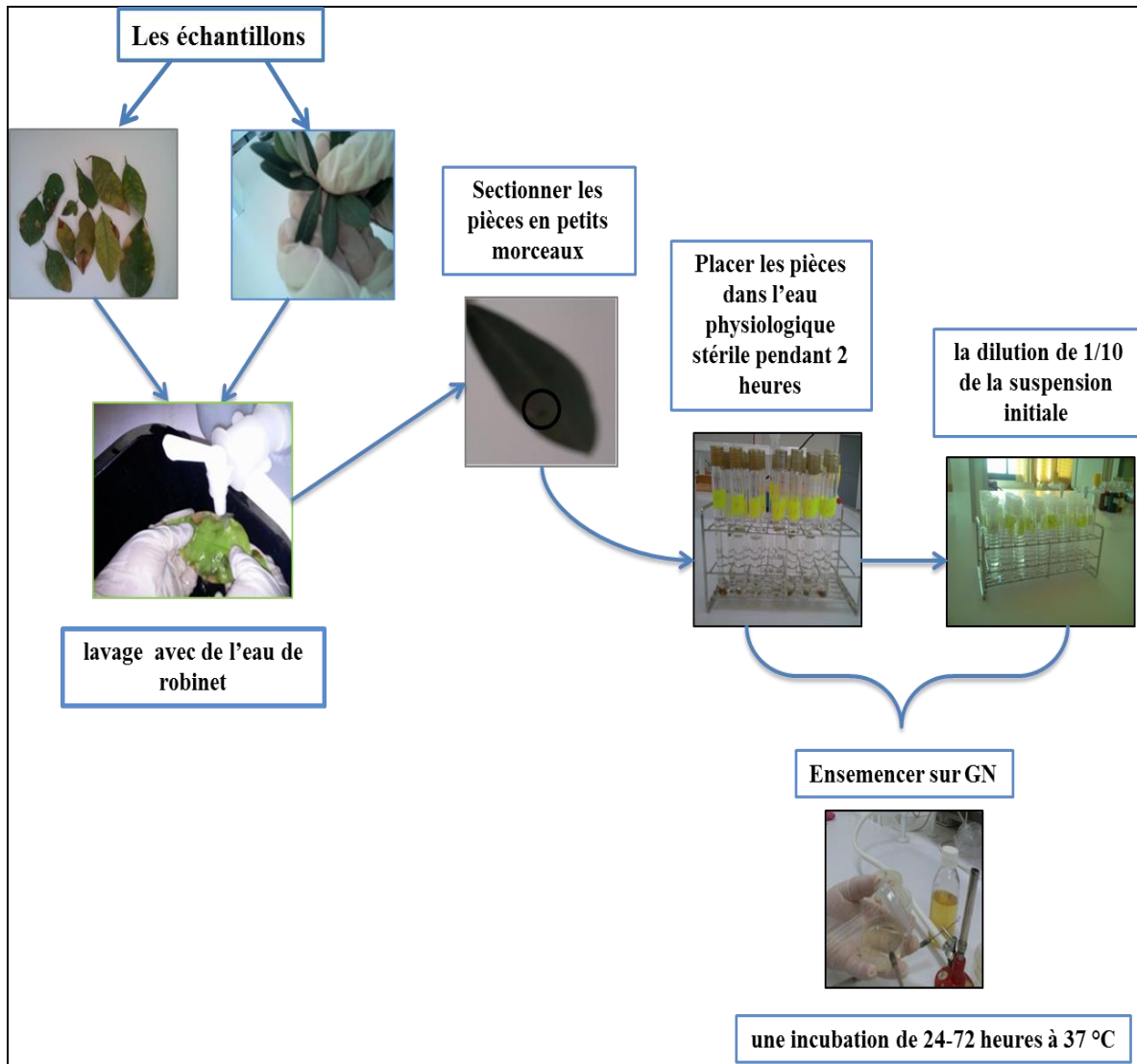


Figure 8 : protocole d'isolement

2-2- Purification

Après une incubation de 24-72 heures à 37 °C, nous avons vérifié et noté la croissance bactérienne et les caractéristiques des colonies existantes.

L'observation macroscopique concerne l'aspect des colonies en surface sur milieu solide (Gélose nutritive), la taille, la forme l'aspect de la surface, l'opacité, la consistance, la couleur et/ou la pigmentation.

Ensuite, nous avons effectué une coloration préliminaire du Gram [figure 09] afin de préciser le type de regroupement, la forme et le Gram des bactéries constituant chaque colonie [Annexe 3].

