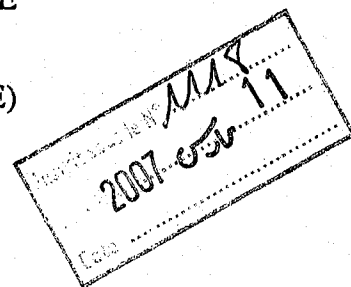
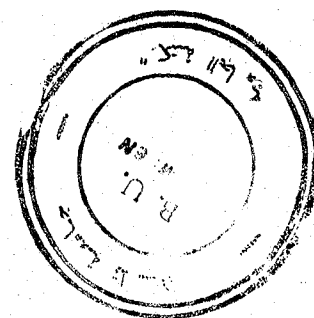


DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE DE PROVENCE  
MENTION SCIENCES  
(CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT ET SANTE)



Nafissa BOUTEFNOUCHET



**"TAXONOMIE, IDENTIFICATION ET  
MARQUEURS DES PSEUDOMONAS DE  
L'ENVIRONNEMENT GENERAL ET  
HOSPITALIER "**

Soutenu le 27 juin 1990 devant la commission

Pr. J. REY  
Pr. Ph. DE MICO  
Pr. J. FRENEY  
Pr. Y. PELOUX  
Pr. C. ROUSSET  
Dr. L. GARDAN  
Dr. C. BOLLET

A notre directeur de thèse.

Le professeur Ph. De Micco

Vous nous avez fait le grand honneur de nous accueillir dans votre service de Microbiologie, Epidémiologie et Hygiène Hospitalière de l'Hôpital Salvator à Marseille. Vous nous avez inspiré le sujet de ce travail et guidé au long de sa réalisation, veuillez trouver ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A notre président de thèse.

Le professeur J. Rey

Après nous avoir prodigué votre enseignement, vous nous faites aujourd'hui l'honneur de siéger dans notre jury de thèse. Que se soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre gratitude.

Au Docteur C. Bollet.

C'est pour nous un honneur et une joie de pouvoir ici vous exprimer notre reconnaissance. Votre enthousiasme, votre savoir et votre dynamisme ont toujours fait notre admiration. Qu'il nous soit permis de vous remercier pour l'aide constante et précieuse que vous nous avez apporté dans la réalisation de ce travail.

Au Docteur L. Gardan.

C'est un très grand honneur que vous nous faites, en assistant à l'achèvement de ce travail. Lors de sa réalisation vous avez bien voulu nous aider de vos conseils et nous faire profiter de votre très grande connaissance des bactéries phytopathogènes, vos travaux dans ce domaine font autorité. Nous avons été très sensible à l'accueil très sympathique que vous nous avez réservé lors de notre stage dans votre laboratoire à la station de phytobactériologie INRA d'Angers, qu'il nous soit permis de vous exprimer ici notre profonde reconnaissance.

Au Professeur C. Rousset.

Vous avez bien voulu participer au jury de notre thèse. Veuillez trouver ici l'expression de nos plus vifs remerciements.

Au Professeur J. Freney.

Vous avez eu l'amabilité de bien vouloir juger ce travail. Soyez assuré de notre profonde considération.

Au Professeur Y. Peloux.

Vous avez bien voulu accepter de faire partie de notre jury. Recevez nos remerciements les plus vifs.

Au personnel du laboratoire.

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 1         | INTRODUCTION  | 4  |
| 2         | EXPOSE THEORIQUE  | 6  |
| 2.1       | Etude du genre <u>Pseudomonas</u>   | 6  |
| 2.1.1     | Historique de la systématique du genre <u>Pseudomonas</u>                         | 6  |
| 2.1.2     | Caractérisation phénotypique  | 7  |
| 2.1.3     | Caractérisation génotypique   | 10 |
| 2.1.4     | Position taxonomique de <u>Pseudomonas</u> phytopathogènes                        | 13 |
| 2.2       | La criblure bactérienne du laurier palme  | 13 |
| 2.2.1     | Plante hôte   | 13 |
| 2.2.1.1   | Aire d'origine géographique   | 13 |
| 2.2.1.2   | Morphologie   | 15 |
| 2.2.1.3   | Croissance et activité photosynthétique   | 15 |
| 2.2.1.4   | Exigences culturales et nutritionnelles   | 15 |
| 2.2.1.5   | Criblure bactérienne  | 15 |
| 2.2.2     | Etude de l'agent causal   | 15 |
| 2.2.2.1   | Caractères morphologiques et culturaux  | 17 |
| 2.2.2.2   | caractères biochimiques   | 17 |
| 2.2.2.3   | Caractères génétiques   | 17 |
| 2.2.2.3.1 | ADN chromosomique   | 17 |
| 2.2.2.3.2 | ADN plasmidique   | 17 |
| 2.2.2.3.3 | Bactériophages et bactériocines   | 19 |
| 2.2.2.4   | Caractères sérologiques   | 19 |
| 2.2.3     | Les maladies dues à <u>P. syringae</u> pv. <u>syringae</u>                        | 21 |
| 2.2.3.1   | Historique  | 21 |
| 2.2.3.2   | Répartition géographique  | 21 |
| 2.2.3.3   | Symptomatologie   | 22 |
| 2.2.3.3.1 | Symptômes sur les feuilles  | 22 |
| 2.2.3.3.2 | Symptômes sur les pousses herbacées   | 24 |
| 2.2.3.4   | Epidémiologie   | 24 |
| 2.2.3.4.1 | Sources de contamination  | 24 |
| 2.2.3.4.2 | Cycle de la bactérie  | 25 |
| 2.2.3.4.1 | Phase épiphyte  | 25 |
| 2.2.3.4.2 | Activité pathogène  | 25 |
| 2.2.3.4.3 | Voies de pénétration  | 25 |
| 2.2.4     | Etude du pouvoir pathogène  | 26 |
| 2.2.4.1   | Rôle de la syringomycine  | 26 |
| 2.2.4.1.1 | Structure   | 26 |
| 2.2.4.1.2 | Condition de production   | 26 |
| 2.2.4.1.3 | Activité biologique   | 26 |
| 2.2.4.2   | Rôle des sidérophores   | 26 |
| 2.2.4.2.1 | Structure   | 27 |
| 2.2.4.2.2 | Activité biologique   | 27 |
| 2.2.4.3   | Rôle des plasmides  | 28 |
| 2.2.2.4   | Déterminants chromosomiques du pouvoir pathogène                                  | 28 |
| 2.2.2.5   | Altérations des échanges transmembranaires  | 28 |
| 2.2.5     | Méthodes de lutte   | 28 |
| 2.2.5.1   | Mesures prophylactiques   | 29 |
| 2.2.5.2   | Lutte chimique  | 29 |
| 2.2.5.3   | Lutte biologique  | 29 |
| 2.3       | Classification et pouvoir pathogène de <u>P. syringae</u> pv. <u>savastanoi</u> . | 30 |
| 2.3.1     | Historique et classification  | 30 |
| 2.3.2     | Etude de l'agent causal   | 32 |
| 2.3.2.1   | Caractères morphologiques et culturaux  | 32 |
| 2.3.2.2   | Caractères biochimiques   | 32 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| 2.3.2.3     | Caractères génétiques  | 33 |
| 2.3.2.3.1   | ADN chromosomique  | 33 |
| 2.3.2.3.2   | ADN plasmidique  | 33 |
| 2.3.2.3.3   | Bactériophages   | 33 |
| 2.3.2.4     | Caractères sérologiques                                      | 34 |
| 2.3.3       | Les maladies dues à <u>P. syringae</u> pv. <u>savastanoi</u> | 34 |
| 2.3.3.1     | Répartition géographique                                     | 33 |
| 2.3.3.2     | Symptomatologie  | 35 |
| 2.3.3.2.1   | Symptômes sur l'olivier                                      | 35 |
| 2.3.3.2.2   | Symptômes sur le laurier rose                                | 35 |
| 2.3.3.2.3   | Symptôme sur le frêne  | 35 |
| 2.3.3.3     | Epidémiologie  | 36 |
| 2.3.3.3.1   | Sources de contamination                                     | 36 |
| 2.3.3.3.2   | Cycle de la bactérie   | 36 |
| 2.3.3.3.2.1 | Phase épiphyllie   | 36 |
| 2.3.3.3.2.2 | Activité pathogène   | 36 |
| 2.3.3.3.3   | Voies de pénétration   | 37 |
| 2.3.4       | Virulence et pouvoir pathogène                               | 37 |
| 2.3.4.1     | Rôle de l'acide indole acétique                              | 37 |
| 2.3.4.2     | Rôle de la cytokinine  | 39 |
| 2.3.4.3     | Rôle de la bactériocine                                      | 39 |
| 2.3.5       | Méthodes de lutte  | 40 |
| 2.3.5.1     | Mesures prophylactiques                                      | 40 |
| 2.3.5.2     | Lutte chimique   | 40 |
| 2.3.5.3     | Lutte biologique   | 40 |
| 2.4         | Taxonomie  | 41 |
| 2.4.1       | Classification   | 41 |
| 2.4.1.1     | Introduction   | 41 |
| 2.4.1.2     | Classification d'intérêt particulier                         | 42 |
| 2.4.1.3     | Classification naturelle phénétique                          | 43 |
| 2.4.1.4     | Classification naturelle phylogénétique                      | 44 |
| 2.4.1.5     | Evaluation et choix d'une classification                     | 44 |
| 2.4.2       | Taxonomie numérique  | 46 |
| 2.4.2.1     | Introduction   | 46 |
| 2.4.2.2     | Choix des souches  | 46 |
| 2.4.2.3     | Choix des caractères   | 47 |
| 2.4.2.4     | Méthodes de codage   | 48 |
| 2.4.2.5     | Calcul des distances   | 50 |
| 2.4.2.6     | Techniques d'agrégation                                      | 52 |
| 2.4.2.7     | Représentation   | 54 |
| 2.4.2.8     | Analyse des résultats  | 55 |
| 2.4.2.8.1   | Coupure du dendrogramme                                      | 55 |
| 2.4.2.8.2   | Coefficient de capacité diagnostique                         | 58 |
| 2.4.2.8.3   | Vigour et pattern  | 59 |
| 2.4.3       | Identification   | 60 |
| 2.4.3.1     | Clés dichotomiques   | 61 |
| 2.4.3.2     | Tables diagnostiques   | 61 |
| 2.4.3.3     | Identification numérique                                     | 63 |
| 2.4.3.4     | Fréquence modale   | 63 |
| 2.4.3.5     | Coefficient T  | 63 |
| 3.          | TRAVAUX PERSONNELS   | 64 |
| 3.1         | Matériel et méthodes   | 64 |
| 3.1.1       | Souches utilisées  | 64 |
| 3.1.2       | Caractères biochimiques classiques                           | 64 |
| 3.1.2.2     | Méthodes et principe   | 68 |
| 3.1.2.2.1   | Hypersensibilité sur tabac                                   | 68 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| 3.1.2.2.2  | Production de pigments fluorescents  | 68  |
| 3.1.2.2.3  | Activité levane sucrase  | 71  |
| 3.1.2.2.4  | Arginine dihydrolase   | 71  |
| 3.1.2.2.5  | Activité pectinolytique  | 72  |
| 3.1.2.2.6  | Hydrolyse de la gélatine   | 73  |
| 3.1.2.2.7  | Mise en évidence d'une tween<br>ésterase   | 73  |
| 3.1.2.2.8  | Recherche d'une activité DNase   | 74  |
| 3.1.2.2.9  | Recherche de l'esculine  | 74  |
| 3.1.2.2.10 | Réduction des nitrates en nitrites   | 75  |
| 3.1.2.2.11 | Oxydation de sucres simples  | 76  |
| 3.1.2.2.12 | Utilisation des acides organiques  | 76  |
| 3.1.2.2.13 | Recherche de la polypectate à pH 5<br>et pH 8,5  | 76  |
| 3.1.2.2.14 | Recherche de la cytochrome C oxydase   | 77  |
| 3.1.3      | Auxanogramme   | 77  |
| 3.1.2.1    | Souches étudiées   | 77  |
| 3.1.2.2    | Méthode et principe  | 78  |
| 3.1.4      | Méthodes de calcul   | 80  |
| 3.1.4.1    | Analyse factorielle des correspondances<br>multiples   | 80  |
| 3.1.4.2    | Classifications ascendantes et descendantes<br>hiérarchiques   | 80  |
| 3.1.4.3    | Taxonomie numérique  | 81  |
| 3.1.4.3.1  | Coefficient de Jaccard-Sneath  | 81  |
| 3.1.4.3.2  | Agrégation en grappes  | 81  |
| 3.1.4.3.3  | Tracé automatique  | 81  |
| 3.1.4.3.4  | Calcul du coefficient d'acuité   |     |
| 3.1.4.3.5  | Calcul du coefficient de capacité<br>diagnostique  | 82  |
| 3.1.4.3.6  | Calcul des paramètres d'identification   | 82  |
| 3.2        | RESULTATS  | 83  |
| 3.2.1      | Souches de <u>P. syringae</u> pv. <u>syringae</u>  | 83  |
| 3.2.1.1    | Caractères biochimiques en tubes   | 83  |
| 3.2.1.2    | Etude des 167 caractères biochimiques  | 86  |
| 3.2.1.2.1  | première analyse : variabilité des 50<br>souches isolées de laurier palme  | 86  |
| 3.2.1.2.2  | Deuxième analyse : variabilité des 50<br>souches de laurier palme et des 58<br>souches de <u>P. syringae</u> pv. <u>syringae</u><br>isolées de différents hôtes  | 92  |
| 3.2.1.2.3  | Troisième analyse : variabilité des 50<br>souches de laurier palme, 58 souches<br>isolées de différents hôtes, 4 souches de<br><u>Pseudomonas</u> phytopathogènes et les 50<br>souches des pathovars de <u>P. syringae</u> | 98  |
| 3.2.2      | Souches de <u>P. syringae</u> pv. <u>savastanoi</u>  | 102 |
| 3.2.2.1    | Première analyse : variabilité de<br>l'ensemble des souches testées  |     |
| 3.2.2.2    | Deuxième analyse : analyse séparée des<br>groupes I et II de Lelliott  |     |
| 3.2.2.3    | Troisième analyse : analyse séparée pour <u>P.</u><br><u>syringae</u> pv. <u>savastanoi</u>  | 135 |
| 3.2.3      | Variabilité phénotypique de <u>P. syringae</u> pv. <u>syringae</u><br>provenant de laurier palme et d'hôtes variés   | 145 |
| 4          | CONCLUSION   | 155 |
| 5          | BIBLIOGRAPHIE  | 157 |

## 1 INTRODUCTION

L'identification et la taxonomie des bacilles à Gram négatif reste un problème majeur en bactériologie. A l'intérieur de ce groupe bactérien immense comportant actuellement 12 familles, 40 genres et près de 200 espèces, la famille des Pseudomonadaceae possède un intérêt particulier en raison de la grande dispersion de ses membres dans l'environnement général (eaux, plantes, animaux) et hospitalier et de la pathogénéicité de certaines espèces.

La complexité du genre Pseudomonas retient l'attention des bactériologistes depuis plusieurs années, certaines de ses espèces présentent une grande hétérogénéité phénotypique et génotypique. Il apparaît donc nécessaire de compléter la taxonomie de ce genre précédemment définie et résumée dans les différentes éditions du Bergey's Manual.

Au cours de ces dernières années, les bactéries du genre Pseudomonas ont été étudiées avec un intérêt croissant, tant en bactériologie médicale qu'en phytopathologie. Le grand nombre d'espèces appartenant à ce genre ainsi que la diversité de leurs sources d'isolement posent souvent un problème de leur caractérisation. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant de définir de nouveaux critères facilitant l'identification du genre Pseudomonas dans le but de classer certaines espèces dont la position taxonomique est encore discutée.

Notre étude concerne les pseudomonas phytopathogènes dont la classification reste encore difficile car il existe peu de caractères phénotypiques différentiels et plusieurs groupes d'hybridation ADN/ADN peuvent être décrits dans une même espèce. Il faut noter que le pouvoir pathogène joue un rôle important dans la détermination de l'espèce ; la description des bactéries phytopathogènes est parfois succincte et le caractère principal d'identification de ces souches consiste à reconnaître l'hôte végétal sensible. Ce pouvoir pathogène est dû à la production d'une phytotoxine spécifique de l'espèce dont la synthèse est gouvernée par un plasmide.

Dans ce travail nous avons étudié la variabilité de deux sous-espèces de l'espèce Pseudomonas. syringae : P. syringae pv. syringae et P. syringae pv. savastanoi. La variabilité de ces deux pathovars de P. syringae a été étudiée sur les plans phénotypiques et génotypiques. Une analyse taxonomique des résultats a été faite dans un but de confirmer l'appartenance de P. syringae pv. syringae et P. syringae pv. savastanoi à l'espèce P. syringae.

P. syringae pv. syringae est responsable de la criblure bactérienne de laurier palme. Cette maladie a été décrite par De Boer en 1980. En France elle a été observée pour la première fois en 1976 dans la région d'Angers, sur les jeunes plants cv. Caucasica. La bactérie isolée par De Boer a été apparentée à l'espèce P. syringae et au pathovar syringae par Gardan et al, en 1989.

P. syringae pv. savastanoi est responsable de la tuberculose de l'olivier. La présence de bactéries dans les tumeurs de l'olivier fût découverte en 1886 par Arcangeli, ces

bactéries ont été dénommées Bacterium oleae. Peu après Savastano en 1887 ayant étudié la maladie en détail avait montré que la véritable cause de la maladie qu'il dénomma "Tuberculose de l'olivier", était due à Bacillus olea tuberculosis.

Sur le laurier rose, une maladie semblable à la tuberculose de l'olivier a été observée pour la première fois par Peglion en 1905 en Italie et dans les jardins de Monaco. La maladie a été attribuée à Bacillus oleae agent pathogène de la tuberculose de l'olivier. Cette bactérie est également responsable du chancre bactérien chez le frêne.

## 2. EXPOSE THEORIQUE.

### 2.1 Etude du genre Pseudomonas

#### 2.1.1 Historique de la systématique du genre Pseudomonas

Le genre Pseudomonas créé par MIGULA en 1894, représente un groupe de bactéries dont l'importance est remarquable. On trouve en effet des représentants dans presque tous les milieux naturels et certains ont un pouvoir pathogène affirmé pour l'homme et l'animal (P. aeruginosa, P. mallei et P. pseudomallei).

Cependant les pseudomonas sont aussi connus par leur rôle en phytopathologie. Ils représentent un des cinq groupes de bactéries phytopathogènes et les principales espèces de Pseudomonas parasites des plantes sont indiquées dans la 8<sup>e</sup> édition du Bergey's Manual.

Il y a une trentaine d'années des centaines de nomenclatures existaient déjà dans la littérature, mais seule l'espèce type P. aeruginosa était reconnaissable d'une façon sûre.

Les travaux effectués à partir de 1963 par une équipe de chercheurs de l'université de Californie à Berkeley, ont permis d'apprécier l'évolution de l'étude systématique du genre Pseudomonas.

Le but principal de ces travaux est de développer une nouvelle méthodologie pour la caractérisation phénotypique et génotypique de Pseudomonas. Un aspect très important de la méthodologie que l'équipe californienne avait développé est l'analyse de la gamme de composés organiques capable de servir comme source principale de carbone et d'énergie pour le genre Pseudomonas. La valeur taxonomique potentielle d'une telle analyse ressortait clairement des recherches précédentes de Den Dooren Dejong en 1926 (40), qui avait montré l'extraordinaire versalité nutritionnelle de certains membres de ce groupe. Pourtant, ces observations furent ignorées par les taxonomistes, et il a fallu attendre 40 ans avant qu'elles soient prises en considération et développées d'une façon systématique.

#### 2.1.2 Caractérisation phénotypique

L'étude phénotypique du genre Pseudomonas s'est appuyée pendant longtemps sur quelques caractères traditionnels : flagellation, oxydase, respiration anaérobie des nitrates, arginine dihydrolase, pigments hydrosolubles caractéristiques, enzymes périsplasmiques, thermotolérance.

Cependant la classification de certaines espèces restait encore difficile, Stanier et al en 1966 (162) ont appliqué une méthodologie d'analyse phénotypique grâce à l'étude de nouveaux caractères (assimilation d'une série de substrats carbonés ou auxanogramme).



Grâce à cet ensemble de caractères, une trentaine d'espèces fut décrite par Doudoroff et Palleroni, en 1974 (8<sup>e</sup> édition du Bergey's Manual) ce qui représente un progrès certain par rapport à l'édition précédente dans laquelle 150 "espèces" étaient repertoriées.

### 2.1.3 Caractérisation génotypique

Des études génomiques étaient nécessaires pour établir les rapports réciproques de cette trentaine d'espèces. Cette analyse débuta par une étude systématique des contenus en GC du DNA.

Les valeurs du GC% varient fortement chez les bactéries (25 à 75% environ). Le rang de variation pour une espèce est voisin de 2,5% (136).

Chez le genre Pseudomonas, le rang de variation autour de la moyenne pour l'ensemble des souches de chaque espèce est inférieur à plus ou moins 1,5. Cependant, une exception fut notée pour P. stutzeri (GC% : 61 à 66) : cette espèce apparaît composite et son statut taxonomique n'est peut être pas définitif.

Les premières expériences, par hybridation ADN/ADN, ont permis de placer la plupart des espèces dans un nombre restreint de groupes d'homologie (126).

Les membres de chaque groupe sont tous liés entre eux par un haut degré d'homologie de leur ADN, mais ils ne manifestent aucune homologie avec des espèces qui appartiennent à d'autres groupes. Cette analyse a confirmé le bien fondé génétique des groupes phénotypiques ; en effet chaque groupe phénotypique correspond à un groupe d'homologie de l'ADN.

Les hybridations entre ADN/ARN ribosomal, ont apporté les données les plus révélatrices concernant les rapports évolutifs du genre Pseudomonas.

On sait que les gènes qui codent pour l'ARN ribosomal sont mieux conservés que le reste du génome chez les bactéries (47).

Ces techniques d'hybridations ont mis en évidence des niveaux élevés d'homologies (80 à 100 %) entre les souches qui ne semblaient pas apparentées sur la base des hybridations ADN/ADN : l'hybridation ADN/ADN permet de définir les espèces, alors que l'hybridation ADN/ARN permet d'étudier les niveaux taxonomiques supérieurs.

Palleroni et Doudoroff en 1973 (125) furent les premiers taxonomistes à utiliser cette technique d'hybridation d'une façon systématique ; ces expériences révèlent l'existence de 5 groupes d'homologie relative à l'ARN ribosomal dans le genre Pseudomonas.

La figure (1) résume l'essentiel des données disponibles. On voit que le degré d'homologie de l'ARN ribosomal à l'intérieur de chaque groupe est très élevé. Mais entre les espèces de groupes différents, le degré d'homologie de l'ARN ribosomal est du même ordre que le degré d'homologie qui existe entre E.coli et n'importe quelle espèce de Pseudomonas.

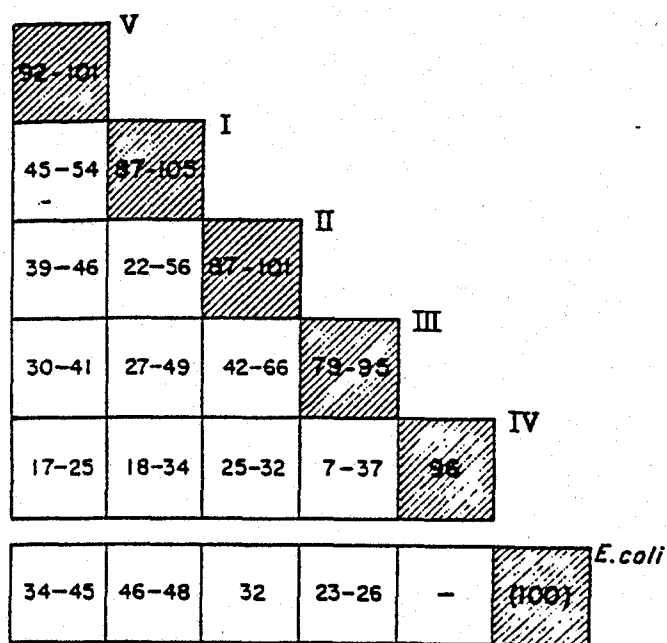


Figure 1 - Matrice des pourcentages de compétition dans les hybridations ADN/ARN ribosomal entre les différentes espèces de Pseudomonas.

Ces chiffres permettent le regroupement de l'ensemble des espèces en 5 groupes d'homologie de l'ARN ribosomal (I à V). En bas les chiffres obtenus dans les hybridations ADN/ARN ribosomal entre E. coli et les différentes espèces de Pseudomonas.

Cette étude démontre nettement que le genre Pseudomonas, tel qu'il a été défini par Stanier en 1964 (161) est constitué de 5 lignées évolutives distinctes, entre lesquelles l'éloignement génétique est tout aussi grand que l'éloignement génétique de chacune de ces lignées vis à vis des entérobactéries.

La figure (2) résume d'une façon schématique la structure évolutive de Pseudomonas. Les cercles gris correspondent à des groupes d'homologie de l'ARN ribosomal, à l'intérieur desquels les cercles blancs correspondent à des groupes d'homologie de l'ADN, plus étroits. Chaque point noir désigne une espèce, ou parfois un biotype.

La topologie des cercles blancs indique d'une façon aproximative les degrés de similitude génétique entre les espèces qui appartiennent à un seul groupe d'homologie de l'ARN ribosomal.

Ainsi, le groupe des 5 espèces qui appartiennent au groupe III d'homologie ARN ribosomal est constitué de 3 groupes distincts d'homologie de l'ADN : P. acidovorans, P. testosteroni, P. facilis, P. delafieldii, et une espèce isolée, P. saccharophila.

**Caractères**

| Groupe | Caractères |         |                                     |                      |                            |                  |        |                 |            | Espèce représentative |
|--------|------------|---------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------|------------------|--------|-----------------|------------|-----------------------|
|        | Levane     | Oxydase | Pourriture tissus de pomme de terre | Arginine dihydrolase | Hypersensibilité sur tabac | 2 céto-gluconate | Lipase | Dénitrification | Saccharose |                       |
| Ia     | +          | -       | -                                   | -                    | +                          | -                | -      | -               | +          | <i>P. syringae</i>    |
| Ib     | -          | -       | -                                   | -                    | +                          | -                | -      | -               | +          | <i>P. delphinii</i>   |
| II     | -          | -       | +                                   | -                    | +                          | -                | -      | -               | -          | <i>P. viridiflava</i> |
| III    | -          | +       | +                                   | -                    | +                          | -                | +      | +/-             | -          | <i>P. cichorii</i>    |
| IVa    | +          | +       | +                                   | +                    | -                          | +                | +      | +               | +          | <i>P. marginalis</i>  |
| IVb    | -          | +       | +                                   | +                    | -                          | +/-              | +/-    | -               | +/-        |                       |
| V      | -          | +       | -                                   | +                    | -                          | +                | +      | -               | -          | <i>P. tolaasii</i>    |

Tableau I . Principaux groupes de *Pseudomonas* phytopathogènes déterminés d'après le schéma de Lelliott et al (95).

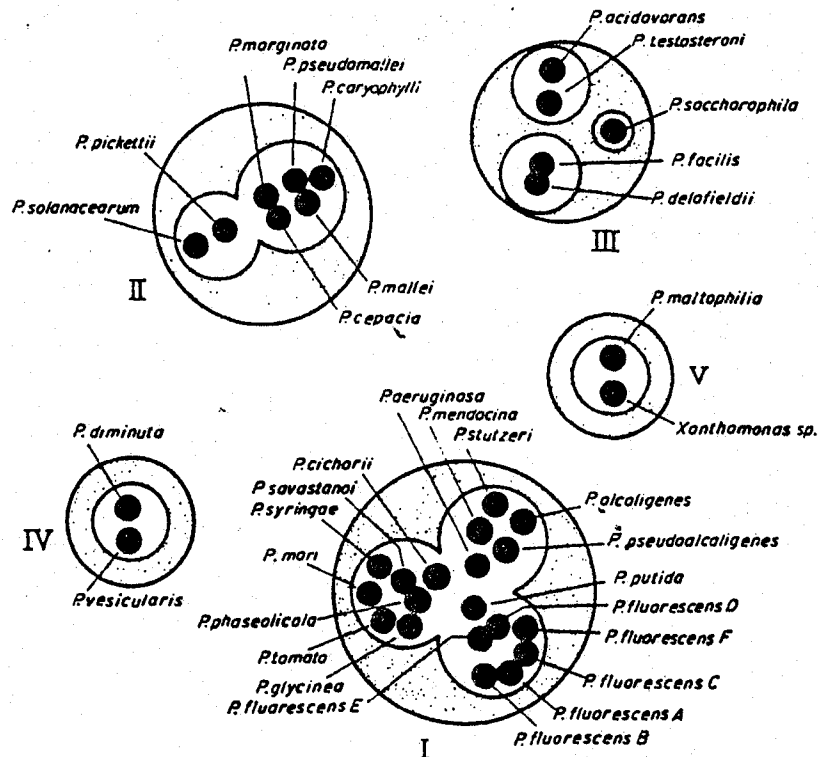


Figure 2 - Représentation diagrammatique des homologies de l'ARN ribosomal et de l'ADN parmi les espèces *Pseudomonas* d'après Palleroni et al (125).

Les homologues de l'ADN des espèces du groupe II sont indiquées sous forme de deux cercles tangents, ayant P. picketti comme pont de liaison. Cette espèce donne des hybrides ADN/ADN, d'un côté avec P. solanacearum, de l'autre avec les espèces du groupe cepacia-pseudomallei, tandis qu'aucune hybridation directe de l'ADN n'est détectable entre P. solanacearum et le groupe cepacia-pseudomallei.

Il est tentant d'accorder à chaque groupe d'homologie de l'ARN ribosomal le rang d'un genre, sinon d'une famille bactérienne.

Depuis l'établissement de ces 5 groupes génomiques, plusieurs travaux ont été effectués dans un but d'apprécier le degré d'homologie d'ADN/ARN ribosomal entre les différents groupes de Pseudomonas établis (43,44,45).

Ces travaux ont montré que le genre Pseudomonas tel qu'il a été décrit dans la 8<sup>e</sup> édition du Bergey's Manual comprend 5 groupes :

- Groupe génomique I : complexe P. fluorescens
- Groupe génomique II : complexe P. acidovorans
- Groupe génomique III : complexe P. solanacearum
- Groupe génomique IV : complexe P. maltophila
- Groupe génomique V : complexe P. diminuta,  
P. vesicularis.

Les liens de parenté de chacun de ces groupes génomiques avec d'autres genres bactériens ont été déterminés par plusieurs auteurs (43,45,122,124,185,186). Ces auteurs, ont montré la dispersion des différents groupes génomiques du genre Pseudomonas parmi les autres genres bactériens.

A partir de ces données, on peut conclure que le genre Pseudomonas ne peut subsister plus longtemps sous sa forme présente mais, il est souhaitable qu'il soit rapidement subdivisé en plusieurs nouveaux genres.

#### 2.1.4 Position taxonomique des pseudomonas phytopathogènes

L'entrée dans la systématique de Pseudomonas phytopathogènes commence sous le nom de genre Phytomonas définis comme des bacilles donnant des colonies jaunes ou blanches, mobiles ou immobiles, donnant ou non un pigment jaune. Ceci correspondait donc aux genres phytopathogènes actuellement rangés dans les genres Pseudomonas, Xanthomonas et Corynebacterium.

La première édition du Bergey's complétait la série des phytopathogènes avec le genre Erwinia, cette opération ayant pour but de placer ensemble tous les genres phytopathogènes et par conséquent d'établir le pouvoir pathogène comme seul critère de détermination acceptable.

| Groupe | Composition   |
|--------|---|
| IA     | <u>P. savastanoi</u> (7),   |
| IB     | <u>P. phaseolicola</u> (8),   |
| IC     | <u>P. phaseolicola</u> (1), <u>P. mori</u> (1), <u>P. morsporunorum</u> (1),<br><u>P. glycinea</u> (1), <u>P. mori varhuszi</u> (1),  |
| ID     | <u>P. coronofaciens</u> (2), <u>P. delphinii</u> (1), <u>P. garcae</u> (1),<br><u>P. glycinea</u> (1), <u>P. dysoxyli</u> (1),  |
| IE     | <u>P. tomato</u> (2),   |
| IF     | <u>P. syringae</u> (7), <u>P. pisi</u> (1), <u>P. angulata</u> (1), <u>P. aptata</u><br>(1), <u>P. panicis</u> (1),   |
| IG     | <u>P. viridiflava</u> (1), <u>P. syringae</u> (2),  |
| IH     | <u>P. cichorii</u> (2),   |
| II     | <u>P. pseudoalcaligenes</u> (1), <u>P. alcaligenes</u> (1), <u>P. aeruginosa</u> (1),<br><u>P. fluorescens</u> (4), <u>P. primulae</u> (1),<br><u>P. angulata</u> (1), <u>P. marginalis</u> (1), <u>P. putida</u> (2),                              |
| III    | <u>P. facilis</u> (1), <u>P. acidovorans</u> (1), <u>P. eutropha</u> (1), <u>P. testosteroni</u> (1),<br><u>P. rubrisubalbicans</u> (1), <u>P. stutzeri</u> (1), <u>P. solanacearum</u> (1), <u>P. setariae</u> (1),<br><u>P. rubrilineans</u> (1), |
| IV     | <u>P. cepacia</u> (1), <u>P. multivorans</u> (1).   |

Tableau II. Composition des groupes admis par Sands et al (142).

(Le chiffre entre parenthèse représente le nombre de souches).

Cependant l'analogie de ces germes avec des bactéries décrites en bactériologie générale ou médicale les a conduit à leur vraie place en 1948 dans la 6<sup>e</sup> édition, en 1957 dans la 7<sup>e</sup> édition et en 1974 dans la 8<sup>e</sup> édition du Bergey's Manual.

Actuellement les pseudomonas phytopathogènes se situent dans le même groupe que les pseudomonas pathogènes pour l'homme. La séparation pratiquée autrefois entre les espèces phytopathogènes et les autres n'est plus valable.

Le nombre d'espèces de Pseudomonas phytopathogènes devient de plus en plus important ; la caractérisation d'une espèce est souvent déterminée par un nombre restreint de caractères biochimiques et surtout par le pouvoir pathogène sur la plante hôte.

En pratique, il faut bien noter que les critiques que font les phytopathologistes s'adressent essentiellement au fait que les caractères ne sont pas en relation évidente avec le pouvoir pathogène.

Lelliott et al en (1966) (95), proposent un schéma de classification phénétique portant sur 9 caractères biochimiques (Tableau I), avec une orientation plus fondamentale, Misaghi et Grogan en 1969 (119), utilisent 133 caractères et 177 isolats.

En 1970, Sands et al (142) examinent un grand nombre de souches en choisissant les critères de Stanier (1966) in (161), et en leur adjoignant une quarantaine d'autres caractères mettant en évidence davantage de propriétés plus particulières aux phytopathogènes. Leurs résultats (Tableau II) interprétés par une analyse numérique, montre la répartition des pseudomonas phytopathogènes en quatre groupes, cette répartition est en accord avec les résultats de Stanier (162).

Les résultats de Sands mettent en évidence la similitude qui existe entre tous les pseudomonas phytopathogènes fluorescents qui sont dans le même groupe I.

L'individualisation de deux espèces dans le groupe I : P. syringae (souche oxydase négative) et P. cichorii (souche oxydase positive) est plus critiquable du moins au vu des résultats obtenus.

L'étude précise par De vos et al, en 1985 (44) portant sur les techniques d'hybridations ADN/ARN 23 S montre l'existence de 4 groupes de Pseudomonas phytopathogènes : groupe P. fluorescens, groupe P. solanacearum, groupe P. acidovorans et le groupe Xanthomonas. La majorité des espèces phytopathogènes sont situées dans le groupe P. fluorescens correspondant à la section I de la 8<sup>e</sup> édition du Bergey's Manual ; aussi De Vos propose de limiter le genre Pseudomonas au groupe P. fluorescens.

## 2.2 La criblure bactérienne du laurier palme

### 2.2.1 Plante hôte

Le laurier palme (*Prunus laurocerasus* L, *Laurocerasus* Roeme, *Cerasus laurocerasus* Loisel) est une dicotylédone appartenant à la famille des Rosacées, à la tribu des Prunoidées, au genre Prunus, au sous-genre Laurocerasus. Ce genre comprend les espèces Prunus laurocerasus et Prunus lusitanica L. (Laurier du Portugal). Il est communément appelé laurier palme, laurier cerise, laurier commun, laurier amande ou bien encore laurier royal.

#### 2.2.1.1 Aire d'origine géographique

C'est un arbre originaire du sud-est de l'Europe et de l'Asie mineure. On le trouve dans le Caucase, le sud de la Russie, la région pontique au nord de l'Iran (Figure 3). Dans son aire d'origine sous des climats très doux, il peut atteindre 2 à 6 mètres de hauteur (74,170).

Il a été introduit en Europe occidentale au XV<sup>ème</sup> siècle. En France il est utilisé comme arbuste d'ornement pour constituer le plus souvent des haies pouvant atteindre 1,2 à 3,5 mètres (117).

C'est une plante de sous bois supportant l'ombre mais sensibles aux froids rigoureux (au dessus de -10°C).

Le Prunus laurocerasus est caractérisé par une croissance rythmique vigoureuse et étendue ; dans de bonnes conditions, il peut atteindre 6 à 8 mètres de hauteur en une dizaine d'années.

Il existe de nombreux cultivars (plus de quinze ont été décrits) à l'intérieur de l'espèce laurocerasus. Leur classification peut être basée sur la morphologie des feuilles ainsi que sur l'aspect général de la plante (Tableau III).

#### 2.2.1.2 Morphologie

Les feuilles sont de forme ovale, lancéolée ou obovale, la face supérieure est vert brillant, la face inférieure, vert pâle mat, porte le plus souvent quatre glandes nectarifères ; les deux faces sont glabres ; le bord du limbe est entier ou légèrement dentelé, il peut être légèrement enroulé.

Les jeunes tiges sont glabres, vertes et, en vieillissant, elles se lignifient et brunissent.

Les fleurs sont petites et éclosent en mai. Elles sont blanches, assemblées en grappes axillaires d'une longueur de 5 à 12 cm.

Les fruits sont ovoïdes, rouges au début, puis finalement noirs, et de la taille d'une cerise.

Toutefois ils ne sont pas comestibles, tout comme les feuilles d'ailleurs. En effet, ces organes contiennent des substances portant des radicaux cyanhydriques qui révèlent une

Tableau III - Caractéristiques des principaux cultivars de laurier palme commercialisés en France.

| Cultivar     | Dimensions foliaires (cm)<br>* | Caractéristiques   |
|--------------|--------------------------------|--|
| Rotundifolia | L : 13-17<br>l : 6-8           | Forme buissonnante. Vigoureux.<br>Feuilles grandes, larges obovales, arrondies au sommet, courtement acuminées, plus larges aux deux-tiers supérieurs, vert clair brillant.<br>Sensible aux fortes gelées. Excellent pour les haies. |
| Caucasica    | L : 13-17<br>l : 3.5-5         | Vigoureux à croissance verticale.<br>Feuilles plutôt étroites, vert foncé.<br>Sensible aux gelées. Excellent pour les haies.   |
| Otto Luyken  | L : 7-11<br>l : 2-3            | Arbuste bas et compact à tiges dressées. Très rustique.<br>Feuilles lancéolées, étroites, pointues, vert foncé, à bord entier.   |
| Zabeliana    | L : 9-14<br>l : 2-3 (3-5)      | Croissance plus ou moins horizontale. Cultivar nain à port étalé.<br>Feuilles oblongues, lancéolées, vert clair et peu brillantes.<br>Introduit de Bulgarie en 1898. Rustique. Excellent pour les rocailles.                         |
| Herbergii    | L : 9-14<br>l : 2-4 à 5        | Compact et pyramidal.<br>Feuilles finissant en pointe, faiblement brillantes, plates à bord plus ou moins entier. Elles ont l'aspect du <i>Laurus nobilis</i> .<br>Particulièrement rustique. Excellent pour les haies.              |
| Latifolia    | L : 25<br>l : 25               | Feuilles vert foncé aussi larges que longues.<br>Très sensible au froid.   |
| Schipkaensis | L : 5-12                       | Feuilles oblongues elliptiques, luisantes.<br>Importé de Bulgarie en 1889. Rustique.   |
| Mischeana    | L : 9-14<br>l : 4-4,5          | Plat et étalé.<br>Feuilles larges.<br>Originaire des Balkans. Très rustique.   |
| Reynvaanii   | L : 9-14<br>l : 2,5-4          | Feuilles mates à bord parfois légèrement ondulé, faiblement denté. Pliure canaliculée caractéristique.   |

\* L : longueur l : largeur



forte odeur d'amande lorsqu'on les froisse. Les feuilles renferment deux glucosides toxiques : la prulaurasine et la prunasine. On en prépare une eau de laurier cerise qui est un stimulant respiratoire (24).

#### 2.2.1.3 Croissance et activité photosynthétique

La croissance du laurier palme n'est pas continue. Elle s'établit par la succession d'unités de croissance (15,90). Le nombre d'unités varie entre 2 et 4 pour les jeunes plants. La nutrition azotée a une action sur la croissance (15). L'activité photosynthétique augmente avec l'apparition des jeunes feuilles (191).

#### 2.2.1.4 Exigences culturales et nutritionnelles

Le laurier palme supporte tous les sols sauf ceux à calcaire actif. Il préfère les sols perméables, humides, amendés avec la tourbe ou du terreau de feuilles (35).

Les besoins nutritionnels du laurier palme sont peu connus. Lemaire, en 1980 (97) au cours d'une enquête réalisée chez différents pépiniéristes a montré que les besoins en CaO sont aussi élevés que ceux en K<sub>2</sub>O (TABLEAU IV).

Un pH compris entre 4,5 et 5,5 permet une bonne croissance du végétal (90).

#### 2.2.1.5 Criblure bactérienne

De Boer, en 1980 (39) a décrit au Canada, sur le cultivar Otto Luyken, une maladie caractérisée par l'apparition de chancres sur rameaux et de taches foliaires évoluant en criblure. Une bactérie, isolée de lésions et identifiée sommairement comme Pseudomonas syringae, a été incriminée comme étant l'agent causal de cette maladie dont les symptômes ont été reproduits.

La criblure du laurier palme avait été observée pour la première fois en France, en août 1976, dans la région d'Angers. Les bactéries isolées de lésions et produisant des symptômes après leur pulvérisation sur les feuilles, ont été apparentées à P. syringae pv. syringae (57).

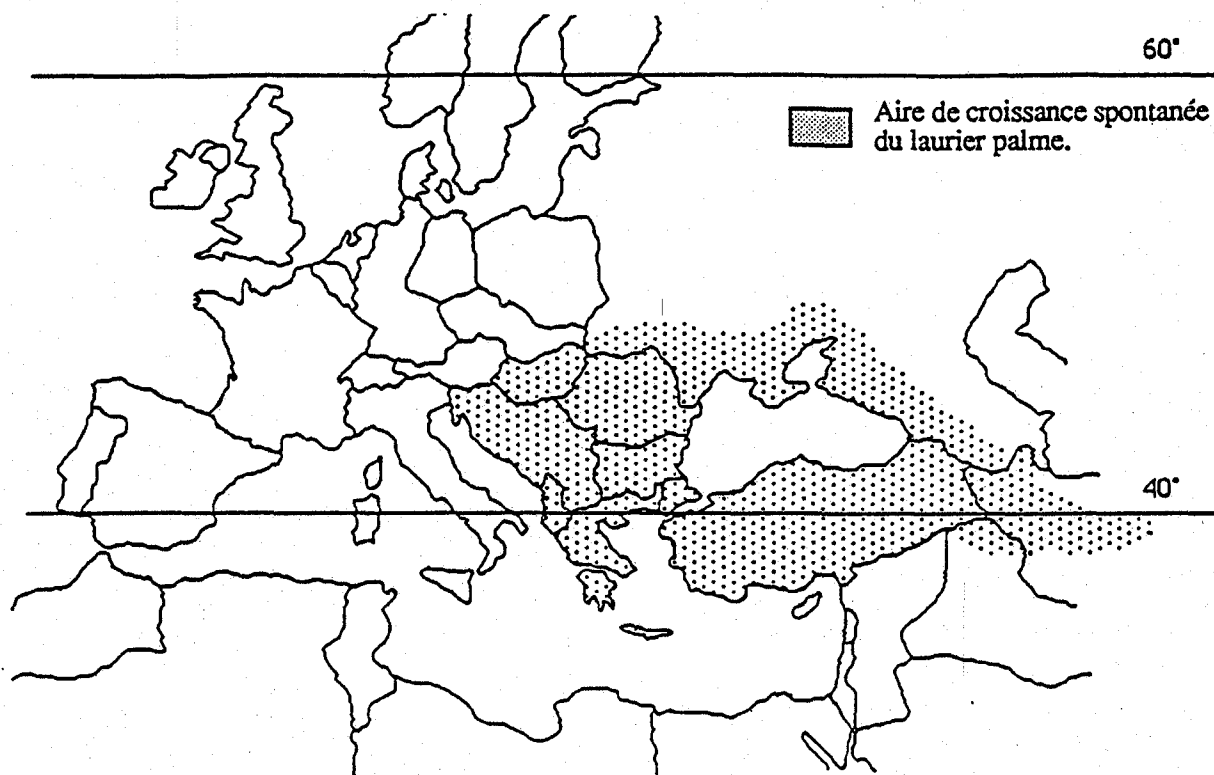
#### 2.2.2 Etude de l'agent causal

##### 2.2.2.1 Caractères morphologiques et culturaux

P. syringae pv. syringae, appartient à l'espèce Pseudomonas syringae. Cette bactérie est un bacille à Gram négatif, de taille variable : 0,7 à 1,2  $\mu$ m de large sur 1,5  $\mu$ m de long (123).

Elle est aérobic stricte non sporulée, son métabolisme respiratoire est oxydatif. Elle est mobile grâce à la présence de 1 à 5 flagelles polaires (59).

Figure 3 - Aire d'origine géographique du laurier palme.



| Nombre de plantes à l'hectare | Hauteur (cm) | Diamètre du tronc (mm) | Rendement MS. t/ha |
|-------------------------------|--------------|------------------------|--------------------|
| 500.000                       | 36,3         | 8                      | 9,91               |

|                           | N   | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | K <sub>2</sub> O | CaO  | MgO  |
|---------------------------|-----|-------------------------------|------------------|------|------|
| Exportation (Kg/ha)       | 162 | 30                            | 140              | 144  | 28   |
| Equilibre de la nutrition | 1   | 0,18                          | 0,84             | 0,89 | 0,17 |

Tableau IV - Rendement en matière sèche et exportation d'un hectare de laurier palme d'une pépinière jeunes plants.

Les colonies sont circulaires, rugueuses ou légèrement muqueuses, plus au moins opaques de couleur crème ou blanche sur milieu King B. Sur ce milieu elles produisent un pigment bleu vert (pyoverdine) fluorescent sous les U.V.

La température maximale de croissance varie entre 25 et 30°C.

#### 2.2.2.2 Caractères biochimiques

Suivant la clé de détermination proposée par Hildebrand (73), P. syringae pv. syringae n'accumule pas de granules de poly-béta-hydroxybutyrate, ne possède pas de cytochrome C oxydase ni d'arginine dihydrolase, ne dégrade pas les polypectates et n'utilise pas le D(-) tartrate.

L'assimilation ou non de composés utilisés comme source de carbone et d'énergie permet de distinguer P. syringae pv. syringae des autres pathovars (TABLEAU V).

P. syringae pv. syringae appartient au groupe Ia de Lelliott et al (95) défini par 9 caractères biochimiques, au groupe Ia de Mishagi et Grogan (119) et au groupe If déterminé par Sands et al (142). Ce dernier utilise 34 à 43 % des 165 substances étudiées.

Toutefois, cette détermination reste limitée. En effet, le nombre de substances est trop important pour être utilisé en routine. De plus on s'aperçoit très vite que lorsqu'un grand nombre de souches d'un même hôte est analysé il existe alors une grande variabilité sur un nombre restreint de caractères. Ainsi, le L(+) tartrate, considéré comme non utilisé dans la littérature (22,73,123) est consommé par un biotype majoritaire de la flore de vigne (103).

#### 2.2.2.3 Caractères génétiques

##### 2.2.2.3.1 ADN chromosomique

D'après les travaux de Palleroni et al en 1973 (125) et de De Vos et De Ley en 1983 (43) P. syringae Van Hall 1902, 141AL se trouve dans le groupe syringae pour l'hybridation DNA/DNA. Malgré la diversité des souches et de leur origine, il se trouve que le pourcentage d'homologie est très élevé (71 à 100 %) (129). Par la technique d'hybridation DNA/DNA à la nucléase S1, la souche type de P. syringae pv. syringae s'hybride à moins de 61 % avec d'autres pathovars : pv. savastanoi 54 %, pv. persicae 46 %, pv. tomato 51 %, pv. phaseolicola 55,9 %, pv. glycinea 50,1 %.

Le contenu en bases guanine et cytosine est compris entre 59 et 61 % (44,129).

L'utilisation de fragments de restriction (RFLP) des DNA chromosomiques a montré qu'il y avait une grande diversité génétique au sein du pathovar syringae contrairement au pathovar tomato (46).

Tableau V - Caractères biochimiques différentiels de certains pathovars de Pseudomonas. syringae

| Caractéristiques    | <i>tabaci</i> | <i>lachrymans</i> | <i>syringae</i> | <i>aptata</i> | <i>pisii</i> | <i>anthirrhini</i> | <i>morsprunorum</i> | <i>delphinii</i> | <i>tomato</i> | <i>eribotryae</i> | <i>sesami</i> | <i>savastanoi</i> | <i>coronafasciens</i> | <i>striafasciens</i> | <i>mori</i> | <i>passiflorae</i> | <i>glycinea</i> | <i>phaseolicola</i> | <i>persicae</i> | <i>cannabina</i> |
|---------------------|---------------|-------------------|-----------------|---------------|--------------|--------------------|---------------------|------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|-----------------------|----------------------|-------------|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------|------------------|
| Formation de Levane | +             | +                 | +               | +             | +            | +                  | +                   | d                | +             | +                 | +             | -                 | +                     | +                    | +           | -                  | +               | +                   | +               | +                |
| Pectinolyse *       | 4,8           | 4,8               | -               | -             | -            | 4                  | 4                   | 4                | 4             | 4                 | 4,8           | 4                 | -                     |                      | 4           |                    | 4               | 4                   | 4               | 4                |
| β-glucosidase       | +             | +                 | +               | +             | d            | +                  | -                   | +                | +             | +                 | -             | +                 | +                     | +                    | -           | +                  | -               | -                   | -               | -                |
| Croissance sur      |               |                   |                 |               |              |                    |                     |                  |               |                   |               |                   |                       |                      |             |                    |                 |                     |                 |                  |
| Mannitol            | +             | +                 | +               | +             | +            | +                  | +                   | +                | +             | +                 | -             | +                 | +                     | +                    | +           | +                  | d               | -                   | +               | -                |
| Bétaine             | +             | -                 | +               | +             | +            | +                  | +                   | +                | +             | +                 | +             | +                 | +                     | +                    | -           | +                  | -               | d                   | -               | +                |
| Inositol            | +             | +                 | +               | +             | +            | +                  | +                   | +                | +             | -                 | +             | d                 | +                     | +                    | +           | +                  | +               | -                   | -               | -                |
| Sorbitol            | +             | +                 | +               | +             | +            | +                  | +                   | +                | +             | +                 | -             | d                 | +                     | +                    | d           | +                  | -               | -                   | +               | -                |
| Trigonelline        | +             | +                 | +               | +             | +            | +                  | +                   | +                | +             | +                 | +             | d                 | -                     | -                    | +           | -                  | +               | +                   | -               | +                |
| Quinate             | +             | +                 | +               | +             | +            | +                  | +                   | +                | +             | +                 | +             | -                 | +                     | -                    | -           | +                  | +               | +                   | -               | -                |
| Erythritol          | d             | +                 | +               | +             | d            | -                  | d                   | +                | -             | +                 | +             | -                 | +                     | +                    | -           | +                  | -               | -                   | -               | -                |
| L-Tartrate          | +             | +                 | -               | -             | -            | -                  | +                   | -                | -             | +                 | +             | d                 | -                     | -                    | -           | -                  | -               | -                   | -               | -                |
| D-Tartrate          | -             | -                 | d               | +             | -            | -                  | -                   | -                | +             | -                 | -             | -                 | -                     | -                    | -           | -                  | -               | -                   | -               | -                |
| L-Lactate           | -             | -                 | +               | +             | d            | -                  | -                   | -                | -             | -                 | -             | -                 | -                     | -                    | -           | -                  | -               | -                   | -               | -                |
| Anthranilate        | -             | -                 | -               | -             | -            | -                  | +                   | -                | -             | -                 | -             | d                 | -                     | -                    | -           | -                  | -               | -                   | -               | -                |
| Homosérine          | -             | -                 | -               | -             | +            | +                  | -                   | -                | -             | -                 | -             | -                 | -                     | -                    | -           | -                  | -               | -                   | -               | -                |

\* milieu de HILDEBRAND (1971)

+ : caractère positif  
 - : caractère négatif  
 d : caractère variable

Sur 40 souches isolées d'érable, de poirier et de plantes herbacées, 21 profils ont été enregistrés après digestion par l'enzyme de restriction EcoR1, montrant encore la diversité génétique de P. syringae pv. syringae (107).

#### 2.2.2.3.2 ADN plasmidique

Comme chez beaucoup de bactéries, la présence de plasmides de poids moléculaire variable a été mise en évidence chez P. syringae pv. syringae. Certains, trouvés chez des souches de maïs, d'abricotier et d'amandier ont un poids moléculaire d'environ 35 mégadaltons. Ces plasmides sont conjugatifs (60). L'utilisation d'éléments transposables comme le Tn5 semble être bien adaptée à P. syringae pv. syringae pour l'obtention de mutants chromosomiques (3) ou plasmidiques (17,60).

Le rôle des plasmides est controversé. Gonzalez et Vidaver en 1978 (61) ont montré une relation entre la présence de plasmide et la production de syringomyce (voir paragraphe 2.2.4). Toutefois cette hypothèse semble maintenant abandonnée. En effet, Currier et Morgan en 1983 (38), Gonzalez et al en 1984 (60) et Xu et Gross en 1988 (187) ont démontré que les souches sans plasmide produisent toujours une toxine.

