

Mag. Bio - 12/02

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bakr Belkaïd - TLEMCEM

Institut de Biologie

THÈSE

Pour l'Obtention du Magister
en Biologie Cellulaire et Moléculaire



Par :

M^{me} Samia MEZAACHE



Thème :

Etude des Propriétés suppressives d'une souche de Pseudomonas isolée de la rhizosphère de la pomme de terre sur la croissance de deux bactéries et de deux champignons phytopathogènes.

Jury :

Président :	Mr. KARAM N.E	Maitre de conférence
Promoteur :	Mme LUKASOVA, E.	Maitre de conférence .
Co-Promoteur :	Mr GUECHI, A.	
Examineurs :	Mr. LAROUS A.	Maitre de conférence
	Mr. BENSOLTANE A.	Maitre de conférence
	Mr. ABDELO'JAHID DJ.E	Maitre Assistant

Sommaire

Abréviations	4
Liste des tableaux	5
Liste des figures	6
Introduction	7
<u>Revue bibliographique:</u>	9
Chapitre I : Bactéries de la rizosphère des plantes	10
I - Bactéries bénéfiques.	10
II - Bactéries inhibitrices.	13
III - Bactéries pathogènes.	14
1 - Définition.	14
2 - Mode d'infection.	14
3 - Les gènes gouvernant la pathogénicité.	15
4 - Exemples de micro-organismes pathogènes .	15
4-1. Agrobacterium tumefaciens.	15
4-2. Les Pseudomonas phytopathogènes.	17
a: Production d'exopolysaccharides.	18
b: Enzymes pectolytiques.	18
c: Production d'auxine.	19
d: Toxines.	20
e: Plasmide de virulence.	20
Chapitre II : Facteurs influençant l'activité de biocontrôle des bactéries:	22
I- Antibiotiques et leurs rôle dans la compétence écologique.	23
II- Sidérophores.	25
Chapitre III - Amélioration des souches utilisées pour le biocontrôle.	28
I - Recombinaisons et facteurs génétiques.	28
A: Augmentation de la production des métabolites importants pour le biocontrôle.	29
B: Transfert des gènes importants pour le biocontrôle à d'autres souches.	29
<u>Matériel et Méthodes:</u>	31
I- Matériel:	32
I-1. Appareillage:	32
I-2. Souches de bactéries utilisées pour la conjugaison.	32
I-3. Souches de champignons utilisées pour le test antifongique.	32
I-4. Produits chimiques et solvants organiques.	32
I-5. Antibiotiques.	32
I-6. Sels de métaux lourds.	32
I-7. Membranes et disques.	32
I-8. Milieux de culture.	32
I-9. Plantes utilisées pour les tests de pathogénicité.	35
I-10. Solutions utilisées pour l'extraction des plasmides.	35
I-11. Solutions d'elution pour chromatographie.	35
I-12. Solution de NaOH.	35

II- Méthodes:	36
II.1. Prélèvements.	36
II-2. Préparation de l'échantillon.	36
a- Ensemencement.	36
b- Incubation.	36
II-3. Isolement.	36
II-4.A. Identification présumptive des Pseudomonas.	36
A1. Recherche de l'oxydase.	36
A2. Métabolisme de glucose.	37
A3. Capacité respiratoire des bactéries.	37
A4. Production des pigments chez les souches sélectionnées.	37
A5. Recherche de la catalase.	37
A6. Réduction de citrate.	37
II.4.B. Identification des espèces de Pseudomonas.	37
B.1. Capacité des souches de se développer à différentes températures.	37
B.2. Production d'H ₂ S.	37
B.3. Hydrolyse de la gélatine.	37
B.4. ADH et LDC.	38
B.5. Test TOPAT.	38
II.5. Dosage de la résistance .	38
5.1. Dosage de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds en milieu liquide.	38
5.2. Dosage de la résistance aux antibiotiques en milieu solide.	39
5.3. Mise en évidence de la B.lactamase de type oxa.	39
II.6. Elimination des plasmides.	40
II.7. Transfert des plasmides par conjugaison .	42
a. Mise en évidence des transconjuguants.	42
II.8. Extraction des plasmides.	42
II.9. Mise en évidence de la production de phénazines et bactériocine.	43
A. Tests des propriétés biologiques des Pseudomonas.	43
a. Suppression fongique selon Vincent et Al 1991.	43
b. Suppression fongique selon James et Gutterson 1986.	44
c. Production de bactériocine.	45
B. Tests de pathogénicité pour la pomme de terre.	45
C. Extraction des Phénazines.	45
a. Méthode d'extraction.	45
b. Fractionnement de l'extrait brut.	46

RESULTATS

47

I- Isolement et Identification des souches de Pseudomonas de la rhizosphère de la pomme de terre. 48

II- Evaluation de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. 48

III- Extraction et visualisation de DNA Plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose. 51

IV- Elimination des plasmides. 54

1- Modification du spectre de résistance des souches curées. 55

2- Effet du curage sur la présence du DNA plasmidique. 55

3- Effet du curage sur les propriétés des bactéries. 55

4- Antibiogramme des souches curées. 57

V- Transfert des plasmides par conjugaison. 57

a : visualisation des plasmides. 57

b: visualisation des plasmides chez les transconjugants. 58

VI- Effet des souches de Pseudomonas sur la croissance de la pomme de terre . 58

VII- Mise en évidence de la production de phénazine et de bactériocine respectivement par la souche Pseudomonas auréofaciens sauvage et la souche Pseudomonas auréofaciens traitée à la ciprofloxacine. 58

VIII- Spectres d'absorption des substances actives produites par la souche No2 (Pseudomonas auréofaciens).69

Discussion

72

1- Caractérisation des Pseudomonas. 73

2- Caractéristiques des plasmides. 73

3-Pathogénicité et suppression. 75

Conclusion. 79

Résumé. 80

Annexe.. 81

Références bibliographiques. 84

Abréviations :

- ADH	: Arginine dihydrolase.
- CCM	: Chromatographie en couche mince.
- CMI	: Concentration minimale inhibitrice.
- DRB	: Rhizobactéries délétaires.
- DRMO	: Micro-organismes délétaires de la rhizosphère.
- EPS	: Exopolysaccharide.
- E.Coli	: Escherichia coli.
- HCN	: Cyanamide d'hydrogène.
- HPLC	: Chromatographie liquide haute performance.
- I	: Intermédiaire.
- IAA	: Indole 3 Acetic - Acid.
- Kb	: Kilos - base .
- Kd	: Kilos - dalton .
- Lac	: Auxotrophie au lactose .
- LDC	: Lysine décarboxylase.
- mM	: milli - molaire .
- Mdal	: Méga - daltons .
- Pao 25	: Pseudomonas aeruginosa portant le plasmide R 6845.
- Pao 303	: Pseudomonas aeruginosa portant le plasmide RP1.
- PCA	: Phénazine 1 carboxylic acid.
- 2-oH-PCA	: 2 hydroxyphénazine 1 - carboxylic acid .
- PDA	: Potato - Dextrose - Agar.
- PGPR	: Rhizobactéries qui améliorent la croissance des plantes.
- Phz	: Phénazine .
- 2oH-Phz	: 2 hydroxy-phénazine.
- Phz	: Phénazine négative .
- PhL	: 2, 4 diacetyl phloroglucinol.
- Plt	: Pyolutéorine.
- pTi	: plasmid - tumor - inducing (plasmide induisant la tumeur).
- Rf	: Rapport - frontal.
- R	: Résistant.
- Sid	: Sidérophore négative .
- S	: Sensible.
- TDNA	: DNA de la tumeur.
- TFD	: l'acide 2,4-dichloro phenoxyacétique .
- UV	: Ultra - violet.
- UDP	: Uridine diphosphate
- UDPGal	: Uridine diphosphate galactose.
- ug/ml	: microgramme par ml .

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : Distribution des phytotoxines bactériennes selon le genre .	21
TABLEAU II : Représentant les plus importants tests utilisés pour l'identification des souches.	49
TABLEAU III : CMI en ug/ml.	50
TABLEAU IV : Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques et métaux lourds.	52
TABLEAU V : Représentant la présence de la B.Lactamase oxa chez les souches sauvages (originelles) et les souches curées (traitées).	52
TABLEAU VI : Efficacité du curage par la ciprofloxacine .	55
TABLEAU VII : CMI en ug/ml de quelques antibiotiques et le cadmium des souches curées.	57
TABLEAU VIII : Effet de l'extrait brut de la culture de Pseudomonas auréofaciens (souche n°2 sur la croissance de Fusarium oxysporum et Fusarium solani.	64
TABLEAU IX : Effet antifongique des extraits des tâches séparées par CCM de l'extrait brut de Pseudomonas auréofaciens -souche n°2- .	65
TABLEAU X : Caractéristiques des fractions d'extrait séparés par CCM . a: souche sauvage. b: souche traitée.	66
TABLEAU XI : Effet antibactérien des tâches séparées par CCM de l'extrait brut de la culture de Pseudomonas auréofaciens (souche n°2) traitée à la ciprofloxacine .	67
TABLEAU XII : Production de bactériocine par la souche n°2 (pseudomonas auréofaciens).	69

Liste des Figures

Figure 1 : Interaction entre PGPR et DRB.	12
Figure 2 : Représentation de l'assimilation du fer par des micro-organismes aérobiques.	26
Figure 3 : Méthode de réplique sur tampon velours.	41
Figure 4 : Schémas de la suppression fongique.	44
Figure 5 : Distribution des souches en fonction de la résistance aux différents antibiotiques et métaux lourds étudiés.	53
Figure 6 : Schéma de l'électrophoréogramme du DNA plasmidique extrait par la méthode de Grinstead.	54
Figure 7 : Électrophoréogramme de quelques souches sauvages, curées et d'un transconjuguant selon la méthode de Felliciello.	56
Figure 8 : AntibioGramme de la souche 2 sauvage et curée (traitée).	58
Figure 9 : Pathogénicité des souches 10 et 12 vis à vis de la pomme de terre. a: Infection des tranches de pomme de terre. b: Infection des pieds de pomme de terre.	60 61
Figure 10 : Suppression des champignons par Pseudomonas auréofaciens (souche n°2).	63
Figure 11 : Schéma du test de détection de l'activité antifongique de l'extrait brut de la culture de Pseudomonas auréofaciens ainsi que ses fractions séparées par CCM.	64
Figure 12 : Activité inhibitrice de l'extrait brut de Pseudomonas auréofaciens traitée vis à vis de 2 souches phytopathogènes.	68
Figure 13 : Spectres d'absorption des tâches 7 et 8 actives de l'extrait de la souche n°2 (Pseudomonas auréofaciens).	70

Introduction.

Durant presque les 3 dernières décennies les scientifiques se sont penchés sur la phytopathologie plutôt que sur l'introduction de micro-organismes utiles pour le biocontrôle.

Les pseudomonas associés aux plantes sont un groupe de bactéries diversifié et importantes pour l'agriculture. Ce groupe inclue aussi bien des souches saprophytes que phytopathogènes.

Durant les dernières années, l'expérimentation a suggéré l'utilisation potentielle de quelques unes de ces bactéries comme agents biologiques, d'une part pour améliorer les rendements des cultures et d'autre part pour la suppression de certaines maladies.

Ces bactéries produisent une large gamme de métabolites secondaires incluant aussi bien les phytotoxines, sidérophores et des antibiotiques.

Toutefois, les souches phytopathogènes sont aussi importantes que les souches saprophytes. Il a été rapporté que certaines phytotoxines posséderaient des activités herbicides et antifongiques.

La biologie moléculaire a révolutionné le monde de la biologie. Des gènes appartenant à n'importe quel micro-organisme sont extraits puis clonés et transférés à d'autre micro-organisme, et la plupart de ces gènes transférés peuvent être exprimés chez le receveur. Pour le présent travail, nous voulons contribuer aux études des souches suppressives isolées d'un champ de pomme de terre situé à proximité de la rivière de Bousselam dans la région de SETIF. Nous étudions le spectre de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds; et quelques essais sont effectués afin de déterminer la présence des plasmides gouvernant cette résistance, et notamment leur transfert et leur élimination; des pseudomonas fluorescentes isolées de ce champ.

Vu l'importance de ces espèces dans le biocontrôle et aussi l'amélioration des cultures, certaines souches sont phytopathogènes et une est bénéfique. Nous avons effectué des essais afin d'extraire le principe actif de cette dernière d'une part, et d'autre part, nous avons effectué des essais complémentaires afin de nous persuader de l'effectivité de l'extrait vis à vis des bactéries et de 2 champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* , *Fusarium solani*).

Ce dernier étant l'agent caucant le « Dry-rot » des pommes de terre (EL-BANNA 1984). Les chromatographies en couche mince de cet extrait permettent de le fractionner. Et enfin,deux des composantes de l'extrait; qui paraissent les plus Intéressantes (du point de vue inhibition des Fusarium) ; subissent une spectroscopie U.V afin d'en établir le spectre d'absorption (de 200 à 600 nm) le cumul de ces résultats nous permet de les comparer avec ceux retrouvés en bibliographie.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

09

chap 1: BACTERIES DE LA RHIZOSPHERE DES PLANTES

La microflore de la rhizosphère est composée d'éléments saprophytes et d'éléments pathogènes. La microflore saprophyte, comporte aussi bien des éléments délétaires (Schippers 1987, Elliott 1985) que bénéfiques (Schippers 1987, Leong 1986), et qui influencent la croissance et le rendement des cultures. Demmergues, a classé les micro-organismes de la rhizosphère comme bénéfique (symbiotiques), pathogènes et enfin neutres. Salt, quand à lui, a fait la distinction entre :

- les pathogènes majeurs (vrais) qui traversent la stèle et détruisent le phloème donnent ainsi les symptômes de la maladie .
- les pathogènes mineurs (saprophytes ou parasites) qui affectent les cellules corticales et les radicelles (Schippers 1987). A l'intérieur de cette catégorie on retrouve les micro-organismes de la rhizosphère affectant les plantes par leurs métabolites sans pour autant parasiter le tissu, et sont nommés micro-organismes délétaires (Elliott 1985 c, Schippers 1987) DRMO, ou inhibiteurs qui comportent aussi bien des champignons que des bactéries (Schippers 1987). Leur pathogénicité est difficile à démontrer parce que leur effet sur la plante est toujours limité à la retardation de la croissance des racines et/ ou des pousses sans autres symptômes (Elliot 1987 b, Schippers 1987).

I- Bactéries bénéfiques:

Les Pseudomonas sont un groupe d'organismes hétérogène. Elles peuvent être retrouvées dans l'eau, le sol, colonisant ou pathogènes des plantes, animaux et l'homme. Pseudomonas est un mot composé de 2 unités : pseudo = faux et Monas = unité. Ce sont en fait des bacilles gram négatives flagellées aux pôles.

Ces bacilles ont un diamètre de 1 µm et une longueur de 4 à 5 µm, pourtant certaines souches (les saprophytes et les phytopathogènes) peuvent être plus long.

Les pseudomonas sont des bactéries aérobies strictes, la production de pyocyanine et des pigments fluorescents est caractéristique à certaines souches. Pseudomonas aeruginosa produisant la pyocyanine, est aussi dit bacille pyocyanique. Ces pigments sont en fait chélateurs ferriques ou siderophores (Zannoni 1989).

Les rhizobactéries sont des bactéries associées aux plantes et dérivent de plusieurs genres, et colonisent agressivement les racines (Weller 1988, Thomashow et Weller 1993 b).

Les micro-organismes bénéfiques de la rhizosphère incluent aussi bien les Symbiotiques (rhizosphère, certaines actinomycètes, et les champignons mycorhizae), ainsi que les saprophytes qui augmentent la disponibilité des nutriments ou les substances nécessaires (Schippers 1987) à la croissance des plantes, ou encore la suppression des parasites et des pathogènes non-parasites.

Ces micro-organismes sont dits PGPR (plant growth promoting rhizobacteria)

(Schippers 1987, Thomashow et Weller 1993 b). L'effet des PGPR sur la croissance est soit du à l'inhibition des pathogènes mineurs ou DRB (Schippers 1987) soit à l'action de stimulation directe sur la plante (Thomashow et Weller 1993 b).

En effet, certains sols sont connus pour leur suppression naturelle vis à vis des Fusariums. C'est la microflore du sol qui est responsable de cette suppression (Lemanceau 1992).

- Agrobacterium radiobacter 84 est le premier agent de biocontrôle commercialisé. Cette bactérie est active contre la gale des couronnes causée par Agrobacterium tumefaciens.

Bacillus sp. a aussi été utilisé pour ses effets de biocontrôle. *Bacillus subtilis* A13 inhibe in vitro un grand nombre de pathogènes, et stimule la croissance de plusieurs plantes, quand les graines sont traitées avec A13, on observe une augmentation de 48% des carottes et 37% des arachides. A13 est suppressif aussi bien pour les pathogènes mineurs que majeurs, et est commercialisé comme traitement pour l'Arachide (Weller 1988). Le traitement des graines est donc une bonne méthode pour introduire les agents de biocontrôle dans le sol (Chao 1986, O'Sullivan 1988). Les PGPR ainsi que celles douées d'activité suppressive vis à vis des pathogènes majeurs ne peuvent être séparées. La plupart des souches sont suppressives vis à vis des pathogènes mineurs et majeurs (Weller 1988). Certaines *Pseudomonas* fluorescentes sont connues pour leur effet bénéfique pour les plantes (Bashan 1986, Thomashow 1988). Ces *Pseudomonas* colonisent les racines, les protègent contre les pathogènes (Thomashow 1988), et contribuent à leur croissance d'où l'augmentation des rendements des cultures (Bashan 1986). Quand ces PGPR sont appliquées aux graines ou tubercules, elles colonisent la surface et l'intérieur des racines ainsi que les canaux de la rhizosphère qui permettent l'accès physique aux racines. Leur emplacement, leur permet de limiter la présence de pathogène sur les racines (Thomashow et Weller 1993 b). Il a été rapporté que *Pseudomonas putida* WLS 358 est une souche stimulant la croissance des plantes (Degroot 1991), selon

Burr et Al., Les souches de *Pseudomonas* fluorescentes et *Pseudomonas putida* appliquées aux graines, augmenteraient la croissance des pommes de terre (Leong 1986, Weller 1988). En effet, les *Pseudomonas* fluorescentes augmenteraient le rendement des pommes de terre de 5 à 33%, cette augmentation est due en premier lieu à la suppression de la production d'HCN par les DRMO (Weller 1988, O'Sullivan 1988) par :

A- la déprivation en fer par élaboration de sidérophores (qui captent le fer avec une affinité plus grande que celle des DRMO).

B- colonisent agressivement les racines des plantes.

C- Utilisation des exsudats de plantes.

D- Production de substances antimycotiques (O'Sullivan 1988).

Certains traits importants pour le biocontrôle peuvent être perdus par mutations (Weller 1988). La mobilité des *Pseudomonas* fluorescentes est essentielle pour la colonisation des racines (Bashan 1986, Schippers 1987) de pommes de terre, les mutants dépourvus de flagelles ne peuvent plus coloniser les racines (Schippers 1987). D'autre part, les E.P.S et les protéines confèrent à la cellule bactérienne un espace d'interactions avec les cellules de plantes, leur absence influencerait les propriétés adhésives de la bactérie (Schippers 1987, Weller 1988). Toutefois, Les mutants siderophores négatives n'ont aucune action sur la colonisation.

Certains facteurs peuvent aussi affecter l'activité des PGPR. La disponibilité des ions Fe^{3+} est limitée dans les sols neutres et alcalins, mais elle est élevée dans les sols acides. Les sols acides diminueraient donc l'activité suppressive des PGPR par rapport aux DRMO, de même que l'illite (argile).

De plus, dans des conditions de stress les plants de pomme de terre libèrent la proline en grande quantité. Cette dernière stimule la production d'HCN (Schippers 1987). Tout ceci suggère que les mécanismes d'antagonisme entre bénéfiques et délétaires ont pour base la disponibilité des ions Fe^{3+} . Les souches bénéfiques inhiberaient la croissance des souches délétaires en les privant de fer, car les souches délétaires ne peuvent utiliser les siderophores des souches bénéfiques, alors que les souches délétaires résistantes aux souches bénéfiques peuvent utiliser les siderophores des souches bénéfiques (Leong 1986), (fig 1).

Potato root cell

Rhizosphere

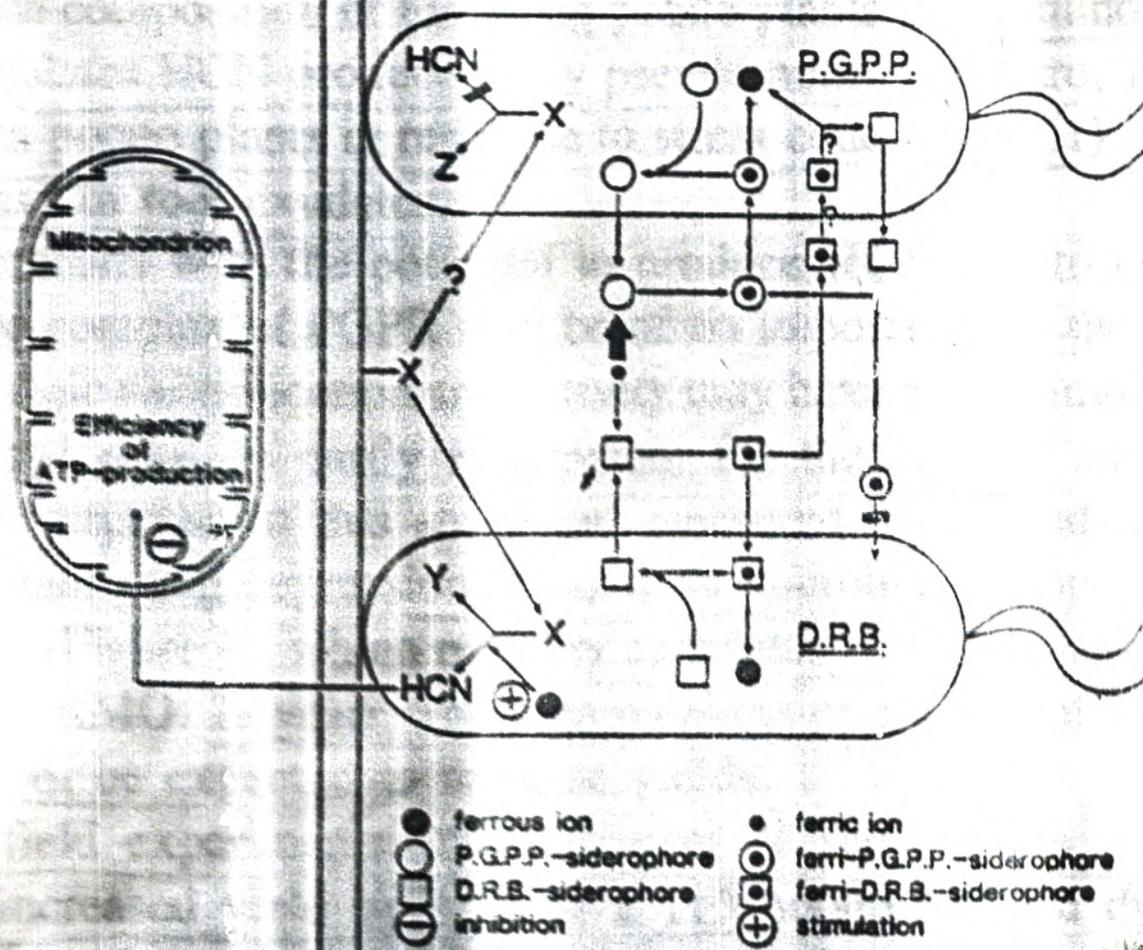


Fig 1: Interactions entre PGPR et DRB (Schippers 1987)

II- Bactéries inhibitrices.

Woltz 1978 (in Elliott 1985c) a nommé ces micro-organismes pathogènes non parasites ou exopathogènes. Les exopathogènes sont des micro-organismes qui vivent sur la superficie des plantes(et éventuellement le rhizoplan)(Elliott1985c) et

affectent les racines en altérant les systèmes responsables de l'apport en eau, ions et substances nutritives (Schippers 1987). Cette affection, est en fait le résultat de la libération d'une toxine hydrosoluble absorbée par la plante (Elliott 1985c).

Cette toxine produit des réactions métaboliques anormales (Elliott 1985c et 1987a) des nécroses, affection de la croissance (Elliott 1987a) : par inhibition de la germination, retardation de la croissance des racines, distorsion et lésions de celles-ci les prédisposants à des affections fongiques (Elliott 1985 a,b,c et 1987 a; et

Schippers 1987). Les souches de rhizobactéries délétaires sont aussi dites DRB, et sont regroupées en : *Pseudomonas* fluorescentes, *flavobacterium*, *citrobacter*, *enterobacter*, *Klebsiella*, *achromobacter*, *arthrobacter*, *chromobacterium*, *bacillus* sp

et enfin les *Pseudomonas* non fluorescentes (Elliott 1987a). C'est depuis 1961 qu'on a suspecté la responsabilité des *pseudomonas* sp, dans la retardation de la croissance des plantes et l'inhibition de la formation de radicelles (Schippers 1987)

et donc une diminution des rendements lors des cultures répétées (Elliott 1984, 1985 a et c, Schippers 1987). Elles sont retrouvées en un nombre élevé sur les racines (rhizoplan) par rapport à la terre qui les entoure(rhizosphère) (Elliott 1985a, Schippers 1987). Les *pseudomonas* saprophytes colonisent communément et abondamment les racines d'orge, de lentilles, de pois, d'avoine, de blé

(Elliott 1987b, 1989) et de pommes de terre sont pour la plupart des DRB, et sont douées d'une activité de décomposition vis à vis des résidus de leurs hôte, sur lesquels elles peuvent survivre et inoculer par la suite des cultures suivantes

(Elliott 1984, 1985 a et c, Schippers 1987). La présence d'un grand nombre de *Pseudomonas* inhibitrices sur les racines est due à une compétition d'espace et/ou nutritivement sur la surface racinaire: quand la population microbienne est naturellement basse, la flore inhibitrice augmente par diminution de la compétition

(Elliott 1985c). Les *pseudomonas* sont un groupe produisant une variété de métabolites secondaires inhibiteurs (Elliott 1985c) dépendants des facteurs environnants (eau, température, résidus, inoculum)(Elliott 1987b). Ce sont en fait

des *Pseudomonas* non fluorescentes psychrophilles et mésophilles (Elliott 1989) instables lorsqu'elles sont transférées sur des milieux de culture (Elliott 1985a et b).

Les DRB colonisant le blé et la pomme de terre libèrent des toxines hautement spécifiques (Elliott 1987 a, Schippers 1987) qui ne sont pas nécessaires à la colonisation (Elliott 1989), et qui dans le cas du blé, est formé d'une courte chaîne d'acides organiques et de patulin (Elliott 1987b) et dont la production est sensible au phosphate inorganique qui est en fait disponible pour la croissance (Elliott 1989).

De plus l'effet de la toxine est inversé par la L. Méthionine (Elliott 1987e et 1989) et sa production est réprimée par la cysteine, mais est hautement induite en présence de résidus (Elliott 1989). Cette toxine est fortement produite pendant la phase exponentielle (Elliott 1988) son activité diminue durant la phase létale, et est labile; et n'est pas libérée pendant la lyse cellulaire (Elliott 1989).

C'est plutôt l'invasion des cellules épidermales et corticales extérieures (Elliott 1985b) par la toxine qui est responsable de l'inhibition et non pas la population bactérienne présente sur les racines (Elliott 1987b). La production de la toxine est en fait sous la dépendance d'un groupe de gènes dans le cas du blé, et non pas un seul gène comme il est le cas pour d'autres. La toxine de *Pseudomonas* colonisant le blé est de plus active contre un bon nombre de mauvaises herbes et de bactéries : *E. coli*, *Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Bacillus subtilis* et enfin antifongique contre *Geotrichum candidum* mais à un degré moindre que le blé (Elliott 1992). Les *Pseudomonas* inhibitrices colonisant le blé et la pomme de terre libèrent aussi du HCNC, dont la production semble être dépendante de la disponibilité d'ions Fe^{3+} . La présence de PGPR inhiberait la croissance des *Pseudomonas* inhibitrices, vu qu'elles entrent en compétition avec celles-ci pour capter le fer. Mais les cultures répétées impliquent une grande quantité de fer et donc la compétitivité diminue. Notons que le HCN affecte sérieusement la voie des cytochromes chez les racines de pomme de terre (Schippers 1987). Toutefois ces souches inhibitrices sont intéressantes pour 3 raisons :

1- diminution de l'émergence de la croissance et les rendements du blé d'hiver, et des cultures répétées de la pomme de terre (Elliott 1988, Schippers 1987).

2- son utilisation pour le biocontrôle des mauvaises herbes.

3- colonisation agressive du rhizoplan (Elliott 1988), de plus le traitement des tubercules de pomme de terre infectés par *Pseudomonas solanacearum*, avec des souches de *Pseudomonas* fluorescentes (exp *Pseudomonas fluorescens* w163), révèle une régression notable de la maladie (Kemp 1983).

III - Bactéries pathogènes .

1- Définition: un pathogène est un membre des espèces microbiennes où la virulence détermine la tendance nuisible de la souche pathogène (Isenberg 1988).

Les bactéries pathogènes possèdent des propriétés génétiques distinctes que leurs apportent significativement une capacité plus grande pour entrer en compétition avec d'autres bactéries afin de préserver leur avantage à l'intérieur d'un hôte spécifique (Falkow 1988). La pathogénicité microbienne (ou virulence) a été définie comme les mécanismes biochimiques avec lequel les micro-organismes causent la maladie (Finley et Falkow 1989, Smith 1991) avec une probabilité variable selon les souches (Finley et Falkow 1989). La virulence n'est pas une unique propriété biologique mais un processus multifactoriel (Lorenzo et Martinez 1988, Smith 1991) dont les bases moléculaires sont les déterminants de la pathogénicité.

Deux qualités sont visuellement présentes dans la pathogénicité :

- l'infection et la pénétration; si l'une d'entre elles est perdue, le micro-organisme deviendrait moins virulent ou non virulent (Smith 1991). La pathogénicité est en fait gouvernée par un groupe de gènes (Kerr 1987).

2- Mode d'Infection: l'infection implique en fait un groupe de phénomènes :

- Le mouvement des pathogènes vers l'hôte.
- Attachement du pathogène sur la surface de la plante.
- Prolifération du pathogène à l'intérieur de l'hôte immédiatement après son entrée

(Lorenzo et Martinez 1988, Sheng-Huang 1986).

La mobilité des bactéries pathogènes aide celle-ci à s'approcher de la plante, et les charges électriques ainsi que les structures de la surface de la plante et les bactéries détermineraient la reconnaissance et l'absorption du pathogène sur l'hôte.

Quant à la pénétration elle peut se faire soit :

a: par les stomates présents sur les feuilles et les jeunes tiges. C'est le cas par exemple de *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* affectant le concombre.

b: par les lenticelles usuellement présentes dans le periderme des tiges et des racines. C'est le cas par exemple : d'*Erwinia carotovora* var. *atroseptica* affectant la pomme de terre.

c: par les racines latérales. C'est le cas de *Pseudomonas solanacearum* infectant les racines des jeunes pousses de tomates.

d: par les petites écorchures : C'est le cas d'*Agrobacterium tumefaciens* qui semble ne produire la galle que sur un plant portant des écorchures.

e: par les surfaces intactes: Les bactéries phytopathogènes étant dépourvues de structures de pénétration, une théorie a été émise. Selon laquelle, il y aurait invagination du mur des cellules chevelues de la racine formant ainsi le filament tubulaire de l'infection, exemple : *Erwinia chrysanthemum* pv. *deffenbachiae* (Sheng-huang 1986).

Des signaux chimiques sont couramment échangés entre les microbes et les plantes hôtes. Les réponses à ces signaux sont d'importants aspects d'interaction. Dans bon nombre de systèmes les plantes libèrent des composés activant les gènes microbiens (Rong 1986) exemple : chez *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, la production de syringomycine importante pour la virulence, est transcrite après activation des gènes induits par des signaux de plantes (arbutine, glucosides phénoliques ect.....) (Gross 1991).