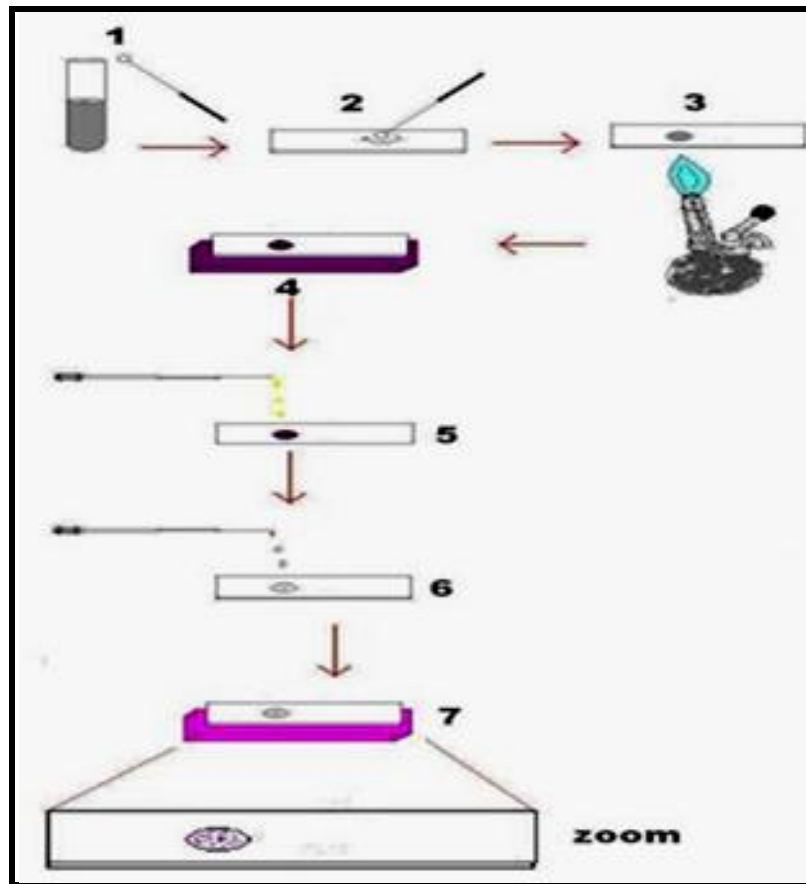


Figure 9 : protocole de la coloration de Gram.

Sur la base de l'observation microscopique et l'aspect macroscopique différent, les diverses colonies sont prélevées et repiquées sur gélose nutritive (bactérie en forme de bacille et coccobacille), sur milieu Chapman (bactérie en forme de Cocci), Sabourau (levure et champignons).

2-3-Identification classique

L'identification des souches bactériennes est basée sur des schémas d'identifications dichotomiques [Joffin J et al., 2002]. Chaque colonie purifiée est prélevée et diluée dans 1 ml d'eau physiologique. A partir de cette suspension bactérienne dense, on procède à une observation microscopique après coloration de Gram et à une série de tests biochimiques classiques en vue d'une identification éventuelle par les tests préliminaires d'orientation suivants [Guiraud J.P., 1998 ; Joffin J et al.,2002] :

- ✓ **La mise en évidence de l'utilisation du mannitol :** le milieu utilisé est le mannitol-mobilité [Annexe 2]. C'est une gélose semi molle permettant de

rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. L'obtention des résultats bien clairs nécessite un temps d'incubation de 24h à 30°C.

- ✓ **La mise en évidence de l'utilisation du glucose, du lactose et de la production d'H₂S** : cette mise en évidence est réalisée sur le milieu T.S.I. [Annexe 2]. On ensemence la surface de la pente de la gélose abondamment par stries serrées et le culot par piqure centrale. La lecture se fait après 24h d'incubation à 30°C.
- ✓ **La mise en évidence de la production d'indole** : la culture est effectuée dans une eau peptonée exempte d'indole [Annexe 2] ou dans le milieu Urée-indole [Annexe 2]. La lecture se fait après incubation à 30°C pendant 24h, l'indole produit est révélé par un réactif spécifique : le réactif de Kovacs.
- ✓ **La mise en évidence de l'uréase** : ce test est effectué aussi sur le milieu urée-indole [Annexe 2], les résultats sont obtenus après 24h d'incubation à 30°C.
- ✓ **La recherche de la catalase** : le test classique consiste à mettre du matériel bactérien, prélevé par une anse métallique dans une goutte de peroxyde d'hydrogène déposée sur une lame de verre. La présence de catalase s'exprime aussitôt par un dégagement gazeux (O₂) aisément discernable.
- ✓ **La recherche de la β-galactosidase** : le test consiste à ajouter un disque d'ONPG dans une suspension bactérienne dense, incubée à 37°C pendant 30min. La présence de la β-galactosidase se révèle par le virage de la couleur au jaune pour les cultures lactose négatif.
- ✓ **Test d'oxydase** : Ce test est réalisé à l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif : N-diméthyl paraphénylène diamine, sur lequel nous avons déposé une colonie. La lecture du résultat est immédiate et sans incubation.

