

UNIVERSITE ABOUBAKR Belkaid - TLEMCCEN-

INSTITUT DE BIOLOGIE

THESE

Pour l'obtention du Magister
en Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par:

Mme Samia MEZAACHE

M 12/02

Thème

**Antagonisme de souches de *Pseudomonas* vis à vis
de la microflore pathogène de la pomme de terre**

devant le jury:

Président:	Mr. N.E. KARAM	M.c. Univ. Oran
Promoteur:	Mme. E. LUKASOVA	M.c. Univ. Sétif
Co-Promoteur:	Mr. A. GUECHI	M.c. Univ. Sétif
Examineurs:	Mr. Dj.E. ABDELOUAHID	M.a. Univ. Tlemcen
	Mr.L. LAROUS	M.c. Univ. Sétif
	Mr. A. BENSOLTANE	M.c. Univ. Oran

Dec. 1997



UNIVERSITE ABOUBAKR Belkaid - TLEMCEM-

INSTITUT DE BIOLOGIE

THÈSE

Pour l'obtention du Magister
en Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par:

Mme Samia MEZAACHE

Thème

**Antagonisme de souches de *Pseudomonas* vis à vis
de la microflore pathogène de la pomme de terre**

devant le jury:

Président:	Mr. N.E. KARAM	M.c. Univ. Oran
Promoteur:	Mme. E. LUKASOVA	M.c. Univ. Sétif
Co-Promoteur:	Mr. A. GUECHI	M.c. Univ. Sétif
Examineurs:	Mr. Dj.E. ABDELOUAHID	M.a. Univ. Tlemcen
	Mr.L. LAROUS	M.c. Univ. Sétif
	Mr. A. BENSOLTANE	M.c. Univ. Oran

DEDICACES

A mes très chers parents qui m'ont longtemps soutenu et encouragé .

A mon époux Salim, et mon adorable fille Nihel- Belkis

A mes frères et soeurs, Fouzia, Samir Nadia Kichem et Nina

A ma grand mère

A mes Oncles et Tantes surtout Messaouda et Leila .

A mes Belles soeurs et Beaux frères surtout Abdemalek

A mes Beaux parents

A mes collègues de Flenzen, Nihel Mohamed Chokri Lotfi et Okacha

A mes collègues de Sétif surtout Leila

En témoignage de ma profonde affection .

Samia

REMERCIEMENTS

Mes plus vifs et sincères remerciements vont à Madame *MUKASOVA* Emilie ancien maître de conférence à l'institut des Sciences Biologiques de l'Université Ferhat Abbes de Sétif qui a bien voulu guider et juger ce travail tout au long de sa réalisation. Elle m'a continuellement guidé et aidé au cours de mes activités de recherche, même après son retour en république Tchèque.

En témoignage de ma gratitude et reconnaissance.

Je remercie vivement Monsieur *MECHA* Abdelhadi, maître de conférence à l'institut des Sciences Biologiques de l'Université de Sétif, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, pour l'aide qu'il m'a apportée et pour la confiance qu'il m'a honorée.

En témoignage de ma gratitude et reconnaissance.

Je témoigne ma grande et sincère reconnaissance aux responsables l'institut des Sciences Biologiques de l'Université de Sétif, pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de l'institut.

En témoignage de ma gratitude et reconnaissance.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur *KARAM* maître de conférence à l'U.S.7 d'Oran pour l'honneur qu'il me fait d'avoir bien voulu accepter de jurer ce travail et de présider le jury de ma thèse.

Mes vifs remerciements vont aussi à Monsieur *ABDELMAHED* maître de conférence à l'Institut de Biologie de Nemcen, à Monsieur *LAROISS* maître de conférence à l'institut de Biologie de Sétif, et Monsieur *BENSOLTANE* maître de conférence l'U.S.7 d'Oran, d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

En témoignage de ma gratitude et reconnaissance.

Je témoigne ma grande reconnaissance à mes tantes Mésaouda et Leïla pour leur aide précieuse à l'élaboration de ce travail .

Je remercie enfin mon Beau-Frère Abdelmalek pour m'avoir aidé à élaborer le manuscrit, ainsi que mon Mari Salim pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée tout au long de la réalisation de ce travail .

A tous Ceux qui, de loin ou de près ont contribué à la réalisation de cette Thèse.

Samia

Sommaire

Abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Revue bibliographique

I- Bactéries de la rizosphère des plantes	4
1 - Bactéries bénéfiques.	5
2 - Bactéries inhibitrices.	9
3 - Bactéries pathogènes.	11
3-1 - Définition.	11
3-2 - Mode d'infection.	11
3-3 - Les gènes gouvernant la pathogénicité.	12
3-4 - Exemples de micro-organismes pathogènes .	13
3-4-1- Agrobacterium tuméfaciens.	13
3- 4-2- Les Pseudomonas phytopathogènes.	14
3-4-2-1- Production d'exopolysaccharides.	16
3-4-2-2- Enzymes pectolytiques.	16
3-4-2-3- Production d'auxine.	17
3-4-2-4- Toxines.	18
3-4-2-5- Plasmide de virulence.	19
II -Facteurs influençant l'activité de biocontrôle des bactéries	21
1- Antibiotiques et leurs rôle dans la compétence écologique.	22
2- Sidérophores.	25
III - Amélioration des souches utilisées pour le biocontrôle.	29
1 - Recombinaisons et facteurs génétiques.	29
1-1- Augmentation de la production des métabolites importants pour le biocontrôle.	30
1-2- Transfert des gènes importants pour le biocontrôle à d'autres souches.	31

Partie pratique

1- Prélèvements.	34
2- Préparation de l'échantillon.	34
a- Ensemencement.	34

b- Incubation.	34
3- Isolement.	34
4- Identification des Pseudomonas.	34
4-1 Identification présumptive des Pseudomonas.	34
4-1-1- Recherche de l'oxydase.	35
4-1-2- Métabolisme de glucose.	35
4-1-3- Capacité respiratoire des bactéries.	35
4-1-4- Production des pigments chez les souches sélectionnées.	36
4-1-5- Recherche de la catalase.	36
4-1-6- Réduction de citrate.	36
4-2- Identification des espèces de Pseudomonas.	36
4-2-1- Capacité des souches de se développer à différentes températures.	36
4-2-2- Production d'H ₂ S.	36
4-2-3- Hydrolyse de la gélatine.	37
4-2-4- ADH et LDC.	37
4-2-5- Test LOPAT .	37
5- Dosage de la résistance .	38
5-1- Dosage de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds en milieu liquide.	38
5-2- Dosage de la résistance aux antibiotiques en milieu solide.	39
5-3- Mise en évidence de la B.lactamase de type oxa.	39
6- Le curage	40
7- Transfert des plasmides par conjugaison .	43
a- Mise en évidence des transconjuguants.	43
8- Extraction des plasmides.	43
9- Mise en évidence de la production de phénazines et bactériocine.	45
9-1- Tests des propriétés biologiques des Pseudomonas.	45
9-1-1- Suppression fongique selon Vincent et Al 1991.	45
9-1-2- Suppression fongique selon James et Gutterson 1986.	46
9-1-3- Production de bactériocine.	46
9-2- Tests de pathogénicité pour la pomme de terre.	48
9-3- Extraction des Phénazines.	48
a- Méthode d'extraction.	48
b- Fractionnement de l'extrait brut.	49

RESULTATS

1- Isolement et Identification des souches de <i>Pseudomonas</i> de la rhizosphère de la pomme de terre.	51
2 - Evaluation de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds.	53
3- Extraction et visualisation de DNA Plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose	57
4 - Elimination des plasmides.	59
4-1- Modification du spectre de résistance des souches curées.	59
4-2- Effet du curage sur la présence du DNA plasmidique.	59
4-3- Effet du curage sur les propriétés des bactéries.	60
4-4- AntibioGramme des souches curées.	62
5- Transfert des plasmides par conjugaison.	62
1 - visualisation des plasmides.	62
2- visualisation des plasmides chez les transconjuguants.	64
6- Effet des souches de <i>Pseudomonas</i> sur la croissance de la pomme de terre	64
7- Mise en évidence de la production de phénazine et de bactériocine respectivement par la souche <i>Pseudomonas aureofaciens</i> sauvage et la souche <i>Pseudomonas aureofaciens</i> traitée à la ciprofloxacine.	65
8- Spectres d'absorption des substances actives produites par la souche No2 (<i>Pseudomonas aureofaciens</i>).	74

Discussion.

1- Caractérisation des <i>Pseudomonas</i> .	77
2- Caractéristiques des plasmides.	78
3-Pathogénicité et suppression.	81

Conclusion.	87
--------------------	-----------

Annexe..

Références bibliographiques.

Résumé.

Abréviations

- ADH	Arginine dihydrolase.
- CCM	Chromatographie en couche mince.
- CMI	Concentration minimale inhibitrice.
- Cor ⁻	Coronatine négative .
- DRB	Rhizobacteries délétaires.
- DRMO	Micro-organismes délétaires de la rhizosphère.
- EPS	Exopolysaccharide.
- E.Coli	<i>Escherichia coli</i> .
- Gram -	Gram négative.
- HCN	Cyanide d'hydrogène.
- HPLC	Chromatographie liquide haute performance.
- I	Intermédiaire
- IAA	Indole 3 Acetic - Acid.
- Kb	Kilos - base .
- Kd	Kilos - dalton .
- Lac ⁻	Auxotrophie au lactose
- LDC	Lysine décarboxylase.
- mM	Milli - molaire .
- Mdal	Méga - daltons .
- Pao 25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> portant le plasmide R 6845.
- Pao 303	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> portant le plasmide RP1.
- PCA	Phénazine 1 carboxylic acid.
- 2-oH-PCA	2 hydroxyphenazine 1 - carboxylic acid .
- PDA	Potato - Dextrose -Agar.
- PGPR	Rhizobactéries qui améliorent la croissance des plantes.
- Phz	Phénazine .
- 2oH-Phz	2 hydroxy-phénazine.
- Phz ⁻	Phénazine négative .
- PhL	2, 4 diacetyl phloroglucinol.
- Plt	Pyolutéorine.
- pTi	Plasmid - tumor - inducing (plasmide induisant la tumeur).
- Rf	Rapport - frontal.
- R	Résistant.
- Sid ⁻	Sidérophore négative.
- S	Sensible.
- Syr ⁻	Syrim gomycine négative .
- TDNA	DNA de la tumeur.
- TFD	l'acide 2,4-dichloro phenoxyacétique .
- TOX ⁻	Toxine négative.
- UV	Ultra - violet.
- UDP	Uridine diphosphate
- UDPGal	Uridine diphosphate galactose.
- ug/ml	Microgramme par ml .
- Tn5	Tranoposon Tn5.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : Distribution des phytotoxines bactériennes selon le genre .	20
TABLEAU II : Représentant les plus importants tests utilisés pour l'identification des souches.	52
TABLEAU III : CMI en ug/ml.	54
TABLEAU IV : Résistance et sensibilité des souches aux antibiotiques et métaux lourds.	55
TABLEAU V : Représentant la présence de la B.Lactamase oxa chez les souches sauvages (originelles) et les souches curées (traitées).	60
TABLEAU VI : Efficacité du curage par la ciprofloxacine .	60
TABLEAU VII : CMI en ug/ml de quelques antibiotiques et le cadmium des souches curées.	60
TABLEAU VIII : Effet de l'extrait brut de la culture de <i>Pseudomonas auréofaciens</i> (souche n°2 sur la croissance de <i>Fusarium oxysporum</i> et <i>Fusarium solani</i> .	69
TABLEAU IX : Effet antifongique des extraits des tâches séparées par CCM de l'extrait brut de <i>Pseudomonas auréofaciens</i> -souche n°2- .	70
TABLEAU X : Caractéristiques des fractions d'extrait séparés par CCM . a: souche sauvage. b: souche traitée.	71
TABLEAU XI : Effet antibactérien des tâches séparées par CCM de l'extrait brut de la culture de <i>Pseudomonas auréofaciens</i> (souche n°2) traitée à la ciprofloxacine .	73
TABLEAU XII : Production de bactériocine par la souche n°2 (<i>Pseudomonas aureofaciens</i>).	73

Liste des Figures

Figure 1 : Interaction entre PGPR et DRB.	8
Figure 2 : Représentation de l'assimilation du fer par des micro-organismes aérobiques.	26
Figure 3 : Méthode de réplique sur tampon velours.	42
Figure 4 : Schémas de la suppression fongique.	47
Figure 5 : Distribution des souches en fonction de la résistance aux différents antibiotiques et métaux lourds étudiés.	56
Figure 6 : Schéma de l'électrophoréogramme du DNA plasmidique extrait par la méthode de Grinsted.	58
Figure 7 : Électrophoréogramme de quelques souches sauvages, curées et d'un transconjuguant selon la méthode de Felliciello.	61
Figure 8 : Antibiogramme de la souche 2 sauvage et curée (traitée).	63
Figure 9 : Pathogénicité des souches 10 et 12 vis à vis de la pomme de terre.	
a: Infection des tranches de pomme de terre.	66
b: Infection des pieds de pomme de terre.	67
Figure 10 : Suppression des champignons par <i>Pseudomonas auréofaciens</i> (souche n°2).	68
Figure 11 : Activité inhibitrice de l'extrait brut de <i>Pseudomonas auréofaciens</i> traitée vis à vis de 2 souches phytopathogènes.	72
Figure 12 : Spectres d'absorption des tâches 7 et 8 actives de l'extrait de la souche n°2 (<i>Pseudomonas aureofaciens</i>).	75

Introduction

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

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

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

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

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

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

Vu l'importance de ces espèces dans le biocontrôle et aussi l'amélioration des cultures, certaines souches sont phytopathogènes par contre l'une d'entre elles est bénéfique. Nous avons effectué des essais afin d'extraire le principe actif de cette dernière d'une part, et d'autre part, nous avons effectué des essais

complémentaires afin de nous persuader de l'effectivité de l'extrait vis à vis des bactéries et de 2 champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* ,*Fusarium solani*).

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

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I- BACTERIES DE LA RHIZOSPHERE DES PLANTES

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

- les pathogènes majeurs (vrais) qui traversent la stèle et détruisent le phloème donnent ainsi les symptômes de la maladie .

- les pathogènes mineurs (saprophytes ou parasites) qui affectent les cellules corticales et les radicelles (Schippers et *al.*, 1987). A l'intérieur de cette catégorie on retrouve les micro-organismes de la rhizosphère affectant les plantes par leurs métabolites sans pour autant parasiter le tissu,et sont nommés micro-organismes délétaires (Elliott et Frederickson,1985 b; Schippers et *al.*, 1987) D R M O , ou inhibiteurs qui comportent aussi bien des champignons que des bactéries (Schippers et *al.*, 1987). Leurs pathogénicité est difficile à démontrer parceque leur effet sur la plante est toujours limité au retardement de la croissance des racines et/ ou des pousses sans autres symptomes (Elliot v et *al.*, 1987, Schippers et *al.*, 1987).