3- Les Gènes gouvernant la pathogénicité

Il existe en fait 4 types de gènes chez les micro-organismes pathogènes absents chez les saprophytes :

a: gènes nécessaires pour la croissance (colonisation) sur ou à l'intérieur de la plante (parasitisme)

b: gènes nécessaires pour l'expression des symptômes de la maladie.

c: gènes spécifiques de l'hôte.

d: gènes d'avirulence (spécificité de race).

La mutation de ces derniers (avirulence) conduirait à une meilleure infection. Toutefois ces gènes agiraient simplement comme des molécules cibles pour les gènes de résistance de plantes, et peuvent être imposants dans l'aptitude de parasiter (Djordjevic 1987).

4- Exemple de micro-organismes pathogènes:

on a pris 2 exemples de bactéries phytopathogènes.

4-1- *Agrobacterium tumefaciens* : Les rhizobiacées comportent aussi bien des micro-organismes (bactéries) saprophytes induisant la fixation de nitrogène gazeux, que pathogènes: c'est le cas d'*agrobacterium tumefaciens* (Djordjevic 1987) qui lui est l'agent causant ou induisant la galle des couronnes (Kerr 1987, Rong 1990).

Les gènes contrôlant l'induction de la galle des couronnes sont localisés sur un plasmide (pTi tumor-inducing plasmid) dont une partie est transférée dans la cellule hôte de la plante, et s'intègre au noyau de celle-ci (T-DNA). La plupart des gènes semblent coder pour la synthèse d'auxine, de cytokinines, et enfin d'opines.

Les gènes de virulences (vir) nécessaires pour l'induction de la galle sont au nombre de 6 Vir A-E et Vir G (Kerr 1987). Les stratégies d'infection sont les suivantes :

La libération d'acétosyringone par les cellules de plantes est reconnue par la bactérie via les gènes Vir A et Vir G (système de transduction des signaux), résultant en l'induction des gènes de virulence et éventuellement de l'excision et le transfert du T-DNA de la bactérie vers la plante. Un autre signal induit l'expression des gènes de virulence, ce sont les opines sécrétées par les tumeurs de la galle qui sont des métabolites de faible poids moléculaire, et sont responsables du catabolisme des opines par la bactérie (Rong 1990).

Les opines sont en fait

« la raison d'être » des galles de couronnes (Kerr 1987). En plus, certaines opines dites conjugales stimulent le transfert du Ti entre les cellules d'Agrobacterium (Rong 1990). Certaines mutations des gènes Vir affecteraient semble-t-il la conjugaison inductible du plasmide Ti (Djordjevic 1987, Rong 1990) et par conséquent affecteraient la pathogénicité. Par contre, les mutations dues à l'insertion du transposant Tn5 dans le Ti résulteraient en mutants encore plus spécifiques (Djordjevic 1987). En plus de ce que nous avons cité, les polysaccharides acides semblent induire certains gènes chromosomaux d'Agrobacterium. Ces polysaccharides acides dériveraient en fait de la partie pectique de la paroi cellulaire des plantes (Rong 1990). Avant d'induire la galle :

Agrobacterium tumefaciens devrait s'attacher aux cellules de plantes (Kerr 1987), cet attachement est sous le contrôle de 2 gènes (Djordjevic 1987, Kerr 1987) chromosomaux (Kerr 1987) dont l'un codant le B-1,2- glucane qui est un exopolysaccharide (Djordjevic 1987, Kerr 1987).

Et enfin le phénomène de l'induction de la galle serait :

- a- attachement d'Agrobacterium tumefaciens aux cellules cibles.
- b- ancrage des cellules bactériennes par les exopolysaccharides.
- c- induction des gènes Vir par les exudats de plantes.
- d- formation du T-DNA linéaire, et est transféré dans les cellules de plantes.
- e- intégration du T-DNA dans le génome de la plante.
- f- synthèse d'hormones de plantes.
- g- division cellulaire pour former les galles.
- h- synthèse des opines.
- i- transfert des pTi à d'autres cellules bactériennes (Kerr 1987).

4-2- Les *Pseudomonas* phytopathogènes :

Les *Pseudomonas* fluorescentes phytopathogènes sont hautement spécifiques à leurs hôtes et sont regroupées sous 2 noms :

Pseudomonas syringae (regroupant 40 espèces) et *Pseudomonas cicchori*, alors que *Pseudomonas marginalis* ressemble à la souche saprophyte *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. Ces *Pseudomonas* sont aérobies stricts, sont incapables de croître à 37°C, oxydase négative à l'exception de *Pseudomonas cicchori*, produisent une réaction hypersensitive sur les feuilles de tabacs, sont arginine dihydrolase négative, et croissent à un taux lent par rapport aux *Pseudomonas* saprophytes. Les différents symptômes produits par les *Pseudomonas* phytopathogènes sur les plantes, sont dues aux substances excrétées par les bactéries, on retrouve : les enzymes capables d'attaquer une variété de composés cellulaires des tissus de plantes, des toxines, et des hormones de plantes. Au sein des hormones hydrolytiques on retrouve les B-glucosidases, xylosidases, xylanases, pectinases, et les plus communes sont la trans-éliminase polygalacturonique et la cellulase. De plus, la majorité des variétés de *Pseudomonas syringae* sinon toutes produisent des peptides toxiques (toxines) (Zannoni 1989) syringomycine, syringotoxine, (Zannoni 1989, Gross 1991) coronatine (Bender 1987 et 1991, Gross 1991, Mitchell 1986 b, Sakamura 1988) rhizobitoxine (Mitchell 1986 a), tabtoxine, phaseolotoxine, tagetitoxine (Gross 1991) ect ...

Ces composés sont considérés comme les déterminants primaires de la pathogénicité et sont dits pathotoxines. Selon leur structure chimique les toxines sont classées en : cyclopeptides, esters d'acides-aminés, ester d'amino-polyole-aliphatique, polyalcools, lactones et polyols aliphatiques, ou galactosides sesquiterpènes (Sakamura 1988).

Les forces de sélection naturelles font que les nutriments organiques relativement excrétés par les plantes offrent un milieu attractif pour les chémo-organotrophes.

Les bactéries necrotrophiques produisent des toxines non spécifiques et des enzymes dégradatives qui détruisent le tissu de la plante avant la colonisation.

Ces interactions sont caractérisées par une légère spécificité d'hôte.

Les *Pseudomonas* sont similaires aux saprophytes stricts dans leur inabilityé de coloniser n'importe quel tissu de plante.

Un mode d'interactions parasitique plus avancé du point de vue spécificité, reconnaissance et peut-être évolution, est celui des bactéries colonisant la totalité de l'hôte. Les interactions de ce type sont caractérisées par l'invasion de vaisseaux de xylème, par la production d'exopolysaccharides (E.P.S) pour éviter les mécanismes de défense de la plante et enfin par un niveau modéré de la spécificité d'hôte exemple : *Pseudomonas solanacearum*.

Ces organismes peuvent se multiplier pendant longtemps avant de causer la maladie. Ils peuvent également provoquer une défense généralisée chez leurs hôtes et ceux qui ne le sont pas.

Un autre mode d'interactions parasitique encore plus avancé ayant une stratégie différente pour éviter la reconnaissance. Les symptômes de la maladie sont absents par exception aux périodes de stress.

Ces interactions sont caractérisées par un contact intime entre les bactéries et les parois cellulaires de l'hôte et par des altérations de ces dernières, par un nombre d'hôtes étroit et un haut niveau de spécificité de race :

C'est le cas de *Pseudomonas syringae* (Djordjevic 1987).

a: Production d'exopolysaccharides (E.P.S).

Les E.P.S des bactéries phytopathogènes sont connues pour leur contrôle dans l'écologie et la pathogénicité de ces bactéries (Boucher 1986, Fett 1986). Les E.P.S agissent comme des adhésines sur les surfaces des feuilles de plantes et leur production en grande quantité est associée à l'augmentation de la virulence (Fett 1986). Dans le cas de *Pseudomonas solanacearum*, c'est un polymère de haut poids moléculaire qui est responsable de l'induction des symptômes de flétrissement caractérisant la maladie, ce flétrissement est dû à l'obstruction du xylème et donc l'obstruction du flux d'eau (Cook 1991).

Les alginates (acides alginiques) sont un groupe de polysaccharides structurellement liés qu'on croyait produites seulement par les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, isolées des fibroses kystiques, sont aussi produites par les bactéries fluorescentes (*fluorescens*, *mendocina*, *putida*) et par les souches phytopathogènes opportunes de *pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas*-phytopathogènes (Fett 1986). Les mutants défectueux en production d'E.P.S permettent la production de lectines de plantes qui agglutineraient et immobiliseraient les bactéries sur les surfaces cellulaires des plantes. Les E.P.S sont alors un facteur marquant d'une part la reconnaissance initiale par la plante (Djordjevic 1987) et le mouvement systémique de la bactérie (Cook 1991). La production d'E.P.S commence lors de la phase exponentielle de croissance et continue jusqu'à la phase stationnaire (Marquès 1986) alors que l'UDPG al-N-Acide semble être une clé intermédiaire dans le phénomène de biosynthèse des E.P.S, car les sucres d'U.D.P sont les substrats communs de la synthèse (Cook 1991). Des concentrations élevées de phosphate réduiraient de moitié cette synthèse (Marquès 1986). Les polymères d'E.P.S peuvent être utilisés en industrie notamment pharmaceutiques et peinture (Marquès 1986, Manresa 1986).

b: Enzymes pectolytiques :

Les phytopathogènes produisent une variété d'enzymes qui sont capables d'attaquer les polymères pectiques des cellules de plantes, il s'agit en fait d'enzymes pectolytiques (Kerr 1987, Collmer 1986) qui dans certains cas clivent

les polymères pectiques de l'exoderme de la lamelle moyenne facilitant ainsi la pénétration et la colonisation par le pathogène (Collmer 1986). C'est un groupe d'enzymes dégradant le polypectate par clivage des ponts 1,4 glycosidique entre les monomères adjacents d'acide uronique par un mécanisme de transélimination

(Kerr 1987). La production de ces enzymes sont sous la dépendance d'un groupe de gènes inductibles, la présence de polygalacturonate ou d'oligogalacturonate retrouvés en grande quantité dans la paroi cellulaire (Rong 1990, Collmer 1986).

La plus part des phytopathogènes pectolytiques sont des *Erwinia* et les champignons, pourtant on a aussi retrouvé des *Pseudomonas* qui en produisaient.

C'est le cas par exemple de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (Collmer 1986). Ce sont en fait 5 gènes (peL A \sim E) qui coderaient la production d'enzymes pectolitiques. Lorsqu'un seul gène est transféré (de *Erwinia chrysanthemi* vers *E. coli*), la souche réceptrice est incapable de macérer (la tomate) la plante, par contre si on venait à transférer 2 gènes pectolytiques ou plus (*Erwinia carotovora* vers *E. coli*) la souche réceptrice acquiert la possibilité de macérer la plante (pomme de terre) (Kerr 1987).

c: Production d'auxine:

La capacité de produire les auxines (ou IAA pour indole 3 acetic-acid) qui sont des phytohormones, est présente aussi bien chez les bactéries que champignons (Fett 1987). Parmi ces bactéries on retrouve certaines *Pseudomonas* exemple : *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Fett 1987, Shaw 1988) et aussi *Agrobacterium tumefaciens* dont la production d'auxine semble être importante pour la pathogénicité. Les gènes responsables de la production d'auxine sont portés par un plasmide. La synthèse d'I.A.A. s'effectue à partir de L. tryptophane (Fett 1987, Kerr 1987). Effectivement 2 voies de synthèse différentes sont connues (Fett 1987).

L'une, commune à certains microbes et plantes, qui a pour principe la transamination du tryptophane en indole-3-acide pyruvique (I PY A), suivie d'une décarboxylation en Indole-3-acétaldéhyde (IAA Ld), et finalement une oxydation du IAA Ld en IAA (Fett 1987).

L'autre voie commune à *Agrobacterium tumefaciens* et *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Fett 1987, Kerr 1987): Le tryptophane est décarboxylé par une monooxygénase en I A M (Indole-3-acétamide) suivie d'une désamination par une hydrolase pour avoir l'I A A (Fett 1987). Deux gènes interviennent dans cette voie respectivement *iaa M* et *iaa H*, qui sont situés sur le même operon et donc sont sous le même contrôle de régulation (Shaw 1988, Kerr 1987), un troisième gène *iaaL* séparé des deux autres par 2Kb, est responsable de la formation d'un conjugué entre IAA et la lysine pour protéger l'auxine contre la dégradation (Kerr 1987). Alors que ces gènes dans le cas d'*Agrobacterium* sont exclusivement portés par le pTi, dans le cas de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* ils peuvent être portés soit par un plasmide (Boucher 1986, Fett 1987) soit par le chromosome (Fett 1987). L'IAA est en fait responsable d'hypertrophie (Fett 1987, Kerr 1987) mais peut être à l'origine de la multiplication cellulaire en absence d'hypertrophie, et contribue à la survie des phytopathogènes comme épiphytes sur les surfaces des plantes (Fett 1987). La disponibilité des mutants IAA, et la réintroduction de plasmides IAAI dans les mutants confirment l'importance de l'I A A dans la virulence (Shaw 1988).

d: Toxines

Les phytotoxines bactériennes sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire et de différentes structures chimiques. Cette variété chimique des phytotoxines démontre qu'elles suivent des étapes de biosynthèse différentes et par conséquent des gènes spécifiques (Mitchell 1991). Les voies de synthèse sont non-ribosomales, et sont composées d'une série d'étapes enzymatiques intervenant dans les dérivés de chaînes peptidiques sont requises pour l'assemblage des toxines (Gross 1991). Le matériel génétique codant pour la biosynthèse de quelques toxines est éparpillé dans la nature (voir tableau I), exemple: les coronatines sont retrouvées aussi bien chez les *Pseudomonas* que les *xanthomonas* (Mitchell 1991).

Les toxines les plus communément étudiées sont les coronatines et syringomycines produites par les *pseudomonas syringae*. Les mutants cor- de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* produits par l'insertion des transposons Tn5, colonisent toujours les plants de tomates en produisant le même nombre de lésions mais les populations déclinent rapidement. La coronatine serait donc un facteur écologique permettant l'augmentation de la population (Bender 1987 et 1991, Shaw 1988).

La production de coronatine est codée par un plasmide de 101 Kb (Bender 1991).

La toxine n'est donc pas un facteur de pathogénicité par contre la production de polygalacturonate-protéase, cutinase et désaminase peut être un facteur de pathogénicité (Bender 1987). Quand aux gènes codant les syringomycines produites par *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, ils sont portés par un plasmide de 22 Kd.

Contrairement au cas précédent le mutant syr-perd sa virulence ainsi que sa capacité de résistance aux bactériophages (Shaw 1988). La production de syringomycine est réprimée par une concentration de 1mM de phosphate, mais est induite par les ions Fe^{3+} . IL a été rapporté que quelques minutes de production de toxines des *pseudomonas* sont nécessaires pour causer les symptômes de la maladie. De plus l'analyse des mutants tox- indique que la production de toxines est un facteur de virulence chez les *Pseudomonas* phytopathogènes (Gross 1991). De plus, quelques phytotoxines sont connues pour leur activité herbicide en plus d'autres activités, et donc peuvent être utilisées comme herbicides, ou des substances régulatrices de croissance exemple: aphidicoline qui est, à la fois antivirale et antibiotique (Sakamura 1988).

e: Plasmide de virulence

Pseudomonas solanacearum est une bactérie causant le flétrissement de plus d'une centaine de plantes. Ce pathogène est en fait un facteur limitant la croissance et par conséquent le rendement de la pomme de terre, tomates, bananes, tabac ect...

(Boucher 1986). La plupart des gènes gouvernant cette virulence sont portés par un mégaplasmide (Boucher 1986, Shaw 1988). Les enzymes dégradant les cellules épidermales sont aussi codées par le plasmide (Shaw 1988). Ce mégaplasmide est connu sous le terme de pwi (plasmid wilt inducing).

Ce plasmide est autotransmissible et est responsable de l'adaptation des bactéries à des endroits écologiques spécifiques (Boucher 1986).

Tableau I : Distribution des phytotoxines bactériennes
(Mitchell 1991).
Selon le genre

toxines	Xantho- monas	Pseudo- monas	Strepto- myces	Bradyrhi- zobium	Erwinia
- 3- MTPA	x				
-Coronatines	x	x			
-phascolotoxine		x			
-Tagetitoxine		x			
-Lipodepsinona peptides		x			
-Tropolone		x			
-Tabtoxines		x	x		
-Rhizobitoxines		x	x	x	
-Thaxtanine			x		
-Dihydrophenyl- alanine					x

* 3-MTPA = 3 methylthiopropionic acid

* Lipodepsinonapeptides : incluent les syringomycines
syringotoxines ,et syringostatines.

Chap II : Facteurs influençant l'activité de biocontrôle des bactéries.

Le contrôle biologique des pathogènes par l'introduction de micro-organismes a été étudié, (Elliott 1987 a, Weller 1988) pendant plus de 65 ans. Toutefois, le traitement des pathogènes infestant les cultures par ces micro-organismes a longtemps été considéré comme non faisable, et c'est seulement depuis 1965 que la recherche a considérablement augmentée dans cette voie (Weller 1988).

Les scientifiques des années 80, se sont intéressés au biocontrôle des phytopathogènes en réponse, en partie, à la croissance chez l'opinion publique du danger des pesticides chimiques (Cook 1993). Dans le cas de la galle des couronnes, aucun agent chimique ne peut remplacer *Agrobacterium radiobacter* 84

(Elliott 1987a, Cook 1993). Les micro-organismes qui peuvent croître dans la rhizosphère sont d'intéressants agents de biocontrôle, conférant à la rhizosphère un front de défense contre l'attaque des racines par les micro-organismes pathogènes (Weller 1988). Certaines souches de *Pseudomonas* fluorescentes sont

douées d'une activité de biocontrôle contre un bon nombre de phytopathogènes

(Elliott 1985b, James et Gutterson 1986, Thomashow 1988, O'ssullivan 1990, Vincent et Al 1991). Cette activité de biocontrôle dépend de 2 propriétés :

la prolifération préférentielle de ces bactéries sur, ou à proximité des racines et la production de substances inhibant les micro-organismes phytopathogènes aussi bien champignons (James et Gutterson 1986, Weller 1988) que bactéries (Weller 1988). Les agents de biocontrôle produisent une large variété de métabolites parmi lesquels on retrouve :

- 1- Les antibiotiques comme les phénazines : 2-4-diacétyl-phloroglucinol, ect..
- 2- Volatils comme l'HCN, l'ammoniac et l'éthanol.
- 3- Enzymes comme chitinases, B-glucanases, cellulases et protéases.
- 4- Sidérophores comme les pyoverdines (Thomashow et Weller 1993a).

Ces métabolites contribueraient à l'activité de biocontrôle par :

- 1- Inhibition de la croissance du pathogène cible ou de son activité exemple : antibiotique ou enzyme (Thomashow et Weller 1993 a et b).
- 2- Inhibition des micro-organismes non-cibles qui entrent en compétition avec l'agent introduit exemple: antibiotique ou enzyme (Thomashow et Weller 1993 a).
- 3- Induire des mécanismes de résistance chez l'hôte , exemple : HCN ou antibiotique.
- 4- Médiation de la compétition pour les éléments essentiels à la mutation exemple: sidérophore (Vincent et Al 1991, Thomashow et Weller 1993 a).

I - Antibiotiques et leurs rôle dans la compétence écologique :

*La plupart des bactéries gram négatives sécrètent des protéines dans le milieu extracellulaire. Les protéines sécrétées interviendraient dans leur pathogénicité
exemple: *Pseudomonas aeruginosa*(bactériocine,protéase) ou bénéficité
exemple: *Pseudomonas putida* Wsc 374(bactériocine)(Degroot 1991) et *Pseudomonas putida* Wsc 358(Lemanceau 1992). Il a été par ailleurs démontré que les produits potentiellement sécrétés par les souches de *Pseudomonas* sont cytotoxique, on retrouve entre autres les phénazines et les protéases (Levy 1992). En effet,les antibiotiques jouent un rôle majeur dans la suppression par les bactéries . L'agrocine 84 est un antibiotique qui est à l'origine de la médiation de la suppression d'*Agrobacterium tumefaciens* par *Agrobacterium radiobacter* 84(Weller 1988).

Les Phz produisent par les *Pseudomonas* fluorescentes sont à l'origine de la suppression du « take-all » doublé,(Weller1988,Thomashow1988,Vincent et Al 1991, Elliott 1992,Thomashow1992b).*Pseudomonas* fluorescents 2-79 inhibe *G.graminis* var.*tritici* (agent causant la « take-all ») in vitro, et est suppressif du « take-all », quand elle est appliquée comme traitement des graines (Chao 1986, Weller 1988, Thomashow 1988 et 1992 b, Cook 1993), les Phz sont en fait les produits de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques avec pour intermédiaire le chorismate (Thomashow 1988). Cet antibiotique inhibe *G.graminis* var. *Tritici* in vitro à une concentration inférieure à 1mg/ml, et inhibe aussi d'autres pathogènes des racines de blé. Les mutants 2-79 Phz - obtenues par insertion du transposon Tn 5 sont moins suppressifs que la souche parentale.

La complémentation de ces derniers par des séquences homologues restore à la fois :la synthèse d'antibiotique,l'inhibition fongique invitro, et le biocontrôle du « take-all » à un niveau similaire à la souche sauvage (Weller 1988, Thomashow 1988). Les mêmes résultats sont obtenus par mutation de *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 produisant la PCA, 2-0H-PCA et 2-0H-Phz (ces 2 dernières molécules dériveraient séquentiellement de la PCA)(Thomashow 1992 a), et chez *Pseudomonas auréofaciens* Q2-87 produisant le 2-4-diacetophloroglucinol (pHL) (Vincent et Al 1991). *Pseudomonas fluorescens* Hv37a produit un composé antifongique (Afv) inhibant *pytium ultimum* infectant les racines des jeunes pousses de coton (la synthèse de ce composé est sous le contrôle du glucose) (James et Guttererson 1986, Weller 1988), et dépend de l'expression d'au moins 5 gènes.

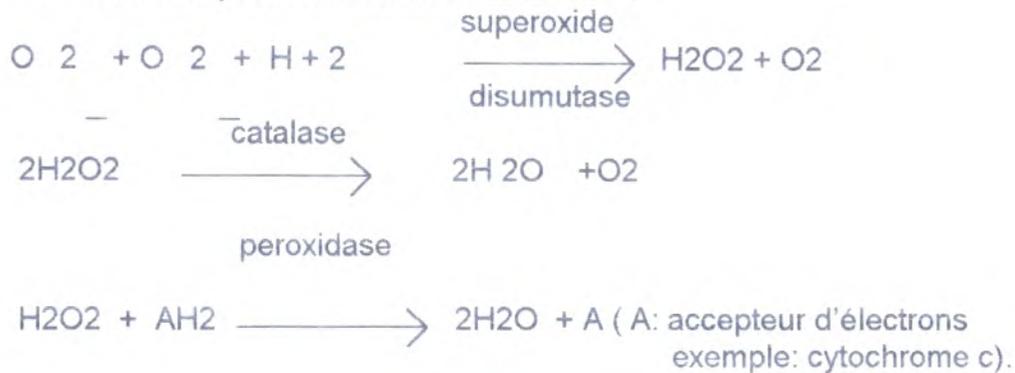
Les mutants Hv37a Afv protègent les jeunes pousses à un degré moindre que les souches parentales, (Weller 1988). Les mutants antibiotiques négatifs aident à démontrer l'importance de la production des antibiotiques dans le biocontrôle des souches les produisant, (Thomashow et Weller 1993b).

* L'activité antimicrobienne de la PCA contre *G.g.tritici* in vitro dépend de la concentration de PCA protonée, et donc la PCA est fortement active dans des conditions acides. Toutefois le pH du sol ne semble pas être un facteur limitant la suppression (Thomashow 1992 b) alors que la teneur du sol en argile l'est (Thomashow 1992 b et 1993 a). Et ce , parceque les antibiotiques, et plus particulièrement les antibiotiques basiques s'y adsorbent et deviennent inactifs (Thomashow et Weller 1993 a) . Dans ce cas le pH augmente et c'est la forme anionique de PCA qui prédomine (Thomashow 1992b). La PCA est essentiellement retrouvée sur les racines et dans la rhizosphère (Thomashow et Weller1993 a).

Il ya actuellement 2 explications quand au mode d'action des Phz : interaction avec la chaîne de transport d'électrons donc perturbation du métabolisme bioénergétique (Thomashow 1992b, Levy 1992) ou l'augmentation de 2 composés, O_2^- et H_2O_2 , qui sont des substances délétaires aussi bien pour les procaryotes que pour les eucaryotes. Les cellules répondent à ce stress oxydatif par l'induction d'une série d'activités responsables de la détoxification causée par l'agent délétaire. Les mécanismes de défense les plus communément retrouvés chez les cellules incluent les enzymes suivantes : superoxide dismutase, catalase et la peroxidase, alors que certains organismes élaborent même la mélanine.

Alors que les activités cellulaires de la catalase et la superoxide dismutase sont augmentées, celle de la peroxidase est diminuée dans certains cas (E.Levy 1992).

Les enzymes citées catalysent les réactions suivantes :



Selon E. Levy (1992) la suppression fongique par *Pseudomonas aeruginosa* serait l'action synergique de 2 produits : Les phz et les Protéases.

Les phz sont une source de métabolites toxiques d'oxygène, qui oxydent les protéines fongiques et les rendent susceptibles aux protéases. Le mécanisme d'action de la PCA est probablement similaire à celui de la pyocyanine qui inhibe la respiration bactérienne au dépend du transport de solutés, ce qui suggère une interaction des antibiotiques avec la chaîne respiratoire de la membrane cellulaire et interfère avec l'abilité des cellules à préformer l'énergie et les processus métaboliques membranaires tel que le transport actif (Thomashow 1992 b).

La production de PhL est un important mécanisme de suppression de nombreuses *Pseudomonas* qui contrôlent les pathogènes responsables de la mosaïque du blé (Thomashow et Weller 1993 a), Le phl inhibe en outre une variété de bactéries et champignons et de plus possède une activité herbicide (Thomashow et Weller 1993 a et b). en entrant en compétition avec le métabolisme de la plante (Thomashow 1992 b).

Pseudomonas fluorescens CHAO est la souche la plus étudiée quand à la production de PhL. En plus du PhL CHAO produit 4 autres composés bioactifs : HCN, acide indolacétique, pyoluteorine et enfin la pyoverdine (Thomashow et Weller 1993a). Les mutants déficients en HCN montrent une protection contre le « black root rot » inférieure à celle présente chez la souche parentale par contre la suppression du « take-all » est toujours la même (Thomashow 1993 b). * De plus, il a été suggéré que la production d'antibiotiques contribuerait à la compétence écologique des micro-organismes du sol Thomashow et Weller 1993 b).

La production de phénazines contribue plus à la persistance de *Pseudomonas fluorescens* 2-79 et *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 dans le sol. En effet, la population des mutants Phz- décroît rapidement dans le sol, ce qui indiquerait l'importance des Phz dans la survie des souches (Cook 1993, Thomashow 1992a, *Thomashow et Weller* 1993 a et b), alors que la population des Phz+ ne décroît pas dans un sol pasteurisé. Ce qui supposerait que les Phz+ contribueraient à l'aptitude des souches 2-79 et 30-84 à entrer en compétition avec la microflore résidente (Thomashow et Weller 1993 a et b). D'autres facteurs contribuent à la compétence écologique des *Pseudomonas* en intervenant dans l'attachement, distribution et croissance; citons : les polysaccharides de surface, flagelles, poils, osmotolérance (Weller 1988), adhésives (Thomashow et Weller 1993 b), et l'aptitude d'utiliser les complexes des carbohydrates (Weller 1988, Kröckel 1987).

2- Sidérophores:

Dans un milieu pauvre en fer, les *Pseudomonas* produisent des pigments fluorescents jaune-verts (Cody 1987, Weller 1988). Ce sont des molécules de faible poids moléculaires (Leong 1986, Weller 1988) de 500 à 1000 daltons (Leong 1986) ayant la capacité de fixer les ions Fe^{III}, désignés sous le terme de sidérophores (Leong 1986, Cody 1987, Weller 1988, O'ssullivan 1990, Smirnov 1990). Ils fixent les ions Fe^{III} avec une très haute affinité (leong 1986). En plus des sidérophores, ces bactéries produisent des récepteurs membranaires protéiques reconnaissant spécifiquement le complexe Fe^{III}- sidérophores (Leong 1986, Weller 1988, O'ssullivan 1990), qui fait que le complexe ne peut pas être reconnu ou utilisé par d'autres bactéries.

Au moins 5 unités transcriptionnelles sont requises pour la biosynthèse de sidérophore fluorescents chez *Pseudomonas* sp. WSC 358, et le gène codant les récepteurs membranaires correspondants chez *Pseudomonas* sp. B10 est étroitement associé avec les gènes de biosynthèse des sidérophores (O'ssullivan 1990). La fonction des sidérophores est de supplémenter la cellule en fer, en agissant comme des facteurs de croissance (Leong 1986) ou comme antibiotique (Leong 1986, Smirnov 1990), (voir fig 2) .

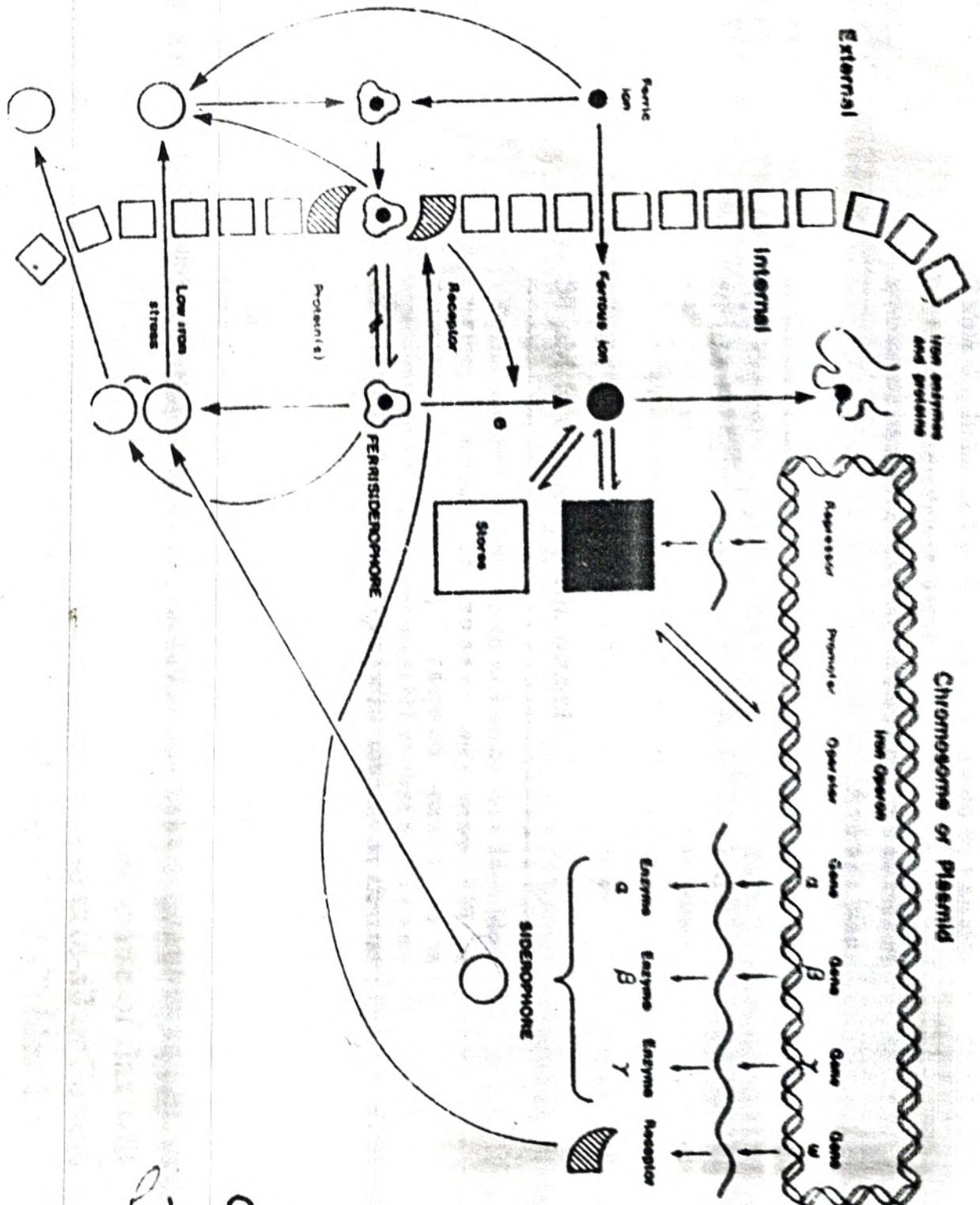


Figure 2 : Représentation schématique de l'assimilation de Fer par les micro-organismes aérobiques (Leong 1986).