1-Isolement et purification

Après l'isolement réalisé à partir des feuilles infectées et ensemencement puis purification sur GN et/ou milieux sélectifs, nous avons constaté l'existence de nombreux aspects microbiologiques entre bactéries et champignons. Dans cette étude nous sommes intéressés des bactéries phytopathogènes. Un nombre de huit colonies bactériennes différentes est compté.

2-Identification

❖ Observation macro et microscopique

Après observation macroscopique et microscopique par coloration de Gram, nous avons pu dresser le tableau 4 résumant les résultats obtenus.

Tableau 4 : Symptômes et types de bactéries isolées

Origine des feuilles	Types des tâches	Types de colonies	Coloration de Gram
Les olives	Noires	A : Petites colonies jaunes	Bacille à Gram -
Les agrumes	Noires	B1 : Colonies blanchâtres B2 : colonies crèmes B3 : colonie jaunes bombé	Cocci à Gram -
Les olives	Noires	C : Colonies rouges	Cocci à Gram -
Les agrumes	Noires	D : Petites colonies vertes	Cocci à Gram -
Les olives	Noires	E : Colonies vertes bombées	Bacilles à Gram -
Les olives	Noires	F : Colonies orangés	Bacilles à Gram -

A partir du tableau 4, on constate que les tâches noires sur les feuilles d'olive et d'agrumes ont permis d'isoler des bactéries de forme ronde et bacille Gram négatif dont les colonies apparaissent avec différents couleurs et aspects.

En se basant sur le type et la couleur des tâches existantes sur les feuilles infectées et les données de la littérature concernant l'agent bactérien causal d'une part et, d'une autre part, sur les résultats préliminaires que nous avons obtenus pour la colonie E (colonie bombée de couleur verte, bacille Gram-) et la colonie F (colonie rouge au centre avec un halo plus claire et contour régulier, bacille Gram-) nous avons pensé aux genres *Pseudomonas* et/ou *Erwinia*.

❖ Tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques pour les souches E et F sont résumés dans le tableau 5

Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques pour les souches E et F

Tests	La souche E	La souche F
King B	une coloration blanchâtre à crème	-
Catalase	+	+
Oxydase	+	-
Mise en évidence de l'uréase	+	+
Production D'indole	-	-
Oxydation et fermentation	+	+
H₂S	-	-
ONPG	-	-
Mannitol-mobilité	+	-

Grace aux tests biochimiques, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries analysées.

***Test catalase**

Après avoir effectué le test catalase, toutes les souches d'*Entérobactéries* que nous avons étudiées ont présenté un caractère catalase (+), ces résultats sont confirmés par la littérature [Khan *et al.*, 2011].

Pour l'espèce de *E*, nous avons observé une positivité du test catalase. Ce résultat est superposable à celui obtenu par [Nkang *et al.*, 2009] pour *Pseudomonas*. Par contre les études de [Dhayanithi *et al.*, 2010] ont montré que l'espèce de *Pseudomonas* peut donner une réponse négative au test catalase.

***Test d'oxydase**

Le but du test d'oxydase est la recherche d'un système Cytochrome C des bactéries (oxydase positive). Ce test est un bon contrôle pour les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, car elles sont toutes oxydase négative, par contre le genre *Pseudomonas* est toujours oxydase positive. En réalisant ce test, nous avons obtenu des résultats conformes à ceux rapportés par [Dhayanithi *et al.*, 2010]

La souche de l'espèce *E* a donné une réaction fortement positive par rapport au test d'oxydase par opposition à l'espèce *F*. Cela est dû au fait qu'elle possède un cytochrome oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du cytochrome C par l'oxygène moléculaire.

Ce cytochrome oxydase intervient dans la chaîne respiratoire des *Pseudomonas*. Ainsi, le cytochrome oxydase oxyde le cytochrome C qui va, à son tour, oxyder le N, N, N tétraméthyl-1,4-phénylène diamine, substrat qui prend une coloration violet foncé.

***Test d'uréase**

En présence de l'enzyme de l'uréase, l'urée est transformée en carbonate d'ammonium et il en résulte une alcalinisation du milieu.

Avec l'espèce *E*, nous avons constaté une réponse à l'urée fortement positive. Ce phénomène s'explique par le fait que cette espèce possède une uréase très active qui entraîne la formation d'ions ammonium.