Les Pseudomonas sont un groupe d'Organismes hétérogène. Elles peuvent être retrouvées dans l'eau, le sol,colonisant ou pathogènes des plantes, chez les animaux et l'homme . Pseudomonas est un mot composé de 2unités : pseudo = faux et Monas = unité.

Ce sont en fait des bacilles gram négatives flagellées aux pôles .

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

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

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

1- Bactéries bénéfiques:

Les micro-organismes bénéfiques de la rhizosphère incluent aussi bien les Symbiotiques (rhizobium, certaines actinomycètes, et les champignons mycorrhizae), ainsi que les saprophytes qui augmentent la disponibilité des nutriments ou les substances nécessaires (Schippers et al., 1987) à la croissance des plantes, ou encore la suppression des parasites et des pathogènes non-parasites, ces micro-organismes sont dits PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) (Schippers et al., 1987, Thomashow et Weller 1993 b). L'effet des PGPR sur la croissance est soit dû à l'inhibition des pathogènes mineurs ou DRB (Schippers et al., 1987) soit à l'action de stimulation directe sur la plante (Thomashow et Weller, 1993 b).

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

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

Bacillus sp. a aussi été utilisé pour ses effets de biocontrôle. *Bacillus subtilis* A13 inhibe in vitro un grand nombre de pathogènes, et stimule la croissance de plusieurs plantes, quand les graines sont traitées avec A13, on observe une augmentation de 48% des carottes et 37% des arachides. A13 est suppressif aussi bien pour les pathogènes mineurs que majeurs, et est commercialisé comme traitement pour l'Arachide (Weller 1988). LE traitement des graines est donc une bonne méthode pour introduire les agents de biocontrôle dans le sol (Chao et al., 1986; O'ssullivan et al., 1988). Les PGPR ainsi que celles douées d'activité suppressive vis à vis des pathogènes majeurs ne peuvent être séparées. La plupart des souches sont suppressives vis à vis des pathogènes mineurs et majeurs (Weller 1988). Certaines *Pseudomonas* fluorescentes sont connues pour leur effet bénéfique pour les plantes (Bashan, 1986 ; Thomashow et Weller, 1988). Ces *Pseudomonas* colonisent les racines, les protègent contre les pathogènes (Thomashow et Weller, 1988), et contribuent à leur croissance d'où l'augmentation

des rendements des cultures (Bashan 1986). Quand ces PGPR sont appliquées aux graines ou tubercules, elles colonisent la surface et l'intérieur des racines ainsi que les canaux de la rhizosphère qui permettent l'accès physique aux racines. Leurs emplacement, leur permet de limiter la présence de pathogènes sur les racines (Thomashow et Weller, 1993 b). Il a été rapporté que *Pseudomonas putida* WLS 358 est une souche stimulant la croissance des plantes (Degroot et al., 1991), selon Burr et al., les souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* appliquées aux graines, augmenteraient la croissance des pommes de terre (Leong, 1986 ; Weller, 1988). EN effet, les *Pseudomonas* fluorescentes augmenteraient le rendement des pommes de terre de 5 à 33% , cette augmentation est dûe en premier lieu à la suppression de la production d'HCN par les DRMO (Weller, 1988, O'ssullivan et O'gara, 1988) par :

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

B- colonisation agressive des racines de plantes.

C- Utilisation des exsudats de plantes.

D-Production de substances antimycotiques (O'ssullivan et O'gara, 1988).

Certains traits importants pour le biocontrôle peuvent être perdus par mutations (Weller1988).La mobilité des *Pseudomonas* fluorescentes est essentielle pour la colonisation des racines (Bashan, 1986 ; Schippers et al., 1987) de pommes de terre, les mutants dépourvus de flagelles ne peuvent plus coloniser les racines (Schippers et al., 1987). D'autre part, les E.P.S et les protéines confèrent à la cellule bactérienne un espace d'Interactions avec les cellules de plantes, leur absence influencerait les propriétés adhésives de la bactérie (schippers et al., 1987; Weller, 1988). Toutefois, Les mutants siderophores négatives n'ont aucune action sur la colonisation.

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

De plus, dans des conditions de stress les plants de pomme de terre libèrent la proline en grande quantité. Cette dernière stimule la production d'HCN (Shippers et al., 1987). Tout ceci suggère que les mécanismes d'antagonisme entre bénéfiques et délétaires ont pour base la disponibilité des ions Fe^{3+} . Les souches

bénéfiques inhiberaient la croissance des souches délétaires en les privant de fer, car les souches délétaires ne peuvent utiliser les siderophores des souches bénéfiques, alors que les souches délétaires résistantes aux souches bénéfiques peuvent utiliser les siderophores des souches bénéfiques (Léong, 1986), (fig 1).

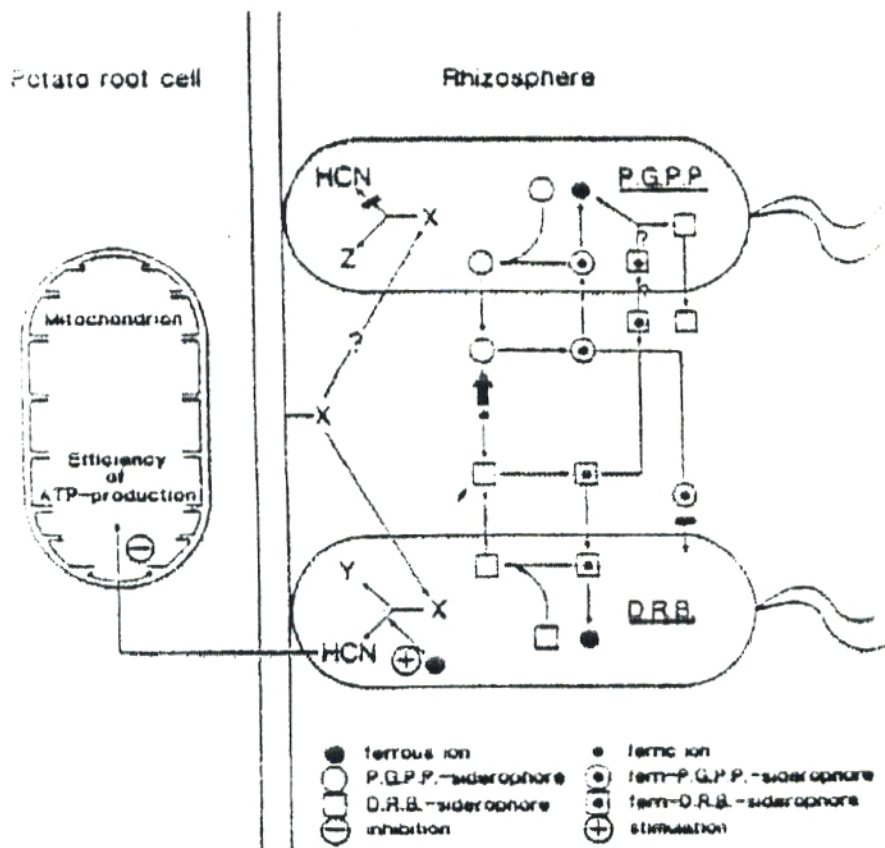


Fig 1: Interactions entre PGPR et DRB (Schippers et al., 1987)

DRB : Rhizo-bactéries délétaires

PGPP : Rhizo-bactéries qui améliorent la croissance des plantes.

- X, Y et Z représentent les voies métaboliques n'aboutissant pas à la production d'HCN.

2-Bactéries inhibitrices

Woltz 1978 (in Elliott et Frederickson, 1985b) a nommé ces micro-organismes pathogènes non parasites ou exopathogènes. Les exopathogènes sont des micro-organismes qui vivent sur la superficie des plantes(et éventuellement le rhizoplan) (Elliott et Frederickson, 1985b) et affectent les racines en altérant les systèmes responsables de l'apport en eau, ions et substances nutritives (Schippers et al. ,1987). Cette affection, est, en fait, le résultat de la libération d'une toxine hydrosoluble absorbée par la plante (Elliott et Frederickson, 1985b).

Cette toxine produit des réactions métaboliques anormales (Elliott et Frederickson, 1985b et Elliott et Cherington, 1987) des nécroses, affection de la croissance (Elliott et Cherington, 1987) : par inhibition de la germination, retardement de la croissance des racines, distorsion et lésions de celles-ci les prédisposants à des affections fongiques (Elliott 1985 a,b,c et 1987 a; et Schippers et al. 1987). Les souches de rhizobactéries délétaires sont aussi dites DRB, et sont regroupées en : *Pseudomonas* fluorescentes, *flavobacterium*, *citrobacter*, *enterobacter* , *klebsiella*, *achromobacter*, *arthrobacter*, *chromobacterium*, *Bacillus* *sp* et enfin les *Pseudomonas* non fluorescentes (Elliott et Cherington, 1987). C'est depuis 1961 qu'on a suspecté la responsabilité des *Pseudomonas* *sp*, dans le retardement de la croissance des plantes et l'inhibition de la formation de radicelles (Schippers et al. ,1987) et donc une diminution des rendements lors des cultures répétées (Elliott, 1984, Elliot et Lynch, 1985 a et b, Schippers et al. , 1987). Elles sont retrouvées en un nombre élevé sur les racines (rhizoplan) par rapport à la terre qui les entoure(rhizosphère) (Elliott et Lynch, 1985, Schippers et al. 1987). Les *Pseudomonas* saprophytes colonisent communément et abondamment les racines d'orge, de lentilles, de pois, d'avoine, de blé (Elliot et al.1987, Elliott et Bolton, 1989) et de pommes de terre sont pour la plupart des DRB, et sont douées d'une activité de décomposition vis à vis des résidus de leurs hôte, sur lesquels elles peuvent survivre et inoculer par la suite des cultures suivantes (Elliot ,1984, Elliott et Lynch,1985 et Elliott et Frederickson 1985b, Schippers et al. ,1987). La présence d'un grand nombre de *Pseudomonas* inhibitrices sur les racines est due à une compétition d'espace et/ou nutritivement sur la surface racinaire: quand la population microbienne est naturellement basse, la flore inhibitrice augmente par diminution de la compétition (Elliott et Frederickson, 1985b). Les *Pseudomonas* sont un groupe produisant une variété de métabolites secondaires inhibiteurs

(Elliott et Frederickson, 1985b) dépendants des facteurs environnants (eau, température, résidus, inoculum) (Elliott et al. 1987). Ce sont en fait des *Pseudomonas* non fluorescentes psychrophilles et mésophilles (Elliott et Bolton, 1989) instables lorsqu'elles sont transférées sur des milieux de culture (Elliott et Lynch, 1985 et Elliott et Frederickson a).

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

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

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

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

2- son utilisation pour le biocontrôle des mauvaises herbes.

3- colonisation agressive du rhizoplan (Elliott et al. , 1988), de plus le traitement des tubercules de pomme de terre infectées par *Pseudomonas solanacearum*, avec des souches de *Pseudomonas fluorescens* (exp *Pseudomonas fluorescens w163*),

révèle une régression notable de la maladie (Kempe et al. , 1983).

3 - Bactéries pathogènes

3-1- Définition:

Un pathogène est un membre des espèces microbiennes où la virulence détermine la tendance nuisible de la souche pathogène (Isenberg, 1988).

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

Deux qualités sont visuellement présentes dans la pathogénicité :

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

gouvernée par un groupe de gènes (Kerr 1987).

3-2-Mode d'Infection

l'infection implique en fait un groupe de phénomènes :

- Le mouvement des pathogènes vers l'hôte.
- Attachement du pathogène sur la surface de la plante.

- Prolifération du pathogène à l'intérieur de l'hôte immédiatement après son entrée (Lorenzo et Martinez 1988; Sheng-Huang, 1986).

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

Quant à la pénétration elle peut se faire soit :

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

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

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

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

e: par les surfaces intactes:Les bactéries phytopathogènes étant dépourvues de structures de pénétration.

Une théorie a été émise. Selon laquelle, il y aurait invagination du mur des cellules chevelues de la racine formant ainsi le filament tubulaire de l'infection, exemple : *Erwinia chrysanthemi* pv *deffenbachiae* (Sheng-huang, 1986).

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

3-3 Les Gènes gouvernant la pathogénicité

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

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

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

c: gènes spécifique de l'hôte.

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

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

3-4- Exemple de micro-organismes pathogènes

On a pris 2 exemples de bactéries phytopathogènes.

3-4-1- *Agrobacterium tuméfaciens*

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

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

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

La libération d'acétylsyringone par les cellules de plantes est reconnue par la bactérie via les gènes vir A et vir G (système de transduction des signaux), résultant en l'induction des gènes de virulence et éventuellement de l'excision et le transfert du T-DNA de la bactérie vers la plante. Un autre signal induit l'expression des gènes de virulence, ce sont les opines sécrétées par les tumeurs de la galle qui sont des métabolites de faible poids moléculaire, et sont responsables du catabolisme des opines par la bactérie (Rong et al. , 1990). Les opines sont en fait « la raison d'être » des galles de couronnes (kerr1987). En plus, certaines opines dites conjugales stimulent le transfert du Ti entre les cellules d'*Agrobacterium* (Rong et al. , 1990). Certaines mutations des gènes vir affecteraient semble-t-il la conjugaison inductible du plasmide Ti (Djordjevic et al. , 1987, Rong et al. , 1990) et par conséquent affecteraient la pathogénicité. Par contre, les mutations dues à l'insertion du transposon Tn5 dans le Ti résulteraient en mutants avec plus de

spécificité (Djordjevic et al. , 1987). En plus de ce que nous avons cité, les polysaccharides acidiques semblent induire certains gènes chromosomaux d'*Agrobacterium*. Ces polysaccharides acides dériveraient en fait de la partie pectique de la paroi cellulaire des plantes (Rong et al. , 1990). Avant d'induire la galle *Agrobacterium tumefaciens* devrait s'attacher aux cellules de plantes (Kerr 1987), cet attachement est sous le contrôle de 2 gènes (Djordjevic et al., 1987, Kerr, 1987) chromosomaux (Kerr, 1987) dont l'un codant le b-1,2-glucane qui est un exopolysaccharide (Djordjevic et al. , 1987, Kerr, 1987).