#### 2.2.2.3.3 Bactériophages et bactériocines

Les bactériophages peuvent dans certains cas être spécifiques d'un pathovar (37) et pour P. syringae pv. syringae parfois même de l'hôte (59).

Les souches de P. syringae pv. syringae isolées de poirier en Angleterre ont montré une sensibilité aux phages 12B, S3, 017 (59).

Quatre-vingt deux souches isolées au nord-ouest des Etats-Unis d'hôtes variés, ont été réparties en neuf groupes de sensibilité aux phages et onze groupes de production de bactériocines. Les souches isolées de poirier se sont montrées peu sensibles aux phages 12B, S3 et 017 contrairement aux souches isolées d'Angleterre.

La sensibilité aux phages ainsi que la production de bactériocines sont des facteurs variables pour P. syringae pv. syringae (131) mais permettent de distinguer des groupes géographiquement distincts qui se trouvent être physiologiquement semblables.

#### 2.2.2.4 Caractères sérologiques

En fonction des techniques utilisées, les souches de P. syringae pv. syringae se répartissent en différents sérogroupe (Tableau VI). Le pouvoir pathogène n'a pu être mis en relation avec le type d'antigènes utilisés .

Casano et al en 1987 (28) ont montré que les anticorps monoclonaux utilisés ont un intérêt partiel pour P. syringae pv. syringae.

Tableau VI-Résultats des principaux travaux sérologiques menés sur *P. syringae*

| Antigènes utilisés pour la réalisation du sérum                    | Méthodes                                    | Antigènes utilisés   | Nombre de souches  | Résultats   | Remarques   | Références                       |
|--|---|--|--|---|---|----------------------------------|
| Bactéries lyophilisées   | agglutination en tube                       | bactéries entières   | 4 souches provenant d'amandier, de pêcher et de cerisier | 8 groupes sérologiques  | hétérogénéité rendant difficile de réduire à 1 seul groupe sérologique                                      | PERLASCA (1960)                  |
| Bactéries entières   | agglutination immunodiffusion (OUCHTERLONY) | bactéries entières et bactéries chauffées                      | 17 souches provenant de 11 hôtes différents              |   | les antigènes thermolabiles donnent des réactions non spécifiques contrairement aux antigènes thermostables | LOVREKOVICH <i>et al</i> (1963)  |
| Bactéries ultrasonnées autoclavées à 121°C<br>Chauffées 1h à 100°C | immunodiffusion (OUCHTERLONY)               | Chauffées 1h à 100°C   | 359 souches isolées de 18 hôtes différents               | 10 sérotypes déterminés d'après les antigènes stables à la chaleur                            | pas de corrélation avec l'origine de l'hôte. Sauf pour les souches isolées de lilas, prunier et amandier.   | OTTA et ENGLISH (1971)           |
| Bactéries entières   | agglutination sur lame                      |  | 62 souches isolées de 10 hôtes différents                | 2 groupes sérologiques  |   | OPREA (1971)                     |
| Bactéries entières formolées                                       | fixation du complément                      | bactéries ultrasonnées   |  | même sensibilité des pathovars <i>phaseolicola</i> -, <i>syringae</i> et <i>mors-prunorum</i> |   | COLÉNO <i>et al</i> (1971)       |
| Bactéries entières ou bactéries chauffées à 100° pendant 2,5 h     | agglutination immunodiffusion (OUCHTERLONY) | Bactéries entières ou bactéries chauffées à 100° pendant 2,5 h | 31 souches   | 3 groupes sérologiques  | hétérogénéité   | PASTUSHENKO et SIMONOVICH (1979) |
| Bactéries isolées de blé ou de lilas                               | agglutination                               |  |  | agglutination avec le sérum homologue uniquement  | présence de différents groupes sérologiques   | ARSENJEVIC (1986)                |
| Bactéries ultrasonnées   | immunodiffusion                             |  | 3 souches  | 28 ou 29 pics de précipitation  | 2 à 3 pics différent avec les pathovars <i>phaseolicola</i> et <i>tabaci</i>                                | EL-KADY <i>et al</i> (1986)      |
| Bactéries entières formolées à 0.5%                                | immunodiffusion (OUCHTERLONY)               | bactéries entières   | 1 (souche type)  | <i>P. s. pv. syringae</i> est regroupé dans le séro-groupe PER-TOM-SAV                        |   | SAUNIER et SAMSON (1987)         |

La spécificité antigénique et la variabilité de P. syringae pv. syringae semblent associées à l'antigène somatique O, thermostable. Le lipopolysaccharide (L.P.S) représente la majeure partie de l'antigène O. En immunodiffusion, il correspondrait à la ligne de précipitation proche du puit contenant l'antigène (69). Sa composition a été déterminée à partir des souches isolées de cerisiers et de poiriers. Il contient du rhamnose et du glucose. La présence de fucose est variable selon les souches. Les déterminants antigéniques du L.P.S. apparaissent plus hétérogènes au sein du pathovar syringae qu'au sein du pathovar mrosprunorum (192).

Les nombreuses méthodes utilisées en sérologie montrent qu'il y a une grande variabilité au sein du pathovar syringae.

### 2.2.3 Les maladies dues à P. syringae pv. syringae

#### 2.2.3.1 Historique

Pseudomonas. syringae a été isolé pour la première fois en 1902 par VAN HALL à partir de lilas.

De nombreux synonymes, 57 au total, lui ont été attribués (22,26).

Très vite un problème taxonomique s'est posé devant le nombre croissant d'espèces dénommées par le concept : une souche, un hôte, une espèce.

La définition des groupes Lelliott et al en 1966 (95), des pathovars Young et al en 1978 (190), Dye et al en 1980 (49), ainsi que l'analyse taxonomique des caractères biochimiques et physiologiques (119,142), ont permis de distinguer les différentes souches de Pseudomonas fluorescents, oxydase négative. Les souches de Pseudomonas. syringae ont été renommées en 1980, P. syringae pathovar. syringae.

#### 2.3.3.2 Répartition géographique

P. syringae pv. syringae est réparti sur tous les continents. 57 pays ont été dénombrés par Bradbury en 1986 (22).

On rencontre la bactérie dans les zones de production intensive:

- sur cerisier en Angleterre (59), en Pologne, au Chili (92,93), au Portugal (113), en Australie (184), en Afrique du Sud (137), en Hongrie (163),
- sur abricotier en France (56,134), en Yougoslavie (6), au Portugal (113), en Hongrie (86), aux Etats Unis, en Australie (184),
- sur prunier en Grande-Bretagne (59), en Afrique du sud (137),
- sur pêcher en France (58), aux Etats Unis (50),

- sur poirier et pommier en Afrique du Sud (108,109),
- sur citrou (127),
- sur maïs aux Etats-Unis (147),
- sur abricot aux Etats Unis (75,98,140),
- sur laurier palme au Canada (39), en France (57).

### 2.2.3.3 Symptomatologie

La symptomatologie prend des aspects variés probablement en fonction du cultivar attaqué, de l'époque d'évolution des symptômes et de la quantité des organes atteints (feuilles jeunes ou âgées, rameaux herbacés)

#### 2.2.3.3.1 Symptômes sur les feuilles

Sur les jeunes feuilles, les symptômes les plus typiques sont bien visibles par transparence et se manifestent d'abord par des taches vitreuses dont le centre, en se nécrosant rapidement, prend un aspect brúnatre plus au moins foncé ; une auréole chlorotique entoure très vite cette partie nécrosée est délimitée par un liséré brillant où se forme l'abscission du limbe. La partie nécrosée du limbe entourée de l'auréole jaune se sépare plus au moins rapidement du reste de la feuille pour former un trou, d'où le nom de criblure donnée à cette maladie (photo 1 et 2).

Sur les feuilles plus âgées, en observation en lumière incidente, vues de la face supérieure de la feuille, les grandes taches sont bien typiques : les points nécrotiques auréolés de jaune sont de plus en plus visibles au cours de l'évolution de la tache. A la face inférieure, les taches apparaissent sous forme de points vitreux légèrement en relief (photo 3). En s'agrandissant, le centre se nécrose, mais l'auréole chlorotique est peu visible tandis que la limite de la tache où s'opérera la criblure est nettement marquée par un liséré en relief d'aspect vitreux.

Dans la nature, les premiers stades d'apparition des symptômes sont très fugaces et ne peuvent être réellement observés qu'en conditions artificielles d'inoculation.

Le diamètre des taches individualisées peut varier de 2 à 10 mm ; les taches évoluent en criblure en 5 à 10 jours. Quand les très jeunes feuilles sont attaquées précocement, l'évolution vers la criblure est rapide et il s'ensuit une déformation parfois très importante du limbe. Quand les taches sont très nombreuses sur une feuille, parallèlement à l'évolution vers la criblure, on peut observer d'abord une chlorose débordant l'aire des taches, puis une chute de la feuille. Dans les cas de forte attaque, le sol des pépinières de culture en pot est jonché de feuilles. Ces chutes de feuilles ont pour conséquence d'affaiblir les plantes et d'altérer leur aspect esthétique. Les attaques sont d'autant plus graves que les plantes sont plus jeunes (photo 4 et 5).





PHOTO 1. Taches nécrotiques sur de très jeunes feuilles.



PHOTO 2. Taches nécrotiques entourées d'un halo de décoloration.



PHOTO 3. Vue d'incidence de taches nécrotiques sur des feuilles adultes.



PHOTO 4. Début d'apparition des taches de décoloration après inoculation artificielle.



PHOTO 5. Taches nécrotiques entourées de halos de décoloration après inoculation artificielle.



PHOTO 6. Dessèchement d'une pousse terminale recourbée en crosse.



PHOTO 7. nécroses apicales avec prolongements nécrotiques le long des nervures principales et nécrose sur tige.



PHOTO 8. Fortes criblures sur jeunes pousses.

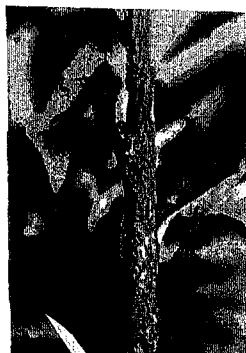


PHOTO 9. Chancre sur tige herbacée.



PHOTO 10. Attaque généralisée de criblure bactérienne

#### 2.2.3.3.2 Symptômes sur les pousses herbacées

Les pousses herbacées ne manifestent de symptômes que dans les fortes attaques.

Des taches vitreuses puis nécrotiques de quelques millimètres de diamètre, entourées d'une réaction anthocyanique rougeâtre ou non, peuvent être observées.

Cependant, le plus souvent, à partir de l'apex de la tige, des taches très allongées d'aspect vitreux évoluent rapidement en nécrose brúnâtres de plus de 10 cm qui, en desséchant, se recourbent en crosse (photo 6) ; les nécroses peuvent se prolonger sur les feuilles le long des nervures qui brunissent et occasionnent des déformations du limbe (photo 7 et 8).

Les taches isolées sur la tige peuvent mesurer de 5 à 10 cm de long et les tissus superficiels déshydratés forment des squames, l'ensemble donnant un chancre (photo 9).

L'évolution des nécroses est relativement rapide et suit très probablement la croissance de la pousse qui se fait en une quinzaine de jours ; les tissus lignifiés ne sont pas sensibles à la bactérie

Cette maladie est grave car le développement de symptômes peut être explosif aussi bien sur les cultures en plein terre qu'en conteneurs (photo 10).

Dans certains cas extrêmes, les tiges sont décapitées et, quoique les plantes ne meurent pas, elles prennent un aspect ramifié du fait du redémarrage des bourgeons axillaires. Quand les attaques sont tardives, les plantes ne sont pas commerciâbles.

#### 2.2.3.4 Epidemiologie

##### 2.2.3.4.1 Sources de contamination

Les sources de contamination sont nombreuses (75), elles peuvent provenir soit de la plante hôte, soit des cultures adjacentes comme les plantes adventives ou les engrais verts.

##### 2.2.3.4.1.1 Organes de la plante hôte

Il a été démontré que les souches de P. syringae pv. syringae peuvent se maintenir en phase épiphyte dans les bourgeons ou dans les châcres sur rameaux (67,137).

Les populations de P. syringae pv. syringae se trouvent : sur les feuilles (110,111,112,139) pour le poirier, sur les graines (98) pour le haricot, sur les fruits (111) ou les fleurs (67), sans provoquer de symptômes pour les arbres fruitiers à pépins et à noyaux.

#### 2.2.3.4.1.2 Plantes adventices et engrais verts.

Les populations sont souvent faibles en hiver et en été sur les plantes hôtes (10,107). Ces plantes adventices prennent le relais puisqu'elles hébergent ces populations, devenant au printemps et à l'automne des sources potentielles d'inoculum (98). On enregistre d'abord une augmentation des populations de P. syringae pv. syringae sur les plantes herbacées puis sur les plantes hôtes.

#### 2.2.3.4.2 Cycle de la bactérie

##### 2.2.3.4.2.1 Phase épiphyllle

P. syringae pv. syringae est une bactérie bien adaptée à la phase épiphyllle. Les bactéries survivent et se multiplient au niveau des bourgeons, des tissus végétatifs ou des tissus nectarifères pendant des périodes critiques en été et en hiver, sans provoquer de symptômes. Généralement les bactéries restent dans la zone proche du point de pénétration, et lorsque la population interne est importante la bactérie migre vers les fleurs et les bourgeons. Suivant la saison, l'estimation des populations, exprimée par organe ou par gramme de matière fraîche, varie entre 10 et 10 bactéries (52,94,104,107).

##### 2.2.3.4.2.2 Activité pathogène

Les conditions climatiques jouent un rôle important dans le développement de la maladie.

L'humidité relative joue un rôle primordial dans le processus infectieux. La présence d'eau sur les organes est indispensable pour que l'infection ait lieu.

Au printemps et à l'automne, on enregistre des augmentations de la population, coïncidant avec des périodes où la température maximale varie entre 19 et 25°C avec des pluies relativement importantes (184). Ces maxima sont parfois suivis de l'apparition de symptômes si les populations ont atteint un niveau d'inoculum suffisant sur l'organe sensible.

L'apparition des symptômes est aussi corrélée avec la sensibilité des tissus ; la sensibilité varie suivant l'hôte et la saison. Ainsi sur abricotier et de nombreux arbres fruitiers à noyaux ou à pépins, les tiges sont sensibles toute l'année sauf en été, avec un maximum au printemps. Les feuilles et les fruits sont surtout sensibles au printemps alors que les bourgeons dormants le sont au début de l'hiver.

##### 2.2.3.4.3 Voies de pénétration

L'utilisation de la microscopie électronique à balayage a été utile pour déterminer les voies de pénétration et les niches écologiques des bactéries (12,110,112,189).

Les blessures de toute nature sont des portes ouvertes qui permettent à la bactérie d'entrer dans les tissus où elle se multiplie et provoque la maladie.

De nombreuses souches de P. syringae pv. syringae ont la capacité de jouer un rôle de noyau de prise en glace. Lors de basse température, la glace formée dans ou sur les plantes sensibles aux gelées, provoque une cassure mécanique des membranes cellulaires initiant alors des microlésions, futurs points éventuels de pénétration et de multiplication de la bactérie (99).

#### 2.2.4 Etude du pouvoir pathogène

##### 2.2.4.1 Rôle de la syringomycine

Au sein du pathovar syringae, les phytotoxines sont diverses et induisent chez le végétal des chloroses ou nécroses (11) P. syringae pv. syringae est le seul parmi les pathovars à produire une toxine induisant des symptômes de nécrose : la syringomycine .

Plusieurs auteurs (42,66,149) ont montré que la syringomycine a un spectre antibiotique très large contre les bactéries et les champignons.

##### 2.2.4.1.1 Structure

La syringomycine est un hexapeptide de faible poids moléculaire dont le point isoélectrique est voisin de pH 7 (149). Elle est composée de différents acides aminés dont la sérine, la phénylamine, l'acide diaminobutyrique, l'arginine dans le rapport 2:1:2:1 (68,193).

##### 2.2.4.1.2 Conditions de production

La production de la syringomycine est optimale en milieu liquide (pomme de terre + dextrose) non agité additionné de 0,4 % d'hydrolysats de caséine. Dans ce cas, on a 20 fois plus de syringomycine que sur milieu solide et 136 fois plus qu'en milieu liquide agité (64).

La présence en quantité élevée de phosphate (0,3 M) ou de peptone diminue la production de syringomycine (42).

La présence de fer est nécessaire à la production de la syringomycine (63).

La quantité de syringomycine varie de 4 à 26 mg/l en fonction des souches.

Cette toxine a la propriété d'être soluble dans de nombreux solvants, d'être stable à la chaleur, résistante à l'action de certains enzymes (42).

##### 2.2.4.1.3 Activité biologique

La toxine est produite dans les tissus (65). Un anticorps fluorescent spécifique de la syringomycine a permis sa

détection (128) dans les tissus malades ou traités par la syringomycine, dans les feuilles et les rameaux de pêcher. Bien qu'elle soit produite dans les tissus malades, il n'a pas été possible de l'extraire.

La syringomycine inoculée donne des lésions sur les tiges de pêcher (42), les feuilles de maïs, ou les feuilles détachées de haricot. 50 à 100 unités (1 à 2  $\mu\text{g}$  de syringomycine par ml) peuvent provoquer en 24 heures des symptômes comparables à ceux de la maladie. La production maximale de syringomycine correspond à la phase de croissance exponentielle de P. syringae pv. syringae.

C'est un facteur de virulence pour un grand nombre de souches (187), qui n'est pas corrélé à la présence de plasmides (38,62).

#### 2.2.4.2 Rôle des sidérophores

La pyoverdine ou pigment fluorescent (bleu-vert), joue dans la bactérie le rôle de sidérophores en se complexant avec les ions ferriques  $\text{Fe}^{+++}$ .

La synthèse de la pyoverdine dépend de la concentration en ion  $\text{Fe}^{+++}$  du milieu. Si le milieu est carencé en fer, une production abondante de pyoverdine se produit, permettant à la bactérie de capter le  $\text{Fe}^{+++}$  extracellulaire (116).

Au sein du pathovar syringae le rôle des sidérophores est de séquestrer le fer ferrique de la plante sous forme chélatée qui serait alors plus facilement assimilable par la bactérie.

##### 2.2.4.2.1 Structure

L'analyse chimique de la pyoverdine montre la présence de 4 acides aminés : l'acide béta hydroxyaspartique, la sérine, la thréonine et la lysine dans le rapport 2 : 2 : 2 : 1 (29). Bien qu'il n'ait pu être mis en évidence chez P. syringae pv. syringae, il semble que le chromophore fluorescent 2,3 diamino 6,7 dihydroxy quinoline soit présent. La masse moléculaire du sidérophore est estimée à 1175 daltons.

##### 2.2.4.2.2 Activité biologique

Lorsque la quantité de fer est faible, 9 protéines membranaires sont exprimées dont le poids moléculaire est compris entre 74 000 et 80 000 (excepté pour la 8ème protéine). Des mutants incapables d'acquérir le fer sont dépourvus de la protéine de 74 000 daltons.

Des mutants de la souche B 301 D, isolée de poirier, incapable de synthétiser la pyoverdine ou d'assimiler le fer ont donné des symptômes similaires à ceux provoqués par la souche sauvage. Cependant les sidérophores doivent jouer un rôle dans le cycle de la bactérie. Des niveaux de fer élevés sont nécessaires pour réguler la synthèse de la syringomycine qui joue un rôle dans la virulence.

Si le rôle des sidérophores n'a pas pu être mis en évidence dans la pathogénèse, ceux ci peuvent jouer un rôle dans la survie de P. syringae pv. syringae en phase épiphyte (102).

#### 2.2.4.3 Rôle des plasmides

La présence du plasmide pGC 131 chez certaines souches de P. syringae pv. syringae joue un rôle dans la virulence (60). Bien qu'il ne soit pas clairement défini, le rôle des plasmides serait de provoquer des changements dans la membrane externe de la cellule.

#### 2.2.4.4 Déterminants chromosomiques du pouvoir pathogène

Les gènes requis à la fois pour l'expression du pouvoir pathogène sur une plante hôte et le développement d'une réaction d'hypersensibilité sur une plante non hôte ont été dénommés gènes Hpr. Le nom Sdg a été attribué aux gènes responsables du développement de la maladie.

Le clonage et l'analyse de séquences impliquées dans le pouvoir pathogène d'une souche de haricot ont permis de montrer que les déterminants chromosomiques se situaient sur un fragment de 8,5 Kb (17). Plus précisément, les facteurs de pathogénicité sont codés dans un des fragments générés par HindIII de 3,9 Kb.

#### 2.2.4.5 Altération des échanges transmembranaires

P. syringae pv. syringae comme beaucoup d'autres pathogènes ne pénètre pas dans la cellule hôte. Mais il peut provoquer une altération dans le transport des éléments nutritifs, notamment de saccharose. En effet le pathogène active les échanges à travers la membrane plasmidique en induisant un efflux de potassium et un influx de protons. Ceci a pour conséquence d'augmenter le pH intra-cellulaire, induisant alors la croissance bactérienne.

L'hypersensibilité se caractérise par la mort rapide des cellules de l'hôte au point de pénétration. Elle provoque aussi une perte d'électrolytes qui se produit 4 à 6 heures après l'inoculation. Ce phénomène serait aussi dû à une perte de perméabilité membranaire. Les mécanismes contrôlant les phénomènes d'hypersensibilité et de pathogénicité sont très proches. La différence entre maladie et hypersensibilité s'avère très subtile. Dans les deux cas, les mécanismes se localisent au niveau membranaire.

#### 2.2.5 Méthodes de lutte

Une bonne connaissance du cycle de la bactérie et du développement de la maladie permet de mieux définir une stratégie de lutte dans laquelle on associera les mesures prophylactiques aux traitements chimiques.

### 2.2.5.1 Mesures prophylactiques

Les mesures prophylactiques de lutte consistent à la suppression de plantes très atteintes et l'élimination des rameaux malades afin de limiter les sources d'inoculum.

### 2.2.5.2 Lutte chimique

Les produits à base de cuivre sont fréquemment utilisés contre les maladies bactériennes, et notamment sur le laurier palme ; dans certains cas le cuivre est phytotoxique (57).

L'utilisation d'antibiotiques semble peu efficace contre P. syringae pv. syringae ; l'apparition de mutants résistants limite leur emploi notamment sur laurier palme (39).

D'autres composés de traitement ont été utilisés telles que les substances biodégradables qui modifient le pH de surface.

Des essais avec des acides (tartrique ou citrique), ont donné des résultats encourageants in vitro et en serre sur poirier et sur Vigna anguiculata (143,144).

### 2.2.5.3 Lutte biologique

Le principe consiste à sélectionner des souches qui ont un avantage sélectif ou qui produisent une inhibition de la croissance de la souche pathogène in vitro mais aussi in vivo.

Cet antagonisme est souvent dû à la production de substances antibiotiques, sidérophores ou bactériocine. Sobiczewki en 1987 (160) a trouvé 4 souches (une appartenant au groupe des pseudomonas non fluorescents, un Erwina appartenant au groupe carotovora, un Erwina herbicola, et une enterobactérie) capables de protéger les fruits de cerisier contre P. syringae pv. syringae.

Lindow et al (100,101) ont montré qu'en utilisant des mutants obtenus par voie chimique ou par manipulation génétique (déletion du gène ice), il était possible de limiter les dégâts dus aux gelées en plein champ ou en serre.

L'antagonisme est dû à une balance entre pathogène et non pathogène. En modifiant cet équilibre, on peut favoriser l'implantation du non pathogène en apportant l'inoculum de façon massive. Cela peut permettre une meilleure colonisation des sites infectieux. Cependant, lorsque l'agent biologique n'a qu'une action de compétition (aucun antagonisme), il ne peut être utilisé que pour des traitements prophylactiques .

## 2.3 Classification et pouvoir pathogène de P. syringae pv. savastanoi

### 2.3.1 Historique et classification

Pseudomonas. syringae pv. savastanoi est l'agent causal de la tuberculose de l'olivier. Arcangeli en 1886 fut le premier à remarquer la présence de bactéries dans les tumeurs de l'olivier qu'il dénomma Bacterium olea.

Peu après Savastano en 1887 (145) constata que la maladie de l'olivier, qu'il dénomma tuberculose était due à une bactérie Bacillus olea tuberculosis.

L'agent causal de la maladie fut étudié ensuite en Amérique par Smith et Rorer en 1904 (155) qui distinguèrent la bactérie pathogène des bactéries saprophytes qui peuvent exister dans les tumeurs. En 1908, Smith décrit les caractères de cette bactérie et l'appelle Bacterium savastanoi.

Bradbury en 1986 (22) a décrit tous les synonymes utilisés :

- Bacterium oleae Tuberculosis (Savastano) Voglino 1882
- Bacillus prillieuxianus Trevisan 1889
- Bacillus oleae (Arcangeli) De Toni et Trevisan 1909
- Pseudomonas olea (Arcangeli) Duggar 1909
- Pseudomonas savastanoi Stevens 1913
- Phytomonas savastanoi (Smith) Bergey's et al 1923
- Agrobacterium savastanoi (Smith) Stan et Weiss 1943

Cette bactérie est également responsable de la tuberculose du laurier rose (Nerium oleander) chez lequel elle a été observée pour la première fois par Peglion en 1905 (130), en Italie et dans des jardins de Monaco. La maladie a été attribuée à Bacillus oleae, agent pathogène de la tuberculose de l'olivier.

Smith en 1906 (153) estimait que la bactérie isolée par Peglion ne ressemblait pas à celle isolée de l'olivier et en 1908, il écrivait que la maladie du laurier rose était due à Pseudomonas tumefaciens car l'agent pathogène de l'olivier n'était pas pathogène pour le laurier rose.

Brown et Townsen en 1911 pensaient que l'agent pathogène de la bactériose du laurier rose n'était pas Pseudomonas tumefaciens même si celui-ci était réellement pathogène sur laurier rose .

Smith en 1928 (154) affirme que Pseudomonas tumefaciens d'une part et les bactéries isolées de l'olivier et du laurier rose d'autre part, sont tout à fait différentes ; par contre, il ne trouve pas de différences considérables entre les organismes isolés de l'olivier et ceux isolés du laurier rose. Il a appelé



cette dernière Pseudomonas savastanoi variété. nerii. Cette bactérie avait été antérieurement nommée par Ferrari (1926) : Bacterium tonellionum.

Le nom Pseudomonas tenolliana a été attribué officiellement dans la 7<sup>e</sup> édition du Bergey's Manual en 1957.

Ce n'est qu'en 1963 que Wilson et Magie (178) ont montré que certaines souches isolées de l'olivier peuvent produire des tumeurs sur le laurier rose ; de plus, ils n'ont pas observé de différences importantes entre les caractères physiologiques et sérologiques et le nom de Pseudomonas savastanoi a été adopté pour les bactéries isolées du laurier rose.

Sur le frêne (Fraxinus excelsior), des chancres ont été observés pour la première fois en Allemagne par Nordlinger en 1863 qui a attribué la maladie à des dégâts mécaniques.

Mer en 1889 (115) est le premier à avoir montré que la maladie était d'origine bactérienne.

Vuillemin en 1897 a attribué la maladie à Pseudomonas savastanoi.

Smith en 1920 affirme que la tuberculose de l'olivier et le chancre du frêne ne sont pas provoqués par le même organisme.

Brown en 1932 (25) après avoir étudié des échantillons du chancre du frêne (envoyés par Smith) et les échantillons de la tuberculose de l'olivier, venant d'Italie, confirme l'origine bactérienne de ces deux maladies ; les bactéries sont très semblables par leurs caractères morphologiques et culturels. L'agent pathogène de frêne est alors appelé Bacterium savastanoi variété fraxini.

Skoric en 1938 (150) a constaté que les bactéries isolées des trois hôtes (olivier, laurier rose et frêne) sont très proches les unes des autres par leurs caractères physiologiques et culturels. L'impossibilité de produire des symptômes sur des hôtes hétérologues avec la bactérie du frêne, l'a amené à considérer cette bactérie comme une espèce séparée ; les synonymes suivants ont été utilisés successivement :

Pseudomonas fraxini (Brown) Skor  
Bacterium savastanoi var fraxini Brown  
Bacterium fraxini (Brown) Skor  
Phytomonas fraxini (Brown) Skor

JANSE (78,79,80), a étudié le chancre bactérien du frêne en comparaison avec la tuberculose de l'olivier et le chancre du laurier rose sur les plans symptomatologique, histologique et sérologique. Il a proposé de classer les trois agents pathogènes dans une sous espèce de Pseudomonas. syringae van Hall 1902, 141A1 en les considérant comme des P. syringae pv. fraxini pour la bactérie du frêne, pv. oleae pour celle de l'olivier, pv. nerii pour celle du laurier rose.

Actuellement les bactéries qui provoquent des excroissances chez l'olivier, le frêne, le jasmin, le troëne et sur d'autres espèces de la famille des Oléacées et chez le

laurier rose (Apocyonacées) sont considérées comme pathovars de Pseudomonas. syringae van Hall 1902, 141A1 : Pseudomonas. syringae pv. savastanoi (190) est retenu dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1984.

### 2.3.2 Etude de l'agent causal

#### 2.3.2.1 Caractères morphologiques et cultureux

Pseudomonas. syringae pv. savastanoi appartient à l'espèce Pseudomonas. syringae. Cette bactérie est un batonnet à Gram négatif de taille variable selon les auteurs de 1-1,3 x 0,3-8  $\mu\text{m}$  (1,25,154,168). Elle est aérobic stricte, non sporulée, ne formant pas de capsule. Son métabolisme est oxydatif. Elle est mobile par 1 à 7 flagelles polaires (78,168).

Les colonies sont circulaires, légèrement bombées ou plates, de couleur blanche, brillantes, transparentes à bords quelques fois irisés, après 3 à 4 jours d'incubation à 23°C (25,168).

Elles produisent sur milieu de King B, un pigment bleu vert (pyoverdine) fluorescent sous les UV.

La température optimale de croissance varie entre 23 et 26°C (25,172).

#### 2.3.2.2 Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques de P. syringae pv. savastanoi ont été étudiés pour rechercher ceux permettant de distinguer les isolats venant de différents hôtes. Tous les auteurs ont trouvé que ces bactéries sont très semblables et les quelques petites différences ne sont pas suffisantes pour les distinguer entre elles (168,181).

P. syringae pv. savastanoi produit des acides sans gaz en utilisant les sucres suivants : arabinose, glucose, galactose, mannose, dextrine, glycérol et mannitol (168), D-galactose, D-ribose, D-xylose et mannitol (80,81).

La bactérie pousse sur un milieu de base contenant une seule source de carbone : dextrose, lévulose, maltose, lactose, galactose, raffinose, xylose ou amidon (178).

Les auteurs ne sont pas toujours d'accord sur l'activité de P. syringae pv. savastanoi sur le saccharose, Sutic et Dowson en 1963 (168), Wilson et Magie en 1963 (178) affirment qu'il utilise le saccharose avec formation d'acide. Par contre Wilson et al en 1972 (182), MC Guire et Kosuge en 1979 (114), ont trouvé que les souches isolées de l'olivier n'utilisent pas le saccharose (sauf quelques exceptions) contrairement à celles isolées du laurier rose qui l'utilisent.

P. syringae pv. savastanoi a aussi les caractères biochimiques suivants : amidon(-), arginine(-), esculine(-), nitrate(-), gélatine(-), et oxydase(-) (95,119), levane(-) sauf quelques exceptions (78,119), indole(-), production de H<sub>2</sub>S(-), caseine(-) (25).

### 2.3.2.3 Caractères génétiques

#### 2.3.2.3.1 ADN chromosomique

Sur la base des hybridations ADN/ARN P. syringae pv. savastanoi appartient au complexe Pseudomonas fluorescens ainsi que la majorité des pathovars de P. syringae (44).

Palleroni et al en 1972 (126), ont trouvé par hybridation DNA/DNA que les espèces de Pseudomonas fluorescens : P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida, P. cichorii, (Pseudomonas fluorescens oxydase positive), le groupe P. syringae (Pseudomonas fluorescens oxydase négative) et les espèces de Pseudomonas non fluorescens : P. stutzeri, P. mendocina, P. alcaligenes, et P. pseudoalcaligenes se trouvent dans le même complexe d'homogénéité d'ADN, séparés des autres espèces de Pseudomonas phytopathogènes.

Le contenu en guanine et cytosine des Pseudomonas phytopathogènes est compris entre 57-60 %. Ce pourcentage est de 60 % pour P. syringae pv. savastanoi.

#### 2.3.2.3.2 ADN plasmidique

La présence de plasmides de poids moléculaires et de nombres variables chez P. syringae pv. savastanoi a été mise en évidence par Surico et al (165).

Viji Pal et al en 1984 (175), en testant plusieurs souches provenant d'hôtes différents (olivier, frêne et laurier rose), n'ont pas trouvé de relation entre la virulence de la bactérie et l'hôte d'origine d'une part et le nombre de plasmides et leur poids moléculaire d'autre part. Les souches ont de 2 à 6 plasmides dont le poids moléculaire varie de 4,5 à 180 MD.

#### 2.3.2.3.3 Bactériophages

La spécificité des bactériophages vis-à-vis de P. syringae pv. savastanoi a été étudiée par Wilson et Magie en 1963 (177), qui ont isolé trois phages du sol prélevés dans un verger de l'olivier atteint de tuberculose et un phage du sol prélevé sous laurier rose. Les phages de l'olivier ont seulement lysé des souches isolées de l'olivier et le phage de laurier rose n'a lysé que les bactéries isolées de cette plante ; par la suite ils ont trouvé que certaines souches isolées du laurier rose sont aussi sensibles à un des phages de l'olivier.

En 1977, Yahiaoui (188), a isolé cinq phages à partir du sol et des tumeurs de l'olivier. Les phages isolés ont révélé une spécificité pour P. syringae pv. savastanoi avec une sensibilité variable selon les souches. Sur 12 souches de P. syringae pv. savastanoi testées, deux renfermaient des phages tempérés actifs sur les 2/3 des souches à partir desquelles les phages ont été isolés

#### 2.3.2.4 Caractères sérologiques

Les souches de P. syringae pv. savastanoi isolées de différents hôtes ne sont pas sérologiquement différentes par la méthode d'Ouchterlony (178) et l'immuno-fluorescence. Une réaction croisée a été trouvée par la méthode d'Ouchterlony :

- avec P. syringae pv. syringae, pv. tomato en utilisant un sérum préparé à partir de bactéries ultrasonnées de P. syringae pv. savastanoi.

- avec P. syringae pv. tabaci, pv. syringae, pv. lachrymans, pv. tomato en utilisant un sérum obtenu avec des bactéries entières,

- avec P. syringae pv. syringae, pv. morsprunorum, pv. maculicola en utilisant la méthode d'immuno-fluorescence et des sérums préparés à partir de P. syringae pv. savastanoi de l'olivier.

Casano en 1986 (27) a obtenu deux anticorps monoclonaux préparés à partir de P. syringae pv. savastanoi (hôte non précisé). Un des anticorps réagit positivement par la méthode ELISA avec P. syringae pv. savastanoi, pv. syringae, pv. tomato et pv. papulans. Le deuxième était positif uniquement avec P. syringae pv. savastanoi et P. syringae pv. glycinea.

Otta et English en 1971 (121) ont trouvé que les bactéries P. syringae pv. antirhini, pv. maculicola, pv. mori, pv. pisi, pv. savastanoi, pv. tomato et P. viridiflava possèdent un antigène commun, stable à la chaleur et formant un seul sérotype.

Samson et Saunier en 1987 (141) ont classé les pathovars de Pseudomonas. syringae sur la base des antigènes somatiques O en 6 sérogroupes ; les pathovars persicae, tomato, savastanoi, pisi, maculicola et syringae (souche type).

#### 2.3.3 Les maladies dues à P. syringae pv. savastanoi.

##### 2.3.3.1 Répartition géographique

La tuberculose de l'olivier a été beaucoup étudiée dans les pays méditerranéens où elle est très répandue. Elle a été décrite en Italie, France, Espagne, Portugal, Algérie, Tunisie, à Chypre, mais aussi aux U.S.A., au Mexique et en Argentine.

Sur laurier rose, elle a été trouvée en Italie, France, Grèce, Australie, Uruguay et aux U.S.A.

P. syringae pv. savastanoi a été isolé de différentes plantes hôtes dans d'autres pays : Lybie, Maroc, Afrique du sud, Tanzanie, Iran, Irak, Liban, Turquie, Nouvelle Zélande, Tchécoslovaquie, Angleterre, Allemagne, Pays Bas, Norvège, Pologne, Ecosse, Suisse, U.R.S.S. Yougoslavie, Argentine, Brésil, Colombie et Pérou (22).

### 2.3.3.2. Symptomatologie

#### 2.3.3.2.1 Symptômes sur l'olivier

La tuberculose de l'olivier se caractérise par l'apparition de tumeurs sur les rameaux, les feuilles, les fleurs et les fruits. Ces tumeurs sont de grosseurs très variable, elles peuvent atteindre le volume d'une noisette et même d'une noix.

Sur les rameaux elles sont rugueuses irrégulièrement mamelonnées de la couleur des rameaux ou d'une couleur un peu plus claire ou verdâtre. Il existe deux sortes de tumeurs : tumeurs primaires formées aux dépens des tissus avoisinants le point de pénétration de la bactérie et tumeurs secondaires ou métastases (apparition des symptômes ailleurs qu'à l'endroit de pénétration de la bactérie).

Sur les feuilles, la maladie provoque la déformation des nervures principales et du limbe.

Sur les fruits, il ya apparition de tâches circulaires, qui se présentent comme de simples points bruns dont le centre se fend. De la fissure sort une substance visqueuse riche en bactéries.

#### 2.3.3.2.2 Symptômes sur laurier rose

Sur les feuilles, les symptômes se caractérisent par des taches crémées ou jaunes dont le centre nécrosé devient brun noir puis évolue en petites taches brunes.

Sur les jeunes tiges, les symptômes commencent par l'apparition de zones de couleur foncée, puis l'épiderme se fend formant des lésions qui prennent l'aspect de chancre.

Sur les vieux rameaux, les symptômes sont plus au moins tumoraux avec des excroissances bosselées, de dimensions variables, brunes et craquelées.

Sur les organes floraux, il ya déformation et épaissement des pédoncules et des ovaires. On peut observer en plus, des arrêts de la floraison.

Le phénomène de métastase est très répandu chez le laurier rose surtout sur les organes jeunes. La bactérie se transmet à partir d'un point d'infection primaire à des organes encore peu lignifiés. Il en est de même pour les feuilles où les phénomènes de métastase sont très caractéristiques (71).

#### 2.3.3.2.3 Symptômes sur le frêne

Les symptômes sur le frêne se manifestent sur le bois, soit par des chancres de petite taille, soit par des chancres très développés avec une cavité qui s'étend dans le bois.

Pendant le premier stade, autour de plaie pétiolaire, on observe d'abord une ou deux petites fentes dans la couche des cellules au dessous du périoderme, puis des fissures transversales

se manifestent. Le chancre devient ouvert, montrant des tissus brúnatres et noirátres ; puis les tissus de l'écorce se déforment de plus en plus.

Sur la tige et sur les branches, des symptômes secondaires apparaissent près du chancre sous forme de petits renflements, de quelques mm à un cm de largeur recouvert par une écorce non déformée (139).

### 2.3.3.3 Epidémiologie

#### 2.3.3.3.1 Source de contamination

Les cavités du centre des tumeurs sont très riches en bactéries qui peuvent se propager à la surface par temps humide, prenant l'aspect de gouttes opaques qui se répandent sur tous les organes aériens de la plante.

#### 2.3.3.3.2 Cycle de la bactérie

##### 2.3.3.3.2.1 Phase épiphyllé

La phase épiphyllé de *P. syringae* pv. *savastanoi* a été démontrée pour la première fois par Ercolani en 1971 (51) ; le nombre de bactéries était de  $10^5$  /cm<sup>2</sup> de feuille en avril et octobre. Cette phase est considérée comme une source d'inoculum importante disponible pour infecter les tissus de la plante.

La densité de la bactérie sur les feuilles n'est pas liée à la gravité de la maladie mais est fonction de l'âge des feuilles et de l'époque de leur formation. Les isolats obtenus de feuilles de même âge et à la même époque ont plus de similitude que celles isolées de feuilles d'âge différent au même moment de l'année ou des feuilles de même âge à des époques différentes de l'année (53). Les facteurs responsables des fluctuations de la population épiphyllé de *P. syringae* pv. *savastanoi* ont été identifiés comme l'activité du calcium, l'âge des feuilles, la période estivale, le temps de la floraison, les pluies d'été et d'hiver et le climat chaud. Plus de 43 % de la variance totale revient au deux premiers facteurs (54).

##### 2.3.3.3.2.2 Activité pathogène

Les bactéries libérées sous forme d'exudat au cours des temps humides ou pluvieux contaminent les organes aériens des plantes.

Le déplacement de la bactérie peut se faire à l'intérieur des tissus de la plante par les vaisseaux. Au champ, la bactérie est transmise par le vent accompagné de la pluie et par des outils contaminés. La transmission de la maladie à longue distance se fait par l'intermédiaire des déchets de taille ou l'utilisation de plantes déjà contaminées.

Les insectes peuvent aussi jouer un rôle dans la transmission de la maladie (70,82).

### 2.3.3.3.3 Voies de pénétration

Les blessures de toute nature sont des portes ouvertes qui permettent à la bactérie d'entrer dans les tissus où elle se multiplie et provoque la maladie. La plus importante blessure est la plaie pétiolaire.

Pendant la cicatrisation de la plaie pétiolaire, une couche de gomme se forme en premier puis elle est suivie par le développement de l'épiderme. L'infection de la plaie pétiolaire, dépend de la distance parcourue pour arriver dans les tissus de la plante. Les bactéries qui entrent par les espaces intercellulaires sont bloquées par la gomme qui remplit cet espace, par contre les bactéries pénètrent très profondément dans les vaisseaux si l'infection a lieu pendant le premier jour, les bactéries seront ensuite libérées dans l'épiderme qui se forme juste au dessus de la gomme.

La plupart des tumeurs formées chaque année sur l'olivier se développent à partir des plaies pétiolaires dont 80 à 95 % sont réceptives juste après la chute des feuilles.

Sur le laurier rose et le frêne, les plaies pétiolaires sont aussi une voie de pénétration importante de la bactérie dans les tissus.

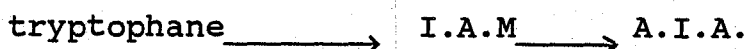
### 2.3.4 Virulence et pouvoir pathogène

Les souches de P. syringae pv. savastanoi varient par leur virulence sur les plantes hôtes homologues et hétérologues. Ce phénomène a été étudié pour connaître la relation entre les plantes hôtes et les souches isolées à partir de ces hôtes.

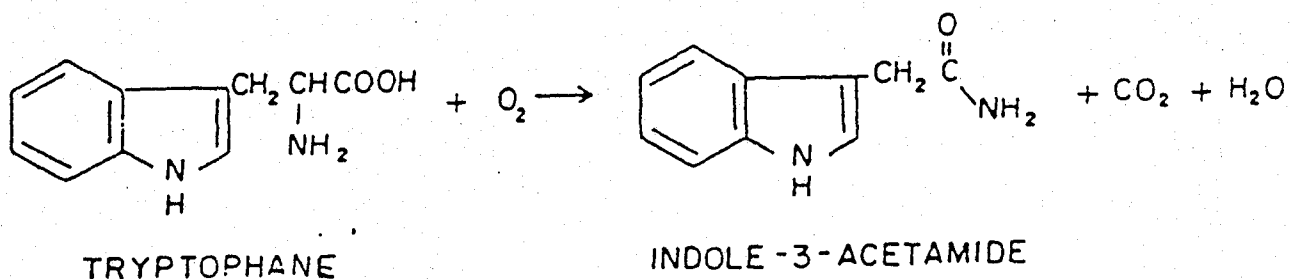
#### 2.3.4.1 Rôle de l'acide indole acétique

Plusieurs auteurs ont trouvé que certaines espèces de Pseudomonas produisent dans le milieu de culture de l'acide indole acétique (A.I.A) en utilisant le L-tryptophane (105). Beltra en 1958 (13) a pensé que le tryptophane présent dans les tissus des branches de l'olivier après transformation en A.I.A influençait la production de tumeurs.

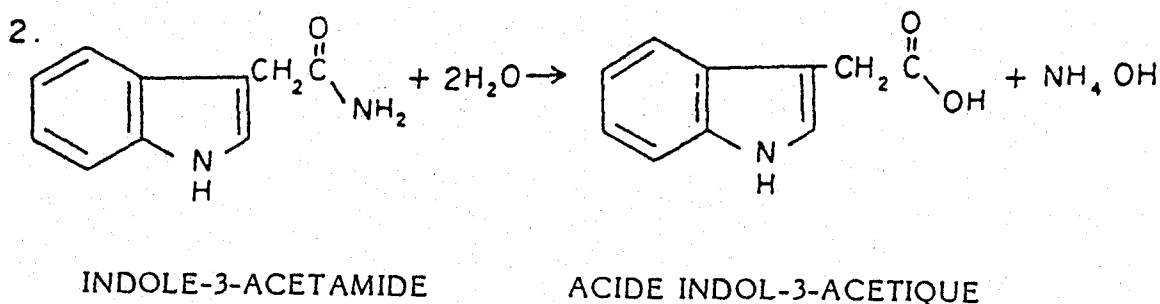
L'A.I.A. a été isolé pour la première fois de tumeurs de l'olivier par Beltra en 1963 (14) et du milieu de culture de P. syringae pv. savastanoi par Magie et Wilson en 1962 (105), ils ont aussi trouvé en 1963 que l'indole acétamide (I.A.M.) est une substance intermédiaire produite pendant la synthèse d'A.I.A à partir du tryptophane elle est donc un précurseur de la synthèse d'A.I.A.:



Kosuge et al en 1966 (88) ont isolé et purifié l'enzyme : la tryptophane oxydative décarboxylase (tryptophane monooxygénase) qui catalyse la transformation de L. tryptophane en indole 3 acétamide (I.A.M) :



L'I.A.M. est hydrolysé en présence d'une enzyme : indole acétamide hydrolase, donnant l'A.I.A et de l'ammoniaque.



Le tryptophane présent dans les tissus des branches après transformation en A.I.A. influence la production de tumeurs. L'A.I.A produite par la bactérie s'accumule dans les tissus de la plante pendant la période d'incubation de la maladie. Plus la quantité d'A.I.A. est importante, plus la période nécessaire pour l'expression de la maladie est courte et inversement (166).

Commai et Kosuge en 1980 (30) ont trouvé dans une souche isolée du laurier rose que la production d'A.I.A. est liée à l'existence d'un plasmide (P.I.A.A.I) de poids moléculaire  $34 \times 10^6$  D.

Le gène (IaaM) porté sur un plasmide qui code la tryptophane-2-mono-oxygénase est porté sur un fragment de 2,7 Kb produit après traitement par EcoRI.

Le gène (IaaH) qui code pour l'indole-acétamide hydrolase est promoteur distal du gène IaaM (31,33). L'insertion d'un élément de 1,3 Kb provoque une mutation polaire dans la région IaaM. Cette insertion ne perd pas seulement l'activité du gène IaaM mais empêche aussi le gène IaaH de s'exprimer.

Comai et al en 1982 (32), ont trouvé que les gènes qui codent pour les deux enzymes responsables de la production d'A.I.A., sont portés sur un plasmide de 52 Kb ou 73 Kb chez des bactéries isolées du laurier rose et sur le chromosome chez les bactéries isolées de l'olivier et de troëne, ils ont remarqué qu'une souche isolée de l'olivier qui donne des tumeurs sur le laurier rose a un plasmide qui code pour la synthèse d'A.I.A.



#### 2.3.4.2 Rôle des cytokinines

Les cytokinines sont les deuxièmes substances produites par P. syringae pv. savastanoi ayant un rôle important dans la formation de tumeurs. Les cytokinines ont été détectées pour la première fois dans le milieu de culture de bactéries par Surico (164).

Elles ont été également trouvées dans les tumeurs de l'Olivier sous forme de glucosides qui sont considérées comme une forme de stockage dans les tissus (76).

Surico et al en 1985 (167) ont isolé à partir d'un filtrat de la souche NCPPB GUO de P. syringae pv. savastanoi isolée du laurier rose, cinq fractions de cytokinines (A1, A2, B1, B2 et C). Ces fractions ont été identifiées respectivement comme zéatine, zéatine riboside, i-méthyl-zéatine, méthyl zéatine riboside et isopentényl adénosine (55).

La détection de cytokinine dans les filtrats des souches isolées de l'olivier, du laurier rose et de troène peut montrer des différences quantitatives des différentes fractions de cytokinine ; par exemple, pour certaines souches, les dérivés de méthyl-zéatine n'ont pas été détectés ce qui montre que les différents pathovars peuvent varier par leur métabolisme des cytokinines. Aussi la quantité de cytokinine intervient au niveau du volume de la tumeur tandis que la quantité d'A.I.A. accumulée est à relier à la longueur de la période d'incubation de la maladie.

La génétique et le mécanisme de la production de cytokonine n'ont pas été encore étudiés.

Surico et al en 1984 (166) ont montré que les mutants résistants à l'alpha-méthyl tryptophane qui ne produisent plus d'A.I.A. provenant du laurier rose et de l'olivier, ont toujours leur activité cytokinique, ce qui montre que les mécanismes responsables de la production de deux substances ne sont pas corrélés.

Kelly et al en 1986 (83), ont trouvé que des mutants d'une souche isolée du laurier rose qui ne produisent plus de cytokinine zéatine et de zéatine-riboside, ont perdu un plasmide de 42 Kb. L'isopentényl transférase catalyse la première étape de la synthèse de cytokinine, le gène qui code pour cette enzyme est porté sur un plasmide chez P. syringae pv. savastanoi.

#### 2.3.4.3 Rôle de la bactériocine

Certaines souches de P. syringae pv. savastanoi produisent in vitro des bactériocines actives contre d'autres espèces de Pseudomonas. Cette substance ne joue pas un rôle pendant la colonisation des feuilles de l'olivier car les bactéries qui produisent ou ne produisent pas de cytokinine, se multiplient sur les feuilles de façon semblable.

### 2.3.5 Méthodes de lutte

#### 2.3.5.1 Mesures prophylactiques

L'utilisation de plans sains est le moyen fondamental de lutte prophylactique.

Il est également conseillé d'éviter toute blessure, surtout celles dues au gaulage (5,135).

Éliminer les tumeurs sur les rameaux serait une chose souhaitable mais impossible de point de vue pratique ; il est conseillé de tailler les rameaux morts et très dénudés et de couvrir les plaies de taille par de la bouillie bordelaise ou par d'autres produits (179). La taille devrait être pratiquée pendant l'été où il fait sec pour diminuer les contaminations

Il faut également éviter les prélèvements de greffons et de boutures sur des arbres malades.

#### 2.3.5.2 Lutte chimique

L'utilisation d'antibiotiques seuls ou associés semble être efficace en traitement préventif.

Ark et Thompson en 1960 (4), ont utilisé la streptomycine et la terramycine séparément ou associées en y adjoignant un mélange d'isoamyle kérosène, lanoline et vaseline. La lanoline et la vaseline permettent de rendre les antibiotiques moins mobiles dans les tissus et d'augmenter le temps de leur action ; les tumeurs traitées meurent après 4 à 7 jours.

Portoles et Beltra en 1964 (132), ont testé l'effet de 13 antibiotiques sur la galle de collet et la tuberculose de l'olivier. Ils ont observé que la sensibilité de P. syringae pv. savastanoi varie en fonction de l'antibiotique. L'association de la tétracycline avec un des antibiotiques : polymixine, pénicilline et novobiocine, a des activités très élevées. La toxicité des antibiotiques vis-à-vis de la plante est très variée, le chloramphénicol, la pénicilline et la dihydrostreptomycine sont les antibiotiques les moins toxiques.

#### 2.5.5.3 Lutte biologique

La lutte biologique contre P. syringae pv. savastanoi n'a pas été beaucoup étudiée, Schroth en 1971 (146), relate que l'un de ses étudiants à l'aide de champignon Fusarium moniliformis et F. laterutium isolés à partir de tumeurs mortes, a pu maintenir la tuberculose de l'olivier à un niveau minimum sans pouvoir la contrôler complètement.

## 2.4 Taxonomie

### 2.4.1 Classification

#### 2.4.1.1 Introduction

Le but de la classification est d'attribuer une identité à un objet vivant ou inanimé.

Le processus de ségrégation des individus en groupes est la taxonomie. Son résultat est une construction théorique appelée systematique, qui permet de nommer un individu selon des règles qui vérifient la légitimité de cette attribution et en limitent les effets, regroupés sous le terme de nomenclature.

Cette attribution vise tout d'abord à résumer l'ensemble des propriétés assignées à un groupe d'individu, de façon à pouvoir prédire les propriétés d'un nouveau membre du groupe sans être obligé de l'exploiter entièrement : la description du modèle permet d'inférer celle de l'individu. Cet aspect prédictif de la classification est très utile aux utilisateurs passifs de la classification bactérienne que sont les médecins cliniciens, pour qui l'assignation d'une bactérie au groupe Escherichia.coli permet de déduire l'ensemble des caractéristiques écologiques, épidémiologiques, et thérapeutiques que possède ce groupe.

La classification est ensuite un préalable à l'identification de nouveaux individus, puisque l'assignation à un groupe ne peut se faire que si le groupe a déjà été décrit : il ne peut y avoir d'identification sans classification préalable.

La classification peut enfin servir à construire des théories sur l'évolution dans le temps d'un groupe d'individus : la systematique des êtres vivants peut servir à étudier leur phylogénèse, c'est à dire les cheminements de l'évolution qui sont à l'origine de l'individu d'aujourd'hui.

La diversité de ces utilisateurs explique que la classification doit satisfaire à plusieurs critères.