Ces ions ammonium vont alcaliniser le milieu et entraîner le virage de l'indicateur du pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique. Le résultat obtenu du test uréase avec *Pseudomonas* est vérifié par celui noté par [Xian *et al.*, 2011]

Avec la souche F, nous avons noté une positivité importante de la réaction, c'est-à-dire une couleur rouge intense mais au-delà de 18 heures. Cela s'explique par le fait que les *Erwinia* ont une activité uréasique faible. La positivité du test uréase avec *Erwinia* est confirmée par les travaux de [Carleen *et al.*, 1993].

***Production d'indole**

Une réaction négative est obtenue avec le test indole pour les deux souches E et F. Ces résultats sont confirmés par [Alves *et al.*, 2006; Nkang *et al.*, 2009] pour *Pseudomonas* et *Erwinia*.

***Milieu TSI (Triple Sugar Iron)**

Ce milieu permet l'identification des *Entérobactéries* par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène. Au cours de notre étude, nous avons trouvé que toutes les deux souches E et F que nous avons analysées fermentent le lactose, le saccharose, le glucose sans production de l'H₂S. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Hajna, 1945] pour *Erwinia* et *Pseudomonas*.

***Utilisation du mannitol**

La fermentation du mannitol se traduit par une acidification du milieu qui sera mise en évidence par le virage de l'indicateur coloré du pH (le rouge de phénol).

Conformément à la littérature [Nkang *et al.*, 2009] et durant notre étude, nous avons bien observé que la souche E a utilisé le mannitol comme source de carbone et d'énergie.

En ce qui concerne l'espèce F, elle était mannitol (-), alors que [Prischmann *et al.*, 2008] ont confirmé l'utilisation du mannitol par *Erwinia*.

Pour la souche E supposée être *Pseudomonas*, les résultats obtenus sont en parfait accord avec ceux décrits par [Phibbs *et al.*, 1978]

Les discordances liées à la recherche de l'utilisation du mannitol par les entérobactéries s'expliquent par une mauvaise manipulation ou bien il s'agit des souches atypiques.

***La mobilité**

Dans notre étude, nous avons obtenu des résultats positifs concernant le test de mobilité avec la souche E. Ce résultat est corroboré par les études de [Catherine et al., 1999; Dhayanithi et al., 2010]

Conformément aux résultats obtenus par [Alves et al., 2006] nous avons obtenu un résultat négatif du test de mobilité avec les souches F supposée être *Erwinia*.

***Test ONPG**

Dans le test ONPG, c'est donc la β -galactosidase qui est recherchée, cette enzyme permet de scinder le composé synthétique, incolore, ONPG (orthonitrophényl- β -Dgalactopiranoside) et libérer l'orthonitrophénol soluble qui donne la coloration jaune. Selon [Delarras ; 2007], les bactéries lactose (+) possèdent la β -galactosidase, et donc elles sont toujours ONPG (+). En comparant nos résultats avec ces données, nous pouvons déduire que nos résultats obtenus avec le test ONPG chez l'espèce F sont conformes aux espèces d'*Erwinia*.

La souche E supposée *Pseudomonas* était ONPG (-). Ce résultat est vérifié par ceux notés par [Davis et al; 2011] qui ont confirmé ce caractère.

***Le milieu King B**

Les colonies de *Pseudomonas* sur le milieu B de King ont une coloration blanchâtre à crème selon [Michel ; 2009]. En comparant nos résultats avec ces données nous pouvons déduire que nos résultats obtenus avec le milieu King B chez la souche E sont corrects.

Selon [Burrill ; 1883], certaines espèces d'*Erwinia* poussent sur le milieu King B mais 'autres non. Dans notre travail la souche F n'a pas donné aucun résultat sur le milieu King B.

En se basant sur les schémas dichotomiques [Guiraud J.P., 1998 ; Joffin J et al.,2002] et en comparant les caractères étudiés avec ceux des genres bactériens publiés dans la 9ème édition du « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » [Holt J.G et al., 1994] on peut assimiler les bacilles à Gram négatif E et F respectivement au

genre *Pseudomonas*, et au genre *Erwinia*. Donc, les tâches noires observées sur les feuilles des olives sont probablement dûes au genres *Pseudomonas* et *Erwinia*.

Le pouvoir pathogène des bactéries a évolué depuis plusieurs décennies, en particulier dans le domaine végétal. Les infections dont elles sont responsables (Nécrose Flétrissement, Pourriture...etc) sont devenues plus variées dans leurs localisations et leurs manifestations.