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

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

3-4-2- Les *Pseudomonas* phytopathogènes

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

Pseudomonas syringae (regroupant 40 sous espèces) et *Pseudomonas cicchori*, alors que *Pseudomonas marginalis* ressemble à la souche saprophyte *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. Ces *Pseudomonas* sont aérobies stricts, sont incapables de croître à 37°C, oxydase négative à l'exception de *Pseudomonas cicchori*, produisent une réaction hypersensitive sur les feuilles de tabacs, sont arginine dihydrolase négative, et croissent à un taux lent par rapport aux *Pseudomonas* saprophytes. Les différents symptômes produits par les *Pseudomonas* phytopathogènes sur les plantes, sont dues aux substances excrétées par les bactéries , on retrouve : les enzymes capables d'attaquer une variété de composés cellulaires des tissus de plantes, des toxines, et des hormones de plantes. Au sein des hormones hydrolytiques on retrouve les β -glucosidases, xylosidases, xylanases, pectinases, et les plus communes sont la trans-éliminase polygalacturonique et la cellulase. De plus, la majorité des variétés

de *Pseudomonas syringae* sinon toutes produisent des peptides toxiques (toxines) (Zannoni, 1989) syringomycine, syringotoxine, (Zannoni, 1989; Gross, 1991) coronatine (Bender et al. ,1987 et Bender,1991; Gross, 1991; Mitchell et Frey, 1986; Sakamura et al., 1988) rhizobitoxine (Mitchell et al. , 1986), tabtoxine, phaseolotoxine, tagetitoxine (Gross, 1991) etc...

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3-4-2-1- Production d'exopolysaccharides (E.P.S)

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

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

3-4-2-2- Enzymes pectolytiques

Les phytopathogènes produisent une variété d'enzymes qui sont capables d'attaquer les polymères pectiques des cellules de plantes, il s'agit en fait d'enzymes pectolytiques (Kerr 1987, Collmer et al. , 1986) qui dans certains cas clivent les polymères pectiques de l'exoderme de la lamelle moyenne facilitant ainsi la pénétration et la colonisation par le pathogène (Collmer et al. , 1986). C'est un groupe d'enzymes dégradant le polypectate par clivage des ponts 1,4 glycosidique

entre les monomères adjacents d'acide uronique par un mécanisme de transélimination (Kerr, 1987).

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

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

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

3-4-2-3- Production d'auxine

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

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

L'autre voie commune à *Agrobacterium-tumefaciens* et *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Fett et al., 1987; Kerr et al., 1987): Le tryptophane est décarboxylé par une monooxygénase en I A M (Indole-3-acétamide) suivie d'une désamination par une hydrolase pour avoir l'I A A (Fett et al., 1987). Deux gènes interviennent dans cette voie respectivement *iaa M* et *iaa H*, qui sont situés sur le

même operon et donc sont sous le même contrôle de régulation (Shaw 1988; Kerr 1987), un troisième gène *iaaL* séparé des deux autres par 2Kb, est responsable de la formation d'un conjugué entre IAA et la lysine pour protéger l'auxine contre la dégradation (Kerr 1987). Alors que ces gènes dans le cas d'*Agrobacterium* sont exclusivement portés par le pTi, dans le cas de *Pseudomonas syringae* *pv.savastanoi* ils peuvent être portés soit par un plasmide (Boucher et al. , 1986, Fett et al. , 1987) soit par le chromosome (Fett et al. , 1987). L'IAA est en fait responsable d'hypertrophie (Fett et al. , 1987; Kerr, 1987) mais peut être à l'origine de la multiplication cellulaire en l'absence d'hypertrophie, et contribue à la survie des phytopathogènes comme épiphytes sur les surfaces des plantes (Fett et al. , 1987). La disponibilité des mutants IAA, et la réintroduction de plasmides IAAI dans les mutants confirment l'importance de l'IAA dans la virulence (Shaw, 1988).

3-4-2-4- Toxines

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

Les toxines les plus communément étudiées sont les coronatines et syringomycines

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

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

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

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

3-4-2-5- Plasmide de virulence

Pseudomonas solanacearum est une bactérie causant le flétrissement de plus d'une centaine de plantes. Ce pathogène est en fait un facteur limitant la croissance et par conséquent le rendement de la pomme de terre, tomates, bananes, tabac etc... (Boucher et al. , 1986). La plupart des gènes gouvernant cette virulence est portée par un mégaplasmide (Boucher et al. 1986; Shaw , 1988). Les enzymes dégradant les cellules épidermales sont aussi codées par le plasmide (Shaw , 1988). Ce mégaplasmide est connu sous le terme de pwi (plasmid wilt inducing).

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

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

toxines	Xantho- monas	Pseudo- monas	Strepto- myces	Bradyrhi- zobium	Erwinia
- 3- MTPA	x				
-Coronatines	x	x			
-phascolotoxine		x			
-Tagetitoxine		x			
-Lipodepsinonapeptides		x			
-Tropolone		x			
-Tabtoxines		x	x		
-Rhizobitoxines		x	x	x	
-Thaxtanine			x		
-Dihydrophenylalanine					x

* 3-MTPA = 3 methylthiopropionic acid

*Lipodepsinonapeptides: incluent les syringomycines syringotoxines, et syringostatines.

II- Facteurs influençant l'activité de biocontrôle des bactéries

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

Les scientifiques des années 80, se sont intéressés au biocontrôle des phytopathogènes en réponse, en partie, à la croissance chez l'opinion publique du danger des pesticides chimiques (Cook 1993). Dans le cas de la galle des couronnes, aucun agent chimique ne peut remplacer *Agrobacterium radiobacter* 84 (Elliott et Cherington, 1987, Cook, 1993). Les micro-organismes qui peuvent croître dans la rhizosphère sont d'intéressants agents de biocontrôle, conférant à la rhizosphère un front de défense contre l'attaque des racines par les micro-organismes pathogènes (Weller 1988). Certaines souches de *Pseudomonas* fluorescentes sont douées d'une activité de biocontrôle contre un bon nombre de phytopathogènes (Elliott et al., 1985a, James et Gutterson 1986, Thomashow et Weller, 1988, O'ssullivan et al. , 1990; Vincent et al. , 1991). Cette activité de biocontrôle dépend de 2 propriétés :

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

- 1- Les antibiotiques comme les phénazines : 2-4-diacétyl-phloroglucinol, etc..
- 2- Les volatils comme l'HCN, l'ammoniaque et l'éthanol.
- 3- Les enzymes comme chitinases, B-glucanases, cellulases et protéases.
- 4- Les sidérophores comme les pyoverdines (Thomashow et Weller, 1993a).

Ces métabolites contribueraient à l'activité de biocontrôle par :

- 1- Inhibition de la croissance du pathogène cible ou de son activité exemple : antibiotique ou enzyme (Thomashow et Weller , 1993 a et b).

2- Inhibition des micro-organismes non-cibles qui entrent en compétition avec l'agent introduit exemple: antibiotique ou enzyme (Thomashow et Weller, 1993 a).

3- Induction des mécanismes de résistance chez l'hôte ,
exemple : HCN ou antibiotique.

4- Médiation de la compétition pour les éléments essentiels à la mutation exemple: sidérophore (Vincent et al. , 1991, Thomashow et Weller, 1993 a).

1 - Antibiotiques et leurs rôle dans la compétence écologique

*La plupart des bactéries Gram négatives sécrètent des protéines dans le milieu extracellulaire. Les protéines sécrétées interviendraient dans leur pathogénicité

exemple: *Pseudomonas aeruginosa* (bactériocine, protéase) ou bénéficité
exemple: *Pseudomonas putida* wsc 374 (bactériocine), (Degroot et al. , 1991) et *Pseudomonas putida* wsc 358 (Lemanceau et al. , 1992). Il a été par ailleurs démontré que les produits potentiellement sécrétés par les souches de *Pseudomonas* sont cytotoxique, on retrouve entre autres les phénazines et les protéases (Levy et al. , 1992). En effet, les antibiotiques jouent un rôle majeur dans la suppression par les bactéries . L'agrocine 84 est un antibiotique qui est à l'origine de la médiation de la suppression d'*Agrobacterium tumefaciens* par *Agrobacterium radiobacter* 84(Weller, 1988).

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

La complémentation de ces derniers par des séquences homologues restore à la fois :la synthèse d'antibiotique,l'inhibition fongique invitro, et le biocontrôle du

« take-all » à un niveau similaire à la souche sauvage (Weller 1988, Thomashow et Weller, 1988). Les mêmes résultats sont obtenus par mutation de *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 produisant la PCA, 2-OH-PCA et 2-OH-Phz (ces 2 dernières molécules dériveraient séquentiellement de la PCA)(Thomashow et Pierson, 1992), et chez *Pseudomonas auréofaciens* Q2-87 produisant le 2-4- diacetophloroglucinol (phL) (Vincent et al. , 1991). *Pseudomonas fluorescens* Hv37a produit un composé antifongique (Afv) inhibant *Pytium ultimum* infectant les racines des jeunes pousses de coton (la synthèse de ce composé est sous le contrôle du glucose) (James et Guttererson, 1986 ; Weller 1988), et dépend de l'expression d'au moins 5 gènes.

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

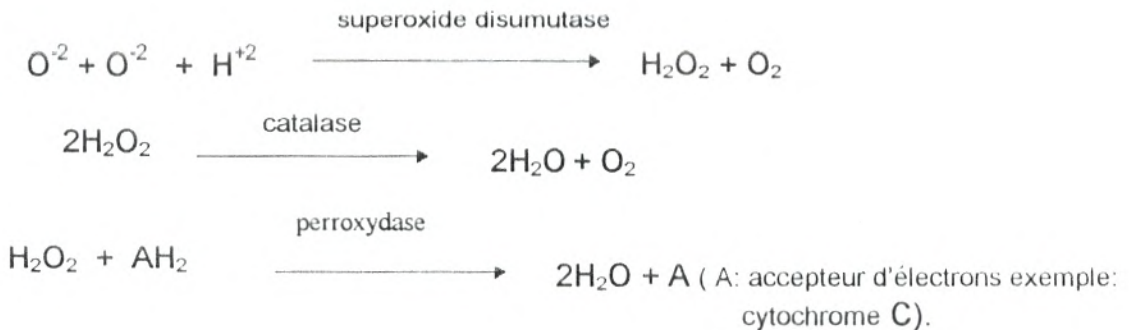
* L'activité antimicrobienne de la PCA contre *Gaeumannomyces graminis var.tritici* in vitro dépend de la concentration de PCA protonée, et donc la PCA est fortement active dans des conditions acides. Toutefois le pH du sol ne semble pas être un facteur limitant la suppression (Thomashow et al. , 1992)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

Il ya actuellement 2 explications quand au mode d'action des Phz :

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

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

Les enzymes citées catalysent les réactions suivantes :



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

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

La production de PhL est un important mécanisme de suppression de nombreuses *Pseudomonas* qui contrôlent les pathogènes responsables de la mosaïque du blé (Thomashow et Weller1993 a), Le phl inhibe en outre une variété de bactéries et champignons et de plus possède une activité herbicide (Thomashow et Weller, 1993 a et b), en entrant en compétition avec le métabolisme de la plante (Thomashow et al. , 1992) . *Pseudomonas fluorescens* CHAO est la souche la plus étudiée quand à la production de PhL . En plus du PhL CHAO produit 4 autres composés bioactifs : HCN , acide indolacétique , pyoluteorine et enfin la pyoverdine (Thomashow et Weller1993a). Les mutants déficients en HCN montrent une protection contre le « black root rot » inférieur à celle présente chez la souche parentale par contre la suppression du « take-all » est toujours la même (Thomashow et Weller, 1993 b).

* De plus, il a été suggéré que la production d'antibiotiques contribuerait à la compétence écologique des micro-organismes du sol (Thomashow et Weller, 1993 b).

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

les polysaccharides de surface, flagelles, poils, osmotolérance (Weller 1988), adhésines (Thomashow et Weller 1993 b), et la capacité d'utiliser les complexes des carbohydrates (Weller, 1988, Kröckel et Focht, 1987).

2- Sidérophores

Dans un milieu pauvre en fer, les *Pseudomonas* produisent des pigments fluorescents jaune-verts (Cody et Gross, 1987, Weller, 1988). Ce sont des molécules de faible poids moléculaires (Leong, 1986, Weller, 1988) 500 à 1000 daltons (Leong, 1986) ayant la capacité de fixer les ions Fe^{III}, désignés sous le terme de sidérophores (Leong, 1986, Cody et Gross, 1987, Weller, 1988, O'ssullivan et al., 1990, Smirnov et al., 1990). Ils fixent les ions Fe^{III} avec une très haute affinité (Leong, 1986). En plus des sidérophores, ces bactéries produisent des récepteurs membranaires protéiques reconnaissant spécifiquement le complexe Fe³⁺ sidérophores (Leong, 1986 ; Weller, 1988 ; O'ssullivan et al., 1990), qui fait que le complexe ne peut pas être reconnu ou utilisé par d'autres bactéries.

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

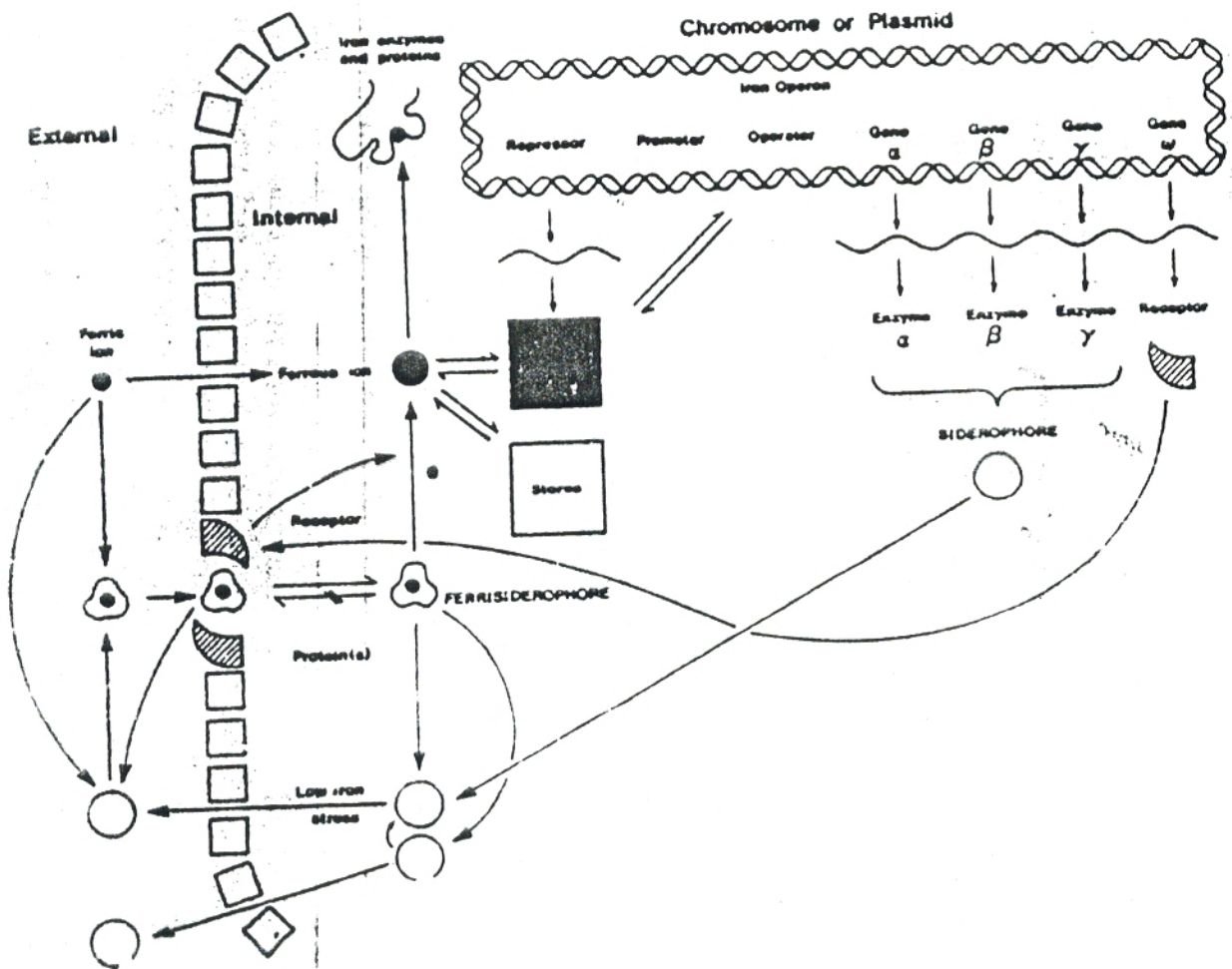


Figure 2: Représentation schématique de l'assimilation de Fer par les micro-organismes aérobiques (Crosa, J. H. 1984 in Leong, 1986).