Elle doit tout d'abord découler d'une connaissance approfondie du groupe décrit, sans quoi sa valeur prédictive serait insuffisante pour les besoins de ses utilisateurs. Une classification reposant sur un faible nombre de caractères considérés comme "importants" par ses auteurs reflétera en fin de compte une quantité d'information réduite et manquera d'efficacité dans la prédiction des caractéristiques des individus que l'on pourra y rattacher. Le choix des caractères "importants" étant essentiellement subjectif, tout taxonomiste pourra les remettre en cause et modifier cette classification instable. La description des espèces dépendra alors de l'idiosyncrasie de chacun, comme le note Véron (174). Cette idiosyncrasie a par exemple entaché la description des espèces du groupe Enterobacter-Erwinia, qui ont été tour à tour décrites en fonction de leurs caractères biochimiques et de leur phytopathogénicité, de telle sorte que ce groupe est actuellement une véritable friche taxonomique.

Sa complexité doit refléter l'hétérogénéité du groupe étudié. C'est ainsi que l'ancienne classification d'Acinetobacter en A. anitratus et A. lwoffii était peu utilisée car trop sommaire et non prédictive d'une pathogénicité ou d'une niche écologique particulière. Grâce à un choix judicieux des souches de références, les travaux de Bouvet et Grimont (21) ont fait passer le nombre de groupes bactériens de 2 à 12, permettant dans la plupart des cas de discerner l'origine de la bactérie et ses possibilités de résister à un traitement antibiotique : l'isolement dans une hémoculture d'Acinetobacter. baumanii, le plus souvent nosocomial et très résistant aux antibiotiques, n'a pas la même signification clinique et épidémiologique que celui d'A. johnsonii, commensal de la peau et des muqueuses et habituellement plus sensible aux antibiotiques.

La classification doit être d'apparence stable pour les utilisateurs. Un remaniement trop fréquent des groupes donne à l'utilisateur l'impression que la classification est fautive et l'incite à se contenter du niveau hiérarchique supérieur. A cet égard la description d'Acinetobacter citée plus haut est un exemple d'évolution bien acceptée d'une classification, car elle est apparue comme d'emblée capable de résoudre la quasi-totalité des problèmes d'identification : peu de souches échappent à la répartition en espèces proposée. A l'opposé, la classification de Pseudomonas souffre des à-coups nettement perceptibles dans la description progressive des nouveaux groupes : la complexification sans cesse croissante du groupe fluorescent (RNA group I de Palleroni) rend difficile l'attribution d'une signification pathologique aux souches isolées chez l'homme, qui sont pourtant nombreuses : on assiste donc à la multiplication de descriptions de cas cliniques causés par ces souches auxquelles on attribue par défaut un caractère de contaminant.

La classification doit reposer à l'évidence sur des critères stables de définition des niveaux hiérarchiques. Nous verrons que si l'espèce bactérienne est maintenant bien définie, il n'en est pas de même pour le genre bactérien et encore moins des niveaux hiérarchiques supérieurs. Les aperçus généraux entrevus jusqu'aux années 1980 se sont évanouis lors de l'apparition des techniques d'étude des parties conservées du patrimoine génétique, qui ont mêlé morphologies, types respiratoires, et structures des parois, notions qui supportaient l'édifice taxonomique classique. Comme le note R.G.E Murray, "The best is yet to be" (le meilleur est à venir) (120). "Aujourd'hui nous voyons au moyen d'un miroir, d'une manière obscure, mais alors nous verrons face à face ; aujourd'hui je connais en partie, mais alors je connaîtrai comme j'ai été connu". (Première Epître aux Corinthiens, 13, 12).

#### 2.4.1.2 Classification d'intérêt particulier

Les bactériologistes et les pathologistes ont souvent construit des classifications en fonction de leurs intérêts particuliers. De nombreuses espèces bactériennes ont été décrites par des caractères choisis de manière dogmatique en fonction de ce que l'on voulait obtenir de la classification (nomen-species).

Les phytopathologistes ont ainsi privilégié la notion de pathovar, en l'affaiblissant encore par un choix orienté des

souches. Actuellement il semble bien que l'existence de l'ensemble de ces pathovars doit être discutée à la lumière de données objectives issue de l'étude du patrimoine génétique des bactéries.

Les bactériologistes médicaux ont essayé de mettre sur pied des classifications rendant compte de la pathogénicité des bactéries. Il existe ainsi un gradient de pathogénicité qui va des souches d'E. coli non pathogènes aux E. coli entéro-invasifs, entéro-toxinogènes, ou entéro-pathogènes, puis aux Shigella, qui sont elles même distinguées par des sérotypes auxquels on attribue une virulence et une agressivité variable. Il n'en reste pas moins que tous ces micro-organismes sont taxonomiquement des E. coli, plus ou moins adaptés à leur milieu, et plus au moins capables de causer des dommages à leur hôte en fonction des gènes perdus ou des caractères extra-chromosomiques acquis. Seule leur signification clinique différente a pu justifier l'usage de noms vernaculaires différents.

Il en est de même pour les distinctions entre Bacillus cereus et B. thurengiensis, qui sont taxonomiquement indifférentiables : certaines souches contiennent des formations cristallines qui les rendent entomopathogènes, et sont nommées B. thurengiensis, d'autres non, et sont des B. cereus.

Ces classifications subsistent à la satisfaction générale, tout comme la subdivision de Mycobacterium tuberculosis, tant il est vrai qu'on doit distinguer une tuberculose pulmonaire d'une infection par M. bovis ou d'une bécigite survenant chez un immunodéprimé.

Ces confusions et assimilations doivent toutefois être gardées en mémoire pour ne pas méconnaître l'émergence des nouveaux pathogènes chez les malades immunodéprimés.

#### 2.4.1.3 Classification naturelle phénétique

Les principes des classifications phénétiques ont été dénoncées par P.H.A Sneath (158,159). Il s'agit d'étudier l'ensemble des caractères physiologiques et structurales des bactéries, c'est à dire celles tenant à leur apparence (phénotype, du grec phaino, je montre), et à leur patrimoine (génotype, du grec genêma, engendré). Leur caractère "naturel" les oppose aux classifications artificielles à but précis du paragraphe précédent. Elles ne font pas référence à l'évolution ou à un éventuel encêtre commun. Les individus sont classés objectivement en groupes polythétiques ou phénons, tenant compte de l'ensemble de leurs caractères. La représentation des rapports entre les individus se fait sous forme de dendrogramme (Figure 8). Le nombre élevé de caractères étudiés permet d'agrèger des individus atypiques pour certains caractères, certains s'éloignant de la définition du groupe au point de ne pouvoir participer à cette dernière mais pouvant y être rattaché au vu de l'ensemble de leur propriétés. la valeur prédictive associée à une identification sera d'autant plus élevée que la quantité d'information recueillie, c'est à dire le nombre de caractères étudiés, sera plus important. Dans la réalité ceci est pondéré par le support génétique des caractères, ainsi que nous le verrons dans le chapitre 2.4.2 consacré à la Taxonomie numérique.

Les classifications monothétiques, rassemblant des noyaux d'individus possédant quelques propriétés communes, aboutissent à des édifices fragiles et ne sont plus utilisées (174).

#### 2.4.1.4 Classification naturelle phylogénétique

Certains microbiologistes anglo-saxons (34), étudiant le plus souvent les bactéries des plantes et des animaux, ont développé des classifications naturelles visant à refléter l'évolution phylogénétique d'un groupe bactérien. Ces taxonomistes cladistiques (du grec Klados, rameau) essaient de retracer l'évolution ayant abouti à l'émergence des micro-organismes que nous connaissons. Les individus sont agrégés en fonction d'un noyau de caractères présumés hérités d'un ancêtre commun. La représentation des rapports entre les groupes se fait sous forme de cladogramme (Figure 4).

Les cladistiques traditionnels, tels Simpson, pondèrent leurs classifications de données phénétiques, en acceptant des groupes composés d'individus ayant acquis des caractères de façon indépendante (8).

Les cladistiques dits Hennigéens constituent au contraire des groupes monophylétiques ayant hérité leurs caractères d'un ancêtre commun. Leurs classifications ne reflètent alors que la phylogénie (72).

Comme le dit Williams (1985) "pour les cladistiques traditionnels la classification doit être conforme aux relations phylogénétiques. Pour les cladistes selon Hennig, elles sont une et même chose (176).

#### 2.4.1.5 Evaluation et choix d'une classification

Les classifications phylogénétiques ne peuvent être vérifiées que par la construction d'une autre classification reposant sur d'autres caractères hérités en commun et la comparaison des cladogrammes. Comme le fait remarquer Sneath, "si les deux cladogrammes ont été construits en utilisant les mêmes caractères, ils seront congruents, sans que cela valide les caractères utilisés. Si les caractères utilisés sont différents, les cladogrammes seront différents" (158).

Les classifications phénétiques se prêtent en permanence à une vérification par leur utilisateur : elles reposent sur des mesures statistiques qui peuvent être répétées en dehors de leur laboratoire d'origine et qui peuvent donner lieu à une analyse mathématique. Ces techniques seront développées dans le chapitre consacré à la taxonomie numérique.

Elles seules permettent d'intégrer des individus nouveaux au fur et à mesure de leur découverte, en modifiant la définition des groupes existants.

Elles seules permettent réellement d'identifier des individus inconnus en mesurant leur proximité par rapport aux groupes connus.

Elles peuvent à l'heure actuelle intégrer des mesures de similarité des séquences de l'ARN ribosomal, leur permettant de refléter la phylogénie du groupe étudié.

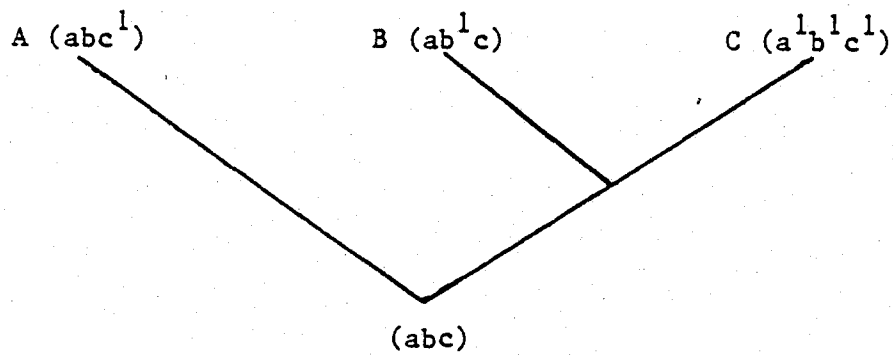


Figure 4. Exemple de cladogramme  
B et C constituent un groupe monothétique, défini par le caractère b. A et B ne sont pas monophylétiques à cause de la présence de C. A et C ont acquis C indépendamment, il ne sont pas monophylétiques.

## 2.4.2 Taxonomie numérique

### 2.4.2.1 Introduction

Jusqu'à la fin des années 1950, les groupes bactériens étaient définis par des clés dichotomiques successives reposant sur la réponse à quelques tests des souches ayant participé à la définition de l'espèce (Figure 11) l'ordre des caractères à étudier était défini de façon arbitraire. Tout individu échappant à la cef (par mutation par exemple) était mal aiguillé et donc impossible à classifier.

Les principes de la taxonomie numérique ont été définis par le botaniste français Michel Adanson, 1763 (2). Il avait entrevu que les affinités naturelles entre les individus seraient mieux étudiées en prenant en compte l'ensemble de leurs caractères:

"Ce fut au Sénégal, en 1750, que je fus convaincu de l'insuffisance des systèmes de Tournefort et de monsieur Linnaeus, ... qui m'embrassaient fort quand il s'agissait d'y ranger la plupart des plantes particulières à ce climat brûlant, qui ne pouvaient se rapprocher à aucune de leurs classes ... Ces diverses remarques me prouvaient de plus en plus la nécessité de considérer les plantes d'une façon toute nouvelle. Je crus donc qu'il fallait me dépouiller de l'ancien préjugé en faveur des systèmes et des idées qui en sont la base et qui bornent nos connaissances, et qu'il fallait chercher dans la nature elle même son système, s'il était vrai qu'elle en eût un ; dans cette vue j'examinai les plantes dans toutes leurs parties, sans en excepter aucune. A mesure qu'il se présentait de nouvelles espèces qui avaient du rapport à celles décrites, je les décrivais à côté, en supprimant toutes les ressemblances, et en notant seulement leurs différences. Ce fut par l'ensemble de ces descriptions comparées que je m'aperçus que les plantes se rangeaient naturellement d'elles-mêmes sous des classes ou familles, qui ne pouvaient être systématiques ni arbitraires, n'étant fondées sur une ou quelques parties qui dussent changer à de certaines limites, mais sur toutes les parties"(2).

Il revient à P.H.A Sneath d'avoir introduit en 1957 (156) le concept de classification adansonienne en microbiologie, sous le nom de taxonomie numérique, qu'il a défini en 1973 comme "le groupement par des méthodes numériques, d'unités taxonomiques en taxon sur la base de leurs caractéristiques" (158).

### 2.4.2.2 Choix des souches

Le choix des souches à étudier est primordial. Il est actuellement admis qu'il est indispensable d'incorporer dans le lot étudié les souches types des espèces considérées, et aussi les souches types des espèces voisines.

La taille minimale du lot de souches fait l'objet de nombreuses controverses. Austin et Priest (8) fixent comme limite raisonnable inférieure 60 souches. Il est vrai que des études significatives ont pu être menées avec moins de souches, mais elles concernaient des groupes bactériens très homogènes, des souches rares, ou encore des populations homogènes dans des niches écologiques restreintes (20).



Les plus importantes études publiées concernent des lots d'environ 600 souches (8,19). La partie taxonomique du logiciel TAXIDEN, développé en commun par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Salvator, le Centre Régional d'Informatique Hospitalière de Marseille, et la société ICOREM, est implémentée sur ordinateur IBM 3090. Elle peut analyser des lots de 1000 souches et en dessiner le dendrogramme sur traceur Benson. Il est vrai que l'étude de dendrogrammes de plus de 300 souches est visuellement difficile et nécessite une coupure à un niveau taxonomique permettant d'isoler quelques groupes ou quelques dizaines de groupes.

Le nombre de souches étudiées varie avec l'hétérogénéité du groupe bactérien. Le choix des souches provenant de niches écologiques différentes permet d'éviter les redondances et donc de garder une taille raisonnable à ce lot. Les souches identiques doivent être éliminées au fur et à mesure.

La pureté des souches étudiées doit être vérifiée à chaque nouvel emploi de la souche conservée.

#### 2.4.2.3 Choix des caractères

Comme le fait remarquer Véron (174) les caractères quantitatifs sont rares en microbiologie (mensurations de la cellule bactérienne, vitesse de croissance, taille des colonies, vitesse d'une réaction). En outre les mesures sont difficiles à standardiser.

On utilisera donc surtout des caractères qualitatifs, ce qui pose des problèmes de codage des résultats. Ces problèmes seront abordés au paragraphe 2.4.2.4.

Suivant les principes d'Adanson, la taxonomie numérique nécessite l'étude du plus grand nombre possible de caractéristiques du micro-organisme. Nous savons maintenant que certains caractères sont codés par une séquence plus longue du chromosome. Certains caractères dépendent d'une seule enzyme (catalase, tryptophane, utilisation du saccharose), d'autres dépendent d'un système simple (l'opéron lactose, qui porte 3 cistrons), d'autres enfin sont sous la dépendance d'un gène polycistronique (la synthèse de l'histidine est codée par 10 cistrons contigus, la présence d'une endospore est due à la présence d'une cinquantaine d'opérons) (8,174).

La correspondance entre caractères et taille de l'information génétique est le plus souvent inconnue. Par ailleurs certains caractères sont codés par les éléments extra-chromosomiques : c'est le cas de la fermentation du lactose et/ou du rhamnose par Serratia marcescens. Il est donc habituelle de considérer que tous les caractères étudiés ont a priori le même poids taxonomique. Le biais introduit est minimisé en augmentant le nombre de caractères étudiés. Cette augmentation n'est cependant pas illimitée : en dehors des limitations imposées par les ordinateurs actuellement disponibles dans les laboratoires de microbiologie, se pose le problème des caractères redondants, c'est à dire codés par les mêmes gènes. Il est possible d'éviter cette redondance si l'on connaît les composés chimiques à métabolisme identique.

Les utilisateurs de la taxonomie numérique ont constaté qu'au delà de 200 à 300 caractères la quantité d'information explorée n'augmente plus.

L'introduction de l'étude des phénotypes de résistance aux antibiotiques est discutée. Cette résistance est très utilisée par les microbiologistes classiques, par exemple pour la classification des bacilles anaérobies stricts à Gram négatif (Bacteroides, Fusobacterium). On sait que nombre de ces résistances sont codés par des plasmides, et sont donc susceptibles de transferts ne respectant pas les classifications taxonomiques : une taxonomie numérique de Staphylococcus isolés de produits pathologiques provenant de malades hospitalisés dans des services de soins intensifs en utilisant seulement les phénotypes de résistance aux antibiotiques refléterait la dynamique des populations bactériennes et non leur hétérogénéité taxonomique. Il se pourrait cependant que la capacité extra-chromosomique de résistance soit sous la domination de gènes chromosomiques, ce qui justifierait leur étude. En absence de certitudes à ce sujet la plupart des auteurs déconseillent d'incorporer les phénotypes de résistance aux antibiotiques à une étude taxonomique (158).

Une fois que les groupes sont définis, il est possible de sélectionner a posteriori les caractères qui ont servi à définir ce groupe. Plusieurs méthodes existent et seront détaillées dans le chapitre "analyse des résultats". Cette attitude est complètement différente de celle du microbiologiste traditionnel qui attribuait à a priori un poids déterminant à certains caractères, et les utilisait pour définir les taxons : les bactéries du genre Clostridium étaient classifiées au fur et à mesure de leur découverte en fonction de la position de leur spore, de leur action sur la gélatine et sur le lait tournesolé, caractères ayant servi à discriminer les premières espèces reconnues (C.butyricum, C.perfringens, C.bifermentans).

#### 2.4.2.4 Méthodes de codage

Le codage logique 1/0 est le plus utilisé : le code 1 signale la présence du caractère, le code 0 son absence. Cette méthode est facile à appliquer pour les caractères nutritionnels ou l'expression des protéines (Tableau VII).

| Caractère                     | Présent | Absent |
|-------------------------------|---------|--------|
| Mobilité                      | 1       | 0      |
| Uréase                        | 1       | 0      |
| Indole                        | 1       | 0      |
| Réaction de Voges - Proskauer | 1       | 0      |
| Liquéfaction de la gélatine   | 1       | 0      |

Tableau VII - Caractères à codage simple oui/non.

Elle peut être adaptée au codage des caractères multi-états, comme les températures de croissance ou la pigmentation des colonies, en attribuant au caractère autant de rangs de codage que celui ci peut prendre d'états. Le tableau VIII montre les techniques de codage utilisées pour quelques caractères multi-états.

| Caractère   | Etats         | Codage |
|---|---------------|--------|
| Pigmentation des colonies sur milieu défini en 48 h | rouge         | 1000   |
|   | jaune         | 0100   |
|   | blanc         | 0010   |
|   | gris          | 0001   |
|   | incolore      | 0000   |
| Taille des colonies                                 |               |        |
| sur milieu défini en 48 h                           | < 1mm         | 10000  |
|   | < 2mm         | 01000  |
|   | < 4mm         | 00100  |
|   | < 6mm         | 00010  |
|   | > 6mm         | 00001  |
| Température de croissance                           | 10°C          | 100000 |
|   | 20°C          | 010000 |
|   | 30°C          | 001000 |
|   | 37°C          | 000100 |
|   | 44°C          | 000010 |
|   | 55°C          | 000001 |
|   | 10°C <-> 37°C | 111100 |
| 44°C <-> 55°C                                       | 000011        |        |

Tableau VIII - Codage des caractères multi-états.

On voit que certains caractères se traduisent par une liste limitée de phénotypes possible : la pigmentation des colonies ne peut être multicolore. D'autres phénotypes peuvent comporter plusieurs réponses positives, comme par exemple l'étude des tolérances de température de croissance.

Cette importance plus grande donnée aux caractères multi-états peut être minimisée en éliminant avant calcul les caractères costamment positifs ou négatifs, en ne créant pas trop de classes différentes, et bien sûr en augmentant le nombre de caractères étudiés.

Les phénotypes de résistance aux antibiotiques peuvent être codés comme des caractères multi-états, en définissant des classes de concentration minimale inhibitrices ou de diamètre d'inhibition de croissance, ou par codage simple 1/0 : on considère que la sensibilité à un antibiotique est une réponse positive au test : la bactérie possède les structures ou les mécanismes enzymatiques permettant à l'antibiotique d'exercer son action inhibitrice.

Il n'existe en microbiologie que peu d'automates capables de lire des résultats et de transmettre des informations à un ordinateur. La plus part des études comprennent donc une phase importante de saisie des résultats. Certains programmes, comme TAXAN (Sea Grant College, University of the Maryland), nécessitent la saisie des résultats sous la forme d'une chaîne de caractères composés d'autant de 0 que de 1 qu'il y a de caractères étudiés. Cette méthode est très difficile à appliquer quand le nombre de caractères est supérieur à quelques dizaines : la saisie est aléatoire et la vérification des données est impraticable. Il a donc été développé une technique consistant à ne saisir que les rangs de tests positifs (Figure 5). Cette méthode permet une saisie confortable et une vérification aisée des phénotypes. L'ordinateur se charge de transformer les rangs des positifs en chaîne de caractères 1/0.

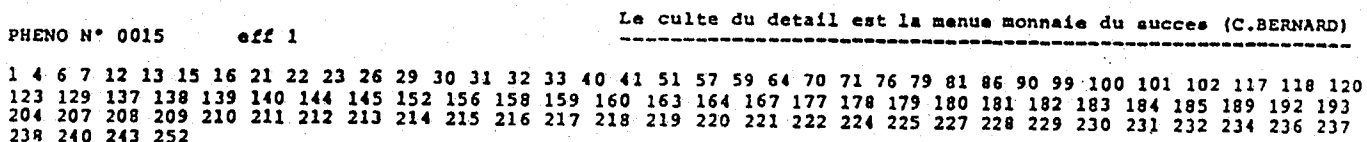


Figure 5. Saisie des rangs des tests positifs

#### 2.4.2.5 Calcul des distances

L'ordinateur se charge de mesurer les distances taxonomiques entre tous les individus pris deux à deux. Il faut lui fournir la formule mathématique de ces distances. Depuis les travaux du mathématicien Jaccard, de nombreux indices ont été proposés. Le tableau IX montre quelques uns des plus utilisés en taxonomie bactérienne.

| Coefficient                                   | Abbreviation        | Formula  |
|---|---------------------|--|
| Simple matching                               | $S_{PM}$            | $\frac{a+d}{a+b+c+d}$  |
| Jaccard                                       | $S_J$               | $\frac{a}{a+b+c}$  |
| Dice  | $S_D$               | $\frac{2a}{2a+b+c}$  |
| Hamann  | $S_H$               | $\frac{(a+d) - (b+c)}{a+b+c+d}$                                  |
| Kulczynski                                    | $S_{KZ}$            | $\frac{1}{2}[(a/a+b) + (a/a+c)]$                                 |
| Ochiali                                       | $S_O$               | $\frac{a}{\sqrt{(a+b)(a+c)}}$                                    |
| Pattern difference                            | $D_P$               | $\frac{2\sqrt{bc}}{a+b+c+d}$                                     |
| Rogers and Tanimoto                           | $S_{RT}$            | $\frac{a+d}{a+d+2(b+c)}$   |
| Total difference                              | $D_T$               | $\frac{b+c}{a+b+c+d}$  |
| Unnamed                                       | $S_{UM1}$           | $\frac{2(a+d)}{a+b+c+d}$   |
|   | $S_{UM2}$           | $\frac{1}{2}[(a/a+b) + (a/a+c) + (d/d+b+d) + (d/d)]$             |
| Angular transformation of $S_{PM} \times 2/a$ | $\sin^{-1}(S_{PM})$ | $0.637 \times \arcsin \left( \sqrt{\frac{a+d}{a+b+c+d}} \right)$ |

*a* and *d* correspond to the number of positive and negative matches, respectively.  
*b* and *c* represent the number of non-matching characters between pairs of OTUs.

Tableau IX - Différents indices utilisés pour le calcul des distances entre les phénotypes, d'après Austin et Colwell (7).

- a : nombre de réponse simultanément positives
- b : réponse différentes : 0/1
- c : réponses différentes : 1/0
- d : nombres de réponses simultanément négatives

| résultats pour la souche B |   |   |   |
|----------------------------|---|---|---|
|                            |   | + | - |
| résultats pour la souche A | + | a | b |
|                            | - | c | d |

L'indice le plus utilisé en microbiologie est celui de Jaccard-Sneath, qui ne prend pas en compte les similarités négatives (174).

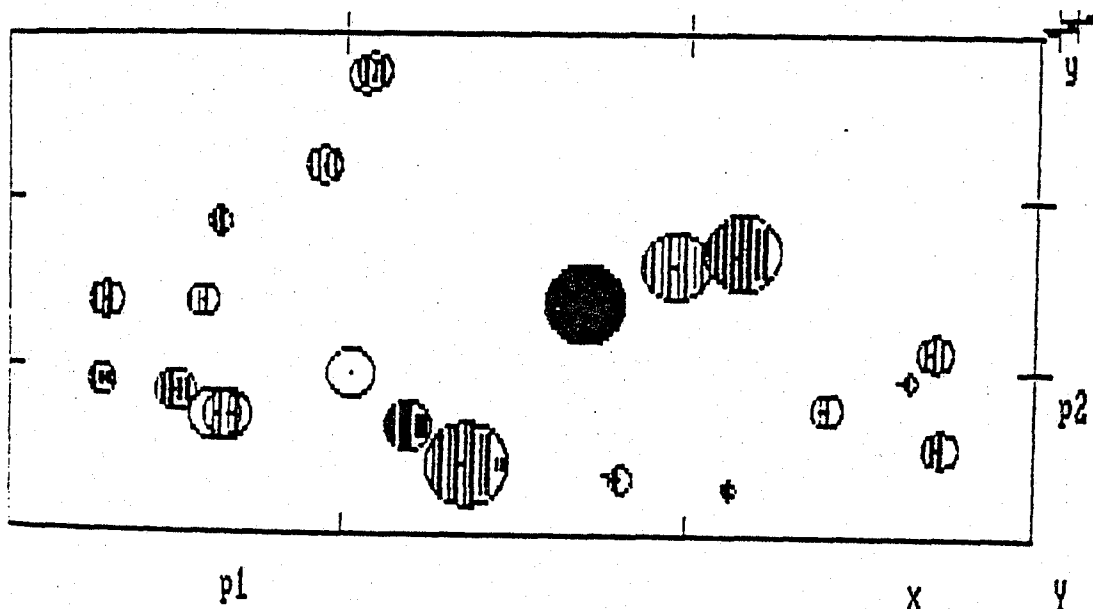
Le calcul des distances pour chaque paire d'individu permet de dresser la matrice des distances. C'est un tableau carré comportant autant de lignes et de colonnes qu'il y a d'individus. Cette matrice est symétrique et ne comporte que des 0 sur sa première diagonale (souche de rang  $i$  comparée à elle-même). Pour  $n$  souches, elle contient  $n(n-1)/2$  distances, soit 499.500 distances pour un fichier de 1000 souches.

#### 2.4.2.6 Techniques d'agrégation

Chacune des lignes de la matrice des distances peut être considérée comme un vecteur-souche, dont les coordonnées sont représentées dans un système d'axes orthogonaux construits dans un espace à  $n$  dimensions (174). Leur représentation dans un espace à  $n$  dimension n'est donc pas directement possible. Deux traitements mathématiques sont utilisés :

- l'analyse factorielle, qui consiste à projeter le nuage des  $n$  points dans un espace à deux dimensions en conservant au maximum la disposition (ou inertie) du nuage. Les groupes obtenus varient avec la technique de projection. De plus leurs limites sont subjectives, ce qui interdit toute analyse en vue d'une classification. L'analyse factorielle n'est utilisée que pour des études de population ou pour représenter les rapports entre les espèces et les différents caractères (19) (Figure 6).

Hyperspace plot: fores



KEY:  $x = -.491$   $X = .221$   $y = -.61$   $Y = .263$   $z = -.268$   $Z = .654$

Figure 6 - Analyse factorielle des correspondances d'un lot de souches de Staphylococcus epidermidis isolées chez différents patients atopiques.

- la classification hiérarchique ascendante procède par agrégations successives en regroupant d'abord les individus les plus semblables, c'est à dire présentant entre eux la plus petite distance. Puis, pas à pas, les groupes (ou grappes, clusters pour les anglo-saxons) et les individus isolés sont agrégés entre eux en groupes de niveaux hiérarchiques supérieurs, jusqu'à ce que tous les phénotypes soient en un groupe unique. La distance séparant la dernière souche et/ou les derniers groupes est par définition le niveau hiérarchique 100% (174).

Il existe plusieurs méthodes d'agrégations, qui diffèrent par la manière de calculer la distance entre un individu isolé et une grappe déjà constituée. Les plus utilisées sont la méthode de la distance minimale et surtout celle du diamètre moyen des grappes. Certains taxonomistes ont également employé la méthode d'agrégation par la variance ou par le diamètre maximale des grappes.

La méthode d'agrégation par le diamètre minimal (single linkage) des grappes consiste à considérer que la distance entre un individu isolé et un groupe est la distance séparant cet individu de l'individu de la grappe qui en est le plus proche. On agrège une grappe i et une grappe jk selon la distance la plus petite (i-j) ou (i-k) :

$$D(i, jk) = \text{Min } D(i, j), D(i, k)$$

Cette méthode a un effet contractant qui se traduit par un phénomène de chainage : les souches de plus en plus éloignées d'une grappe sont agrégées successivement sans qu'il y ait constitution de grappes homogènes. Pour peu que l'on dispose de suffisamment de souches atypiques, on obtient un dendrogramme en marche d'escalier ou en peigne et l'étude est ininterprétable (Figure 7). Elle ne peut être utilisée que pour des lots présentant une distribution en populations homogènes et très différentes entre elles. Elle présente l'avantage d'être la plus facile à programmer et de se contenter d'ordinateurs de capacité réduite.

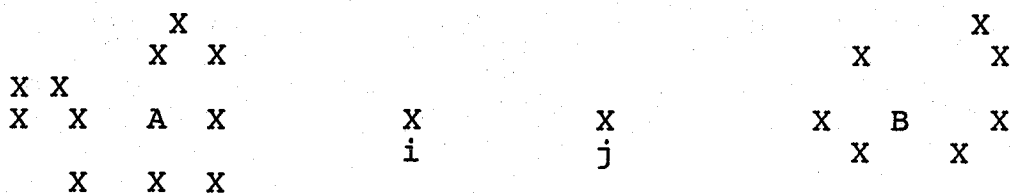


Figure 7 - Le phénomène de chainage. La distance entre les grappes A et B sera ici réduite de la distance entre les individus i et j.

La méthode de diamètre maximale (complete linkage) des grappes fournit des résultats voisins. Elle incorpore les individus dans les grappes ou agrège les grappes entre elles au niveau de similarité le plus bas entre l'individu et n'importe qu'elle membre de la grappe (8).

La méthode d'agrégation par la variance (centroid sorting/clustering) pondère la distance calculée d'un facteur qui est plus faible que la distance à laquelle se forme la nouvelle grappe est petite (174).

La méthode de diamètre moyen des grappes (unweighted pair group method with averages, UPGMA) est de loin la plus employée (8,174). Dans cette technique, un individu est agrégé à un groupe au niveau taxonomique correspondant à sa distance moyenne par rapport à tous les phénotypes qui constituent le groupe. La distance D entre deux grappes est calculée en tenant compte de l'effectif M de chaque grappe :

$$D(i,jk) = \{ M_j \cdot D(i,j) + M_k \cdot D(i,k) / (M_j + M_k) \}$$

L'agrégation de deux groupes nécessite le calcul de toutes les distances des individus des deux groupes pris deux à deux et le calcul de la distance moyenne. Des calculs mathématiques ont montré que cette technique est la plus appropriée pour la représentation des structures taxonomiques (8). Elle présente l'inconvénient de nécessiter des ordinateurs puissants, puisque l'ensemble des distances de la matrice est recalculé à chaque étape du processus. L'étude d'un fichier de 100 phénotypes nécessite environ 150.000 calculs de distances entre les phénotypes, celle d'un fichier de 1000 phénotypes en comporte 150.000.000, soit avec les explorations successives des matrices et les entrées-sorties environ 2h 30 mn d'occupation de l'unité centrale de calcul d'un IBM 3090.

#### 2.4.2.7 Représentation

Deux représentations sont utilisées :

- la représentation sous forme de dendrogramme montre l'emboîtement successif des grappes et donne une idée de l'affinité des groupes discernés (174). Son tracé nécessite la connaissance des points d'intersection du diagramme. La programmation en est complexe et le dessin d'études importantes requiert des traceurs de grande capacité (Figure 8). Une règle de trois donne le niveau hiérarchique ou pourcentage de similarité en fonction de la distance entre les phénotypes.



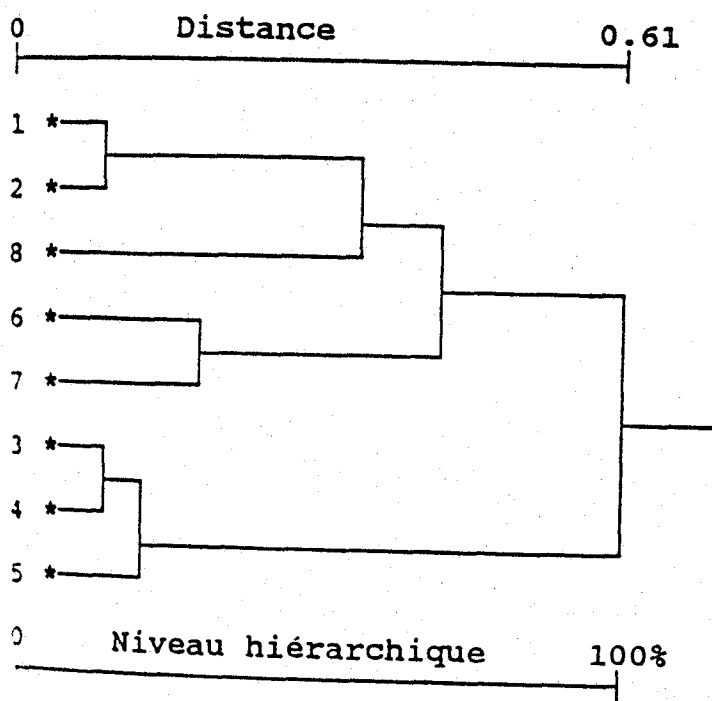


Figure 8 - Exemple de dendrogramme (8 phénotypes).  
Le tracé est obtenu sur imprimante matricielle

- la représentation sous forme de matrice de similarité est d'exécution plus simple. Elle consiste à répartir les distances figurant dans la matrice en plusieurs classes et à attribuer à chaque classe un niveau de gris ou un caractère ASCII d'aspect plus au moins sombre, de telle façon que le résultat donne une idée visuelle des répartitions en grappes (Figure 9)

Il est généralement admis (8), que les espèces bactériennes sont individualisées à des pourcentages de similarité de 80 à 85 % en utilisant l'indice de Jaccard-Sneath et l'agrégation par la méthode du diamètre moyen (UPGMA). Cette définition approximative est acceptable pour des groupes bactériens homogènes et bien connus (Enterobacteriaceae). Elle ne l'est pas pour des groupes moins connus tels que Pseudomonas. En tout état de cause, il est absolument nécessaire de la valider par des études de chénotaxonomie ou hybridation ADN/ADN.

#### 2.4.2.8 Analyse des résultats

##### 2.4.2.8.1 coupure de dendrogramme

Dans un but descriptif, il est nécessaire de choisir un niveau de coupure du dendrogramme pour délimiter les classes individualisées et les phénotypes isolés. Ce choix est le plus

souvent arbitraire. En pratique on choisit plusieurs niveaux de coupures et on essaye d'évaluer la rationalité de chacun de ces choix. Cette méthode permet habituellement de dégager un consensus parmi les observateurs.

Le problème de choix d'un niveau de coupure est d'autant plus ardu que le lot étudié est vaste et hétérogène. Il faut éviter les coupures trop hautes qui simplifient à l'excès la classification et les coupures trop basses qui la rendent inutilisables. Un bon compromis a été obtenu dans certaines études (174), en utilisant le calcul du coefficient d'acuité : le dendrogramme peut être coupé horizontalement à n'importe quel niveau entre 0 et 100% de similarité. Pour chaque niveau de coupure on mesure la quantité d'information apportée ou coefficient d'acuité : il tient compte du nombre de phénotypes regroupés, du niveau de coupure, de la différence entre le niveau de coupure et la dernière agrégation (173) (Figure 10).

On obtient une courbe dont le maximum désigne le niveau de coupure le plus intéressant. Les grappes individualisées en dessous de ce niveau constituent les espèces ou groupes phénétiques.

Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant l'agrégation par la variance.

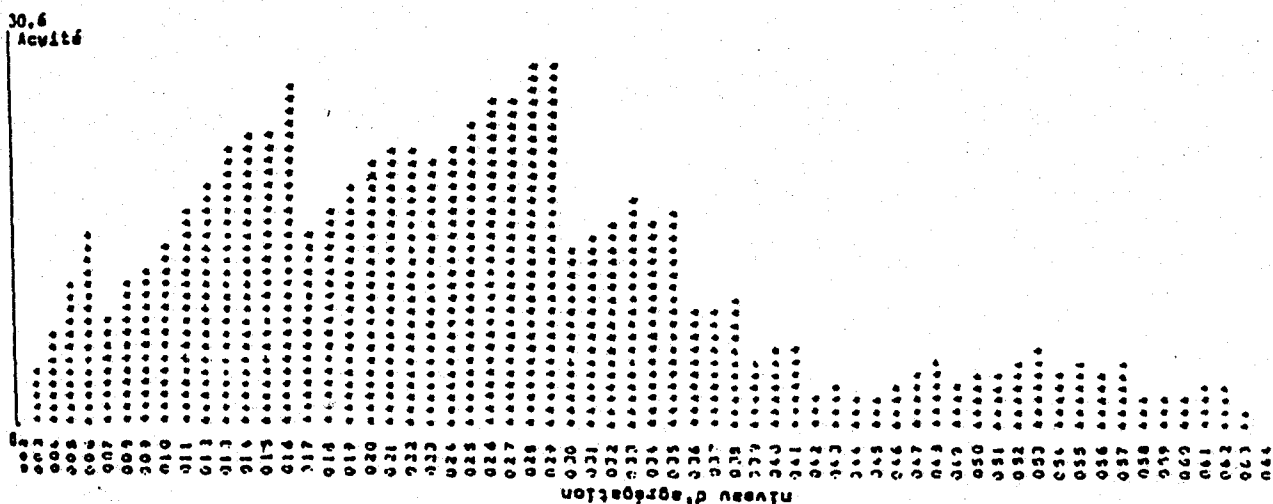


Figure 10 - Variations du coefficient d'acuité. Etude de 65 souches de bactéries anaérobies (18).

ACUITE MAXIMALE : 30,6 ; NIVEAU : 0029 ; NOMBRE D'ESPECES : 0010

TITLE - Bacillus

SIMILARITY MATRIX, ENTRIES IN SHADING SYMBOLS:

SYMBOLS USED TO REPRESENT SCALES VALUES BETWEEN 0.000 AND

1.000

RANGE SYMBOL

|                  |       |
|------------------|-------|
| 0.00 < S <= 0.55 | blank |
| 0.55 < S <= 0.60 | .     |
| 0.60 < S <= 0.65 | ,     |
| 0.65 < S <= 0.70 | :     |
| 0.70 < S <= 0.75 | -     |
| 0.75 < S <= 0.80 | =     |
| 0.80 < S <= 0.85 | +     |
| 0.85 < S <= 0.90 | *     |
| 0.90 < S <= 0.95 | \$    |
| 0.95 < S <= 0.98 | @     |
| 0.98 < S <= 1.00 | #     |

```

2  #
5  *#
4  **#
8  +*=#
10 +*+$#
19 +=$$#
20 +=*$@#
21 +=***$#
25 ==-*****#
3  ==+=-----#
11 +=+=====+#
12 +=*+=-----+$#
13 ++++++=====+$#$
15 +=+++++=====+*$$$#
22 =====+-----+$***#
17 ==-====-+====+##
18 -----=::::,-.#
24 :::-=====:,,,:-#
34 -----=::::-,+##
45 -----+=-----=::::-==#
27 :::-=====:,,,:-##
36 -----=::::-,+##
43 -----=::::-,+##
30 :::-=====::::-,+##
47 :::-=====::::-,+##
26 -----=::::-,+##
    
```

Figure 9 - Matrice de similarité établie par le programme TAXAN (26 souches de Bacillus télluriques).

Ce coefficient d'acuité semble intéressant dans des lots très homogènes (distances taxonomiques faibles), ou en cas d'utilisation de la méthode d'agrégation par variance.

#### 2.4.2.8.2. Coefficient de capacité diagnostique

Le coefficient de capacité diagnostique de Descamps et Véron (41) dérive du théorème de Bayes et mesure la quantité d'information apportée pour chaque test.

Soit une souche bactérienne X, pouvant appartenir à N classes (N diagnostics possibles).

Soit P(A) la probabilité pour la souche X d'appartenir à la classe A.

Soit P(C+/A) (lire P de C+ si A) la probabilité conditionnelle pour qu'une souche de la classe A ait le caractère C. Pour chaque modalité (C+ ou C-) d'un caractère, l'écart entre les distributions a priori et à postériori peut être mesuré par diverses fonctions mathématiques de forme générale :  $f(P(A), P(A/C))$ . L'intérêt d'un caractère est donné par la moyenne des écarts calculés pour chaque modalité pondérée par la fréquence de ces modalités. Cette moyenne ou coefficient de capacité diagnostique s'exprime sous la forme générale :

$$CCD (C) = P(C+) \cdot f(P(A), P(A/C+)) + P(C-) \cdot f(P(A), P(A/C-))$$

Il prend en compte la fréquence constatée de chaque espèce dans le lot de départ et les pourcentages de positivité de la matrice des données.

On peut également le calculer en affectant à chaque espèce une fréquence égale (optique "centre de référence").

Le Tableau X montre l'utilisation du coefficient de capacité diagnostique pour évaluer les différentes techniques d'identification des bactéries anaérobies.

| Test                | CCD |
|---------------------|-----|
| Spore sub-terminale | .87 |
| Gram                | .82 |
| Saccharose          | .79 |
| Raffinose           | .78 |
| Lactose             | .78 |
| Lécithinase         | .77 |
| Bile                | .75 |
| Anaérodisc Kana     | .75 |
| Anaérodisc Péri     | .74 |
| Maltose             | .74 |
| Gaz                 | .74 |
| Mannose             | .72 |
| Anaérodisc Vanco    | .68 |
| Lait cystéiné       | .67 |
| Esculine            | .65 |
| Gélatine            | .62 |
| Glucose             | .60 |
| Double hémolyse     | .52 |
| Arabinose           | .48 |
| Catalase            | .44 |
| Cellobiose          | .39 |
| Indole              | .38 |
| Glycérol            | .33 |
| Sodium poly sulfate | .32 |
| Novobiocine         | .31 |
| Salicine            | .30 |
| Tréhalose           | .30 |
| Nitrates            | .30 |
| Rahmnose            | .29 |
| Estérase            | .28 |
| Mélezitose          | .23 |
| Sorbitol            | .20 |
| Estérase/lipase     | .18 |
| Urée                | .18 |
| Béta-hémolyse       | .18 |
| Lipase œuf          | .16 |
| Protéase œuf        | .15 |
| Mannitol            | .13 |
| Spore terminale     | .11 |

Tableau X - Utilisation du coefficient de capacité diagnostique pour l'évaluation de différentes techniques d'identification des bactéries anaérobies.

#### 2.4.2.8.3 Vigour et pattern

Les travaux de Sneath (157) sur la "vigour" (vigour) et le "profil" de (pattern) ont profondément influencé la réflexion des taxonomistes. Schématiquement il s'agit de faire la part de ce qui revient aux capacités génétiques, c'est à dire à la possession des circuits métaboliques et de leur information génétique sous-jacente, et de la manière dont cette information est exprimée. Les souches à vigour faible peuvent ainsi avoir les mêmes aptitudes que les souches à vigour élevée, sans pouvoir les exprimer lorsqu'elles sont explorées par les tests biochimiques ou culturels habituels. On peut alors leur assigner un "pattern" ou profil de réponse aux tests identiques, avec une "vigour" plus faible.

Cette conception rend parfaitement compte de l'adaptation à leur hôte de certaines souches d'E.coli, qui ont gardé leur "pattern" en perdant leur "vigueur" lors de leur transformation en Shigella.

Elle permet également d'expliquer l'adaptation d'Hafnia alvei aux fermenteurs de levure à bière : la pression de sélection exercée par ce milieu très riche a fait évaluer H. alvei, bactérie très réactive voisine d'Enterobacter, en Obesumbacterium proteus, incapable de fermenter la plupart des substrats utilisés par H. alvei.

Ces travaux ont débouché sur une conception nouvelle des systèmes d'identification, accordant un poids plus important aux caractères présents qu'aux caractères absents, privilégiant donc le "pattern" par rapport à la "vigueur".

### 2.4.3 Identification

#### 2.4.3.1 Clés dichotomiques

Classiquement, l'identification des bactéries fait appel à un certain nombre de test concernant la morphologie, les caractères cultureux et physiologiques, le pouvoir pathogène expérimental... Ces tests étaient pratiqués "à l'unité" ou par groupes réduits (tels que la "galerie Pasteur" d'identification des Enterobacteries), en fonction d'une élimination dichotomique successive inspirée par l'expérience du microbiologiste.

L'identification est conduite en étapes successives, la réponse au test de rang N entraînant un branchement conditionnel sur le test de rang N+1. On conçoit qu'il suffit d'une erreur dans la lecture d'un des premiers tests pour rendre impossible toute identification.

Les clés dichotomiques ont été abandonnées pour les tables diagnostiques au cours des années 1960-1970 (Figure 11). On les trouve encore dans les fiches techniques fournies aux étudiants pour simplifier leur tâche d'apprentissage.

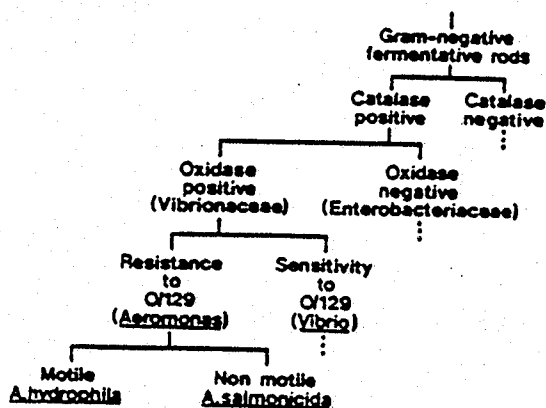


Figure 11 - Clé dichotomique pour l'identification d'Aeromonas.

#### 2.4.3.2 Tables diagnostiques

Les tables diagnostiques sont des matrices contenant l'ensemble des réponses d'un lot de taxons à un certain nombre de tests.

Il est habituellement admis qu'elles ne doivent pas contenir de cases vides (non documentées).

Les résultats sont codés sous la forme +, -, + ou -. Ils sont à l'heure actuelle le plus souvent exprimés sous la forme retenue par le Bergey's Manual :

- + : 90% ou plus des souches possèdent le caractère
- : 90% ou plus des souches ne possèdent pas le caractère
- d : 11-89% des souches possèdent le caractère
- v : caractère instable

La souche inconnue est soumise aux tests figurant dans la table, puis les résultats sont comparés aux réponses fournies par chaque taxon. Il est facile de comprendre que ce processus est d'autant plus délicat que les tests et les taxons sont nombreux.

Les travaux de Lapage (91) ont permis de faire réaliser les comparaisons par un ordinateur, de façon à n'oublier aucune possibilité. Ils ont débouché sur l'identification numérique moderne.

#### 2.4.3.3 Identification numérique

L'identification numérique utilise une matrice des données : elle contient pour chaque taxon les fréquences de réponse positive aux différents tests. Pour éviter les exclusions, les fréquences 1 et 0 ne sont pas attribuées, on leur préfère les valeurs 0.01 et 0.99.

Quand le microorganisme inconnu présente un résultat positif, on retient la valeur de la fréquence figurant dans la matrice des données. Si le résultat est négatif, la probabilité est obtenue en soustrayant la probabilité positive de l'unité.

Lapage a défini en 1973 (91) la fréquence théorique d'apparition du phénotype dans l'espèce ("probability products") comme le produit des fréquences de positivité pour les différentes espèces. Elle reflète l'atypie du phénotype.

Dybowski et Franklin (48) ont proposé le pourcentage d'identification relative ("percent relative likelihood") : c'est le rapport de la fréquence théorique du phénotype dans l'espèce à la fréquence théorique plus élevée. Ce coefficient exprime la qualité de la discrimination, mais ne permet pas de définir les valeurs-seuil (8). On préfère donc utiliser le pourcentage d'identification normalisé de LAPAGE "identification score": C'est le rapport de la fréquence théorique du phénotype dans l'espèce à la somme des fréquences théoriques.

On l'utilise habituellement multiplié par 100, et on accepte généralement les seuils suivants :

- > 99,9% : excellente identification
- > 99% : très bonne identification
- > 90% : bonne identification
- > 80% : identification acceptable
- < 80% : identification inacceptable

La figure 12 présente un exemple d'identification numérique utilisant ces paramètres.

Matrice des données :

| Taxon | Catalase | oxydase | béta-galactosidase |
|-------|----------|---------|--------------------|
| 1     | 0,80     | 0,95    | 0,05               |
| 2     | 0,99     | 0,01    | 0,95               |

Réponse aux tests (phénotype) de l'individu inconnu X :

| Nom | catalase | oxydase | béta-galactosidase |
|-----|----------|---------|--------------------|
| X   | +        | -       | +                  |

1) fréquence théorique d'apparition du phénotype dans l'espèce ("probability products").

$$\begin{aligned} X \text{ comparé au taxon 1} &: 0,80 \times (1-0,95) \times 0,05 = 0,002000 \\ X \text{ comparé au taxon 2} &: 0,99 \times (1-0,01) \times 0,95 = 0,931095 \\ &\text{total} \quad \quad \quad 0,933095 \end{aligned}$$

2) pourcentage d'identification relative ("percent relative likelihood")

$$\begin{aligned} X \text{ comparé au taxon 1} &: 0,002000/0,931095 = 0,0021480085 \\ X \text{ comparé au taxon 2} &: 0,931095/0,931095 = 1 \end{aligned}$$

3) pourcentage d'identification normalisé de LAPAGE ("identification score")

$$\begin{aligned} X \text{ comparé au taxon 1} &: 0,002000/0,933095 = 0,0021434 \\ X \text{ comparé au taxon 2} &: 0,931095/0,933095 = 0,9978566 \end{aligned}$$

X peut être identifié au taxon 2 avec un pourcentage d'identification de 99,7% (très bonne identification). La fréquence théorique d'apparition du phénotype dans l'espèce est de 0,93, ce qui peut aussi s'exprimer en disant que 93% des souches du taxon 2 présentent ce phénotype.

Figure 12 - Calcul des paramètres d'identification.



#### 2.4.3.4 Fréquence modale

La fréquence modale (48) est le rapport de la fréquence d'apparition du phénotype dans l'espèce à la fréquence d'apparition du phénotype le plus typique. Cet index est indépendant de la variabilité du taxon. Il n'est pas affecté par la présence d'espèces voisines dans la matrice, mais sa valeur dépend du nombre de tests étudiés.

#### 2.4.3.5 Coefficient T

Boeufgras et al, ont proposé en 1987 (A new computer program for routine interpretation of API identification systems, 2nd conference of taxonomy and automatic identification of bacteria, prague, 1987) de pondérer la fréquence modale avec le seuil de signification S qui tient compte du nombre de résultats atypiques. Ce coefficient T varie de 1 (profil le plus typique à presque 0 (profil le moins typique). Ces auteurs ont proposé de retenir les seuils suivants :

- > 0,75 : excellente identification
- > 0,50 : très bonne identification
- > 0,25 : bonne identification.

### 3. TRAVAUX PERSONNELS

#### 3.1 Matériel et méthodes

##### 3.1.1 Souches utilisées

Les premières souches de P. syringae pv. syringae ont été isolées en 1976. Depuis, 231 souches ont été prélevées en majorité à partir de 1986, principalement au printemps et à l'automne :

- soit de la surface de feuilles saines lors de broyage ou de lavage,
- soit à partir de symptômes sur feuilles ou sur tige.

Ces souches proviennent de :

- 6 cultivars (Caucasica, Rodundifolia, Otto Luyken, Herbergii, Reynvaanii et Zabeliana),
- 3 pépinières françaises de diverses situations géographiques (région parisienne, ouest, sud-ouest),
- quelques jardins publics et privés.

Vingt-neuf souches possédant une cytochrome C oxydase ont aussi été isolées de la surface des feuilles saines de laurier palme.

143 souches de P. syringae pv. savastanoi ont également été incluses dans notre étude (Tableau XII).

Ces souches ont été isolées de différents hôtes :

|                  |    |
|------------------|----|
| olivier          | 58 |
| laurier rose     | 33 |
| frêne            | 39 |
| troëne           | 6  |
| <u>Phillyrea</u> | 4  |
| jasmin           | 3  |

Elles proviennent de différents pays : France, Algérie, Italie, Yougoslavie, Syrie, Tunisie, Grèce, Portugal, Etats-Unis, Pays-bas et Grande-Bretagne.