Le diagnostic microbiologique et le traitement de ces infections imposent l'identification correcte de l'agent étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence d'une population variée de microorganismes au sein des tissus végétaux étudiés (les feuilles des olives et des agrumes). Nous avons essayé de vérifier si les tâches noires situées au niveau des feuilles d'olive sont des symptômes dus aux bactéries phytopathogènes.

Suivant le plan d'identification classique adopté et selon les moyens disponibles nous avons pu nous orienter vers deux genres susceptibles d'être responsables du symptôme de noircissement observé sur les feuilles d'olive : *Pseudomonas* et *Erwinia*.

Cette identification, considérée primaire, reste insuffisante et nécessite d'être confirmée par la réalisation d'autres tests spécifiques et plus discriminatifs bien que le phénotype biochimique présente certaines limites dans l'identification bactérienne.

Enfin, au point de vue perspective, nous insistons sur l'élaboration d'une approche plus fiable pour permettre aux laboratoires de microbiologie de suivre une démarche simple, cohérente pour une bonne identification des différentes espèces bactériennes. Comme il est adéquat d'intégrer des outils moléculaires et bioinformatiques pour une phylogénie plus précise et plus fiable pour une systématique plus approfondie.

Akram A (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de Doctorat. Université de Liège.166p

Anonyme (2011). Maladies émergentes chez les plantes. Agents Pathogènes Prévenir ou Guérir. AGRO News. 9p

Alves M.S., Rubens C.S.D., De Castro A.C.D., Riley L.W., Moreira B.M. (2006). Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *Journal of clinical microbiology*. 44 (10) : 3640-3646.

Ayres AJ (2001). Le contrôle des maladies des agrumes au Brésil. Symposium sur les agrumes Chine/FAO. 118p

Boher B (2008). Les bacteries parasites des plantes cultivees en republique populaire du congo. Laboratoire de Phytopathologie Brazzaville. 7p

Bouteau H (2010). Phytopathologie. 31p

Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP (2007). The Functions of Plant TIR Domains. *Science*. STKE 2007: pe46-

Burrill TJ (1883). New species of *Micrococcus*. *Am. Naturalist*. 17:319

Carleen M.C., Delia M.G., Heike L. (2006). Identification of a nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. *Molecular Microbiology*. 8 (1): 187-198.

Catherine A.M., Robert B. (1999). Genomic rearrangements in the flagellin genes of *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology*. 31 (2) : 679–690.

Cazaux M (2009). Etude de la résistance de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* à *Colletotrichum trifolii*, agent de l'antracnose. Doctorat de L'Université de TOULOUSE. 167p

Chauv S & Jonathan J (2000). *Caenorhabditis elegans* : Un modèle d'étude des interactions hôte-organisme pathogène. médecine/sciences. Vol 16, n° 8-9.

Dangl JL, Jones JD (2001). Plant pathogens and integrated defence response to infection. *Nature*, 411: 826-833.

Davis J.A., Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B., Brousse J.H., Gustafson J (2011). Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant - *Escherichia coli* from healthy companion animals. *Journal of Applied Microbiology*. 110 (2): 597-604.

Delaunay-Cesbron S (2009). Interaction entre des mutants *hrp d'Erwinia amylovora* agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité. Thèse de Doctorat. Université d'Angers. 50p

Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.

Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kathiresan K (2010). Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology*. 31 :409-412.

Djebali N (2008). Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. Doctorat de l'Université de Toulouse. 191p

Dugé T (2009). Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, et le pommier (*Malus x domestica*). Thèse de Doctorat. Université d'Angers. 264p

Durrant WE, and Dong X (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 42:185-209.

Flor HH (1955). Host-parasite interaction in flax rust: its genetics and other implications. *Phytopathol* 45: 680-685

Giniaux J & Hugues M (2011). Les mécanismes de défenses indirectes chez les plantes. Université de Strasbourg. 24p

Guiraud J.P (1998). *Microbiologie Alimentaire*. Dunod (Ed.). Paris. France. 652 p.

Hajna A.A (1945). Triple Sugar Iron Medium for the Identification of the Intestinal groups of Bacteria. *J. Bact.* 49 : 516-517.

Hélène JP (2010). Bactéries pathogènes et environnement. Laboratoire de Bactériologie, CHU Montpellier. 33p

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins Co (9^eEd.). Baltimore. 787 p.