Plusieurs études ont montré que la production de sidérophores par les *Pseudomonas* fluorescentes bénéfiques sont en partie responsables de l'augmentation de la croissance des plantes. Ils ont une activité bactériostatique contre *Erwinia carotovora* affectant la pomme de terre, et réduisant la population fongique sur le rhizoplan de la pomme de terre. Ils entrent en compétition pour le Fer avec les DRB, de telle sorte que les racines de pomme de terre soient en meilleure santé (Leong 1986, Weller 1988). La présence de *Pseudomonas* sp. WSC 358 sur les racines de pomme de terre, résulte en un développement meilleur de celle-ci, alors qu'en présence de *Pseudomonas* Sid- les racines ne se développent pas bien et sont susceptibles (Leong 1986, Schippers 1987, Weller 1988).

Kloeppers et Al. ont été les premiers à démontrer l'importance de la production de sidérophores dans le mécanisme de biocontrôle. La suppression médiée par les sidérophores est plus élevée dans les sols acides (Weller 1988). Si bien que dans les sols alcalins contrairement aux sols acides, la compétition pour le Fer (FeIII) a été proposée comme un mécanisme de suppression (Elad 1985 a) de plusieurs *Fusarium oxysporum* par la production de sidérophores par les *Pseudomonas* spp, (Elad 1985 a, Leong 1986). De même que l'inhibition, de la germination, dans le sol des chlamydospores de ces derniers est due à la production de sidérophores (Elad 1985 b). Cette inhibition est totalement ou partiellement inversée par ajout de Fer (Elad 1985 b, Leong 1986).

La présence d'autres cations (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{2-4}) essentiels peuvent entrer en compétition pour le site de fixation sur les sidérophores et inhiberaient la multiplication des agents de biocontrôle des *Pseudomonas* (Elad 1985 a), d'autre part la pauvreté des exudats limiterait considérablement la production de sidérophores (Elad 1985 b). En plus, de leur suppression de *Fusarium oxysporum*, les sidérophores sont aussi suppressifs vis à vis de *G.graminis* var. *tritici* (Leong 1986, Weller 1988) et de *Pythium* spp, (Weller 1988).

En fixant les ions Fe III dans la rhizosphère, les sidérophores limiteraient sa disponibilité pour les pathogènes et par conséquent la suppression de leur croissance (Leong 1986, Weller 1988). Les phytopathogènes sont sensibles à la suppression par les sidérophores pour différentes raisons :

- a: ne produisent pas de sidérophores.
- b: ne peuvent utiliser les sidérophores produits par leurs antagonistes ou par les micro-organismes présents dans leur environnement immédiat.
- c: produisent une petite quantité de sidérophores, ou des sidérophores avec une affinité au Fer inférieure à celle de leurs antagonistes .
- d: produisent des sidérophores qui peuvent être utilisés par leurs antagonistes mais ne peuvent utiliser ceux de leur antagonistes (Weller 1988).

Chap III : Amélioration des souches utilisées pour le biocontrôle .

I- Recombinaison et facteurs génétique

* Les plasmides sont des éléments génétiques extrachromosomiques (Novick 1987, Shaw 1988) retrouvées chez les procaryotes et moins fréquemment chez les eucaryotes (Shaw 1988), se répliquant d'une manière autonome (Kerr 1987).

Ils se présentent sous la forme d'une double chaîne de DNA circulaire superenroulée (CCC.DNA : covalently closed circular DNA) (Kerr 1987, Shaw 1988), d'une taille inférieure au chromosome bactérien et allant de 1 ou 2 M dal jusqu'à 300 Mdal (Shaw 1988). Les plasmides, portent fréquemment des gènes qui confèrent une plus grande flexibilité à la bactérie en réponse aux changements de l'environnement (Gross 1991). Ils portent deux fonctions essentielles, la réplication et la ségrégation (Shaw 1988). Quand ils sont coupés, ils deviennent linéaire, et s'ils sont mélangés à d'autres fragments de DNA coupés avec les mêmes enzymes puis traités avec la même ligase, un fragment du DNA étranger y est, alors, incorporé (Kawasaki 1985, Kerr 1987).

C'est alors que le plasmide obtenu est introduit dans un organisme (usuellement E.coli) pour sa propagation in vitro le plus fréquemment par conjugaison (Kerr 1987). Les réarrangements de gènes par recombinaison de DNA jouent un grand rôle dans l'évolution des micro-organismes, en particulier les recombinaisons illégitimes: transposition, délétion, duplication ou cointégration qui tendent à promouvoir aussi bien la diversification des plasmides que celle des micro-organismes. Ces réarrangements sont communs dans la nature (Trevors 1989), mais la population de chaque recombinant dans des conditions non sélectives est très faible. Si les mêmes conditions sont créées au laboratoire, la recombinaison in vivo peut causer une évolution plus rapide des plasmides que dans la nature et permettrait de créer de nouveaux plasmides (Kawasaki 1985). Ceci permettrait de construire des bactéries capables de produire soit de la phénazine en grandes quantités, soit d'autres métabolites.

En général, le plasmide utilisé pour l'introduction d'un gène est un plasmide suicide qui est perdu lorsque le gène qu'il portait, est transposé sur la cible (O'ssullivan 1988). Eberhard, spécule que certains gènes sont susceptibles d'être retrouvés plutôt sur le plasmide que sur le chromosome (Bender 1991). La recombinaison de deux plasmides peut donner naissance à de nouveaux plasmides totalement différents des plasmides parentaux (Carney 1989, Kawasaki 1985). La recombinaison la plus fréquemment utilisée est la mutation par l'introduction de transposons Tn 5 (O'ssullivan 1988, Bender 1991, Coplin 1992).

(Quand il est inséré dans un gène, le transposon réprime l'activité de ce dernier, et /ou peut alors déterminer le rôle du gène réprimé (Kerr 1987, O'ssullivan 1988). Cette mutagenèse ne peut être effective que si le transposon est porté par un plasmide (Lam 1985).

Le transfert intra et intergénique des plasmides dans le sol a été démontré entre un donneur introduit et des souches réceptrices (où Pao 25 est le donneur et *Agrobacterium tumefaciens* est le receveur). Ceci permettrait d'avoir une nouvelle source de dissémination de gènes.

Toutefois, dans un environnement stérile le nombre de transconjugants est constant et son niveau est inférieur à la souche réceptrice parentale.

Cela supposerait que certains facteurs interviendraient dans la régulation des niveaux de population dans le sol :

La compétition (intra ou inter-spécifique) et la prédation sont des facteurs limitant la croissance et le nombre de micro-organismes. Pourtant la compétition intra-spécifique est à considérer car elle permettrait d'indiquer si la souche manipulée pourrait survivre plus longtemps que la souche sauvage parentale (Richaume 1992).

Les recombinaisons génétique de DNA ont révolutionnées le biocontrôle en facilitant l'identification des gènes responsables de la suppression (Thomashow et Weller 1993 b) et donc une meilleure compréhension des bases moléculaires du biocontrôle (Thomashow et Weller 1993 a et b). Deux approches sont effectuées d'une part l'augmentation des métabolites et d'autre part le transfert des gènes de biocontrôle à d'autres souches, et donc la construction d'organismes de biocontrôle par introduction de gènes (Kerr 1987).

A- Augmentation de la production des métabolites importants pour le biocontrôle :

Le premier exemple est l'augmentation de la production de Phz par les souches de *Pseudomonas fluorescens* 2-79 et *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 par introduction d'extra-copies de plasmides (Thomashow et Weller 1993 a et b) au locus de biosynthèse (Thomashow et Weller 1993 b) ou de gènes activateurs (Thomashow et Weller 1993 a et b) de la biosynthèse de Phz (Thomashow et Weller 1993 b).

De la même manière, l'introduction du cosmide PME 3090 (Thomashow et Weller 1993 a) portant un fragment de 22Kb du DNA de *Pseudomonas fluorescens* CHAO dans CHAO augmenterait la production de Plt , et par le même protégerait les concombres de l'infection due au *pythium ultimum* avec une efficacité supérieure à la souche parentale (Thomashow et Weller 1993 a et b).

L'introduction d'extra-copies de plasmides portant le locus de biosynthèse de PhL, de *Pseudomonas auréofaciens* Q2-87 dans Q2-87 résulte en l'augmentation de PhL et par conséquent la suppression du « take-all » (Thomashow et Weller 1993 a).

La production d'oomycine A et donc la suppression de *pythium* chez le coton par *Pseudomonas fluorescens* HV37a est augmentée par placement du gène (Thomashow et Weller 1993 a et b) AFV (James et Gutterson 1986) sous le contrôle du promoteur constitutif tac d'E. Coli (Thomashow et Weller 1993 a et b).

B- Transfert des gènes importants pour le biocontrôle à d'autres souches :

Le gène responsable de la synthèse de la chitinase de *serratia marscens* est cloné dans E.coli, et est transféré à une souche de *Pseudomonas fluorescens* qui est une souche de la rhizosphère. Cette souche recombinée protégerait les plantes, des champignons ayant une paroi externe chitineuse et peut être aussi des insectes vivant dans le sol. De même que les gènes d'avirulence, s'ils sont introduits dans une souche de la rhizosphère et que celle-ci est utilisée comme traitement des graines, leur transfert dans des souches pathogènes présentes dans le sol convertirait ces souches pathogènes en souches avirulentes (Kerr 1987).

La mobilisation du locus de biosynthèse de PhL de *Pseudomonas auréofaciens* Q2-87 dans *Pseudomonas fluorescens* 2-79 et 509 7, leur confèrent l'abilité de synthétiser le PhL et par conséquent l'augmentation de l'inhibition de *G.graminis vartritici* et *pythium ultimum* (Vincent et Al 1991, Thomashow et Weller 1993 a et b) *Pseudomonas fluorescens* P3 est faiblement suppressive du « black root rot » alors que le recombinant portant les gènes HCN de CHAO montre une activité de biocontrôle notable (Thomashow et Weller 1993 a).

De plus l'introduction du locus de biosynthèse des Phz de 2-79 résulte en la production de PCA chez 27 souches de *Pseudomonas*, mais seulement quelques unes montrent une suppression notable (Thomashow et Weller 1993 a et b). L'augmentation de la production d'un métabolite important, où le transfert de gènes les déterminants dans une autre souche n'implique pas nécessairement l'activité de biocontrôle, les recombinants doivent subir une sélection (Thomashow et Weller 1993 a).

* Une autre caractéristique est à noter chez les *Pseudomonas*.

C'est leur pouvoir d'amélioration des sols, par métabolisation de certains composés toxiques. Les composés aromatiques chlorés ont été extrêmement utilisés durant les 4 dernières décennies, aussi bien en industrie qu'en agriculture. La plupart de ces composés persistent dans l'environnement (Krockel 1987, Kukor 1989).

Le nettoyage biologique des sites contaminés est connu pour être une bonne solution en termes de coût et de gestion.

L'inoculation des sols avec des micro-organismes spécifique pour la contamination biologique sont obtenus par recombinaisons génétiques (Kröckel 1987).

L'acide 2 méthyl-4-chlorophenoxyacétique et l'acide 2,4- dichlorophenoxyacétique (TFD) sont tous deux dégradés par les bactéries du sol et aquatiques (Kukor 1989).

Les micro-organismes utilisant les hydrocarbures aromatiques chlorés comme seule source de carbone sont difficile à obtenir, par contre certaines bactéries peuvent cométaboliser ces composés et les produits finaux peuvent être métaboliser en CO_2 HCL ou même en H_2O par d'autres bactéries (Kröckel 1987). La bactérie la plus étudiée est *Alcaligene entrophus* JMP134 dont le plasmide pJP4 code les gènes catabolisant le TFD.

Ce plasmide est transféré à *Pseudomonas* sp. PKO1 qui métabolise le TFD en 2-chloromaleoyacétate (CMA) qui lui même est métabolisé par *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida* (Kukor 1989).

MATERIEL

ET

METHODES

31

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL:

I-1 - Appareillage :

- Appareil électrophorétique horizontale .
- Centrifugeuse à 3500 trs/min « Hettich Universal 2s ».
- Hotte stérile « ERLAB »
- Lampe Ultraviolette monochromatique à 254 et 360nm.
« DASAGA HEIDELBERG ».
- Cuve à chromatographie .

I-2 - Souche de bactéries utilisée pour la conjugaison.

- Eschérichia coli Jrs 856 (leu^- , lac^- , $thia^-$, Sm^5 , Uv^5 , Tc^5 , Ap^5 , Km^5 , Nal^5 , Cm^5 , F , SrL , rk^-) nous a été offerte par Dr Koukalova de l'Institut de biophysique de l'Académies Tchèque de Science BRNO, République Tchèque.

I-3 -Souches de champignons utilisées pour le test antifongique .

Fusarium solanii et Fusarium oxysporum , nous ont été offerts par Aissaoui Kamel, qu'il a isolé et identifié à partir des tomates pourris .

I-4 - Produits chimiques et solvants organiques.

- Eau oxygéné.
- Chloroforme.
- Acétate d'éthyle.
- Benzène.
- Méthanol.
- Isopropanol.

- I-5 - Antibiotiques :

Les antibiotiques sont utilisés pour déterminer la résistance des bactéries isolées d'une part et pour le curage d'autre part.

Ampicilline (Farmitalia.Sol.inj) * Oxacilline* Chloromphenicol* Streptomycine * Kanamycine * Bactrim * Céfacidal.

Ciproflaxacine nous à été aimablement fournie par le prof Michel-Briand : laboratoire de bactériologie,virologie et parasitologie Faculté de Médecine et de pharmacie, Besançon - France.

I-6- Sels de Métaux lourds.

- Sulfate de cuivre $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- Chlorure de cadmium $CdCl_2 \cdot 7H_2O$.

I-7- Membranes et Disques:

- Disques O.N.P.G
- Disques oxydase
- Plaques de silice pour C.C.M
- Disques d'antibiotiques.

I-8- Milieux de Culture:

a-milieu à l'acétamide g/l.

KH_2PO_4 13,6 * $-SO_4(NH_4)_2$ 2 . * $-MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 * $Fe \cdot SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0005
Rouge de phénol , - Acétamide 10 g.

Production de NH_3 à partir de l'acétamide en alcalinisant le milieu (changement de couleur) utilisé pour déterminer Pseudomonas aeruginosa.

b-Milieu à l'amidon g/l.

- Milieu Nutritif oxoid 25.
- Agar 13.
- Amidon de riz 10.

Utilisé pour spécifier la possession d'une amylase.

c-Bouillon nutritif g/l.

- Milieu nutritif oxoid 25.

d-Bouillon nutritif à l'extrait de levure (NBY) g/l.

- Milieu nutritif oxoid 25 .
- Extrait de levure 5.

Utilisé pour production de phénazine.

e-Milieu au cétrimide g/l.

- Peptone 20
- sulfate de potassium 10
- chlorure de Mg 3
- phosphate dipotassique 0,3
- Cetrimide(bromure de tetradonium) 0,2
- Acide nalidixique 0,015 * Agar 15.

Milieu sélectif et spécifiques pour les Pseudomonas.

f-Milieu citraté de simmons (Institut Pasteur)

g-Milieu de Falkow g/l

- Extrait de levure 3 .
- Glucose 1.
- Nacl 5.
- Bromocresal pourpre (sol 1,6%) 1ml
- Acide aminé à une Concentration finale de 0,5 % aminé.

Pour déterminer la présence d'une arginine dihydrolase et d'une lysine decarboxylase



h-Milieu à la Gélatine g/l (selon le Bergus manual).

- Infusion de coeur de boeuf.
- Gélatine.

Pour déterminer le pouvoir de Gélatinolyse.

i-Gélose nutritive : g/l

- Milieu nutritif oxoid 25.
- Agar 15.

j-Gélose nutritive à l'extrait de levure g/l.

- Milieu nutritif oxoid 25.
- Extrait de levure 5.
- Agar 15.

k-Gélose nutritive au sucrose: g/l.

- Milieu nutritif oxoid 25.
- Sucrose 5.
- Agar 15.

Pour la production de levure.

l-Gélose V.F. (Viande-Foie) : g/l. (Institut Pasteur).

- Peptone pepsique de viande de boeuf 300.
- Glucose 2.
- Agar 6.

Détermination du type respiratoire.

m-Milieu de Hajna-Kligler : g/l.

- Extrait de viande de boeuf 3.
- Extrait de levures 3.
- Peptone 20.
- Chlorure de Sodium 5.
- Citrate ferrique 0,3 .
- Lactose 10.
- Glucose 1.
- Rouge de phenol 0,05.
- Agar 12.

Pour la mise en évidence de l'attaque des sucres et la production d'H₂S.

n-Milieu Hugh-leifson : g/l.

- Extrait de levures 1.
- Peptone pancréatique caseine 2.
- NaCl 5.
- K₂HPO₄ 0,3.
- Agar 3.
- Bleu de Bromothynol 15ml à 0,2%.

Mise en évidence du métabolisme des sucres.

o-Milieu du king A: g/l. (Institut Pasteur).

- Peptone de Gélatine 20.
- Glycérol 10.
- Sulfate de potassium anhydre 10.
- Chlorure de magnésium anhydre 1,4.
- Agar 15.

Pour la production de pyocyanine (bleu-vert) pyorubine (brun-rose).

p-Milieu de king B: g/l.

- Polypeptone 20.
- Glycérol 10.
- Phosphate bipotassique anhydre 1,5.
- Sulfate de magnésium . 7H₂O 1,5.
- Agar 15.

Pour la production de la pyoverdine (pigment fluorescent).

q-Milieu de LURIA : g/l

- * Tryptone 10 .
- * Extrait de levure 5.
- * Agar 20.
- * NaCl 0,5.
- * Glucose 10ml à 20%.

Test bactericide (production de la bacteriocine).

r-Milieu de Mc Conkey (Institut de Pasteur).

Pour selectionner les Gram negatifs.

s-Milieu MÜLLER - Hinton (Institut Pasteur).

Pour les antibiogrammes.

t-PDA g/l.

- * Pomme de terre 200.
- * Glucose ou saccharose 20.
- * Agar 15.

Pour la culture des champignons et eventuellement pour les tests antifongiques.

I-9. Plantes utilisées pour les tests de pathogénicité.

- * Tabac .
- * Pomme de terre.

I-10- Solutions utilisées pour l'extraction des plasmides:

a- Solution G :

- * Glucose 50 mM (0,9 g/l) .
- * Tris - Hcl pH8 10 mM.
- * EDTA disodique 1mM.

b -Solution de Lyse:

- * NaOH 0,2 N (88 mg/10ml). * SDS 1% (1 mg/ml) . * H2O distillée q.s.q 10 ml.

c - Solution d'acétate de potassium :

- * 4 Volumes d'acétate de potassium 5M. * 1 Volume d'acide acétique 10M (57%).

d - Tampon TE:

- * Tris 10mM . (1,21 mg/ml). * EDTA disodique 1mM (0,372 mg/ml).
- * pH 7,8 ajusté par Hcl 0,1 M .

e - Solution de dépôt :

- * Glycerol 40 % (w/v) (4ml). * Bleu de bromophénol 0,05% 5mg.
- * EDTA disodique 2mM 1ml de la solution 20mM.
- * Tampon tris-acide borique pH8 5ml.

f -Solution d'électrophorèse : (50 fois concentré).

- * Tris-acide acétique 0,04M (24,2 g/100 ml)
- * Acide acétique glacial 4mM. (5,2 g/ 100ml).
- * EDTA disodique pH8 2mM (3,72g/ 100ml).

I-11- Solutions d'élution pour chromatographie:

*** Solution 1:**

- * Benzène 95 ml . * Acide acétique 5 ml .

*** Solution 2:**

- * Toluène 50 ml . * Acétate d'éthyl 40 ml . * Acide formique 10 ml.

I-12- Solution de NaOH à 0,1N pour spectroscoPie U.V.

II-METHODES

II- 1 - Prélèvements.

Plusieurs prélèvements ont été effectués dans différents points d'un champ de pomme de terre au mois de Mai 1993. Chaque échantillon correspond à une zone du pied du plant de pomme de terre, ce dernier en effet divisé en 3 sphères:

- * Sphère (terre adhérente aux racines).
- * Rhizosphère (terre entourant les racines).
- * Terre (terre facilement détachable).

Chaque échantillon est prélevé dans un sac stérile .

II-2- Préparation de l'échantillon:

Arrivés au laboratoire, 50 g de chaque échantillon est mis dans un erlen de 500 ml contenant 500 ml d'eau physiologique stérile (9‰ de NaCl). Les erlens sont alors mis en agitation pendant 30mn, puis laissés sédimentés. Une série de dilution de l'ordre de 10^{-2} est alors effectuée à partir des surnageants de chaque échantillon. Dans une boîte de pétri contenant de la gélose Mc Conkey, 1 ou 0,1 ml de surnageant est déposé et étalé avec un étaloir stérile. Nous opérons de la même façon pour les autres échantillons et les différentes dilutions (Gilardi 1985).

a- Ensemencement:

La gélose Mc Conkey nous permet de sélectionner les bactéries gram- , les Pseudomonas étant lactose- par conséquent incolores.

b- Incubation :

Après l'ensemencement, les boîtes sont incubées dans une étuve à 28°C pendant 20h, puis sélectionner celles comprenant les colonies les mieux isolées.

II-3-Isolément :

A partir de chaque boîte retenue, on prélève au hasard quelques colonies incolores donc Lac⁻ .

II-4A- Identification présumptive des Pseudomonas:

Les colonies isolées sont purifiées sur gélose nutritive. Les caractères morphologique et biochimique sont pris en considération ainsi que la production de pigments sur King A et B .Les colonies gram négatives, Lactose négatives, aérobies stricts, après confirmation de l'oxydase, sont soumises à plusieurs tests pour confirmer leurs identités (Palleroni 1984). et 1992

A1 - Recherche de l'oxydase : (Indophenol oxydase).

On entend sous le terme imprécis « oxydase », la recherche de la phényl-diamine-oxydase qui agissant sur un substrat incolore entraîne la formation d'une semi-quinone, cette substance très instable s'oxyde rapidement en donnant un composé noirâtre.

oxydase

di ou tetramethyl-p-phénylenediamine + α -naphthol $\xrightarrow{\text{oxydase}}$ indophenol bleu.

(Zannoni 1989).

Les colonies lactoses et gram négatives font l'objet du test de l'oxydase. Un disque pour dosage de l'oxydase est inhibé d'eau physiologique et mis en contact avec les bactéries prélevées d'une colonie à identifier. Les bactéries oxydases positives dégradent le substrat sur le disque et donnent une coloration violette foncée après quelques secondes. (Marchall 1982).

A.2. Métabolisme du glucose.

Afin de déterminer si le métabolisme du glucose est oxydatif ou fermentatif, 2 tubes de milieu Hugh-leifson sont inoculés par piqûre centrale à l'aide d'un fil en plastique chargé d'une culture prélevée d'un milieu liquide. L'un des 2 tubes est recouvert d'une couche de vaseline stérile 1 à 1,5 cm, l'autre par contre ne l'est pas. Les 2 tubes sont mis à incuber pendant 24 à 48h à 28°C. Les bactéries dégradant le glucose de manière oxydative provoquent l'acidification lente du milieu dans le tube sans vaseline, or dans le tube vaseliné elles ne doivent pas se développer (Marchall 1982).

A.3 : Capacité respiratoire des bactéries :

Le caractère aérobic strict des bactéries dégradant le glucose de manière oxydative est confirmé sur le gélose viande-foie semi-solide. L'ensemencement se fait par piqûre centrale. Les Pseudomonas étant aérobic-strict ne se développent qu'en surface (Marchall 1982).

A.4 - Production des pigments chez les souches sélectionnées:

Deux milieux permettent l'identification du genre Pseudomonas, par la production de pigments. Le king A permet la production de pyocyanine (pigment bleu), tandis que le king B permet la production de pyoverdine (pigment jaune-vert) ou pyomelanine (pigment rouge). Une suspension bactérienne prise d'un milieu liquide est étalée grâce à une anse sur les deux milieux et mise en incubation pendant 24h à 28°C. Puis laissée sur la paillasse pendant plusieurs jours pour suivre la production de pigments (Marchall 1982).

A.5- Recherche de la catalase :

Une suspension bactérienne est mise en contact avec une goutte d'eau oxygénée. La production de bulles révèle la présence d'une catalase, (Marchall 1982).

La catalase catalyse en effet la réaction :



A.6. Réduction de citrate :

Le principe repose sur le fait que le milieu citraté de Simmons ne comporte que le citrate comme seule source de carbone. Alors seules les bactéries supposées possédant une citrate perméase sont capables de se développer sur ce milieu. Les souches citrates positives alcalinisent le milieu dont la couleur verte vire au bleu (Marchall 1982).

II.4.B. Identification des espèces de Pseudomonas :

B.1- Capacité des souches de se développer à différentes températures(28°,37°,42°C).

Le milieu le plus approprié pour ce test est la gélose à l'extrait de levure. La capacité de croître à 42°C est spécifique pour les souches de Pseudomonas aeruginosa. Celle-ci est absente chez les autres espèces (Gilardi 1985). De plus certaines souches comme Pseudomonas auréofaciens et pseudomonas fluorescens se développent mieux à 28°C qu'à 37°C (Weller 1988).

B.2. Production d'H₂S:

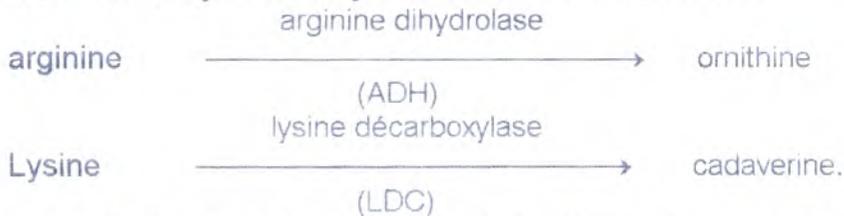
La production d'H₂S est recherché sur milieu Hajna-kligLer. Pseudomonas putréfaciens produit du H₂S en noircissant entièrement le culot du tube (Gilardi 1985). Des tubes contenant 10ml de milieu légèrement incliné, sont ensemencées le long de la pente puis une piqûre centrale. La production d'H₂S se traduit par le noircissement soit au fond soit de la totalité du milieu (Marchall 1982).

B.3. Hydrolyse de la gélatine:

Toutes les souches de Pseudomonas aeruginosa, à la différence de pseudomonas fluorescens et pseudomonas putida, se développent à 42°C et sont douées ou non de capacité de gélatinolyse. Alors que les pseudomons fluorescens sont toutes douées de cette dernière, les putida en sont dépourvues (Gilardi 1985).

B.4. Arginine dihydrolase et lysine de carboxylase:

Ces deux enzymes catalysent les réactions suivantes:



Les activités de ces enzymes sont déterminées sur milieu de Falkow contenant les acides aminés déjà indiqués. On prévoit alors 3 lots notés T (témoin) L (lysine) A (arginine). Après que le milieu soit inoculé, il est incubé pendant 24h à 48h à 28°C.

On verse alors goutte à goutte une solution de tampon pH4 dans chacun des tubes, qui sont agités pendant quelques secondes. Chaque tube doit recevoir le même nombre de gouttes jusqu'au virage acide du tube témoin. Alors sont ajoutées 3 gouttes supplémentaires dans les tubes restants. L'activité est positive quand la couleur du milieu s'alcalinise donc vire vert le violet, et négative donc acide de couleur jaune (Marchall 1982).

B.5. Test LOPAT :

A été proposé par Elliot et al. En 1966, et qui permet de déterminer et regrouper les Ps. fluorescentes phytopathogènes sous deux noms Ps. syringae et Ps. cicchorii, avec une exception pour Ps. syringae qui est oxydase négative (Fahy et Loyd 1983, Zannoni 1989). De plus un autre test est utilisé pour aider l'identification de Ps. cicchorii. C'est la sensibilité des plants de tomates. Notons en plus que Pseudomonas cicchorii est levane négative (Cooksey et Al 1990). LOPAT signifie ce qui suit :

L: Pour production de Levane:

La production de levane est déterminée sur gélose nutritive au sucrose. Cette production se traduit par la présence de colonies blanchâtre et convexes.

O: Pour oxydase : déjà cité.

P: Pour pourriture de la pomme de terre: (Potato rotting capacity).

Sur des tranches de pomme de terre déposées stérilement dans des boîtes de pétri contenant de l'eau physiologique stérile, on dépose quelques gouttes d'une culture en milieu liquide. Après 7 à 14 jours on peut observer une réaction positive se traduisant par la pourriture de la pomme de terre et la production d'une forte odeur.

A: Pour Arginine dihydrolase : déjà cité.

T: Pour hypersensibilité du Tabac: (Tobacco hypersensitivity).

De jeunes plants de tabac de 6 feuilles sont infectées par 10.3^3 cellules/ml. La réaction positive se traduit par la dépigmentation de la feuille autour du point d'infection, puis par la mort du jeune plant. Selon le Bergus Manual)

II-5. Dosage de la Résistance:

5.1- Dosage de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds en milieu liquide:

On détermine habituellement la résistance ou la sensibilité d'une souche aux antibiotiques et aux métaux lourds en estimant leur concentration minimale inhibitrice ou CMI. Cette CMI est déterminée comme la plus petite concentration d'agents antimicrobiens qui inhibent toute croissance visible. (Jones et Al 1985). La méthode utilisée est la microdilution en milieu liquide, qui est la plus quantitative et ne fait intervenir qu'une petite quantité d'antibiotiques et de milieux (Thornsberry et Sherris 1985; Jones 1985). Les microplaques destinées à cet effet comportent 12 colonnes à 8 cupules à fond rond et ce pour bien apprécier le trouble au dépôt bactérien (ainsi on peut doser 8 substances sur une même microplaque). Dans les 8 puits de la première colonne, 150 µl de bouillon nutritif double concentré sont mis à l'aide d'une micropipette.

Les colonnes suivantes sont remplies par 150 μ l. de bouillon nutritif simple concentré. Ensuite 150 μ l de la solution mère de l'antibiotique ou du métal sont ajoutées dans les cupules de la première colonne. Après une légère agitation 150 μ l sont prélevés de ces microcupules, mis dans le 2^{ème} rang sont agités, la même chose est effectuée jusqu'au 11^{ème} rang, là les 150 μ l prélevés sont rejetés. De telle sorte que le 11^{ème} rang soit 2 fois moins concentré que le 10^{ème} et ainsi de suite. Ainsi, le 12^{ème} rang sert de témoin sans substance. En fin, toutes les cupules sont ensemencées par 50 μ l d'une suspension bactérienne fraîche de 10⁵ cellules par ml, de telle sorte qu'on obtienne finalement 200 μ l dans chaque cupule. Notons que toutes ces opérations sont effectuées dans une hôte. Les microplaques sont alors recouvertes, après une légère agitation elles sont incubées à 28° et 37°c pendant la nuit. La lecture est effectuée à l'aide d'un miroir à angle variable (Jones et Al 1985).

5.2. Dosage de la résistance aux antibiotiques en milieu solide:

(antibiogramme ou méthode de diffusion).