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

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

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

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

a: ne produisent pas de sidérophores.

b: ne peuvent utiliser les sidérophores produits par leurs antagonistes ou par les micro-organismes présents dans leur environnement immédiat.

c: produisent une petite quantité de sidérophores, ou des sidérophores avec une affinité au Fer inférieure à celle de leurs antagonistes .

d:produisent des sidérophores qui peuvent être utilisés par leurs antagonistes mais ne peuvent utiliser ceux de leur antagonistes (Weller, 1988).

III- Amélioration des souches utilisées pour le biocontrôle

1- Recombinaison et facteurs génétiques

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

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

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

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

la mutation par l'introduction de transposons Tn 5 (O'ssullivan et O'gara, 1988, Bender et al., 1991, Coplin et al., 1992).

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

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

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

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

La compétition (intra ou inter-spécifique) et la prédation sont des facteurs limitant la croissance et le nombre de micro-organismes. Pourtant la compétition intra-spécifique

est à considérer car elle permettrait d'indiquer si la souche manipulée pourrait survivre plus longtemps que la souche sauvage parentale (Richaume et al., 1992).

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

1-1-Augmentation de la production des métabolites importants pour le biocontrôle

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

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

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

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

1-2-Transfert des gènes importants pour le biocontrôle à d'autres souches :

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

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

De plus l'introduction du locus de biosynthèse des Phz de 2-79 résulte en la production de PCA chez 27 souches de *Pseudomonas*, mais seulement quelques unes montrent une suppression notable (Thomashow et Weller, 1993 a et b). L'augmentation de la production d'un métabolite important, où le transfert de gènes

les déterminants dans une autre souche n'impliquent pas nécessairement l'activité de biocontrôle, les recombinants doivent subir une sélection (Thomashow et Weller, 1993 a).

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

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

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

L'inoculation des sols avec des micro-organismes spécifiques pour la contamination biologique est obtenue par recombinaisons génétiques (Kröckel et Focht, 1987).

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

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

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

PARTIE PRATIQUE

1 - Prélèvements

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

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

Chaque échantillon est prélevé dans un sac stérile .

2- Préparation de l'échantillon

Arrivés au laboratoire, 50 g de chaque échantillon est mis dans un erlen de 500 ml contenant 100 ml d'eau physiologique stérile (9‰ de NaCl). Les erlens sont alors mis en agitation pendant 30 mn, puis laissés sédimenter. Une série de dilution de l'ordre de 10^{-2} est alors effectuée à partir des surnageants de chaque échantillon. Dans une boîte de Pétri contenant de la gélose Mc Conkey, 1 ou 0,1 ml de surnageant est déposé et étalé avec un étaloir stérile. Nous opérons de la même façon pour les autres échantillons et les différentes dilutions (Gilardi, 1985).

a- Ensemencement:

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

b- Incubation :

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

3-Isolement

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

4- Identification des Pseudomonas

4-1- Identification présumptive des Pseudomonas

Les colonies isolées sont purifiées sur gélose nutritive. Les caractères morphologique et biochimique sont pris en considération ainsi que la production de pigments sur King A et B . Les colonies Gram négatives, Lactose négatives,

aérobies stricts, après confirmation de l'oxydase, sont soumises à plusieurs tests pour confirmer leurs identités (Palleroni, 1984 et 1992).

4-1-1 - Recherche de l'oxydase : (Indophenol oxydase)

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

di ou tetraméthyl-p-phénylenidiamine + α -naphthol $\xrightarrow{\text{oxydase}}$ indophenol bleu.
(Zannoni 1989).

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

4-1-2- Métabolisme du glucose

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

4-1-3 - Capacité respiratoire des bactéries

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

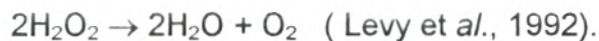
4-1-4 - Production des pigments chez les souches sélectionnées:

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

4-1-5- Recherche de la catalase

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

La catalase catalyse en effet la réaction :



4-1-6- Réduction de citrate

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

4-2- Identification des espèces de *Pseudomonas*

4-2-1-Capacité des souches de se développer à différentes températures(28°,37°,42°C)

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

4-2-2. Production d'H₂S

La production d'H₂S est recherchée sur milieu Hajna-kligLer. *Pseudomonas putréfaciens* produit du H₂S en noircissant entièrement le culot du tube (Gilardi,

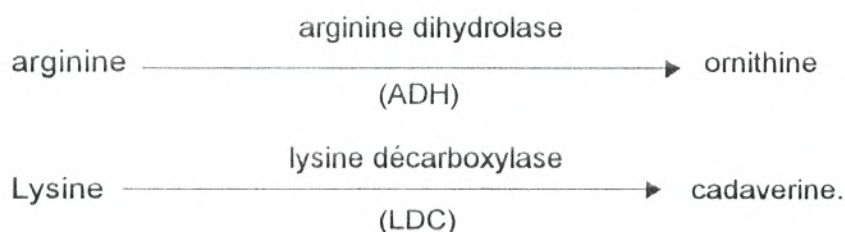
1985). Des tubes contenant 10 ml de milieu légèrement incliné, sont ensemencés le long de la pente puis une piqûre centrale. La production d'H₂S se traduit par le noircissement soit au fond soit de la totalité du milieu (Marchall et al., 1982).

4-2-3- Hydrolyse de la gélatine

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

4-2-4- Arginine dihydrolase et lysine de carboxylase

Ces deux enzymes catalysent les réactions suivantes:



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

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

4-2-5- Test LOPAT

A été proposé par Elliot et al. En 1966, il permet de déterminer et regrouper les *Ps. fluorescentes* phytopathogènes sous deux noms *Ps. syringae* et *Ps. cicchorii*, avec une exception pour *Ps. syringae* qui est oxydase négative (Fahy et

Loyd, 1983; Zannoni,1989).De plus un autre test est utilisé pour aider l'identification de *Ps. cicchorII*. C'est la sensibilité des plants de tomates. Notons en plus que *Pseudomonas cicchorII* est levane négative (Cooksey et al.,1990).

LOPAT signifie ce qui suit :

L: Pour production de Levane:

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

O: Pour oxydase : déjà cité.

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

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

A: Pour Arginine dihydrolase : déjà cité.

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

De jeunes plants de tabac de 6 feuilles sont infectées par 10^3 cellules/ml. La réaction positive se traduit par la dépigmentation de la feuille autour du point d'infection, puis par la mort du jeune plant. Selon le Bergus Manual)

5- Dosage de la Résistance

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

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

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

5.2. Dosage de la résistance aux antibiotiques en milieu solide

(antibiogramme ou méthode de diffusion).

La méthode la plus couramment utilisée, et essentiellement en biologie médicale est celle de la diffusion en gélose Müller-Hinton. Cette dernière consiste à déposer sur une boîteensemencée par inondation de la surface, avec 0,1 ml de suspension bactérienne fraîche à 10⁵ cellules par ml, un disque de papier filtre imbibé d'antibiotique. Le dessous se trouve alors imbibé d'eau et l'antibiotique dissout diffuse dans la gélose, selon les lois physiques qui régissent la diffusion des molécules à travers un milieu gélosé. Ainsi les différents antibiotiques diffusent à des taux différents en conséquence de leurs structures.

Le résultat est la formation d'un gradient de concentration d'antibiotique dans le milieu entourant le disque. Après une incubation de 18h à 28 et 37°C, les zones d'inhibitions sont alors mesurées en mm (Barry et Thornsberry, 1985). Après mesure du diamètre d'inhibition, les souches sont classées en fonction de leur sensibilité selon les recommandations de la société française de microbiologie (Acar et *al.*, 1991).

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

Nous avons essayé de mettre en évidence la présence de β -lactamases pour les antibiotiques suivants: Ampicilline, oxacilline, céfalosporine, pour certaines souches que nous avons jugées importantes. Les souches de bactéries ont

développé plusieurs types de β -lactamases dégradant avec une grande spécificité les β -lactamases de différentes structures chimiques. Nous avons, alors cherché celles qui dégradent plus les oxacillines. A cet effet, nous avons utilisé la méthode iodométrique qualitative (Schoen knecht et al.,1985) que nous avons légèrement modifiée.

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

L'oxacilline est solubilisée dans un tampon phosphate 0,1M de pH 6, à une concentration de 15 μ g/ml et ce juste avant l'expérience.

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

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

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

6. Le curage

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

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

La concentration de la ciprofloxacine utilisée pour le curage est la concentration sub-inhibitrice (CSI). Cette dernière est déterminée par des dilutions

progressives et qui permet un très faible développement des bactéries (turbidité juste détectable) $\cong 5 \cdot 10^7$ bactérie /ml.

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

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

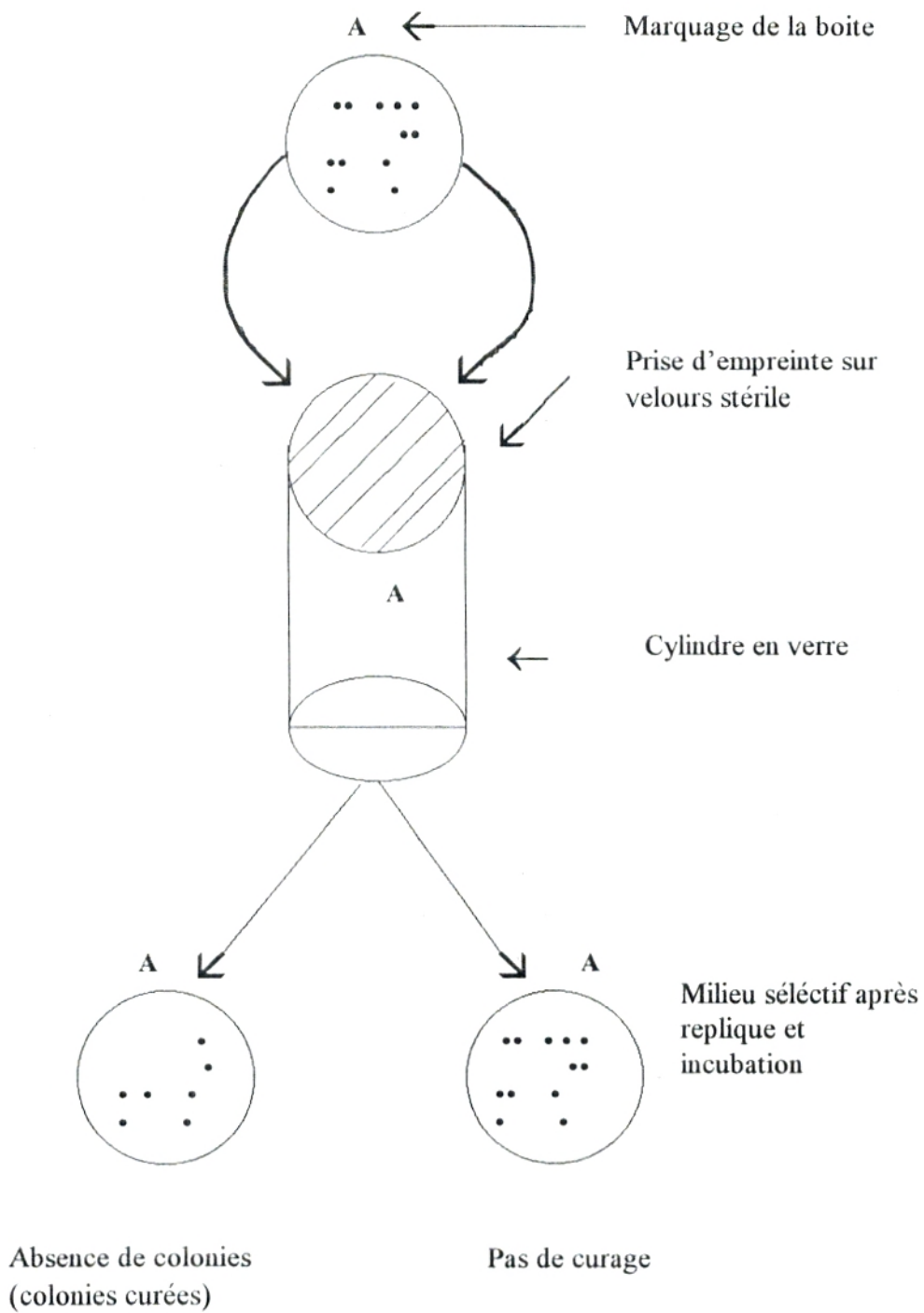


Fig 3 : Methode de réplique sur tampon velours

A : Point de repère

7 -Transfert de plasmides par conjugaison

La conjugaison est le transfert d'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Le phénomène est , en effet, couplé avec une réplication de l'ADN. Des deux copies produites, l'une est transférée tandis que l'autre est conservée par la bactérie donneuse.