78 autres souches de référence ont été ajoutées dont 41 pathovars de P. syringae, 35 souches de Pseudomonas fluorescents et non fluorescents, une souche d'Agrobacterium tumefaciens et une souche de Xanthomonas. campestris pv. campestris (Tableau XIII)

##### 3.1.2 Caractères biochimiques classiques

###### 3.1.2.1 Bactéries étudiées.

140 souches de P. syringae pv. syringae, isolées principalement de lésions, ont été identifiées au moyen de 20 caractères biochimiques classiques (Tableau XIV). 91 souches,

Tableau XII - Souches de P. syringae pv. savastanoi

| Hôte    | N° de la souche dans le laboratoire | N° de la souche dans la collection | Code de la souche | Origine géographique |         |
|---------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------|----------------------|---------|
| Olivier | 49                                  | CFBP 2074                          | S01               | Algérie              |         |
|         | 50                                  | CFBP 2075                          | S02               | Algérie              |         |
|         | 54                                  |                                    | S03               | Algérie              |         |
|         | 60                                  | CFBP 2076                          | S04               | Algérie              |         |
|         | 62                                  |                                    | S05               | Algérie              |         |
|         |                                     |                                    | CFBP 71           | S06                  | Tunisie |
|         | G 29.1                              | CFBP 2073                          | S07               | France               |         |
|         | K 23.1                              |                                    | S08               | Algérie              |         |
|         | K 23.2                              |                                    | S09               | Algérie              |         |
|         | K 23.7                              | CFBP 2069                          | S010              | Algérie              |         |
|         | K 23.10                             |                                    | S011              | Algérie              |         |
|         | K 23.12                             |                                    | S012              | Algérie              |         |
|         | K 23.15                             |                                    | S013              | Algérie              |         |
|         | K 23.19                             |                                    | S014              | Algérie              |         |
|         | K 124.4                             |                                    | S015              | Algérie              |         |
|         | K 124.7                             |                                    | S016              | Algérie              |         |
|         | K 124.9                             |                                    | S017              | Algérie              |         |
|         | K A 1                               |                                    | S018              | Algérie              |         |
|         | K C 2.1                             | CFBP 2070                          | S019              | Algérie              |         |
|         | K C 3.1                             |                                    | S020              | Algérie              |         |
|         | K C 4.1                             |                                    | S021              | Algérie              |         |
|         | K C 4.2                             |                                    | S022              | Algérie              |         |
|         | K L 2                               |                                    | S023              | Algérie              |         |
|         | K O 1                               | CFBP 2071                          | S024              | Algérie              |         |
|         | K O 21                              |                                    | S025              | Algérie              |         |
|         | L 6.12                              |                                    | S026              | Algérie              |         |
|         | L 9.11                              |                                    | S027              | Algérie              |         |
|         | L 9.22                              |                                    | S028              | Algérie              |         |
|         | L 9.32                              |                                    | S029              | Algérie              |         |
|         | L 9.33                              |                                    | S030              | Algérie              |         |
|         | L 9.34                              |                                    | S031              | Algérie              |         |
|         | L 14.4                              | CFBP 2081                          | S032              | France               |         |
|         | OB 1                                |                                    | S033              | Algérie              |         |
|         | OC 1                                |                                    | S034              | Algérie              |         |
|         | S 43.21                             |                                    | S035              | France               |         |
|         | S 43.22                             |                                    | S036              | France               |         |
|         | S 43.26                             |                                    | S037              | France               |         |
|         | S 43.27                             |                                    | S038              | France               |         |
|         | T 12.6                              |                                    | S039              | Grèce                |         |
|         | T 35.1                              | NCPPB 64                           | S040              | Portugal             |         |
|         | T 35.3                              | NCPPB 1342                         | S041              | U.S.A.               |         |
|         | T 35.4                              | NCPPB 1344                         | S042              | U.S.A.               |         |
|         | T 35.6                              | NCPPB 1479                         | S043              | Yougoslavie          |         |
|         | T 35.7                              | NCPPB 1480                         | S044              | Yougoslavie          |         |
|         | T 35.8                              | NCPPB 1481                         | S045              | Yougoslavie          |         |
|         | T 35.9                              | NCPPB 1506                         | S046              | Italie               |         |
|         | T 37.1                              |                                    | S047              | Italie               |         |
|         | T 37.2                              |                                    | S048              | Italie               |         |
|         | T 37.3                              |                                    | S049              | Italie               |         |
|         | T 37.4                              |                                    | S050              | Italie               |         |
|         | T 37.5                              |                                    | S051              | Italie               |         |

Suite du tableau XII

|                 |   |  |   |   |
|-----------------|---|--|---|---|
| Olivier         | T 38.1<br>T 38.2<br>T 38.3<br>T 38.4  | CFBP 1020<br>CFBP 1670<br>CFBP 1746  | S052<br>S053<br>S054<br>S055<br>S056<br>S057<br>S058  | Syrie<br>Syrie<br>Syrie<br>Syrie<br>France<br>Yougoslavie<br>Italie   |
| Laurier<br>rose | G 30.1<br>H 129.1<br>H 129.2<br>H 129.5<br>K 4.2<br>K 119.1<br>L 7.21<br>L 14.3<br>L 86.1<br>L 87.2<br>L 145.1<br>L 145.2<br>RF 22<br>S 43.4<br>S 43.7<br>S 43.19<br>S 43.23<br>T 12.1<br>T 12.5<br>T 12.7<br>T 12.8<br>T 12.9<br>T 35.2<br>T 35.5<br>T 36.7<br>T 37.6<br>T 37.7<br>T 37.8<br>T 37.9<br>T 37.10<br>51 | CFBP 2084<br>CFBP 2083<br>CFBP 2087<br>CFBP 2088<br>CFBP 2089<br>CFBP 2090<br>CFBP 2091<br>CFBP 2092<br><br>NCPFB 640<br>NCPFB 1345<br><br>CFBP 2085<br>CFBP 1021<br>CFBP 1839 | SN1<br>SN2<br>SN3<br>SN4<br>SN5<br>SN6<br>SN7<br>SN8<br>SN9<br>SN10<br>SN11<br>SN12<br>SN13<br>SN14<br>SN15<br>SN16<br>SN17<br>SN18<br>SN19<br>SN20<br>SN21<br>SN22<br>SN23<br>SN24<br>SN25<br>SN26<br>SN27<br>SN28<br>SN29<br>SN30<br>SN31<br>SN32<br>SN33 | France<br>France<br>France<br>France<br>Algérie<br>France<br>Algérie<br>Algérie<br>U.S.A.<br>U.S.A.<br>France<br>France<br>France<br>France<br>France<br>Grèce<br>Grèce<br>Grèce<br>Grèce<br>Grèce<br>Grèce<br>Yougoslavie<br>U.S.A.<br>Pays-Bas<br>Italie<br>Italie<br>Italie<br>Italie<br>Italie<br>Italie<br>Algérie<br>France<br>France |
| Frêne           | Fe 30<br>Fe 51<br>Fe 56<br>Fe 58<br>Fe 60<br>Fe 61<br>Fe 83<br>Fe 92<br>Fe 93<br>Fe 161   | CFBP 2158<br>CFBP 2161<br>CFBP 2162<br>CFBP 2174<br>CFBP 1793<br>CFBP 2163<br>CFBP 2164<br>CFBP 2166<br>CFBP 2167  | SF1<br>SF2<br>SF3<br>SF4<br>SF5<br>SF6<br>SF7<br>SF8<br>SF9<br>SF10   | France<br>France<br>France<br>France<br>France<br>France<br>France<br>France<br>France<br>France  |

Suite du tableau XII

|           |           |            |          |          |
|-----------|-----------|------------|----------|----------|
| Frêne     | Fe 241    | CFBP 2159  | SF11     | France   |
|           | Fe 261    | CFBP 1794  | SF12     | France   |
|           | Fe 311    | CFBP 1795  | SF13     | France   |
|           | Fe 400    | CFBP 2160  | SF14     | France   |
|           | Fe 401    |            | SF15     | France   |
|           | Fe 406    | CFBP 1838  | SF16     | France   |
|           | Fe 500    | CFBP 2171  | SF17     | France   |
|           | Fe 501    |            | SF18     | France   |
|           | Fe 502    | CFBP 2168  | SF19     | France   |
|           | Fe 504    |            | SF20     | France   |
|           | Fe 505    | CFBP 2172  | SF21     | France   |
|           | Fe 506    | CFBP 2169  | SF22     | France   |
|           | Fe 600    | CFBP 2175  | SF23     | France   |
|           | FX 2      | CFBP 2176  | SF24     | Algérie  |
|           | L 39.4    | CFBP 2093  | SF25     | France   |
|           | L 48.3    | CFBP 2094  | SF26     | Algérie  |
|           | T 5.1     |            | SF27     | France   |
|           | T 35.12   | NCPBP 2716 | SF28     | U.K.     |
|           | T 36.1    |            | SF29     | Pays-Bas |
|           | T 36.2    |            | SF30     | Pays-Bas |
| T 36.3    |           | SF31       | Pays-Bas |          |
| T 36.4    |           | SF32       | Pays-Bas |          |
| T 36.5    |           | SF33       | Pays-Bas |          |
| T 36.6    |           | SF34       | Pays-Bas |          |
| T 36.8    |           | SF35       | Pays-Bas |          |
| T 36.9    |           | SF36       | Pays-Bas |          |
| T 36.10   |           | SF37       | Pays-Bas |          |
|           | CFBP 1663 | SF38       | U.S.A.   |          |
|           | CFBP 1666 | SF39       | U.K.     |          |
|           | T 35.10   | NCPBP 2328 | SL1      | Italie   |
|           | T 37.11   |            | SL2      | Italie   |
|           | T 37.12   |            | SL3      | Italie   |
|           | T 37.13   |            | SL4      | Italie   |
|           | T 37.14   |            | SL5      | Italie   |
|           | T 37.15   |            | SL6      | Italie   |
| Phillyrea | Phi       |            | SP1      | Algérie  |
|           | T 51.1    |            | SP2      | Algérie  |
|           | T 51.2    |            | SP3      | Algérie  |
|           | T 51.3    |            | SP4      | Algérie  |
| Jasmin    | T 12.4    |            | SJ1      | Grèce    |
|           | T 12.10   |            | SJ2      | Grèce    |
|           |           | 1751       | SJ3      | Grèce    |

CFBP : Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (Angers).  
 NCPBP : National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (Londres).

essentiellement isolées à la surface des feuilles saines par lavage ou par broyage, ont été brièvement identifiées par 9 caractères. Les 29 souches possédant une cytochrome C oxydase n'ont pas été étudiées sur le plan biochimique.

Toutes les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* ont été identifiées au moyen des 20 caractères biochimiques classiques. (Tableau XII), y compris les 78 autres souches de référence (Tableau XIII).

### 3.1.2.2 Méthodes et principes

#### 3.1.2.2.1 Hypersensibilité sur tabac

La mise en évidence du pouvoir phytopathogène d'une bactérie se pratique généralement sur tabac, mais peut se réaliser aussi sur beaucoup de plantes (hétérologue par rapport à la bactérie).

Il consiste à l'infiltration dans le limbe foliaire d'une suspension bactérienne dense de  $10^8$  bactéries /ml à l'aide d'une seringue hypodermique. L'injection se fait plus facilement en immobilisant avec le pouce et l'index de la main gauche la zone choisie et en piquant latéralement la nervure principale ou une grosse nervure secondaire ; l'injection du liquide se traduit par une plage humide qui s'étend dans le limbe. Il faut obtenir une plage d'au moins 1 ou 2 cm.

Pour les bactéries phytopathogènes, 24 à 48 heures après, suivant les bactéries, il apparaît dans la zone infiltrée un collapse et un dessèchement des tissus (87).

On peut affiner ce test en déterminant la dose minimale hypersensible (D.M.H.) en injectant des différentes dilutions de la suspension bactérienne.

#### 3.1.2.2.2 Production de pigments fluorescents

Principe : Certains *Pseudomonas* produisent des pigments fluorescents (pyoverdine) sur des milieux particuliers contenant une faible concentration en fer.

Ces pigments sont hydrosolubles, insolubles dans le chloroforme, gris vert, fluorescents aux UV. En solution la pyoverdine se comporte comme un indicateur de pH.

|    |   |                             |   |                           |   |                           |
|----|---|-----------------------------|---|---------------------------|---|---------------------------|
| pH | → | 3                           | → | 7-8                       | → | 11                        |
|    |   | incolore non<br>fluorescent |   | jaune-vert<br>fluorescent |   | jaune-brun<br>fluorescent |

Les pseudomonas ont la propriété d'émettre une lumière visible lorsqu'ils reçoivent un flux de rayons UV, ils transforment alors le flux de faible longueur d'onde en un flux de longueur d'onde plus grande.

Tableau XIII - Souches des pathovars de P. syringae et d'autres espèces de Pseudomonas

| Nom de l'espèce ou du pathovar              | N° de la souche (CFPB) | Code de la souche | Groupe de Lelliott et al. |
|---|------------------------|-------------------|---------------------------|
| <u>P. syringae</u> pv. <u>aceris</u>        | 2339                   | ACR               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>antirhini</u>     | 1620                   | ANT               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>aptato</u>        | 1617                   | APT               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>atofaciens</u>    | 2213                   | ATF               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>atropurpurea</u>  | 2340                   | ATR               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>berberidis</u>    | 1727                   | BRB               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>cannabina</u>     | 2341                   | CAN               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>coronafaciens</u> | 2216                   | COR               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>eriobotryae</u>   | 2343                   | ERY               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>garcae</u>        | 1634                   | GAR               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>glycinea</u>      | 2214                   | GLY               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>helianthi</u>     | 2067                   | HEL               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>lachrymans</u>    | 2440                   | LAC               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>lapsa</u>         | 1731                   | LAP               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>macumlicola</u>   | 1657                   | MAC               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>mori</u>          | 1642                   | MRI               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>morsprunorum</u>  | 2211                   | MOR               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>panici</u>        | 2345                   | PNC               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>persicae</u>      | 1573                   | PER               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>phaseolicola</u>  | 1390                   | PHS               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>lisi</u>          | 2105                   | PIS               | IA                        |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>porri</u>         | 2361                   | POR 1             |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>porri</u>         | 2397                   | POR 2             |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>porri</u>         | 1908                   | POR 3             |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>primulae</u>      | 1660                   | PRM               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>sesami</u>        | 1671                   | SES               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>syringae</u>      | 1392                   | SYR               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>tabaci</u>        | 2106                   | TAB               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>tomato</u>        | 2212                   | TOM               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>ulmi</u>          | 1407                   | ULM               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>viburni</u>       | 1702                   | VIB               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>ciccaronei</u>    | 2342                   | CIC               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>delphinii</u>     | 2215                   | DEL               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>dysoxyli</u>      | 2356                   | DYS               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>mellea</u>        | 3244                   | MEL               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>papulans</u>      | 1754                   | PAP               | IB                        |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>passiflorae</u>   | 2346                   | PAS               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>ribicola</u>      | 2348                   | RBC               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>striaefaciens</u> | 1674                   | STR               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>tagetis</u>       | 1694                   | TAG               |                           |
| <u>P. syringae</u> pv. <u>theae</u>         | 2353                   | THE               |                           |
| <u>P. viridiflava</u>                       | 2107                   | VIR               | II                        |
| <u>P. cichorii</u>                          | 2101                   | CIH               | III                       |
| <u>P. marginalis</u> pv. <u>marginalis</u>  | 1387                   | MAR               |                           |
| <u>P. marginalis</u> pv. <u>pastinacae</u>  | 2038                   | PAS               | IV                        |
| <u>P. marginalis</u> pv. <u>alfalfae</u>    | 2039                   | ALF               |                           |

Suite du tableau XIII

|  |           |      |                    |
|--|-----------|------|--------------------|
| <u>P. tolaasii</u>                         | 2068      | TLS1 |                    |
| <u>P. tolaasii</u>                         | 2152      | TLS2 |                    |
| <u>P. aeruginosa</u>                       | 100/20    | AER  |                    |
| <u>P. fluorescens</u>                      | 2102      | FLU1 |                    |
| <u>P. fluorescens</u>                      | 2299      | FLU2 |                    |
| <u>P. fluorescens</u>                      | 2123      | FLU3 |                    |
| <u>P. fluorescens</u>                      | 2125      | FLU4 |                    |
| <u>P. fluorescens</u>                      | 2127      | FLU5 |                    |
| <u>P. fluorescens</u>                      | 2129      | FLU6 |                    |
| <u>P. fluorescens</u>                      | 2130      | FLU7 |                    |
| <u>P. putida</u>                           | 2066      | PUT  | V                  |
| <u>P. putida</u>                           | 2298      | PUT2 |                    |
| <u>P. fuscovaginae</u>                     | 2265      | FUSC |                    |
| <u>P. cayophylli</u>                       | 2429      | CAR  |                    |
| <u>P. cepacia</u>                          | 2234      | CEP1 |                    |
| <u>P. cepacia</u>                          | 2227      | CEP2 |                    |
| <u>P. corrugata</u>                        | 2431      | COR1 |                    |
| <u>P. corrugata</u>                        | 82.145.41 | COR2 |                    |
| <u>P. corrugata</u>                        | 84.30.5   | COR3 |                    |
| <u>P. corrugata</u>                        | 83.22.4   | COR4 |                    |
| <u>P. gladioli</u> pv. <u>gladioli</u>     | 2427      | GLA  |                    |
| <u>P. gladioli</u> pv. <u>alliicola</u>    | 2422      | ALI  |                    |
| <u>P. solanacearum</u>                     | 2047      | SOL1 |                    |
| <u>P. solanacearum</u>                     | 1482      | SOL2 |                    |
| <u>P. solanacearum</u>                     | 1420      | SOL3 |                    |
| <u>P. rubrilineans</u>                     | 1294      | RUB  | <u>Pseudomonas</u> |
| <u>P. rubrisubalbicans</u>                 | 1296      | RRS  | <u>non fuore-</u>  |
| <u>P. pseudoalcaligenes</u>                | 2435      | ALCT | <u>scents</u>      |
| <u>P. alcaligenes</u>                      | 2437      | ALC  |                    |
| <u>P. stutzeri</u>                         | 2443      | STT  |                    |
| <u>A. tumefaciens</u>                      | 2413      | AGR  |                    |
| <u>X. campestris</u> pv. <u>campestris</u> | 2350      | XCC  |                    |



### Milieu de king B

|   |      |    |
|---|------|----|
| - Protéose peptone n° 3   | 20   | g  |
| - Glycerol  | 10   | g  |
| - Phosphate bipotassique : K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 1,5  | g  |
| - Sulfate de magnésium M <sub>9</sub> SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O | 1,5  | g  |
| - Agar  | 18   | g  |
| - Eau distillée   | 1000 | ml |

Répartir en tube de 6 ml, autoclaver pendant 30 mn à 115°C et incliner jusqu'à ce que le milieu soit suffisamment solidifié.

L'ensemencement se fait en trait droit de bas en haut du tube, le pigment hydrosoluble diffuse dans le milieu et donne parfois une coloration jaune vert-visible à l'oeil nu. L'examen des tubes sous une lampe émettant une lumière UV à la longueur d'onde de 365 nm (lampe Wood.Mineralight.Re. 51-32-8295) permet de vérifier la production du pigment fluorescent bleu ou vert, en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (85).

#### 3.1.2.2.3 Activité levane sucrase

Principe : certains pseudomonas qui possèdent une levane sucrase scindent le saccharose en glucose et fructose puis polymérisent ce dernier en polyfructose : levane.



#### Milieu

C'est un milieu hypersaccharosé utilisé en pente gélosé.

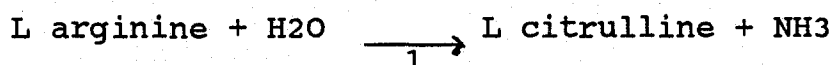
|                      |        |
|----------------------|--------|
| - Extrait de levures | 2 g/l  |
| - Bactopeptone       | 5 g/l  |
| - CINA               | 5 g/l  |
| - Saccharose         | 50 g/l |
| - Agar               | 15 g/l |

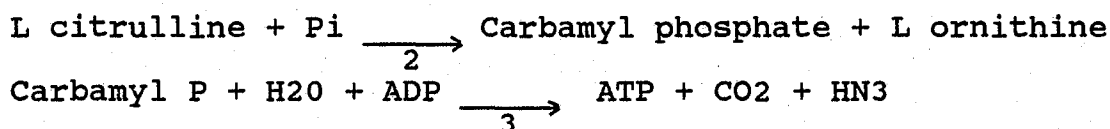
pH 7,2 à 7,4

La recherche de la levane sucrase se fait par ensemencement en une strie droite sur la pente gélosée ; la présence de la levane sucrase se traduit, après 3 jours d'incubation à 24°C, par une culture abondante, bombée, muqueuse et brillante (96).

#### 3.1.2.2.4 Arginine dihydrolase

Principe : Il s'agit d'une fermentation de l'arginine qui correspond à une double hydrolyse.





La phosphorylation au niveau du substrat intervenant dans l'étape 2 permet aux germes aérobies de se développer en anaérobiose.

#### Milieu de Thornley .

|                                   |      |     |
|-----------------------------------|------|-----|
| - Arginine mono HCL               | 10   | g/l |
| - Bactopeptone                    | 1    | g/l |
| - CINA                            | 5    | g/l |
| - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,3  | g/l |
| - Rouge de phénol                 | 0,01 | g/l |

Répartir en tube d'Ivan Hall et autoclaver 20 mn à 120°C (171).

La recherche de l'arginine dihydrolase se fait par ensemencement des deux parties, aérobie et anaérobie, du tube d'Ivan Hall, avec quelques gouttes d'un inoculum liquide. Après incubation pendant 3 à 7 jours à 24°C, une coloration rouge pourpre (alcalinisation) de la partie du tube en anaérobiose révèle la présence d'une activité arginine dihydrolase.

#### 3.1.2.2.5 Activité pectinolytique

Principe : les pectines sont des chaînes linéaires d'acide poly B 1:4 galacturonique méthylé en position 6. Elles sont dégradées par :

- la pectine méthyle estérase (PME) qui hydrolyse les groupements méthyle.

- la polygalacturonidase (P.G) qui hydrolyse les liaisons 1:4 de la chaîne et libère de l'acide galacturonique. C'est une dépolymérisation. Elle est mise en évidence sur gel de pectinate de calcium.

#### Milieu pour la mise en évidence des dépolymérases

A : - Cl<sub>2</sub>Ca      5 g/l  
 - Agar          15 g/l  
 3 ml par tube de 16 mm x 160

B : - Extrait de levure      2 g/l  
 - Bactopeptone          3 g/l  
 - pectine de pomme      5 g/l  
 - Ethanol 95°            10 ml

pH 7

Au moment de l'emploi, on recouvre le culot de Cl<sub>2</sub>Ca de 1 à 1,5 ml de pectine (milieu B).

L'activité dépolymérase se révèle par la liquéfaction de gel de pectinate, après ensemencement par piqûre au centre du gel

et incubation à une température entre 23-25°C pendant 3 à 5 jours. Une agitation intempestive aura pour effet de briser le gel et d'entraîner une interprétation erronée (133).

### 3.1.2.2.6 Hydrolyse de la gélatine

Principe : la gélatine est une protéine de poids moléculaire important, obtenue à partir de tissus riches en collagène. A température inférieure à 23-25°C, la gélatine est prise en masse est constitue un gel qui se liquéfie quand la température dépasse 25°C. L'hydrolyse de la gélatine réalisée par une gélatinase enzyme extracellulaire entraine une fragmentation poussée de la protéine ce qui modifie ses propriétés physiques :

- plus de prise en gel à basse température
- pas de précipité opaque avec le bichlorure de mercure.

#### Milieu

|                     |        |
|---------------------|--------|
| - Extrait de levure | 3 g/l  |
| - Bactopeptone      | 5 g/l  |
| - Gélatine          | 40 g/l |
| - Agar              | 15 g/l |

Autoclaver et couler en boîte de Pétri.

L'hydrolyse de la gélatine, se traduit après incubation à 23°C pendant 2 à 7 jours, par l'apparition d'un halo clair autour du spot ou de la strie d'ensemencement après révélation par le réactif de Frazier :

|                   |        |
|-------------------|--------|
| HgCl <sub>2</sub> | 15 g   |
| HCl concentré     | 20 ml  |
| Eau distillée     | 100 ml |

### 3.1.2.2.7 Mise en évidence d'une Tween estérase

Principe : la Tween estérase fait partie du groupe des lipases enzymes extra-cellulaires qui hydrolysent graisses et esters. Leur action entraine la production d'alcool et d'acides gras.



Les Tweens sont des dérivés polyéthyléniques d'esters gras d'anhydride de sorbitol.

### Milieu au Tween 80 (monoléate de sorbitol)

|  |         |
|--|---------|
| - NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,5 g/l |
| - K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>               | 0,5 g/l |
| - Mg SO <sub>4</sub>                             | 0,2 g/l |
| - Na Cl  | 5 g/l   |
| - Extrait de levures                             | 5 g/l   |
| - Tween 80                                       | 1 ml/l  |
| - Agar   | 15 g/L  |

Autoclaver à 120°C pendant 20 mn et répartir en boîte de Pétri.

La recherche de la Tween estérase se fait par ensemencement du milieu gélosé en spot ou en strie. L'activité tween estérase se traduit par le dépôt d'un précipité d'acides gras autour de la culture. On peut l'observer en général après 3 à 7 jours d'incubation (148).

### 3.1.2.2.8 Recherche d'une activité DNase

Principe : les bactéries possèdent divers enzymes exo ou endo-cellulaires qui dégradent l'acide désoxyribinucleique.

Le résultat est la fragmentation plus ou moins poussée en nucléotides donc une diminution du poids moléculaire.

#### Milieu (milieu déshydraté Bio Mérieux)

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| - Acide désoxyribonucléique | 2 g/l  |
| - Bio Trypticase            | 15 g/l |
| - Bio Soyase                | 5 g/l  |
| - NaCl                      | 5 g/l  |
| - Agar                      | 15 g/l |

pH final 7,3

La mise en évidence de l'activité DNase se fait par ensemencement en rayon ou en spots (4 à 6 maximum par boîte). Après incubation pendant 3 à 5 jours à 24°C, la présence de la DNase se traduit par une zone transparente autour de la strie ou du spot, après révélation par l'acide HCl 1 N.

### 3.1.2.2.9 Recherche de l'esculine

Principe : l'esculine est une molécule de glucose à laquelle est accroché un groupement aglycone (esculitine). Sous l'action d'une enzyme beta-glucosidase il y a libération du groupement aglycone dans le milieu et utilisation de la molécule de glucose. L'esculine va réagir avec le citrate de fer ammoniacal présent dans le milieu pour donner un complexe colorant en noir le milieu (23).

### Milieu

- Bactopeptone 10 g/l
- Citrate de fer amoniacal 1 g/l
- Esculine 1 g/l
- Agar 10 g/l

pH 7

Autoclaver et répartir en tube avec une forte pente.

Après ensemencement de la pente par une strie droite, une réaction positive (coloration noire) sera visible dans un délai de 1 à 3 jours après incubation.

#### 3.1.2.2.10 Réduction des nitrates en nitrites

Les souches possédant une nitrate réductase peuvent réduire les nitrates en nitrites, d'autres peuvent les réduire jusqu'au stade azote gazeux, il s'agit de dénitrification.

La réduction des nitrates se recherche sur une culture en bouillon nitraté à 1 p 1000 (No<sub>3</sub>K). La mise en évidence de l'apparition des nitrites se fait, par addition à 1 ml de la culture, de quelques gouttes de chacun des 2 réactifs suivants :

##### - réactif 1 :

- Acide sulfanilique 0,8 g
- Acide acétique 5 N 100 ml

(l'acide acétique 5 N est préparé en ajoutant 1 volume d'acide acétique glacial à 2,5 volumes d'eau)

##### - réactif 2 :

- Alpha naphtylamine 0,5 g
- Acide acétique 5 N 100 ml

La présence de nitrites (germes nitrate réductase +) se traduit par une coloration rouge (23).

Si la réaction est négative, deux éventualités possibles : ou bien la réduction a dépassé le stade nitrites et s'en poursuivie jusqu'au stade NH<sub>3</sub> ou N<sub>2</sub> ; ou bien les nitrates non réduits sont encore présents (germe nitrate réductase -).

On ajoute à la culture un peu de poudre de Zn.

On mélange, on laisse reposer : si les nitrates n'avaient pas été utilisés, ils sont réduits chimiquement par la poudre de Zn et la réaction colorée des nitrites apparaît : rouge négatif ; par contre si le milieu reste encore incolore, les nitrates avaient été complètement réduits au delà du stade nitrite et la présence de bulles gazeuses dans la culture témoigne de la réduction des nitrates en N<sub>2</sub> gazeux.

### 3.1.2.2.11 Oxydation de sucres simples (mannitol, sorbitol, érythritol, saccharose).

Principe : en aérobiose, l'oxydation des sucres conduit à la formation d'acide pyruvique indépendamment de la voie de métabolisme empruntée ce qui entraîne une acidification du milieu .

En pratique on emploie un milieu minéral de base, milieu A.R.J. par exemple, additionné d'un indicateur coloré qui est le bleu de bromothymol (B.B.T) ; il peut être liquide ou semi gélosé à (4 g/l). A ce milieu stérile, on ajoute le sucre lui-même stérilisé par filtration sur membrane Millipore (0,22  $\mu$ m , REF, Millipore S.A 67. 120 Molsheim), pour l'amener à une concentration finale de 2%..

#### Milieu ARJ (9).

|  |      |     |
|--|------|-----|
| - NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1    | g/l |
| - KCl  | 0,2  | g/l |
| - Mgso <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O            | 0,2  | g/l |
| - B.B.T.   | 0,03 | g/l |

pH 7,2

Après ensemencement, soit par une piqûre au centre du culot (milieu semi gélosé avec une culture solide), soit à l'aide de quelques gouttes d'une suspension dense (milieu liquide) et incubation à une température optimale pour le germe considéré pendant 3 à 5 jours, l'acidification du milieu se traduit par une coloration jaune d'où utilisation du sucre correspondant.

### 3.1.2.2.12 Utilisation des acides organiques (DL-lactate, L (+) Tartrate, D(-) Tartrate)

Principe : en aérobiose, les acides organiques sont métabolisés et donnent naissance à du gaz carbonique et de l'eau.

En pratique, ils sont apportés sous forme de sels de sodium. Leur métabolisation entraîne donc une accumulation d'ions Na<sup>+</sup> qui augmentent le pH de façon importante.

Divers milieux minéraux ont été utilisés. On conseille le milieu A.R.J. déjà utilisé par le métabolisme des sucres, dans laquelle la substance à étudier est ajoutée à une concentration de 0,5 à 1% (9).

L'utilisation de l'acide organique se traduit par un virage au bleu après 2 à 5 jours d'incubation à une température optimale.

### 3.1.2.2.13 Recherche de la Polypectate à pH 5 et pH 8,5

Principe : L'activité de la polypectate est recherchée par l'acidification qui résulte de la dégradation de polygalacturonate alcalin par certaines bactéries.

La formation de polypectate est recherchée sur gel de polypectate de sodium :

- Solution de bleu de bromothymol à 1,5 % 1 ml
  - CaCl<sub>2</sub> à 10 % 6 ml
  - Polypectate de sodium 22 g
  - Eau distillée 1000 ml
- Ajuster à pH 5 ou pH 8,5

Autoclaver pendant 20 mn à 120°C, rajouter ensuite 100 ml d'agar stérile à 4 %. Répartir en boîte de Pétri.

Après ensemencement en spots et incubation pendant 3 à 5 jours à 24°C, l'utilisation de la polypectate se traduit par un éclatement au niveau de la spot (73).

#### 3.1.2.2.14 Recherche de la cytochrome C oxydase

Principe : On utilise des disques commecalisés par Bio Mérieux ( Ref 53 381). Ces disques sont imprégnés d'oxalate de N-diméthylparaphénylènediamine ; ce composé est oxydé par le système cytochrome C des bactéries dites oxydase positive en un composé violet (89).

En pratique le disque à utiliser est placé sur une lame porte-objet et humecté avec une ou deux gouttes d'eau distillée. Sur ce disque, étaler une culture obtenue sur gélose nutritive ou gélose Mueller-Hinton et prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur. La présence d'oxydase se manifeste par une coloration violette.

La réaction d'oxydase ne doit pas être recherchée à partir de milieux contenant des glucides fermentescibles (B.C.P., S.S., E.M.B., Mac Conkey, Hektoen), milieux susceptibles de donner des résultats faussement négatifs en particulier chez les Vibrionaceae.

#### 3.1.3 Auxanogramme

##### 3.1.3.1 Souches étudiées

Quatre groupes de souches ont été étudiées :

- 50 isolats de laurier palme, représentatifs de la collection par leurs origines géographiques, temporelles et variétales (Tableau XV).
- 58 souches isolées d'hôtes variés, apparentées à l'espèce P. syringae pv. syringae (Tableau XVI).
- 50 souches de différents pathovars de P. syringae et 4 de pseudomonas phytopathogènes (Tableau XVII).
- Toutes les souches de P. syringae pv. savastanoi en comparaison avec les 78 autres souches de référence (Tableau XII, XIII).

### 3.1.3.2 Méthode et principe

L'assimilation des sources hydrocarbonées en temps que source de carbone et d'énergie a été étudiée à l'aide de galeries API 50 CH, LRA 50 AO, LRA 50 AA. Sur 147 substrats, 49 sucres, 49 acides organiques et 49 acides aminés ont été testés.

Chaque galerie est constituée de 50 microtubes comportant chacun un tube en anaérobiose et une cupule en aérobiose. Le premier tube contenant uniquement le milieu de base, sert de témoin négatif de croissance.

Une suspension bactérienne de  $10^8$  bactéries /ml est ajoutée au milieu utilisé : milieu minimum semi solide apportant les éléments indispensables à la croissance des microorganismes (azote, acides aminés et facteurs de croissance) :

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| Bacto Yeast Nitrogen Difco | 6,7 g       |
| Agar noble Difco           | 1,5 g       |
| Tampon Sorensen M/10 pH 7  | qsq 1000 ml |

La croissance est observée après 1, 2, 4 et 6 jours d'incubation à 24°C.

Les réactions positives sont reportées dans les colonnes correspondantes de la fiche des résultats traduites en :

- : absence de croissance, comparable au témoin
- + II : croissance très légère
- + I : croissance légère
- + : croissance dense

Au terme de 6 jours d'incubation, les résultats ont été codés 0 ou négatif s'ils étaient notés - ou +II et 1 ou positif s'ils étaient +I ou +.



Tableau XVII - Caractéristiques des souches des espèces de Pseudomonas et des pathovars de P. syringae étudiés.

| Nom de l'espèce ou du pathovar        |   | N° de la souche<br>CFBP NCPPB |      | Hôte                               | Pays             | Année | Isolateur                 |
|---------------------------------------|---|-------------------------------|------|------------------------------------|------------------|-------|---------------------------|
| <i>P.s. pv. aceris</i>                | T | 2339                          | 958  | <i>Acer sp.</i>                    | Etats-Unis       |       | ARK P.A.                  |
| <i>P.s. pv. aesculi</i>               | T | 2894                          |      | <i>Aesculus indica</i>             | Inde             | 1980  | DURGAPAL J.C.             |
| <i>P.s. pv. anthirrhini</i>           | T | 1620                          | 1817 | <i>Anthirrhinum majus</i>          | Grande-Bretagne  | 1965  | JONES G.E.                |
| <i>P.s. pv. apii</i>                  | T | 2103                          | 1626 | <i>Apium graveolens</i> var. dulce | Etats-Unis       | 1942  | BURKHOLDER W.H.           |
| <i>P.s. pv. aptata</i>                | T | 1617                          | 871  | <i>Beta vulgaris</i>               | Etats-Unis       | 1959  | SNEIDER C.L.              |
| <i>P.s. pv. atrofaciens</i>           | T | 2213                          | 2612 | <i>Triticum aestivum</i>           | Nouvelle-Zélande | 1968  | WILKIE J.P.               |
| <i>P.s. pv. atropurpurea</i>          | T | 2340                          | 2397 | <i>Lolium multiflorum</i>          | Japon            | 1967  | TOMINAGA T.               |
| <i>P.s. pv. berberidis</i>            | T | 1727                          | 2724 | <i>Berberidis sp.</i>              | Nouvelle-Zélande | 1972  | YOUNG J.M.                |
| <i>P.s. pv. cannabina</i>             | T | 2341                          | 1437 | <i>Cannabis sativa</i>             | Hongrie          | 1957  | KLEMENT Z.                |
| <i>P.s. pv. ciccaroni</i>             | T | 2342                          | 2355 | <i>Ceratonia siliqua</i>           | Italie           | 1969  | ERCOLANI G.L.             |
| <i>P.s. pv. coronafaciens</i>         | T | 2216                          | 600  | <i>Avena sativa</i>                | Grande-Bretagne  | 1958  | LELLIOTT R.A.             |
| <i>P.s. pv. delphinii</i>             | T | 2215                          | 1879 | <i>Delphinium sp.</i>              | Nouvelle-Zélande | 1957  | KEMP W.J.                 |
| <i>P.s. pv. dysoxyl</i>               | T | 2356                          | 225  | <i>Dysoxylum spectabile</i>        | Nouvelle-Zélande | 1949  | DYE D.W.                  |
| <i>P.s. pv. eriobotryae</i>           | T | 2343                          | 2331 | <i>Eriobotrya japonica</i>         | Etats-Unis       | 1970  | LAI M.                    |
| <i>P.s. pv. glycinea</i>              | T | 2214                          | 2411 | <i>Glycine max</i>                 | Nouvelle-Zélande | 1968  | WATSON D.R.W.             |
| <i>P.s. pv. helianthi</i>             | T | 2067                          | 2640 | <i>Helianthus annuus</i>           | Mexique          | 1972  | PIENING L.J.              |
| <i>P.s. pv. hibisci</i>               | T | 2895                          |      | <i>Hibiscus japonica</i>           |                  |       | JONES J.B.                |
| <i>P.s. pv. japonica</i>              | T | 2896                          | 3093 | <i>Hordeum vulgare</i>             | Japon            | 1951  | YOSHIDA K.                |
| <i>P.s. pv. lachrymans</i>            | T | 2440                          | 537  | <i>Cucumis sativus</i>             | Etats-Unis       | 1935  | ARK P.A.                  |
| <i>P.s. pv. lapsa</i>                 | T | 1731                          | 2096 | <i>Triticum aestivum</i> (hybride) |                  | 1968  | CHAKRA VARTI B.P.         |
| <i>P.s. pv. maculicola</i>            | T | 1657                          | 2039 | <i>Brassica oleracea</i>           | Nouvelle-Zélande | 1965  | SCHACKLETON D.            |
| <i>P.s. pv. mellea</i>                | T | 2344                          | 2356 | <i>Nicotiana tabacum</i>           | Japon            | 1968  | ONO K.                    |
| <i>P.s. pv. mori</i>                  | T | 1642                          | 1034 | <i>Morus alba</i>                  | Hongrie          | 1958  | KLEMENT Z.                |
| <i>P.s. pv. mors-prunorum</i>         | T | 2351                          | 2995 | <i>Prunus domestica</i>            | Etats-Unis       |       | WORMALD H.                |
| <i>P.s. pv. myricae</i>               | T | 2897                          | 3143 | <i>Myrica rubra</i>                | Japon            | 1978  | OGINI C.                  |
| <i>P.s. pv. panici</i>                | T | 2345                          | 1498 | <i>Panicum sp.</i>                 | Etats-Unis       | 1963  | MOSKOVETS                 |
| <i>P.s. pv. papulans</i>              | T | 1754                          | 2848 | <i>Malus sylvestris</i>            | Canada           | 1973  | DHANVANTARI B.N.          |
| <i>P.s. pv. passiflorae</i>           | T | 2346                          | 1387 | <i>Passiflora edulis</i>           | Nouvelle-Zélande | 1962  | BAIGNANT N.L., STARR M.P. |
| <i>P.s. pv. persicae</i>              | T | 1573                          | 2761 | <i>Prunus persicae</i>             | France           | 1974  | PRUNIER J.P.              |
| <i>P.s. pv. persicae</i>              |   | W 24-1                        |      | <i>Prunus persicae</i>             |                  |       | YOUNG J.M.                |
| <i>P.s. pv. persicae</i>              |   | W 24-2                        |      | <i>Prunus persicae</i>             |                  |       | SOCO                      |
| <i>P.s. pv. persicae</i>              |   | W 24-3                        |      | <i>Prunus persicae</i>             |                  |       | YOUNG J.M.                |
| <i>P.s. pv. phaseolicola</i> (race 1) | T | 1390                          | 52   | <i>Phaseolus vulgaris</i>          | Canada           | 1949  |                           |
| <i>P.s. pv. philadelphi</i>           | T | 2898                          | 3257 | <i>Philadelphus coronarius</i>     | Grande-Bretagne  | 1982  | ROBERTS S.J.              |
| <i>P.s. pv. photinae</i>              | T | 2899                          |      | <i>Photinia glabra</i>             | Japon            | 1983  | GOTO M.                   |
| <i>P.s. pv. pisi</i>                  | T | 2105                          | 2585 | <i>Pisum sativum</i>               | Nouvelle-Zélande | 1969  | WATSON D.R.W.             |
| <i>P.s. pv. porri</i>                 | T | 1908                          | 3364 | <i>Allium porrum</i>               | France           | 1978  | SAMSON R.                 |
| <i>P.s. pv. primulae</i>              | T | 1660                          | 133  | <i>Primulae sp.</i>                | Etats-Unis       | 1939  | ARK P.A.                  |
| <i>P.s. pv. ribicola</i>              | T | 2348                          | 963  | <i>Ribes aureum</i>                |                  | 1946  | BOHN G.W.                 |
| <i>P.s. pv. savastanoi</i>            | T | 1670                          | 639  | <i>Olea europaea</i>               | Yougoslavie      | 1959  | SUTIC D.                  |
| <i>P.s. pv. sesami</i>                | T | 1671                          | 1016 | <i>Sesamum indicum</i>             | Yougoslavie      | 1961  | SUTIC D.                  |
| <i>P.s. pv. striafaciens</i>          | T | 1674                          | 1898 | <i>Avena sativa</i>                |                  | 1966  | ELLIOTT C.                |
| <i>P.s. pv. syringae</i>              | T | 1392                          | 281  | <i>Syringa vulgaris</i>            | Grande-Bretagne  | 1950  | SABET K.A.                |
| <i>P.s. pv. tabaci</i>                | T | 2106                          | 1427 | <i>Nicotiana tabacum</i>           | Hongrie          | 1959  | KLEMENT Z.                |
| <i>P.s. pv. tagetis</i>               | T | 1694                          | 2488 | <i>Tagetes erecta</i>              | Rhodésie         | 1972  | BRADBURY J.F.             |
| <i>P.s. pv. theae</i>                 | T | 2353                          | 2598 | <i>Theae sinensis</i>              | Japon            | 1970  | GOTO M.                   |
| <i>P.s. pv. tomato</i>                | T | 2212                          | 1106 | <i>Lycopersicon esculentum</i>     | Grande-Bretagne  | 1960  | LELLIOTT R.A.             |
| <i>P.s. pv. ulmi</i>                  | T | 1407                          | 632  | <i>Ulmus sp.</i>                   | Yougoslavie      | 1958  | SUTIC D.                  |
| <i>P.s. pv. viburni</i>               | T | 1702                          | 1921 | <i>Viburnum sp.</i>                |                  |       | THORNBERRY H.H.           |
| <i>Pseudomonas amygdali</i>           | T | W 28.1                        |      |                                    |                  |       |                           |
| <i>Pseudomonas amygdali</i>           |   | 2354                          |      | <i>Prunus amygdalus</i>            |                  |       |                           |
| <i>Pseudomonas cichorii</i>           | T | 2101                          | 943  | <i>Cichorium endiva</i>            | R.F. Allemande   | 1929  | KOTTE W.                  |
| <i>Pseudomonas viridiflava</i>        | T | 2107                          | 635  | <i>Phaseolus sp.</i>               | Suisse           | 1927  | BURKHOLDER W.H.           |

### 3.1.4 Méthodes de calcul

Les données des caractères biochimiques ont été étudiées, par analyse numérique des correspondances multiples, par classification hiérarchique ascendante et en taxonomie numérique.

#### 3.1.4.1 Analyse factorielle des corespondances multiples.

Ce type de calcul est essentiellement descriptif et s'apparente aux analyses en composantes principales. On considère les souches comme étant des individus isolés représentant des lignes (I), les substances étudiées sont considérées comme des variables représentant des colonnes (J). Les individus et les variables sont caractérisés par leur profil et leur masse (16).

La diversité des profils qui présentent les lignes ou les colonnes requiert une représentation spaciale où I sera présenté dans l'espace des profils sur J, et J dans celui des profils de I. L'ensemble des profils des diverses lignes et colonnes, chacun muni de la masse qu'il représente, constitue le nuage défini par les valeurs  $N(I)$  et  $N(J)$ . Chaque nuage sera plus au moins dispersé autour du centre de gravité. La dispersion peut être chiffrée globalement en calculant l'inertie totale du nuage (la somme des inerties des divers points par rapport au centre de gravité). Lorsqu'on écrit l'inertie totale du nuage comme la somme des valeurs propres, on la considère répartie selon divers axes principaux d'inertie. Pour rendre la construction des nuages visible, on cherche à les projeter sur des axes principaux d'inertie.

La première est une droite qui passe par le centre de gravité du nuage sur lequel est réalisé le maximum d'inertie du nuage projeté sur cette droite.

Le deuxième axe est une droite perpendiculaire au premier axe passant par le centre de gravité, une droite sur laquelle le nuage se projette avec l'inertie maximale et ainsi de suite.

La projection d'un point sur un axe donné sera plus au moins réelle. La valeur de cette projection peut être estimée par le cosinus carré de l'angle construit entre cet axe et la droite qui reçoit ce point avec le centre de gravité. Plus le cosinus est proche de 1, plus la projection du point est réelle.

Des projections du nuage sur des plans factoriels (obtenus en prenant deux à deux les axes factoriels) donnent des configurations lisibles et aident l'interprétation. Elles sont données par l'ordinateur.

#### 3.1.4.2 Classifications ascendantes et descendantes hiérarchiques

Afin d'enrichir l'interprétation de sous-espace factoriels (sans se limiter aux axes, ni aux plans), on procède à

1000 NBNDE 1 den  
Mau pieurs des pss  
Clementinment  
Nafissa: Bouteff  
1990

crits par leurs coordonnées est constituée par deux étapes:

qui correspond à une position nt alors des groupements ombre de classes stables dans ce cas une idée de la

our celle-ci, il faut écedants comme des individus on ascendante de ce groupement

dendrogramme et obtenir un nombre de classes différent.

### 3.1.4.3 Taxonomie numérique

Les processus numériques font appel à des méthodes de classifications hiérarchiques. Ces méthodes procèdent par différentes étapes de calcul. Tous nos calculs ont été réalisé sur un ordinateur IBM 3090 au Centre Régional d'Information de Marseille avec des programmes écrits en Cobol et assembleur.

#### 3.1.4.3.1 Coefficient de Jaccard-Sneath

Après la saisie des données, on calcule pour chaque paire de souches un indice de distance à partir du nombre de caractères étudiés. Pour ce calcul nous avons utilisé le coefficient de Jaccard-Sneath.

#### 3.1.4.3.2 Agrégation en grappes

L'analyse des grappes a été faite en utilisant la méthode des diamètres moyen des grappes : Unweighthed Pair Group Method with Averages (UPGMA).

Dans cette technique un individu est agrégé à un groupe au niveau taxonomique correspondant à sa distance moyenne par rapport à tous les phénoytypes qui constituent le groupe. La distance D entre deux grappes est calculée en tenant compte de l'effectif de chaque groupe.

L'agrégation de 2 groupes nécessite le calcul de toutes les distances des individus des 2 groupes pris 2 à 2 et le calcul de la distance moyenne. Cette méthode nécessite des ordinateurs puissants, puisque l'ensemble des distances de la matrice est recalculé à chaque étape du processus.

#### 3.1.4.3.3 Tracé automatique

En fin d'analyse, les étapes de cette agrégation pas à pas sont représentées sous forme de dendrogramme, les différentes grappes formées sont agrégées à des niveaux hiérarchiques (h)

différents. La valeur  $h$  égale à 1 étant attribuée à la distance la plus grande trouvée entre les grappes les plus éloignées donc les plus différentes.

#### 3.1.4.3.4 Calcul du coefficient d'acuité

Le dendrogramme peut être ensuite coupé à n'importe quel niveau hiérarchique. Pour chaque niveau de coupure on mesure la quantité d'information apporté ou coefficient d'acuité. Il tient compte du nombre de phénotypes regroupés, du niveau de coupure, de la différence entre le niveau de coupure et la dernière agrégation.

#### 3.1.4.3.5 Calcul du coefficient de capacité diagnostique

La mesure de la quantité d'information apportée pour chaque test est appréciée par le calcul du coefficient de capacité diagnostique (CCD).

#### 3.1.4.3.6 Calcul des paramètres d'identification

Un programme d'identification numérique calcule les paramètres d'identification suivants :

- la fréquence théorique d'apparition du phénotype dans l'espèce, c'est à dire le produit des pourcentages de positivité pour les différentes espèces : c'est un reflet de l'atypie du phénotype.

- Le pourcentage d'identification : rapport de la fréquence théorique du phénotype dans l'espèce à la somme des fréquences théoriques (91). Il mesure la discrimination.

## 3.2 Résultats

Les résultats ont été interprétés dans un premier temps avec la collection des souches de P. syringae pv. syringae et dans un deuxième temps avec la collection des souches de P. syringae pv. savastanoi. L'interprétation des données a été faite à l'aide d'analyses statistiques ; les résultats de chacun de ces deux pathovars de P. syringae ont été comparés avec d'autres pathovars de P. syringae et autres Pseudomonas phytopathogènes.

### 3.2.1 Souches de Pseudomonas. syringae pv. syringae

#### 3.2.1.1 Caractères biochimiques en tubes

##### 3.2.1.1.1 Souches de P. syringae pv. syringae isolées de laurier palme.

Parmi les 260 souches de collection, 29 souches possèdent une cytochrome C oxydase.

137 souches (Tableau XIV) isolées principalement de lésions ont les caractères suivants:

- fluorescence sur milieu de King B,
- production de levane,
- absence de cytochrome C oxydase
- absence d'hydrolyse de la pectine
- absence d'arginine dihydrolase,
- réaction d'hypersensibilité sur tabac,
- absence de nitrate réductase,

La majorité des 140 souches isolées de laurier palme (Tableau XIV) s'apparentent au groupe Ia défini par Lelliott et al (95).

Trois souches ont montré une réaction négative vis-à-vis du levane et cinq vis-à-vis de la gélatine.

Toutes les souches assimilent le saccharose.

99% des souches isolées de laurier palme utilisent le D(-) tartrate. Très peu de souches utilisent le L(+) tartrate. Suivant le profil d'assimilation des 3 acides organiques (DL lactate, L(+) tartrate et D(-)tartrate) et des sucres (sorbitol et érythritol), six biotypes ont été définis (Tableau XVIII a). La majorité des souches se trouve dans le biotype 3. Les 50 souches utilisées pour l'étude en auxanogramme se répartissent dans les biotypes 1, 2, 3, 4 et 6. La majorité des souches sont dans le biotype 3 (Tableau XVIII c)

Les 91 souches isolées par broyage ou par lavage de la surface de feuilles saines, caractérisées par 9 caractères uniquement, sont plus variables que la majorité des souches isolées de lésions (Tableau XIV). 13 souches ne possèdent pas de levane. Les caractères ne sont pas suffisants pour rattacher les souches King B positif, levane positif et oxydase négatif au groupe Ia. Toutefois, en fonction de l'assimilation des 3 acides organiques et deux sucres, la répartition des souches montre que 90% des souches se répartissent dans les biotypes 1, 2, 3, 4 et 5, précédemment décrits (Tableau XVIII b). Le pourcentage de souches dans le biotype 3 est plus faible que celui des souches isolées de lésions. Le biotype 4 regroupe des souches qui utilisent le L(+) tartrate.

#### 3.2.1.1.2 Souches de *P. syringae* pv. *syringae* isolées de différent hôtes.

La majorité des 58 souches (98 %) s'apparentent au groupe Ia défini par Lelliott et al (95). Une souche ne possède pas le levane. Le caractère gélatine est particulièrement variable parmi ces souches. En fonction de l'assimilation des 3 acides organiques et des sucres (sorbitol et érythritol), il est possible de définir cinq biotypes (Tableau XVIII d). La souche type de *P. syringae* pv. *syringae* se trouve dans le biotype 2. Le biotype 3 est majoritaire.

#### 3.2.1.1.3 Discussion

Les souches isolées de lésions présentent une variabilité moindre que les souches isolées à la surface des feuilles. Une majorité des souches est associée au groupe Ia de Lelliott et al (95). Toutefois peu de souches ont le profil caractéristique de *P. syringae* pv. *syringae* défini par Hildebrand et Schroth (73). Le biotype majoritaire des souches, isolées de laurier palme ou des différents hôtes de *P. syringae* pv. *syringae*, est caractérisé par l'assimilation du DL-lactate, du D(-) tartrate, du sorbitol et de l'érythritol.

Il semble que le caractère gélatine ne soit pas stable dans le temps. En effet certaines souches de *P. syringae* pv. *syringae* ont donné une réaction positive au moment de leur isolement et négative lors de notre étude. Le taux d'assimilation des sucres est comparable à celui observé par Sands et al (142). La distinction en différents biotypes suivant l'assimilation des acides organiques et des sucres a déjà servi pour la classification des souches isolées de la flore de vigne (103). Le biotype majoritaire de la flore de vigne correspond au biotype 9 de notre étude.

Certaines souches ne possédant pas de levane, isolées à la surface des feuilles, peuvent appartenir à l'espèce *P. viridiflava*. L'étude des caractères supplémentaires serait nécessaire.