La méthode la plus couramment utilisée, et essentiellement en biologie médicale et celle de la diffusion en gélose müller - Hinton. Cette dernière consiste à déposer sur une boîte ensemencée par inondation de la surface, avec 0,1 ml de suspension bactérienne fraîche à 10⁵ cellules par ml, un disque de papier filtre inhibé d'antibiotique. Le dessous se trouve alors inhibé d'eau et l'antibiotique dissout diffuse dans la gélose, selon les lois physiques qui régissent la diffusion des molécules à travers un milieu gélosé. Ainsi les différents antibiotiques diffusent à des taux différents en conséquence de leurs structures. Le résultat est la formation d'un gradient de concentration d'antibiotique dans le milieu entourant le disque. Après une incubation de 18h à 28 et 37°c, les zones d'inhibitions sont alors mesurées en mm (Barry et Thornsberry 1985). Après mesure du diamètre d'inhibition, les souches sont classées en fonction de leur sensibilité selon les recommandations de la société française de microbiologie (Acar et Al 1991).

5.3. Mise en évidence de la β .Lactamase de type OXA:

Nous avons essayé de mettre en évidence la présence de β -Lactamases pour les antibiotiques suivants: Ampicilline, oxacilline, céfalosporine, pour certaines souches que nous avons jugées importantes. Les souches de bactéries ont développées plusieurs types de β - Lactamases dégradant avec une grande spécificité les β -lactamases de différents structures chimique. Nous avons, alors cherché celles qui dégradent plus les oxacillines. A cet effet, nous avons utilisé la méthode iodométrique qualitative (Schoen knecht et Al 1985) que nous avons légèrement modifié.

Les souches bactériennes sont préalablement cultivées dans 5ml de milieu NBY liquide pendant la nuit. La Solution d'iode est préparée par solubilisation de 2,03g d'iode dans un petit volume de KI à 53,2g/l. La solubilisation effectuée, le volume est alors ajusté à 100ml et stocké dans un récipient ne permettant pas le passage de la lumière à température de laboratoire.

L'oxacilline est solubilisé dans un tampon phosphate 0,1M de pH6, à une concentration de 15 μ g/ml et ce juste avant l'expérience.

La solution d'amidon est aussi fraîchement préparée à 1% .

5ml de la suspension bactérienne sont concentrés par centrifugation, et au culôt obtenu 0,1ml de la solution d'antibiotique est ajoutée. Le mélange est alors laissé pendant 30 mn à température ambiante. C'est alors que 2 gouttes d'amidon et 1 goutte d'iode sont ajoutées à l'aide d'une pipette pasteur. Une coloration bleu pourpre se développe instantanément, due à la réaction de l'iode avec l'amidon .

Le mélange est alors agité pendant près d'une minute. Si la β - Lactamase concerné est produite, la décoloration se produit avant 10 mn .

II-6. Elimination des plasmides:

L'élimination des plasmides de la cellule bacterienne est en fait un phénomène qui consiste à cultiver une bactérie en présence d'une substance curante qui devrait empêcher ou ralentir sa replication avec une probabilité supérieure à la perte spontanée. Ce phénomène est plus communément appelé curage. Plusieurs agents physiques ou chimiques peuvent provoquer ce phénomène, et ce en agissant differemment.

Dans notre travail, nous avons utiliser la ciprofloxacine qui est une quinolone fluorée agissant sur l'ADN gyrase . Cette dernière participe normalement à la replication de l'ADN plasmidique. Si cette enzyme n'est pas fonctionnelle, le plasmide ne peut pas se multiplier (Nordmann et Al 1987, Michel Briand et Al 1988, Grayson et Eliopoulos 1990).

La concentration de la ciprofloxacine utilisée pour le curage est la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette dernière est déterminée par des dilutions progressives et qui permet un très faible developpement des bactéries (turbidité juste détectable)

$\cong 5 \cdot 10^7$ bactérie /ml.

10^3 bactéries par ml préalablement cultivées sur NBY sont repiquées. Ce même milieu "NBY " contenant une concentration de ciprofloxacine en progression géométrique à raison de $\frac{1}{2}$. Après incubation pendant 18h à 28°C 0,1 ml ayant poussé sur les C.S.I (concentration sub-inhibitrices) sont ensemencées sur milieu Müller-Hinton et incubées pendant 18h à 28°C. En parallèle, des boites contenant le milieu Müller-Hinton sélectif sont préparées. Après incubation, les boites sur lesquelles les colonies sont bien séparées, sont choisies pour pouvoir être repliquées, et donc sélectionnées. Les colonies qui ont perdu le plasmide, ne possèdent plus la capacité de se developper en présence de l'antibiotique (Michel briand et Al 1986) sont repliquées sur le milieu sélectif pour vérifier leurs croissance. La réplique est effectuée à l'aide d'un tampon velours stérile tendu sur un support cylindrique en verre de diamètre légèrement inférieur à celui du fond de la boite de petri, de telle sorte qu'il puisse s'emboiter. Le velours est appliqué par une légère pression sur les colonies développées.

Sur la gélose Müller-Hinton est ensuite empreintées précisément entre les mêmes repères sur la boite contenant le milieu sélectif , (Voir fig 3).

La gélose Müller-Hinton sélective contient une concentration en antibiotique quatre fois plus basse que CMI de l'antibiotique approprié. Après incubation, les deux boites sont comparées et les colonies manquantes sur le milieu sélectif sont marquées et nommées colonies curées. La perte du plasmide est confirmé par extraction de ce dernier et séparation électrophorétique sur gel d'agarose chez la souche curée et sauvage.

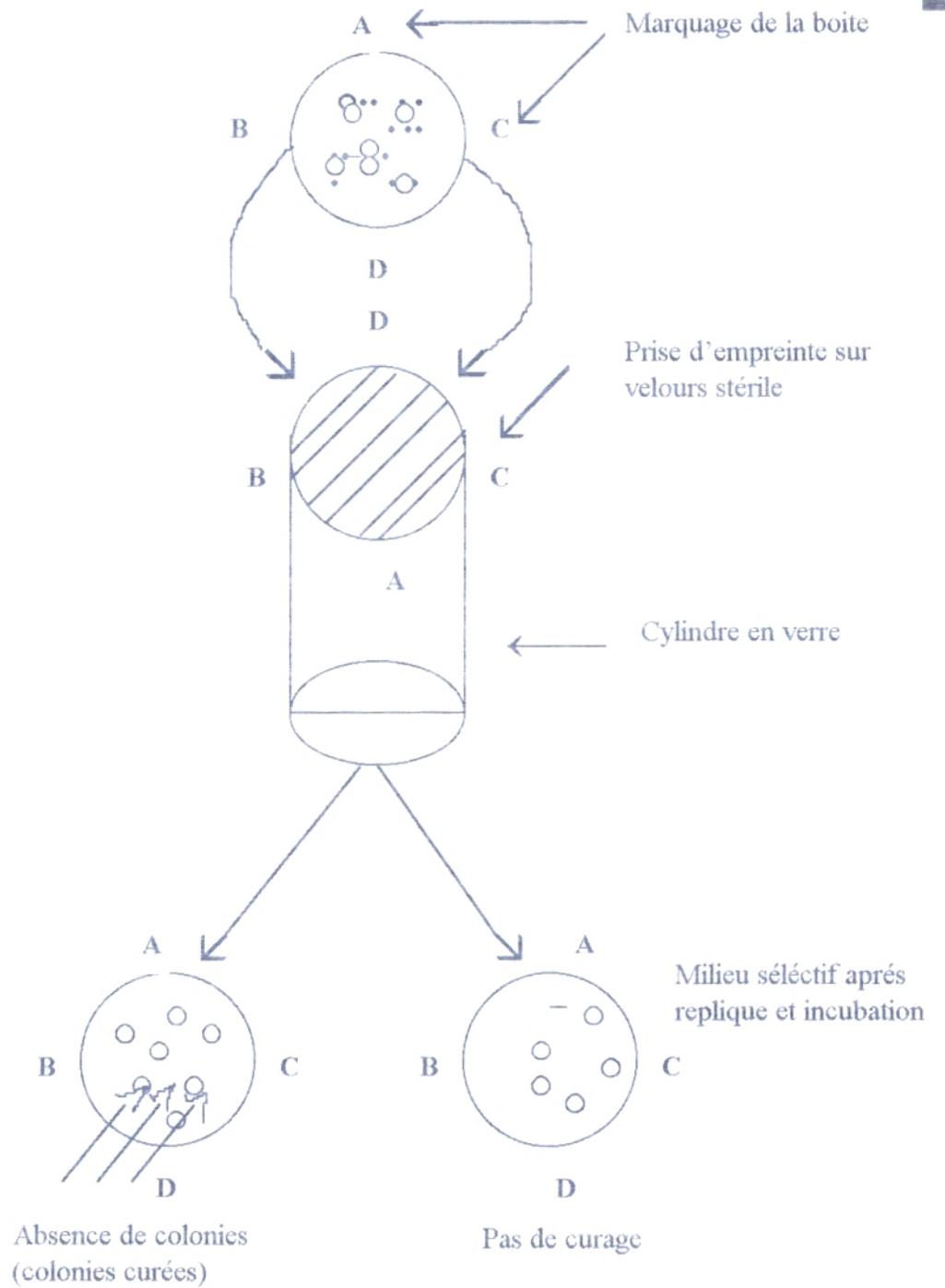


Fig 3 : Methode de replique sur tampon velours

II-7 Transfert de plasmides par conjugaison :

La conjugaison est le transfert d'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Le phénomène est, en effet, couplé avec une réplication de l'ADN. Des deux copies produites, l'une est transférée tandis que l'autre est conservée par la bactérie donneuse. La méthode utilisée est une méthode standard qui consiste à prendre 10ml d'une suspension bactérienne de donneur et de receveur fraîche en phase de croissance logarithmique comportant $5-10^8$ bactérie par ml (Haas et Guenther 1983, O'sullivan et AL 1990). Ces bactéries sont alors centrifugées pendant 10mn à 3000 tr/mn, les culots récupérés sont resuspendus dans 1ml de NaCl à 9‰. 15ul du donneur et 15 ul du receveur ainsi préparés sont étalés sur une surface de 2cm^2 de gélose mülle-Hinton, et incubés à 28°C pendant 18h. C'est alors qu'1 ml de solution d'NaCl à 9‰ est ajoutée dans la boîte de pétri et est mélangé. Enfin, 0,1ml de ce mélange est étalé sur le milieu sélectif préparé auparavant (Haas et Guenther 1983, Vincent et Al 1991).

a - Mise en évidence des transconjugants :

Des subcultures sont effectuées sur des milieux sélectifs qui ne permettent ni la croissance du donneur ni celle du receveur, sauf si ce dernier a acquis des résistances au contact du donneur. Il s'agit en l'occurrence de gélose nutritive additionnée d'antibiotique sélecteurs de métal lourd. Nous constatons en parallèle que ni le donneur ni le receveur ensemencées séparément ne développent sur ces milieux si des transconjugants ont formé des colonies, nous purifions quelques uns puis nous en contrôlons les caractères biochimiques et établissons le test de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (Vincent et Al 1991).

II-8-Extraction de plasmide:

Afin de se persuader de la présence de plasmides chez les souches isolées, on effectue leur extraction. Le principe de la méthode repose sur la lyse de la cellule bactérienne suivie de l'élimination de l'ADN chromosomique et la majorité des protéines qui peuvent empêcher la visualisation de l'ADN plasmidique après électrophorèse sur gel d'agarose (Kado liu 1981, Ish - Horowicz and Burke 1981, Grinsted and Bennett 1988, King 1989) Selon leurs configuration (ccc → circulaire superenroulé, oc → circulaire ouverte ou L → linéaire) et leurs poids moléculaire, les bandes plasmidiques correspondant aux différentes configuration migrent différemment. Les grandes plasmides migrent à proximité mutuelle du point de dépôt, alors que celles correspondants aux différentes configurations des petits plasmides migrent jusqu'au centre du gel loin du point de dépôt.

Plusieurs méthodes ont été utilisées, cependant une seule a été retenue, c'est celle selon Felliciello and Chinalig (1993). L'extraction est effectuée selon les étapes suivantes :

- 1- 10ml de bactéries cultivées pendant la nuit dans du bouillon nutritif sont centrifugées pendant 15mn à 4000tr/mn à 4°C .
- 2- Le culot est ensuite resuspendu dans 250 μl de la solution G froide par le vortex.
- 3- 500 μl de la solution de lyse sont ajoutées et mélangées par renversement du tube 5 fois, puis laissés 5 mn sur la glace.

4- C'est alors que 750 µl de l'acétate de potassium sont ajoutés et mélangés plusieurs fois comme auparavant. Et laissés reposer 10mn.

5 - Centrifugation à 12000tr/mn à 4°C pendant 5mn.

6- 1,4 ml de surnageant est récupéré et auquel 0,7 µl d'isopropanol est ajouté, le surnageant et l'isopropanol sont mélangés par inversion 5 à 7 fois puis centrifugés pendant 5mn à 4°C et à 12000 tf/mn.

7- le surnageant versé, le sédiment est séché pendant 2mn sous vide.

8 - Le sédiment est solubilisé dans 40µl de tampon Tε pendant 30mn.

9 - 25 µl de cette solution sont mélangés avec 5 µl de saccharose à 40% avec du bromophenol bleu.

10 - Electrophorèse sur gel d'agarose : C'est une technique de séparation dont le principe repose sur la séparation de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Les plasmides étant composés d'ADN qui lui est un double polymère d'au moins 10^4 nucléotides chargés négativement sont séparées sous l'influence d'un champ électrique selon leurs poids moléculaire et leur conformation (Felliciello and Chinalig1993)

Préparation du gel d'agarose:

Le gel d'agarose est préparé par solubilisation, à chaud jusqu'à ébullition pendant 3mn, de 0,7 g d'agarose dans 98 ml d'eau distillé ajoutées de 2 ml de tampon ε 50 fois concentré. Le liquide est alors refroidi à 60°C, versé dans un bac requis de telle façon qu'après gélification, le gel aura une épaisseur de 0,5 cm avec des fentes d'un volume de 60 µl. Le bac contenant le gel d'agarose, est déposé dans un bac horizontal plus grand, pourvu de 2 compartiments pour électrolyte comportant des électrodes en platine.

Un litre de tampon ε est utilisé comme électrolyte, et est versé dans les deux compartiments du bac en immergeant le gel de 1 à 2mm. L'électrophorèse est alors effectuée pendant 14h à 1,5 v/cm de gel. Et ce après dépôt des échantillons préparés plus haut. Une fois l'électrophorèse terminée, on arrive à l'étape de coloration. La plaque de gel est glissée attentivement dans une solution de 0,5 mg/ml de bromure d'ethidium pendant 20mn. Le gel est rincé à l'eau courante et observé à 254nm l'ADN plasmidique se présente sous forme de bandes de fluorescence rouges, étroites bien individualisées. La plaque de gel est enfin photographiée à l'aide d'un filtre orange sur pellicule noire et blanche de 100 ASA avec un diaphragme 8 pendant 12 sec (Grinsted et Bennett 88).

II-9 Mise en évidence de la production de phénazines et bacteriocine respectivement par la souche ps .auréofaciens et ps.auréofaciens traitée à la cyprofloxacin (curée).

A - tests des propriétés biologiques des Pseudomonas :

a -suppression fongique selon Vincent et Al 1991:

Le test a pour objet de mettre en évidence l'activité suppressive d'une souche de Pseudomonas isolée et identifiée par rapport à 2 champignons phytopathogènes. Sur des boîtes de pétri contenant du PDA auquel le dextrose est substitué par le glucose, 3ml de bactéries fraîchement poussées sont étalées sur un front et incubés pendant la nuit à 28°C . Lorsque les souches des bactéries ont bien poussés sur l'autre front un disque fongique de 8 mm de diamètre provenant d'une culture de 7 jours, est déposé . Les boîtes sont alors incubées à température du laboratoire pendant une semaine. La distance entre la colonie et le mycélium est mesurée. Cette distance est comparée par rapport à un témoin qui ne contient que le champignon (fig 4a) .

b - suppression fongique selon James et Gutterson 1986.

Contrairement au précédent, ce test fait intervenir les extraits de bactéries (substances actives). (Ces extraits sont préparés comme il est décrit plus loin). Une plaque dotée de grands puits, d'un volume de 1,5ml chacun est requise. Dans chaque puit 800ml de PDA chaud semi solide y est versée. En parallèle plusieurs dilutions de l'extrait bacterien sont effectuées. C'est alors qu'à chaque puit d'une température de 55°, 200µl de l'extrait est ajoutée et mélangée soigneusement par un fil. Lorsque le PDA est gélifié un petit disque du champignon est déposé au centre. La plaque est alors recouverte et incubée pendant 48h à 28°C.

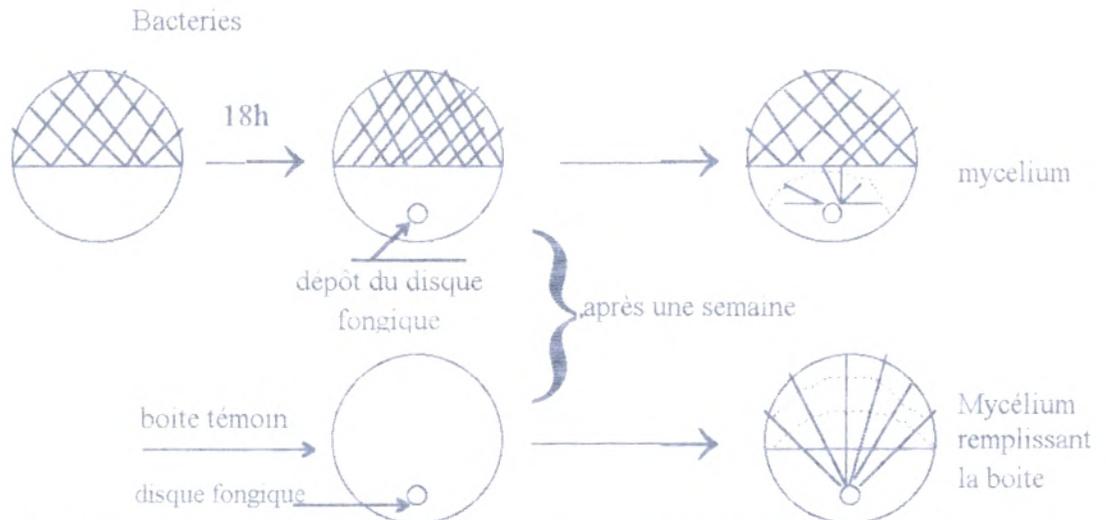


fig.-4a: schéma de la suppression fongique selon Vincent et Al, 1991.

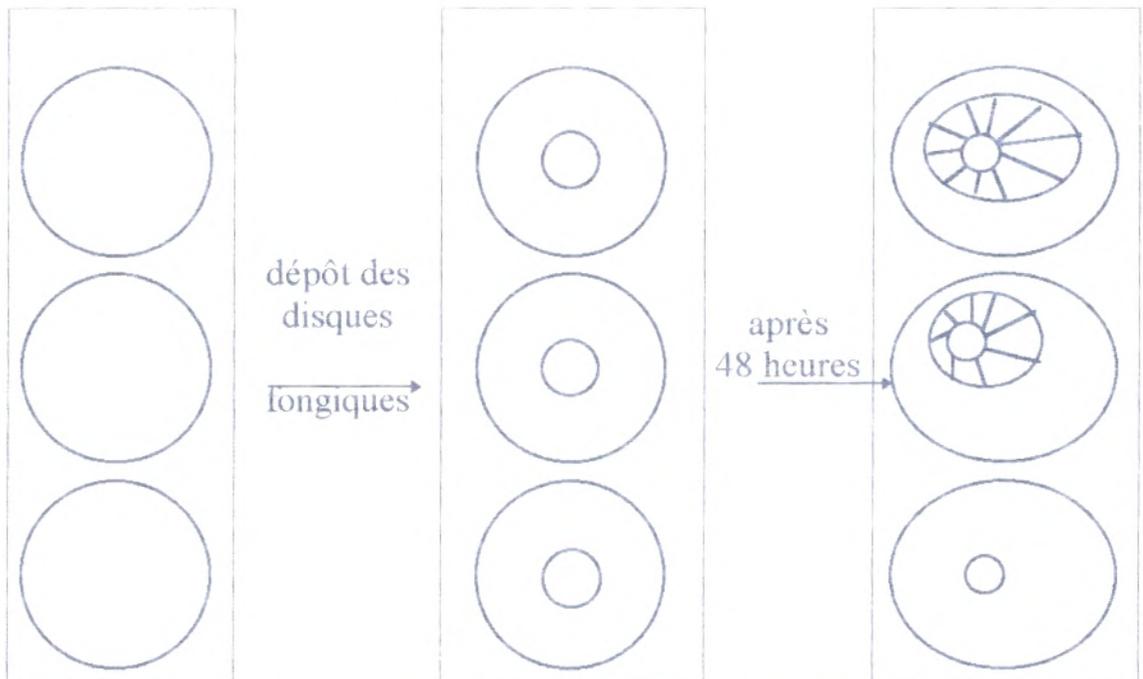


fig.-4b : schéma de la suppression fongique selon James et Gutterson 1986.

Une unité de l'activité antifongique est définie comme la quantité de matériel qui inhibe totalement la croissance fongique. En plus de l'extrait brut, ce test aussi effectué en utilisant séparément les différentes fractions de l'extrait séparées par C.C.M (fig 4b).

C- Production de bacteriocine : (Selon Degroot 1991), la première étape de ce test consiste à cultiver 5µl de bactéries sur LURIA gélosé pendant la nuit. Les cellules alors fraîchement poussées sont irradiées pendant 15s avec des rayons u.v à 254nm, et sont remises en incubation pendant 7h. Après incubation les bactéries sont tuées par les vapeurs de chloroforme, puis elles sont recouvertes par une souche présumée sensible et incubée pendant 24h à 28°C. La production de bacteriocine se manifeste par la présence d'une zone d'inhibition autour de la zone traitée. Un autre test inspiré de ce dernier et mettant en évidence la production de bacteriocine a été effectué. Les extraits de bactéries sont déposés sur des disques en papier préalablement stérilisés.

Ces derniers sont déposés dans des boîtes contenant du Müller-Hinton gélosé, sont incubés pendant la nuit à 4°C pour permettre la diffusion de l'extrait dans le milieu.

La souche bactérienne à tester est alors étalée par immersion, et la boîte incubée pendant la nuit à 28°C. La production d'une zone d'inhibition révèle la sensibilité de la souche à l'extrait.

B-Tests de pathogénicité pour la pomme de terre:

Toutes les souches isolées sont préalablement cultivées pendant 48h à 28°C dans le milieu king B liquide.

a - Test de pathogénicité sur la pomme de terre Potato-Rotting (cité plus haut).

b - Test de pathogénicité sur le plant de pomme de terre et le tubercule.

De petites quantités de bactéries (1 à 2 ml à raison de 10⁸ cellule /ml) sont injectées dans les tiges de petits plants de pomme de terre d'une part et à des tubercules de pomme de terre prêts à être plantés d'autre part.

L'évolution de cette injection est alors suivie pendant plusieurs semaines par rapport à un témoin auquel on a injecté de l'eau stérile. Notons que la terre utilisée pour la culture de pomme de terre est stérilisée à l'autoclave pendant 1h à 120°C et ceci durant 3 jours successifs (ou autoclave le 1^{er} jour on retire, on laisse refroidir, et on refait la même opération le 2^{ème} et le 3^{ème} jour) (Chao et Al 1986).

C-Extraction des Phénazines:

a- Dans 2 Erlen de 2l contenant 250ml de NBY (Bouillon nutritif à l'extrait de levure) chacun, la souche 2 et 2 traitée (curée) à la ciprofloxacine sont cultivées (Thomashow 1988 et 1992a) avec une concentration finale en glucose de 2% (Thomashow 1988) pendant 5 jours à 28°C (James et Gutterson 1986, Thomashow 1988, Vincent et Al 1991, Thomashow 1992a). Les cultures sont alors acidifiées à pH2 avec du Hcl concentré (Thomashow 1992a).

L'extraction proprement dite est alors effectuée 2 fois avec le même volume de solvant (Benzène pour la souche n° 2 sauvage et l'acétate d'éthyl pour la souche n°2 traitée), et ce par agitation du mélange solvant + culture bactérienne pendant 15 mn.

Le mélange est laissé pour sédimenter. Le surnageant composé de solvant + extrait est récupéré. Une deuxième extraction est alors effectuée. Afin d'éliminer les gouttes d'eau contenues dans le mélange solvant / extrait, le mélange est filtré à travers du sulfate de sodium anhydre.

Le solvant + extrait est alors vaporisé à 55° (James et Gutterson 1986) et le substrat sec resuspendu dans de l'acétate d'éthyl (Vincent et Al 1991).

L'extrait de la souche n° 2 sauvage est récupéré dans 7,5ml d'acétate d'éthyl, alors que celui de la souche traitée est récupéré dans 1,5ml.

b - Fractionnement de l'extrait brut :

l'extrait préalablement préparé est fractionné par chromatographie en couche mince de silice avec un solvant d'élution benzène / acide acétique (95:5) (Thomashow 1992a) pour la souche sauvage, et toluène / acétate d'éthyl / acide formique (5:4:1) pour la souche traitée (curée).

Après chromatographie les plaques de silice sont d'abord séchées et les tâches obtenues observées sous u.v à 254 nm, sont marquées, leur silice est grattée et sont extraites 5 fois par le méthanol (James et Gutterson 1986).

L'extrait de chaque tâche est alors concentré jusqu'à sec puis dissous dans 0,6 ml de chloroforme chacun. Les extraits sont alors testés pour leur activité biologiques (antifongiques pour les extraits de la souche sauvage et bactéricides pour les extraits de la souche traitée), et sont soumis à une spectroscopie U.V à balayage (Thomashow 1992a).

Résultats.

I : Isolement et identification des souches de Pseudomonas de la rhizosphère de la pomme de terre:

A partir de 3 échantillons, 15 souches de pseudomonas fluorescentes ont été isolées au hasard sur des pieds de pomme de terre, pris dans un champ situé à proximité de Oued-Bousselam, au mois de mai de l'année 1993. Le-dit Oued situé au sud de la ville de Sétif.

Les souches sont sélectionnées sur milieu au cetrimide et ce après une présélection des souches lactose négatives sur le milieu de Mc.Conkey.

Afin de les identifier, une série de tests est alors effectuée. Toutes les souches possèdent plusieurs caractères communs: gram-négatives ; lactose-négatives ; oxydase-positives ; catalase-positives ; aérobie-stricts, dégradant le glucose de manière oxydative et produisent des pigments sur King A ou B. Les souches sont identifiées à base de certaines caractéristiques spécifiques (tableau II).l'espèce aeruginosa est la seule capable de se développer à 42°C, alors que toutes les autres pseudomonas ne le peuvent pas. De plus, aeruginosa est l'unique producteur de pyocyanine (pigment hydrosoluble bleu-foncé non fluorescent) sur King A.

Pseudomonas fluorescens hydrolyse la gélatine tandis que pseudomonas Putida ne l'hydrolyse pas. Les 2 espèces produisent la pyoverdine qui est un pigment fluorescent jaune-verdâtre à 254 nm sur King B. Nos souches sont déterminées comme fluorescentes suivant ces critères.

La souche 2 identifiée comme pseudomonas auréofaciens produit un pigment orange visible à l'œil nu , et sous U.V. à 254 nm; le pigment orange est entouré par un halo noirâtre (Thomashow 1988 , Thomashow 1992 a). Quand aux deux souches phyto pathogènes 10 et 12, elles infectent les jeunes plants de tabac, pourrissent la pomme de terre, n'hydrolysent ni l'arginine ni la gélatine et ne produisent pas de levane (Cooksey et Al 1989). Leur identification comme pseudomonas cicchori est le fait que celles-ci sont les seules pseudomonas fluorescentes phytopathogènes qui sont oxydase-positives (Fahy and Loyd 1983, Zannoni 1989). La souche 15 est identifiée comme pseudomonas putréfaciens car c'est la seule qui produit du H₂S dans le milieu Hajna-Kligler dont le culot devient entièrement noir (Gilardi 1985), tandis que les autres souches n'en produisent pas.

II : Evaluation de la résistance des souches de pseudomonas aux antibiotiques et aux métaux lourds:

La résistance des souches de pseudomonas aux antibiotiques et aux métaux lourds a été évaluée par la méthode de microdilution en milieu liquide [microplaque] (Thornsberry et Al 1985); et ce pour des raisons économiques du milieu, de temps et spécialement d'antibiotiques. La résistance la plus communément retrouvée est celle aux β -lactamines (ampicilline, oxacilline, céfalosporine) , aux amino-glycosides (kanamycine et streptomycine) et enfin au cadmium (tableau III).

Les CMI (concentrations minimales inhibitrices) des antibiotiques et métaux lourds utilisées montrent un très haut niveau de résistance.

- Pour 33% des souches la CMI de l'ampicilline est > 1000 μ g/ml.
- Pour 100% des souches la CMI de l'oxacilline est > 250 μ g/ml.
- Pour 20% des souches la CMI de la kanamycine est > 1000 μ g/ml.

Tableau II:

Représentant les plus importants tests utilisés pour l'identification des souches.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Température 28°C	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	++
Température 37°C	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
Température 42°C	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-
Gélatinolyse	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
ADH*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
LDC*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Production de levane	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Pourriture de la p.d.t.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Sensibilité du tabac.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Production Pyocianine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production Pyoverdine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production Pyomélanine	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type respiratoire aérobie-strict	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Métabolisme du glucose oxydatif.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pseudomonas →	/fluorescens	auréofaciens	aeruginosa	aeruginosa	/fluorescens	/fluorescens	/fluorescens	aeruginosa	/fluorescens	cicchori	Putida	cicchori	/fluorescens	aeruginosa	Putrifaciens

(*) ADH: arginine dihydrolase.
LDC: Lysine décarboxylase.
P.d.t : pomme de terre.

Tableau III:
CMI en µg/ml.

Souche de pseudo-monas	A N T I B I O T I Q U E S									Métaux lourds		
	β- lactamines			Amino glycosides		Chloramphénicols	Tétracyclines	Sulfamides	Quinolones			
	amp	céf	oxa	kan	str	chl	tet	bac	cip	Cd	Cu	Hg
1	31,25	312,5	>250	>500	156,25	52,44	1,95	1,95	12,5	>2000	125	<0,97
2	15,62	19,53	>250	250	9,76	4,88	0,97	3,9	8	>2000	250	<0,97
3	>1000	312,5	>250	500	156,25	2,44	7,81	7,81	16	1000	7,81	<0,97
4	>1000	312,5	>250	250	312,5	9,76	3,9	3,9	25	>2000	15,625	<0,97
5	250	312,5	>250	250	312,5	2,44	7,81	62,5	nd	nd	nd	nd
6	250	312,5	>250	500	312,5	4,88	3,9	3,9	56	1000	15,625	<0,97
7	250	625	>250	500	312,5	4,88	7,81	31,25	56	1000	15,625	<0,97
8	250	312,5	>250	500	156,25	4,88	3,9	62,5	25	250	15,625	<0,97
9	125	312,5	>250	250	312,5	2,44	3,9	0,97	nd	nd	nd	nd
10	250	312,5	>250	500	312,5	2,44	3,9	1,95	50	1000	31,25	<0,97
11	>1000	312,5	>250	500	312,5	4,88	1,95	0,97	8	>2000	125	<0,97
12	125	312,5	>250	>1000	156,25	2,44	1,95	1,95	50	500	7,81	<0,97
13	>1000	156,25	>250	>1000	312,5	4,88	0,97	3,9	nd	nd	nd	nd
14	500	312,5	>250	>1000	625	4,88	0,97	7,81	nd	nd	nd	nd
15	>1000	156,25	>250	250	625	4,88	3,9	3,9	nd	nd	nd	nd
JRS	1,95	1,95	nd	<1,95	<1,95	nd	nd	nd	<3,9	nd	nd	nd

amp : ampicilline
 bac : bactrim
 Cd : cadmium
 céf : céfalosporine
 chl : chloramphénicol
 cip : ciprofloxacine
 Cu : cuivre
 Hg : mercure

kan : kanamycine
 nd : non déterminé
 oxa : oxacilline
 str : streptomycine
 tet : tétracycline
 CMI : concentration minimale inhibitrice
 µg / ml : microgramme par millilitre
 JRS : E.-Coli JRS

Sur les 9 antibiotiques testés appartenant à 6 groupes chimiques différents, les antibiotiques obtenus contiennent 2 à 5 caractères de résistance (tableau IV).