La méthode utilisée est une méthode standard qui consiste à prendre 10 ml d'une suspension bactérienne, de donneur et de receveur, fraîche en phase de croissance logarithmique comportant $5 \cdot 10^8$ bactéries par ml (Haas et Guenther 1983, O'sullivan et *al.* 1990). Ces bactéries sont alors centrifugées pendant 10mn à 3000 tr/mn, les culots récupérés sont resuspendus dans 1ml de NaCl à 9‰. 15µl du donneur et 15 µl du receveur ainsi préparés, ils sont étalés sur une surface de 2cm² de gélose mülleo-Hinton, et incubés à 28°C pendant 18h. C'est alors qu'1 ml de solution d'NaCl à 9‰ est ajouté dans la boîte de Pétri et est mélangé. Enfin , 0,1ml de ce mélange est étalé sur le milieu sélectif préparé auparavant (Haas et Guenther , 1983; Vincent et *al* 1991).

a - Mise en évidence des transconjugants :

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

8-Extraction de plasmides

Afin de se persuader de la présence de plasmides chez les souches isolées, on effectue leur extraction. Le principe de la méthode repose sur la lyse de la cellule bactérienne suivie de l'élimination de l'ADN chromosomique et la majorité des protéines qui peuvent empêcher la visualisation de l'ADN plasmidique après électrophorèse sur gel d'agarose (Kado et liu 1981; Ish-Horowicz and Burke, 1981; Grinsted and Bennett, 1988; King, 1989) Selon leur configuration (ccc→ circulaire

superenroulé, oc→circulaire ouverte ou L→linéaire) et leur poids moléculaire, les bandes plasmidiques correspondant aux différentes configurations migrent différemment. Les grands plasmides migrent à proximité mutuelle du point de dépôt, alors que celles correspondant aux différentes configurations des petits plasmides migrent jusqu'au centre du gel loin du point de dépôt.

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

- 1- 10 ml de bactéries cultivées pendant la nuit dans du bouillon nutritif sont centrifugées pendant 15 mn à 4000 tr/mn à 4°C.
- 2- Le culot est ensuite resuspendu dans 250 µl de la solution G froide par le vortex.
- 3- 500 µl de la solution de lyse sont ajoutées et mélangées par renversement du tube 5 fois, puis laissés 5 mn sur la glace.
- 4- C'est alors que 750 µl de l'acétate de potassium sont ajoutés, mélangés plusieurs fois comme auparavant. Puis laissés reposer 10mn.
- 5 - Centrifugation à 12000 tr/mn à 4°C pendant 5 mn.
- 6- 1,4 ml de surnageant est récupéré et auquel 0,7 µl d'isopropanol est ajouté, le surnageant et l'isopropanol sont mélangés par inversion 5 à 7 fois puis centrifugés pendant 5 mn à 4°C et à 12000 tr/mn.
- 7- le surnageant versé, le sédiment est séché pendant 2mn sous vide.
- 8 - Le sédiment est solubilisé dans 40µl de tampon T&E pendant 30mn.
- 9 - 25 µl de cette solution sont mélangés avec 5 µl de saccharose à 40% avec du bromo-phenol bleu.
- 10 - Electrophorèse sur gel d'agarose : C'est une technique de séparation dont le principe repose sur la séparation de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Les plasmides, étant composés d'ADN qui lui est un double polymère d'au moins 10^4 nucléotides, chargés négativement, sont séparés sous l'influence d'un champ électrique selon leur poids moléculaire et leur conformation (Felliciello and Chinalig, 1993).

Préparation du gel d'agarose:

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

Un litre de tampon E est utilisé comme électrolyte, et est versé dans les deux compartiments du bac en immergeant le gel de 1 à 2mm. L'électrophorèse est alors effectuée pendant 14h à 1,5 v/cm de gel. Et ce après dépôt des échantillons préparés plus haut. Une fois l'électrophorèse terminée, on arrive à l'étape de coloration. La plaque de gel est glissée attentivement dans une solution de 0,5 mg/ml de bromure d'ethidium pendant 20mn. Le gel est rincé à l'eau courante et est observé à 254nm l'ADN plasmidique se présente sous forme de bandes de fluorescence rouges, étroites bien individualisées.

La plaque de gel est enfin photographiée à l'aide d'un filtre orange sur pellicule noire et blanche de 100 ASA avec un diaphragme 8 pendant 12 sec (Grinsted et Bennett, 1988).

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

9-1 - tests des propriétés biologiques des Pseudomonas

9-1-1 -suppression fongique selon Vincent et al 1991

Le test à pour objet de mettre en évidence l'activité suppressive d'une souche de Pseudomonas isolée et identifiée par rapport à 2 champignons phytopathogènes. Sur des boites de Pétri contenant du PDA auquel le dextrose est substitué par le glucose, 3ml de bacteries fraîchement poussées sont étalées sur un front et incubés pendant la nuit à 28°C . Lorsque les souches des bacteries ont bien pousés sur l'autre front un disque fongique de 8 mm de diamètre provenant d'une culture de 7 jours, est déposé . Les boites sont alors incubées à température du laboratoire pendant une semaine. La distance entre la colonie et le mycélium est

mesurée. Cette distance est comparée par rapport à un témoin qui ne contient que le champignon (Fig. 4a).

9-1-2 - suppression fongique selon James et Gutterson 1986

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

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

9-1-3- Production de bacteriocine

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

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

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

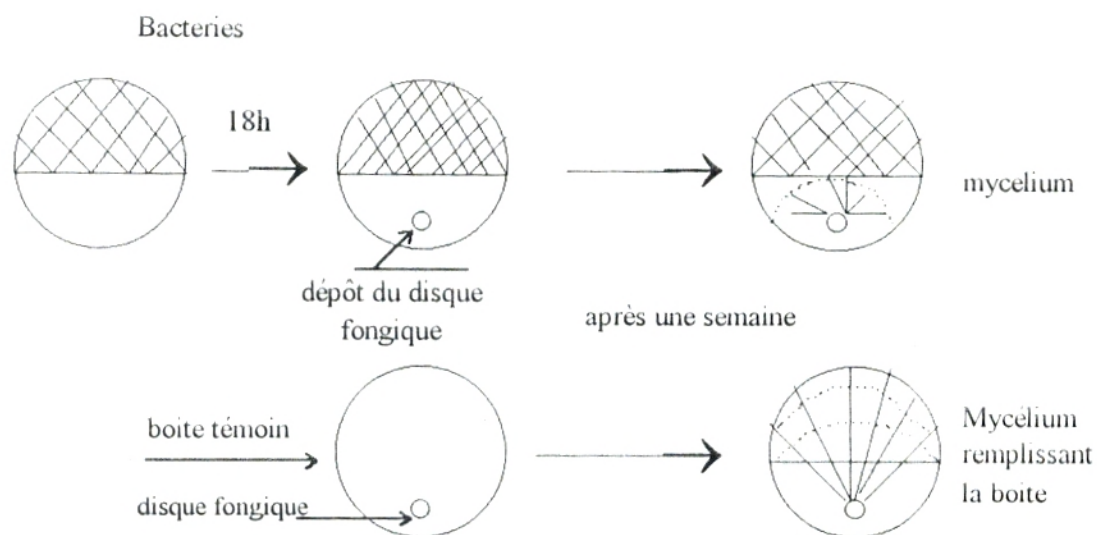


fig.-4a: schéma de la suppression fongique selon Vincent et al, 1991.

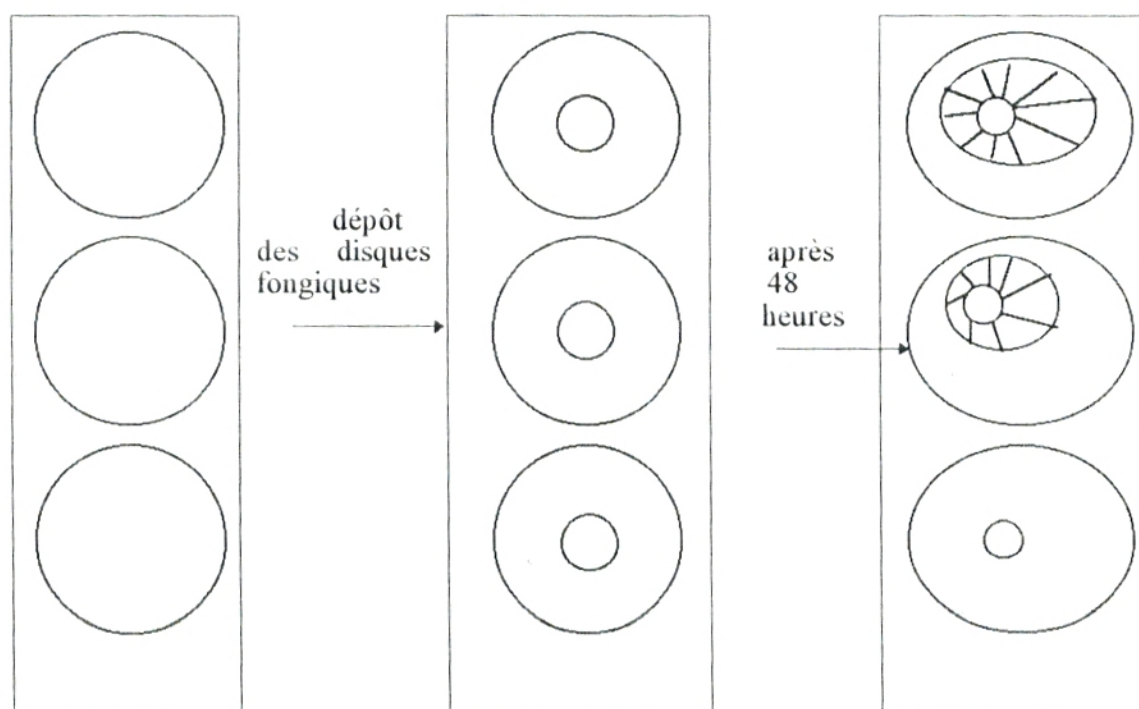


fig.-4b : schéma de la suppression fongique selon James et Gutterson 1986.

9-2-Tests de pathogénicité pour la pomme de terre

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

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

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

De petites quantités de bactéries (1 à 2 ml à raison de 10^8 cellule /ml) sont injectées dans les tiges de petits plants de pomme de terre d'une part et à des tubercules de pomme de terre prêts à être plantés d'autre part.

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

9-3-Extraction des Phénazines

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

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

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

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

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

b - Fractionnement de l'extrait brut:

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

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

L'extrait de chaque tâche est alors concentré jusqu'à sec puis dissous dans 0,6 ml de chloroforme chacun. Les extraits sont alors testés pour leur activité biologique (antifongique pour les extraits de la souche sauvage et bactéricide pour les extraits de la souche traitée), et sont soumis à une spectroscopie UV à balayage (Thomashow et Pierson, 1992).

Résultats

1-Isolement et identification des souches de *Pseudomonas* de la rhizosphère de la pomme de terre:

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

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

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

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

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

Tableau II

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

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

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

2-Evaluation de la résistance des souches de Pseudomonas aux antibiotiques et aux métaux lourds

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

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

- Pour 33% des souches la CMI de l'ampicilline est $> 1000 \mu\text{g/ml}$.
- Pour 100% des souches la CMI de l'oxacilline est $> 250 \mu\text{g/ml}$.
- Pour 20% des souches la CMI de la kanamycine est $> 1000 \mu\text{g/ml}$.

Sur les 9 antibiotiques testés appartenant à 6 groupes chimiques différents, les antibiogrammes obtenus contiennent 3 à 7 caractères de résistance (tableau IV).

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

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

Tableau III
CMI en µg/ml.

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

amp : ampicilline

bac : bactrim

Cd : cadmium

céf : céfalosporine

chl : chloramphénicol

cip : ciprofloxacine

Cu : cuivre

Hg : mercure

kan : kanamycine

nd : non déterminé

oxa : oxacilline

str : streptomycine

tet : tétracycline

CMI : concentration minimale inhibitrice

µg / ml : microgramme par millilitre

JRS : E.-Coli JRS

Tableau IV

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

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

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

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

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

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

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

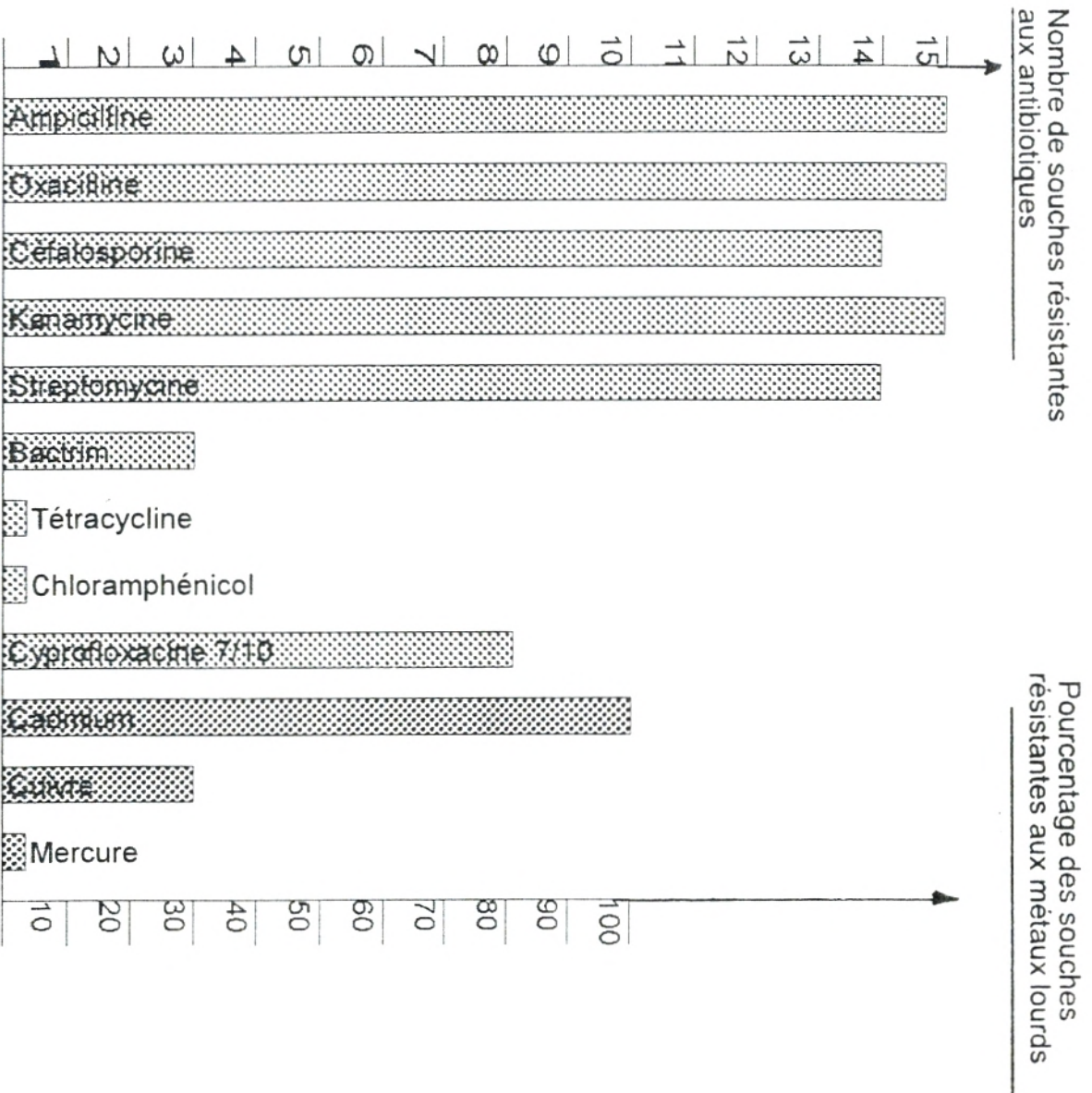


Figure 5 - distribution des souches en fonction de la résistance aux différents antibiotiques et métaux lourds étudiés

3- Extraction et visualisation de l'ADN plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose.