Tableau XVIII - Biotypes des différents groupes de souches de P. syringae étudiées.

a - Biotypes des 140 souches isolées principalement de lésions

| Biotype | Sorbitol | Erythritol | DL Lactate | L (+) Tartrate | D (-) Tartrate | Nombre de souches | %  |
|---------|----------|------------|------------|----------------|----------------|-------------------|----|
| 1       | +        | +          | -          | -              | +              | 5                 | 4  |
| 2       | +        | +          | +          | -              | -              | 1                 | <1 |
| 3       | +        | +          | +          | -              | +              | 123               | 89 |
| 4       | +        | +          | +          | +              | +              | 9                 | 6  |
| 5       | -        | +          | +          | -              | +              | 1                 | <1 |
| 6       | -        | -          | +          | -              | +              | 1                 | <1 |

b - Biotypes des 91 souches isolées de la surface des feuilles.

| Biotype | Sorbitol | Erythritol | DL Lactate | L (+) Tartrate | D (-) Tartrate | Nombre de souches | %  |
|---------|----------|------------|------------|----------------|----------------|-------------------|----|
| 1       | +        | +          | -          | -              | +              | 8                 | 10 |
| 2       | +        | +          | +          | -              | -              | 4                 | 5  |
| 7       | +        | -          | +          | -              | -              | 1                 | 1  |
| 3       | +        | +          | +          | -              | +              | 41                | 53 |
| 4       | +        | +          | +          | +              | +              | 16                | 21 |
| 8       | +        | -          | +          | -              | +              | 5                 | 7  |
| 5       | -        | +          | +          | -              | +              | 1                 | 1  |
| 9       | +        | +          | -          | +              | +              | 1                 | 1  |
| 10      | +        | +          | -          | -              | -              | 1                 | 1  |

c - Biotypes des 50 souches isolées de laurier palme utilisées en auxanogramme.

| Biotype | Sorbitol | Erythritol | DL Lactate | L (+) Tartrate | D (-) Tartrate | Nombre de souches | %  |
|---------|----------|------------|------------|----------------|----------------|-------------------|----|
| 1       | +        | +          | -          | -              | +              | 1                 | 2  |
| 2       | +        | +          | +          | -              | -              | 1                 | 2  |
| 3       | +        | +          | +          | -              | +              | 45                | 90 |
| 4       | +        | +          | +          | +              | +              | 2                 | 4  |
| 6       | -        | -          | +          | -              | +              | 1                 | 2  |

d - Biotypes des 58 souches de P. syringae pv. syringae isolées d'hôtes différents.

| Biotype | Sorbitol | Erythritol | DL Lactate | L (+) Tartrate | D (-) Tartrate | Nombre de souches | %  |
|---------|----------|------------|------------|----------------|----------------|-------------------|----|
| 1       | +        | +          | -          | -              | +              | 3                 | 5  |
| 2       | +        | +          | +          | -              | -              | 11                | 19 |
| 3       | +        | +          | +          | -              | +              | 37                | 64 |
| 8       | +        | -          | +          | -              | +              | 1                 | 2  |
| 11      | +        | -          | -          | -              | +              | 6                 | 10 |

### 3.2.1.2. Etude des 167 caractères biochimiques

Pour chaque analyse, nous avons cherché :

- à caractériser les axes de l'analyse factorielle des correspondances multiples (AFCM) en prenant les plus fortes contributions (CTR),

- à déterminer les niveaux de coupure satisfaisants des dendrogrammes réalisés soit par la classification ascendante hiérarchique (CAD), soit par la taxonomie numérique. Les coefficients de capacité diagnostic (CCD) ont servi à caractériser les classes définies en taxonomie numérique.

Trois analyses ont été faites : la première concerne la variabilité de 50 souches de laurier palme entre elles avec la souche type de P. syringae pv. syringae (CFBP 1392), la deuxième a été faite sur la variabilité sur 50 souches de laurier palme en comparaison avec les 58 souches isolées de différents hôtes, la troisième concerne la comparaison des souches de P. syringae pv. syringae avec 50 souches d'autres pathovars de P. syringae et 4 souches de Pseudomonas phytopathogènes.

#### 3.2.1.2.1 Première analyse

##### 3.2.1.2.1.1 Variabilité des 50 souches isolées de laurier palme (Tableau XIX).

Les souches de laurier palme diffèrent entre elles par l'utilisation de 45 substances biochimiques : la variation est due essentiellement aux acides organiques (39%). Six substances (succinate, D-malate, méso-tartrate, L-histidine, L-aspartate, L-arginine) ne sont pas assimilées par la souche type de P. syringae pv. syringae (CFBP 1392) alors que toutes les souches isolées de laurier palme ont donné des réactions positives vis à vis de ces caractères.

##### 3.2.1.2.1.2 Analyse factorielle des correspondances multiples

Les trois premiers axes ont pour valeur propre respectives 0,32, 0,16 et 0,06, ce qui représente successivement 32,4%, 16,8% et 6,2% de l'inertie du nuage. En valeur cumulée, les trois premiers axes rendent compte de 55,6% de l'inertie.

La plus forte contribution sur l'axe 1 (Figure 16) est définie par la souche isolée de laurier palme U21.1 (contribution sur l'axe : 0,975). Des substances à fortes contributions caractérisent aussi cet axe : érythritol- (CTR = 0,059), sorbitol- (CTR = 0,059), tréhalose+ (CTR = 0,059), D-raffinose+ (CTR = 0,059), 2 céto-glutarate+ (CTR = 0,059), L-thréonine+ (CTR = 0,059), L-tyrosine+ (CTR = 0,059), trigonelline- (CTR = 0,059), L-ornithine+ (CTR = 0,059), béta-alanine+ (CTR = 0,059), amylamine+ (CTR = 0,059), éthanolamine (CTR = 0,059).



Tableau XX - Caractères biochimiques des souches de laurier palme ayant une forte contribution sur les axes 1 et 2 définis par l'AFCM.

Axe 1 :

| Contribution | Substance          | Groupe 1<br>9 souches | Groupe 2<br>7 souches |
|--------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,135        | o Hydroxybenzoate  | +                     | -                     |
| 0,125        | Benzoate           | - (55%)               | -                     |
| 0,089        | Glucosamine        | +                     | - (66%)               |
| 0,087        | Acétate            | - (55%)               | -                     |
| 0,086        | D Lyxose           | - (55%)               | -                     |
| 0,047        | DL 5 Aminovalérate | -                     | +                     |
| 0,045        | Itaconate          | -                     | + (70%)               |
| 0,044        | N Caproate         | + (55%)               | +                     |

Axe 2 :

| Contribution | Substance          | Groupe 1<br>4 souches | Groupe 2<br>3 souches |
|--------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,129        | 2 Cétoglutarate    | -                     | +                     |
| 0,103        | L Cystéine         | -                     | +                     |
| 0,081        | Malonate           | -                     | + (66%)               |
| 0,077        | D Xylose           | + (50%)               | +                     |
| 0,071        | Glutarate          | -                     | +                     |
| 0,050        | D(-) Tartrate      | + (75%)               | +                     |
| 0,041        | Diaminobutane      | -                     | - (66%)               |
| 0,037        | DL 5 Aminovalérate | + (50%)               | +                     |
| 0,030        | L Isoleucine       | -                     | + (66%)               |
| 0,030        | Itaconate          | + (50%)               | -                     |
| 0,027        | Sarcosine          | + (75%)               | +                     |
| 0,025        | N Valérate         | -                     | + (66%)               |

L'axe 2 est défini par la souche type (CFBP 1392) dont la contribution sur l'axe est de 0,915. Elle se détermine par les caractères suivants : succinate- (CTR = 0,110), D-malate- (CTR = 0,0110), mé-sotartrate- (CTR = 0,0110), L-isoleucine+ (CTR = 0,0110), L-aspartate- (CTR = 0,110), L-arginine- (CTR = 0,0110), D(-) tartrate- (CTR = 0,065), p-hydroxybenzoate- (CTR = 0,062), fumarate- (CTR = 0,059), L-histidine- (CTR = 0,037), D xylose- (CTR = 0,034), Tween estérase- (CTR = 0,020).

La projection sur les axes 1 et 2 (Figure 16) montre que ces deux souches se trouvent aux deux extrémités des axes et que les 49 autres souches isolées de laurier palme sont concentrées autour du centre de gravité .

Les souches U21.1 et 1392 se distinguent donc très nettement des autres par leurs fortes contributions sur les axes. Aussi, afin d'observer la variabilité des souches isolées de laurier palme, nous avons refait une analyse en mettant ces deux souches en individus supplémentaires, qui ne contribuent pas alors à l'inertie des axes.

Pour cette analyse, les deux premiers axes rendent compte de 21,9% de l'inertie. L'axe 1 (Figure 16) est construit par deux groupes de souches qui s'opposent en fonction de l'utilisation de certaines substances dont le o.hydroxybenzoate et le DL 5-aminovalérate (Tableau XX). L'axe 2 permet de discriminer deux autres groupes qui diffèrent surtout par le 2 céto-glutarate, la L-cystéine et le glutarate (Tableau XX).

#### 3.2.1.2.1.3 Classification hiérarchique ascendante

Une coupure du dendrogramme en 3 classes semble satisfaisante (Figure 17). Trois phénotypes sont isolés représentant les souches S56.1, U21.1 et 1392.

- La classe 1 est constituée de 46% des souches qui sont en majorité du côté négatif de l'axe 1 et du côté positif de l'axe 2 (sauf pour la souche T78.1) (Figure 16).

- La classe 2 correspond à 32 % des souches qui ont discriminées de part et d'autre de l'axe 1 et du côté négatif de l'axe 2.

La classe 3 rassemble les souches distribuées du côté positif de l'axe 1 et de part et d'autre de l'axe 2.

Ces différentes classes se caractérisent suivant l'assimilation de neuf substances et particulièrement du malonate (Tableau XXI).

#### 3.2.1.2.1.4 Taxonomie numérique

La coupure du dendrogramme au niveau 0,084 (Figure 18) donne 6 classes et 10 phénotypes isolés. Quinze substances peuvent caractériser ces classes (Tableau XXII). Les souches U21.1 et 1392 sont très différentes des autres souches. On retrouve une relation entre les 3 classes obtenues par la CAH et les 6 classes de la taxonomie numérique.

La classe 1 définie par la CAH regroupe les classes 1, 3, 6, une souche de la classe 4 est un phénotype isolé (L160.1).

La classe 2 définie par la CAH correspond à la classe 2 et renferme un phénotype isolé (U45.4).

La classe 3 définie par la CAH correspond à la classe 2 et renferme une souche de la classe 4, la classe 5 et quatre phénotypes isolés (U32.4, U43.2, U45.5, T78.1).

#### 3.2.1.2.5 Discussion

Les souches isolées à partir du laurier palme montrent une certaine hétérogénéité sur le plan biochimique. Une souche (U21.1) se distingue nettement des autres. Aucune corrélation n'existe entre la présence d'une souche dans une classe et son origine géographique ou variétale, ou avec le pouvoir pathogène de cette souche. Les caractères définissant la variabilité sont principalement des acides organiques. L'assimilation du DL-lactate et du L(+)tartrate ne permettent pas de bien caractériser les classes définies contrairement aux biotypes. De plus peu de caractères biochimiques en tubes, utilisés en routine dans de nombreux laboratoires, interviennent dans la définition de la variabilité des souches isolées de laurier palme.

On trouve une bonne corrélation entre la production d'acides à partir de l'érythritol et du sorbitol sur milieu semi-gélosé et leur assimilation par méthode API. Cela n'est pas tout à fait le cas pour les acides organiques (DL-lactate, D(-) tartrate, L(+) tartate). Sur milieu d'Ayers (9) l'ensemble des souches a tendance à utiliser le D(-) tartrate alors qu'en microtube API, l'assimilation est très faible.

Les souches isolées de laurier palme sont très différentes sur le plan biochimique de la souche type de P. syringae pv. syringae (CFBP 1392). Cette dernière se différencie des autres souches par 6 caractères. Les caractères communs de la souche CFBP 1392 ont été comparés avec ceux des groupes Ia et If définis comme P. syringae respectivement par Misaghi et Grogan (119) et Sands et al (142). La souche type se distingue respectivement par 5 et 6 caractères.

Deux hypothèses peuvent être faites à ce niveau :

- les souches isolées de laurier palme ne peuvent être définies comme P. syringae pv. syringae car elles diffèrent de la souche type par de nombreux caractères biochimiques,

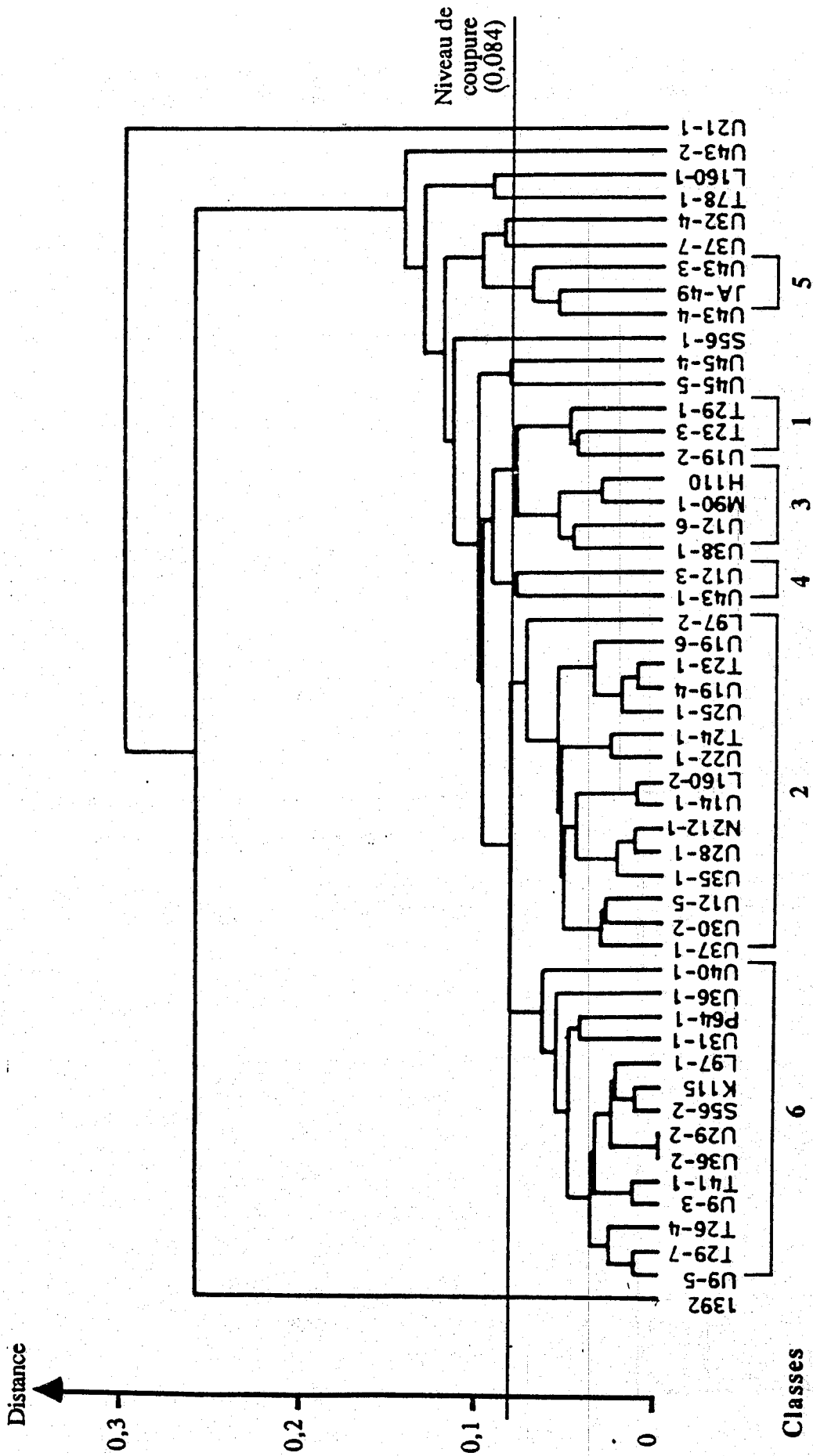
- la souche de référence CFBP 1392 n'est pas représentative du pathovar syringae.

Tableau XXII - Profil biochimique des 6 classes et des 10 phénotypes isolés définis par la taxonomie numérique sur les souches isolées de laurier palme.

| C.C.D.* | Substance          | Classe 1  |            | Classe 2  |           | Classe 3  |           | Classe 4  |           | Classe 5   |            | Classe 6 |   | U454 | U455 | S56.1 | U37.7 | U32.4 | T8.1 | L16.1 | U43.2 | U21.1 | 1392 |
|---------|--------------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|----------|---|------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|------|
|         |                    | 3 souches | 15 souches | 4 souches | 4 souches | 2 souches | 2 souches | 3 souches | 3 souches | 14 souches | 14 souches |          |   |      |      |       |       |       |      |       |       |       |      |
| 0,964   | Malonate           | -         | +          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -        | - | +    | -    | -     | +     | -     | -    | -     | -     | -     | -    |
| 0,892   | Glucosamine        | +         | +          | -         | +         | (75%)     | +         | +         | +         | +          | +          | +        | + | +    | +    | +     | +     | +     | +    | +     | +     | +     | +    |
| 0,574   | DL 5 Aminovalérate | -         | +          | +         | +         | (93%)     | -         | -         | +         | +          | +          | +        | + | -    | -    | -     | +     | -     | -    | -     | -     | -     | -    |
| 0,471   | L Cystéine         | -         | +          | -         | -         | -         | -         | -         | +         | +          | +          | +        | + | +    | +    | +     | +     | +     | +    | +     | +     | +     | +    |
| 0,424   | o Hydroxybenzoate  | -         | -          | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -          | -          | -        | - | -    | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -     | -    |
| 0,371   | Sarcosine          | +         | +          | +         | +         | (93%)     | -         | -         | +         | +          | +          | +        | + | +    | +    | +     | +     | +     | +    | +     | +     | +     | +    |
| 0,360   | D Lyxose           | -         | -          | -         | -         | -         | +         | +         | +         | +          | +          | +        | + | +    | +    | +     | +     | +     | +    | +     | +     | +     | +    |
| 0,331   | Propionate         | -         | +          | +         | +         | (33%)     | -         | -         | +         | +          | +          | +        | + | -    | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -     | -    |
| 0,323   | N Caproate         | +         | +          | +         | +         | (80%)     | +         | +         | +         | +          | +          | +        | + | -    | -    | -     | +     | +     | +    | +     | +     | +     | +    |
| 0,246   | Glutarate          | -         | +          | +         | +         | (80%)     | +         | +         | +         | +          | +          | +        | + | +    | +    | +     | +     | +     | +    | +     | +     | +     | +    |
| 0,243   | Benzoate           | -         | -          | -         | -         | -         | -         | -         | +         | +          | +          | +        | + | -    | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -     | -    |
| 0,223   | Itaconate          | -         | -          | -         | -         | -         | -         | -         | +         | +          | +          | +        | + | -    | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -     | -    |
| 0,138   | DL Lactate         | +         | +          | +         | +         | (50%)     | +         | +         | +         | +          | +          | +        | + | +    | +    | +     | +     | +     | +    | +     | +     | +     | +    |
| 0,125   | 2 Cétoglutarate    | +         | +          | +         | +         | (75%)     | +         | +         | +         | +          | +          | +        | + | +    | +    | +     | +     | +     | +    | +     | +     | +     | +    |
| 0,107   | L(+) Tartrate      | -         | -          | -         | -         | -         | -         | -         | +         | +          | +          | +        | + | -    | -    | -     | -     | -     | -    | -     | -     | -     | -    |

\* Coefficient de capacité de diagnostic

Figure 18 - Dendrogramme des distances des 50 souches isolées de laurier palme



### 3.2.1.2.2 Deuxième analyse

#### 3.2.1.2.2.1 Variabilité des 50 souches isolées de laurier palme et des 58 souches de P. syringae pv. syringae isolées de différents hôtes

Ces 108 souches se différencient entre elles par l'utilisation de 79 substances dont 20 sucres, 22 acides aminés et 27 acides organiques (Tableau XIX).

#### 3.2.1.2.2.2 Analyse factorielle des correspondance multiples

En valeur cumulée, les trois premiers axes rendent compte de 35,5 % de l'information.

L'axe 1 (Figure 19) est construit par les souches CFBP 1787 (isolée de Allium cepa) et CFBP 1701 (isolée de Persea americana) dont chaque contribution est de 0,419. Elles sont situées de part et d'autre du côté positif de l'axe. Ces deux souches sont très différentes des autres souches de P. syringae pv. syringae. Elles n'assimilent pas l'heptanoate (CTR = 0,080), le caprylate (CTR = 0,080), et le caprate (CTR = 0,055).

La souche CFBP 1701 n'utilise pas le L malate (CTR = 0,043), le L-arabinose (CTR = 0,043), le L -spartate (CTR = 0,031), le ribose (CTR = 0,030) et le DL-glycérate (CTR = 0,030).

La souche CFBP 1787 se distingue par l'absence d'hydrolyse de l'esculine (CTR = 0,038) et de l'assimilation du citrate (CTR = 0,080), du pélargonate (CTR = 0,038), de l'arbutine (CTR = 0,038) et du 2 céto-gluconate (CTR = 0,030).

L'axe 2 (Figure 19) est construit par la souche isolée de laurier palme U21.1 dont la contribution est de 0,884.

L'axe 3 (Figure 20) est déterminé par les souches CFBP 1701 et 1787 dont les contributions sont respectivement de 0,297 et 0,491, la souche type CFBP 1392 est une souche isolée de poirier (CFBP 311) de contributions 0,053 et 0,050.

La projection des individus sur les axes 2 et 3 montrent que les souches CFBP 1787 et 1701 s'opposent diamétralement. La souche type ainsi que la souche CFBP 311 se distinguent des souches isolées de laurier palme et des 54 souches identifiées comme P. syringae pv. syringae.

En valeur cumulée, les trois premiers axes rendent compte de 21,6 % de l'information.

L'axe 1 est construit par un groupe de 7 souches isolées d'hôtes différents situées du côté positif (Figure 19). Les deux souches isolées de Magnolia sp. sont dans ce groupe qui se distinguent des autres souches de P. syringae pv. syringae par l'utilisation ou non d'un certain nombre de substances biochimiques (Tableau XXIII). La souche R10.1 a un profil assez différent des 6 autres souches. Les isolats CFBP 1776 et P64.4, discriminés du côté positif de l'axe 1 et 2, se distinguent par l'utilisation de la L-phénylamine, L-ornithine et du diamminobutane.

Tableau XXIV - Profil biochimique des souches ayant une forte contribution sur les axes 1 et 3, définis par l'AFCM sur les souches de P. syringae pv. syringae isolées de différents hôtes.

| Contribution | Substance          | Groupe 1<br>15 souches | Groupe 2<br>10 souches |
|--------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 0,054        | Glucosamine        | +                      | - (90%)                |
| 0,054        | Malonate           | +                      | - (60%)                |
| 0,053        | Glycine            | + (53%)                | -                      |
| 0,046        | DL 5 Aminovalérate | +                      | - (70%)                |
| 0,034        | N Caproate         | + (80%)                | - (60%)                |
| 0,030        | Glutarate          | +                      | - (60%)                |
| 0,029        | L Isoleucine       | - (67%)                | -                      |
| 0,025        | L Proline          | + (67%)                | - (80%)                |
| 0,021        | Erythritol         | + (93%)                | - (50%)                |
| 0,020        | D (-) Tartrate     | + (73%)                | +                      |

L'axe 2 est surtout construit par la souche CFBP 1408, isolée de peuplier. Les souches CFBP 600, CFBP 1692, S9.6 et CFBP 1408 ont en commun l'utilisation du o.hydroxybenzoate contrairement à la souche CFBP 1760 (Tableau XXIII).

La projection des individus sur les axes 1 et 3 permet de distinguer trois groupes (Figure 20).

L'axe 1 définit le groupe comportant les 7 souches, décrit plus haut. L'axe 3 distingue deux autres groupes qui sont discriminés de part et d'autre de cet axe et dont le profil biochimique est donné dans le Tableau XXIV).

### 3.2.1.2.2.3 Classification hiérarchique ascendante

Une coupure du dendrogramme (Figure 21) en 3 classes est satisfaisante. Trois phénotypes sont isolés (CFBP 1701, 1787 et U21.1). On retrouve par cette analyse le caractère marginal de ces souches.

La première classe comporte 96 souches dont 49 isolées de laurier palme et 47 identifiées comme P. syringae pv. syringae. Cette classe pourrait être subdivisée en deux sous classes dont l'une serait constituée uniquement de souches isolées de différents hôtes.

La classe 2 renferme la souche type de P. syringae pv. syringae (CFBP 1392) et la souche isolée de poirier (CFBP 311).

La classe 3 est constituée de 7 souches isolées de différents hôtes. Les deux isolats de Magnolia sp. sont groupés dans cette classe.

### 3.2.1.2.2.4 Analyse en taxonomie numérique

La coupure du dendrogramme au niveau 0,138 permet de définir 7 classes et 10 phénotypes isolés (Figure 22). Les classes peuvent se différencier par 27 caractères biochimiques (Tableau XXV).

La classe 1 pourrait être considérée comme un phénotype isolé. En effet elle est constituée des souches CFBP 1392 et 1393 qui sont en fait deux répétitions de la souche CFBP 1392.

La classe 2 est constituée de 5 souches isolées de laurier palme (10 %) et d'une souche isolée de haricot.

La classe 3 regroupe 4 souches de collection isolées de différents hôtes (Cucurbita, Euphorbia, Magnolia, Prunus persica).

La classe 4 est uniquement constituée de souches de P. syringae pv. syringae dont 5 isolées de Rosacées.

La classe 5 caractérise les 2 souches isolées de peuplier.

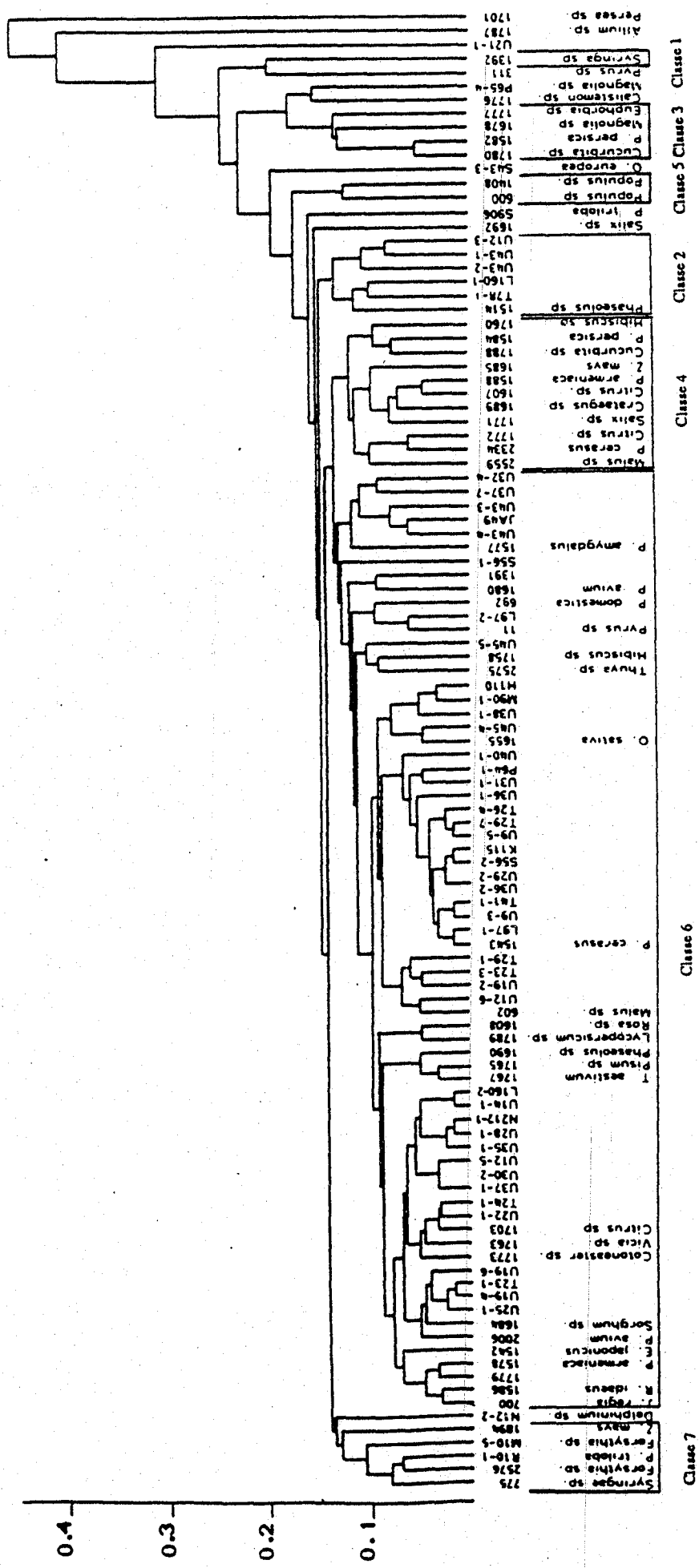


Tableau XXV - Profil biochimique des 7 classes et des 10 phénotypes isolés définis par la taxonomie numérique sur les souches isolées de laurier palme et de différents hôtes.

| C.C.D.* | Substance           | Classe 1<br>2 souches | Classe 2<br>6 souches | Classe 3<br>4 souches | Classe 4<br>11 souches | Classe 5<br>2 souches | Classe 6<br>69 souches | Classe 7<br>5 souches | N12.2 | P65.4 | S43.3 | S9.6 | U21.1 | 1692 | 1701 | 1776 | 1787 | 311 |
|---------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|------|------|-----|
| 0,334   | Glycine             | -                     | -                     | -                     | +                      | -                     | - (99%)                | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | -    | -    | -    | -    | +   |
| 0,275   | Malonate            | -                     | -                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | +     | +     | -    | +     | +    | +    | +    | +    | +   |
| 0,272   | Erythritol (API)    | +                     | +                     | -                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,272   | Erythritol          | +                     | +                     | -                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,257   | Sarcosine           | +                     | +                     | -                     | +                      | -                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,251   | DL Lactate          | +                     | +                     | -                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,237   | Gélatine            | +                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,229   | L Glutamine         | +                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,224   | DL Lactate (API)    | +                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,219   | Propionate          | -                     | +                     | +                     | +                      | -                     | -                      | +                     | +     | +     | +     | -    | +     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,216   | N Caproate          | -                     | +                     | -                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,200   | D(-) Tartrate (API) | -                     | +                     | +                     | +                      | -                     | -                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,198   | Glucosamine         | +                     | +                     | -                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,192   | Méso Tartrate       | -                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,186   | D Raffinose         | -                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,168   | L Arginine          | -                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,163   | Succinate           | -                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,162   | Glutarate           | -                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,155   | L Cystéine          | -                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,150   | L Histidine         | -                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,144   | L Valine            | +                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |
| 0,139   | Salicine            | -                     | +                     | -                     | -                      | +                     | -                      | -                     | -     | -     | -     | +    | -     | -    | -    | -    | -    | +   |
| 0,112   | L Leucine           | +                     | +                     | +                     | +                      | -                     | +                      | +                     | +     | -     | -     | +    | -     | +    | +    | -    | +    | +   |

\* : Coefficient de capacité de diagnostic.

Figure 22 - Dendrogramme des distances des 50 souches isolées de laurier palme et de 58 souches isolées de différents hôtes.



La classe 6 majoritaire renferme 64 % des souches étudiées. Elle regroupe 44 souches isolées de laurier palme (88 %) et 25 souches isolées de différents hôtes (43 %). Ces souches ont été isolées de 24 espèces dont la majorité appartient à la famille des Rosacées.

La classe 7 est constituée de 5 souches de P. syringae pv. syringae. Les deux isolats de Forsythia sont dans cette classe.

Certains phénotypes isolés pourraient être rattachés à des classes, ainsi, les souches P65.4 et CFBP 1776 à la classe 3, la souche CFBP 311 à la classe 4 et la souche N12.2 à la classe 7.

### 3.2.1.2.2.5 Discussion

La souche U21.1 est très marginale par rapport aux autres souches isolées de laurier palme et par rapport à celles isolées de différents hôtes. Il semble que les souches CFBP 1701 (isolée de Persea americana) et CFBP 1787 (isolée de Allium cepa) ont été à tort identifiées comme P. syringae pv. syringae. Elles sont très éloignées de la souche type et de l'ensemble des souches de P. syringae pv. syringae.

Les souches de laurier palme ne forment pas un groupe homogène mais se trouvent dispersées parmi les souches parmi les souches isolées de différents hôtes. Toutefois, cette dispersion est moins importante que celle des souches de P. syringae pv. syringae. Les souches isolées de laurier palme sont réparties en 2 classes alors que les souches isolées de différents hôtes sont distribuées dans les 7 classes définies par la taxonomie numérique.

L'appartenance à une classe n'est pas corrélée avec l'origine de l'hôte à l'exception de la classe 5 qui regroupe les souches isolées de Populus sp. L'étude sur un plus grand nombre de souches isolées de peuplier serait bien sûr souhaitable pour confirmer ce résultat.

La majorité des souches identifiées comme P. syringae pv. syringae se distingue nettement de la souche type. Ces résultats confirment l'hypothèse que la souche CFBP 1392 ne serait pas un bon représentant du pathovar syringae.

La classe 6 définie par la taxonomie numérique regroupe 88 % des souches isolées de laurier palme et 43 % des souches isolées de différents hôtes. Cette classe pourrait être représentative du pathovar syringae. Les caractères définissant cette classe seraient ceux permettant de distinguer P. syringae pv. syringae.

L'érythritol et les acides organiques DL-lactate et D(-) tartrate ont une forte contribution dans la distinction de ces classes.

En revanche, la classe 3 se distingue très nettement de l'ensemble des autres classes par l'absence d'assimilation de l'érythritol et du DL-lactate et par l'utilisation du D(-) tartrate. C'est le seul cas où l'on a une bonne corrélation entre la production d'acide sur milieu d'Ayers (9) et l'assimilation du D(-) tartrate par la méthode API.

La microméthode API semble relativement fiable puisque les deux représentants de la souche CFBP 1392, dont les caractères ont été étudiés par deux personnes différentes, se retrouvent exactement au même endroit et dans la même classe.

Il est nécessaire de faire intervenir les individus marginaux (de très forte CTR ou très éloignés sur l'axe) en éléments supplémentaires pour avoir un aperçu de la variabilité des souches situées autour du centre de gravité. Cette méthode est à priori intéressante pour caractériser des individus marginaux parmi une population hétérogène mais n'est pas tout à fait adaptée à des études en taxonomie. La taxonomie numérique permet de mieux apprécier la variabilité des individus. Cependant, les différentes analyses donnent des résultats assez comparables.

### 3.2.1.2.3 Toisième analyse

Pour les raisons évoquées ci-dessus, seule la taxonomie numérique a été faite.

#### 3.2.1.2.3.1 Variabilité de 50 souches de laurier palme, 58 souches isolées de différents hôtes, 4 souches de Pseudomonas phytopathogènes et les 50 souches des pathovars de P. syringae.

Ces 162 souches se différencient par 108 caractères (Tableau XIX).

#### 3.2.1.2.3.2 Analyse taxonomique

Si on effectue une coupure au niveau 0,13 (Figure 23), on obtient alors 14 classes et 45 phénotypes isolés dont P. cichorii, P. viridiflava, 34 souches appartenant aux 32 pathovars de P. syringae, 8 souches identifiées comme P. syringae pv. syringae et une souche de laurier palme (U21.1).

Certaines classes renferment regroupent des pathovars dont les profils biochimiques sont proches :

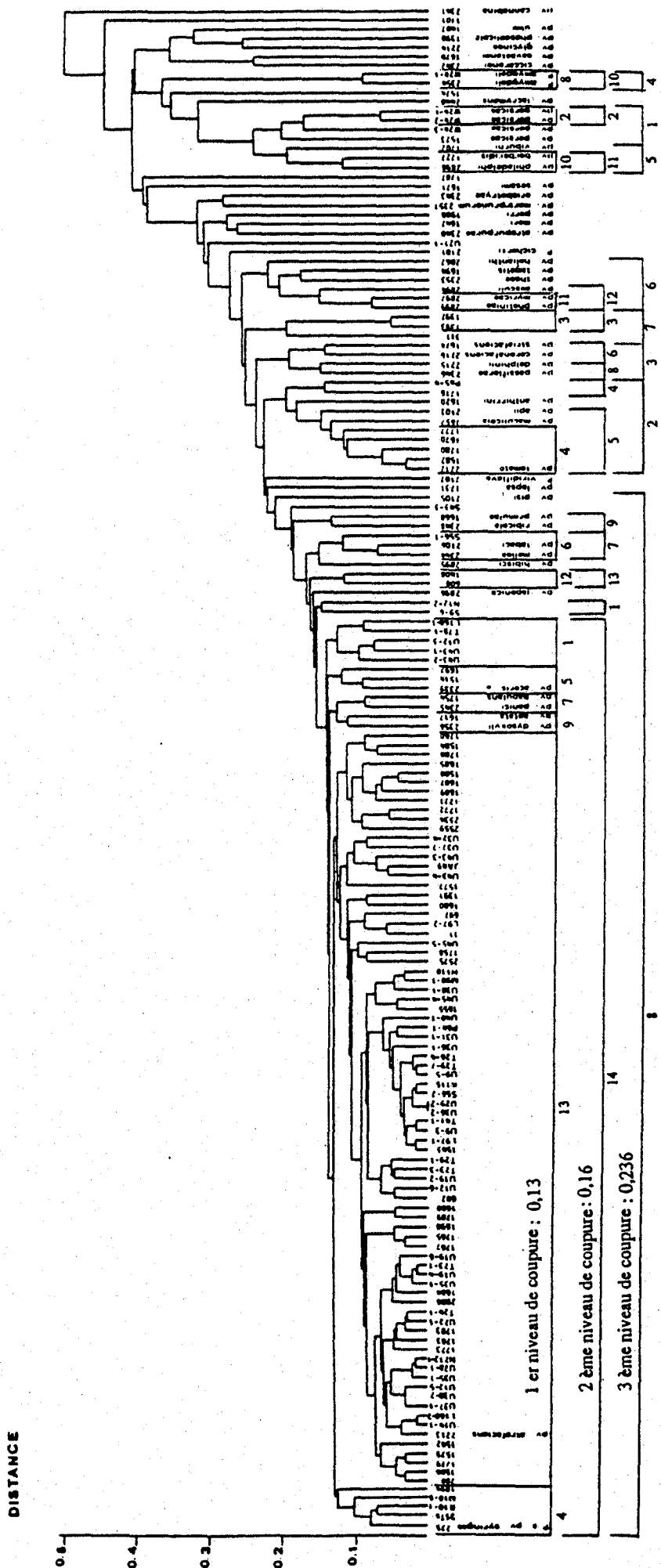
- classe 6 : pv. tabaci et pv. mellea
- classe 7 : pv. papulans et pv. panici,
- classe 9 : pv. aptata et pv. dysoxyli,
- classe 10 : pv. berberidis et pv. philadelphi,
- classe 11 : pv. myricae et pv. photiniae.

La classe 8 comprend les deux souches de P. amygdali.

La classe 13 renferme 80 souches dont 43 isolées de laurier palme (86 %), 36 souches de P. syringae pv. syringae isolées de différents hôtes (62 %) et un pathovar de P. syringae (atrofaciens).



Figure 23 - Dendrogramme des distances des souches isolées de laurier palme et d'hôtes différents, des souches de Pseudomonas et des pathovars de P. syringae.



Les souches isolées de laurier palme se répartissent dans 3 classes alors que les souches identifiées comme P. syringae pv. syringae sont dispersées dans 6 classes.

La souche type de P. syringae pv. syringae (CFBP 1392) s'individualise dans la classe 3. Les deux souches isolées de Populus identifiées comme P. syringae pv. syringae sont regroupées dans la classe 12.

Lorsque le niveau de coupure est plus élevé (0,16), on obtient toujours 14 classes mais 32 phénotypes isolés. En effet les classes 1, 5, 7, 9 et 14 définies précédemment se trouvent regroupées dans la nouvelle classe majoritaire 14. Elle comprend 48 souches isolées de laurier palme (96 %), 43 souches identifiées comme P. syringae pv. syringae (74 %) et 6 pathovars de P. syringae.

Les classes 2, 3, 6, 8, et 10 n'ont pas changé et ont été renommées respectivement classes 2, 3, 7, 10 et 11. Par contre d'autres regroupements ont été faits parmi les 45 phénotypes précédemment définis. Ainsi ont été regroupé :

- dans la classe 4, les pathovars maculicola et apii,
- dans la classe 6, les pathovars coronafaciens et striafaciens,
- dans la classe 8, les pathovars passiflorae et delphinii,
- dans la classe 9, les pathovars ribicola et primulae,
- dans la classe 12, les pathovars photiniae, myricae et aesculi.

Ces différentes classes se distinguent en fonction de l'assimilation des caractères dont les coefficients de capacité de diagnostic sont élevés (Tableau XXVI).

Nous avons réalisé un troisième niveau de coupure (0,236). on obtient alors 8 classes et 19 phénotypes isolés.

La classe 1 caractérise le pathovar persicae regroupant des souches isolées de France et de Nouvelle-Zélande.

La classe 2 semble caractériser le pathovar tomato. Six souches identifiées comme P. syringae pv. syringae, isolées de différents hôtes s'apparentent plus au pathovar tomato qu'au pathovar syringae. Trois pathovars, maculicola, apii et anthirrhini ont des profils biochimiques très proche du pathovar tomato.

La classe 4 caractérise l'espèce P. amygdali.

La classe 8 renferme 68 % des souches étudiées et comprend 49 souches isolées de laurier palme (98 %), 48 souches identifiées comme P. syringae pv. syringae (83 %) et 13 pathovars de P. syringae.

### 3.2.2 Souches de P. syringae pv. savastanoi

Trois analyses ont été faites pour l'interprétation des 167 caractères biochimiques :

- la première concerne toutes les souches étudiées c'est à dire les 143 souches de P. syringae pv. savastanoi (Tableau XII) en comparaison, avec les 78 souches type dont 41 pathovars de P. syringae, 35 souches de Pseudomonas fluorescents et non fluorescents, 1 souche d'Agrobacterium tumefaciens et 1 souche de Xanthomonas campestris pv. campestris (Tableau XIII).

- la deuxième a été faite uniquement sur les souches type appartenant aux différents pathovars de P. syringae y compris P. syringae pv. savastanoi et P. viridiflava (groupe I et II de Lelliott, tableau XIII).

- la troisième n'a concerné que les souches de P. syringae pv. savastanoi (Tableau XII).

#### 3.2.2.1 Première analyse

##### 3.2.2.1.1 Variabilité de l'ensemble des souches testées

Les 221 souches ont répondu positivement au fumurate et négativement à 10 substrats : L-xylose, I.O.méthyl- alpha-D-xyloside, inuline, DL-norvoline, L-méthionine, 3 amino-benzoate, 4 amino-benzoate, urée, acétamide, éthylamine. Les substances I.O méthyle-beta-D-xyloside, I.O.méthyl-alpha-D-glucoside, lactose, mélizitose et D-turanose n'ont été uniquement utilisés que par Agrobacterium tumefaciens.

Les groupes I et II de Lelliott ont donné des réponses positives à 6 caractères en plus du fumarate : tabac, D-glucose, D-fructose, gluconate, succinate, et L-glutamate et des réponses négatives à 64 caractères : oxydase, nitrate, arginine, pectine, D-arabinose, L-arabinose, dulcitol, N-acétyl-glucosamine, amygdaline, arbutine, D-cellobiose, mélibiose, glycogène, gentibiose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, L-arabitol, 2 céto-gluconate, 5 céto-gluconate, acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, N-valérate, isovalérate, adipate, pimolate, subérate, azélate, sébacate, glycolate, levulinate, citraconate, phénylacétate, benzoate, o.hydroxybenzoate, m-hydroxybenzoate, D-mandélate, L-mandélate, phtalate, iso-phtalate, tere-phtalate, glycine, L-isoleucine, L-norleucine, DL-2-amino butyrate, L-thréonine, D-tryptophane, L-tryptophane, L-ornithine, L-lysine, DL-kynurénine, créatine, beta-alanine, DL-3 amino-butyrate, butylamine, amylamine, éthanolamine, benzylamine, spermine, histamine, tryptamine.

P. syringae pv. savastanoi possède une DNase et utilise le saccharose, le mannitol, le D-galactose, le D-mannose, le L(+) tartrate, le DL-glycérate, le L-malate, le L-pyruvate, le L-aspartate, le citrate et le L-proline ; cette espèce est négative vis à vis de 29 caractères : gélatine, esculine, DL-lactate, érythrytol, Tween estérase, polypectate de sodium pH 8,5, adonitol, maltose, L-sorbose, tréhalose, salicine, amidon, xylitol, D-xylose, oxalate, maléate, malonate, D-tartrate (API), DL-3 hydroxy-



butyrate, mésoaconate, méso-Tartrate, L-cystéine, L-phényl-alanine, L-citruline, 2 amino-benzoate, Di-amino-butyraté, glucosamine, L-isoleucine, L-valine.

L'examen de l'utilisation des 167 substrats étudiés (Figure 24), montre que les 41 pathovars de P. syringae, P. viridiflava et P. cichorii (groupe I, II et III de Lelliott, tableau XIII), assimilent moins de substrats (24 à 62) que les groupes IV et V (66 à 111) et certaines bactéries non fluorescentes comme P. cepacia, P. corrugata, P. gladioli pv. gladioli, P. gladioli pv. alliicola, P. rubrisubalbicans et A. tumefaciens dont l'assimilation des différents substrats est comprise entre (62-111). Les autres bactéries non fluorescentes P. solanacearum, P. pseudoalcaligenes, P. stutzeri, P. alcaligenes et X. campestris pv. campestris consomment entre 19 et 42 substances.

L'utilisation des sucres (Figure 25), montre que :

- les groupes I, II et III utilisent entre 8 et 12 sucres (P. syringae pv. phaseolicola et P. syringae pv. cannabina utilisent seulement 7 et 8 sucres respectivement),

- les groupes IV et V (Tableau XIII), utilisent entre 7 et 21 (mais certaines bactéries non fluorescentes : P. gladioli pv. gladioli, P. gladioli pv. alliicola et P. cepacia consomment 23, 24, 33 respectivement),

- P. alcaligenes n'a utilisé aucun sucre et P. pseudoalcaligenes a seulement utilisé le D-fructose. P. solanacearum utilise entre 2 et 12 sucres,

- A. tumefaciens est la plus consommatrice de sucres : 36 sucres.

L'utilisation des acides organiques (Figure 26) est aussi variable :

- les groupes I, II et III n'en utilisent qu'entre 4 et 5 pour P. syringae pv. lachrymans et P. syringae pv. cannabina et 22 pour P. syringae pv. dysoxyl et P. viridiflava,

- les bactéries des groupes IV, V et les pseudomonas non fluorescents (P. corrugata, P. cepacia, P. gladioli pv. alliicola, P. rubrilineans et P. rubrisubalbicans) en utilisent entre 22 et 37, P. gladioli pv. gladioli est la bactérie qui utilise le plus d'acides organiques,

- P. solanacearum, P. alcaligenes et P. pseudoalcaligenes utilisent entre 6 et 11,

- A. tumefaciens et X. campestris pv. campestris utilisent 13 acides organiques.

L'utilisatiopn des acides aminés (Figure 27) est sensiblement la même que celle des acides organiques.

- P. cepacia est la bactérie qui consomme le plus d'acides aminés : 35. P. pseudoalcaligenes utilise seulement deux

Figure 24 - Nombre des réponses positives vis-à-vis de 167 caractères biochimiques.

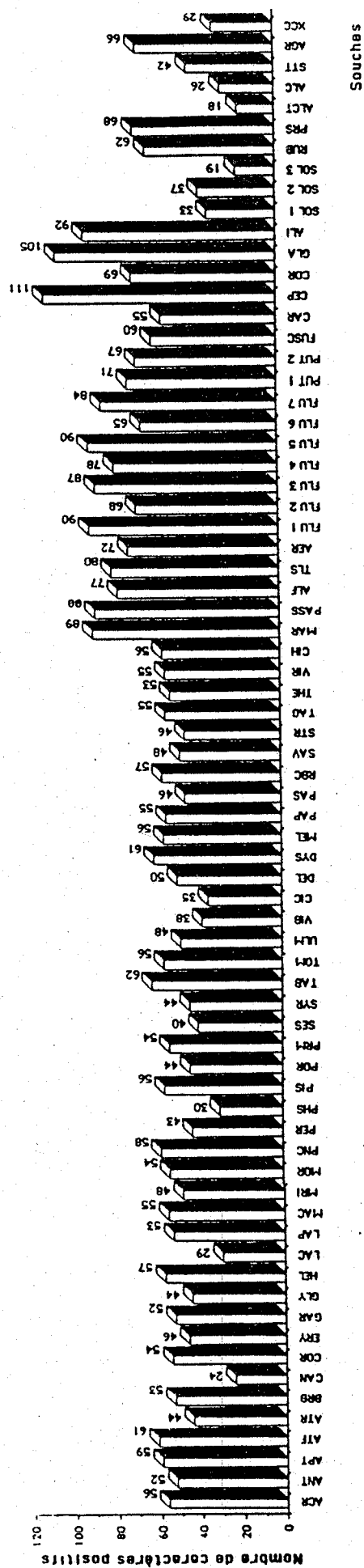


Figure 25 - Nombre de sucres utilisés.

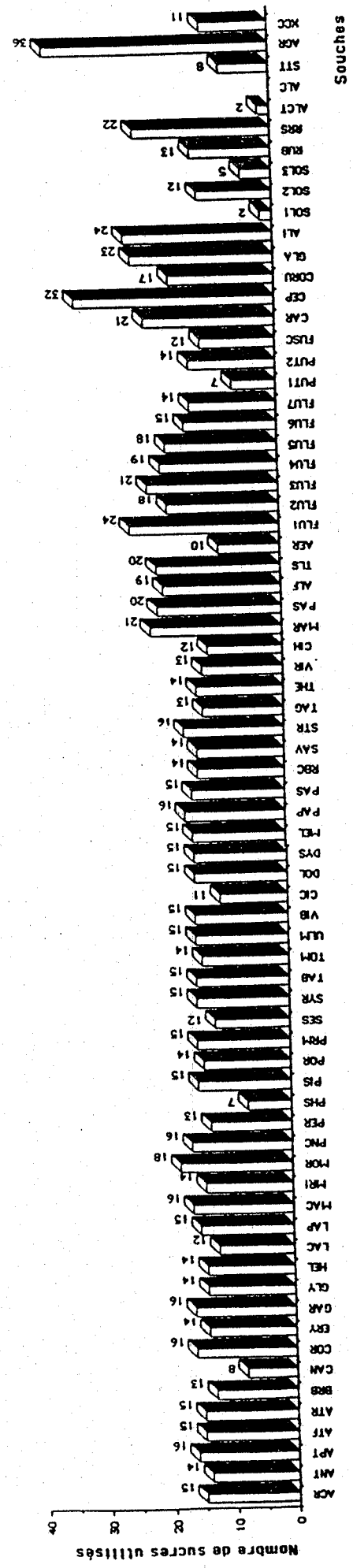


Figure 26 - Nombre d'acides organiques utilisés.

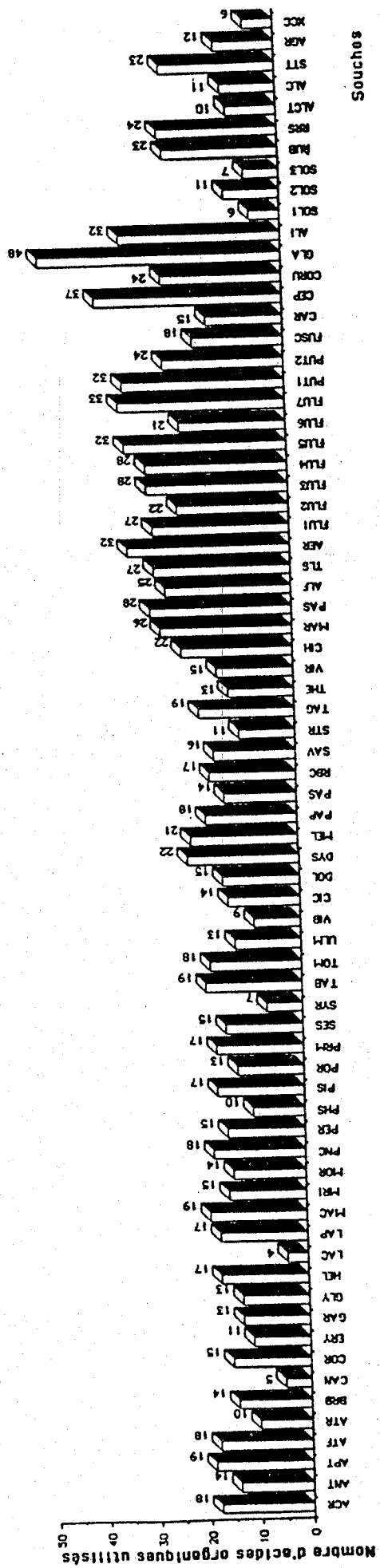
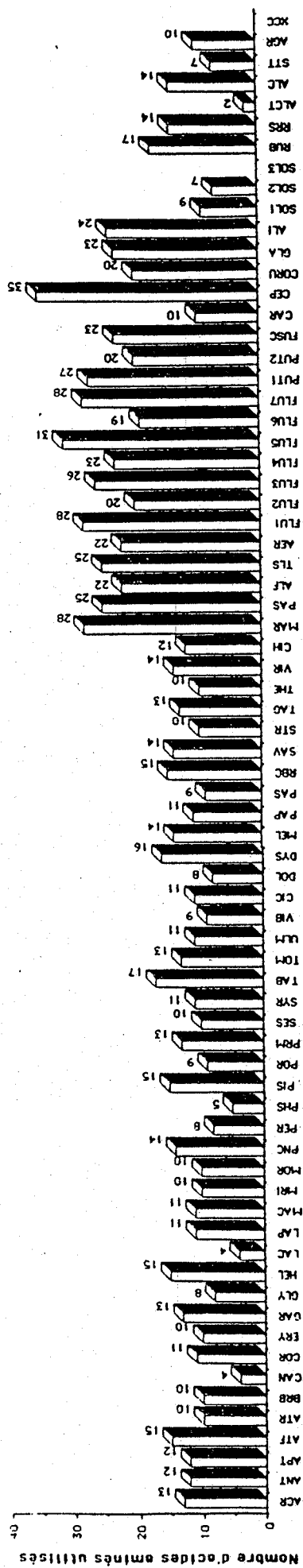


Figure 27 - Nombre d'acides aminés utilisés.



Souches

acides aminés par contre P. solanacearum et X. campestris pv. campestris n'en utilisent aucun,

- parmi les groupes I, II et III : P. syringae pv. cannabina, P. syringae pv. lachrymans et P. syringae pv. phaseolicola n'utilisent que 4 ou 5 acides aminés. Les autres souches utilisent entre 8 et 17.

### 3.2.2.1.2 Analyse factorielle des correspondances multiples

L'analyse factorielle des correspondances multiples (A.F.C.M.) montre que le maximum d'informations est porté sur les trois premiers axes factoriels puisque la somme des valeurs propres (37,66 %) est significativement représentative.

L'examen de la projection du nuage des individus sur des plans factoriels (Figure 28, 29, 30) et la sélection des individus et des variables qui ont de fortes contributions sur les axes factoriels (Tableau XXVII et XXVIII) permet de définir ces axes.