INRA (2009). Comment stimuler les défenses naturelles des plantes ? 2p

INRA (2010). La tomate, les défis du goût. Alimentation Agriculture Environnement. INRA MAGAZINE • N°13. 35p

INRA (2011). La bactérie et son hôte. Ecole d'été Département Alimentation Humaine. 104p

Johnson M & Sekhar V (2012). Principles of Plant Pathology. Practical Manual Course No: PATH-271. Acharya N. G. Ranga Agricultural University. 79p

Jones JD, Dangl JL (2006). The plant immune system. Nature 444: 323-329

Jourdan E (2008). Dialogue moléculaire entre les rhizobactéries et leur hôte végétal : deux nouveaux éliciteurs impliqués dans l'induction de résistance aux pathogènes. Université de Liège. Thèse de Doctorat. 192p

Keen NT (1975). Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? Science 187: 74-75

Khan F., Rizvi M., Shukla I., Malik A. (2011). A novel approach for identification of members of Enterobacteriaceae isolated from clinical samples. Biology and Medicine. 3 (2): 313-319.

Lacroix M (2012a). Tomates et Poivrons: Victimes du Chancre Bactérien. Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec. 5p

Lacroix M (2012b). Les maladies bactériennes de la Tomate et du Poivron. Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec. 38p

Lateur M (2002). Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique. Centre de Recherches agronomiques de Gembloux. 77p

Lemattre M (2006) .Doit-on avoir peur des bactéries ? Santé des plantes. Jardins de France. 34p

Michel L (2009). Tests biochimiques classiques pour l'identification des *Pectobacterium* (*Erwinia Pectinolytica*) et des *Pseudomonas fluorescens*. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection – MAPAQ. 9p

Loqman S (2009). La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycéta les antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Université de Reims Champagne-Ardenne. 216p

Mandroux C (2012). Mieux comprendre les mécanismes de défense naturelle des plantes et l'utilisation des SDP. Journée Technilore. 3p

Mazurier S (2012) .Interactions plantes-microorganismes; Comment allier bonne production primaire et qualité de l'environnement. Université de Bourgogne. 20p

Mbaye AA, Coly EV & Demba Kane P (2008). *Ralstonia solanacearum*, agent causal du flétrissement bactérien observé sur cultures de tomate dans les parcelles de BOKHAL et GAYA (Dagana, Sénégal). Institut s Sénégalais de Recherches Agricoles. 5p

McGuinness DH, Dehal PK, Pleass RJ (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol* 19: 312-319

Mohler F (1987). Agents pathogènes et maladies physiologiques des plantes cultivées en Nouvelle-Calédonie et aux Iles Wallis et Futuna. Nstitut français de recherche scientifique pour le developpement en cooperation. 49p

Montesano M, Brader G, Palva ET (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol Plant Pathol* 4: 73-79

Nkang A.O., Okonko O.I., Fowotade A., Udeze A.O., Ogunnusi T.A., Fajobi E.A (2009). Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria. *J. Bacteriol. Res.* 1 (8): 89-96.

Nyengani Z (2008). Microbiologie et mycologie. Université Virtuelle Africaine. 57p

Phibbs P., McCowen S., Feary T., Blevins W. (1978). Mannitol and Fructose Catabolic Pathways of *Pseudomonas aeruginosa* Carbohydrate-Negative Mutants and Pleiotropic Effects of Certain Enzyme Deficiencies. *J. Bacteriol.* 133 (2) : 717–728.

Prischmann A.D., Lehman R.M., Christie A.A., Dashiell K.E. (2008). Characterization of bacteria isolated from maize roots: Emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (*Chrysomelidae: Diabrotica*). *Applied soil ecology.* 40 : 417-431.

Selosse MA & Gibert A (2011). Des champignons qui dopent les plantes. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. 120p

Toussaint v (2009). Ma salade est malade, à qui la faute ? Le point sur les maladies bactériennes dans la laitue. *Agriculture et Agroalimentaire Canada.* 4p

Viollet A (2010). Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. Fluorescents non pathogènes. Docteur de l'Université de Bourgogne. 171p

Xavier N (2012). Contrôle de la communauté microbienne associée aux racines par le système immunitaire inné de la plante. Mémoire Master. Université Claude Bernard Lyon I. 52p

Xian G., Lixia Z., Ganzhen D., Chang L., Chengye L., Changwei Q (2011). Aerobes and Levels of Estradiol and Progesterone in Cystic Endometrial Hyperplasia-Pyometra Complex Bitches. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2011; 10 (8): 965971.