Ces résultats montrent que les souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre sont multirésistantes aux antibiotiques de différents groupes, sont aussi résistantes au cadmium; par contre elles sont très sensibles au mercure (fig. 5).

On a aussi observé une nette corrélation entre la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez les souches chez lesquelles elles ont été déterminées. De plus, les souches 1, 2 et 3 possèdent la β -lactamase oxa, et l'activité de cette dernière est légèrement affectée après le curage (tableau V).

III: Extraction et visualisation de l'ADN plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose.

Il est actuellement acquis que la résistance bactérienne aux agents antibactériens est déterminée dans la majorité des cas par des gènes portés par une molécule circulaire extrachromosomique plus communément connue sous le terme de plasmide (Contrepois 1984, Nordmann et Al 1987, Brisson et Al 1988). Et vu que les souches isolées sont résistantes à plusieurs antibiotiques à des concentrations élevées, nous avons supposé que celles-ci en portaient.

L'extraction et la visualisation ont été effectuées chez 2 souches isolées (11 et 14) et comparées avec des plasmides de souches déterminées: E.-Coli 2180 portant le plasmide col E1, PAO 303 portant le plasmide RP1, E.-Coli R et D et enfin chez Staphylococcus lactis. Cette extraction a été effectuée avec la collaboration de M^r Djeradi, selon la méthode de Grinsted qui diffère de celle qu'on a citée plus haut par deux choses:

- ① Les cellules au début sont suspendues dans l'eau au lieu de la solution G.
- ② L'isopropanol est remplacé par l'éthanol.

Cette étude nous a révélé la présence d'une ou de deux bandes d'ADN plasmidiques après séparation électrophorétique des lysats (fig. 6).

Les grands plasmides migrent à proximité du point de dépôt, alors que les petits plasmides migrent loin du point du dépôt. Si un plasmide se trouve en différentes configurations dues au processus d'extraction, ceux-ci peuvent être distingués sur gel d'agarose à 0,7 %. C'est la conformation ccc (circulaire super enroulée) qui migre le plus rapidement, puis oc (circulaire ouverte) ensuite la forme linéaire.

Les grands plasmides PAO 303 (pseudomonas aeruginosa portant le plasmide RP1) et E.-Coli D (Escherischia Coli D) se trouvent à la même distance du point de départ, ils ont donc approximativement le même poids moléculaire.

Les plasmides de pseudomonas 14 (isolée dans ce travail) et E.-Coli R sont situés à une distance approximative et donc sont de poids moléculaire légèrement inférieur à celui des précédentes.

La souche 11 (isolée dans ce travail) possède deux bandes; il pourrait s'agir du même plasmide avec deux conformations différentes. La bande la plus éloignée du point de dépôt est la configuration surenroulée (ccc). Le plasmide Col E1 de E.-Coli 2180 se situe très loin; il s'agit en fait d'un petit plasmide dont la masse moléculaire est de $3,6 \cdot 10^6$ daltons. Tandis que le plasmide de staphylococcus lactis se situe au centre du gel.

Tableau IV:

Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques et aux métaux lourds.

	amp	céf	oxa	kan	str	chl	tet	bac	cip
1	R	R	R	R	R	S	S	S	S
2	R	I	R	R	I	S	S	I	S
3	R	R	R	R	R	S	I	I	R
4	R	R	R	R	R	I	S	I	R
5	R	R	R	R	R	S	I	R	nd
6	R	R	R	R	R	S	S	I	R
7	R	R	R	R	R	S	I	R	R
8	R	R	R	R	R	S	S	R	R
9	R	R	R	R	R	S	S	S	nd
10	R	R	R	R	R	S	S	S	R
11	R	R	R	R	R	S	S	S	S
12	R	R	R	R	R	S	S	S	R
13	R	R	R	R	R	S	S	I	nd
14	R	R	R	R	R	S	S	I	nd
15	R	R	R	R	R	S	S	I	nd
JRS	S	S	nd	S	S	nd	nd	nd	S

Cd	Cu	Hg
R	R	S
R	R	S
R	S	S
R	S	S
nd	nd	nd
R	S	S
R	S	S
R	S	S
nd	nd	nd
R	S	S
R	R	S
R	S	S
nd	nd	nd

I : intermédiaire .
 nd: non déterminé .
 R: résistant .
 S: sensible .
 JRS: E. Coli JRS.

Tableau V:Présence de la β -lactamase oxa chez les souches sauvages [originelles] et curées [traitées].

	β -lactamase oxa	
	Souches sauvages	Souches curées
1	+	±
2	+	±
3	+	+ =
4	±	±
5	nd	nd
6	±	±
7	±	±
8	±	±
9	nd	nd
10	±	±
11	±	±
12	±	±
13	nd	nd
14	nd	nd
15	nd	nd
JRS	-	nd

nd: non déterminé
 + : présence de β -lactamase oxa (activité positive)
 ± : faible activité
 + = : activité encore plus faible
 JRS: E.-Coli JRS

Nombre de souches résistantes
aux antibiotiques

Pourcentage des souches
résistantes aux métaux lourds

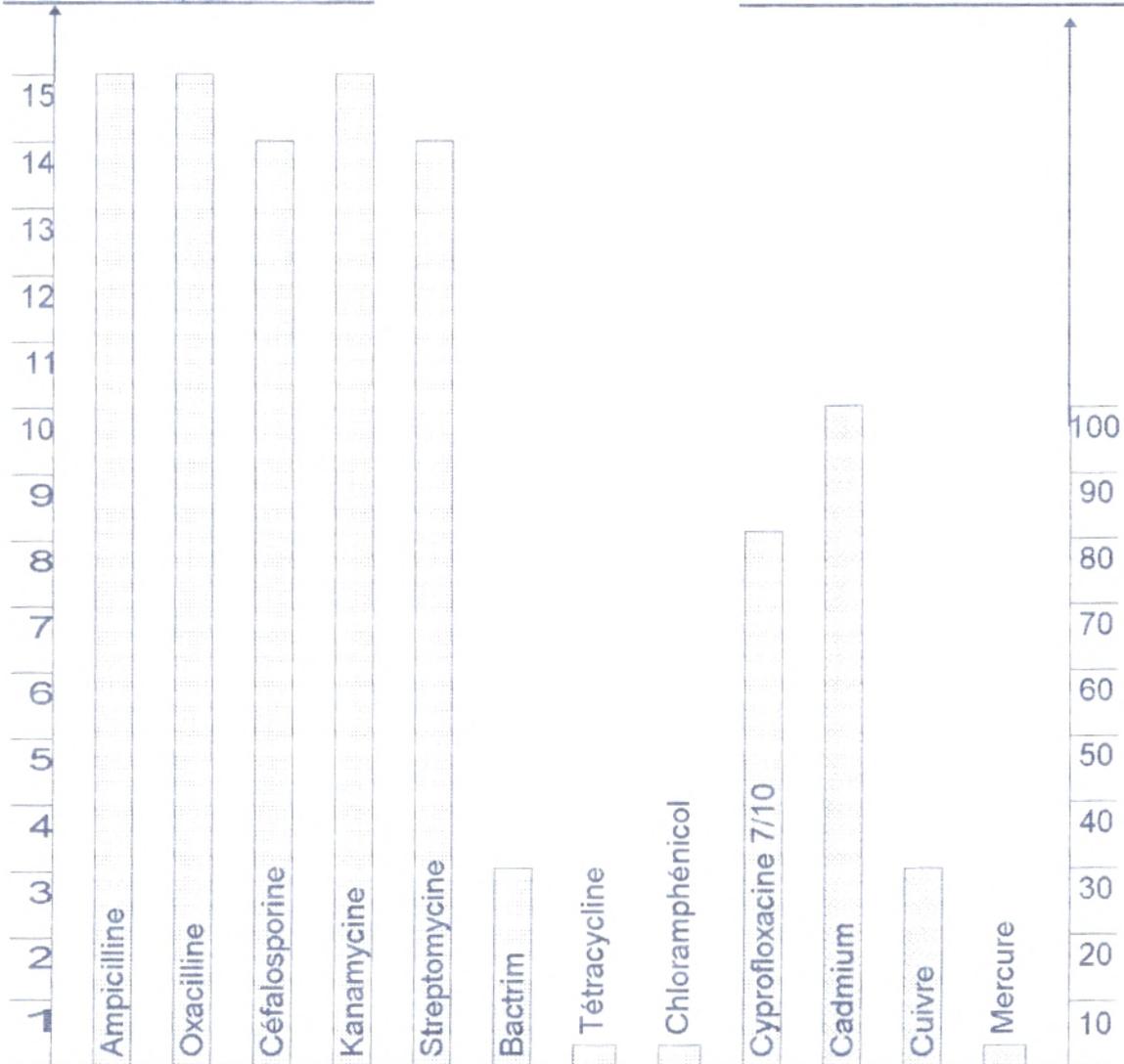
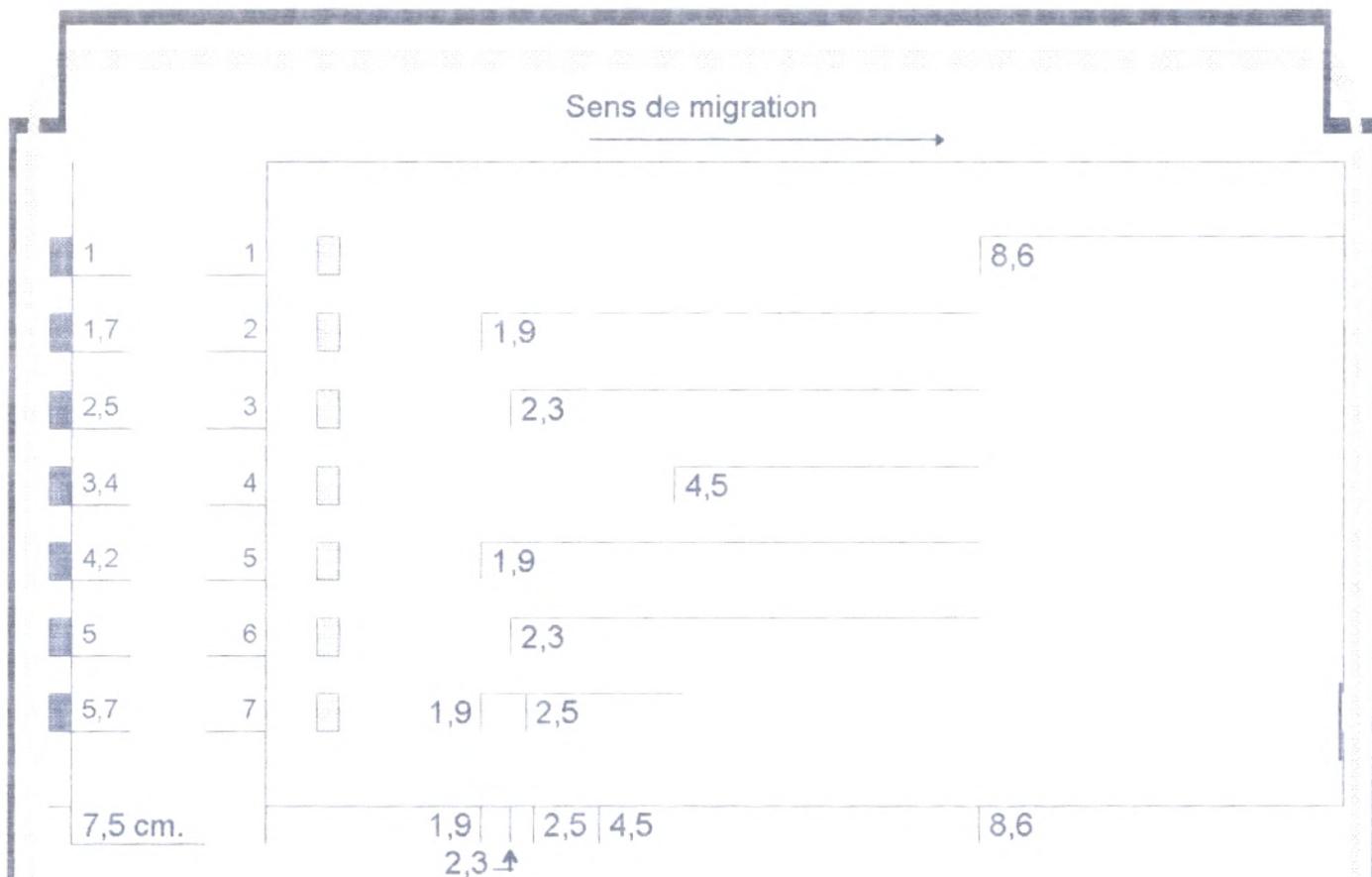


Figure 5 - distribution des souches en fonction de la résistance aux différents antibiotiques et métaux lourds étudiés



■ = 0,5 cm.

- 1- Escherischia Coli 2180 (plasmide col E1)
- 2- Escherischia Coli D.
- 3- Escherischia Coli R.
- 4- Staphylococcus lactis.
- 5- PAO 303 . RP1. (Pseudomona aeruginosa avec plasmide RP1).
- 6- Pseudomona 14.
- 7- Pseudomona 11.

Fig.-6: Schéma de l'électrophoréogramme du DNA plasmidique extrait par la méthode de Grinsted et Bennett.

IV: Elimination des plasmides (curage):

Plusieurs souches portant chacune plusieurs caractères de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds ont été choisies pour le curage .

Ces souches diffèrent entre-elles non seulement par les caractères de résistance aux antibiotiques et métaux lourds, mais aussi par la production de pigments diffusibles dans le milieu.

Nous supposons que ces souches possèdent des plasmides qui pourraient porter des gènes codants pour les protéines de résistance, et donc en les éliminant (les plasmides) par curage on éliminerait cette résistance.

Dans la population des colonies issues des cellules traitées, on a cherché celles qui ont perdu la résistance à une ou plusieurs substances.

L'efficacité du curage est alors évaluée sur le milieu Müller-Hinton sélectif contenant un agent auquel la ou les souches ont été hautement résistantes. Sa concentration doit permettre l'inhibition de la souche curée tout en permettant la croissance de la souche non curée. L'agent choisi pour cet effet est le cadmium à la concentration de 125 µg/ml.

Pour réaliser ce processus de curage, il a été nécessaire de trouver d'abord la concentration optimale de ciprofloxacine (agent curant). L'efficacité du curage a varié entre 10 et 100 % (voir tableau VI). Cette efficacité est déterminée par comparaison chez les souches sauvages et traitées d'une part pour la production de pigments et d'autre part de leurs résistances aux antibiotiques et métaux lourds.

IV.1 : Modification du spectre de résistance des souches curées.

Parmi les colonies qui ne peuvent pas se développer sur le milieu sélectif après traitement par la ciprofloxacine, une ou deux colonies est sélectionnée parmi chaque souche, et leurs phénotypes de résistance ont été étudiés par microdilution. L'étude des phénotypes est portée seulement sur quelques antibiotiques et un seul métal, et ce vu leur importance (tableau VII).

IV.2 : Effet du curage sur la présence du DNA plasmidique.

Le traitement des souches par la ciprofloxacine, n'a pas éliminé totalement la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. Pour cette raison nous avons cherché à comparer la présence des plasmides chez les souches sauvages et curées (traitées), et mettre en évidence -grâce à cet effet- le changement au niveau du DNA plasmidique accompagné par le changement de résistance.

3 souches ont été choisies pour cette comparaison: après isolement et électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique, on a constaté que la souche 3 curée (traitée) a perdu son plasmide (fig.-7)

IV.3 : Effet du curage sur les propriétés des bactéries.

Nous avons constaté que certaines souches isolées du milieu sélectif après traitement par la ciprofloxacine ont perdu la capacité de produire des pigments, notamment les souches 2 et 10 et par conséquent, l'effet de ces pigments sur les autres bactéries et les champignons (voir chapitre production de phénazine).

Tableau VI:

Efficacité du curage par la ciprofloxacine.

Souches de pseudomonas	Concentration de ciprofloxacine en µg	pourcentage de curage
pseudomonas 2	0,9375	100
pseudomonas 3	1,2	60
pseudomonas 4	1,875	40
pseudomonas 6	1,875	100
pseudomonas 7	1,875	100
pseudomonas 8	1,875	10
pseudomonas 10	4,05	100
pseudomonas 11	1,2	100

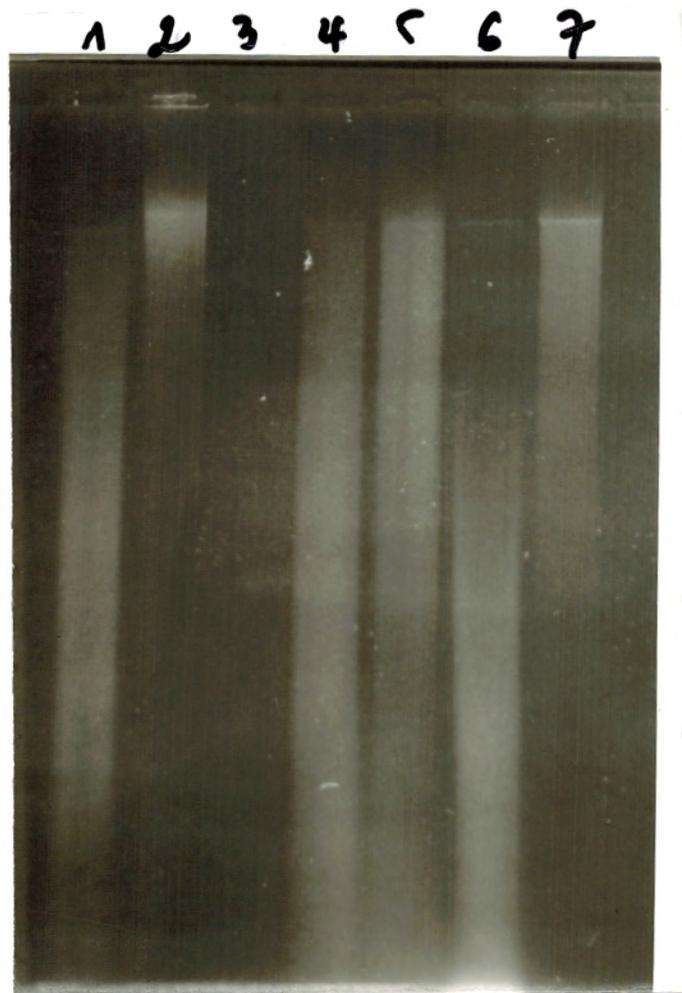


Fig.- 7: électrophoréogramme des souches sauvages, curées (traitées à la ciprofloxacine) et d'un transconjugant.

- 1- souche 2.
- 2- souche 2 traitée (curée).
- 3- souche 3 traitée (curée).
- 4- souche 3.
- 5- transconjugant 2 x E.-Coli JRS.
- 6- souche 10 traitée (curée).
- 7- souche 10.

Tableau VII.

(CMI en µg/ml de quelques antibiotiques et du cadmium es souches curées)

Souche curée	amp	céf	kan	oxa	str	Cd
Ps. 2	< 0,97	< 2,44	1,95	0,488	< 2,44	< 1,95
Ps. 3	< 0,97	9,76	0,97	62,5	< 2,44	31,25
Ps. 4	< 0,97	156,25	0,97	31,25	< 2,44	31,25
Ps. 6	< 0,97	< 2,44	1,95	< 0,122	< 2,44	< 1,95
Ps. 7	1,95	< 2,44	0,97	0,97	4,88	31,25
Ps. 8	1,95	156,25	3,9	31,25	4,88	31,25
Ps. 10	125	312,5	0,97	31,25	< 2,44	62,5
Ps. 11	15,62	78,125	< 0,97	0,488	< 2,44	15,625

Ps. : Pseudomonas
 amp : ampicilline
 céf : céfalosporine
 kan : kanamycine
 oxa : oxacilline
 str : streptomycine
 Cd : cadmium
 CMI: concentration minimale inhibitrice.

IV.4 : Antibiogramme des souches curées.

Pour nous persuader de la perte de résistance déjà constatée par la méthode de microdilution, nous avons effectué un antibiogramme, et nous n'en avons retenu que celui concernant la souche 2 sauvage et traitée, (vu son importance) pour 5 antibiotiques (ampicilline, céfazoline, oxacilline, oxytétracycline et kanamycine). On a constaté que la souche 2 traitée est sensible à l'ampicilline, à la céfazoline, à l'oxacilline, à l'oxytétracycline, et intermédiaire pour la kanamycine (fig.-8).

V : Transfert des plasmides par conjugaison:

① Par extraction des plasmides et leur séparation par électrophorèse sur gel d'agarose, nous avons montré que les souches de pseudomonas isolées de la pomme de terre comportent des plasmides qui peuvent porter des déterminants génétiques codant pour la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, ainsi que pour les propriétés antimicrobiennes des souches.

Pour savoir si ces déterminants peuvent être transférés à des souches de la même espèce ou à des souches d'espèce différentes, la conjugaison a donc été effectuée. Les souches utilisées dans la conjugaison comme donneuses et receveuses ont été choisies de telle manière que les transconjugants puissent être détectés sans ambiguïté. Dans notre travail, nous avons essayé de transférer le plasmide de la souche 2 sur les souches 3, 10 et E.-Coli JRS. Le meilleur marqueur pour cette conjugaison est la sensibilité à un ou plusieurs antibiotiques ou un métal lourd.

- ♦ La souche 2 est sensible à la streptomycine (inhibée par 80 µg/ml) et à l'ampicilline (inhibée par 100 µg/ml).
- ♦ La souche 3 est sensible au cuivre (inhibée par 100 µg/ml).
- ♦ La souche 10 est sensible au cuivre (inhibée par 100 µg/ml).
- ♦ La souche E.-Coli JRS est sensible à l'oxacilline (inhibée par 250 µg/ml).

Le phénomène le plus marquant de cette conjugaison reste le transfert du pigment orange de la souche 2 vers les souches receveuses même à E.-Coli JRS. Les résultats montrent que le caractère responsable de la synthèse du pigment orange a été transféré avec une grande fréquence au cours de la conjugaison.

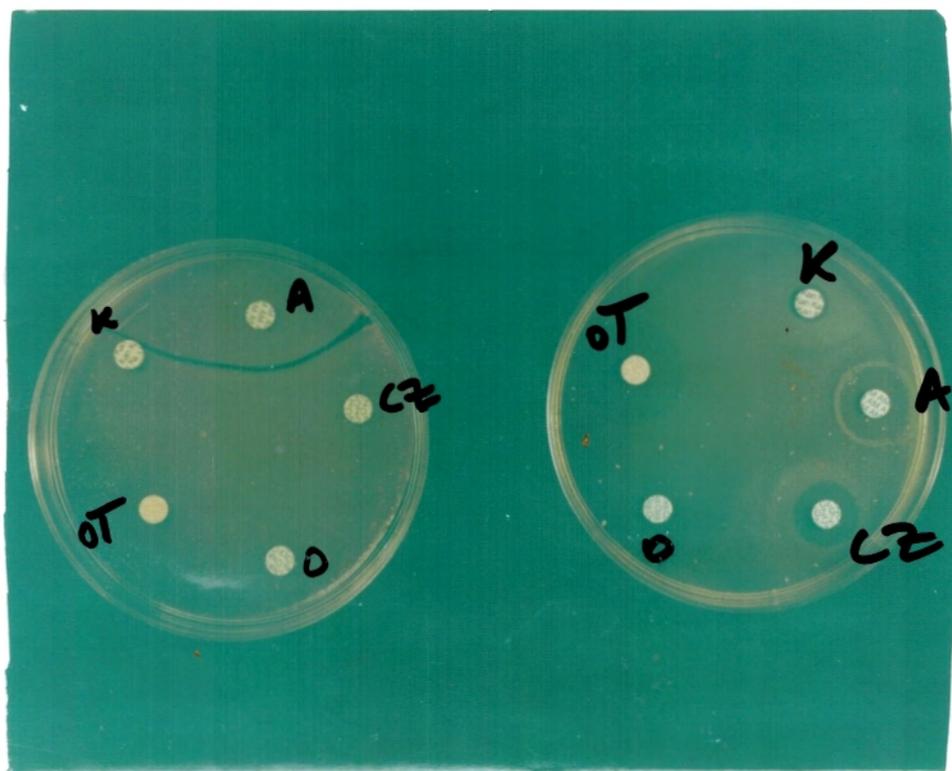


Fig.- 8: antibiogramme de souche 2 sauvage (à gauche),
et 2 traitée (curée) (à droite).

A- ampicilline.
K- kanamycine.
O- oxacilline.
OT- oxytétracycline.
CZ- céphazoline.

Pour confirmer que les transconjugants pigmentés issus de la conjugaison de pseudomonas 2 et E.-Coli JRS sont des souches d'E.-Coli et non des souches de pseudomonas, deux tests ont été effectués: la capacité d'hydrolyser le lactose et le test à l'oxydase. Ces tests ont montré que ce sont les souches d'E.-Coli qui ont acquis le pigment orange à partir des pseudomonas, elles sont oxydase négatives et lactose positives. De plus, le milieu sélectif choisi pour détecter les transconjugants contient 500 µg/ml d'oxacilline pour éliminer la souche E.-Coli JRS receveuse et 400 µg/ml de streptomycine pour éliminer la souche 2 donneuse. → Donc, seulement le transconjugant peut y croître. Ce transconjugant est résistant à l'oxacilline comme la souche 2 et à la streptomycine comme la souche E.-Coli JRS.

② Visualisation des plasmides chez les transconjugants:

La visualisation des plasmides des transconjugants sur gel d'agarose et leur comparaison avec celle des souches parentales a montré que la souche 2 conjuguée avec la souche E.-Coli JRS (ne possédant pas de plasmide) a donné naissance à un transconjugant noté 5 et possédant un plasmide qui migre un peu plus lentement que le plasmide de la souche originale 2 (fig.-7).

VI : Effet des souches de pseudomonas sur la croissance de la pomme de terre:

Parmi les 15 souches isolées, 2 souches se sont révélées être pathogènes pour la pomme de terre: il s'agit des souches 10 et 12 (fig.-9a) identifiées toutes les deux comme étant pseudomonas cicchori.

La pathogénicité de ces souches se traduit par la pourriture de la pomme de terre accompagnée d'une forte odeur désagréable si des tranches de celle-ci ont été infectées par ces souches. Par contre, si des pieds de pomme de terre sont infectés, leur croissance ralentie considérablement d'abord, puis ils meurent par la suite (fig.-9b). Si l'infection est effectuée avant la plantation, alors les tubercules ne germent pas du tout.

Alors que les souches 10 et 12 inhibent et tuent les plants et les tubercules, les souches 1, 2, 3, 4, 5, 9, et 15 stimulent par contre leur croissance. Le traitement des tubercules par ces souches avant leur plantation, et plus précisément par la souche 2, a montré une nette accélération de la germination par rapport au témoin. Cette accélération varie d'une semaine (souches 5 et 9) à 10 jours (souche 2) en avance sur le témoin. Le reste des souches n'a aucun effet sur la germination des tubercules et qui est [la germination] notamment normale par rapport au témoin. Ce sont donc des souches saprophytes sans aucun effet sur la germination et la croissance des plants.

VII: Mise en évidence de la production de phénazine et de bactériocine respectivement par la souche pseudomonas auréofaciens sauvage et la souche pseudomonas auréofaciens traitée à la ciprofloxacine:

Au cours des différentes manipulations (tests antifongiques et de cytotoxicité), un fait surprenant est apparu; la souche 2 identifiée comme pseudomonas auréofaciens et produisant un pigment orange semble effectuer une activité suppressive vis-à-vis de 2 champignons phytopathogènes (F. Oxysporum ; F. Solani). Cette suppression est beaucoup plus importante vis-à-vis de fusarium oxysporum que celle vis-à-vis de fusarium solani. La souche 2 qui d'habitude ne produit pas de pigment sur PDA (avec comme sucre le glucose), en produit en présence du champignon mais le plus sur la ligne la séparant du champignon après 7 jours d'incubation. Alors que dans la boîte de contrôle où le mycélium du champignon inoculé sous forme d'un disque de 3 mm de diamètre sur un côté de la boîte couvre la surface entière de la gélose ; là où les différentes souches de pseudomonas sont inoculées sur

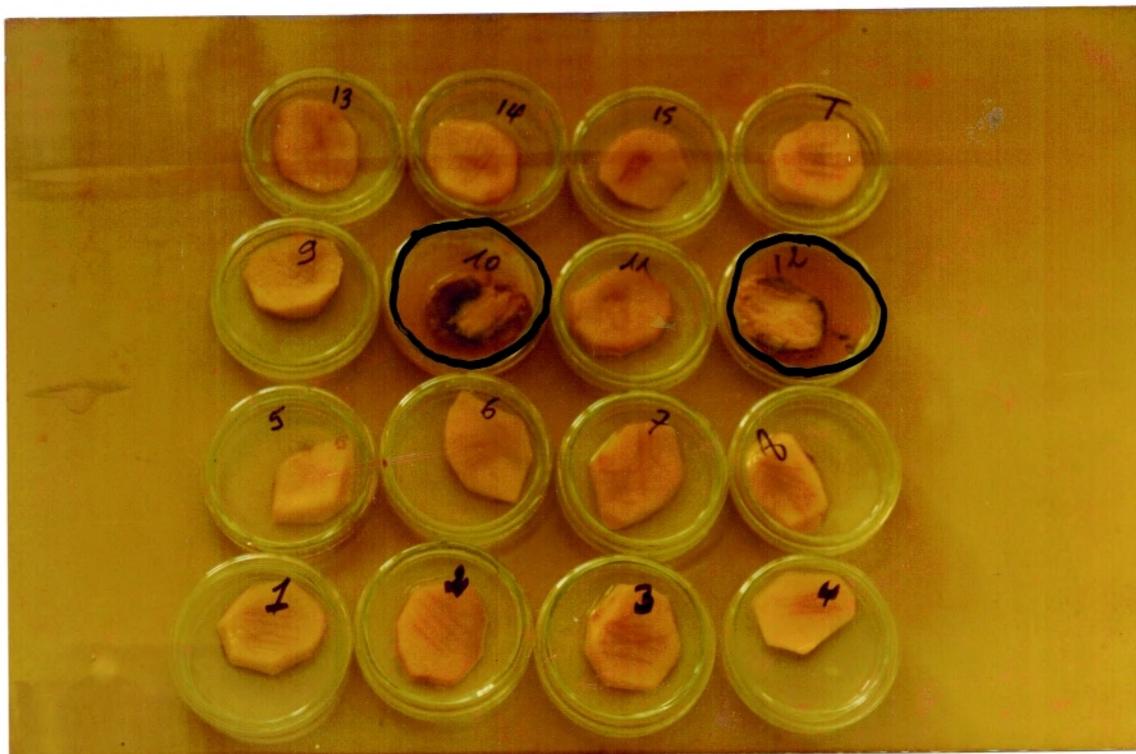


Fig.- 9a : infection des tranches de pomme de terre par les souches isolées 10 et 12.

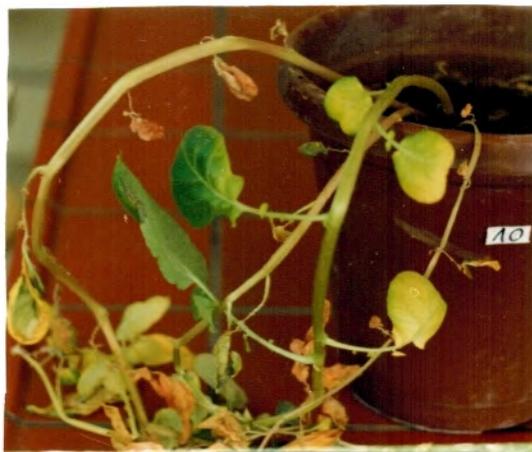


Fig.-9b : infection des pieds de pomme de terre par les souches 10 et 12.
En haut : plant témoin.
En bas : à gauche : plant traité avec la souche 12.
À droite : plant traité avec la souche 10.

l'autre moitié de la boîte, il y a un ralentissement de la croissance de mycélium. Ce ralentissement est beaucoup plus important sur les boîtes inoculées par *Pseudomonas auréofaciens* (souche 2). Dans ce cas, le mycélium s'est développé très peu, uniquement autour du disque inoculé. Ce sont par contre les bactéries qui prolifèrent et dépassent la ligne de séparation. Dans tous les autres cas, le mycélium des deux champignons a dépassé la ligne séparant la partie inoculée par le champignon et celle inoculée par les bactéries (fig.-10).