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

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

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

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

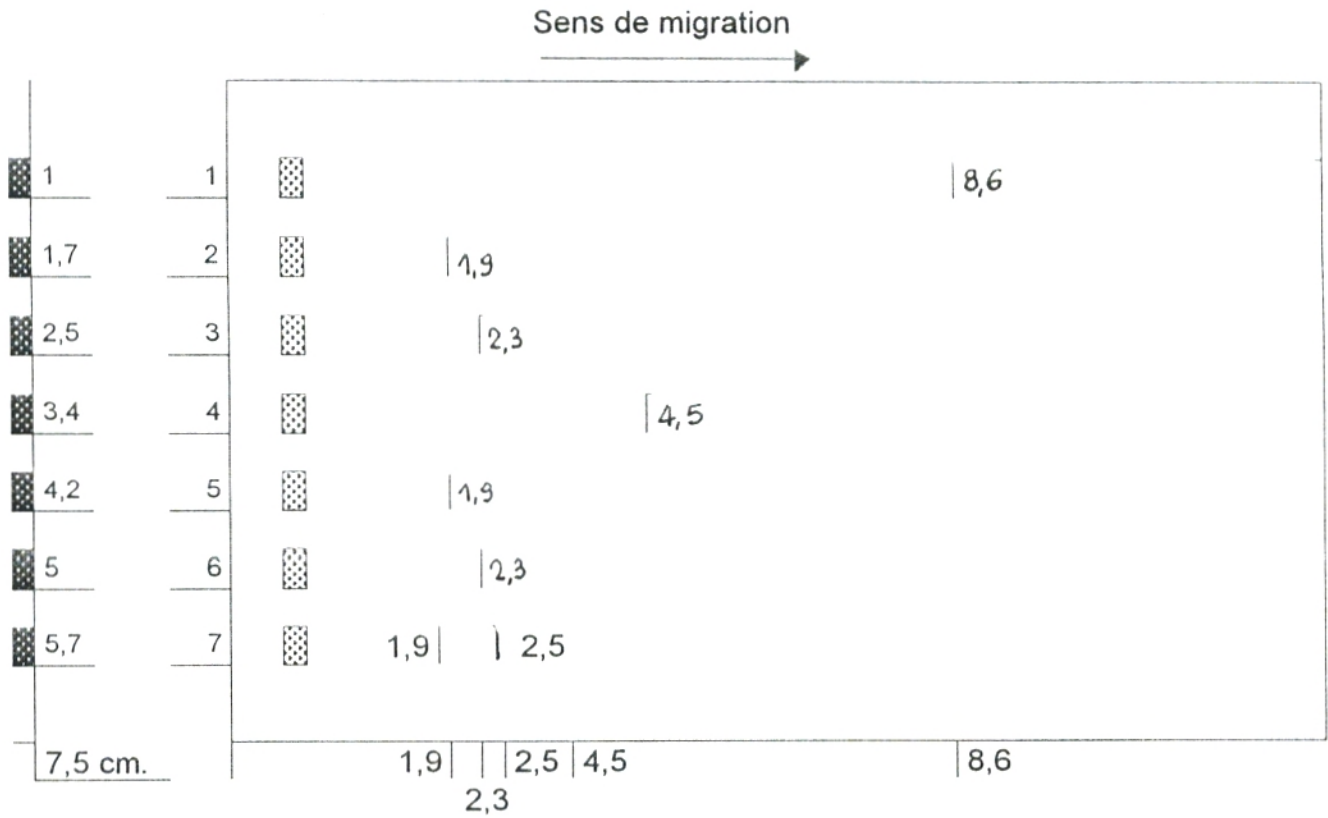
Les grands plasmides migrent à proximité du point de dépôt, alors que les petits plasmides migrent loin du point du dépôt. Si un plasmide se trouve en différentes configurations dûes au processus d'extraction, ceux-ci peuvent être distingués sur gel d'agarose à 0,7 %. C'est la conformation ccc (circulaire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

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

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

La souche 11 (isolée dans ce travail) possède deux bandes; il pourrait s'agir du même plasmide avec deux conformations différentes. La bande la plus éloignée du point de dépôt est la configuration surenroulée (ccc). Le plasmide Col E1 de *E.Coli*

2180 se situe très loin; il s'agit en fait d'un petit plasmide dont la masse moléculaire est de $3,6 \cdot 10^6$ daltons. Tandis que le plasmide de *Staphylococcus lactis* se situe au centre du gel.



■ = 0,5 cm.

1- *Escherichia Coli* 2180 (plasmide col E1)

2- *Escherichia Coli* D.

3- *Escherichia Coli* R.

4- *Staphylococcus lactis*.

5- PAO 303 . RP1. (*Pseudomonas aeruginosa* avec plasmide RP1).

6- *Pseudomonas* 14.

7- *Pseudomonas* 11.

Fig.-6: Schéma de l'électrophoréogramme du DNA plasmidique extrait par la méthode de Grinsted et Bennett (1988).

4- Elimination des plasmides (curage)

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

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

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

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

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

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

4-1- Modification du spectre de résistance des souches curées

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

4-2- Effet du curage sur la présence du DNA plasmidique

Le traitement des souches par la ciprofloxacine, n'a pas éliminé totalement la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. Pour cette raison nous avons cherché à comparer la présence des plasmides chez les souches sauvages et curées

(traitées), et mettre en évidence -grâce à cet effet- le changement au niveau du DNA plasmidique accompagné par le changement de résistance.

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

4-3- Effet du curage sur les propriétés des bactéries

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

Tableau VI:
Efficacité du curage par la ciprofloxacine.

Souches de Pseudomonas	Concentration de ciprofloxacine en µg	pourcentage de curage
Pseudomonas 2	12,5	100
Pseudomonas 3	18	60
Pseudomonas 4	28	40
Pseudomonas 6	57,5	100
Pseudomonas 7	57,5	100
Pseudomonas 8	28	10
Pseudomonas 10	54	100
Pseudomonas 11	16	100

Tableau VII.
CMI en µg/ml de quelques antibiotiques et du cadmium des souches curées

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

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

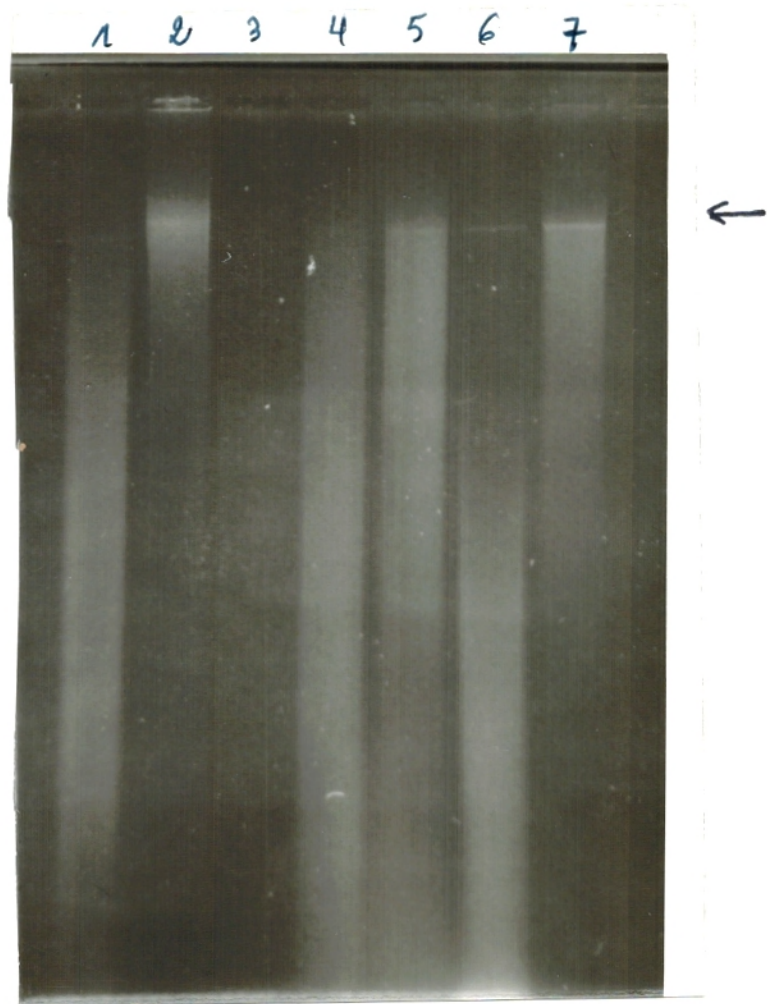


Fig. 7: électrophoréogramme des souches sauvages, curées (traitées à la ciprofloxacine) et d'un transconjugant.

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

4-4- Antibiogramme des souches curées

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

5- Transfert des plasmides par conjugaison

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

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

◆ La souche 2 est sensible à la streptomycine (inhibée par 80 µg/ml) et à l'ampicilline

(inhibée par 100 µg/ml).

◆ La souche 3 est sensible au cuivre (inhibée par 100 µg/ml).

◆ La souche 10 est sensible au cuivre (inhibée par 100 µg/ml).

◆ La souche *E. Coli JRS* est sensible à l'oxacilline (inhibée par 250 µg/ml).

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

Pour confirmer que les transconjugants pigmentés issus de la conjugaison de *Pseudomonas 2* et *E. Coli JRS* sont des souches d'*E. Coli* et non des souches de

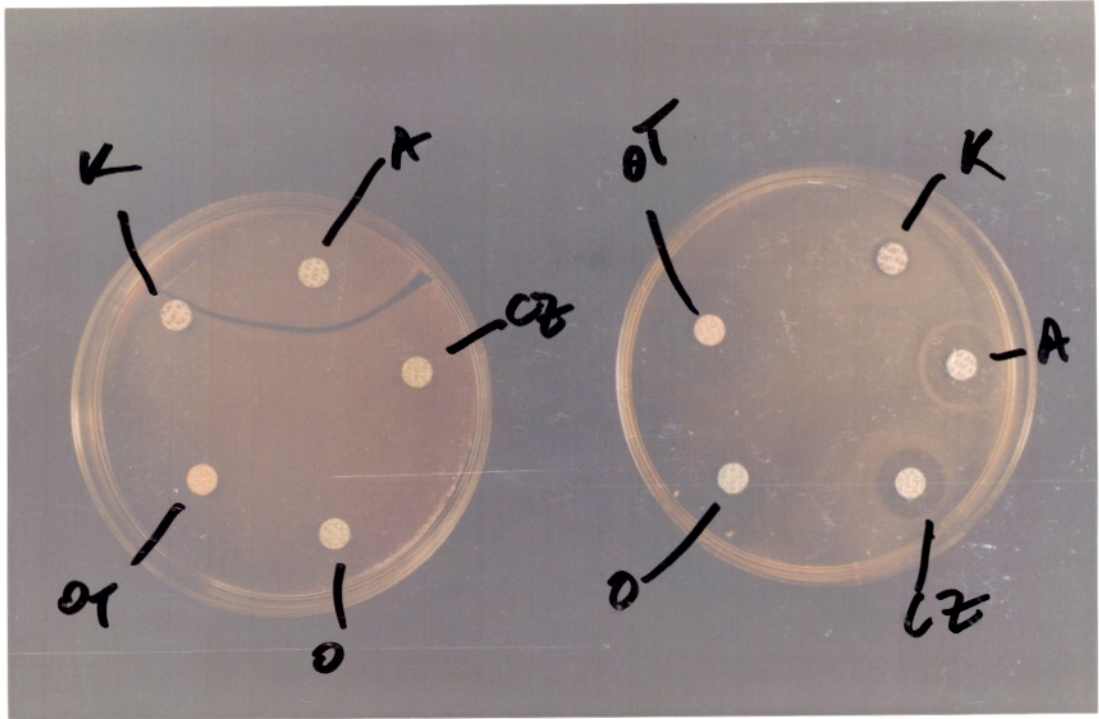


Fig. 8: antibiogramme de souche 2 sauvage (à gauche),
et 2 traitée (curée) (à droite).

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

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

● Visualisation des plasmides chez les transconjugants:

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

6-Effet des souches de Pseudomonas sur la croissance de la pomme de terre

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

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

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

des souches saprophytes sans aucun effet sur la germination et la croissance des plants.

7- Mise en évidence de la production de phénazine et de bactériocine respectivement par la souche *Pseudomonas aureofaciens* sauvage et la souche *Pseudomonas aureofaciens* traitée à la ciprofloxacine

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

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

Pour détecter la substance responsable de l'activité antifongique de cette souche 2, nous avons essayé de l'extraire et de tester son effet sur la croissance des champignons. Différentes quantités de l'extrait brut de la souche 2 ont été mélangées avec 1,5 ml de PDA stérile à 55°C dans des cupules de 12 mm de diamètre . Après solidification du PDA les disques de champignons de 3mm de diamètre y sont déposés. Après deux jours d'incubation, on a pu constater la mort du mycélium inoculé sur le PDA comportant 100 µl de l'extrait, et l'inhibition totale du développement sur PDA contenant 80 µl de l'extrait (tableau VIII). Une inhibition importante par rapport au témoin est observable même sur PDA contenant uniquement 10µl de l'extrait. De plus, les 2 *Fusarium* sont inhibés de la même manière.