Le premier pourrait être défini par le 2 céto-gluconate, l'acétate et le tabac. Les bactéries qui ont répondu positivement aux deux premiers tests et négativement au troisième, sont situées du côté négatif de l'axe et sont donc opposées aux bactéries des groupes I, II qui sont tabac positif (Figure 28).

Les bactéries qui consomment peu de substances (P. solanacearum, P. stutzeri, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes et X. campestris pv. campestris) contribuent à la construction de l'axe 2 et sont opposées aux bactéries qui utilisent beaucoup de substances (P. cepacia, P. gladioli pv. gladioli et P. gladioli pv. alliicola).

Le troisième axe pourrait être défini par l'utilisation de l'arginine ce qui est le cas de P. fluorescens.

La projection des individus sur le plan I x 2 (Figure 28) montre que :

- les groupes IV et V de Lelliott, P. corrugata, P. fuscovaginae, P. cepacia, P. gladioli pv. gladioli, P. gladioli pv. alliicola et P. caryophylli qui ont des fortes contributions sur l'axe 1, sont réparties sur la partie négative de cet axe. D'autres bactéries (P. solanacearum, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes, P. stutzeri et X. campestris pv. campestris) sont discriminées seulement par l'axe 2,

- les groupes I, II et III de Lelliott sont concentrés autour du centre de gravité.

La projection des individus sur le plan I x 3 (Figure 29) montre que :

- les bactéries qui sont discriminées par l'axe 1 (plan I x 2) sont ici séparées par l'axe 3 en deux sous-groupes. L'un contient les groupes IV et V de Lelliott, P. corrugata et P. fuscovaginae qui sont opposés à d'autres bactéries non

Tableau XXVIII - Contribution des souches à la construction des axes factoriels.

| Nom de la bactérie              | Code de la souche | AXES   |          |                  |        |          |                  |        |          |                  |
|---------------------------------|-------------------|--------|----------|------------------|--------|----------|------------------|--------|----------|------------------|
|                                 |                   | 1      |          |                  | 2      |          |                  | 3      |          |                  |
|                                 |                   | CORD   | CONT ABS | COS <sup>2</sup> | CORD   | CONT ABS | COS <sup>2</sup> | CORD   | CONT ABS | COS <sup>2</sup> |
| <i>p. cepacia</i>               | CEP 1             | - 2,51 | 12,57    | 0,59             | 1,02   | 6,11     | 0,1              | - 1,28 | 9,73     | 0,15             |
| <i>p. cepacia</i>               | CEP 2             | - 2,45 | 11,98    | 0,57             | 0,98   | 5,65     | 0,09             | - 1,21 | 8,69     | 0,14             |
| <i>p. gladioli pv. gladioli</i> | GLA               | - 2,06 | 8,51     | 0,35             | 0,87   | 4,42     | 0,06             | - 0,46 | 1,24     | 0,02             |
| <i>p. fluorescens</i>           | FLU 5             | - 1,67 | 5,58     | 0,36             |        |          |                  | 0,43   | 1,13     | 0,02             |
| <i>p. fluorescens</i>           | FLU 7             | - 1,51 | 4,53     | 0,47             |        |          |                  | 0,31   | 0,57     | 0,02             |
| <i>p.g.pv. allicola</i>         | ALI               | - 1,39 | 3,87     | 0,41             | 0,31   | 0,57     | 0,02             |        |          |                  |
| <i>p. fluorescens</i>           | FLU 1             | - 1,20 | 2,87     | 0,44             | - 0,5  | 1,48     | 0,04             | 0,66   | 2,56     | 0,13             |
| <i>p. putida</i>                | PUT 1             | - 1,20 | 2,87     | 0,21             | - 0,5  | 1,48     | 0,04             |        |          |                  |
| <i>p. aeruginosa</i>            | AER               | 1,19   | 2,84     | 0,39             | 0,43   | 1,1      | 0,05             | 0,36   | 0,77     | 0,04             |
| <i>p. marginalis pv. marg.</i>  | MAR               | - 1,16 | 2,69     | 0,37             |        |          |                  | 0,64   | 2,44     | 0,11             |
| <i>p. ubrisubalbicans</i>       | RRS               | - 0,93 | 1,74     | 0,22             |        |          |                  |        |          |                  |
| <i>p. ubrilineans</i>           | RUB               | - 0,82 | 1,36     | 0,19             |        |          |                  |        |          |                  |
| <i>p. fluorescens</i>           | FLU 2             | - 0,72 | 1,02     | 0,26             |        |          |                  | 0,40   | 0,93     | 0,08             |
| <i>p. pseudoalcaligenes</i>     | ALCT              |        |          |                  | - 1,55 | 13,99    | 0,50             | - 0,52 | 1,58     | 0,06             |
| <i>p. stutzeri</i>              | STT               | - 0,51 | 0,53     | 0,06             | - 1,26 | 9,27     | 0,34             |        |          |                  |
| <i>p. alcaligenes</i>           | ALC               |        |          |                  | - 1,12 | 7,35     | 0,36             |        |          |                  |
| <i>p. solanacearum</i>          | SOL 3             |        |          |                  | - 1,11 | 7,25     | 0,47             | - 0,44 | 1,17     | 0,07             |
| <i>p. solanacearum</i>          | SOL 1             |        |          |                  | - 1,06 | 6,56     | 0,35             | - 0,35 | 0,74     | 0,04             |
| <i>x. campestris pv. camp.</i>  | XCC               |        |          |                  | - 0,99 | 5,68     | 0,25             | - 0,58 | 2,03     | 0,09             |
| <i>p. solanacearum</i>          | SOL 2             |        |          |                  | - 0,85 | 4,22     | 0,28             |        |          |                  |
| <i>p.s.pv. lachrymans</i>       | LAC               |        |          |                  | - 0,51 | 1,49     | 0,13             | - 0,36 | 0,76     | 0,07             |
| <i>p.s.pv. cannabina</i>        | CAN               |        |          |                  | - 0,49 | 1,38     | 0,21             | 0,31   | 0,57     | 0,09             |
| <i>agrobacterium tumef.</i>     | AGR               | - 1,24 | 3,06     | 0,11             |        |          |                  | - 2,26 | 30,56    | 0,38             |
| <i>p.m.pv. pastinacae</i>       | PAS               | - 1,13 | 2,55     | 0,40             |        |          |                  | 0,8    | 3,82     | 0,2              |
| <i>p. tolaasii</i>              | TLS 2             | - 1,15 | 2,65     | 0,46             |        |          |                  | 0,73   | 3,15     | 0,18             |
| <i>p. corrugata</i>             | COR 2             | - 1,16 | 2,69     | 0,49             |        |          |                  | 0,70   | 2,94     | 0,18             |
| <i>p. tolaasii</i>              | TLS 1             | - 1,04 | 2,15     | 0,41             |        |          |                  | 0,70   | 2,92     | 0,19             |
| <i>p. fluorescens</i>           | FLU 3             | - 1,15 | 2,63     | 0,44             |        |          |                  | 0,67   | 2,65     | 0,15             |
| <i>p. fluorescens</i>           | FLU 4             | - 1,07 | 2,27     | 0,42             |        |          |                  | 0,62   | 2,29     | 0,14             |
| <i>p. putida</i>                | PUT 2             | - 0,78 | 1,20     | 0,29             |        |          |                  | 0,58   | 1,97     | 0,16             |
| <i>p.m.pv. alfalfa</i>          | ALF               | - 0,89 | 1,59     | 0,28             |        |          |                  | 0,52   | 1,62     | 0,10             |
| <i>p. fluorescens</i>           | FLU 6             | - 0,49 | 0,48     | 0,19             |        |          |                  | 0,45   | 1,22     | 0,16             |
| <i>p. corrugata</i>             | COR 3             | - 0,41 | 0,34     | 0,14             |        |          |                  | 0,41   | 0,99     | 0,14             |
| <i>p. corrugata</i>             | COR 4             | - 0,44 | 0,38     | 0,17             |        |          |                  | 0,37   | 0,81     | 0,12             |
| <i>p.s.pv. phaseolicola</i>     | PHS               |        |          |                  | - 0,37 | 0,79     | 0,08             | - 37   | 0,81     | 0,08             |
| <i>p. corrugata</i>             | COR 1             | - 0,44 | 0,38     | 0,17             |        |          |                  | 0,32   | 0,59     | 0,07             |
| <i>p. fuscovaginae</i>          | FUSC              | - 0,50 | 0,50     | 0,18             |        |          |                  | 0,27   | 0,45     | 0,05             |
| <i>p. caryophylli</i>           | CAR               | - 0,39 | 0,30     | 0,06             |        |          |                  | - 0,23 | 0,31     | 0,02             |

CORD = Coordonnées sur l'axe

CONT ABS = Contribution absolue

COS<sup>2</sup> = Cosinus carrés

fluorescentes comme P. cepacia, P. gladioli pv. gladioli et A. tumefaciens,

- P. solanacearum, P. pseudoalcaligenes, X. campestris pv. campestris et les pathovars de P. syringae : pv. phaseolicola, pv. lachrymans et pv. cannabina sont discriminés uniquement par l'axe 3.

Sur le plan 2 x 3 (Figure 30), cinq groupes se présentent :

- les groupes IV et V de Lelliott, P. corrugata et P. fuscovaginae sont discriminés sur l'axe 3 et sont opposés à la souche d'A. tumefaciens,

- P. cepacia, P. gladioli pv. gladioli, P. gladioli pv. alliicola forment un groupe discriminé par l'axe 2 et sont opposées à P. solanacearum, P. stutzeri, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes et X. campestris pv. campestris,

- P. syringae pv. canabina, P. syringae pv. lachrymans, P. syringae pv. phaselicola ont une contribution non négligeable sur l'axe 2,

- les groupes I, II et III de Lelliott sont toujours plus au moins dispersés autour du centre de gravité.

La représentation des bactéries dans un espace à trois dimensions (Figure 31), montre de façon claire que :

- les groupes I, II et III de Lelliott sont concentrés sur la partie positive de l'axe I autour du centre de gravité,

- les groupes IV et V de Lelliott, P. corrugata et P. fuscovaginae sont disposés sur la partie négative des axes 1 et 2 et sur le côté positif de l'axe 3,

- à la même place sur l'axe 1 et 2, on trouve P. rubrilineans, P. rubrisubalbicans et P. caryophylli qui sont cependant opposés aux bactéries précédentes sur l'axe 3,

- P. solanacearum, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes, P. stutzeri et X. campestris pv. campestris qui ne sont pas discriminés sur l'axe 1 et se disposent sur le côté négatif des axes 2 et 3. P. gladioli pv. gladioli, P. gladioli pv. alliicola et P. cepacia sont éloignées sur la partie positive de l'axe 2 et négative sur les axes 1 et 3,

- P. cepacia est très éloigné sur l'axe 3 de P. gladioli pv. gladioli et P. gladioli pv. alliicola, les coordonnées sur cet axe sont - 0,13 et - 0,46 pour P. gladioli pv. alliicola et P. gladioli pv. gladioli et - 1,28 pour P. cepacia,

- A. tumefaciens est plus au moins proche de P. rubrilineans, P. rubrisubalbicans et P. caryophylli sur les axes 1 et 2 et s'éloigne beaucoup sur l'axe 3.





Figure 28 - AFCM pour l'ensemble des souches (plan 1 X 2).

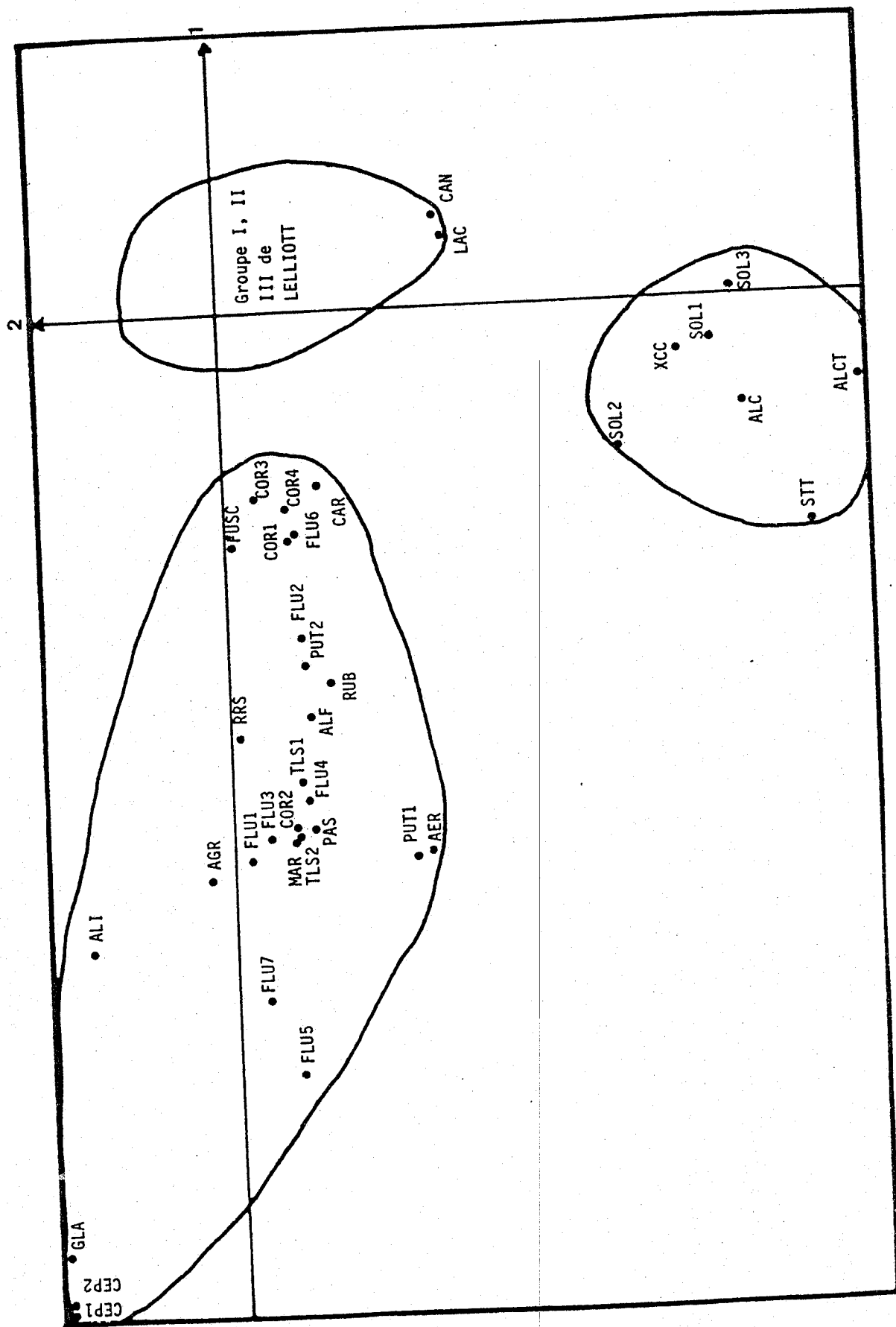
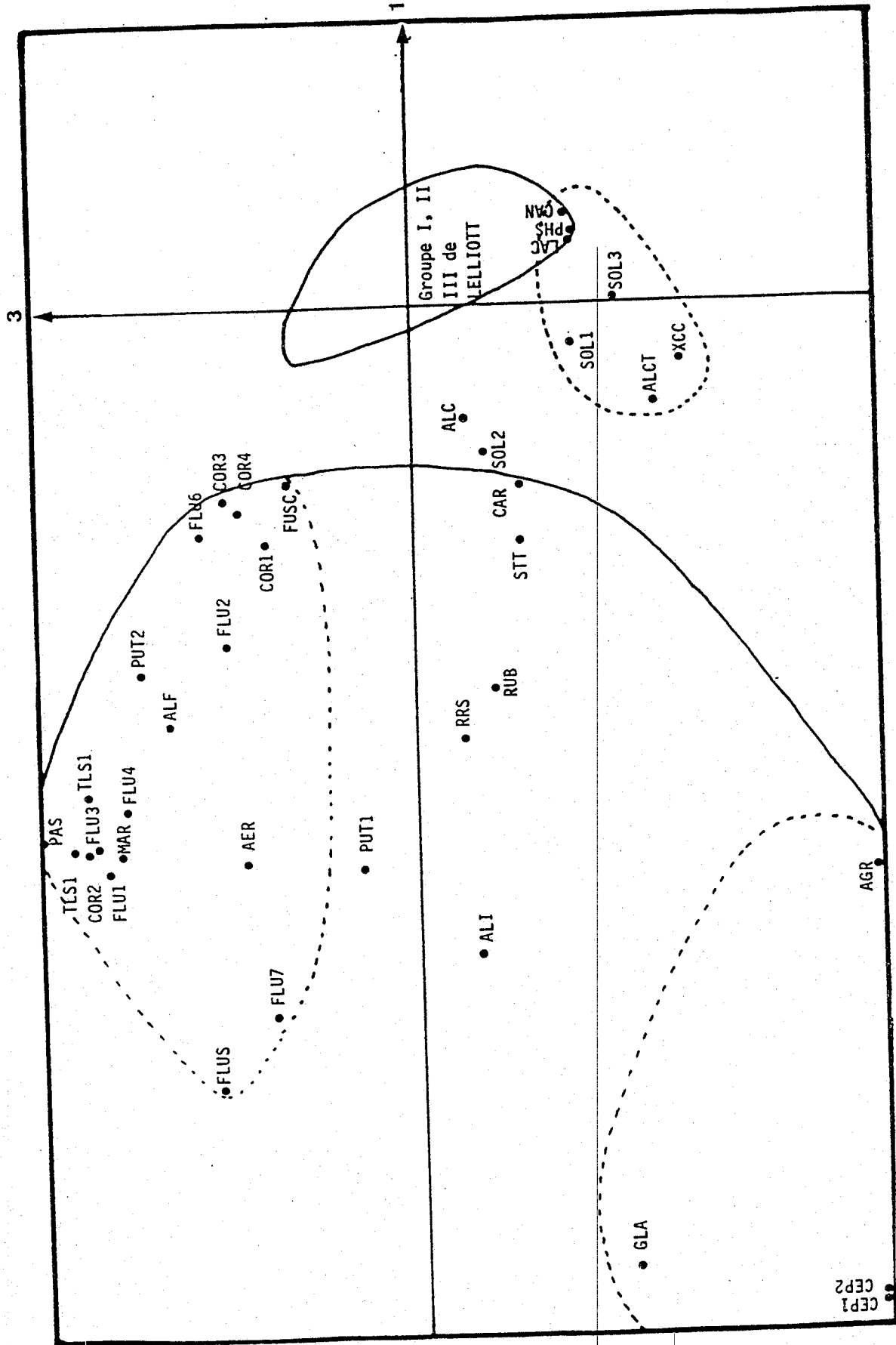


Figure 29 - AFCM pour l'ensemble des souches (plan 1 X 3).



CEP1  
CEP2

Figure 30 - AFCM pour l'ensemble des souches (plan 2 x 3).

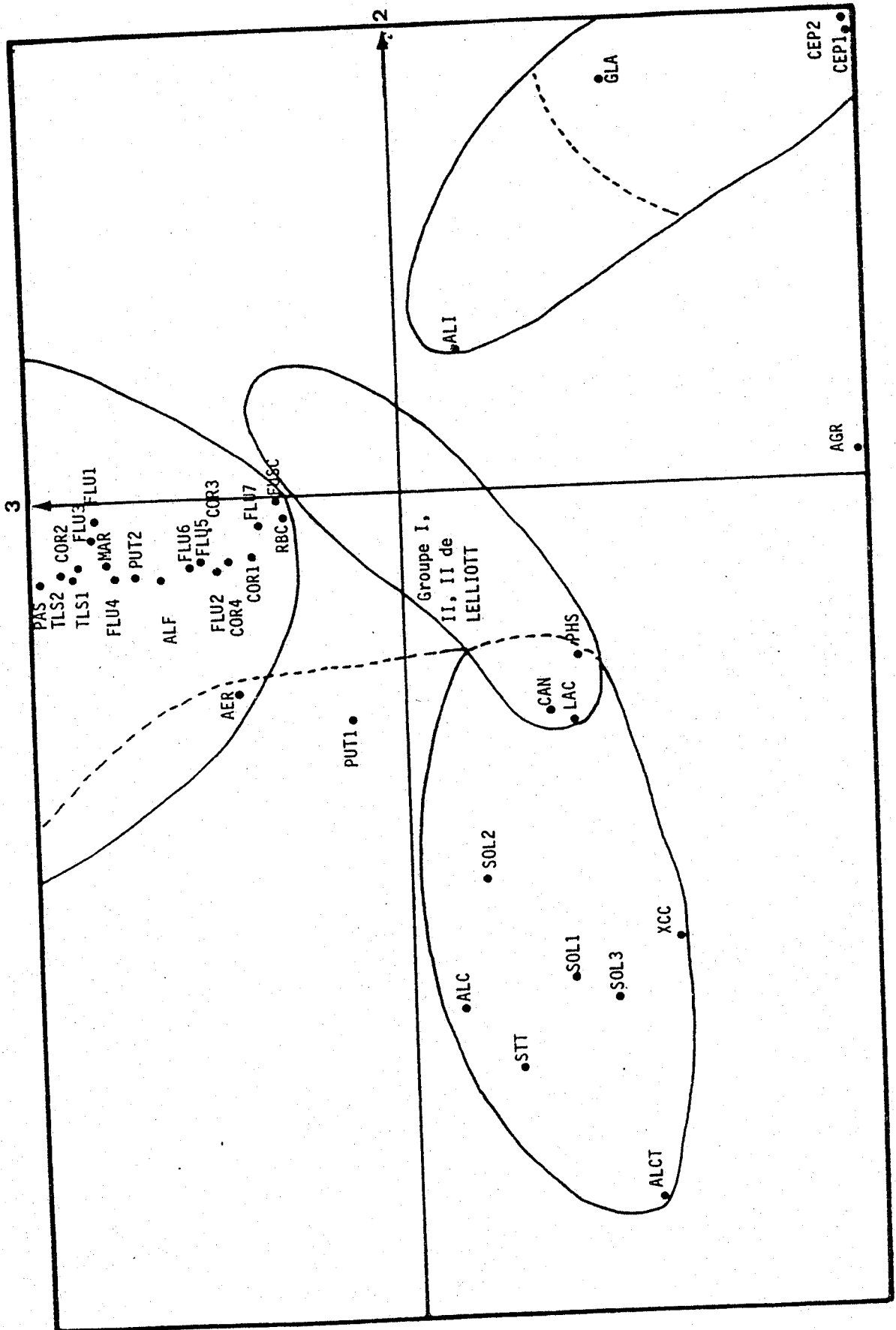
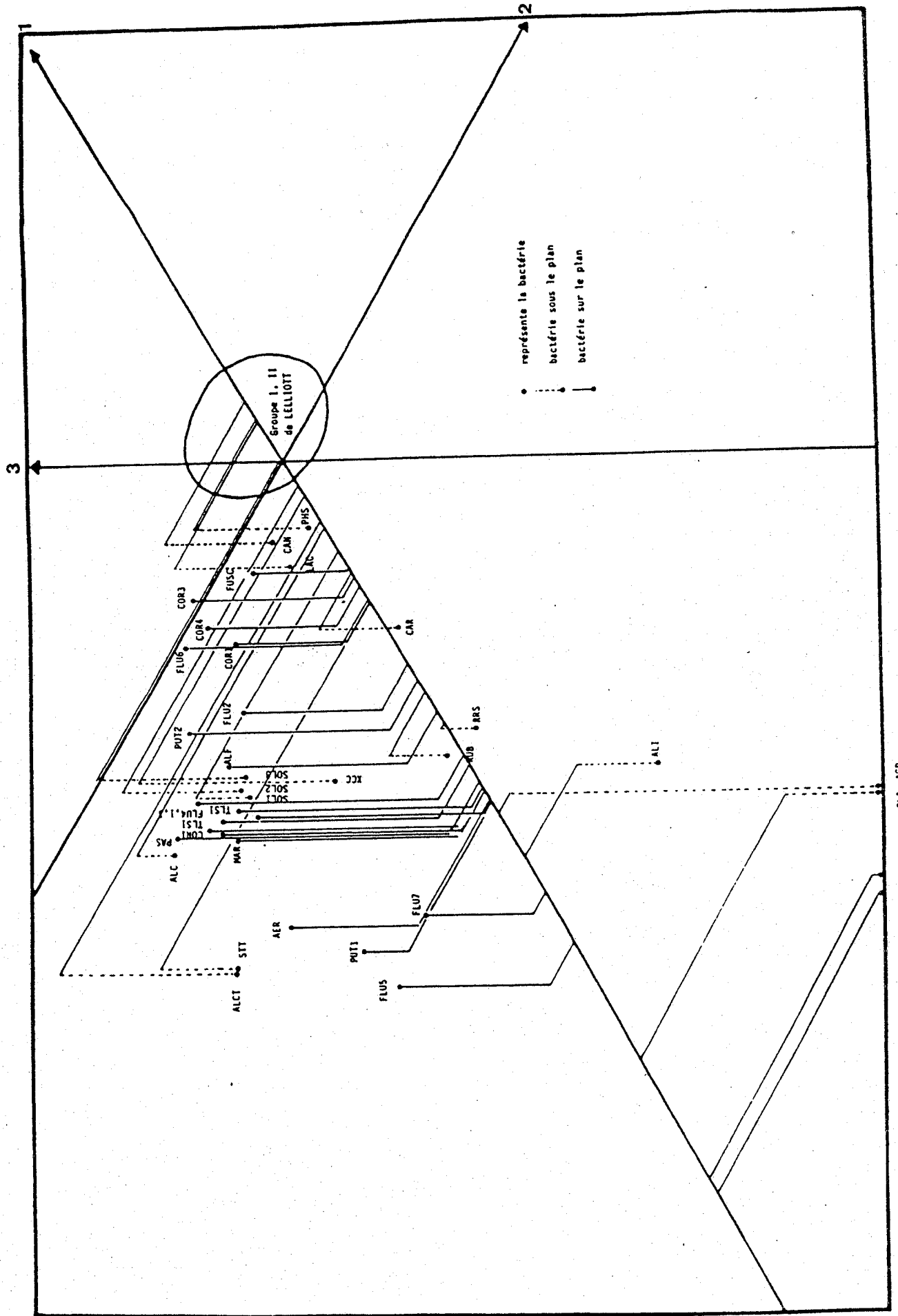


Figure 31 - AFCM pour l'ensemble des souches (axes 1, 2, 3).





La sélection des caractères qui ont de fortes contributions sur les trois premiers axes factoriels (Tableau XXIX) permet de différencier les groupes I, II et III de Lelliott (qui ont des caractères négatifs sauf le tabac et le D-mannose qui sont positifs) des autres bactéries qui ont des réponses variables. Les caractères les plus importants sont l'oxydase, le nitrate, le propionate, le 2 céto-gluconate, le tabac, la N-acétyl-glucosamine, la bêta-alanine, l'éthanolamine, le N-valérate, le tréhalose et la L-tyrosine.

P. cichorii appartenant au groupe III de Lelliott est la seule espèce oxydase positive.

Certaines souches de groupe I et II sont exceptionnellement positives vis à vis de certains caractères comme le tréhalose (P. syringae pv. psii), et la valine (P. syringae pv. anthirini). Les substances qui sont utilisées ou non par 5 souches maximum (Tableau XXX) pourraient être intéressantes pour caractériser certaines espèces. Par exemple, P. pseudoalcaligenes et P. alcaligenes seulement n'ont pas utilisé le glucose. P. alcaligenes était le seul D-fructose négatif. Seulement P. syringae pv. savastanoi, pv. lachrymans et P. pseudoalcaligenes étaient pyruvate négatif, pv. lachrymans, pv. phaseolicola, P. pseudoalcaligenes et A. tumefaciens n'ont pas utilisé le citrate. Uniquement P. gladioli pv. gladioli a utilisé les phtalate, isophtalate et tere-phtalate.

La classification ascendante n'a pas été faite pour cette analyse.

### 3.2.2.1.3 Taxonomie numérique

Si on effectue une coupure au niveau 0,282, on obtient alors 13 classes et 28 phénotypes isolés (Figure 32).

Les classes peuvent être différenciées par 29 caractères biochimiques (Tableau XXXI).

Les souches de P. syringae pv. savastanoi sont réparties en deux classes :

la classe 2 majoritaire, elle renferme 133 souches de P. syringae pv. savastanoi provenant d'hôtes différents (52 isolées de l'olivier, 39 de frêne, 29 de laurier rose, 3 de jasmin, 4 de Phillyrea et 1 de troëne,

la classe 1 qui regroupe 8 souches de P. syringae pv. savastanoi.

La classe 11 est constituée de 25 souches appartenant à différents pathovars de P. syringae, la souche de P. viridiflava et la souche de P. cichorii.

Les autres pathovars de P. syringae sont répartis dans les classes 10, 7, 5 et 3.

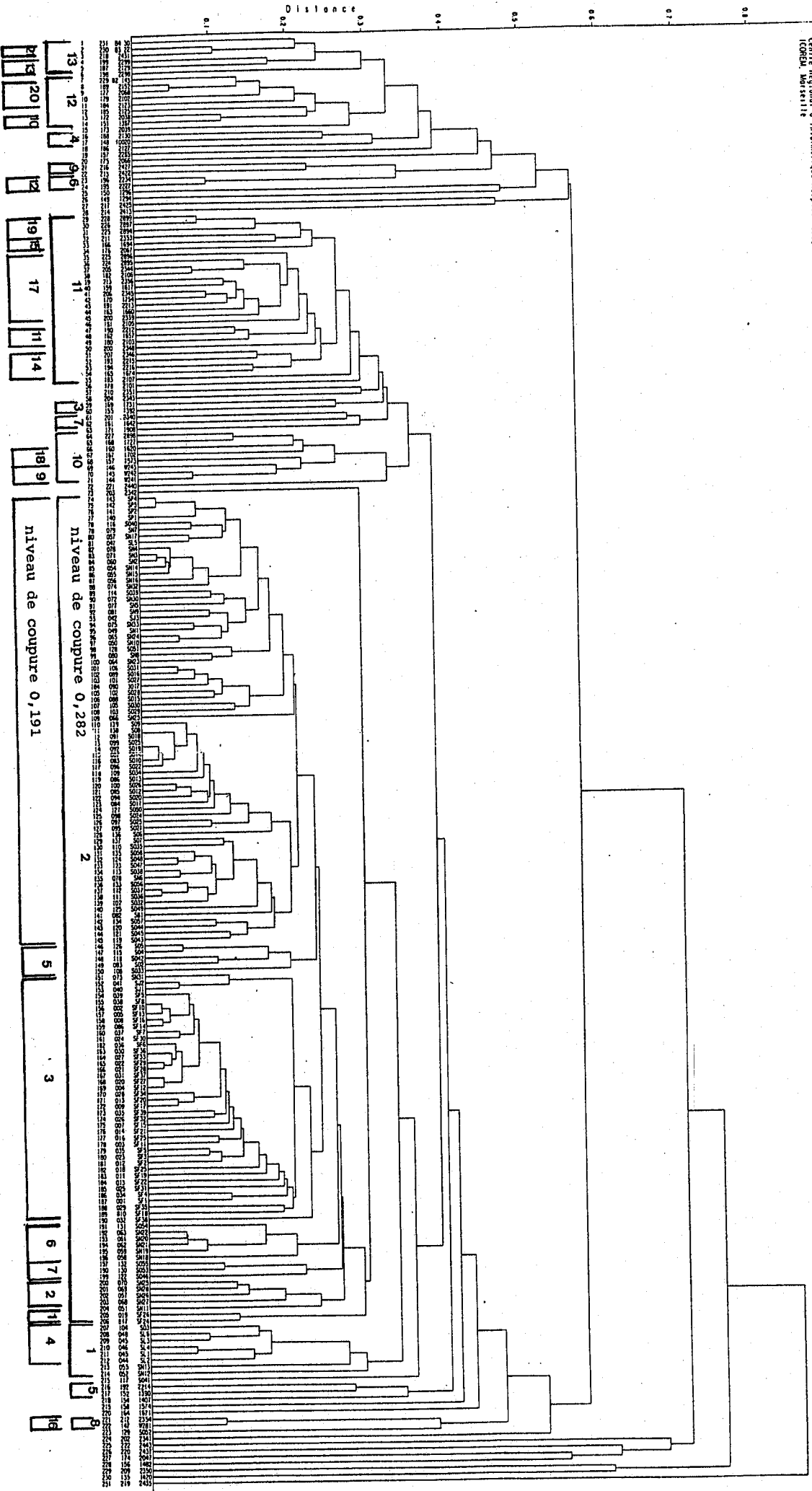
La classe 4 est constituée de 2 souches de Pseudomonas fluorescents (P. fluorescens et P. aeruginosa).

| C.C.D. Caractère            | Classe 1 (8 souches) | Classe 2 (133 souches) | Classe 3 (2 souches) | Classe 4 (2 souches) | Classe 5 (2 souches) | Classe 6 (2 souches) | Classe 7 (2 souches) | Classe 8 (2 souches) | Classe 9 (2 souches) | Classe 10 (8 souches) | Classe 11 (27 souches) | Classe 12 (8 souches) | Classe 13 (5 souches) |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,634 Malonate              | -                    | -                      | -                    | +                    | +                    | +                    | -                    | -                    | +                    | +                     | +                      | +                     | +                     |
| 0,590 Méso-Tartrate         | -                    | -                      | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | +                    | +/-                   | +                      | +                     | -                     |
| 0,580 Tween                 | -                    | -                      | -                    | +                    | +/-                  | +                    | +/-                  | +/-                  | +                    | +                     | +                      | -                     | -                     |
| 0,572 D-arabitol            | +                    | +                      | +                    | +                    | +/-                  | +                    | +                    | +                    | +                    | +                     | +                      | +                     | +                     |
| 0,556 Levane                | -                    | -                      | +/-                  | -                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                     | +                      | +/-                   | -                     |
| 0,537 L(+)tartrate          | +                    | +                      | -                    | -                    | +                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | -                     | -                     |
| 0,523 DNase                 | +                    | +                      | -                    | +                    | -                    | -                    | -                    | -                    | +                    | +/-                   | -                      | +                     | +                     |
| 0,520 DL-3 hydroxy butyrate | -                    | -                      | +/-                  | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | +                      | +                     | +                     |
| 0,502 DL-lactate            | -                    | -                      | +                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | +                     |
| 0,473 Sarcosine             | -                    | -                      | +/-                  | +/-                  | -                    | +                    | +                    | -                    | +                    | -                     | +                      | +                     | +                     |
| 0,466 Lactate               | -                    | -                      | +                    | +/-                  | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | +                     |
| 0,462 Erythrytol            | -                    | -                      | +                    | -                    | -                    | -                    | +/-                  | -                    | -                    | -                     | +                      | -                     | -                     |
| 0,439 Béta-alanine          | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | +                     |
| 0,438 Esculine              | -                    | -                      | +                    | -                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | +                      | -                     | -                     |
| 0,427 Oxydase               | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                      | +                     | +                     |
| 0,417 N.acétyl-glucosamine  | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | -                     |
| 0,412 Diamino-butyrate      | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                      | +                     | +                     |
| 0,392 Tabac                 | +                    | +                      | +                    | -                    | +                    | -                    | +                    | +                    | +                    | +                     | +                      | -                     | -                     |
| 0,384 Thréaloze             | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | -                     | -                     |
| 0,380 2 céto-gluconate      | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | -                     |
| 0,375 N-valérate            | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | +                     |
| 0,373 Propionate            | -                    | -                      | -                    | +                    | +/-                  | +/-                  | -                    | -                    | +/-                  | -                     | -                      | +                     | +                     |
| 0,306 D-lyxose              | -                    | -                      | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | -                     |
| 0,357 Spermine              | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                      | +                     | -                     |
| 0,357 L-tryptophane         | -                    | -                      | -                    | +/-                  | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | -                     |
| 0,357 Arginine              | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                      | +                     | -                     |
| 0,348 L-ornithine           | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | +                    | -                    | -                    | +                    | -                     | -                      | +                     | -                     |
| 0,347 Mésaconate            | -                    | -                      | -                    | +                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                      | +                     | -                     |
| 0,341 Ribose                | -                    | -                      | +                    | +                    | +                    | +                    | +                    | +                    | +                    | +                     | +                      | +                     | +                     |

Tableau XXXI- Profil biochimique des 13 classes définies par la taxonomie numérique des souches de P. syringae pv. savastanoi



Figure 32 - Dendrogramme des distances des souches de *P. syringae* pv *savastanoi* en comparaison avec les 78 souches types.



Les autres souches de Pseudomonas fluorescents se trouvent dispersées avec les Pseudomonas non fluorescents dans la classe 13 qui est constituée de 3 souches de P. corrugata, et de 2 souches de P. fluorescens, et la classe 12 qui renferme 3 souches de P. fluorescens, 2 souches de P. tolaasii, 2 souches de P. marginalis et une souche de P. corrugata.

Lorsque le niveau de coupure est plus bas (0,191), on obtient 21 classes et 56 phénotypes isolés (Figure 32). Ces différentes classes se distinguent en fonction de l'assimilation des caractères dont les coefficients de capacité de diagnostic sont élevés (Tableau XXXII).

La classe 2 majoritaire obtenue par la coupure précédente est subdivisée en 7 classes : 1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8.

La classe 8 renferme 50 % des souches de P. syringae pv. savastanoi testées. Elle regroupe 72 souches dont 47 isolées de l'olivier, 1 de jasmin, 19 de laurier rose, 1 de trène et 4 de Phillyrea.

La classe 3 est composée de la majorité des souches de frêne (36 sur 39), 2 souches de jasmin et 1 souche de laurier rose. Les 2 souches de frêne FX2 et L 48.3 sont éloignées des autres et forment la classe 1, la souche de frêne (CFBP 1663) est un phénotype isolé.

Les classes 5 et 7 sont uniquement constituées des souches de l'olivier. Une souche de l'olivier (T.38.1), parmi les 58 testées est un phénotype isolé.

Les classe 2 et 6 sont constituées respectivement de 4 et 5 souches de laurier rose. La classe 6 regroupe également 1 souche de l'olivier.

La classe 4 regroupe la majorité des souches isolées de trène (5 sur 6), et une souche isolée d'olivier.

Les différents patovars de P. syringae sont réparties dans les classes 10, 11, 14, 15, 17 et 18.

P. cichorii et P. viridiflava qui se situaient dans la même classe que certains pathovars de P. syringae au niveau de la coupure précédente, se sont écartés en deux phénotypes isolés.

Les pseudomonas fuorescents sont répartis dans les classes, 13 qui est constituée de 2 souches de P. fluorescens et de la classe 20 qui renferme 4 souches de Pseudomonas fluorescents ; P. corrugata (1 souche), P. tolaasii (2 souches) et P. fluorescens (1 souche).

Les pseudomonas non fluorescents se trouvent dans la classe 12 constituée de 2 souches de P. cepacia et la classe 21 constituée de 2 souches de P. corrugata.

Les autres espèces de Pseudomonas fluorescents et non fluorescents sont des phénotypes isolés.

| C.C.D. | Caractère                  | Classe 1 (2 souches) | Classe 2 (4 souches) | Classe 3 (39 souches) | Classe 4 (6 souches) | Classe 5 (5 souches) | Classe 6 (6 souches) | Classe 7 (3 souches) | Classe 8 (72 souches) | Classe 9 (3 souches) | Classe 10 (2 souches) | Classe 11 (3 souches) | Classe 12 (2 souches) | Classe 13 (2 souches) |
|--------|----------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,743  | Méso-Tartrate              | +                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | -                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,688  | DL-hydroxybutyrate         | -                    | -                    | +/-                   | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | +                     | -                     | +                     |
| 0,682  | Erythrytol                 | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | -                     | -                     |
| 0,665  | Levane                     | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | +                    | +                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,627  | Malonate                   | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | +                    | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,626  | Tween                      | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | +                    | +                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,593  | DNase                      | +                    | +                    | +                     | +                    | +                    | +                    | +                    | +                     | +                    | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,588  | Esculine                   | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | +                    | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,585  | L(+) tartrate              | +/-                  | +                    | +                     | +                    | +                    | +                    | +                    | +                     | -                    | -                     | -                     | +                     | -                     |
| 0,574  | L(-) tartrate              | -                    | +                    | +/-                   | +/-                  | -                    | -                    | -                    | +                     | -                    | -                     | -                     | +                     | -                     |
| 0,573  | DL-lactate                 | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,561  | N-caproate                 | -                    | +                    | +                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,542  | Lactate                    | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,505  | Glucosamine                | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +/-                   |
| 0,488  | Betaine                    | +                    | -                    | +                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,480  | L-phénylalanine            | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,477  | Diaminobutyrate            | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,476  | Béta-alanine               | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,475  | Polypectate de sodium pH 5 | +                    | +                    | +                     | -                    | -                    | +                    | -                    | -                     | -                    | -                     | -                     | +                     | -                     |
| 0,456  | Tabac                      | +                    | +                    | +                     | +                    | +                    | +                    | +                    | +                     | +                    | -                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,451  | Tréhalose                  | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,439  | Oxydase                    | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | +                     | -                     | +                     |
| 0,433  | D-Tartrate                 | -                    | +/-                  | -                     | +                    | +                    | -                    | -                    | -                     | +                    | +                     | +                     | -                     | +                     |
| 0,428  | L-valine                   | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,422  | Acétate                    | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +/-                   |
| 0,420  | N-valérate                 | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +/-                   |
| 0,417  | L-tyrosine                 | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +/-                   | +                     |
| 0,409  | 2 céto-gluconate           | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,406  | D-xylose                   | -                    | -                    | +                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | +                    | +                     | -                     | +                     | +/-                   |
| 0,388  | Spermine                   | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | -                     | +                     |
| 0,386  | Propionate                 | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +/-                   | +/-                   |
| 0,381  | Glutarate                  | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | +                     | +                     | -                     |
| 0,373  | L-ornithine                | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | -                     |
| 0,361  | L-tryptophane              | -                    | -                    | -                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | -                    | +                     | -                     | +                     | -                     |
| 0,359  | Caprate                    | -                    | +                    | +                     | -                    | -                    | +                    | +                    | +                     | +                    | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,435  | Ribose                     | +                    | -                    | +                     | -                    | -                    | -                    | -                    | -                     | +                    | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,348  | Inositol                   | +/-                  | +                    | +                     | +                    | -                    | -                    | +                    | +                     | -                    | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,343  | L-leucine                  | -                    | +/-                  | +                     | -                    | +                    | +                    | +                    | +                     | -                    | +/-                   | +                     | +                     | -                     |
| 0,331  | D-malate                   | +                    | +/-                  | +                     | -                    | +                    | -                    | +                    | +                     | +                    | +                     | +                     | +                     | -                     |

Tableau XXXII- profil biochimique des 21 classes définies par la taxonomie numérique des souches de P. syringae pv. savastanoi

| C.C.D. | Caractère                     | Classe 14 (4 souches) | Classe 15 (2 souches) | Classe 16 (2 souches) | Classe 17 (11 souches) | Classe 18 (3 souches) | Classe 19 (3 souches) | Classe 20 (4 souches) | Classe 21 (2 souches) |
|--------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,743  | Mésotarate                    | +                     | +                     | -                     | +                      | +                     | +                     | +                     | -                     |
| 0,688  | DL-hydroxy-<br>butyrate       | -                     | +/-                   | -                     | +                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,682  | Erythritol                    | +                     | -                     | -                     | +                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,665  | Levane                        | +                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,627  | Malonate                      | +/-                   | +                     | -                     | +                      | -                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,626  | Tween                         | +                     | +                     | +/-                   | +                      | -                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,593  | DNase                         | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,588  | Esculine                      | +                     | -                     | -                     | +                      | -                     | -                     | -                     | -                     |
| 0,585  | L(+)tartrate                  | -                     | +/-                   | -                     | +                      | -                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,574  | L(-)tartrate                  | -                     | +/-                   | -                     | -                      | -                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,573  | DL-lactate                    | -                     | -                     | -                     | +                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,561  | N-caproate                    | -                     | +/-                   | -                     | +                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,542  | Lactate                       | -                     | -                     | -                     | +                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,505  | Glucosamine                   | -                     | +                     | -                     | +                      | -                     | -                     | +                     | +/-                   |
| 0,488  | Bétaine                       | +                     | +                     | -                     | +                      | -                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,480  | L-phényl-<br>alanine          | -                     | +                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,477  | Diamino-<br>butyrate          | -                     | +/-                   | -                     | +                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,476  | Béta-alanine                  | -                     | +                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,475  | Polypectate<br>de sodium pH 5 | +/-                   | +/-                   | +                     | -                      | -                     | -                     | -                     | -                     |
| 0,456  | Tabac                         | +                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                     | -                     | -                     |
| 0,451  | Tréhalose                     | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,439  | Oxydase                       | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,433  | D-tartrate                    | +                     | +                     | -                     | +                      | +                     | -                     | -                     | -                     |
| 0,428  | L-valine                      | +/-                   | -                     | -                     | -                      | -                     | +                     | +                     | -                     |
| 0,422  | Acétate                       | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,420  | N-valérate                    | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,417  | L-tyrosine                    | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,409  | 2 céto-<br>gluconate          | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | -                     |
| 0,406  | D-xylose                      | +                     | +                     | -                     | +                      | -                     | +                     | +/-                   | +                     |
| 0,388  | Spermine                      | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +/-                   |
| 0,386  | Propionate                    | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,381  | Glutarate                     | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +                     |
| 0,373  | L-ornithine                   | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | +/-                   |
| 0,361  | L-tryptophane                 | -                     | -                     | -                     | -                      | -                     | -                     | +                     | -                     |
| 0,359  | Caproate                      | +                     | +                     | -                     | +                      | -                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,435  | Ribose                        | +                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,348  | Inositol                      | +                     | +                     | -                     | +                      | +                     | +                     | +                     | +                     |
| 0,343  | L-leucine                     | +                     | +                     | -                     | +                      | -                     | +                     | +                     | -                     |
| 0,331  | D-malate                      | +                     | +                     | +                     | +                      | +                     | +                     | +                     | -                     |

Tableau XXXII (suite).

### 3.2.2.2 Deuxième analyse : analyse séparée des groupes I et II de Lelliott.

#### 3.2.2.2.1 Analyse factorielle des correspondances multiples

Cette analyse a été faite uniquement avec les pathovars de P. syringae et une souche de P. viridiflava.

La projection des individus sur le plan I x 2 (Figure 33) montre que les souches de P. syringae pv. savastanoi sont séparées du reste des autres bactéries dont la majorité ont une forte contribution supérieure ou égale à 0,4 sur l'axe 1 (Tableau XXXIII). Certains pathovars de P. syringae (pv. viburni, pv. eribotryae, pv. atrofaciens, pv. porri, pv. berberidis, pv. mori, pv. persicae) ont des contributions inférieures à 0,4. P. syringae pv. theae, pv. glycinea et pv. cicaronei sont les bactéries les plus proches de P. syringae pv. syringae, pv. phaseolicola et pv. cannabina qui ne sont pas séparées par l'axe 1 le sont avec P. syringae pv. lachrymans sur l'axe 2. Ce sont les bactéries qui utilisent le moins de substances.

Les souches de P. syringae pv. savastanoi sont dispersées sur l'axe 2 ce qui montre par l'examen des contributions supérieures ou égales à 0,4 (Tableau XXXIII) : 25 souches isolées de frêne sont présentées sur le côté positif de l'axe et sont opposées à d'autres souches : 3 souches de l'olivier (SO 52, SO 3, SO 41), 3 de laurier rose (SN 12, SN 18) et 4 de troène (SL 4, SL 1, SL 2, SL 3).

Cet axe (2) n'a pas permis de faire des groupes entre le reste de pathovars sauf P. syringae pv. phaseolicola, pv. cannabina et pv. lachrymans qui se distinguent des autres. On peut trouver certaines bactéries qui s'opposent les unes aux autres par exemple : P. syringae pv. tagetis, pv. mellea et P. dysoxylis sont opposées de P. syringae pv. syringae, pv. eribotryae, pv. sesami, pv. striafaciens, pv. viburni.

Sur le plan I x 3 (Figure 34), les souches de P. syringae pv. savastanoi se distinguent du reste des pathovars de P. syringae par l'axe 1 et se séparent entre elles sur l'axe 3 (Tableau XXXIII) : 32 souches isolées de frêne, une souche de jasmin, P. syringae pv. phaseolicola et P. syringae pv. cannabina sont disposés du côté positif de l'axe et donc opposés à 30 souches isolées de l'olivier et 3 de troène.

P. viridiflava et P. syringae pv. ribicola ont été séparées par l'axe 3 du reste des pathovars de P. syringae ; on remarque aussi que les pathovars de P. syringae pv. morsporunum, pv. lachrymans, pv. maculicola, pv. sesami, pv. glycinea, pv. mori, pv. ulmi, pv. coronafaciens et pv. maculicola sont opposés à d'autres pathovars : pv. lapsa et pv. ribicola.

L'axe 1 pourrait être défini par l'esculine et méso-Tartrate. L'axe 2 est caractérisé par le caprylate et l'heptanoate. L'axe 3 est assimilé à L-sérine.

Le plan 2 X 3 n'apparaît pas intéressant car on trouve que les souches de P. syringae pv. savastanoi sont mélangées avec

Figure 33 - AFCM des groupes I et II de Lelliott (plan 1 X 2).