Les Site webs:

[1] <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/05-070.htm> consulter le 11/1/2013

Annexe1 :Matériel et les produits utilisés

Appareillage	Les Milieux
<p>Bec bunsen : pour assurer une stérilisation instantanée.</p> <p>Four Pasteur : stérilisation de la verrerie du laboratoire à sec</p> <p>Autoclave : stérilisation à la vapeur</p> <p>Incubateur : pour la culture des bactéries</p> <p>Réfrigérateur : conservation des souches et des réactifs.</p> <p>Microscope optique : permet l'observation (état frais, coloration de Gram)</p>	<p>Milieux de culture :</p> <p>Gélose : isolement sélectif des bactéries</p> <p>Sabourau : isolement sélectif des levures et moisissures</p> <p>Chapman : isolement sélectif des Bacilles</p> <p>Milieux d'identification :</p> <p>Urée indole</p> <p>TSI : Triple SugarIron Agar</p> <p>Mannitol</p> <p>King A et King B</p>
Autres matériels	
<p>Pipettes : Pour l'inoculation</p> <p>Pipettes Pasteur : pour l'inoculation et l'ensemencement</p> <p>Micropipettes : pour une prise très précise</p> <p>Lames et lamelles : Pour l'observation microscopique</p> <p>Tubes à essai</p> <p>Boites de Pétri : pour les cultures bactériennes</p> <p>Anse de platine : pour l'ensemencement</p>	<p>Les réactifs utilisés:</p> <p>violet de gentiane</p> <p>lugol</p> <p>alcool</p> <p>fushine</p> <p>H₂O₂ : pour le test de catalase</p> <p>Les disques d'oxydase</p> <p>L'eau distillée</p> <p>L'eau physiologique</p> <p>Kovacs</p> <p>L'huile de seder</p>

Annexe 2 : Les milieux de cultures

Gélose Nutritive :

Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15
pHfinal:	7,4

Chapman- Mannitol Salt Agar:

Le milieu Chapman-Mannitol Salt Agar est préparé selon la formule décrite par Chapman :

Peptone	10
Extrait de viande de bœuf	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	10
Rouge de phénol	0,025
Agar	15
pH final:	7,4 ± 0,2

King B:

Le milieu King Best est préparé selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney

Peptone	20
Glycérol	10 ml
Phosphate dipotassique	1,5
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	1,5
Agar agar bactériologique	15
pH final:	7,4 ± 0,2

King A :

Le milieu King A est préparé selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney

Peptone	20
Glycérol	10
Sulfate de potassium	10
Chlorure de magnésium	1,4
Agar purifié	12
pH final:	7,2 ± 0,2

Mannitol-Mobilité :

Hydrolysate tryptique de caséine	10
Mannitol	7,5
Rouge de phénol	0,0004
Nitrate de potassium	1
Agar	3,5
pH final:	7,6

T.S.I.:

Ce milieu est préparé selon la formule décrite par Hajna

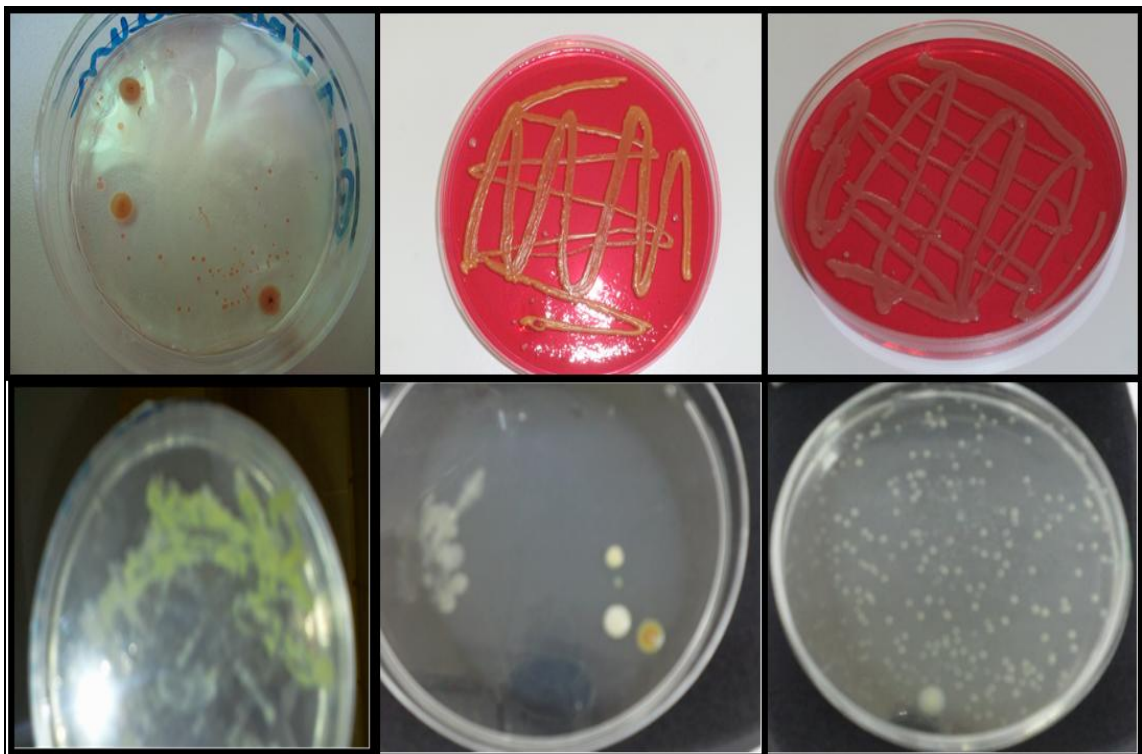
Tryptone	14
Extrait autolytique de levure	3
Extrait de viande	3
Glucose	1
Lactose	10
Saccharose	10
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	0,3
Citrate ferrique ammoniacal	0,3
Rouge de phénol	0,024
Agar agar bactériologique	13,5