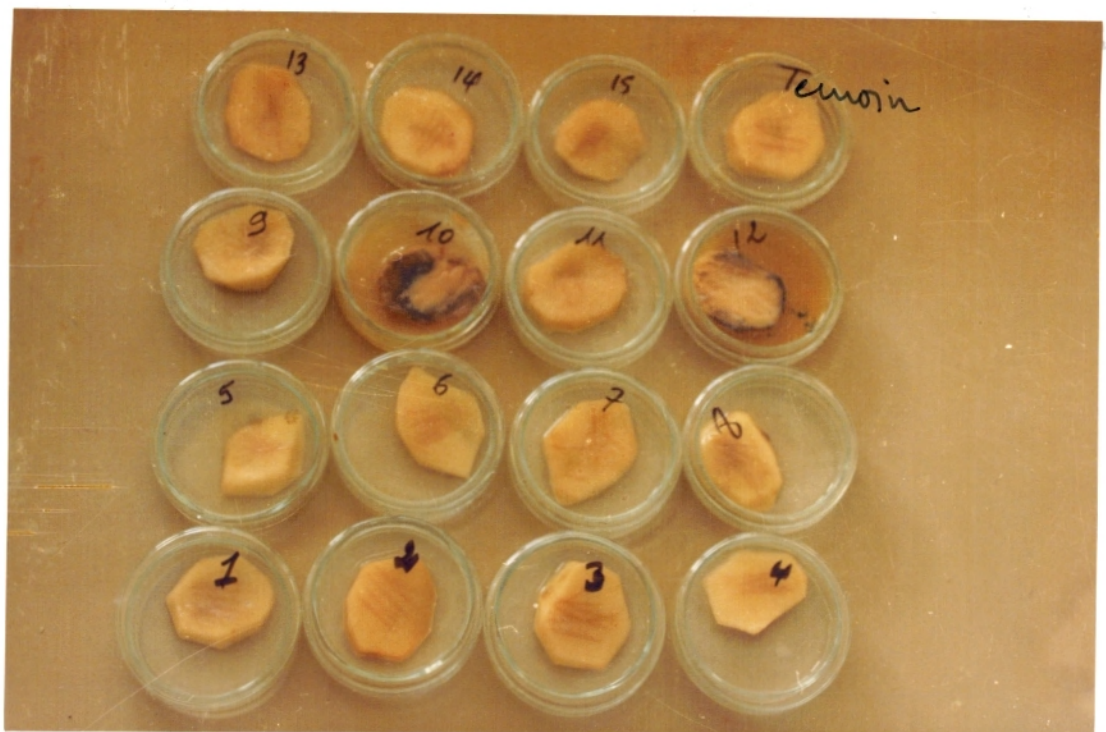


Fig. 9a : infection des tranches de pomme de terre par les souches isolées (10 et 12 pathogènes).

le test dure trois semaines (chaque tranche est infectée par une colonie celle-ci issue d'une cellule après 18 heures d'incubation).



Fig. 9b : infection des pieds de pomme de terre par les souches 10 et 12.

En haut : plant témoin.

En bas : à gauche : plant traité avec la souche 12.

À droite : plant traité avec la souche 10.

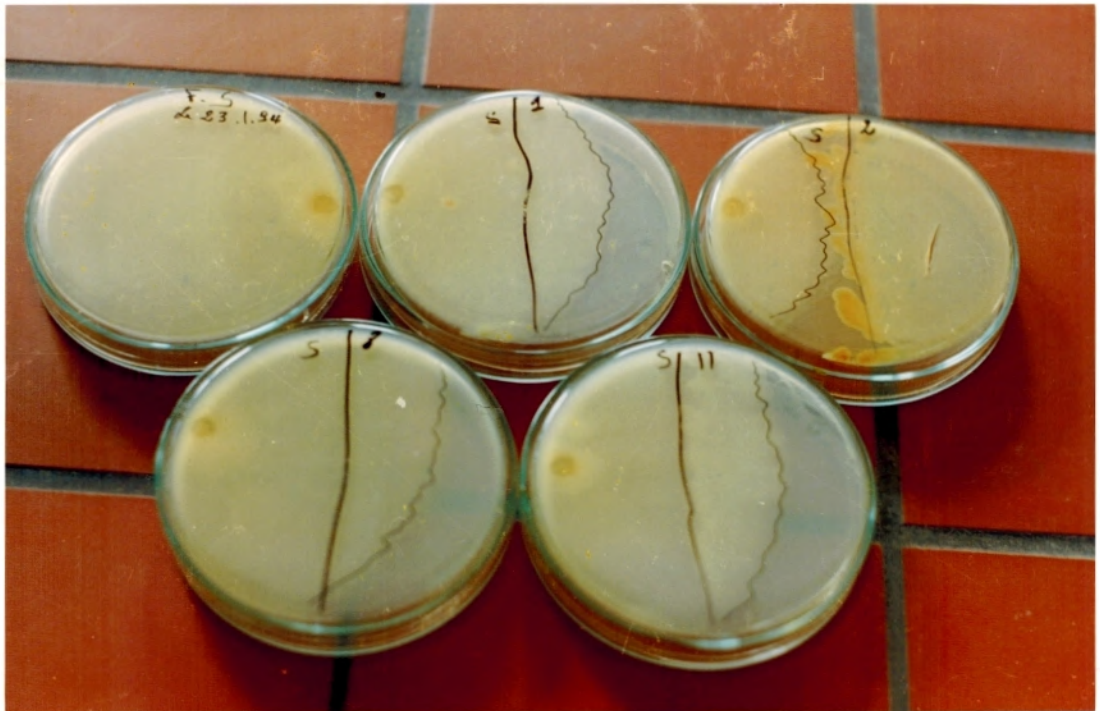
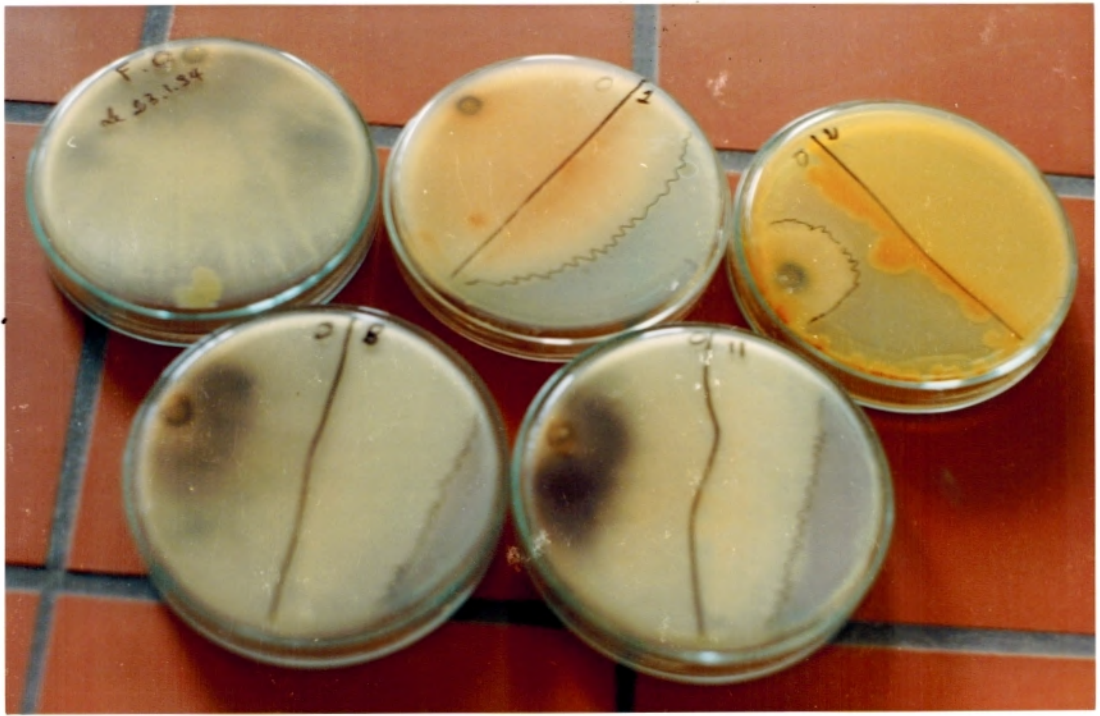


Fig. 10 : Suppression des champignons par
Pseudomonas aureofaciens [souche 2].
 En haut avec *Fusarium oxysporum*
 En bas avec *Fusarium solani*.
 1, 2, 8 et 11 souches de *Pseudomonas*.
 FO et O : *Fusarium oxysporum*.
 FS et S : *Fusarium solani*.

Tableau VIII.

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

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

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

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

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

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

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

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

Tableau IX.

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

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

- 1 µl de l'extrait de tache correspond à 33. 10⁵ cellules
- Diamètre du puits : 12 mm.
- Diamètre du mycélium inoculé 3 mm.

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

Alors que le fractionnement de l'extrait orange de la souche sauvage donne naissance à huit composantes (taches) dont trois sont douées d'une activité antifongique, celui de la souche traitée (déficiente en pigment orange) donne naissance à six composantes (taches) dont trois sont douées d'une activité bactéricide vis-à-vis de deux bactéries phytopathogènes (10 et 12 citées plus haut) (Fig.11), plus un composé protéique décelé sur le point de dépôt du chromatogramme (tableau X-b).

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

Tableau X.

Caractéristiques des fractions d'extraits séparées par CCM .

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

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

FS: *Fusarium solani*.

FO: *Fusarium oxysporum*.

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

Tableau X-b: Souche traitée de *Pseudomonas aureofaciens*.

(Souche 2 traitée à la ciprofloxacine).

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

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

♦ Souches 10 et 12 : souches isolées phytopathogènes.

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

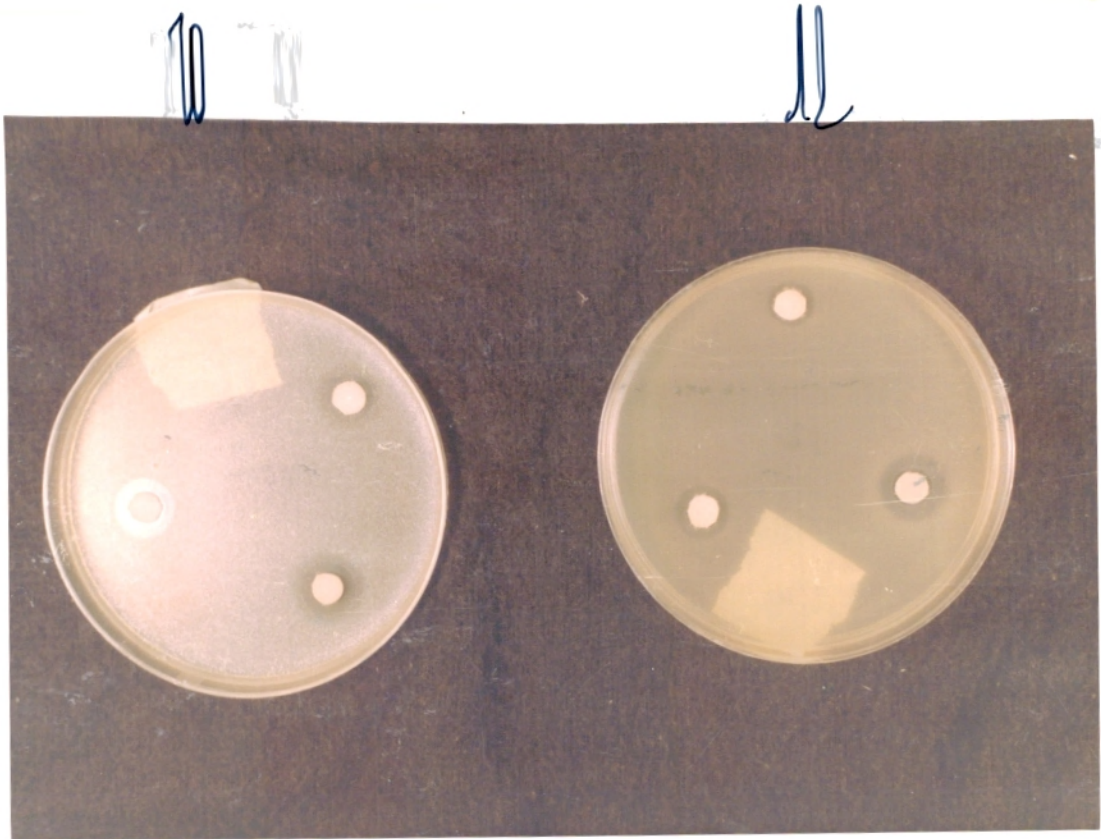


Fig.11: Activité inhibitrice de l'extrait brut de *Pseudomonas aureofaciens* (souche 2) traitée à la ciprofloxacine vis-à-vis de 2 souches pathogènes.

- Diamètre du disque en papier imbibé d'extrait 6mm.
- A droite souche 12.
- A gauche souche 10.

Tableau XI.

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

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

- Diamètre du disque imbibé d'extrait 7 mm.
- Nd : non déterminé.
- 1 µl d'extrait brut correspond à $3 \cdot 10^7$ cellules
- 1 µl des tâches 1, 2 et 4 correspond à 10^7 cellules.

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

Tableau XII.

Production de bactériocine par la souche 2 : *Pseudomonas aureofaciens*

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

nd: non déterminé.

♦ 3, 5,15 : souches isolées.

♦ LWP2 et LVWRA : *E. Coli* LWP2 et *E. Coli* LVWRA. ♦ le diamètre est mesuré en mm.

8- Spectres d'absorption des substances actives produites par la souche 2 (*Pseudomonas aureofaciens*)

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

Les composantes sont diluées d'une part dans du NaOH 0,1N et d'autre part dans de l'eau distillée. Les spectres ont été comparés avec ceux trouvés dans le travail de Pierson et Thomashow (1992). A la différence des spectres de trois dérivés des antibiotiques de nature phénazinique caractérisés dans le travail de ces auteurs, nos substances avaient une faible absorbance dans la région ultraviolette (fig.-12).

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

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

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

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

Fig.12 : Spectres d'absorption des taches 7 et 8 actives de l'extrait de la souche 2 (*Pseudomonas aureofaciens*)

Discussion

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

- 1 *Pseudomonas putida*.
- 4 *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2 *Pseudomonas cicchori*.
- 1 *Pseudomonas aureofaciens*.
- 1 *Pseudomonas putrefaciens*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cela suppose que le déterminant de la β-lactamase a été transmis à la souche JRS.

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

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

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

On a utilisé plusieurs méthodes pour démontrer la présence des plasmides chez nos souches. Ces méthodes ont pour principe la lyse alcaline puis l'élimination du DNA chromosomique par le phénol seulement, nous avons retenu celle de Ish-Horowicz et Burke légèrement modifiée par Felliciello, et qui, au lieu d'utiliser le phénol pour éliminer le DNA chromosomique, utilise plutôt l'acétate de potassium concentré. Il semble, en effet, que le DNA plasmidique dénaturé par le

pH alcalin à température même ambiante devient fragile et peut facilement être dégradé. C'est pour cela qu'on travaille à une température basse de 4°C. Certaines des souches de *Pseudomonas* testées comportent de grands plasmides qui diffèrent légèrement dans leur taille comme le montre la distance qui les sépare du point de départ (fig.-7).