Pour détecter la substance responsable de l'activité antifongique de cette souche 2, nous avons essayé de l'extraire et de tester son effet sur la croissance des champignons. Différentes quantités de l'extrait brut de la souche 2 ont été mélangées avec 1,5 ml de PDA stérile à 45 °C dans des cupules de 12 mm de diamètre (fig.-11). après solidification du PDA les disques de champignons de 3mm de diamètre y sont déposés. Après deux jours d'incubation, on a pu constater la mort du mycélium inoculé sur le PDA comportant 100 µl de l'extrait, et l'inhibition totale du développement sur PDA contenant 80 µl de l'extrait (tableau VIII). Une inhibition importante par rapport au témoin est observable même sur PDA contenant uniquement 10µl de l'extrait. De plus, les 2 *Fusarium* sont inhibés de la même manière.

Par séparation chromatographique, l'extrait de *Pseudomonas auréofaciens* (souche 2) est fractionné en 8 taches. Ces taches sont différentes aussi bien par leur couleur, leur position par rapport au point de départ, que par leur effet suppressif vis-à-vis des *Fusarium* (tableau Xa).

Parmi les 8 composantes produites par le fractionnement de l'extrait de la souche *Pseudomonas auréofaciens* (souche 2) sauvage, trois sont actives et sont supposées être de nature phénazinique (tableau IX).

□ La plus importante est la composante correspondant à la tache n° 7 et de couleur jaune, qui devient noire sous U.V. (rayonnement ultraviolet du spectre de la lumière) avec un RF (rapport frontal) de 0,20 dans le système chromatographique.

□ La seconde moins importante que la précédente correspondant à la 8^{ème} tache, de couleur orange aussi, bien sous U.V. qu'à l'œil nu, et avec un RF de 0,30.

□ Et enfin, celle de plus faible effet, correspondant à la 2^{ème} tache de couleur marron-clair avec une fluorescence orange et un RF de 0,08.

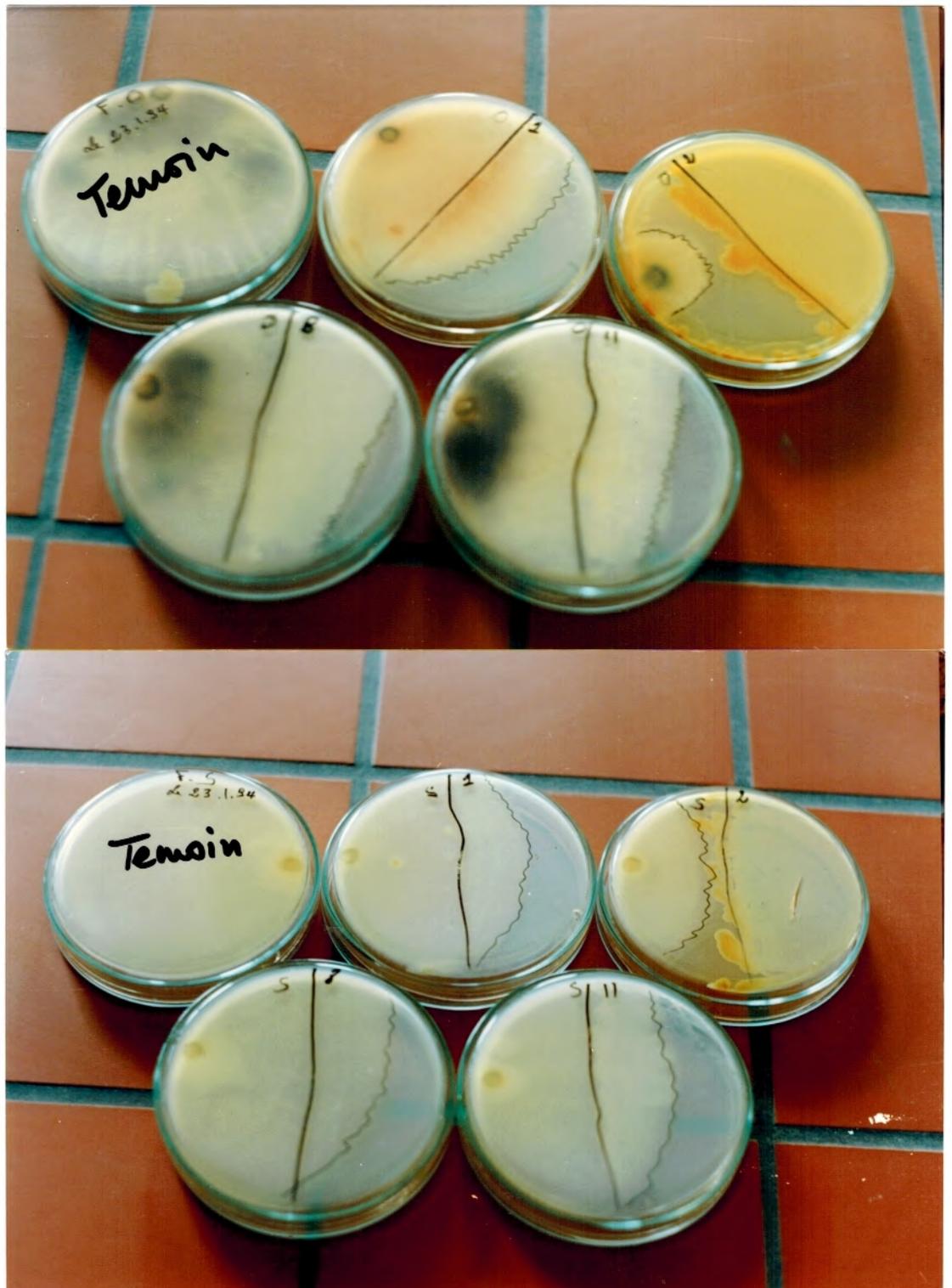


Fig.-10 : Suppression des champignons par *Pseudomonas auréofaciens* [souche 2].
 En haut avec *Fusarium oxysporum*
 En bas avec *Fusarium solani*.
 1, 2, 8 et 11 souches de *Pseudomonas*.
 FO et O : *Fusarium oxysporum*.
 FS et S : *Fusarium solani*.

	témoin	extrait brut	tache 2	tache 7	tache 8
Fusarium solani					
Fusarium oxysporum					



- ♦ Diamètre du puits : 12 mm.
- ♦ Diamètre du mycélium inoculé : 3 mm.
- ♦ Dans chaque puits 100µl d'extrait sont mélangés avec PDA.
 - 1 µl d'extrait brut correspond à $66 \cdot 10^5$ cellules.
 - 1 µl d'extrait tache 2 correspond à $33 \cdot 10^5$ cellules
 - tache 7 correspond à $33 \cdot 10^5$ cellules
 - tache 8 correspond à $33 \cdot 10^5$ cellules

Fig.-11 : Schéma du test de détection de l'activité antifongique de l'extrait brut de la culture de Pseudomonas auréofaciens [souche 2] ainsi que ses fractions séparées par CCM.

Tableau VIII.

Effet de l'extrait brut de la culture de Pseudomonas auréofaciens [souche 2] sur la croissance de Fusarium oxysporum et Fusarium solani.

↓ Quantité de l'extrait (µl)	Diamètre du mycélium (en millimètre)	
	Fusarium oxysporum	Fusarium solani
0	12	12
10	6	6
20	5	5
40	nd	5
60	4	5
80	3	3
100	absence de mycélium	

} mycélium dense

1 µl d'extrait correspond à : $66 \cdot 10^5$ cellules.
nd : non déterminé.

Tableau IX.

Effet antifongique des extraits des taches séparées par CCM de l'extrait brut de la culture de *Pseudomonas auréofaciens* (souche 2).

Extrait	Témoin	tache 2	tache 7	tache 8
Echantillon en μl	0	100	100	100
Diamètre du champignon en mm.				
<i>Fusarium solani</i>	12	9	4	8
<i>Fusarium oxysporum</i>	12	8	7	8

- 1 μl de l'extrait de tache correspond à $33 \cdot 10^5$ cellules.
- Diamètre du puits : 12 mm.
- Diamètre du mycélium inoculé 3 mm.



Pour se persuader que c'est le pigment orange de *Pseudomonas auréofaciens* [souche 2] qui est responsable de l'inhibition des champignons sur PDA, la souche déficiente (souche 2 traitée à la ciprofloxacine) est analysée.

Alors que le fractionnement de l'extrait orange de la souche sauvage donne naissance à huit composantes (taches) dont trois sont douées d'une activité antifongique, celui de la souche traitée (déficiente en pigment orange) donne naissance à six composantes (taches) dont trois sont douées d'une activité bactéricide vis-à-vis de deux bactéries phytopathogènes (10 et 12 citées plus haut), plus un composé protéique décelé sur le point de dépôt du chromatogramme (tableau X-b).

Tableau X.
Caractéristiques des fractions d'extraits séparées par CCM .

Tableau X-a: Souche sauvage [souche 2] *Pseudomonas auréofaciens*.

Tache	Distance de point de dépôt (en cm.)	Coloration observée à l'œil nu	Fluorescence à 366 nm.	Effet anti fongique FS FO
1	0,2	marron	jaune claire	
2	0,4	orange claire	rose	+
3	0,9	marron claire	bleue	
4	1,6	jaune	verte	
5	2	rose	bleue	
6	2,5	marron claire	jaune	
7	2,9	jaune	noire	+
8	3,1	jaune orange	orange	+

FS: *Fusarium solani*.

FO: *Fusarium oxysporum*.

♦ l'extrait a été séparé dans le mélange chromatographique benzène/acide acétique (95|5).

Tableau X-b: Souche traitée de *Pseudomonas auréofaciens*.
(Souche 2 traitée à la ciprofloxacine).

Tache	Distance de point de dépôt (en cm.)	Coloration observée à l'œil nu	Fluorescence à 366 nm.	Effet bactéricide (souches 10 et 12)
1	dépôt	orange	marron orange	+
2	0,7	rouge	rouge	+
3	2,8	bleue	bleue	
4	4,9	bleu jaune	bleu jaune	+
5	5,7	incolore	bleue fluorescent (queues)	
6	7,4	rose	rose	

♦ La tache 1 est de nature protéique (après révélation à la ninidrine).

♦ Souches 10 et 12 : souches isolées phytopathogènes.

♦ L'extrait a été séparé dans le mélange chromatographique: toluène/acétate d'éthyl/acide formique (5|4|1).

Donc, contrairement au pigment orange antifongique, la souche traitée possède une activité inhibitrice de deux bactéries phytopathogènes (10 et 12 fig.-12); ce sont en fait les taches 1, 2 et 4 qui sont à l'origine de cette inhibition. Et c'est semble-t-il la tache 1 qui est la plus active (tableau XI).

Tableau XI.

Effet antibactérien de l'extrait brut de la culture de *Pseudomonas auréofaciens* (souche 2) traitée à la ciprofloxacine, ainsi que ses fractions actives.

Extrait	témoin	extrait brut	tache 1	tache 2	tache 4
Echantillon en μl	0	150	150	100	150
Diamètre de la zone d'inhibition en mm.					
Souche 10	0	17	12	8	8
souche 12	0	13	9	nd	9,5

- Diamètre du disque imbibé d'extrait 7 mm.
- Nd : non déterminé.
- 1 μl d'extrait correspond à :

- extrait brut : $3 \cdot 10^7$ cellules.
- Tache 1 : 10^7 cellules.
- Tache 2 : 10^7 cellules.
- Tache 4 : 10^7 cellules.

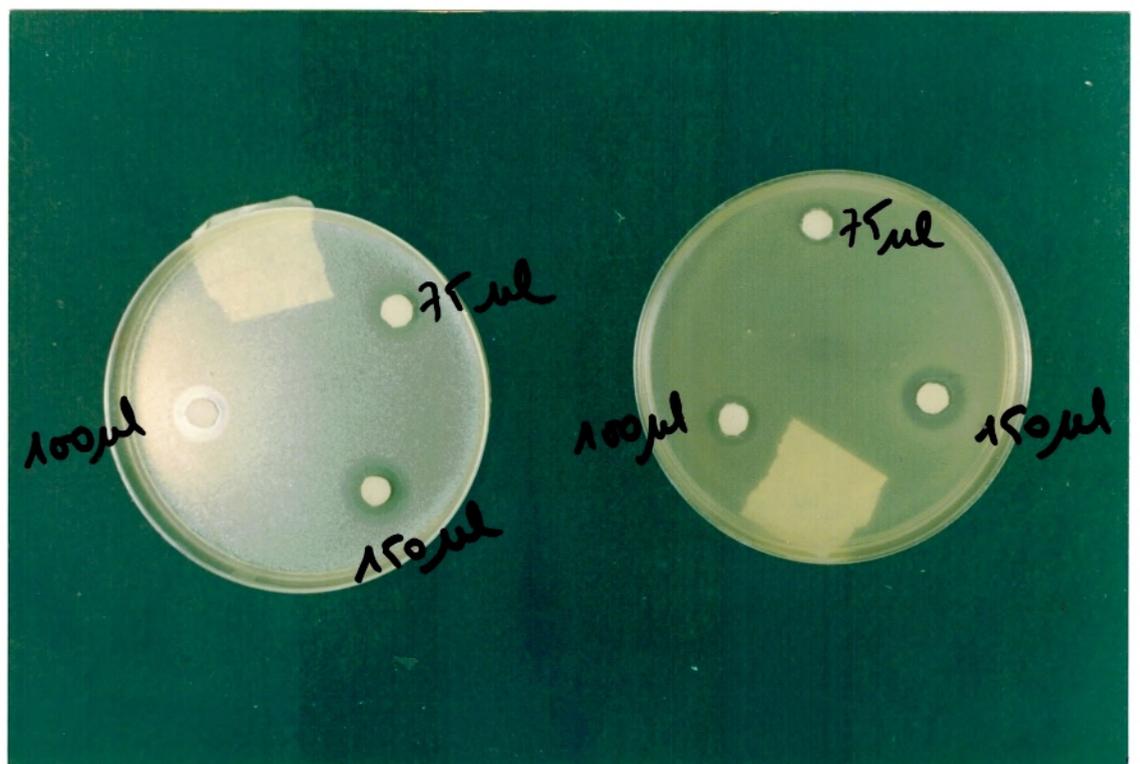


Fig.-12 : Activité inhibitrice de l'extrait brut de *Pseudomonas auréofaciens* (souche 2) traitée à la ciprofloxacine vis-à-vis de 2 souches pathogènes.
- Diamètre du disque en papier imbibé d'extrait 6mm.
- A droite souche 12.
- A gauche souche 10.

Pour mieux élucider ce résultat (activité bactéricide), nous avons effectué un test complémentaire pour nous persuader que la souche sauvage possédait bien cette activité bactéricide, mais que celle-ci est masquée par la production de substances antifongiques. Nous avons effectué le test basé sur la production de bactériocine selon De Groot. Ce test montre que la souche 2 possède effectivement une activité bactéricide contre un bon nombre de bactéries et spécifiquement contre les deux souches phytopathogènes. Mais cette activité est beaucoup plus importante sur milieu L.U.R.I.A. (tableau XII).

Tableau XII.

(Production de bactériocine par la souche 2 : *Pseudomonas auréofaciens*)

Souches inhibées	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	LWP2	LWVRA
Diamètre de la zone d'inhibition sur milieu LURIA	5	7	nd	16	9	5	6	25	nd	2	nd	12	3	10
Diamètre de la zone d'inhibition sur milieu king B	4	0,5	3	0,5	1	nd	nd	2	2	nd	1	2	0,5	nd

nd: non déterminé.

- ◆ le diamètre est mesuré en mm.
- ◆ 3, 5, 15 : souches isolées.
- ◆ LWP2 et LWVRA : E.-Coli LWP2 et E.-Coli LWVRA.

VIII: Spectres d'absorption des substances actives produites par la souche 2 (*Pseudomonas auréofaciens*).

Nous avons effectué une spectroscopie U.V. à balayage (de 200 à 550 nm) afin de pouvoir déterminer les spectres de deux composantes correspondant aux taches 7 et 8 de l'extrait de la souche 2.

Les composantes sont diluées d'une part dans du NaOH 0,1N et d'autre part dans de l'eau distillée. Les spectres ont été comparés avec ceux trouvés dans le travail de Pierson et Thomashow (1992). A la différence des spectres de trois dérivés des antibiotiques de nature phénazinique caractérisés dans le travail de ces auteurs, nos substances avaient une faible absorbance dans la région ultraviolette (fig.-13).

Fig.-13 : Spectre d'absorption des taches 7 et 8 actives de l'extrait de la souche 2 (*Pseudomonas auréofaciens*)

200 μm

350

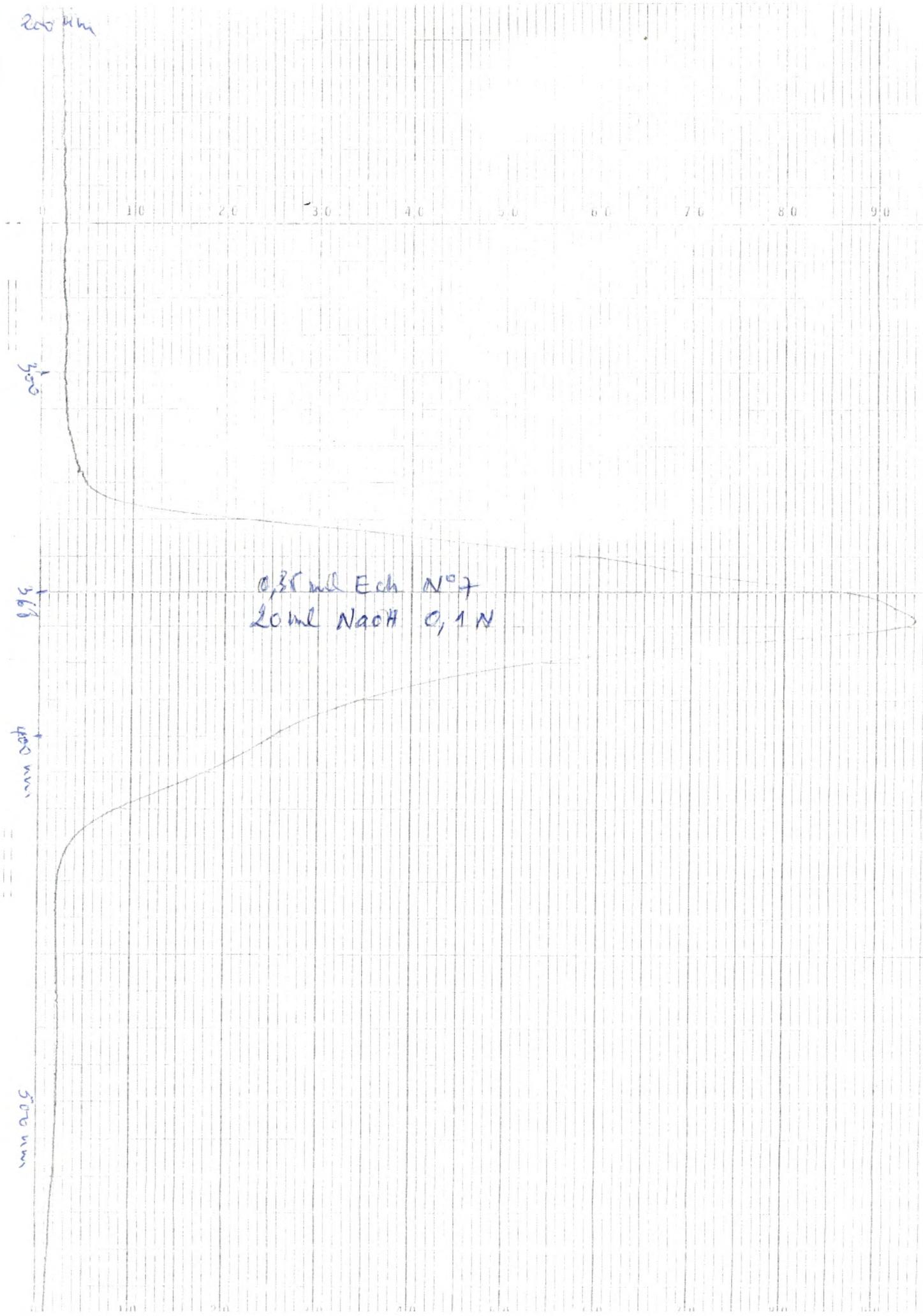
368

400

500 μm

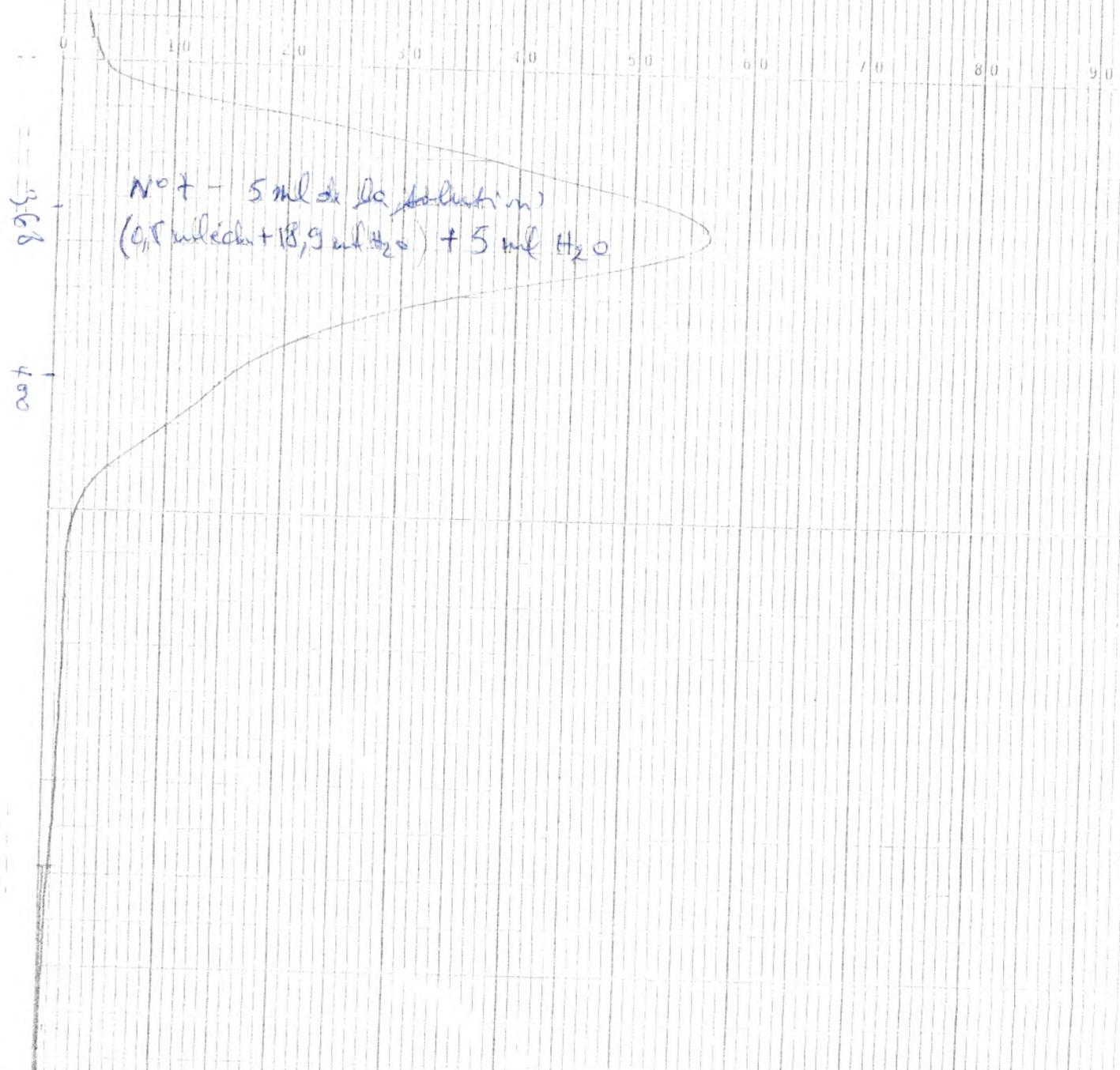
10 20 30 40 50 60 70 80 90

0,35 ml Ech N°7
20 ml NaOH 0,1 N



→ 200 mm

... ..



№ 1111

3600

368

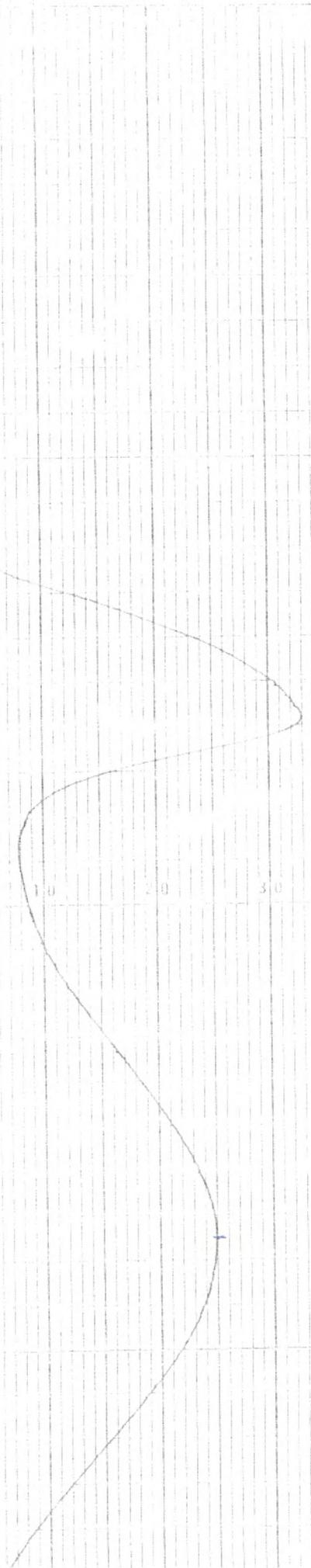
370

385

390

1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0

93.5 ml ECH № 8
25 ml NaOH 0,1 N



200 mm

↓ vitesse du papier
60 mm / min

300

370

400

470

500

H_2O
ech: 10,7 ml + 2,9 ml H_2O

0 100 200 300 400 500 600 700 800 900



La composante 8 manifeste une faible absorption à 290 nm et une forte absorption à 269 et 485 nm. Ces 3 pics correspondent exactement à l'absorption de 2-hydroxy-phénazine-1-carboxylic-acid (2-OH-PCA).

La différence entre le spectre de notre composante et celui décrit par les auteurs cités plus haut réside dans le fait que le pic à 290 nm de notre composante est très faible.

La composante 7 ne manifeste aucune absorption dans la région ultraviolette, cependant elle donne un grand pic à 368 nm de la même manière que 1-carboxylic-acid-phenazine (1-OH-Phz). Mais cette dernière substance absorbe aussi à 250 nm.

Le manque de l'absorption de nos substances en région U.V n'est pas clair.



Discussion

I-a: Quinze souches de *Pseudomonas* fluorescentes isolées de la rhizosphère de la pomme de terre sont lactose-négatives, oxydase-positives (Palleroni 1984); calase-positives, aérobie-strict (Cooksey 1990). Parmi ces souches, six ont été identifiées comme *Pseudomonas fluorescens*:

- 1 *Pseudomonas putida*.
- 4 *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2 *Pseudomonas cicchori*.
- 1 *Pseudomonas auréofaciens*.
- 1 *Pseudomonas putréfaciens*.

Pseudomonas fluorescens hydrolyse la gélatine (Marchall 1982) alors que *Pseudomonas Putida* ne l'hydrolyse pas (Carney 1989, Gilardi 1985). *Pseudomonas aeruginosa* est douée ou non de cette activité de gélatinolyse, mais c'est la seule capable de croître à 42°C (Palleroni 1992).

Pseudomonas cicchori est la seule souche de *Pseudomonas* fluorescente phytopathogène oxydase-positive (Zannoni 1989), ADH-négative, gélatinolyse-négative, levane-négative (Cooksey 1990). *Pseudomonas putréfaciens* noircit complètement le milieu Hajna-kilgler par production d'H₂S (Gilardi 1985). Alors que *Pseudomonas auréofaciens* produit un pigment orange diffusible dans le milieu entouré d'un halo sombre sous U.V. (Thomashow 1992a).

I-b: De plus, ces souches montrent une multirésistance variable aux différentes familles chimiques d'antibiotiques (6) citées plus haut, et à 3 métaux lourds.

Les valeurs de CMI des antibiotiques considérés par les normes médicales comme seuil de résistance selon les recommandations de la société française de microbiologie (Acar et Al 1991) sont assez basses pour la majorité des antibiotiques étudiés alors que nos souches dépassent fortement ces valeurs et atteignent parfois des valeurs de CMI 10 et 20 fois voire parfois 100 fois supérieures. Par contre elles sont sensibles au mercure, fortement résistantes au cadmium et seulement 3 sont résistantes au cuivre (tableaux III et IV).

Puisque la résistance bactérienne aux antibiotiques et aux métaux lourds peut être soit naturelle soit acquise après mutations chromosomiques, ou après acquisition d'une nouvelle information portée par un plasmide ou par un gène (Grayson et Eliopoulos 1990, Courvalin et Al 1987), il est possible que les différents niveaux de cette résistance puissent avoir différents mécanismes moléculaires (Courvalin et Al 1987 et 1988).

2: En effet, c'est en 1972 que Courvalin a noté l'association des plasmides aux phénomènes de résistances aux antibiotiques. En général, la résistance à de faibles concentrations d'antibiotiques est due à une altération chromosomique ayant pour conséquence la diminution de perméabilité membranaire ou modification des cibles; par contre celle à grandes concentrations est due spécifiquement à des transposons situés sur des plasmides (Clewell 1990).

Chez la majorité des souches testées, on observe une résistance à haute concentration d'antibiotiques, notamment à: ampicilline, oxacilline, céfalosporine, kanamycine et aussi le cadmium.

Cela supposerait donc que les déterminants de cette résistance sont portés par des plasmides, qui peuvent être transmis à d'autres souches par le processus de conjugaison. Or ceci n'a pu être prouvé par nos expériences, vu le haut niveau de résistance à tous les marqueurs examinés chez toutes nos souches. Le déroulement du processus de conjugaison a été détecté uniquement par le transfert du pigment orange de la souche 2 aux autres souches. Il est donc fortement probable que la synthèse de ce pigment est

déterminée par des gènes portés par un plasmide et que le transfert de ce dernier au cours de la conjugaison qui est responsable de la production de ce pigment par les souches receveuses.

Parmi les souches receveuses, on a seulement retenu la souche E.-Coli JRS qui diffère des *Pseudomonas* par l'absence de plasmides et de pigments, et est fortement sensible à l'oxacilline et à l'ampicilline.

Le transfert de la capacité de production du pigment orange de *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 vers E.-Coli a été déjà observé par Thomashow (1992b).

Les caractères du transconjugant n'ont pas été analysés profondément, mais la visualisation des plasmides sur gel d'agarose nous révèle la présence d'un plasmide qui n'était originellement pas présent chez la souche JRS sauvage. Le plasmide acquis n'est pas situé sur la même ligne que celui de la souche 2 donneuse.

Cela suppose qu'il est sous une configuration différente de celui de la souche 2. Notons qu'avec l'acquisition du plasmide, le transconjugant acquiert une autre caractéristique qui n'est autre que le pouvoir de croître dans un milieu contenant jusqu'à 500 µg/ml d'oxacilline et supérieur à 500 µg/ml pour l'ampicilline mais sensible au cadmium.