pH final : $7,4 \pm 0,2$

Urée-indole :

L-Tryptophane	3
Phosphatebipotassique	1
Phosphatemonopotassique	1
Chloruredesodium	5
Urée	20
Alcool à 95°	10 ml
Rouge de phénol à 1%	2,5 ml

Annexe 3: Les souches bactériennes isolées



Résumé

Bien que survenant après l'établissement indiscutable de la cause microbienne de certaines maladies de l'Homme et de l'animal, la démonstration de l'origine bactérienne de maladies des végétaux n'a pas été sans dispute et controverse, l'étude des bactérioses des végétaux et des genres microbiens responsables a été intégrée dans la phytopathologie et la microbiologie. A présent, on reconnaît environ 350 bactéries provoquant des maladies sur les végétaux. Ces maladies peuvent se classer en trois grandes catégories, selon le type de symptômes qu'elles provoquent sur la plante : nécrose et flétrissement, pourriture, tumeur. A partir d'une identification classique d'isolat d'olive, un groupe de *Pseudomonas* ou d'*Erwinia*, intervient par modification du métabolisme de l'hôte à la suite de transfert de gènes pénétrer la plante sur les feuilles.

Sur le plan socio-économique, les bactérioses peuvent être des facteurs limitant de production pour certaines cultures, parfois vitales (riz, olives..); elles interviennent également en dépréciant la qualité de produits agricoles (réduction de végétation, tache sur feuilles et fruits). Les méthodes de lutte qui peuvent leur être opposées sont d'efficacité partielle. Elles reposent sur la prophylaxie, la lutte chimique et l'emploi de génotypes résistants.

Mots clés : Isolement, identification, bactéries pathogènes

Summary

The plant diseases of microbial origin are a major problem in the field of agriculture, because of the importance of a correct diagnosis to adapt a better treatment. Therefore, the identification of the involved pathogen is an essential step for this treatment.

In our study, we tried to isolate and identify some bacteria assumed to be responsible for certain plant pathology symptoms. In fact, olive and citrus leaves showing symptoms like black spots are used. After isolation and purification of bacteria using a dichotomous identification plan that is based on macroscopic and microscopic observation followed by conventional biochemical tests, we were able to think about two genera *Pseudomonas* and *Erwinia* which are probably responsible for the appearance of these spots on olive leaves, but other tests and in-depth studies are needed to confirm these genera and the identification of their species

Key words: *Erwinia* sp, *Pseudomonas* sp, Phytopathology, Isolation, Identification.

المخلص

ان الأمراض النباتية التي سببها الميكروبات هي مشكلة رئيسية في مجال الزراعة، ونظرا لأهمية التشخيص السليم في اختيار الطريقة الفعالة للحد من هذه الامراض علينا تحديد العوامل المسببة لها بدقة.

خلال دراستنا حاولنا عزل وتحديد بعض أنواع البكتيريا التي تكون مسؤولة عن ظهور بعض أعراض أمراض النباتات. من اجل هذا استعملنا أوراق زيتون وحمضيات مصابة تظهر عليها بقع سوداء. بعد الحصول على مستعمرات بكتيرية نقية، واعتماد خطة تحديد نوعي على أساس الملاحظة العينية والمجهريّة المتبوعة باجراء اختبارات بيو كيميائية كلاسيكية تبين ان الجنسين المحتمل ان يكونا مسؤولين عن الاعراض المدروسة هما *Pseudomonas* و *Erwinia* ، لكن تزال هناك حاجة إلى اختبارات اضافية ودراسات متعمقة لتأكيد هذه الأجناس وتحديد أنواعها.

الكلمات المفتاحية : أمراض النباتات، العزلة، تحديد الهوية *Erwinia* و *Pseudomonas*