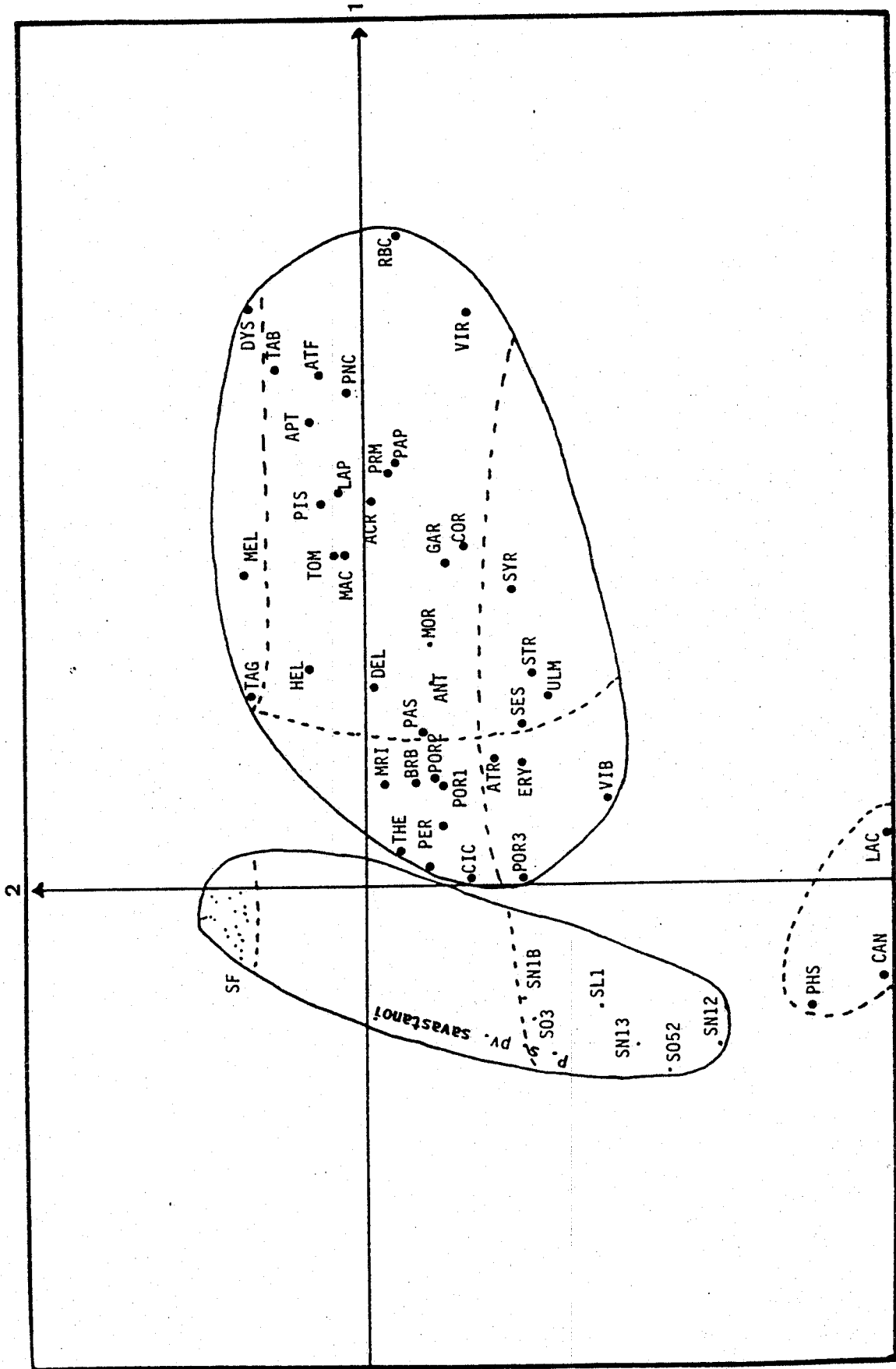








Tableau XXXIII - Souches qui ont de fortes contributions sur les axes factorielles (Groupes I et II de Lelliott).

| ESPECES                     | Code                    | Axe 1 |          |                  | Axe 2 |          |                  | Axe 3 |          |                  |      |
|-----------------------------|-------------------------|-------|----------|------------------|-------|----------|------------------|-------|----------|------------------|------|
|                             |                         | CORD  | CONT ABS | COS <sup>2</sup> | CORD  | CONT ABS | COS <sup>2</sup> | CORD  | CONT ABS | COS <sup>2</sup> |      |
| <i>p.s.pv. morspurnorum</i> | MOR                     | 0,50  | 1,14     | 0,04             |       |          |                  | 0,66  | 4,69     | 0,08             |      |
|                             | SF 18                   |       |          |                  |       |          |                  | 0,55  | 3,19     | 0,1              |      |
|                             | S028                    |       |          |                  |       |          |                  | -0,51 | 2,83     | 0,29             |      |
|                             | S041                    |       |          |                  | -0,34 | 0,85     | 0,07             | -0,50 | 2,68     | 0,14             |      |
|                             | SF 35                   |       |          |                  |       |          |                  | 0,49  | 2,61     | 0,24             |      |
|                             | S030                    |       |          |                  |       |          |                  | -0,47 | 2,39     | 0,24             |      |
|                             | S015                    |       |          |                  |       |          |                  | -0,46 | 2,22     | 0,23             |      |
|                             | <i>p.s.pv. sesami</i> → | SES   | 0,32     | 0,47             | 0,04  | -0,35    | 0,93             | 0,05  | 0,40     | 1,71             | 0,06 |
|                             |                         | S017  |          |                  |       | 0,34     | 0,87             | 0,14  | 0,33     | 1,52             | 0,18 |
|                             |                         | SF 23 |          |                  |       | 0,31     | 0,72             | 0,11  | 0,37     | 1,48             | 0,15 |
| S029                        |                         |       |          |                  |       |          |                  | -0,36 | 1,41     | 0,13             |      |
| SF 34                       |                         |       |          |                  |       |          |                  | 0,35  | 1,34     | 0,25             |      |
| S021                        |                         |       |          |                  |       |          |                  | -0,34 | 1,24     | 0,25             |      |
| SF 32                       |                         |       |          |                  |       |          |                  | 0,34  | 1,20     | 0,29             |      |
| SF 20                       |                         |       |          |                  | 0,25  | 0,48     | 0,16             | 0,33  | 1,19     | 0,28             |      |
| SF 21                       |                         |       |          |                  | 0,26  | 0,49     | 0,08             | 0,33  | 1,19     | 0,14             |      |
| S031                        |                         |       |          |                  |       |          |                  | -0,33 | 1,15     | 0,27             |      |
| SF 28                       |                         |       |          | 0,25             | 0,45  | 0,19     | 0,32             | 1,11  | 0,33     |                  |      |
| SF 12                       |                         |       |          | 0,26             | 0,50  | 0,18     | 0,32             | 1,09  | 0,28     |                  |      |
| S017                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,31            | 1,05  | 0,21     |                  |      |
| S018                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,31            | 1,04  | 0,25     |                  |      |
| SF 25                       |                         |       |          | 0,23             | 0,40  | 0,08     | 0,31             | 1,03  | 0,15     |                  |      |
| GLY                         |                         |       |          |                  |       |          | 0,31             | 1,03  | 0,11     |                  |      |
| SF 2                        |                         |       |          | 0,31             | 0,74  | 0,07     | 0,30             | 0,98  | 0,07     |                  |      |
| SF 31                       |                         |       |          |                  |       |          | 0,29             | 0,88  | 0,12     |                  |      |
| S050                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,29            | 0,88  | 0,21     |                  |      |
| SF 29                       |                         |       |          | 0,28             | 0,60  | 0,26     | 0,29             | 0,87  | 0,27     |                  |      |
| S08                         |                         |       |          |                  |       |          | -0,28            | 0,84  | 0,20     |                  |      |
| S044                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,28            | 0,84  | 0,09     |                  |      |
| SF 6                        |                         |       |          | 0,26             | 0,50  | 0,20     | 0,28             | 0,83  | 0,24     |                  |      |
| SF 39                       |                         |       |          |                  |       |          | 0,28             | 0,83  | 0,23     |                  |      |
| SF 7                        |                         |       |          | 0,25             | 0,48  | 0,19     | 0,28             | 0,83  | 0,24     |                  |      |
| S06                         |                         |       |          |                  |       |          | -0,28            | 0,83  | 0,14     |                  |      |
| SF 19                       |                         |       |          |                  |       |          | 0,28             | 0,81  | 0,17     |                  |      |
| SF 16                       |                         |       |          | 0,29             | 0,63  | 0,17     | 0,26             | 0,74  | 0,14     |                  |      |
| S040                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,26            | 0,74  | 0,23     |                  |      |
| SL 3                        |                         |       |          | -0,30            | 0,68  | 0,16     | -0,26            | 0,73  | 0,12     |                  |      |
| S027                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,26            | 0,72  | 0,17     |                  |      |
| S045                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,26            | 0,71  | 0,14     |                  |      |
| SL 6                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,26            | 0,70  | 0,13     |                  |      |
| SF 30                       |                         |       |          | 0,27             | 0,53  | 0,23     | 0,25             | 0,69  | 0,21     |                  |      |
| SF 33                       |                         |       |          | 0,27             | 0,55  | 0,24     | 0,25             | 0,69  | 0,21     |                  |      |
| SF 36                       |                         |       |          | 0,27             | 0,55  | 0,24     | 0,25             | 0,69  | 0,21     |                  |      |
| S016                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,25            | 0,67  | 0,17     |                  |      |
| SF 14                       |                         |       |          | 0,27             | 0,54  | 0,15     | 0,25             | 0,64  | 0,12     |                  |      |
| SF 22                       |                         |       |          |                  |       |          | 0,25             | 0,64  | 0,11     |                  |      |
| SF 27                       |                         |       |          | 0,26             | 0,48  | 0,25     | 0,24             | 0,63  | 0,22     |                  |      |
| SF 37                       |                         |       |          | 0,26             | 0,48  | 0,25     | 0,24             | 0,63  | 0,22     |                  |      |
| SF 3                        |                         |       |          | 0,28             | 0,58  | 0,15     | 0,24             | 0,62  | 0,10     |                  |      |
| S020                        |                         |       |          |                  |       |          | -0,24            | 0,61  | 0,20     |                  |      |
| S024                        |                         |       |          |                  |       |          | -38              | 1,63  | 0,31     |                  |      |

Suite du tableau XXXIII.

|                     |      |  |  |  |  |  |  |       |      |      |
|---------------------|------|--|--|--|--|--|--|-------|------|------|
|                     | S042 |  |  |  |  |  |  | -0,24 | 0,60 | 0,11 |
|                     | S038 |  |  |  |  |  |  | -0,22 | 0,53 | 0,14 |
|                     | S023 |  |  |  |  |  |  | -0,21 | 0,49 | 0,13 |
|                     | SF5  |  |  |  |  |  |  | 0,21  | 0,48 | 0,08 |
|                     | SL5  |  |  |  |  |  |  | -0,21 | 0,48 | 0,16 |
|                     | SJ1  |  |  |  |  |  |  | 0,21  | 0,48 | 0,07 |
|                     | SF15 |  |  |  |  |  |  | 0,21  | 0,45 | 0,07 |
|                     | S026 |  |  |  |  |  |  | -0,20 | 0,44 | 0,16 |
|                     | S011 |  |  |  |  |  |  | -0,20 | 0,42 | 0,12 |
|                     | S013 |  |  |  |  |  |  | -0,20 | 0,41 | 0,13 |
|                     | S010 |  |  |  |  |  |  | -0,20 | 0,41 | 0,13 |
|                     | S014 |  |  |  |  |  |  | -0,20 | 0,41 | 0,13 |
|                     | S019 |  |  |  |  |  |  | -0,20 | 0,41 | 0,13 |
|                     | S025 |  |  |  |  |  |  | -0,20 | 0,41 | 0,13 |
|                     | S048 |  |  |  |  |  |  | -0,19 | 0,40 | 0,13 |
| <i>p.s.pv. mori</i> | MRI  |  |  |  |  |  |  | 0,19  | 0,39 | 0,04 |

- SO : *p.s.pv. savastanoi* isolé d'Olivier  
 SN : *p.s.pv. savastanoi* isolé de Nérיום oleander  
 SF : *p.s.pv. savastanoi* isolé de Frêne  
 SJ : *p.s.pv. savastanoi* isolé de Jasmin  
 SP : *p.s.pv. savastanoi* isolé de Phillyrea  
 SL : *p.s.pv. savastanoi* isolé de Ligustrum

les autres pathovars ; par contre, la présentation des souches dans un espace à trois dimensions (Figure 35) montre bien la position relative de P. syringae pv. savastanoi par rapport au reste des pathovars. Certaines souches de P. syringae pv. savastanoi (SO 52, SN 12, SN 13, SL 4 et SL 1) sont plus au moins écartées du reste des autres souches. P. syringae pv. phaseolicola et P. syringae pv. lachrymans est encore plus éloignée sur cette axe du reste des autres bactéries.

Les autres pathovars de P. syringae sont plus au moins dispersés : P. viridiflava, les pathovars de P. syringae : pv. ribicola, pv. dysoxyl, pv. atrofaciens, pv. tabaci, pv. panici, pv. psii, pv. garcea, pv. tomato, pv. maculicola, pv. coronofaciens, pv. mellea et pv. syringae forment un groupe bien distinct de pv. savastanoi. Le reste des pathovars est condensé dans un groupe plus au moins proche de P. syringae pv. savastanoi. Pour différencier P. syringae pv. savastanoi des autres pathovars nous avons sélectionné les caractères qui ont une forte contribution sur les 3 axes factoriels (Tableau XXXIV) et qui permettent de distinguer P. syringae pv. savastanoi des autres pathovars de P. syringae (Tableau XXXIV). Les caractères sont rangés par ordre décroissant d'importance ; parmi les plus importants, on trouve : esculine, érythrytol, mésotartrate, gélatine, sarcosine, D(-)tartrate et levane pour lesquels P. syringae pv. savastanoi sont négatifs (sauf quelques souches de frêne qui sont levane positifs). Elles ont été positives vis à vis de : L(+)tartrate, aconitate, DNase et mannitol. Le reste des pathovars est positif ou négatif. Certaines substances sont utilisées seulement par très peu de souches (Tableau XXXV), par exemple P. syringae pv. morsprunorum a seulement utilisé l'adonitol, P. syringae pv. phaseolicola utilise le L-sorbose. La L-salicine a été utilisée seulement par P. syringae pv. papulans.

### 3.2.2.2 Classification ascendante hiérarchique

La classification ascendante hiérarchique présentée sous forme de dendrogramme (Figure 36) permet d'avoir différentes classes selon le niveau de la coupure. On estime que la coupure au niveau de 6 classes est la plus intéressante, car elle permet de rassembler environ 90 % des souches de P. syringae pv. savastanoi dans les trois premières classes.

La classe 1 comporte 41 souches de P. syringae pv. savastanoi dont 37 isolées de l'olivier, 3 de troène et 1 de laurier rose.

La classe 2 est constituée de 48 souches de P. syringae pv. savastanoi et 1 souche de P. syringae pv. glycinea. Les souches de P. syringae pv. savastanoi proviennent de différents hôtes : 13 isolées de l'olivier, 29 de laurier rose, 4 de Phillyrea et 2 du jasmin.

La classe 3 comporte 35 souches de P. syringae pv. savastanoi provenant de frêne et 1 souche de P. syringae pv. savastanoi provenant de jasmin.

La classe 4 contient 15 souches des pathovars de P. syringae (pv. anthirini, pv. atropurpureae, pv. berberidis, pv. delphini, pv. eriobotryae, pv. helianthi, pv. mori, pv.

Tableau XXXIV - Substances discriminantes sur les axes factoriels  
(Groupe I et II Lelliott).

| SUBSTANCES             | Code   | Nb de souches | AXES FACTORIELS |          |                  |       |          |                  |       |          |                  |
|------------------------|--------|---------------|-----------------|----------|------------------|-------|----------|------------------|-------|----------|------------------|
|                        |        |               | Axe 1           |          |                  | Axe 2 |          |                  | Axe 3 |          |                  |
|                        |        |               | CORD*           | CONT ABS | COS <sup>2</sup> | CORD  | CONT ABS | COS <sup>2</sup> | CORD  | CONT ABS | COS <sup>2</sup> |
| Esculine               | ESC1   | 25            | 2,17            | 68       | 72               |       |          |                  |       |          |                  |
| Erythrytol (API)       | ERY2   | 25            | 2,04            | 60       | 64               |       |          |                  |       |          |                  |
| Mésotartrate           | MTA2   | 35            | 1,66            | 56       | 64               |       |          |                  |       |          |                  |
| D.L. Lactate           | LAC2   | 11            | 2,95            | 55       | 54               |       |          |                  |       |          |                  |
| D.L.3 Hydroxy butyrate | DLM2   | 21            | 2,13            | 55       | 57               |       |          |                  |       |          |                  |
| D.L. Lactate (API)     | DLL2   | 11            | 2,89            | 53       | 52               |       |          |                  |       |          |                  |
| Sarcosine              | SAR    | 24            | 1,72            | 41       | 43               |       |          |                  |       |          |                  |
| Gélatine               | GEL2   | 10            | 2,45            | 34       | 33               |       |          |                  |       |          |                  |
| D Tatrte (API)         | DTA2   | 11            | 2,26            | 32       | 32               |       |          |                  |       |          |                  |
| Erythrytol             | ERY2   | 13            | 1,94            | 28       | 28               |       |          |                  |       |          |                  |
| L. Phényl-alanine      | LPH2   | 4             | 3,15            | 23       | 21               |       |          |                  |       |          |                  |
| D(-)tartrate           | D-T2   | 55            | 0,85            | 22       | 30               |       |          |                  |       |          |                  |
| L. Cystéine            | LCY2   | 5             | 2,60            | 19       | 18               |       |          |                  |       |          |                  |
| Tween 80               | TWE2   | 12            | 1,53            | 16       | 16               |       |          |                  |       |          |                  |
| Caprylate              | CAY1   | 28            |                 |          |                  | -1,58 | 65       | 44               |       |          |                  |
| Heptanoate             | HEP1   | 31            |                 |          |                  | -1,42 | 57       | 40               |       |          |                  |
| L. Alanine             | LAL1   | 13            |                 |          |                  | -2,08 | 52       | 32               |       |          |                  |
| Pélagonate             | PEL1   | 33            |                 |          |                  | -1,21 | 45       | 31               | -0,60 | 15       | 7                |
| Pyruvate               | PYR1   | 1             |                 |          |                  | -6,80 | 43       | 24               |       |          |                  |
| L. Asparate            | LAS1   | 1             |                 |          |                  | -6,80 | 43       | 24               |       |          |                  |
| Citrate                | CIT1   | 2             |                 |          |                  | -4,80 | 42       | 25               |       |          |                  |
| Aconitate              | ACO1   | 15            |                 |          |                  | -1,66 | 38       | 24               |       |          |                  |
| Caprate                | CEP1   | 45            |                 |          |                  | -0,92 | 35       | 26               | -0,59 | 20       | 11               |
| Mannitol (API)         | MAN1   | 6             |                 |          |                  | -2,04 | 23       | 13               |       |          |                  |
| L. Leucine             | LLE1   | 65            |                 |          |                  | -0,63 | 23       | 21               |       |          |                  |
| Inositol               | INO1   | 23            |                 |          |                  | -1,03 | 22       | 14               |       |          |                  |
| D- α-alanine           | DAL1   | 20            |                 |          |                  | -1,09 | 21       | 14               | -0,83 | 18       | 8                |
| L(+)-tartrate          | L+T1   | 18            | 1,22            | 15       | 15               | -1,11 | 20       | 13               |       |          |                  |
| D-Nase                 | DNS1   | 6             |                 |          |                  | -1,84 | 18       | 11               |       |          |                  |
| L-Arabinose            | LAR1   | 12            |                 |          |                  | -1,24 | 17       | 10               |       |          |                  |
| D-cétogluconate        | K2G1   | 37            |                 |          |                  | -0,71 | 17       | 12               |       |          |                  |
| L-Histidine            | LHI1   | 41            |                 |          |                  | -0,66 | 16       | 12               |       |          |                  |
| Manitole               | MAN1   | 8             |                 |          |                  | -1,42 | 15       | 9                |       |          |                  |
| L-Arabitol             | ARI1   | 15            |                 |          |                  | -0,96 | 12       | 8                |       |          |                  |
| L-urine                | LSE1   | 33            |                 |          |                  |       |          |                  | 1,25  | 68       | 33               |
| Phénelrandt pH 5       | PH51   | 76            |                 |          |                  |       |          |                  | -0,78 | 61       | 42               |
| D-actarose (API)       | SAC1   | 16            |                 |          |                  |       |          |                  | -1,65 | 57       | 25               |
| D-propoate             | NCA2   | 57            |                 |          |                  | 0,63  | 21       | 17               | 0,79  | 47       | 27               |
| D-alfinose             | DRA2   | 20            |                 |          |                  |       |          |                  | 1,22  | 39       | 17               |
| D-étane                | BET1   | 72            |                 |          |                  |       |          |                  | 0,59  | 33       | 22               |
| D-actarose             | SAC1   | 5             |                 |          |                  |       |          |                  | -2,06 | 28       | 11               |
| D-ucine                | LEV2   | 38            | 0,99            | 21       | 25               |       |          |                  | 0,73  | 26       | 13               |
| D-ularate              | GLR2   | 25            | 1,03            | 15       | 16               |       |          |                  | -0,88 | 25       | 12               |
| D-4-aminobutyrate      | BU4 1  | 39            |                 |          |                  |       |          |                  | -0,68 | 24       | 12               |
| D-ignonelline          | TRI2   | 51            | 0,72            | 15       | 19               |       |          |                  | -0,58 | 22       | 12               |
| D-ébrand pH 8,5        | pH 8,5 | 2             | 3,72            | 16       | 15               |       |          |                  | -2,57 | 20       | 8                |
| D-5-amino- valérate    | AV5 2  | 38            | 0,93            | 18       | 12               |       |          |                  | 0,62  | 19       | 9                |
| D-amino-benzoate       | AB2    | 5             |                 |          |                  |       |          |                  | 1,65  | 18       | 7                |

Tableau XXXV - Substances utilisées ou non par 5 souches (Groupes I et II de Lelliott).

| Espèces                      | Numéro de la souche | pH 8,5     |                       |          |             |           |           |          |         |           |        |         |          |         |         |          |          |               |         |          |            |                  |             |             |           |                  |               |             |
|------------------------------|---------------------|------------|-----------------------|----------|-------------|-----------|-----------|----------|---------|-----------|--------|---------|----------|---------|---------|----------|----------|---------------|---------|----------|------------|------------------|-------------|-------------|-----------|------------------|---------------|-------------|
|                              |                     | Saccharose | Polypectate de sodium | Adonitol | D-galactose | D-mannose | L-sorbose | Salicine | Maltose | Trehalose | Amidon | Xylitol | D-lyxose | Oxalate | Maleate | L-malate | Pyruvate | Mesocarbonate | Citrate | L-valine | L-cystéine | L-phényl-alanine | L-aspartate | L-citruline | L-proline | 2-amino-benzoate | Diaminobutane | Glucosamine |
| <i>p.s.pv. antirhini</i>     | 1620                | +          | -                     | -        | -           | -         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | -           |
| <i>p.s.pv. atrofaciens</i>   | 2213                | +          | -                     | -        | -           | -         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. coronafaciens</i> | 2216                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | +        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. lachrymans</i>    | 2440                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. maculicola</i>    | 1657                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | +      | -       | -        | +       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. morspurnorum</i>  | 2211                | +          | -                     | +        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | +      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. panici</i>        | 2345                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. phaseolicola</i>  | 1390                | +          | -                     | -        | +           | +         | +         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. pisi</i>          | 2105                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | +       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. primulae</i>      | 1660                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. sesami</i>        | 1671                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. tabaci</i>        | 2106                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. tomato</i>        | 2212                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | +       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. ulmi</i>          | 1407                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | +       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. aceris</i>        | 2339                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. dysoxyli</i>      | 2356                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. papulans</i>      | 1754                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | +        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. ribicola</i>      | 2348                | +          | +                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. striafaciens</i>  | 1674                | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| <i>p.s.pv. savastanoi</i>    | 49                  | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| Olivier                      | K 23.2              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | +        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | K 124.4             | -          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | L 9.22              | -          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | L 9.32              | -          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | L 9.33              | -          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | T 35.3              | -          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | T 35.9              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | +       | -         | -      | -       | -        | -       | -       | +        | +        | -             | +       | +        | -          | -                | +           | +           | -         | -                | -             | +           |
| T 38.1                       | +                   | -          | -                     | +        | +           | -         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | +             |             |
| T 38.3                       | +                   | -          | -                     | +        | +           | -         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | +             |             |
| Frêne                        | Fe 51               | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | Fe 58               | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | Fe 241              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | Fe 500              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | Fe 502              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | +       | +         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | Fe 505              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | Fe 600              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | L 48.3              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | T 36.8              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
| Laurier rose                 | L 145.2             | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |
|                              | T 36.7              | +          | -                     | -        | +           | +         | -         | -        | -       | -         | -      | -       | -        | -       | +       | +        | -        | +             | +       | -        | -          | +                | +           | -           | -         | -                | -             | +           |

morsporunorum, pv. passiflorae, pv. porri, pv. striafaciens, pv. theae, et pv. viburni) et 3 souches de P. syringae pv. savastanoi dont 2 isolées de frêne et 1 isolée de troène.

Dans la classe 5, on ne trouve que les pathovars de P. syringae qui sont éloignés sur l'axe 1 (Figure 35) et que nous considérons comme un sous-groupe (P. viridiflava, P. syringae pv. aceris, pv. aptata, pv. atrofaciens, pv. coronofaciens, pv. dysoxyli, pv. garcae, pv. lapsa, pv. maculicola, pv. mellea, pv. panici, pv. papulans, pv. pisi, pv. primulae, pv. ribicola, pv. syringae, pv. tabaci, pv. tomato)

La classe 6 contient 13 souches P. syringae pv. savastanoi isolées de différents hôtes et les pathovars de P. syringae qui sont plus au moins proches des souches de P. syringae pv. savastanoi (pv. cannabina, pv. ciccaronei, pv. lachrymans, pv. persicae, pv. phaseolicola, pv. sesami, pv. tagetis et pv. ulmi).

Certaines de ces classes peuvent être subdivisées en sous classes alors que d'autres pourrait être regroupées. Ces différentes classes peuvent être caractérisées comme suit :

| N° de la classe | Caractère                    | % des souches dans la classe qui ont la réponse correspondante | % des souches dans la classe par rapport au nombre total qui ont la réponse correspondante |
|-----------------|------------------------------|--|--|
| 1               | Polypectate de sodium - pH 5 | 93   | 52,6   |
| 2               | Trigonelline-                | 100  | 36,3   |
| 3               | L-serine -                   | 83,3   | 90,9   |
| 4               | L-tartrate -                 | 94,7   | 22,5   |
| 5               | Esculine +                   | 100  | 72   |
| 6               | L-alanine -                  | 38,1   | 61,5   |

### 3.2.2.2.3 Taxonomie numérique

Pour la deuxième analyse la taxonomie numérique a été faite sur un échantillonnage limité de la collection d'étude.

- P. syringae pv. savastanoi : olivier 10  
laurier rose 10  
frêne 10  
Phillyrea 4  
jasmin 3
- les pathovars de P. syringae : 41 souches type
- P. cichorii : 1 souche
- P. viridiflava : 1 souche
- P. corrugata : 1 souche
- P. marginalis pv. pastinacea : 1 souche

La figure 37 montre que les souches de P. syringae pv. savastanoi sont toutes regroupées avec un coefficient de similitude de 0,91. Celles-ci sont regroupées comme suit avec des coefficients différents :

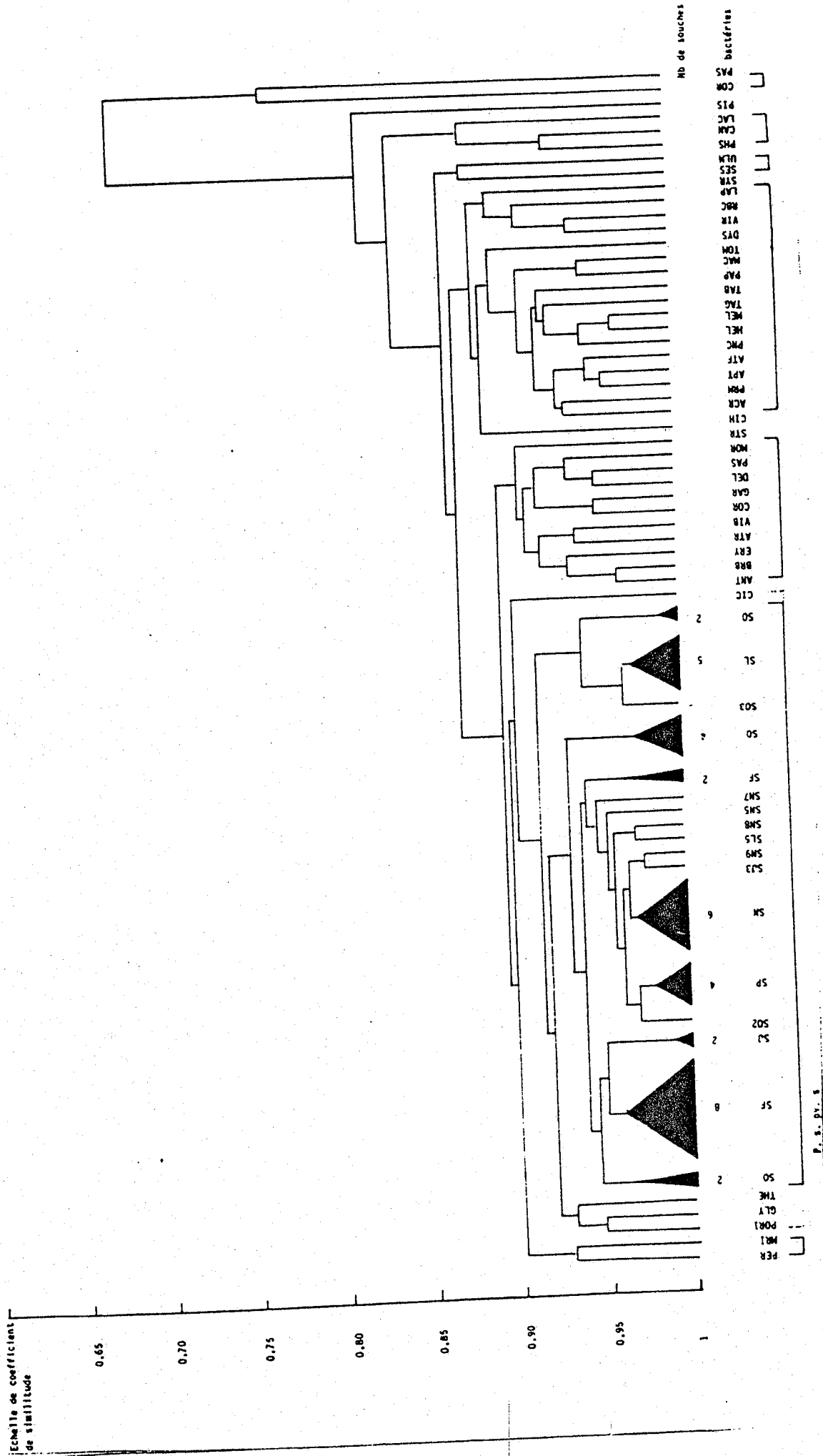
- dans un groupe, on trouve 8 souches sur 10 isolées de frêne (0,96),
- 4 souches de Phillyrea (0,98),
- 2 souches sur 3 isolées de jasmin (0,98),
- 6 souches isolées de laurier rose (0,97),
- Les souches d'olivier ont formé plusieurs petits groupes dont 4 souches sur 10 (0,92).

Les souches appartenant à P. syringae pv. porri, pv. glycinea et pv. mori rejoignent P. syringae pv. savastanoi avec un coefficient de 0,90.

P. syringae pv. anthirini, pv. berbidis, pv. atrofaciens, pv. viburni, pv. coronofaciens, pv. garcae, pv. delphéni, pv. passiflorae, pv. morsporunorum, pv. striafaciens forment un groupe (coefficient de 0,91). Ces pathovars rejoignent le groupe de pv. savastanoi (coefficient de 0,89). Ces souches ont été trouvées dans la classe 4 dans la classification ascendante descendante hiérarchique des I et II de Lelliott. Les deux souches de P. syringae pv. coronofaciens et pv. garcae ont été classées dans la classe 5.

P. syringae pv. aceris, pv. primulae, pv. aptata, pv. atrofaciens, pv. panaci, pv. helianthi, pv. mellea, pv. tagetis, pv. tabaci, pv. papulans, pv. maculicola, pv. tomato, pv. dysoxylis, pv. ribicola, pv. lapsa, pv. syringae et P. viridiflava

Figure 37 - Dendrogramme des distances des groupes I et II de Lelliott.





sont regroupés avec un coefficient de 0,98. Ces souches se trouvent dans la classe 5 définie par la classification ascendante hiérarchique sauf pv. helianthi qui a été classé dans la classe 4 et pv. tagetis dans la classe 6.

On constate que P. cichorii rejoint le groupe de P. syringae pv. syringae.

P. syringae pv. sesami, pv. ulmi sont isolés et se réunissent avec un coefficient de 0,88.

P. syringae pv. phaseolicola, pv. cannabina et pv. lachymans sont groupés ensemble avec un coefficient de 0,88 puis avec pv. sesami et pv. ulmi, elles font parties de la classe 6 déterminée par la classification ascendante hiérarchique.

P. syringae pv. pisi est la bactérie la plus isolée parmi les groupes I, II et III de Lelliott alors qu'elle est classée dans la classe 5 dans la classification ascendante descendante hiérarchique.

### 3.2.2.3 Troisième analyse : analyse séparée pour P. syringae pv. savastanoi

#### 3.2.2.3.1 Analyse factorielle des correspondances multiples

La projection des souches sur le plan 1 X 3 (Figure 38), montre que les souches isolées du frêne sont bien séparées du reste des souches et surtout celles isolées de l'olivier.

on remarque aussi que les souches isolées du laurier rose prennent une place intermédiaire entre les souches du frêne et celles de l'olivier. Les souches de l'olivier sont étalées sur l'axe 3.

Sur le plan 1 X 2 (Figure 39), les souches de P. syringae pv. savastanoi venant de différents hôtes sont mieux distinguées par l'axe 1 alors que l'axe 2 sépare les souches de frêne en deux sous groupes. Le premier groupe se dispose dans la partie négative de l'axe 2. Le deuxième groupe se dispose

La majorité des souches de laurier sont bien séparées de celles isolées de l'olivier.

Le plan 2 X 3 n'est pas très intéressant car les souches isolées de différents hôtes sont très mélangées.

Les caractères dont les contributions sont élevées sur les axes factoriels (Tableau XXXVI) permettent de distinguer les souches isolées de différents hôtes (Tableau XXXVII). On remarque qu'uniquement les souches isolées de frêne ont utilisé le DL-5-amino-valérate à 53,8 %, le levane à 21 %, le raffinose à 23 %, le 2-amino-benzoate à 13 % et la L-tyrosine à 18 %.

Le D-xylose est utilisé par 92 % des souches de frêne, 45 % de celles d'olivier, une souche de laurier rose et une souche de troëne. La L-sérine a été utilisée par toutes les souches sauf celles de frêne qui l'utilisent à 20,5 % ; ces dernières utilisent

Figure 38 - AFCM des souches de P. syringae pv. savastanoi (plan 1 X 3).

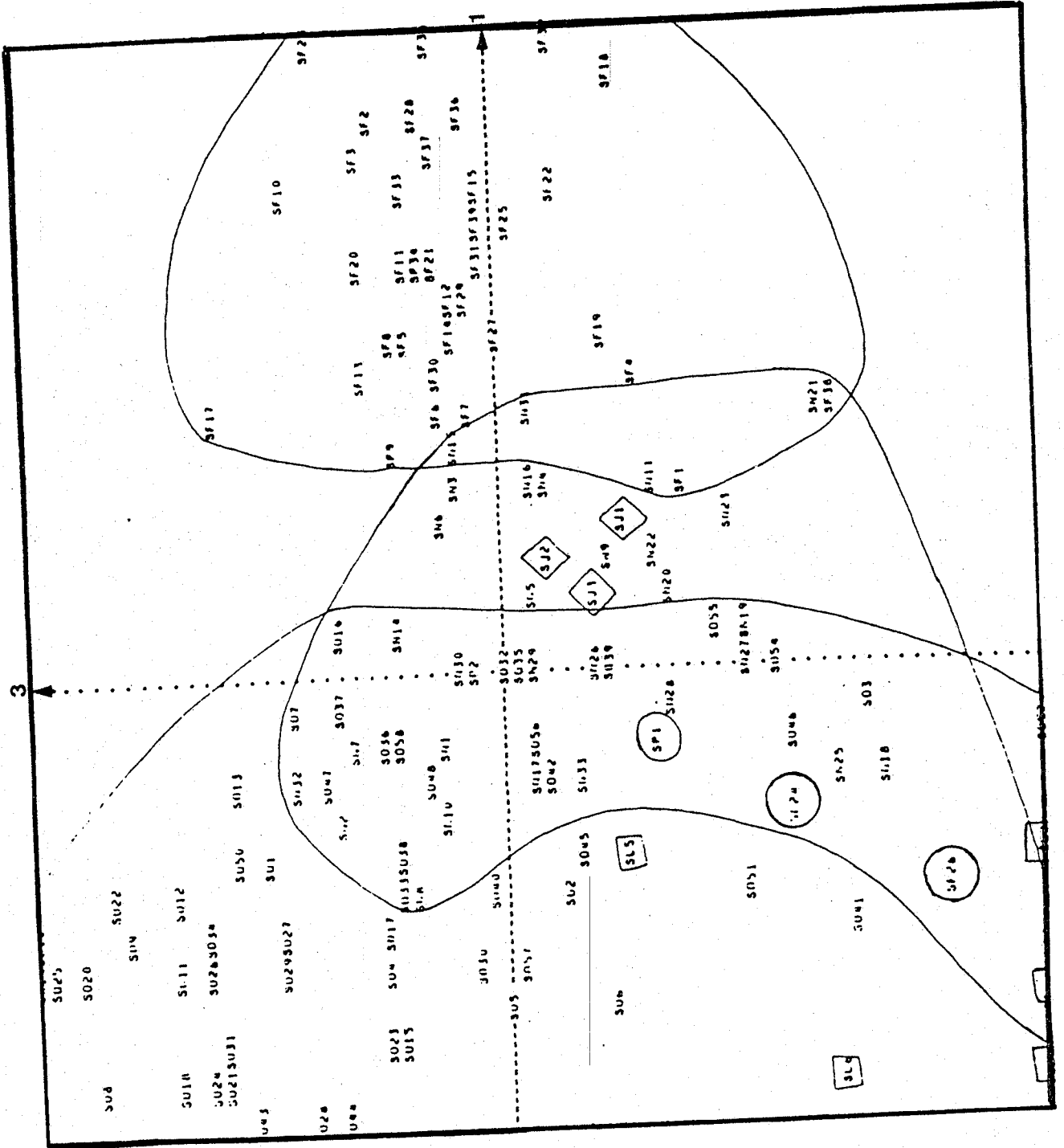


Figure 39 - AFCM des souches de P. syringae pv. savastanoi (plan 1-X 2).

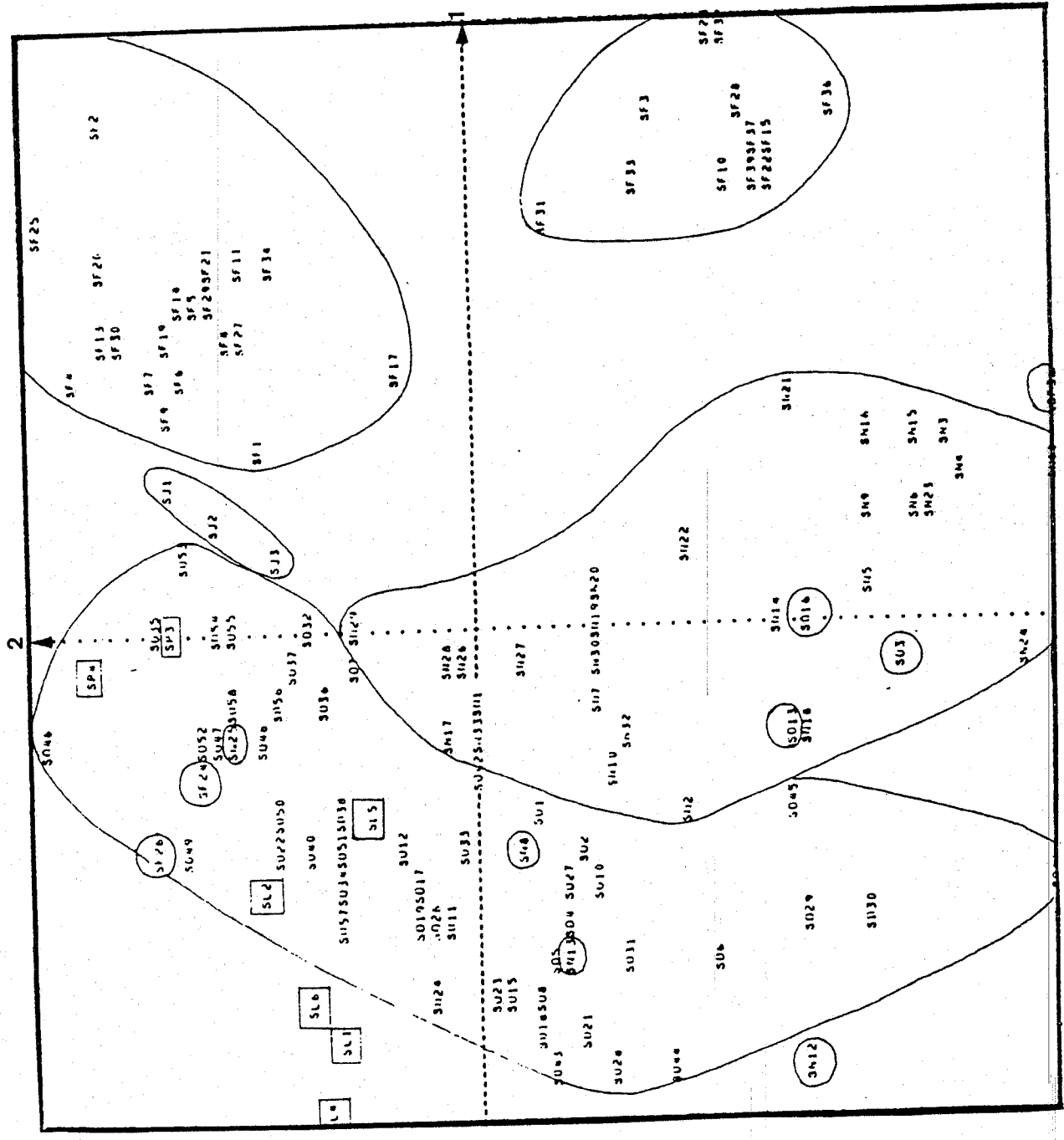


Tableau XXXVI - Substances discriminantes sur les trois axes factoriels (souches de P. syringae pv. savastanoi).

| SUBSTANCES                            | Code | Nb de souches | AXES FACTORIELS |          |                  |       |          |                  |       |          |                  |
|---------------------------------------|------|---------------|-----------------|----------|------------------|-------|----------|------------------|-------|----------|------------------|
|                                       |      |               | 1               |          |                  | 2     |          |                  | 3     |          |                  |
|                                       |      |               | CORD            | CONT ABS | COS <sup>2</sup> | CORD  | CONT ABS | COS <sup>2</sup> | CORD  | CONT ABS | COS <sup>2</sup> |
| L.sérine                              | LSE1 | 31            | 1,39            | 55       | 53               |       |          |                  |       |          |                  |
| N-caproate                            | NCA2 | 3             | 0,98            | 41       | 46               |       |          |                  |       |          |                  |
| Polypectate de sodium Ph5             | PH51 | 56            | -0,84           | 36       | 45               |       |          |                  |       |          |                  |
| D-L-5-Amino-valérate                  | AVS2 | 22            | 1,30            | 34       | 30               |       |          |                  |       |          |                  |
| Novobiocine                           | NOV2 | 54            | -0,78           | 30       | 36               |       |          |                  |       |          |                  |
| L-Leucine                             | LLE1 | 46            | -0,77           | 25       | 28               |       |          |                  |       |          |                  |
| Chloramphénicol                       | CLP1 | 42            | 0,77            | 25       | 28               |       |          |                  |       |          |                  |
| Lévane                                | LEV2 | 8             | 1,72            | 21       | 17               |       |          |                  |       |          |                  |
| Caprate                               | CEP1 | 30            | -0,87           | 21       | 20               |       |          |                  | -0,57 | 12       | 8                |
| Raffinose                             | DRA2 | 9             | 1,48            | 18       | 14               |       |          |                  |       |          |                  |
| Pélagronate                           | PEL1 | 20            | -1,00           | 18       | 16               |       |          |                  | -0,87 | 19       | 12               |
| P-hydroxy-benzoate                    | PHB1 | 36            | -0,62           | 12       | 12               |       |          |                  | -0,53 | 12       | 9                |
| 2-Amino-benzoate                      | AB2  | 5             | 1,62            | 12       | 9                |       |          |                  |       |          |                  |
| Ticarilline                           | TCR1 | 38            | 0,64            | 14       | 14               | -1,29 | 64       | 59               |       |          |                  |
| Spécilline G                          | SPC1 | 30            | 0,74            | 15       | 14               | -1,40 | 60       | 51               |       |          |                  |
| Novobiocine                           | NOV1 | 33            | 0,78            | 18       | 18               | -1,31 | 58       | 51               |       |          |                  |
| Chlorhydrate chlorte-<br>Tétracycline | CLT2 | 58            |                 |          |                  | 0,90  | 48       | 55               |       |          |                  |
| Pristivamycine                        | PRS1 | 25            | 1,14            | 30       | 27               | -1,36 | 47       | 39               |       |          |                  |
| Novobiocine                           | NOV3 | 56            |                 |          |                  | 0,91  | 47       | 52               |       |          |                  |
| Sulfadiazine                          | SVZ1 | 25            | 1,11            | 28       | 20               | -1,34 | 40       | 32               |       |          |                  |
| Clindamycine                          | CLN1 | 19            | 1,12            | 22       | 19               | -1,45 | 40       | 32               |       |          |                  |
| Fostomycine                           | FOS1 | 53            |                 |          |                  | -0,73 | 29       | 31               |       |          |                  |
| D-xylose                              | DXY2 | 62            | 0,50            | 14       | 19               | 0,27  | 19       | 18               |       |          |                  |
| Ampicilline                           | AMP1 | 6             |                 |          |                  | -1,75 | 18       | 13               |       |          |                  |
| Fosfomycine                           | FOS3 | 17            |                 |          |                  | 0,99  | 17       | 13               |       |          |                  |
| Carbénicilline                        | CAR1 | 4             |                 |          |                  | -1,96 | 15       | 11               |       |          |                  |
| Chlorure de mercure                   | CLM1 | 30            |                 |          |                  | -0,69 | 14       | 12               |       |          |                  |
| D-Arabitol                            | ART1 | 11            |                 |          |                  | -1,06 | 12       | 9                |       |          |                  |
| Caprylate                             | CAY1 | 17            |                 |          |                  |       |          |                  | -1,93 | 61       | 37               |
| Heptanoate                            | HÉP1 | 20            | -0,82           | 12       | 10               |       |          |                  | -1,44 | 52       | 33               |
| L-α-Alanine                           | LAL1 | 10            |                 |          |                  |       |          |                  | -1,82 | 42       | 24               |
| Arsénite de sodium                    | ARS2 | 32            | -0,98           | 28       | 28               |       |          |                  | 1,00  | 40       | 28               |
| Trigonelline                          | TRI2 | 29            | -0,95           | 24       | 22               |       |          |                  | 1,01  | 37       | 26               |
| Glutarate                             | GLR2 | 14            | -1,10           | 15       | 13               |       |          |                  | 1,43  | 36       | 22               |
| L-Arabinose                           | LAR1 | 11            |                 |          |                  |       |          |                  | -1,49 | 31       | 18               |
| Sulfate de cuivre                     | SCU1 | 9             |                 |          |                  |       |          |                  | -1,36 | 30       | 17               |
| Tartrate                              | LTA1 | 42            |                 |          |                  |       |          |                  | -0,70 | 26       | 20               |
| D-malate                              | DMA1 | 55            |                 |          |                  |       |          |                  | -0,57 | 23       | 20               |
| Aconitate                             | ACO1 | 8             |                 |          |                  |       |          |                  | -1,41 | 20       | 11               |
| Spiramycine                           | SPR1 | 8             |                 |          |                  |       |          |                  | -1,42 | 20       | 11               |
| L-Argénine                            | LRG1 | 60            |                 |          |                  |       |          |                  | -0,51 | 19       | 18               |
| Bétaïne                               | BET1 | 58            |                 |          |                  |       |          |                  | -0,51 | 18       | 17               |
| D-Galactos                            | GAL1 | 4             |                 |          |                  |       |          |                  | -1,87 | 17       | 10               |
| Inositol                              | INO1 | 16            |                 |          |                  |       |          |                  | -0,83 | 14       | 8                |
| Citrate                               | CIT1 | 1             |                 |          |                  |       |          |                  | -3,32 | 14       | 7                |
| D-α-Alanine                           | DAL1 | 16            |                 |          |                  |       |          |                  | -0,84 | 14       | 8                |

en plus le N-caproate à 82 % alors que celles de l'olivier ne l'utilisent qu'à 12 %, celles de laurier rose à 18 % et celles de jasmin à 66 %.

On remarque aussi qu'uniquement les souches d'olivier ont assimilé la trigonelline à 50 %, le glutarate à 24 % et seulement 13 % ont été pectinolytiques à pH 5 alors que le reste l'ont été à 100 % sauf celles isolées de trène qui n'ont été positives qu'à 16 % et une souche de laurier rose.

La variabilité des souches isolées de jasmin, Phillyrea et de trène n'a pas été car peu de souches ont été testées.

### 3.2.2.3.2 Classification ascendante

Le dendrogramme montre que la coupure au niveau de 7 classes (figure 40), permet de grouper la majorité des souches d'olivier dans la première classe (34 souches sur 58) et 5 souches de laurier rose.

Les souches de trène sont groupées avec une souche de l'olivier dans la classe 3.

La classe 7 contient uniquement la majorité des souches de frêne (23 sur 39).

La classe 6 se compose de 13 souches de frêne et 9 souches de laurier rose.

Deux souches (FX 2 et L 48.3) isolées de frêne sont groupées avec 7 souches de laurier rose et deux souches d'olivier dans la classe 2. Ces deux souches sont celles qui s'écartent toujours des autres, elles sont L-sérine positif, N-caproate négatif, LD-aminovalérate négatif, D-xylose négatif et L-leucine négatif alors que les souches de frêne présentent des réponses inverses.

La classe 4 renferme des souches provenant de différents hôtes sauf de frêne.

La classe 5 contient 2 souches d'olivier, 3 souches de laurier rose et 1 souche de frêne.

La classe 2 et 3, 4 et 7, 5 et 6 peuvent être réunies deux à deux si la coupure est faite en 4 classes.

Les classes peuvent être définies par un caractère important comme suit :

| N° de la classe | Caractère     | % des souches dans la classe qui ont la réponse correspondante | % des souches dans la classe par rapport au nombre total qui ont la réponse correspondante |
|-----------------|---------------|--|--|
| 1               | L-arabinose - | 90,9   | 90,9   |
| 2               | pélargonate - | 100  | 30   |
| 3               | L-sérine -    | 82,6   | 61,3   |

### 3.2.2.3.3 Discussion

L'étude de 167 caractères biochimiques grâce à l'analyse factorielle des correspondances multiples nous a permis de distinguer facilement les groupes I, II et III de Lelliott et al (95) du reste des autres groupes.

Ces résultats confirment ceux obtenus par Sands (142), ceci est dû au fait que les Pseudomonas fluorescents phytopathogènes sont arginine, oxydase et nitrate négatifs et tabac positif sauf P. cichorii qui est oxydase positif alors que les espèces saprophytes P. fluorescens et P. putida sont oxydase positive et tabac négatif.

Nos résultats sont aussi en accord avec ceux de Misaghi et Grogan (119) du fait que P. marginalis utilise un nombre de substances important est classé avec le groupe de Pseudomonas saprophytes.

On constate que certaines bactéries non fluorescentes phytopathogènes : P. gladioli pv. gladioli, P. cepacia et P. corrugata utilisent aussi un nombre de substances très élevé alors que d'autres non fluorescentes : P. solanacearum, P. alcaligenes et P. pseudoalcaligenes en utilisent beaucoup moins.

Certains caractères utilisés par Lelliott et al (95), Hildebrand et Schroth (73), tel que levane, esculine, gélatine et pectine sont marginalement intervenus pour caractériser les groupes I, II et III de Lelliott du reste des autres groupes, ils sont cependant très utiles pour caractériser certaines souches à l'intérieur de ces groupes. Notre étude permet d'ajouter d'autres caractères intéressants pour identifier ces bactéries : acétate, N-acétyl-glucosamine, bêta-alanine (Tableau XXIX).

Certaines substances (D-arabinose, L-fucose) ont été utilisées uniquement par les espèces non fluorescentes de P. caryophylli, P. cepacia, P. gladioli pv. gladioli, P. gladioli pv. allicola, P. rubrisubalbicans et A. tumefaciens.

| Caractère                        | Olivier | Frêne  | Laurier<br>rose | Jasmin | <u>Phillyrea</u> | Tröene |
|----------------------------------|---------|--------|-----------------|--------|------------------|--------|
| L-sérine                         | +(100)  | +(20)  | +(100)          | +(100) | +(100)           | +(100) |
| N-caproate                       | +(12)   | +(82)  | +(18)           | +(66)  | -                | -      |
| Polypectate<br>de sodium<br>pH 5 | +(13)   | +(100) | +(97)           | +(100) | +(100)           | +(16)  |
| DL-5 amino<br>valérate           | -       | +(53)  | -               | -      | -                | -      |
| L-leucine                        | +(50)   | +(92)  | +(76)           | +(100) | +(100)           | +(16)  |
| Levane                           | -       | +(21)  | -               | -      | -                | +(16)  |
| Caproate                         | +(67)   | +(90)  | +(91)           | +(100) | +(100)           | -      |
| Rafinose                         | -       | +(23)  | -               | -      | -                | -      |
| Pélargonate                      | +(87)   | +(97)  | +(91)           | +(100) | +(100)           | +(33)  |
| P-Hydroxy<br>benzoate            | +(57)   | +(100) | +(85)           | +(100) | +(100)           | -      |
| 2-amino-<br>benzoate             | -       | +(13)  | -               | -      | -                | -      |
| L-tyrosine                       | -       | +(18)  | -               | -      | -                | -      |
| D-xylose                         | +(45)   | +(92)  | +(3)            | -      | -                | -      |
| D-arabitol                       | +(95)   | +(100) | +(82)           | +(100) | +(100)           | +(100) |
| Caprylate                        | +(95)   | +(100) | +(88)           | +(100) | +(100)           | +(33)  |
| Heptonate                        | +(83)   | +(93)  | +(91)           | +(100) | +(75)            | +(16)  |
| L-alpha-<br>alanine              | +(97)   | +(93)  | +(93)           | +(100) | +(100)           | +(50)  |
| Trigonel-<br>line                | +(50)   | -      | -               | -      | -                | -      |
| Glutarate                        | +(24)   | -      | -               | -      | -                | -      |
| L-arabinose                      | +(37)   | +(95)  | +(97)           | +(100) | +(100)           | +(100) |
| L-tartrate                       | +(97)   | +(54)  | +(70)           | -      | +(100)           | +(50)  |
| D-malate                         | +(62)   | +(80)  | +(36)           | +(66)  | +(75)            | +(33)  |
| Aconitate                        | +(97)   | +(93)  | +(97)           | +(100) | +(100)           | +(66)  |
| L-arginine                       | +(73)   | +(57)  | +(33)           | +(33)  | +(100)           | +(50)  |
| Betaine                          | +(81)   | +(33)  | +(58)           | +(100) | +(100)           | +(33)  |
| D-galactose                      | +(95)   | +(97)  | +(97)           | +(100) | +(100)           | +(100) |
| Inositol                         | +(90)   | +(97)  | +(81)           | +(100) | +(100)           | +(100) |
| D alpha-<br>alanine              | +(97)   | +(80)  | +(73)           | +(100) | +(100)           | +(100) |

Tableau XXXVII - Caractères biochimiques de P. syringae  
pv. savastanoi

+ = Réaction positive

- = Réaction négative

Les chiffres entre parenthèse indiquent le pourcentage des souches qui ont des réponses positives.

L'analyse spécifique concernant les pathovars de P. syringae et P. viridiflava a montré que P. syringae pv. savastanoi est bien séparé des autres pathovars. Sands et al (142), ont remarqué que les quelques souches étudiées étaient rassemblées dans un sous-groupe à l'intérieur du groupe de Pseudomonas fluorescents phytopathogènes. Il pensait que ce pathovar pourrait être mieux identifié si d'autres tests étaient pratiqués comme la production d'Acide-Indole-Acétique. Janse (78) a présenté 7 caractères pour distinguer P. syringae pv. savastanoi de P. syringae pv. syringae : gélatine négative, esculine négative, arbutine négative, D(+) raffinose négative, caseine négative, érythrytol négatif et L(+) tartrate positive. Nos résultats montrent que les caractères de Janse sont très utiles pour caractériser P. syringae pv. savastanoi à condition de les compléter par d'autres caractères : méso-Tartrate, sarcosine, D(-) tartrate (Tableau XXXVIII).

Le levane est un caractère intéressant, mêmes si certaines souches de frêne sont positives car il caractérise bien le sous-groupe Ib de lelliott et al (95).

Certains caractères classiques n'ont pas répondu correctement. Par exemple, le test D(-) tartrate que nous avons trouvé positif pour certains pathovars comme pv. eriobotryae, pv. garcea, pv. lachrymans, pv. papulans et pv. passiflorae alors qu'ils sont indiqués comme négatifs dans la littérature.

La taxonomie numérique de P. syringae pv. savastanoi et les pathovars de P. syringae a relativement donné des résultats semblables à ceux obtenus par l'analyse factorielle des correspondances multiples et la classification ascendante descendante hiérarchique. Certains pathovars de P. syringae (pv. theae, pv. glycinea, pv. porri et pv. ciccaronei qui sont très proches de P. syringae pv. savastanoi par l'analyse factorielle des correspondances multiples sont regroupés avec P. syringae pv. savastanoi en taxonomie numérique.

L'analyse statistique des caractères biochimiques montre que P. syringae pv. savastanoi n'est pas une population homogène comme elle est considérée depuis longtemps. Cette hétérogénéité n'est pas due au hasard mais à mettre en relation avec l'hôte dont cette bactérie a été isolée.

Pour certains caractères, toutes les souches isolées de différents ont répodu de la même façon (Tableau XXX) ; d'autres caractères sont communs avec les autres pathovars de P. syringae.