Cela suppose que le déterminant de la β-lactamase a été transmis à la souche JRS. Il est d'ailleurs connu que la résistance aux β-lactamines et par conséquent les déterminants des β-lactamases sont portés par des plasmides transmissibles (Scioli 1984) de *Pseudomonas aeruginosa* à E.-Coli (Medeiros 1985). Et donc avec le transfert du plasmide de *Pseudomonas auréofaciens* (souche 2) à E.-Coli JRS il y a eu à la fois :

- transfert de la production du pigment orange.
- Du déterminant de la β-lactamase "oxa" (oxacilline).
- du déterminant de la β-lactamase de l'ampicilline .

Thomashow et Weller (1993 b) ont observé que l'acquisition du pigment chez E.-Coli est accompagnée par la résistance de cette dernière aux antibiotiques originellement produits par *Pseudomonas auréofaciens* 30-84. Selon ces auteurs, cette acquisition est accompagnée dans certains cas par la production des trois antibiotiques produits par la souche donneuse *Pseudomonas auréofaciens* 30-84.

On a utilisé plusieurs méthodes pour démontrer la présence des plasmides chez nos souches. Ces méthodes ont pour principe la lyse alcaline puis l'élimination du DNA chromosomique par le phénol seulement, nous avons retenu celle de Ish-Horowitz et Burke légèrement modifiée par Felliciello, et qui au lieu d'utiliser le phénol pour éliminer le DNA chromosomique utilise plutôt l'acétate de potassium concentré. Il semble, en effet, que le DNA plasmidique dénaturé par le pH alcalin à température même ambiante devient fragile et peut facilement être dégradé. C'est pour cela qu'on travaille à une température basse de 4°C. Certaines des souches de *Pseudomonas* testées comportent de grands plasmides qui diffèrent légèrement dans leur taille comme le montre la distance qui les sépare du point de départ (fig.-7).

Il semble, que, quoique la souche 2 ait perdu la capacité de produire le pigment orange (les phénazines) après traitement à la ciprofloxacine. Le plasmide n'est pas éliminé mais semble être plus grand que celui présent chez la souche parentale, puisqu'il migre moins vite sur gel d'agarose. Il est possible qu'il s'agit d'un double plasmide, c'est à dire que deux plasmides ne se sont pas séparés après la répllication parce que la gyrase qui assure cette séparation a été inhibée par la ciprofloxacine (Courvalin 1987, Grayson et Eliopoulos 1990).

On a remarqué d'ailleurs que lorsque le plasmide de la souche 2 est transféré chez JRS, cette dernière acquiert la capacité de produire le pigment orange correspondant aux phénazines, et le plasmide se trouve presque sur la même ligne que celui présent chez la souche 10 et 10 traitée à la ciprofloxacine, et donc plus grand que celui de la souche donneuse. Est-il possible que ce soit le plasmide qui est en double chaîne ? ou que le transposon qui code pour la résistance à la streptomycine s'est intégré au plasmide transféré (Clewell 1990) car, contrairement à la souche JRS ayant une CMI à la streptomycine inférieure à 1,95 µg/ml, le transconjugant (souche 2 x E.-Coli JRS) a une CMI à la streptomycine de 31,25 µg/ml.

La souche 3 semble avoir perdu son plasmide après traitement à la ciprofloxacine, alors que la souche 10 traitée a considérablement diminué sa pathogénéicité, sans pour autant perdre le plasmide, mais ne produit plus de pigment fluorescent et par conséquent de mucus. Et bien que, après traitement, les souches 2 et 10 aient considérablement diminué leur taux de résistance, voire même devenues sensibles pour certains antibiotiques et au cadmium, leurs plasmides sont toujours présents.

Est-il alors possible que la ciprofloxacine ait touché certaines fonctions vitales du plasmide ? ou bien, les déterminants conférant cette résistance sont portés par le chromosome bactérien, et que ce dernier a été légèrement endommagé ? car si on venait à comparer les souches 2 et 3 qui ont toutes deux perdu leur résistance pour presque tous les antibiotiques testés, alors que la souche 3 a perdu son plasmide après traitement, la souche 2 par contre en possède un qui est plus grand que celui de la souche parentale, et que ce dernier ne lui confère plus la résistance au cadmium.

Il est d'ailleurs actuellement acquis que les déterminants conférant la résistance à la plupart des métaux lourds sont portés par des plasmides (Cooksey 1987,1990,1991, Silver and Misra 1988), et que ces derniers peuvent en même temps coder pour la résistance aux antibiotiques et à d'autres métaux lourds (Silver and Misra 1988).

Le déterminant génétique de la résistance au cuivre est organisée opéron constitué de 4 gènes (cop A, cop B, cop C, cop D) situés sur le plasmide (Cooksey 1990-1991).

Si l'un des gènes venait à être muté ou altéré, par n'importe quel agent interne ou externe, la résistance serait diminuée ou perdue sans pour autant que le plasmide le soit. Par contre, dans le cas du cadmium, exclusivement les *Pseudomonas* produisent une métallothionéine intercellulaire qui est un polypeptide jaune extracellulaire constitué de résidus de cystéine (48 %) glutamate ou glutamine (19%) et glycine (22%): ces derniers constituent une structure de phytochélatine responsable de chélater le cadmium. La production du polypeptide semble être gouvernée par un plasmide (Silver and Misra 1988). On pourrait donc supposer que la perte de la résistance au cadmium ne peut pas être seulement due à la mutation qui donne naissance à un polypeptide muté qui ne pourra plus chélater le cadmium et donc la souche deviendra sensible. Il est aussi possible que le polypeptide ne peut plus être élaboré.

3- Parmi les souches isolées, deux sont douées d'une activité phytopathogène. Cette pathogénicité, causée par les souches 10 et 12, se traduit par le pourrissement de la pomme de terre (par production de mucus et d'une odeur très désagréable sur les tranches de pomme de terre) d'une part, et le ralentissement de la croissance puis la mort du plant d'autre part.

Certaines souches (1,2,3,4,5,9,15) stimulent la croissance de la pomme de terre et donc peuvent être utilisées dans l'amélioration des rendements, le reste par contre est saprophyte. La souche 2, identifiée comme *Pseudomonas auréofaciens* est douée d'une activité suppressive vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes qui sont:

Fusarium oxysporum et *Fusarium solani*.

Nous avons supposé que ces phénomènes : pathogénéicité, stimulation et suppression sont dûs à l'excrétion dans le milieu extracellulaire de métabolites secondaires. La plupart des bactéries Gram négatives secrètent des protéines dans le milieu extracellulaire (Degroot 1991). Les souches de *Pseudomonas*, quand à elles secrètent 2 types de métabolites secondaires potentiellement cytotoxiques, il s'agit de phénazines et de protéases (Levy 1992). Durant les dernières années une évidence unéquivoque est apparue: la production par les agents de bicontrôle de phénazines, de sidérophores et d'HCN contribuait avec d'autres métabolites secondaires à la suppression d'agents phytopathogènes. (Thomashow et Weller 1993 a et b ; Vincent et Al 1991).

Parmi ces métabolites certains, comme le 2-4-diacétyl-phloroglucinol ont une activité herbicide (Thomashow et Weller 1993 a et b) et donc peuvent entrer en compétition avec les plantes pour les matières nutritives et affecter leur métabolisme (Thomashow 1992 a). Il est actuellement admis que les *Pseudomonas* fluorescentes douées d'une activité suppressive vis-à-vis des champignons phytopathogènes sont connues en partie pour leur action sécrétoire de substances antifongiques (James et Gutterson 1986 ; Vincent et al 1991) de sidérophores et d'HCN (Vincent et Al 1991).

Nous avons alors essayé de mettre en évidence les substances antifongiques secrétées par la souche 2. Ces substances ne sont autres que des substances de nature phénazinique (Thomashow 1988, 1992 a et b) dont la couleur orange est caractéristique. Effectivement la souche 2 [*Pseudomonas auréofaciens*] secrète des substances antifongiques, qui induisent la suppression de deux champignons phytopathogènes sur PDA.

Par traitement à la ciprofloxacine la souche 2 perd cette capacité en même temps que la production du pigment orange; en revanche elle secrète une autre substance, cette fois bactéricide et qui était semble-t-il masquée par la première.

Selon Lévy (1992), le degré d'inhibition fongique, par les substances phénaziniques, dépend de leur concentration. C'est ce que nous avons constaté avec l'extrait de la souche 2. Nous avons noté que l'inhibition des deux champignons est proportionnelle à la concentration en phénazine, et que 100 µl de l'extrait brut inhibe totalement la croissance des champignons voire même la mort du mycélium ensemencé. Tandis que des concentrations moins élevées permettraient une légère croissance du mycélium, voire même réversible dans le cas de très faibles concentrations exemple: 10 ou 20 µl.

(1 µl correspond à $66 \cdot 10^5$ cellules par ml par 24h.)

Ceci suppose que le champignon est capable de se protéger contre cet agent toxique.

Lévy (1992) a trouvé que *Septoria tritici* est sensible à la phénazine de *Pseudomonas aeruginosa* LEC1, mais à faible concentration l'inhibition est réversible. Cette réversibilité est due à la dégradation de la phénazine par *Septoria tritici*. Ceci suppose que durant la suppression, *Septoria tritici* dégrade la phénazine et développe en même temps un mécanisme de protection contre la toxicité de la phénazine.

Les phénazines représentent une classe d'antibiotiques qui, produites en quantité suffisante, contrôlent les maladies des plantes (Thomashow 1992 a). Le complexe phénazinique qu'on a isolé comporte 8 composantes dont 3 seulement sont actives. Deux d'entre elles (7 et 8) migrant l'une à côté de l'autre sur CCM, et la troisième est proche du start (2). En comparant nos résultats avec ceux obtenus par Thomashow (1992 a) nous pourrions en conclure une grande similarité.

Nos trois composantes actives présentent les mêmes caractères physiques et migrent de la même manière que les substances isolées par Thomashow (1992a), avec une légère différence. Quand au RF (rapport frontal) et c'est sûrement dû à l'impureté de nos composantes qui devaient être purifiées par HPLC (chromatographie liquide haute performance).

En effet:

- la composante 7 (la plus importante du point de vue suppressivité) qui pourrait correspondre à la PCA. Cette dernière est une substance caractérisée par une couleur jaune qui devient noire sous U.V. et avec un rapport frontal de 0,17 (Thomashow 1992 a), ces propriétés correspondent à la substance 7 ayant un rapport frontal de 0,2.
- la composante 8 (moins active que la précédente) pourrait correspondre à la 2-OH-PCA qui est de couleur orange avec une fluorescence orange (Thomashow 1992 a), la différence réside dans le rapport frontal qui est de 0,19 pour la 2-OH-PCA et de 0,3 pour la composante 8.
- la composante 2 (d'activité mineure) pourrait correspondre à la 2-OH-phénazine de fluorescence orange avec un rapport frontal de 0,04 (Thomashow 1992 a), tandis que la composante a un rapport frontal de 0,08.

Après spectroscopie U.V. à balayage, les composantes 7 et 8 ne présentent pas les mêmes spectres présents dans le travail de Thomashow (1992 a), ceci pourrait être dû comme nous l'avons cité plus haut à l'impureté des composantes.

Les composantes prises séparément sont moins actives que le composé brut, quoique la composante 7 soit la plus active des trois. Ce fait peut être expliqué par la diminution de la concentration de ces substances (brutes et fractionnées), il faut les avoir en même et plus grande concentration. La quantité de ces substances ainsi que leur pureté sont indispensables pour leur identification précise. Les mutants déficients en phénazines perdent complètement le pouvoir de suppression, même s'ils continuent à produire les sidérophores et l'HCN qui sont très légèrement protecteurs (Thomashow 1992 a). Un résultat similaire est obtenu dans notre travail par traitement de la souche 2 à la ciprofloxacine. Elle devient incapable d'inhiber les champignons phytopathogènes. Ce traitement déprime la souche 2 de la production du pigment orange.

Les composantes de l'hydroxyphénazine dérivent de la PCA (Thomashow 1992 a et b). Les phénazines et leurs dérivés sont en fait les produits de biosynthèse de la chaîne des acides aminés aromatiques, avec pour intermédiaire le chorismate (acide chorismique) (leur production peut atteindre plusieurs centaines de milligrammes par litre en 24^h), c'est pour cela qu'une altération dans le métabolisme intermédiaire, ou la synthèse de chorismate limiterait sinon abolirait la synthèse de phénazine (Thomashow 1988, 1992 a)

D'autres voies peuvent aussi dramatiquement influencer la biosynthèse d'antibiotiques; exemple: la mutation de la glucose déshydrogénase, bien que la bactérie assimile toujours le glucose par une autre voie, elle ne produit plus d'antibiotiques actifs (James et Gutterson 1986).

Actuellement, la recherche sur les métabolites secondaires des shizobactéries qui améliorent la croissance des plantes (PGPR) est orientée vers : phénazine-1-carboxylic acid (PCA), 2-4-diacetyl-phloroglucinol (PhI), pyoluteorine (Plt), pyrrolnitrine, oomycine A et HCN. Toutefois, les deux antibiotiques les plus communément et intensément étudiés sont la PCA et PhI (Thomashow et Weller 1993 b).

Selon Thomashow (1988) les antibiotiques de nature phénazinique seraient toxiques pour E.-Coli.

En accord avec cette constatation nous avons observé que sur LURIA où *Pseudomonas auréofaciens* (souche 2) produit beaucoup de pigments, il y a une inhibition élevée de E.-Coli LWP2 et E.-Coli LUWRA. Il est possible que ce sont les phénazines qui sont responsables de cette inhibition. Il est aussi possible qu'il s'agit de bactériocine, ou de l'effet synergique de ces deux toxines. Si les phénazines sont toxiques pour E.-Coli, comment expliquer la capacité d'E.-Coli JRS de produire ces pigments après

conjugaison avec la souche 2 (*Pseudomonas auréofaciens*), mais ce fait a déjà été

observé par Thomashow et Weller (1993 b) qui ont eu le même résultat. Ils expliquent que la capacité d'une souche d'E.-Coli de produire l'antibiotique lui confère en même temps la résistance à cet antibiotique.

Nous avons aussi remarqué que la souche 2 (*Pseudomonas aureofaciens*) ne produit pas de pigment sur PDA, mais en produit sur la ligne la séparant du champignon. Serait-ce le champignon qui aurait induit la production du pigment phénazique ?

la production de phénazines peut être un mode de défense de la bactérie contre les champignons. Le milieu aussi pourrait être un inducteur de la production de phénazines.

La production des métabolites secondaires est hautement dépendante des conditions de culture, et dans les habitats naturels l'environnement physique et chimique change rapidement. Par exemple la production d'oomycine A est induite par le glucose et inhibée par les acides aminés, tous deux présents dans la rhizosphère (Thomashow et Weller 1993 a). D'autres facteurs peuvent affecter la production des phénazines ; l'addition d'acide borique, de sulfate de fer et de magnésium augmente le nombre de cellules et la quantité de PCA (Thomashow et Weller 1993 b), alors que l'addition de sulfate de zinc (Thomashow et Weller 1993 a) ou zinc + molybdate d'ammonium et de cytosine (Thomashow et Weller 1993 b) augmenterait seulement la quantité de PCA. En effet, la suppression du « take-all » par *Pseudomonas fluorescens* 2-79 est significativement élevée dans un sol pourvu de 50 µg de zinc/gr de sol par rapport à un sol dépourvu (Thomashow et Weller 1993 a et b). Le zinc est en fait un composé catalytique ou structural de presque 300 enzymes (Thomashow et Weller 1993 b). La température influe aussi sur la production d'antibiotiques (Thomashow et Weller 1993 a).

En conclusion, on pourrait dire que la production d'antibiotiques (phénazines) par *Pseudomonas auréofaciens* est le mécanisme dominant dans la suppression des *Fusaria*. Toutefois ces substances peuvent dans certains cas affecter le métabolisme des plantes.

Schippers (1987) et Weller (1988) observent que certaines *Pseudomonas* de la rhizosphère protègent les plantes de certaines maladies et par la même augmentent le rendement des cultures.

CONCLUSION

15 Souches de *Pseudomonas* fluorescentes isolées de la rhizosphère de la pomme de terre à proximité de la rivière de Bousselam ont été caractérisées selon 3 points de vues:

- résistance aux antibiotiques et métaux lourds.
- plasmides : présence, transfert et élimination.
- métabolites secondaires :
 - * activité de biocontrôle (souche No2) (antibiotiques spécialement les phénazines) .
 - * pouvoir phytopathogène (souche 10 et 12).

Les résultats montrent que la résistance aux antibiotiques couramment utilisés est très répondeuse entre les souches. La perte des plasmides gouvernant la résistance est difficile à obtenir ainsi que l'élimination des caractères de pathogénicité des souches 10 et 12. Par contre le transfert du pigment orange de la souche 2 vers *E. Coli* JRS est facilement obtenu, et s'accompagne d'un transfert plasmidique chez cette dernière. Mais le plasmide retrouvé chez *E. Coli* JRS est plus grand que celui présent chez la souche 2. La souche 2, identifiée comme *Pseudomonas auréofaciens* , est douée d'une activité inhibitrice sur PDA de 2 champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*.

Le traitement de souche 2 à la ciprofloxacine la rend déficiente en production du pigment orange, abolie en même temps l'inhibition des champignons phytopathogènes mais la rend inhibitrice envers les 2 souches phytopathogènes isolées (10 et 12). Toutefois , l'origine de ces propriétés est à éclaircir, entre les régions où le rendement des cultures de pomme de terre est élevé(exemple : champs situés de part et d'autre de la rivière de Bousselam), et celles à faible rendement afin de déterminer s'il s'agit là de sols suppressifs. De plus, étudier la persistance de la souche 2 dans le sol d'une part, et son introduction dans un sol à faible rendement ou réintroduction dans le sol d'origine d'autre part. Il serait ainsi intéressant de mieux caractériser les souches pathogènes isolées ainsi que les souches saprophytes.

RESUME

1- 15 Souches de *Pseudomonas* fluorescentes ont été isolées de la rhizosphère de la pomme de terre dans un champ situé à proximité de la rivière de Bousselam durant le mois de Mai de l'année 1993.

2- Parmi les souches isolées 2 sont identifiées comme phytopathogène et une est suppressive .

3- Les CMI des antibiotiques et des métaux lourds sont déterminées chez les *Pseudomonas* isolées. Elles présentent toutes une multirésistance à 6 familles d'antibiotiques et 3 métaux lourds .

4- La majorité des souches présentent une haute résistance aux B-lactames, au cadmium, mais une très grande sensibilité au mercure.

5- Les plasmides ont été détectés chez 5 souches par la méthode de Grinsted et Bennett (souches 11 et 14), et par la méthode de Felliciello (souches 2,3 et 10). Ces plasmides sont de grande taille exemple : la taille du plasmide de la souche 11 est proche de RP1.

6- Le curage (élimination des plasmides a été effectué par la ciprofloxacine.

7- L'élimination du plasmide s'est accompagnée par l'élimination de l'activité des B-lactamases oxa, de la résistance au cadmium, à la streptomycine ect

8- La souche 2 qui a perdu l'activité B-lactamasique oxa, a aussi perdu la capacité de produire le pigment orange sans perdre le plasmide .

9- Le transfert du plasmide de la souche 2 vers la souche *E.Coli* JRS a été effectué par conjugaison. Ce transfert s'est accompagné par la production du pigment orange par *E. Coli* JRS , et en même temps le changement des caractères de résistance de cette dernière .

10- La souche 2 est douée d'une activité suppressive vis à vis de 2 champignons phytopathogènes sur PDA .

11- L'activité suppressive de la souche 2 est abolie par traitement à la ciprofloxacine , et l'activité bactéricide masquée par la suppression apparaît vis à vis de 2 souches phytopathogènes isolées (10 et 12).

12- L'Extraction, chromatographie en couche mince, puis spectroscopie U.V. à balayage, montrent que le principe actif de cette suppression est d'une configuration et caractéristiques proches des phénazines décrites par Thomashow (1992b).

ANNEXE : (Définition)

Antibiotique : un antibiotique est tout composé élaboré par un organisme vivant (bactérie, champignon) ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose, d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux à l'égard des micro-organismes.

Enfin, ce sont des substances qui peuvent être soit bactéricides soit bactériostatiques. L'exemple étudié dans le présent travail est la production des phénazines.

Chromatographie en couche mince : (C.C.M) (d'adsorption).

La C.C.M utilise le transfert d'une substance d'une phase vers une autre : l'une est fixe ou stationnaire, l'autre est mobile. Ce type de chromatographie fait donc intervenir la notion de partage, mais les phénomènes d'adsorption y sont très importants.

En série aliphatique les groupements fonctionnels permettant l'adsorption sont par ordre décroissant : acide (COOH), amide, alcool, amine primaire, ester, éther, aminetertiaire, halogène.

Technique : Le dépôt des produits à chromatographies s'effectue à l'aide de micropipettes qui permettent de déposer sous forme d'une tâche de très petit diamètre (spot) les solutions des produits à étudier. Puis le dépôt est séché.

L'enceinte ayant été préalablement saturée par le solvant de migration, la plaque est placée verticalement dans la cuve, elle-même disposée sur un plan strictement horizontal. La révélation après migration est assurée par examen des spots en lumière ultra-violette à 254 nm.

Centrifugation : Lorsque l'on veut séparer deux liquides non miscibles de densité différente, il suffit de laisser le mélange dans un verre ou mieux dans une ampoule à décantation. Le liquide ayant la densité la plus élevée sédimente à la partie inférieure. Les particules du sédiment subissent en fait l'action de deux forces de sens opposés : l'une dirigée vers le fond du tube due à la pesanteur, l'autre qui s'y oppose due à la viscosité du milieu. La première répond à la formule $G_{\eta} = m\gamma$. Où γ est l'accélération due à la pesanteur et m la masse de la particule. Il est souvent utile d'accélérer le phénomène de sédimentation en modifiant l'accélération. Ceci est obtenu en utilisant la force centrifuge dans des appareils dits centrifugeurs, et l'opération porte le nom de centrifugation.

Curage : C'est l'élimination des plasmides. Beaucoup de substances chimiques peuvent provoquer la perte des plasmides. Parmi ces substances, on retrouve les agents s'intercalant entre les bases du DNA, tels que l'orange d'acridine, l'acriflavine, le bromure d'éthidium, ou composé perturbant le fonctionnement de la machinerie de la réplication de DNA.

Conjugaison : a été découverte en 1946 par J.Lederberg et E.L.Tatum.

Durant la conjugaison, le DNA est transféré d'une cellule donneuse à une cellule réceptrice par l'intermédiaire d'une connexion inter-cellulaire (tube de conjugaison) formé entre les deux cellules. (Le donneur et le receveur sont parfois nommés cellules mâle et femelle respectivement). Le transfert de l'information génétique durant la conjugaison se fait dans un seul sens plutôt qu'un échange réciproque de matériel génétique.

Les cellules ayant la capacité de servir de donneur durant la conjugaison sont différenciées par la présence de système d'ancrage qui ne sont autres que les pili. « F », absents chez les cellules receveuses. De plus, les gènes portés par une petite molécule de DNA circulaire sont dits facteur F (facteur de fertilité ou plasmide F). Les cellules portant le facteur F, initient le transport de DNA après contact avec des cellules dépourvues; ces dernières sont dites cellules F⁻ (cellules réceptrices).

Dry-rot : pourriture emmagasinée de la pomme de terre causée par *Fusarium solanii* var *coruleum*. Les tubercules développent des zones noires puis des lésions suintantes dans les cavités infectées par le mycelium; les tubercules affectés perdent leur eau et sont éventuellement déshydratés. Alors que sous des conditions humides, l'infection des tubercules résulte en une décomposition rapide.

Électrophorèse : on appelle électrophorèse le déplacement des particules chargées dans un champ électrique formé par un courant électrique continu. Ces particules peuvent être de grande taille (cellules) ou à l'inverse de très petite taille (acide aminé). Le champ électrique est formé par la d.d.p. appliquée aux électrodes plongeant dans des bacs de solution d'électrolytes (10 mA). La séparation électrophorétique sur gel associe à la séparation des macromolécules en fonction de leur charge, une séparation en fonction de leur taille. Les gels forment en effet une sorte de filet dont les mailles retardent les molécules dont la taille est élevée.

Quand * le pH tampon < pHi la particule est chargée positivement et migrera vers la cathode .

* le ph tampon > phi la particule est chargée négativement et migrera vers l'anode.

* le ph = phi la charge de la particule est nulle et donc pas de migration.

mutation : le terme de mutation réfère en fait à la fois au changement du matériel génétique, et au processus par lequel ce changement survient. Un organisme exhibant un nouveau phénotype comme résultat d'une mutation est dit mutant. La mutation est tout changement soudain et héritable du matériel génétique, non expliqué par une recombinaison, la mutation peut être naturelle ou induite, ponctuelle ou par insertion d'élément transposables.

Plasmide : Par définition un plasmide est un replicon, (unité de matériel génétique douée d'une capacité d'autoreplication) transmis aux cellules filles sans aucune sélection spécifique, et sous un état extrachromosomique. La plus part des plasmides ne sont pas indispensable pour la survie de la cellule ou ils résident. Les plasmides sont des molécules de DNA circulaire suppenroulé portant un ou plusieurs gènes .

Spectroscopie: Lorsqu'un faisceau de radiation monochromatique parallèle traverse sous incidence normale un milieu absorbant homogène et constitué d'une solution de composés dissouts ne réagissant pas les uns sur les autres. L'absorbance de l'ensemble est égale à la somme des absorbances spécifique. La loi de Beer-Lambert s'exprime par l'équation $D_0 = \sum LC$ ou ϵ : coefficient d'extinction moléculaire L: parcourt optique C: concentration molaire. La spectroscopie u.v est une méthode d'analyse fonctionnelle, qui permet la recherche des différents groupement essentiels qui donnent une approche structurale de la molécule.

L'échantillon à analyser peut être préparé dans une solution où il y a un solvant par exp : une solution méthanolique (1/1000) . la détermination et la mise en évidence des principaux groupements fonctionnels est réalisée par comparaison avec des données bibliographiques . En principe à chaque longueur d'onde correspond une structure d'un groupement ou d'une fonction . Exp :

236 nm → $>C = C <$ 350 nm → $-N = N-$

274 nm → $>c = O$

226 nm → $>c = c - c = c <$

Take-all : maladie de céréales causée par *Gae mannomyces graminis* affectant blé, orge ect ... Se traduisant par la pourriture des racelles des jeunes pousses. Cette affection est aussi causée par d'autres champignons , et n'est pas susceptible par traitement chimique .

Black-root-rot : est généralement le noircissement des racines, et est une affection secondaire qui survient seulement après affection du plant exp : le blé par *G.graminis* .

Transposon: Les transposons ou Tn sont un groupe complexe d'éléments transposables. Les transposons sont des éléments de 2000 paires de nucléotides portant un ou plusieurs gènes qui ne sont pas liés avec leurs transposabilité. Généralement ces gènes codent pour un ou plusieurs antibiotiques. Exp : Tn5 codant pour résistance à la kanamycine). Ou retrouve les :

Transposons simples : limités par les IRS de 38 pb.exp: Tn3 leur transposition se fait par la formation obligatoire d'un cointégrat , composé du DNA du donneur et du DNA du receveur séparés dans chaque fonction par une copie du transposon.

Transposons composés : Limités par des séquences d'insertion (IS) Exp : Tn5. Leurs transposition se fait soit par formation d'un cointégrat, soit directement.

Cosmide : C'est un plasmide portant le site " cos " du phage λ , et avec l'acquisition du site " cos " le plasmide acquiert la capacité d'emballage.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ACAR, J., COURVALIN, P., et al. (1991). Communiqué 1991 du comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie. PATH. BIOL. 39: 737-740.
- 2 - BARRY, A.L., THORNSBERRY, C., (1985). Susceptibility tests: diffusion test procedures. In Manual of Clinical Microbiology. Eds LENNETTE, E.H. BALLOWS, A., HANSLER, W.J., SHADOMY, J.R.H.,) Washington, pp: 1000-1008.
- 3 - BASHAN, Y., (1986); Migration of the rhizosphere bacteria *azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. Journal of general microbiol. 132:3407-3424.
- 4 - BENDER, C.L., COOKSEY, D.A., STONE, H.E., SIMS, J.J., (1987). Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. tomato Tn5 mutants defective in coronatine production. PHYSIOL. MOL. PLANT PATHOL. 30:273-283.
- 5 - BENDER, C.L., YOUNG, S.A., MITCHELL, R.E., (1991) Conservation of plasmid DNA sequences in coronatine-producing pathovars of *Pseudomonas syringae*. APPL. ENV. MICROBIOL. 57:993-999.
- 6 - BOUCHER, C., MARTINEL, A., BARBERIS, P., et al. (1986) Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum*. GEN. GENT. 205:270-275.
- 7 - BRISSON, A., COURVALIN, P., TRIEU-COUT, P., SOUGAKOF, W., (1989). Aspects actuels de la résistance bactérienne aux antibiotiques. ANN. BIOL. CLINI. 47:98-101.
- 8 - CARNEY, B.F., KROCKEL, L., LEARY, J.V., FOCHT, D.D., (1989). Identification of *Pseudomonas alcaligenes* chromosomal DNA in the plasmid DNA of the chlorobenzene-degrading recombinant *Pseudomonas putida* strain CB1-9. APPL. ENV. MICROBIOL. 55:1037-1039.
- 9 - CHAO, W.L., NELSON, E.B., HARMAN, E.G., and hoch, H.C., (1986). Colonisation of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. PHYTOPATHOL, 76: 60-65.
- 10 - CLEWELL, D.B., (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. EUR. J. CLIN. MICROBIOL. INFECT. DIS. 9:90-102.
- 11 - CODY, Y.S., GROSS, D.C., (1987) Characterization of pyoverdinin pss the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. APPL. ENV. MICROBIOL. 53:928-934.
- 12 - COLLMER, A., KEEN, N.T., (1986). The rôle of the pectic enzymes in plant pathogenesis. ANN. REV. PHYTOPATHOL. 25:141-157.
- 13 - COOK, D.; SEQUEIRA, L. (1991). Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide production and for virulence. JOURNAL of BACTERIOLOGY. 173: 1654-1662.
- 14 - COOK, D.J. (1993); Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. ANN. REV. PHYTOPATHOL. 31:53-80.
- 15 - COOKSEY, D.A. (1987). Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. APPL. ENV. MICROBIOL. 53:454-456.
- 16 - COOKSEY, D.A., AZAD, H.R., CHA, J., LIM, C., (1990). Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. APPL. ENV. MICROBIOL. 56:431-435.
- 17 - COOKSEY, D.A., and CHA, J. (1991). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. PROC. NATL. ACAD. SCI. 88:8915-8919.

- 18 - CONTREPOIS, M. (1984). Plasmides et virulence bacterienne : cas particulier des colibacilles
7ème reunion des microbiologistes de l'IRNA. pp 11-14.
- 19 - COPLIN, D.L., FREDERICK, R.D., MAJERCZAK, D.R., (1992). New pathogenicity loci in *Erwinia stewartii* identified by random Tn5 mutagenesis and molecular cloning. *MOL. PLANT. MICROBE. INTERACTIONS*. 5:266-268.
- 20 - COURVALIN, P., LAFONT, P., et al. (1987). Detection of a second mechanism of resistance to gentamycin in animal strains of *E. Coli*. *ANTIMICROBIAL AGENTS and CHEMOTHERAPY*. 31:1274-1277.
- 21 - COURVALIN, P., OUNISSI, H., (1988). La resistance plasmidique aux antibiotiques : La Tunisie medicale n°6/375-380.
- 22 - DE GROOT, A., FILLOUX, A., TOMMASSEN, J., (1991). Conservation of xcp genes, involved in the two step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram negative bacteria. *MOL. GEN. GENET.* 229:278-284.
- 23 - DE LORENZO, V., MARTINEZ, J.L., (1988). Aerobactin production as avirulence factor : a reevaluation ; *EUR. J. CLIN. MICROBIOL. INFECT. DIS.* 7:621-629.
- 24 - DE VINCENTE, A., AVILES, M., et al. (1990). Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from naturel waters. *J. APPL. MICROBIOL.* 68:625-632.
- 25 - DJORDJEVIC, M.A., GABRIEL, D.W., ROLFE, B.G., (1987). Rhizobium-the defined parasite of legumes *ANN. REV. PHYTOPATHOL.* 25:187-209.
- 26 - EL BANNA, A.A., SCOTT, P., et al ; (1984). Formation of trichotecenes by *Fusarium solanii* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in potatoes. *APPL. ENV. MICROBIOL.* 47:1169-1171.
- 27 - ELAD, Y., BAKER, R., (1985). Influences of trace amounts of cations and siderophores-producing *Pseudomonas* on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*; *PHYTOPATH.* 75:1047-1052.
- 28 - ELAD, Y., BAKER, R., (1985b). The role of competition for ion and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. By *Pseudomonas* spp. *PHYTOPATHOL.* 75:1053-1059.
- 29 - ELLIOTT, L.F., (1984). *Pseudomonas* as a factor in the growth of winter wheat (*triticum aestivum* L.) *SOIL. BIOL. BIOCHEM.* 16 :69-71.
- 30 - ELLIOTT, L.F., LYNCH, J.M ; (1985a). Plant growth-inhibitory *Pseudomonas* colonizing winter wheat (*Triticum aestivum*) L. Goots . *Plant and soil.* 83 :57-65.
- 31 - ELLIOTT, L.F., FREDERICKSON, J.K., (1985b). Effects on winter wheat seedlings growth by toxin-producing rhizobacteria *Plant and Soil.* 83: 399-409.
- 32 - ELLIOTT, L.F., FREDERICKSON, J.K., (1985c). Colonization of winter wheat roots by inhibitory rhizobacteria. *SOIL. SCI. SOC. AM. J.* 49 : 1172-1177.
- 33 - ELLIOTT, L.F., CHERRINGTON, C.A., (1987 a). Incidence of inhibitory *Pseudomonas* in the pacific north-west. *PLANT and SOIL.* 101: 159-165.
- 34 - ELLIOTT, L.F., FREDERICKSON, J.K., ENGIBOUS, J.C. (1987 b). Crop residues as substrate for host specific inhibitory *Pseudomonas*. *SOIL. BIOL. BIOCHEM.* 19 :127-134.
- 35 - ELLIOTT, L.F., STROO, H.F., PAPENDICK, R.I. (1988). Growth, survival and toxin production of root inhibitory *Pseudomonas* crop residues, *SOIL. BIOL. BIOCHEM.* 20: 201-207.
- 36 - ELLIOTT, L.F., BOLTON, H., (1989). Toxin production by a rhizobacterial *Pseudomonas* sp. That inhibit wheat root growth. *PLANT and SOIL.* 114: 269-278.

- 37 - ELLIOTT, L.F., STROO, H.F., FREDERICKSON, J.K., BOLTON, H. KENNEDY, A.C., (1992). Competitive abilities of Tn5 tox mutants of a rhizobacterium inhibitory to wheat growth, *PLANT and SOIL* 144: 143-153.
- 38 - FAHY, P.C., LOYD, A.B., (1983) The fluorescent *Pseudomonas*. In *Plant Bacterial diseases. A diagnostic guide*: ACAD. PRESS. AUSTRALIA. pp.141-378
- 39 - FALKOW, S., (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES*; 10: 8274-8276.
- 40 - FELICIELO, I., and CHINALI, (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *E. Coli*, *ANALYT. BIO. CHEM.* 212: 394-401.
- 41 - FETT, W.F., OSMAN, S.F., FISHMAN, M.L., SIEBELES III, T.S. (1986). Alginate production by plant-pathogenic *Pseudomonas*. *APPL. ENV. MICROBIOL.* 52: 466-473.
- 42 - FETT, W.F., OSMAN, S.F., and DUNN, M.F., (1987). Auxin production by plant-pathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *APPL. ENV. MICROBIOL.* 172: 1839-1845.
- 43 - FINLEY, B.B. FALKOW, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *MICROBIOL. REV.* 53: 210-230.
- 44 - GILARDI, R.G., (1985). *Pseudomonas* in *Manual of Clinical Microbiology*. (Eds. LENNETTE, E.H. BALLOWS, HANSLER, W.J., SHADOMY, J.R.H.) Washington, pp 360-372.
- 45 - GRAYSON, L.M., ELIOPOULOS, G.M. (1990). Antimicrobial resistance in the intensive care unit. *SEMINARS IN RESPIRATORY INFECTIONS*. 5: 204-214.
- 46 - GRINSTED, J. and BENNETT, P.M. (1988). Preparation and electrophoresis of plasmid DNA. *METHODS IN MICROBIOLOGY*. 21: 129-142.
- 47 - GROSS, D.D. (1991). Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *ANN. REV. PHYTOPATH.* 29: 247-278.
- 48 - HAAS, D., RIESS, G. (1983). Spontaneous deletions of the chromosome-mobilizing plasmid R68-45 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *PLASMID*. 9: 42-52.
- 49 - ISENBERG, H.D., (1988). Pathogenicity and virulence: another view; *CLIN. MICROBIOL. REV.* 1: 40-53.
- 50 - ISH-HOROVICZ, D., and BURKE, J.F., (1981). Rapid and efficient cosmid cloning *NUCLEIC ACIDS* 9: 2989-2998.
- 51 - JAMES, D.W. and GUTTERSON, N.I., (1986). Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* H.V37 a and their differential regulation by glucose *APPL. ENV. MICROBIOL.* 52: 1183-1189.
- 52 - JONES, R.N., BARRY, A.E., GAVAN, T.L., WASHINGTON, J.A., (1985). Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures; in *Manual of Clinical Microbiology*. (Eds: LENNETTE, E.H., BALLOWS, A., HANSLER, W.J. SHADOMY, J.R.H.) WASHINGTON, pp: 972-977.
- 53 - KADO, C.L., LIU, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of bacteriology*. 145: 1365-1373.
- 54 - KAWAZAKI, H., TAKAO, M., KOISO, A., TONOMURA, K., (1985). Genetic rearrangement of plasmids in vivo recombination between a dehalogenation plasmid and multiple-resistance plasmid RP4 in *Pseudomonas* sp. *APPL. ENV. MICROBIOL.* 49: 1544-1546.
- 55 - KEMPE, J., SEQUEIRA, L., (1983). Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by introducing treating tubers with bacteria. *PLANT DISEASE*. 67: 499-503.

- 56 - KERR, A. (1987). The impact of molecular genetics on plant pathology. ANN.REV.PHYTOPATOL. 25:87-110.
- 57 - KING, G.J. (1989). Plasmid analysis and variation in *Pseudomonas syringae*. J.APPL.BACTERIOL. 67: 489-496.
- 58 - KROCKEL, L., FOCHT, D.D., (1987) Construction of chlorobenzene-utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event. APPL.ENV.MICROBIOL. 53:2470-2474.
- 59 - KUKOR, J.J., OLSEN, R.H., SIAK, J.S. (1989). Requirement of a chromosomally encoded maleylacetate reductase for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by plasmid pJP4. Journal of Bacteriology. 171: 3385-3390.
- 60 - LAM, S.T., LAM, B.S., STROBEL, G., (1985). A vehicle for the detection of transposons into plant-associated *Pseudomonas*; Plasmid. 13: 200-204.
- 61 - LEMANCEAU, P., BAKKER, P.A.H.M., DE KOGEL, W.J., ALABOUVETTE, C., SCHIPPERS, B., (1992). Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS 358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnation by non pathogenic *Fusarium oxysporum* FO47. APPL.ENV.MICROBIOL. 58: 2978-2982.
- 62 - LEONG, J., (1986). Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant antifungal products of *Pseudomonas*; PHY.MOL.PLA.PATH. 40: 163-171.
- 63 - LEVY, E., EYAL, Z., CHET, I., and HOCHMAN, A., (1992). Resistance mechanisms of *septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. PHY.MOL.PLA.PATH. 40: 163-171.
- 64 - MARCHAL, N., BOURDON, J.L., RICHARD, C., (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries; Eds, DOIN PARIS.
- 65 - MARQUES, A.M., ESTAMOL, J.M., FUSTE, C., SIMON-PUJOL, D., et al. (1986). Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp strain EPS-5028. APPL.ENV.MICROBIOL. 52: 1221-1223.
- 66 - MANRESA, A., ESPUNY, M.J., GUINEA, J., COMELLES, F., (1987). Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910, MICROBIOL BIOTECHNOL. 26:347-351.
- 67 - MEDEIROS, A.A., COHENFORD, M., JACOBY, G.A., (1985). Five novel plasmid-determined B-Lactamase. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 27: 715-719.
- 68 - MICHEL-BRIAN, Y., LAPORTE, J.M., COUETDIC, G., SANSONETTI, P.J., (1986). Elimination of a virulence plasmid from *shigella sonnei* and *E. Coli* by antibiotics. ANN.INST.PASTEUR.MICROBIOL. 137B: 291-295.
- 69 - MICHEL-BRIAN, Y., DUPONT, M.J., PLASIAT, P., (1988). La sensibilité du bacille pyocyanique aux antibiotiques. SEM.HOP.PARIS. 64: 2099-2102.
- 70 - MITCHELL, R.E., FREY, E.J. and BENN, M.H., (1986). Rhizobitoxine and L-threohydroxythreonine production by the plant pathogen *Pseudomonas andropogonis*. PHYTOCHEMISTRY. 25: 2711-2715.
- 71 - MITCHELL, R.E., FREY, J., (1986 b). Production of N-coronofacoyl-l-amino acid analogues of coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. atropurpurea in liquid cultures supplemented with l-amino acids. Journal G.M. 132: 1503-1507.
- 72 - MITCHELL, R.E., (1991). Implications of toxins in the ecology and evolution of plant pathogenic micro-organism. BACTERIA EXPERIANCIA. 47: 491-803.
- 73 - NORDMANN, P., TREIEU, COUT, P., COURVALIN, P., (1987). Resistance bacterienne aux antibiotiques: mutations chromosomiques ou acquisition de genes. La lettre de l'infectiologue tome II, 16: 491-497.
- 74 - NOVICK, R.P., (1987a). Plasmid incompatibility. MICROBIOL.REV. 51: 381-395.

- 75 - NOVICK, R.P. et al., (1987b). Extraction of B-Lactamases. In METHODS IN ENZYMOLOGY (Eds: Edgar, p.) Acad press, New York, pp :320-330.
- 76 - O'SULLIVAN, D.J., O'GARA, F., (1988). Delivery system for creation of one-step in vivo lac gene fusions in *Pseudomonas* spp. Involved in biological control. APPL. ENV. MICROBIOL. 54: 2877-2880.
- 77 - O'SULLIVAN, D.J., MORRIS, J., O'GARA, F., (1990) Identification of an additional ferrisiderophore uptake gene clustered with receptor, biosynthesis, and fur-like regulatory genes in fluorescent *Pseudomonas* sp. strain M114. APPL. ENV. MICROBIOL. 56: 2056-2064.
- 78 - PALLERONI, J., (1984). Genes I. *Pseudomonas* in Bergey's Manual of the systematic bacteriology 1: 141-199, (KRIEG, N.R., HOLT, J.G., Eds) WILLIAMS and WILLIAMS BALTIMORE.
- 79 - PALLERONI, J., (1992). Present situation of the taxonomy of aerobic *Pseudomonas*. In *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology. Part 3. Taxonomy and identification* (Galli, Silver, S. Eds) American society of Microbiology, Washington, DC, pp: 105-115.
- 80 - RICHAUME, A., BERNILLON, D. and FAURIE, G. (1992). Role of the intraspecific competition in the regulation of *Agrobacterium tumefaciens* transconjugant population level in soil experiments. FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY. 86: 321-330.
- 81 - RONG, L., KARCHER, S.J., O'NEAL, K.Y., HAWES, M.C., et al. (1990). Pic A, a novel plant-inducible locus on the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome. Journal of Bacteriology. 127: 5828-5836.
- 82 - SAKAMURA, S., ISHIHARA, A., YOSHIHARA, T., (1988). Toxins of phytopathogenic micro-organisms: structural diversity and physiological activity. BIOLOGICALLY ACTIVE NATUREL PRODUCTS. Pp: 57-64.
- 83 - SCHIPPERS, B., BAKKER, A.W., and BAKKER, P.A.H.M., Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere micro-organisms and the effect of cropping practices. ANN. REV. PHYTOPATH. (1987). 25: 339-358.
- 84 - SCHOENKNECHT, F.D., SABATH, L.D., THORNSBERRY, C., (1985). Susceptibility tests: special tests In manual of Clinical Microbiology. (Eds: LENNETTE, E.H., BALLOWS, A., HANSLER, W.J., SHADOMY, J.R.H Washington pp: 1000-1008.
- 85 - SCIOLI, C., ESPOSITO, S., MARTINELLI, R., (1984). In vivo activity of six B-LACTAM antibiotics against non-B-Lactamase producing and producing enterobacteria and antibiotic resistance transfer. BOLL. IST. SIOROTER. 63: 338-347.
- 86 - SHAW, P.D., (1988). Plasmids in phytopathogenic bacteria. EXPERIMENTAL and CONCEPTUAL PLANT PATOLOGY; C: 221-234.
- 87 - SHENG HUANG, J., (1986). Ultrastructure of bacterial penetration in plants. ANN. REV. PHYTOPATH. 24: 141-157.
- 88 - SILVER, S., MISRA, T.K., (1988). Plasmid-mediated heavy metal resistances. ANN. REV. PHYTOPATH. 42: 717-743.
- 89 - SMIRNOV, V.V., KIPRIANOVA, E.A., GARAGULYA, A.D., DODATCO, T.A., and pilyashenko, I.I., (1990). Antibiotic activity and siderophores of *Pseudomonas capacia*. PRIKLADNAYA BIOKIMIYA MIKROBIOLOGIYA. 26: 75-80.
- 90 - SMITH, H., (1991). The influence of the host on microbes that cause disease. PROC. NAT. SOC. BACTERIO. 246: 95-105.
- 91 - THOMASHOW, L.S., and WELLER, D.M., (1988). Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Journal of Bacteriology. 170: 3499-3508.

- 92 - THOMASHOW, L.S., and PIERSON, L.S., (1992a) . Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-80. *MOL.PLANT.MICROBE. INTERACTIONS* . 5: 330-339.
- 93 - THOMASHOW, L.S., WELLER, D.M., OWNLEY, B.H. , (1992b) . Influence of in situ and in vivo pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* -79 *PHYTOPATH.* 82: 178-184.
- 94 - THOMASHOW, L.S.,and WELLER, D.M.,(1993a) . Microbial metabolites with biological activity against plant pathogens. 174-180, by the american chemical society.
- 95 - THOMASHOW, L.S.,and WELLER, D.M.,(1993b) . Use of rhizobacteria for biocontrol. *Current opinion in biotechnology* . 4: 306-311.
- 96 - THORNSBERRY ,C., SHERRIS,J.C., (1985) . General considerations in *Manual of Clinical Microbiology* . (Eds : LENNETTE,E.H., BALLOWS, A., HANSLER,W,J., SHADOMY,J.R.H.,) Washington pp :959-966.
- 97 - TREVORS, J.T., and BERG, G., (1989). Conjugal RP4 transfer between *Pseudomonas* in soil and recovery of RP4 PLASMID DNA from soil . *SYSTEM.APPL.MICROBIOL.* 11: 223-227.
- 98 - VINCENT , M.A., HARRISSON, L.A., BRACKIN, J.M., KOVACEVICH,P.A., MUKERJI, P. WELLER, D.A., PIERSON, L.S. (1991) . Genetic analysi of the antifungal activity of a soil borne *Pseudomonas aureofaciens* *APPL.ENV.MICROBIOL.* 57: 2928-2934.
- 99 - VISSER , R., HOLZAPFEL,W.H., BEZUIDENHOUT, J.J., and KOTZE, j,m, (1986) . antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *APPL.ENV.MICROBIOL.* 52: 552-555.
- 100 - WELLER,D.M., (1988) . Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria . *ANN.REV.PHYTOPATH.* 26: 379-407.
- 101 - ZANNONI ,D. , (1989) . The respiratory chains of pathogenic *Pseudomonas* . *BIOCHIMIA ET BIOPHYSICA Acta* . 975: 299-316.

Mag. Bio - 12 / 09 - 02

Resumé de thèse

Pour l'obtention du Magister
en Biologie cellulaire et moléculaire

Par:

Mme: GEZALHE Samir

Thème:

Etude des propriétés suppressives d'une souche
de Pseudomonas isolée de la rhizosphère de la
Romane de terre sur la croissance de deux
bactéries et de deux champignons phytopathogènes



introduction

Durant presque les 3 dernières décennies les scientifiques se sont penchés sur la phytopathologie plutôt que sur l'introduction de micro-organismes utiles pour le biocontrôle.

Les pseudomonas associées aux plantes sont un groupe de bactéries diversifié et importantes pour l'agriculture. Ce groupe inclut aussi bien des souches saprophytes que phytopathogènes.

Durant les dernières années, l'expérimentation a suggéré l'utilisation potentielle de quelques unes de ces bactéries comme agents biologiques, d'une part pour améliorer les rendements des cultures et d'autre part pour la suppression de certaines maladies.

Ces bactéries produisent une large gamme de métabolites secondaires incluant aussi bien les phytoalexines, siderophores et des antibiotiques.

Toutefois, les souches phytopathogènes sont aussi importantes que les souches saprophytes. Il a été rapporté que certaines phytoalexines possèderaient des activités herbicides et antifongiques.

La biologie moléculaire a révolutionné le monde de la biologie. Des gènes appartenant à n'importe quel micro-organisme sont extraits puis clonés et transférés à d'autres micro-organismes, et la plupart de ces gènes transférés peuvent être exprimés chez le receveur. Pour le présent travail, nous voulons contribuer aux études des souches suppressives isolées d'un champ de pomme de terre situé à proximité de la rivière de Bousselam dans la région de SETIF. Nous étudions le spectre de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds; et quelques essais sont effectués afin de déterminer la présence des plasmides gouvernant cette résistance, et notamment leur transfert et leur élimination; des pseudomonas fluorescentes isolées de ce champ.

Vu l'importance de ces espèces dans le biocontrôle et aussi l'amélioration des cultures, certaines souches sont phytopathogènes et une est bénéfique. Nous avons effectué des essais afin d'extraire le principe actif de cette dernière d'une part, et d'autre part, nous avons effectué des essais complémentaires afin de nous persuader de l'efficacité de l'extrait vis à vis des bactéries et de 2 champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*).

Ce dernier étant l'agent causant le « Dry-rot » des pommes de terre (EL-BANNA 1984). Les chromatographies en couche ^{mince} de cet extrait permettent de le fractionner. Et enfin, deux des composantes de l'extrait, qui paraissent les plus intéressantes (du point de vue inhibition des Fusarium) ; subissent une spectroscopie U.V afin d'en établir le spectre d'absorption (de 200 à 600 nm) le cumul de ces résultats nous permet de les comparer avec ceux retrouvés en bibliographie.

Mots clés:

Pseudomonas, suppression, rhizosphère, pomme de terre.

Pseudomonas phytopathogènes, champignons phytopathogènes

Matériels et méthodes:

a- Appareillage

- Appareil électrophorétique horizontale
- Cuve à chromatographie
- Centrifugeuse à 3500t/ mn (HeltichUniversal 25)
- Hotte stérile (ERLAB)
- Lampe ultraviolette monochromatique à 254 et 360 nm (Dasaga Heidelberg).

b- Souche de bactéries utilisée pour la conjugaison E. Coli IRS 856.

c- Souches de champignons phytopathogènes, utilisées pour les tests antifongiques:

Fusarium oxysporum et fusarium salanī.

d- Produits chimiques et solvants organiques

Eau oxygénée - chloroforme - acétate d'éthyle - benzène- méthanol - isopropanol.

e- Antibiotiques:

Ampicilline - oxacilline - chlorauphénicol - streptomycine - kanamycine - bactrium - céfacidal - ciprofloxacine

f- Sels de métaux lourds:

- Sulfate de cuivre
- Chlorure de cadmium

g- membranes et disques:

- Disque O.N.P.G
- Disque oxydase
- Plaques de silice pour C.C.M
- Disques d'antibiotiques

n- Milieux de culture:

Plusieurs milieux ont été utilisés pour déterminer les différentes souches.

Les plus importants sont:

- Le milieu de Mc Conkey: pour sélectionner les couches gram négatives.
- Le milieu au cétrimide pour sélectionner les pseudomonas.
- Le bouillon nutritif à l'extrait de levure (NBY) pour la production de phénazines.

I- Solutions utilisées pour l'extraction des plasmides.

- Solution G
- Solution de lyse
- Solution d'acétate de potassium
- Tampon TE
- Solution de dépôt
- Solution d'électrophorèse
- Solutions déluions pour chromatographie
- Solution de NaOH pour spectroscopie U.V.

2- Méthodes:

a- Prélèvements et préparation et identification de l'échantillon:

Plusieurs prélèvements ont été effectués dans différents points d'un champ de pommes de terre.

50 gr de chaque échantillon sont mis dans un erlen de 500ml contenant 100ml d'eau physiologique stérile et mis en agitation pendant 30mn.

Puis sont laissés sédimenter. Une série de dilutions est alors effectuée à partir des surnageants de chaque échantillon.

Puis sont ensemencés sur gelose Mc Conkey pour sélectionner les bactéries gram négatives, lactoses négatives incolores (Giraldi 1985).

Les colonies isolées sont purifiées sur gélose nutritive. Les caractères morphologiques et biochimiques sont pris en considération, ainsi que la production de pigments sur King A et B. (Marchall 1982)

Les colonies gram négatives, lactose négatives aérobies stricts, après confirmation de l'oxydase, sont soumises à plusieurs tests pour confirmer leurs identités (Palleroni 1984).

b- Test Lopat:

Ce test permet de déterminer et regrouper les pseudomonas fluorescentes phytopathogènes. (Fahy et Loyd 1983, Zannoui 1989).

c- Dosage de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds:

On détermine habituellement la résistance ou la sensibilité d'une souche aux antibiotiques et aux métaux lourds en estimant leur concentration minimale inhibitrice ou CMI. Cette CMI est déterminée comme la plus petite concentration d'agents anti-microbiens qui inhibent toute croissance visible (Jones et al 1985).

Deux méthodes sont utilisées:

* La méthode de microdilution en milieu liquide, qui est la plus quantitative et ne fait intervenir qu'une petite quantité d'antibiotiques et de milieu. (Thorusberry et Sherris 1985; Jones et al 1985).

*** Antibiogramme ou méthode de diffusion:**

C'est la méthode la plus couramment utilisée, essentiellement en biologie médicale. C'est la diffusion en gélose Müller Hinton.

d- Mise en évidence de la β lactamase de type oxa:

Les souches de bactéries ont développées plusieurs types de β lactanases dégradant avec une grande spécificité les β lactamases de différentes structures

chimiques. Nous avons alors cherché celles qui dégradent plus les oxacillines et ce avant après curage.

Nous avons utilisé la méthode iodométrique qualitative (Schoenknetcht et al 1985) que nous avons légèrement modifié.

e- Élimination des plasmides: (Curage)

L'élimination des plasmides de la cellule bactérienne est en fait un phénomène qui consiste à cultiver une bactérie en présence d'une substance curante qui devrait empêcher ou ralentir sa répliation avec une probabilité supérieure à la perte spontanée. Plusieurs agents sont utilisés pour le curage.

Dans notre travail, nous avons utilisé la ciprofloxacine.

La ciprofloxacine est une quinone fluorée agissant sur l'ADN gyrase, cette dernière participe normalement à la répliation de l'ADN chromosomique ainsi que l'ADN plasmique, si cette enzyme n'est pas fonctionnelle, le plasmide ne peut pas se multiplier (Nordmann et al 1987, Michel Briand et al 1988) Grayson et Eliopouds 1990).

Nous avons utilisé ce test pour nous persuader de la présence de certaines fonctions des bactéries isolées sur le plasmide, notamment la résistance aux antibiotiques et la production de pigments.

f- Transfert de plasmides par conjugaison:

La conjugaison est le transfert d'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Le phénomène est, en effet, couplé avec une répliation de l'ADN.

Des deux copies produites, l'une est transférée tandis que l'autre est conservée par la bactérie donneuse.

La méthode utilisée est une méthode standard selon Haas et Gauthier 1983.

La conjugaison est effectuée entre 2 souches de 2 familles différentes qui sont pseudomonas et E. Coli.

g- Extraction de plasmides:

Afin de se persuader de la présence de plasmides chez les souches isolées, on effectue leur extraction.

Le principe de la méthode repose sur la lyse de la cellule bactérienne suivie de l'élimination de l'ADN chromosomique et la majorité des protéines qui peuvent empêcher la visualisation de l'ADN plasmidique après électrophorèse sur gel d'agarose.

Plusieurs méthodes ont été utilisées, cependant une seule a été retenue, c'est celle selon Fellicielrand chiuallig (1993).

h- Mise en évidence de la production de phénazines et de bactériocine respectivement par la souche Psauréafociens (sauvage) et Psauréofaciens traitée à la ciprofloxacine.

1- Tests des propriétés biologiques des pseudomonas:

- a- Suppression fongique selon Vincent et al 1991
- b- Suppression fongique selon James et Gutterson 1986
- c- Production de bactériocine selon De Groot 1991

2- Tests de pathogénicité sur la pomme de terre

- a- Potato rotting
- b- Test de pathogénicité sur le plan de pomme de terre et le tubercule

3- Extraction des phénazines

- a- Pour nous persuader que ce sont les phénazines qui ont une activité antifongique et bactéricide.

Nous les avons extraites par les méthodes citées dans les travaux de James et Gutterson 1986, Vincent et al 1991, Thomashow 1988 et 1992; et nous avons testés leurs activités suppressives vis à vis de 2 champignons et de 2 bactéries phytopathogènes.

b- Les extraits bruts sont fractionner par CCM selon la méthode décrite par James et Gutterson 1986, et les composantes sont testées.

Enfin une spectroscopie U.V à balayage est effectuée afin de comparer nos résultats avec ceux retrouvés en bibliographie (Thomashow 1992).

CONCLUSION

15 Souches de *Pseudomonas* fluorescentes isolées de la rhizosphère de la pomme de terre à proximité de la rivière de Bousselam ont été caractérisées selon 3 points de vues:

- résistance aux antibiotiques et métaux lourds.
- plasmides : présence, transfert et élimination.
- métabolites secondaires :
 - * activité de biocontrôle (souche No2) (antibiotiques spécialement les phénazines)
 - * pouvoir phytopathogène (souche 10 et 12).

Les résultats montrent que la résistance aux antibiotiques couramment utilisés est très répandue entre les souches. La perte des plasmides gouvernant la résistance est difficile à obtenir ainsi que l'élimination des caractères de pathogénicité des souches 10 et 12. Par contre le transfert du pigment orange de la souche 2 vers *E. Coli* JRS est facilement obtenu, et s'accompagne d'un transfert plasmidique chez cette dernière. Mais le plasmide retrouvé chez *E.Coli* JRS est plus grand que celui présent chez la souche 2. La souche 2, identifiée comme *Pseudomonas auréofaciens*, est douée d'une activité inhibitrice sur PDA de 2 champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*.

Le traitement de la souche 2 à la ciprofloxacine la rend déficitaire en production du pigment orange, abolie en même temps l'inhibition des champignons phytopathogènes mais la rend inhibitrice envers les 2 souches phytopathogènes isolées (10 et 12).

Toutefois, l'origine de ces propriétés est à éclaircir, entre les régions où le rendement des cultures de pomme de terre est élevé (exemple : champs situés de part et d'autre de la rivière de Bousselam), et celles à faible rendement afin de déterminer s'il s'agit là de sols suppressifs. De plus, étudier la persistance de la souche 2 dans le sol d'une part, et son introduction dans un sol à faible rendement ou réintroduction dans le sol d'origine d'autre part. Il serait ainsi intéressant de mieux caractériser les souches pathogènes isolées ainsi que les souches saprophytes.

- 1 - DE GROOT, A., FILLOUX, A., TOMMASSEN, J., (1991). Conservation of xcp genes, involved in the two step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram negative bacteria. *MOL.GEN.GENET.* 229:278-284.
- 2 - EL BANNA, A.A., SCOTT, P.M., et al ; (1984) . Formation of trichotecenes by *Fusarium solanii* var.coeruleum and *Fusarium sambucinum* in potatoes. *APPL.ENV.MICROBIOL.* 47:1169-1171.
- 3 - FAHY, P.C., LOYD, A.B., (1983) The fluorescent *Pseudomonas* . In *Plant Bacterial diseases. A diagnostic guide* ; ACAD. PRESS. AUSTRALIA. ~~pp. 325-328~~ pp. 141 - 328
- 4 - FELICIELO, I., and CHINALIG, (1993) . A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *E. Coli* . *ANALYT.BIO.CHEM.* 212 :394-401.
- 5 - GILARDI, R.G., (1985) . *Pseudomonas* in manual of Clinical Microbiology. (Eds. LENNETTE, E.H. BALLOWS, HANSLER, W.J., SHADOMY, J.R.H.) Washington, pp 360-372.
- 6 - GRAYSON, L.M., ELIOPOULOS, G.M. (1990). Antimicrobial resistance in the intensive care unit . *SEMINARS IN RESPIRATORY INFECTIONS* . 5 : 204-214.
- 7 - HAAS, D., RIESS, G. (1983) . Spontaneous deletions of the chromosome-mobilizing plasmid R68-45 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *PLASMID*. 9: 42-52.
- 8 - JAMES, D.W. and GUTTERSON, N.I., (1986) . Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* H.V37 a and their differential regulation by glucose. *APPL. ENV. MICROBIOL.* 52: 1183-1189.
- 9 - JONES, R.N., BARRY, A.E., GAVAN, T.L., WASHINGTON, J.A., (1985). Susceptibility tests : microdilution and macrodilution broth procedures ; in *Manual of Clinical microbiology* .(Eds : LENNETTE, E.H., BALLOWS, A., HANSLER, W.J. SHADOMY, J.R.H. WASHINGTON, pp : 972-977.
procedure
- 10 - MARCHALL, N., BOURDON, J.L., RICHARD, C., (1982) . Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries ; Eds, DOIN PARIS.
- 11 - MICHEL-BRIAN, Y., DUPONT, M.J., PLASIAS, P., -1988). La sensibilité du bacille pyocyanique aux antibiotiques . *SEM.HOP.PARIS.* 64: 2099-2102.
- 12 - NORDMANN, P., TREIEU-COUT, P., COURVALIN, P., (1987). Resistance bacterienne aux antibiotiques: mutations chromosomiques ou acquisition de genes. *La lettre de l'infectiologue* tome II p 16 : 491-497.
- 13 - PALLERONI, J., (1984). Genes I. *Pseudomonas* in *Bergey's Manuel of te systematic bacteriology* 1: 141-199, (KRIEG, N.R., HOLT, J.G., Eds) WILLIAMS and WILLIAMS BALTIMORE.
- 14 - SCHOENKNECHT, F.D., SABATH, L.D., THORNSBERRY, C., (1985). Susceptibility tests : special tests In *manual of Clinical Microbiology*. (Eds: LENNETTE, E.H., BALLOWS, A., HANSLER, W.J., SHADOMY, J.R.H Washington pp : 1000-1008.
- 15 - THOMASHOW, L.S., and WELLER, D.M., (1988). Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. *Journal of Bacteriology* . 170: 3499-3508.
- 16 - THOMASHOW, L.S., and PIERSON, L.S., (1992a) . Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-80. *MOL.PLANT.MICROBE. INTERACTIONS* . 5: 330-339.
- 17 - THORNSBERRY, C., SHERRIS, J.C., (1985) . General considerations in *Manual of Clinical Microbiology*. (Eds : LENNETTE, E.H., BALLOWS, A., HANSLER, W.J., SHADOMY, J.R.H.) Washington pp : 959-966.
- 18 - VINCENT, M.A., HARRISSON, L.A., BRACKIN, J.M., KOVACEVICH, P.A., MUKERJI, P. WELLER, D.A., PIERSON, L.S. (1991) . Genetic analysis of the antifungal activity of a soil borne *Pseudomonas aureofaciens* . *APPL.ENV.MICROBIOL.* 57: 2928-2934.
- 19 - ZANNONI, D., (1989) . The respiratory chains of pathogenic *Pseudomonas* . *BIOCHIMIA ET BIOPHYSICA Acta* . 975: 299-316.