Nous avons trouvé des divergences avec les résultats obtenus par certains auteurs (114,182), qui ont trouvé que les souches isolées de l'olivier n'utilisent pas le saccharose alors que nos résultats et ceux obtenus par Wilson et Magie (178) et Sutic et Dowson (168), montrent que P. syringae pv. savastanoi l'utilise (quelques souches peuvent être négatives).

Misaghi et grogan (119) ont trouvé que très peu de souches de P. syringae pv. savastanoi utilisent le D-manose, le succinate, le L-proline alors que pour nos résultats, nous avons trouvé que presque toutes les souches les utilisent. Cette différence pourrait être due au nombre limité de bactéries testées.



Tableau XXXVIII - Caractères biochimiques différentiels entre *P. syringae* pv. *savastanoi* et les groupes I et II de Lelliott.

| Espèces                      | Nombre de souches | CARACTERES |                   |                   |            |                        |                  |                 |          |                  |            |              |       |               |       |         |                  |        |                 |                    |                       |                 |
|------------------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|------------|------------------------|------------------|-----------------|----------|------------------|------------|--------------|-------|---------------|-------|---------|------------------|--------|-----------------|--------------------|-----------------------|-----------------|
|                              |                   | Esculine   | Erythritole (API) | Mésotartate (API) | DL-Lactate | DL-J hydroxy but.(API) | DL-Lactate (API) | Sarcosine (API) | Gélatine | D Tartrate (API) | Erythrytol | D(-)Tartrate | Tween | L(+)-Tartrate | DNase | Manitol | D-Rafinose (API) | Levane | Glutarate (API) | Trigonelline (API) | DL-5 amino-val. (API) | Aconitate (API) |
| <i>P. aceris</i>             | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. antirrhini</i>    | 1                 | -          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. aptatata</i>      | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. atrofaciens</i>   | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. atropurpurea</i>  | 1                 | -          | +                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. berberidis</i>    | 1                 | -          | -                 | +                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. cannabina</i>     | 1                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. coronafaciens</i> | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. eriobotryae</i>   | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. garcae</i>        | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. glycinea</i>      | 1                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. helianthi</i>     | 1                 | -          | +                 | +                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. lachrymans</i>    | 1                 | +          | +                 | -                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. lapsa</i>         | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. maculicola</i>    | 1                 | +          | -                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. mori</i>          | 1                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. morsprunorum</i>  | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. panici</i>        | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. persicae</i>      | 1                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. phaseolicola</i>  | 1                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. pisi</i>          | 1                 | +          | -                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. porri</i>         | 1                 | -          | -                 | +                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
|                              | 2                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
|                              | 3                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. primulae</i>      | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. sesami</i>        | 1                 | -          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. syringae</i>      | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | +               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. tabaci</i>        | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. tomato</i>        | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. ulmi</i>          | 1                 | -          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. viburni</i>       | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. ciccaronei</i>    | 1                 | -          | -                 | +                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. delphinii</i>     | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. dysoxylis</i>     | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. mellea</i>        | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. papulans</i>      | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. passiflorae</i>   | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. vibicola</i>      | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | +               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. striaefaciens</i> | 1                 | +          | +                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. tagetis</i>       | 1                 | +          | -                 | +                 | -          | +                      | +                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. theae</i>         | 1                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P. viridiflava</i>        | 1                 | +          | +                 | +                 | +          | +                      | +                | +               | +        | +                | -          | +            | +     | +             | +     | -       | -                | +      | -               | +                  | +                     | +               |
| <i>P.s.pv. savastanoi</i>    | 1                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | -        | -                | -          | -            | -     | -             | -     | -       | -                | -      | -               | -                  | -                     | -               |
| Olivier                      | 58                | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | -        | -                | 10*        | +            | +     | +             | +     | -       | -                | 24     | 50              | -                  | -                     | +               |
| Frêne                        | 39                | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | -        | -                | -          | +            | +     | +             | +     | +       | 27               | 21     | -               | -                  | 53                    | +               |
| Laurier rose                 | 33                | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | -        | -                | 15         | +            | +     | +             | +     | +       | -                | -      | -               | -                  | -                     | +               |
| Jasmin                       | 3                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | -        | -                | 66         | +            | +     | +             | +     | +       | -                | -      | -               | -                  | -                     | +               |
| Phillyrea                    | 4                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | -        | -                | -          | +            | +     | +             | +     | +       | -                | -      | -               | -                  | -                     | +               |
| Troëne                       | 6                 | -          | -                 | -                 | -          | -                      | -                | -               | -        | -                | 84         | +            | +     | +             | +     | +       | -                | -      | -               | -                  | -                     | 66              |

+ = réponse positive  
- = réponse négative

\* les chiffres indiquent des pourcentages des souches qui ont des réponses positives

Les souches isolées de jasmin, Phillyrea et de tröene n'ont pas été distinguées des autres souches provenant d'hôtes différents du fait du petit nombre de souches testées, alors que le reste des souches et en particulier celles de frêne, sont bien séparées.

Les bactéries isolées d'un hôte donné, ne sont pas toujours homogènes et une variabilité peut être observée dans certains cas.

Variabilité phénotypique de Pseudomonas. syringae pv. syringae  
provenant de laurier palme et d'hôtes variés.

L. Gardan<sup>1</sup>, S. Cottin<sup>1</sup>, C. Bollet<sup>2</sup>, N. Boutefnouchet<sup>2</sup>, and  
G. Hunault<sup>3</sup>.

Nous avons étudié 108 souches de P. syringae pv. syringae isolées entre 1950 et 1986 de 31 genres botaniques différents, et les souches de 53 autres pathovars de P. syringae. Ces souches ont été soumises à 167 tests biochimiques et cultureux.

Nous avons utilisé la classification hiérarchique dans un but d'apprécier la variabilité phénotypique de P. syringae pv. syringae isolées de laurier palme, en vue de déterminer les souches à utiliser pour l'étude génotypique de ce pathovar.

tipliés en France, le cultivar *Caucasica* est plus touché que les cultivars *Otto Luyken* et *Rotundifolia*.

De 1976 à 1988, 231 souches ont été isolées de lésions et de surface de feuille. Nous présentons d'abord dans cet article, la variabilité des caractères biochimiques des 50 souches isolées de laurier palme, identifiées comme *P s pv syringae*, puis en comparaison avec les 58 autres souches de *P s pv syringae* isolées d'hôtes variés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Souches

Cinquante souches de *P s pv syringae* isolées de laurier palme, représentatives de la collection des 231 souches ont été retenues d'après leurs origines géographique, variétale et temporelle. La souche type (CFBP n° 1392) sert de témoin.

Cinquante huit autres souches de *P s pv syringae* ayant été isolées de 1950 à 1986 en France et à l'étranger, d'hôtes variés classés dans 31 genres botaniques ont été incluses dans l'étude (tableau I).

### Tests biochimiques

Le caractère hypersensibilité sur tabac et 19 caractères biochimiques ont été étudiés : production de pigment fluorescent aux UV, de lévane, d'une cytochrome c oxydase et d'une arginine dihydrolase, réduction des nitrates, dégradation de l'esculine, de la gélatine, de la pectine, du polypectate à pH 5 et 8,5, lipolyse du tween 80, production d'acide à partir de saccharose, sorbitol, érythritol, mannitol, alcalinisation du milieu en présence d'acides organiques : DL-lactate, L(+) tartrate et D(-) tartrate (Gardan et Luisetti, 1982).

L'assimilation de 49 sucres, 49 acides organiques et 49 acides aminés a été étudiée en utilisant les galeries 50 CH, LRA 50 AO, LRA 50 AA (Api System, Gardan et al, 1984). La croissance à 24 °C est observée jusqu'à 6 jours.

### Taxonomie numérique

167 caractères ont été étudiés et le codage logique 1/0 a été utilisé. La matrice des distances a été calculée en utilisant le coefficient de Jaccard et Sneath. L'analyse des grappes a été faite en utilisant la méthode des diamètres moyens des grappes (UPGMA = Unweighted pair group method with averages) (Sokal et Sneath, 1963; Sneath et Sokal, 1973).

Un programme d'identification numérique calcule les paramètres d'identification suivants : la fréquence théorique d'apparition du phénotype dans l'espèce (produit des pourcentages de positivité pour les différentes espèces) qui reflète l'atypie du phénotype, et le pourcentage d'identification (rapport de la fréquence théorique d'apparition du phénotype dans l'espèce à la somme des fréquences d'apparition) (Lapage et al, 1973; Bollet et al, 1988). Ceci peut permettre de rattacher un phénotype isolé à un groupe.

La mesure de la quantité d'informations apportée par chaque test est appréciée par le calcul du coefficient de capacité de diagnostic (CCD) (Descamp et Véron, 1981).

Tous les calculs ont été réalisés sur un ordinateur IBM 3 090 avec des programmes écrits en Cobol et en assembleur.

## RÉSULTATS

Nous avons d'abord étudié la variabilité des 50 souches provenant de laurier palme entre elles en comparaison avec la souche type de *P s pv syringae* puis, dans un deuxième temps, nous les avons comparées aux 58 souches de *P s pv syringae* isolées d'hôtes variés.

### Variabilité des souches isolées de laurier palme

Le dendrogramme des distances des 51 souches (fig 1) donne une bonne idée de la variabilité des souches; sa coupure à la distance 0,081 9 nous donne 6 groupes et 10 phénotypes isolés. L'identification numérique n'a pas permis de rattacher ces phénotypes isolés à un de ces 6 groupes, ce qui paraît logique lorsqu'on examine leur place dans le dendrogramme des distances (fig 1) et qui est confirmé par l'examen de leurs caractères biochimiques comparés à ceux des groupes (tableau II).

Les effectifs des groupes varient de 2 à 15. Les groupes 6 et 2 sont les plus importants puisqu'ils contiennent respectivement 14 et 15 souches. Les individus sont rassemblés dans chaque groupe du fait de leurs propriétés phénotypiques et aucune relation ne peut être faite entre les individus des groupes et les caractéristiques propres des souches : origine, année d'isolement, nature de l'isolement et le cultivar (tableau I).

La souche type de *P s pv syringae* (CFBP n° 1392) et la souche U 21-1 sont éloignées des autres souches puisqu'elles s'agrègent à l'en-

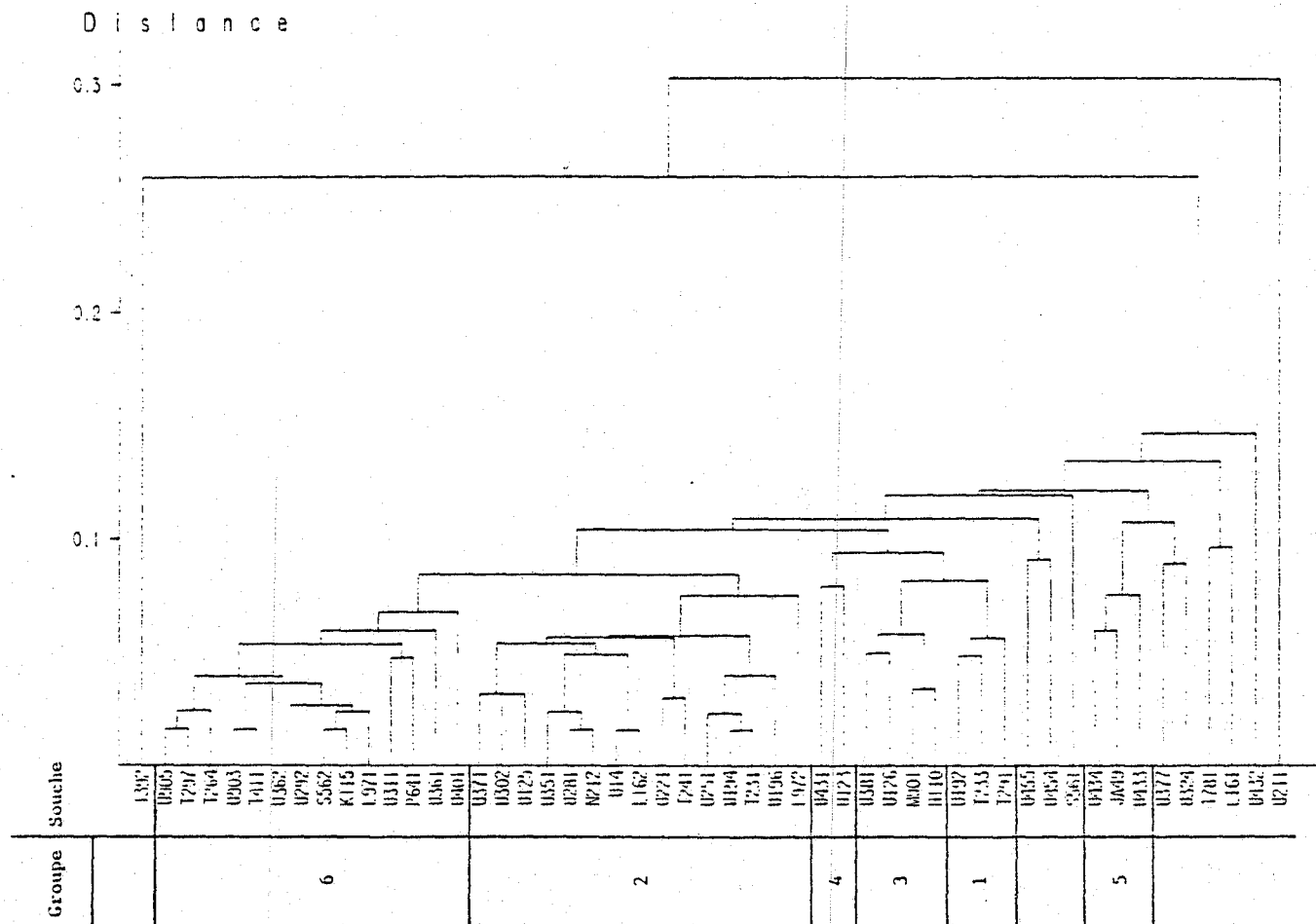


Fig 1. Dendrogramme des distances des 50 souches de *P s pv syringae* isolées de laurier palme et de la souche type de *P s pv syringae* (CFBP n° 1392).

semble des souches à haut niveau, respectivement aux distances 0,259 et 0,302.

En retenant les CCD les plus élevés de 0,107 à 0,964, on sélectionne les 15 caractères les plus discriminants qui permettent de différencier les 6 groupes et les phénotypes isolés entre eux (tableau III). Sur la base des caractères malonate et glucosamine on définit l'ensemble des groupes 1 + 4 + 5, le groupe 2 et le groupe 6.

Le groupe 1 se distingue du groupe 4 (sarcosine, propionate), du groupe 5 (D-xylose) et du groupe 3 (sarcosine).

Le groupe 6 ne s'individualise du groupe 3 que par des caractères notés d (DL-5-aminovalérate, L-cystéine, sarcosine, itaconate).

Presque toutes les souches sont DL-lactate et 2-cétoglutarate positives et L(+) tartrate négatives.

#### **Variabilité comparée des souches de *P s pv syringae* isolées de laurier palme et des autres hôtes**

Le typage sur la base de 5 caractères classiques de Hildebrand et Schroth (1972) (sorbitol, erythritol, DL-lactate, L(+) tartrate, D(-) tartrate) donne 7 biotypes au total (tableau III). La répartition de l'ensemble des souches dans les différents biotypes montre que le biotype 3 est majoritaire puisqu'il rassemble 90% des souches isolées de laurier palme et 64% des souches provenant de différents hôtes. Le biotype 2 est encore conséquent pour les souches isolées d'hôtes variés puisqu'il rassemble 19% des souches; par contre les autres biotypes sont minoritaires puisqu'ils représentent moins de 10% des souches des 2 provenances.

Tableau III. Biotypes selon Hildebrand et Schroth (1972) Des différentes souches de *P s pv syringae* isolées de laurier palme et d'hôtes variés.

|   | Sorbitol | Erythritol | DL Lactate | L(+) Tartrate | D(-) Tartrate | Nombre de souches | %  |
|---|----------|------------|------------|---------------|---------------|-------------------|----|
| Biotypes des 50 souches de <i>P s pv syringae</i> , isolées de laurier palme.   |          |            |            |               |               |                   |    |
| 1   | +        | +          | -          | -             | +             | 1                 | 2  |
| 2   | +        | +          | +          | -             | -             | 1                 | 2  |
| 3   | +        | +          | +          | -             | +             | 45                | 90 |
| 4   | +        | +          | +          | +             | +             | 2                 | 4  |
| 5   | -        | -          | +          | -             | +             | 1                 | 2  |
| Biotypes des 58 souches de <i>P s pv syringae</i> , isolées d'hôtes différents. |          |            |            |               |               |                   |    |
| 1   | +        | +          | -          | -             | +             | 3                 | 5  |
| 2   | +        | +          | +          | -             | -             | 11                | 19 |
| 3   | +        | +          | +          | -             | +             | 37                | 64 |
| 6   | +        | -          | +          | -             | +             | 1                 | 2  |
| 7   | +        | -          | -          | -             | +             | 6                 | 10 |

La souche type de *P s pv syringae* (CFBP n° 1392) est classée dans le biotype 2 et non dans le biotype majoritaire 3.

Le dendrogramme (fig 2) montre la répartition des 108 souches suivant les distances qui les séparent. La coupure du dendrogramme à la distance 0,130 fait apparaître 7 groupes et 10 phénotypes isolés (tableau IV).

Le groupe 1 où figurent 2 répétitions de la souche type de *P s pv syringae*, est le plus éloigné de l'ensemble des autres groupes.

Les souches provenant de laurier palme sont réparties dans le groupe 6 (44) et le groupe 2 (5). Les souches provenant d'hôtes variés sont réparties de façon plus large (22 dans le groupe 6 et une seule dans le groupe 2); elles représentent la totalité des groupes 3, 4, 5 et 7 qui ne comprennent que des souches isolées d'hôtes variés. L'identification numérique pourrait permettre de rattacher la souche N 12-2 (isolée de *Delphinium sp*) au groupe 7 puisqu'elle en est très proche; ce n'est pas le cas des 9 autres phénotypes isolés.

En retenant les CCD de 0,334 à 0,112, on sélectionne 25 caractères discriminants qui permettent de bien différencier les 7 groupes entre eux et les 10 phénotypes isolés (tableau V).

Les caractères glycine, malonate et érythritol permettent de différencier les groupes 1 et 2 des autres groupes.

Le groupe 1 se différencie du groupe 2 par les caractères mésotartrate, L-arginine, succinate, L-histidine et fumarate.

Les groupes 4 et 6 ont respectivement les caractères glycine et malonate d, donc positifs, ou négatifs. Le groupe 4 se différencie du groupe 5 (sarcosine, gélatine, propionate, salicine et L-leucine), du groupe 6 (D-tartrate, L-valine) et du groupe 7 (D-raffinose et L-valine).

Le groupe 6 se distingue du groupe 1 (mésotartrate, L-arginine, succinate, glutarate, L-cystéine, L-histidine, L-valine et fumarate), du groupe 2 (glutarate, L-cystéine et L-valine), du groupe 5 (salicine, L-Leucine).

Les phénotypes isolés ont des caractères différents les uns des autres et se distinguent facilement des 6 groupes par 1 ou plusieurs caractères (tableau V).

Les biotypes de Hildebrand et Schroth (1972) et les groupes phénotypiques que nous avons délimités ne coïncident pas; l'ensemble des 69 souches du groupe 6 appartiennent au biotype 3 mais les autres biotypes sont répartis au hasard parmi les groupes phénotypiques.

## DISCUSSION

Les souches isolées de lésions ou à la surface des feuilles de laurier palme et identifiées



#### 4 CONCLUSION

L'étude d'un grand nombre de caractères phénétiques nous a permis d'apprécier la variabilité phénotypique au sein de l'espèce P. syringae.

Cette variabilité est relativement importante pour les souches de P. syringae pv. syringae isolées de laurier palme, elle apparaît encore plus élevée parmi les souches de P. syringae pv. syringae isolées de différents hôtes.

La notion de pathovar existe mais la souche CFBP 1392 n'est pas a priori une bonne souche-type. Dans notre étude, ce pathovar serait considéré par la classe 14 définie par la taxonomie numérique. Le pathovar syringae pourrait se distinguer des autres pathovars par l'assimilation des caractères suivants : DL-lactate (+), érythritol (+), gélatine (+), N-caproate (+), glucosamine (+), mésotartrate (+), L-histidine (+), L-arginine (+), L-alanine (-).

Les souches isolées de laurier palme sont en majorité concentrées dans cette classe ainsi que de nombreuses souches isolées de différents hôtes. Il s'avère que certaines souches définies comme représentatives d'un pathovar sont très proches du pathovar syringae sur le plan biochimique (atrofaciens, dysoxylii, aptata, panaci, papulans, aceris).

Certains pathovars se trouvent très proches et leur différenciation sur le plan biochimique s'avère difficile. C'est le cas pour les pathovars berberidis, tabaci et mellea.

Les souches de P. syringae pv. savastanoi, ont montré une hétérogénéité plus au moins importante sur la base des caractères biochimiques, liée à l'hôte. Les 20 caractères classiques ne permettent pas de montrer cette hétérogénéité (sauf les tests polypectate pH5 et levane) alors que l'assimilation des substances hydrocarbonées montrent des différences entre les souches isolées de différents hôtes.

Les souches isolées de différents hôtes sont plus au moins séparées mais d'une façon moins importante que celles isolées de frêne.

Aussi les groupes I, II et III de Lelliott se distinguent facilement des groupes IV et V de Lelliott et d'autres Pseudomonas fluorescents et non fluorescents.

P. syringae pv. phaseolicola, pv. lachrymans et pv. cannabina semblent être bien distincts du reste des pathovars de P. syringae. L'utilisation d'une seule souche de chaque pathovar ne nous permet pas de conclure sur ce sujet ; une étude exhaustive reste à faire.

Au vu des résultats, il semble que l'espèce P. syringae est à redéfinir sur la base des caractères biochimiques et d'hybridation.



Le terme pathovar définit des groupes de souches ayant des caractéristiques identiques, différenciés à un niveau infraspécifique d'autres souches de la même espèce ou sous espèce sous la base d'une pathogénicité distincte sur un ou plusieurs hôtes.

Il semble que la notion de pathovar est caduque car l'hybridation ADN/ADN montre que P. syringae pv. syringae est différent du reste des pathovars. P. syringae pv. savastanoi est aussi différent de P. syringae pv. syringae et de certains de ses pathovars. En plus ces différences sont confirmées par l'étude phénotypique.

Une étude taxonomique des caractères biochimiques et des hybridations DNA/DNA de tous les pathovars de P. syringae permettra seule de clarifier la situation.

## 5 BIBLIOGRAPHIE

1. Adams, D.B., and Y. Pugle. 1934. A bacterial canker disease of oleander. J. Dep. Agr. Victoria. Australie. 32:309-311.
2. Adanson, M. 1763. Familles naturelles des plantes. Vicent, Paris.
3. Anderson, D.M., and D. Mills. 1985. The use of transposon mutagenesis in the isolation of nutritional and virulence mutants in two pathovars of Pseudomonas. syringae. Phytopathol. 75:104-108.
4. Ark, P.A., and J.P. Thompson. 1960. Experimental greenhouse of crown gall and olive knot with antibiotic drenches. Pl. Dis. Rep. 44:197-199.
5. Arnaud, G., and M. Arnaud. 1963. Maladies bactériennes de l'olivier. Traité de phatologie végétale T.I, édi. Paul le Chevalier. p.1598-1604.
6. Arsenijevic, M. 1973. Further investigations on Pseudomonas. syringae VAN HALL as pathogen of apricot in Yugoslavia. Working Party of "Pseudomonas. syringae" Group, Angers, France: 60-66.
7. Austin, B., and R.R. Colwell. 1977. Evaluation of some coefficients for use in numerical taxonomy of microorganisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 27:204-210.
8. Austin, B., and F. Priest. 1986. Modern bacterial taxonomy. Van Nostrand Reinhold, Wokingam, England.
9. Ayers, S.H, Rupp, P., and W.T. Johnson. 1919. A study of alkali forming bacteria found in milk. Bul. U.S. Dep. Agri. 782.
10. Baca, S., and L.W. Moore. 1987. Variation in Pseudomonas. syringae isolated from grass species occuring in woody plant nurseries in the pacific northwest. Pl. Dis. 71:724-726.
11. Barzic, M.R. 1985. Les toxines des bactéries phytopathogènes. Bul. Inst. Past. 83:245-287.
12. Bashan, Y., Sharone, E., Okon, Y., and Y. Henis. 1981. Scanning electron and light microscopy of infection and symptom development in tomato leaves infected with Pseudomonas. tomato. Physiol. Pl. Pathol. 19:139-144.
13. Beltra, R. 1958. Relacion entre la concentracion de triptofano en los tallos de olivo y la localizacion de de los tumores bacterianos. Microbiol. Espan. 11:401-410.
14. Beltra , R. 1963. Estudio de la facciion hormonal de los tumoros producidos en el olivo por el Pseudomonas. savastanoi. Microbiol. Espan. 16:1-10.

30. Comai, L., and T. Kosuge. 1980. Involvement deoxyribonucleic acid synthetis in Pseudomonas. savastanoi. J. Bacteriol. 143: 950-957.
31. Comai, L., and T., Kosuge. 1982. Cloning and characterization of iaaM, a virulence detarminant of Pseudomonas. savastanoi. J. Bacteriol. 149:40-46.
32. Comai, L., Surico, G., and T. Kosuge. 1982. Relation of plasmid DNA to indolacetic acid production in different stains of Pseudmonas. syringae pv. savastanoi. J. Gen. Microbiol. 128:2157-2163.
33. Comai, L., and T., kosuge. 1983. Transposable element that causes mutations in a plant pathogenic Pseudomonas sp. J. Bacteriol. 154:1162-1167.
34. Cracraft, J. 1983. The signifiance of phylogenetic classifications for systematic and evolutionary biology, p. 1-17. In J. Felsenstein (ed.), Numerical taxonomy, Springer-Verlag, Berlin, New-York and Tokyo.
35. Crockett, J.U. 1978. Plantes à feuilles persistantes. Time life International.
36. Crosse, J.E. 1966. Epidemiological relations of the Pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. Ann. Rev. Phytopathol. 4:291-310.
37. Cuppels, D. 1984. Phages useful in detecting and identifiyng Pseudomonas. syringae pv. tomato. Proceeding of the 2nd Pseudomonas Working Group, Athens, 50-52.
38. Currier, T.C., and M.K. Morgan. 1983. Plasmids of Pseudomonas. syringae : no evidence of a role in toxin production or pathogenicity. Can. J. Microbiol. 29:84-89.
39. De Boer, S.H. 1980. Leaf spot of cherry laurel caused by Pseudomonas. syringae. Can. J. Pl. Pathol. 2:235-238.
40. Den Dooren de Jong, L.E. 1926. Bijdrage tot de Kennis van het mineralisatieproces. Nijgh & Van Ditmar, Rotterdam.
41. Descamps, P. and M. Veron. 1981. Une méthode de choix des caractères d'identification basée sur le théorème de Bayes et la mesure de l'information. Ann. inst. Pasteur (Paris), 132B:157-170.
42. De Vay, J.E., Lukezic, F.L., Sinden, S.L., English, H.; and D.L. coplind. 1968. A biocide produced by pathogenic isolates of Pseudomonas. syringae and its possible role in the bacterial canker disease of peach trees. Phytopathol. 58:95-101.
43. De Vos, P., and J. De Ley. 1983. Intra and intergeneric similarities of Pseudomonas and Xanthomonas ribosomal ribonucleic acid cistrans. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 487-509.

44. De Vos, P., Goor, M., Gillis, M. and J. De Ley. 1985. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic Pseudomonas species. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:169-184.
45. De Vos, P., Van Landschoot, A., Sergers, P., Tytgat, R., Gillis, M., Bauwens, M., Rossau, R., Goor, M., Pot, B., Kersters, K., Lizzaraga, P., and J. De Ley. 1989. Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified Pseudomonas and Pseudomonas-like strains by deoxyribonucleic acid : ribosomal ribonucleic acid hybridizations. Int. J. Syst. bacteriol. 39:35-49.
46. Denny, T.P. 1987. Application of restriction fragment length polymorphism analysis to the systematics of Pseudomonas. syringae pathovars. Proceedings of 3rd International Working Groupe on Pseudomonas. syringae pathovars. Libson (sous presse).
47. Doi, R.H., and R.T. Igarashi. 1965. Conservation of ribosomal and messenger ribonucleic acid cistrons in Bacillus species. J. Bacteriol. 90:384-390.
48. Dybowski, W., and D.A. Franklin. 1968. Conditional probability and the identification of bacteria : a pilot study. J. Gen. Microbiol. 54:215-229.
49. Dye, D.W., Bradbury, J.F., Goto, M., Hayward, A.C., Lelliott, R.A., and M.N. Schrott. 1980. International standards of naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathophyte strains. Rev. Pl. Pathol. 59:153-168.
50. Endert, E., and D.F. Ritchie. 1984. Overwintering and survival of Pseudomonas. syringae pv. syringae and symptom development in peach trees. Pl. Dis. 68:468-470.
51. Ercolani, G.L. 1971. Pesenza epifitica di Pseudomonas. savastanoi (E.F. Smith) stevens sull'olivo, in puglia. Phytopathol. Medit. 10:130-132.
52. Ercolani, G.L., Hagedorn, D.J., Kelman, A., and R.E. Rand. 1974. Epiphitic survival of Pseudomonas. syringae on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. Phytopathol. 64:1330-1339.
53. Ercolani, G.L. 1983. Variability among isolates of Pseudomonas. syringae pv. savastanoi from the phyllophane of the olive. J. Gen. Microbiol. 129:901-916.
54. Ercolani, G.L. 1985. Factor analysis of fluctuation in population of Pseudomonas. syringae pv. savastanoi on the phyllophane of the olive . Microbiol. Ecol. 11:41-49.
55. Evidente, A., Surico, G., Iacobellis, N.S., and G. Randazzo. 1986. 1'-methyl-zealin, an additional cytokinin from Pseudomonas. syringae pv. savastanoi. Phytochem. 25:525-526.

56. Gardan, L., Prunier, J.P., Luisetti, J., and J.J. Bezelgues. 1973. Etude sur les bactérioses des arbres fruitiers. VII Responsabilité de divers Pseudomonas dans le dépérissement bactérien de l'abricotier en France. Rev. Zool. Agr. Pathol. Veg. 4:112-120.
57. Gardan, L., Digat, B., Krause, A., Cottin, S., and F. Lemaire. 1989. La criblure bactérienne du laurier palme. Pépiniéristes, Horticulteurs, Maraîchers. 294:29-35.
58. Gardan, L., and J.P. Prunier. 1973. Epiphytic survival of three Pseudomonads on peach leaves. Working Party of "Pseudomonas. syringae" Group, Angers, 95-96.
59. Garrett, C.M.E., Panagopoulos, C.G., and J.E. Gross. 1966. Comparaison of plant pathogenic Pseudomonads from fruit trees. J. App. Bacteriol. 29:342-356.
60. Gonzalez, C.F., Layher, S.K., Vidaver A.K., and R.H. Olsen. 1984. Transfer, mapping, and cloning of Pseudomonas. syringae pv. syringae plasmid pCG 131 and assessment of its role in virulence. Phytopathol. 74:1245-1250.
61. Gonzalez, C.F., and A.K. Vidaver. 1978. Analysis of plasmids of syringomycin producing strains of Pseudomonas. syringae. Proceedings of the 4 th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, Angers, 31-38.
62. Gross, D.C., and Y.S. Cody. 1984. The effects of iron acquisition and uptake on syringomycin production by Pseudomonas. syringae pv. syringae. Proceedings of the 2nd Pseudomonas Working Group, Athens. 77-79.
63. Gross, D.C., and Y.S. Cody. 1985. Mechanisms of plant pathogenesis by Pseudomonas species. Can. J. Microbiol. 31:403-410.
64. Gross, D.C., and J.E. De Vay. 1977. Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by Pseudomonas. syringae. Physiol. Pl. Pathol. 11:13-28.
65. Gross, D.C., and J.E. De Vay. 1977. Role of syringomycin in hocolus spot of maize and systemic necrosis of cowpea caused by Pseudomonas. syringae. Physiol. Pl. Pathol. 11:1-11.
66. Gross, D.C., and J.E. Vay .1977. Population dynamics and pathogenesis of Pseudomonas. syringae in maize and cowpea in relation to the production of the syringomycin in vitro. Phytopathol. 67:475-483.
67. Gross, D.C., Cody, Y.C., Proebsting, E.L.Jr., Rademaker, G.K., and R.A. Spotts. 1983. Distribution population dynamics, and characteristics of ice nucleation-active bacteria in deciduous fruit tree orchards. App. Env. Microbiol. 46:1370-1379.
68. Gross, D.C., De Vay, J.E., and F.H. Stadman. 1977. Chemical properties of syringomycin and syringotoxin : toxinogenic peptides produced by P. syringae. J. App. Bacteriol. 43:453-463.

82. Katlabi, N.Y., EL-Mouallem, M.K.H., and E. Koudmani. 1986. The relationship between Dasyneura olea L. and Pseudomonas savastanoi on olive trees. Abstracts, Second arab. Congress of Plant Protection. Damascus, March 24-27. 1986.
83. Kelly, J.L., Roberto, F., Silva, O.C., and T. Kosuge. 1986. Cytokinin production and virulence in Pseudomonas savastanoi. Thrid international symposium on the molecular genetics of plant microbe interactions MC. fild university Montreral-Canada, July. 43:27-31.
84. Khan, I.D., and K. Rudolph. 1978. Development of detached leaf bioassay for the evaluation of a necrotoxin produced by P. syringae Van Hall sensu stico in bean leaves (Phaseolus vulgaricus L.). Proceeding of the 4th International Conference On Plant Phathogenic Bacteria, Angers, 651-655.
85. King, E.O., Ward, M.K., and D.E. Raney. 1951. Two simple media for the demonstration of pyocyanin or fluorescin. L. Lab. Cli. med. 44:301-307.
86. Klement, Z., Rozsnay, D.S., Balo, E., Panczel, M., and G.Y. Prileszky. 1984. Physiological relationships between bacterial multiplication and frost injury of bark of apricot trees infected with Pseudomonas syringae pv. syringae. Prociding if the 2nd Pseudomonas working group, Athens, 70-72.
87. Klement, Z., Fkras, G.L., and L. Lovrekovich. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathol. 54:474-477.
88. Kosugue, T., Heskett, M., and E.E. Wilson. 1966. Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. The conversion by an enzyme system from Pseudomonas savastanoi. J. Biol. Chem. 241:3738-3744.
89. Kovacs, N. 1956. Identification of Pseudomonas pyocyanea by oxydase reaction. Nat. 178:703.
90. Krauze, A. 1984. La maladie des criblures du Prunus laurocerasus. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences d'Angers, 27p.
91. Lapage, S.P., Bascomb, S., Willcox, W.R., and M.A. curtis. 1973. Identification of bacteria by computer : general aspect and perspectives. J. Gen. Microbiol. 77:273-290.
92. Latorre, B.A., and A.L. Jones. 1979. Pseudomonas morsprunorum, The cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with P. syringae. Phytopathol. 69:335-339.
93. Lattore, B.A., and A.L. Jones. 1979. Evaluation of weeds and plant refuse as potential sources of inoculum of Pseudomonas syringae in bacterial canker of cherry. Phytopathol. 69:1122-1225.

94. Lattore, B.A., Conzalez, J.A., Cox, J.E., and F. Vial. 1985. Isolation of Pseudomonas. syringae pv. syringae from cankers and effect of free moisture an its epiphytic population on sweet cherry trees. Pl. Dis. 69:409-412.
95. Lelliott, R.A., Billing, E., and A.C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluoresent plant pathogenic Pseudomonads. J. App. Bacteriol. 29:470-489.
96. Lelliott, R.A., and D.E. Stead. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants. Volume 2. T.F. Preece. Blackwell Scientific Publications.
97. Lemaire, F. 1980. Maintien des fertilités organiques et minérales des sols de pépinières. Hortiforum 80. Subsrats et fertilisation, Orléans (11-13 sept. 1980). Hortimat éditeur, St Cyr en val.
98. Lindemann, J., Arny, D.C., and C.D. Upper. 1984. Epiphytic populations of Pseudomonas. syringae pv. syringae on snap bean and nonhost plants and the incidence of bactériel brown spot disease in relation to cropping patterns. Phytopathol. 74:1329-1333.
99. Lindow, S.E. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Ann. Rev. Phytopathol. 21:363-364.
100. Lindow, S.E. 1985. Ecology of P. syringae relevant to the field use of ice-deletion mutants constructed in vitro for plant frost control. Engineered organisms in the environment scientific issues, 23-35. Ame. Soc. Microbiol. Washington, D. C. in H.O. Halvorson, D. Pramer and R. Rogul.
101. Lindow, S.E., Papp, J., and G.A. Anderson. 1984. Biological control of frost injury to pear using non-ice nucleation active bacteria (abstract). Proceeding of the American Conference of INA Bacteria, 2nd, Flagstaff.
102. Loper, J.E., and S.E. Lindow. 1987. Lack of evidence for in situ fluoresent pigment production by Pseudomonas. syringea pv. syringae on bean leaf surfaces. Phytopathol. 77:1449-1454.
103. Luisetti, J., and J.L. Gaignard. 1985. Bacterial populations in buds and frost in jury probability on grapevine. Proceedings of the 6 th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Beltsville. 983-993.
104. Luisetti, J., and J.P. Paulin. 1972. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. III Recherche du Pseudomonas. syringae (Va n Hall) à la surface des organes aériens du poirier et étude de ses variations quantitatives. Ann. Phytolahol. 4:215-227.
105. Magie, A.R., and E.E. Wilson. 1962. Expressions of virulence among isolates of Pseudomonas. savastanoi from olive and oleander. Proceedings of the American phytopathological society. Phytopathol. 52:742.

106. Magie, A.R., Wilson, E.E., and F. Kosuge. 1963. Indoleacetamide as an intermediate in the synthesis of indoleacetic acid in Pseudomonas. savastanoi. Sci. 141:1281-1282.
107. Malvick, D.K., and L.W. Moore. 1988. Population dynamics and diversity of Pseudomonas. syringae on mapple and pear trees and associated grasses. Phytopathol. 78:1366-1370.
108. Mansvelt, E.L., and M.J. Hattingh. 1986. Pear blossom blast in South Africa caused by Pseudomonas. syringae pv. syringae. Pl. Pathol. 35:337-343.
109. Mansvelt, E.L., and M.J. Hattingh. 1986. Bacterial blister bark and blight of fruit spurs of apple in South Africa caused by Pseudomonas. syringae pv. syringae. Pl. Dis. 70-:403-405.
110. Mansvelt, E.L., and M.J. Hattingh. 1987. Scanning electron microscopy of colonisation of pear leaves by Pseudomonas. syringae pv. syringae. Can. J. Bot. 65:2517-2522.
111. Mansvelt, E.L., and M.J. Hatting. 1988. Resident populations of Pseudomonas. syringae pv. syringae on leaves, blossoms, and fruits of apple and pear trees. Phytopathol. 121:135-142.
112. Mansvelt, E.L., and M.J. Hattingh. 1989. Scanning electron microscopy of invasion of apple leaves and blossoms by Pseudomonas. syringae pv. syringae. App. Env. microbiol. 55:533-538.
113. Martins, J.M.S. 1982. Characteristics and population densities of fluorescent Pseudomonads from cherry and apricot leaf surfaces in Portugal. Ser. Est. Agr. 9:249-390.
114. MC Guire, R.G., and T. Kosuge. 1979. Biological properties and plasmids of olive and oleander strains of P. savastanoi. Phytopathol. 69:917-918.
115. Mer, E. 1989. Influence de l'exposition sur l'accroissement de l'écorce des sapins. J. Bot. Paris. 3:114-121.
116. Meyer, J.M., and J.M. Hornsperger. 1978. Role of pyoverdine Pf the iron-binding fluorescent pigment of Pseudomonas. fluorescens, in iron transport. J. gen. Microbiol. 107:329-331.
117. Michard, P. 1978. Arbrisseaux d'ornement. Flammarion.
118. Miles, W.G., Daines, R.H., and J.W. Rue. 1977. Presymptomatic egress of Xanthomonas pruni from infected peach leaves. Phytopathol. 59:895-897.
119. Mishagi, I., and R.G. Grogan. 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent Pseudomonas. Phytopathol. 59:1436-1450.



120. Murray, R.G.E. 1984. The higher taxa, or, a place for everything...?, P.31-34. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, The Williams & Wilkins co., Baltimore.
121. Otta, J.D., and H. English. Serology and pathology of P. syringae. Phytopathol. 61:443-461.
122. Palleroni, N.J. 1983. The taxonomy of bacteria. Bio. Sci. 33: 370-377.
123. Palleroni, N.J. 1984. Genus I. Pseudomonas. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (N.R. Krieg and J.G. Holt, ed.), vol. 1, P.141-199. Williams & Wilkins, Baltimore.
124. Palleroni, N.J. 1986. Taxonomy of the Pseudomonas. In "The Bacteria" (J. R. Sokatch, ed.), Vol. 10, pp.3-25. Academic Press, Orlando, Florida.
125. Palleroni, N.J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, and M. Doudoroff. 1973. Nucleic acid homologies in the genus Pseudomonas. Int. J. Syst. Bacteriol. 23:333-339.
126. Palleroni, N.J., Ballard, R.W., Ralston, R. and M. Doudoroff. 1972. Deoxyribonucleic acid homologies among some Pseudomonas species. J. Bacteriol. 110:1-11.
127. Panagopoulos, G.G., and P.G. Psallidas. 1973. Studies of epiphyllous Pseudomonads and other bacteria from citrus. Working Party of "Pseudomonas. syringae" Group, Angers, 67-78.
128. Paynter, V.A., and R. Alconero. 1979. A specific fluorescent antibody for detection of syringomycin in infected peach tree tissues. Phytopathol. 69:493-496.
129. Pecknold, P.C., and R.G. Grogan. 1973. Deoxyribonucleic acid homology groups among phytopathogenic Pseudomonas species. Int. J. systematic. Bacteriol. 23:111-121.
130. Peglion, V. 1905. La rogna o-tuberculosis del Nerium oleander. Rendic. Accad. Lincei. 14:462-463.
131. Perlasca, G. 1960. Relationships among isolates of Pseudomonas. syringae pathogenic on stone fruit trees. Phytopathol. 50:889-899.
132. Portoles, A.Y., and R. Behra. 1964. Antibiothérapie de la tuberculosis del olivo. Oyton. 21:181-189.
133. Prunier, J.P., and P. Kaiser. 1964. Etude de l'activité pectinolytique chez les bactéries phytopathogènes et saprophytes des plantes. I. Recherche des enzymes pectinolytiques. Ann. Epi. 15:205-219.
134. Prunier, J.P., and J. Cotta. 1987. Le dépérissement bactérien (Pseudomonas sp.) de l'abricotier : situation en France. Bul. OEPP/EPPO. 17:251-256.

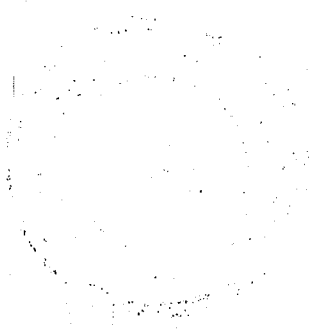
135. Pyrowolakis, E., and H.C. Weltzien. 1974. Studies on the distribution of olive knot, induced by Pseudomonas savastanoi (S m). Stev. in the Greek island of Crète. Phytol. pathol. Medit. 13:118-120.
136. Ravin, A.W. 1963. Experimental approaches to the study of bacterial phylogeny. Amer. Naturalist. 97:307-318.
137. Roos, I.M.M., and M.J. Hattingh. 1986. Bacterial canker of sweet cherry in South Africa. Phytophylactica. 18:1-4.
138. Roos, I.M.M., and M.J. hattingh. 1986. Systematic invasion of plum leaves and shoots by Pseudomonas syringae pv. syringae introduced into petioles. Phytopathol. 77:1253-1257.
139. Rouse, D.I., Nordheim, E.V., Hirano, S.S., and C.D. Upper. 1985. A model relating the probability of poliar disease incidence to the population frequencies of bacterial plant pathogens. Phytopathol. 75:505-509.
140. Saad, S.M., and D.J. Hagedorn. 1972. Relationship of isolate source to virulence of Pseudomonas syringae on Phaseolus vulgaris. Phytopathol. 62:678-680.
141. Samson, R., and M. Saunier. 1987. Désignation de références sérologiques pour six sérogroupes de pathovars de Pseudomonas syringae sur la base de leur lipopolyside. Bul.OEPP. 17:165-171.
142. Sands, D.C., Schroth, M.N., and D.C. Hildebrand. 1970. Taxonomy of phytopathogenic Pseudomonads. J. Bacteriol. 101:9-23.
143. Sands, D.C. and J.L. Mc Intyre, J.L. 1979. Possible methods to control pear blast, caused by Pseudomonas syringae. Pl. Dis. Rep. 61:311-312.
144. Sands, D.C., and J.L. Mc Intyre. 1977. Citrate and tartrate sprays for reduction of Erwinia amylovora and Pseudomonas syringae. Pl. Dis. Rep. 61:823-827.
145. Savastano, L. 1886. Les maladies de l'olivier hyperplasies et tumeurs. Compt. Rend. Acad. Agr. france. 103:1278.
146. Schroth, M.N., and J.W. Osgood. 1971. Relationship between the olive knot disease and reduced yield. San Francisco. 25:1.
147. Shane, W.W., and J.S. Baumer. 1987. Population dynamics of Pseudomonas syringae pv. syringae on spring wheat. Phytopathol. 77:1399-1405.
148. Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observation on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van leuwnhoek. 23:15-22.

149. Sinden, S.L., De Vay, J.E., and P.A. Backman. 1971. Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by Pseudomonas. syringae, and its role in the bacterial canker disease of peach trees. Physiol. Pl. Pathol. 1:199-213.
150. Skoric, V. 1938. Jasenov rak injegov uzronik. (The ash canker and its causal organism). Glasn. Sum. Pok. 6:66-97.
151. Smidt, M. and T. Kosuge. 1976. Role of indole-3-acetic acid production in pathogenicity of Pseudomonas. savastanoi on olives and oleanders. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 3:270.
152. Smidt, M., and T. Kosuge. 1978. The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan-resistant mutants of Pseudomonas. savastanoi in gall formation on oleander. Physiol. Pl. Pathol. 13:203-214.
153. Smith, C.O. 1906. A bacterial disease of oleander. Bat. Gaz. 42:416-417.
154. Smith, C.O. 1928. Oleander bacteriosis in California. Physiopathol. 18:503-518.
155. Smith, E.F., and J.B. Rorer. 1904. The olive tubercle. Sci. N.Y. 19:416-417.
156. Sneath, P.H.A. 1957. The application of computer to taxonomy. J. Gen. Microbiol. 17:201-226.
157. Sneath, P.H.A. 1968. The vigour and pattern in taxonomy. J. Gen. Microbiol. 54:1-11.
158. Sneath, P.H.A. 1983. Philosophy and method in biological classification. p. 22-37. In J. Felsenstein (ed.), Numerical taxonomy, Springer-Verlag, Berlin, New-York and Tokyo.
159. Sneath, P.H.A. 1984. Numerical taxonomy, p.5-7. In N.R. Krieg and J.G Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1, The williams & wilkins Co., Baltimore.
160. Sobiczewski, P. 1987. Antagonistic bacteria in relation to Pseudomonas. syringae pv. syringae occurring in necrosis and cankers of sour cherry trees. Fruit. Sci. Rep. 14:179-185.
161. Stanier, R.Y. 1976. Reflexion sur la taxonomie de Pseudomonas. Bul. Ins. Pasteur. 74:225-270.
162. Stanier, R.Y. Palleroni, N.J., and M. Doudoroff. The aerobic Pseudomonads : a taxonomie study. J. Gen. Microbiol. 43:159-217.
163. Sule, S., and E. Seemuller. 1987. The role of ice formation in the infection of source cherry leaves by Pseudomonas. syringae pv. syringae. Phytopathol. 77:173-177.
164. Surico, G., Sparapano, L., Lerario, P., Durbin, R.D., and N. Icobellis. 1975. Cytokinin like activity extracts from culture filtrates of Pseudomonas. savastanoi. Exp. 31:929-930.

165. Surico, G., and N.C. Iacobellis . 1984. Correlation between phytohormone production, presence of plasmide and olive knot disease caused by strains of Pseudomonas. syringae pv. savastanoi. Proceedings of the 2nd working groupe on Pseudomonas. syringae pathovar. Sounion (Greece), April 1984. p.30-32.
166. Surico, G., Iacobellis, N.S., and A. Sisto. 1984. Recent advences in the study of pathogenic mechanisms in Pseudomonas. syringae pv. savastanoi causing olive knot disease. Phytobacteriology and plant bacterial disease of quarantine significance. Roma-Italy, Septembre 1984. p.61-64.
167. Surico, G., Evidente, A., Iacobellis, N.S., and G.Randazzo. 1985. A cytokinin from the culture filtrate of Pseudomonas. syringae pv. savastanoi. Phytochemis. 24:1499-1502.
168. Sutic, D., and W.J. Dowson. 1963. Microbiological characteristics of some isolates and varieties of Pseudomonas. savastanoi (Smith) stevens. Phytopathol. 2:159-160.
169. Sutic, D. and W.J. Dowson. 1963. The reaction of olive, oleander and ash, cross inoculated with some strains and forms of Pseudomonas. savastanoi (Smith ) Stevens. Phytopathol. Z. 46:305-314.
170. Testu, C. 1972. Arbustes et Arbrisseaux de nos jardins. La maison rustique.
171. Thornley, M.J. 1960. The differenciation of Pseudomonas from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. App. Bacteriol. 23:37-52.
172. Vavaro, L. 1983. Effects of temperature on multiplication of Pseudomonas. syringae pv. savastanoi (Smith) Young et al. Phytopathol. mediteranea. 22:39-46.
173. Véron, M. 1974. Sur un citère de calcul du meilleur niveau de coupure d'un dendrogramme de classification hiérarchique. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 125b:29-44.
174. Véron, M. 1982. Taxonomie bactérienne, p..L. Le Minor and M. véron (ed.), Bactériologie médicale, Flammarion, Paris, France.
175. Viji Pal, Gardan, L. Manceau, C., and M. Ride. 1984. evidence on the presnce of plasmid species in Pseudomonas. syringae pv. savastanoi from ash, Oleander and olive. Proceedings of the 2nd working group on Pseudomonas. syringae pathovars. Sonion, (Greece), 24-28 april 1984, 95-97.
176. Williams, J. 1985. Cladistis and evolution of proteins, p. 61-90. In M. Goodfellow , D. Jones, and F.G. Priest (ed.), Computer-assisted bacterial Systematic, Academic Press, London
177. Wilson, E.E. and A. Magie. 1963. Host physiological and phage relations of Pseudomonas. savastanoi and P. tonelliana. Phytopathol. 52:33.

178. Wilson, E.E. and A. Magie. 1963. Physiological serological and pathological evidence that Pseudomonas. tonelliana is identical with P. savastanoi. Phytopathol. 53:653-659.
179. Wilson, E.E. and A. Magie. 1935. The olive knot disease its inception. Developpement and control. Hilgardia. 9:233-264.
180. Wilson, E.E. and A. Magie. 1963. Pathological histology of tumors induced in oleander by P. savastanoi. Phytopathol. 53:893-894.
181. Wilson, E.E. and M.G. Heskett. 1968. Oxidative metabolic patterns displayed by P. savastanoi on carbohydrate and amino-substrates. Abstract olive-D oleander-D-phytopathology. 58:1072-1073.
182. Wilson, E.E., Heskett, M.G., Johson, M.L., and T. Kosuge. 1972. Metabolic behavior of Pseudomonas. savastanoi isolates from olive and oleander on certain carbohydrate and amino substrates. Phytopathol. 62:349-355.
183. Wimalajeewa, D.L.S. 1987. Sesonal variation in susceptibility of apricot to P. syringae pv. syringae (bacterial canker) and cherry. Australian J. Exper. Agr. 27:475-479.
184. Wimalajeewa, D.L.S. and J.D. Flett 1985. A study of populations of P. syringae on stone fruits in Victoria. Pl. Pathol. 34:248-254.
185. Woese, C.R., E. Stackebrant and W.C. Weisburn. 1984. The phylogeny of puple bacteria. The alpha subdivision. Syst. Appl. Microbiol. 5:315-326.
186. Woese, C.R. and B.J. Weisburn. 1984. The pathogeny of purplebacteria. The beta subdivision. Syst. Appl. Microbiol. 5:327-336.
187. Xu, G.W., and D.C. Gross. 1988. Evaluation of the role of syringomycin in plant pathogenesis by using Tn5 mutants of P. syringae pv. syringae detective in syringomycin production. Appl. Env. Microbiol. 54:1345-1354.
188. Yahiaoui, M. 1977. Contribution à l'étude écologique et biologique de P. savastanoi (Smith) stevens agent de la tuberculose de l'olivier en Algerie. Thèse d'ingenieur agronome. 99 p.
189. Yamanaka, S., Osaki, M., and S. Kato. 1980. Some observations on angular leaf spot of cucumber with a scanning electron microscope. Tohoku. J. Agr. Res. 30:135-141.
190. Young, J.M., Deye D.E., Bradbury, J.F. and G.C. Panagopoulos. 1978. Proposed nomenclature and classification for plant payhogenic bacteria. Angers. 779-784.
191. Zaletova, E., and C. Paulech. 1978. Dynamique saisonnière de l'intensite photosynthetique des espèces de Prunus laurocerasus. J. Gen. Microbiol. 132:3393-3401.

192. Zamze, S.E. and R.C. Hignett. 1986. Comparaison of lipopolysaccharides from P. syringae pv. syringae and a serological comparaison with lipopolysaccharide from P. syringae pv. morsprunorum. J. Gen. Microbiol. 32:3393-3401.
193. Zhang, L. and J.Y. Takemoto. 1987. Pseudomonas phytotoxin , syringomycin stimulans the plsma membrane functions ATPase of Rhodotorula. pilimanae. Phytopathol. 75:1381.



**REPROGRAPHIE CRILLON**  
**1-Rue Crillon-1**  
**13005 MARSEILLE**  
**Tél : (91) 48.65.12**