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

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

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

Est-il alors possible que la ciprofloxacine ait touché certaines fonctions vitales du plasmide ? ou bien, les déterminants conférant cette résistance sont portés par le chromosome bactérien, et que ce dernier a été légèrement

endommagé ? car si on venait à comparer les souches 2 et 3 qui ont toutes deux perdu leur résistance pour presque tous les antibiotiques testés, alors que la souche 3 a perdu son plasmide après traitement, la souche 2 par contre en possède un qui est plus grand que celui de la souche parentale, et que ce dernier ne lui confère plus la résistance au cadmium.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Selon Lévy et *al.*, (1992), le degré d'inhibition fongique, par les substances phénaziniques, dépend de leur concentration. C'est ce que nous avons constaté avec l'extrait de la souche 2. Nous avons noté que l'inhibition des deux champignons est proportionnelle à la concentration en phénazine, et que 100 µl de l'extrait brut inhibe totalement la croissance des champignons voire même la mort du mycélium ensemencé. Tandis que des concentrations moins élevées permettraient une légère croissance du mycélium, voire même réversible dans le cas de très faibles concentrations exemple: 10 ou 20 µl . (1 µl correspond à $66 \cdot 10^5$ cellules par ml par 24 h.)

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

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

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

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

En effet:

- la composante 7 (la plus importante du point de vue suppressivité) pourrait correspondre à la PCA. Cette dernière est une substance caractérisée par une couleur jaune qui devient noire sous U.V. et avec un rapport frontal de 0.17 (Thomashow et Pierson, 1992), ces propriétés correspondent à la substance 7 ayant un rapport frontal de 0.2 .

- la composante 8 (moins active que la précédente) pourrait correspondre à la 2-OH-PCA qui est de couleur orange avec une fluorescence orange (Thomashow et Pierson, 1992), la différence réside dans le rapport frontal qui est de 0,19 pour la 2-OH-PCA et de 0,3 pour la composante 8.

- la composante 2 (d'activité mineure) pourrait correspondre à la 2-OH-phénazine de fluorescence orange avec un rapport frontal de 0,04 (Thomashow et Pierson, 1992), tandis que la composante a un rapport frontal de 0,08.

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

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

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

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

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

Selon Thomashow et Weller, (1988) les antibiotiques de nature phénazinique seraient toxiques pour *E.Coli*.

En accord avec cette constatation nous avons observé que sur LURIA où *Pseudomonas aureofaciens* (souche 2) produit beaucoup de pigments, il y a une inhibition élevée de *E.Coli* LWP2 et *E.Coli* LUWRA. Il est possible que ce sont les phénazines qui sont responsables de cette inhibition. Il est aussi possible qu'il s'agit de bactériocine, ou de l'effet synergique de ces deux toxines. Si les phénazines sont toxiques pour *E.Coli*, comment expliquer la capacité d' *E.Coli* JRS de produire ces pigments après conjugaison avec la souche 2 (*Pseudomonas aureofaciens*), mais ce fait a déjà été observé par Thomashow et Weller (1993 b) qui ont eu le même résultat. Ils expliquent que la capacité d'une souche d' *E.Coli* de produire l'antibiotique lui confère en même temps la résistance à cet antibiotique.

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

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

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

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

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

CONCLUSION

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

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

Les résultats montrent que la résistance aux antibiotiques couramment utilisés est très répandue entre les souches. La perte des plasmides gouvernant la résistance est difficile à obtenir ainsi que l'élimination des caractères de pathogénicité des souches 10 et 12. Par contre le transfert du pigment orange de la souche 2 vers *E. Coli* JRS est facilement obtenu, et s'accompagne d'un transfert plasmidique chez cette dernière.

Mais le plasmide retrouvé chez *E.Coli* JRS est plus grand que celui présent chez la souche 2. La souche 2, identifiée comme *Pseudomonas auréofaciens* , est douée d'une activité inhibitrice sur PDA de 2 champignons phytopathogènes :

Fusarium oxysporum et *Fusarium solani*.

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

Toutefois , l'origine de ces propriétés est à éclaircir, entre les régions où le rendement des cultures de pomme de terre est élevé(exemple : champs situés de part et d'autre de la rivière de Bousselam), et celles à faible rendement afin de

déterminer s'il s'agit là de sols suppressifs. De plus, étudier la persistance de la souche 2 dans le sol d'une part, et son introduction dans un sol à faible rendement ou réintroduction dans le sol d'origine d'autre part. Il serait ainsi intéressant de mieux caractériser les souches pathogènes isolées ainsi que les souches saprophytes.

ANNEXE

1 - Appareillage :

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

2 - Souches de bactéries utilisée pour la conjugaison.

- *Eschérichia coli* Jrs 856 (leu⁻ , lac⁻ , thia⁻ , Sm^S , Uv^S , Tc^S , Ap^S , Km^S , NaI^S , Cm^S , F⁻ , SrL⁻ , rk⁻) nous a été offerte par Dr Koukalova de l'Institut de biophysique de l'Académies Tchèque de Science BRNO, République Tchèque.
- *Pao 303* (RP1) (Arg⁻ B18, Cb^f 500µg/ml, Tc^f 125 µg/ml, Km^f 300 µg/ml; Tra⁺ Inc P1)

3 -Souches de champignons utilisées pour le test antifongique .

Fusarium solanii et *Fusarium oxysporum* , nous ont été offerts par Aissat Kamel, qu'il a isolé et identifié à partir des tomates pourris (Laboratoire phytopathologie de Sétif) .

4 - Produits chimiques et solvants organiques.

- Eau oxygénée.
- Chloroforme.
- Acétate d'éthyle.
- Benzène.
- Isopropanol.
- Toluène
- Acide formique
- Acide acétyque
- Méthanol.

5 - Antibiotiques :

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

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

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

6- Sels de Métaux lourds.

- Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Chlorure de cadmium $\text{Cd Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- Chlorure de mercure HgCl_2

7- Membranes et Disques:

- Disques oxydase
- Plaques de silice pour C.C.M
- Disques d'antibiotiques.

8- Milieux de Culture:

a-milieu à l'acétamide g/l.

KH_2PO_4 13,6 * $-\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ 2 . * $-\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 * $\text{Fe} \cdot \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005

Rouge de phénol , - Acétamide 10 g.

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

b-Bouillon nutritif g/l.

- Milieu nutritif oxoid 25.

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

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

Utilisé pour production de phénazine.

d-Milieu au cétrimide g/l.

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

Milieu sélectif et spécifiques pour les *Pseudomonas*.

e-Milieu citraté de simmons (Institut Pasteur)

f-Milieu de Falkow g/l

- Extrait de levure 3 .
- Glucose 1.

-NaCl 5.

-Bromocresal pourpre (sol 1,6°%) 1ml

- Acide aminé à une Concentration finale de 0,5 % aminé.

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

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

-Infusion de coeur de boeuf.

- Gélatine.

Pour déterminer le pouvoir de Gélatinolyse.

h-Gélose nutritive : g/l

- Milieu nutritif oxoid 25.

- Agar 15.

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

-Milieu nutritif oxoid 25.

- Extrait de levure 5.

-Agar 15.

j-Gélose nutritive au sucrose: g/l.

- Milieu nutritif oxoid 25.

-Sucrose 5.

-Agar 15.

Pour la production de levane.

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

- Peptone pepsique de viande de boeuf 300.

- Glucose 2.

- Agar 6.

Détermination du type respiratoire.

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

- Extrait de viande de boeuf 3.

- Extrait de levures 3.

- Peptone 20.

-Chlorure de Sodium 5.

-Citrate ferrique 0,3 .

-Lactose 10.

-Glucose 1.

-Rouge de phenol 0,05.

-Agar 12.

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

m-Milieu Hugh-Lefson : g/l.

- Extrait de levures 1.
- Peptone pancréatique caseine 2.
- NaCl 5.
- K_2HPO_4 0,3.
- Agar 3.
- Bleu de Bromothynol 15ml à 0,2%.

Mise en évidence du métabolisme des sucres.

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

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

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

o-Milieu de king B: g/l.

- Polypeptone 20.
- Glycérol 10.
- Phosphate bipotassique anhydre 1,5.
- Sulfate de magnésium . $7H_2O$ 1,5.
- Agar 15.

Pour la production de la pyoverdine (pigment fluorescent).

p-Milieu de LURIA : g/l

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

Test bactericide (production de la bacteriocine).

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

Pour selectionner les Gram négatifs.

r-Milieu Müller - Hinton (Institut Pasteur).

Pour les antibiogrammes.

s-PDA g/l.

* Pomme de terre 200.

* Glucose ou saccharose 20.

* Agar 15.

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

9. Plantes utilisées pour les tests de pathogénicité.

* Tabac . * Pomme de terre.

10- Solutions utilisées pour l'extraction des plasmides:

a- Solution G :

* Glucose 50 mM (0,9 g/l) .

* Tris - HCl pH8 10 mM.

* EDTA disodique 1mM.

b -Solution de Lyse:

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

c - Solution d'acétate de potassium :

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

d - Tampon TE:

* Tris 10mM . (1,21 mg/ml). * EDTA disodique 1mM (0,372 mg/ml).

* pH 7,8 ajusté par HCl 0,1 M .

e - Solution de dépôt :

* Glycerol 40 % (w/v) (4ml). * Bleu de bromophénol 0,05% 5mg.

* EDTA disodique 2mM 1ml de la solution 20mM.

* Tampon tris-acide borique pH8 5ml.

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

* Tris-acide acétique 0,04M (24,2 g/100 ml)

* Acide acétique glacial 4mM. (5,2 g/ 100ml).

* EDTA disodique pH8 2mM (3,72g/ 100ml).

11- Solutions d'élution pour chromatographie:

* Solution 1:

* Benzène 95 ml . * Acide acétique 5 ml .

* Solution 2:

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

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

Dry-rot :

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

Take-all :

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

Black-root-rot :

est généralement le noircissement des racines, et est une affection secondaire qui survient seulement après affection du plant exp :

le blé par *Gaeumannomyces graminis* .

BIBLIOGRAPHIE

- 1-ACAR,J, COURVALIN,P., E. BERGOGNE-BEREZIN, Y. CHABBERT, R. CLUZEL, A. COURTIEU, H. DABERNAT, H. DRUGEON, J. DUVAL, J.P. FLANDROIS, J. FLEURETTE, F. GOLDSTEIN, M. MEYRAN, CL. MOREL, A. PHILIPPON, J. SIROT, C.J. SOUSSY A. THABAUT, M. VERON (1991). Communiqué 1991 du comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie . PATH. BIOL.39: 737-740.
- 2-BARRY ,A.L , THORNSBERRY,C. , (1985). Susceptibility tests: diffusion test procedures. In Manual of Clinical Microbiology .Eds LENNETTE, E.H BALLOWS, A. , HANSLER, W.J,SHADOMY, J.R.H.) Washington, pp : 1000-1008 .
- 3-BASHAN,Y.,(1986); Migration of the rhizosphère bactéria azospirillum brasilense and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil Journal of general microbiol. 132;3407-3424.
- 4-BENDER,C.L.,COOKSEY,D.A.,STONE,H.E.,SIMS,J.J.,(1987).Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* Tn5 mutants defective in coronatine production.PHYSIOL.MOL.PLANT PATHOL.30:273-283.
- 5 -BENDER,C.L., YOUNG,SA.,MITCHELL,R.E,(1991) Conservation of plasmid DNA sequences in coronatine-producing pathovars of *Pseudomonas syringae*. APPL.ENV.MICROBIOL.. 57:993-999.
- 6 -BOUCHER,C.MARTINEL,A.BARBERIS,P; (1986) Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum*. GEN.GENT.205:270-275.
- 7-BRISSON,A,COURVALIN,P., TRIEU-COUT,P.SOUGAKOF,W.,(1989). Aspects actuels de la résistance bactérienne aux antibiotiques. ANN.BIOL.CLINI.47:98-101.
- 8-CARNEY,B.F.,KROCKEL,L.,LEARY,J.V,FOCHT,D.D,(1989). Identification of *Pseudomonas alcaligenes* chromosomal DNA in the plasmid DNA of the chlorobenzene-degrading recombinant *Pseudomonas putida* strain CB1-9.APPL.ENV.MICROBIOL.:55:1037-1039
- 9-CHAO,W.L, NELSON ,E.B.,HARMAN,E.G.,and HOSH,H.C.,(1986). Colonisation of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. PHYTOPATHOL , 76 : 60-65.
- 10-CLEWELL , D.B, (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. EUR.J.CLIN.MICROBIOL.INFECT.DIS. 9:90-102.

- 11-CODY, Y.S., GROSS, D.C., (1987). Characterization of pyoverdins, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. APPL. ENV. MICROBIOL. 53:928-934.
- 12-COLLMER, A., KEEN, N.T., (1986). The rôle of the pectic enzymes in plant pathogenesis. ANN. REV. PHYTOPATHOL. 25:141-157.
- 13-COOK, D.; SEQUEIRA, L. (1991). Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide production and for virulence. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 173: 1654-1662.
- 14-COOK, D.J. (1993) ; Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. ANN. REV. PHYTOPATHOL. 31:53-80.
- 15-COOKSEY, D.A. (1987). Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. APPL. ENV. MICROBIOL. 53:454-456.
- 16-COOKSEY, D.A., AZAD, H.R., CHA, J., LIM, C., (1990). Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. APPL. ENV. MICROBIOL. 56:431-435.
- 17-COOKSEY, D.A., and CHA, J. (1991). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. PROC. NATL. ACAD. SCI. 88:8915-8919.
- 18-CONTREPOIS, M. (1984) . Plasmides et virulence bacterienne : cas particulier des colibacilles 7ème reunion des microbiologistes de l'IRNA. pp 11-14.
- 19-COPLIN, D.L., FREDERICK, R.D., MAJERCZAK, D.R., (1992). New pathogenicity loci in *Erwinia stewartii* identified by random Tn5 mutagenesis and molecular cloning. MOL. PLANT. MICROBE. INTERACTIONS. 5:266-268.
- 20-COURVALIN, P., LAFONT, P., E. CHASLUS-DANCLA, G. GERBAUD, J.L. MARTEL, L. LAGORCE, (1987). Detection of a second mechanism of resistance to gentamycin in animal strains of *E. Coli*. ANTIMICROBIAL AGENTS and CHEMOTHERAPY. 31:1274-1277.
- 21-COURVALIN, P., OUNISSI, H., (1988). La resistance plasmidique aux antibiotiques : La Tunisie medicale n°6/375-380.
- 22-DE GROOT, A., FILLOUX, A., TOMMASSEN, J., (1991). Conservation of xcp genes, involved in the two step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other Gram negative bacteria. MOL. GEN. GENET. 229: 278-284.
- 23-DE LORENZO, V. ; MARTINEZ, J.L., (1988). Aerobactin production as a virulence factor : a reevaluation ; EUR. J. CLIN. MICROBIOL. INFECT. DIS. 7: 621- 629.

- 24-DE VINCENTE , A., AVILES. M , JC. CODINA, JJ. BORREGO, P. ROMERO, (1990).Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from naturel waters.J.APPL.MICROBIOL.68:625-632.
- 25-DJORDJEVIC,M.A. , GABRIEL , D.W. , ROLFE,B.G. , (1987) . Rhizobium-the defined parasite of legumes ANN.REV.PHYTOPATH.25:187-209.
- 26-EL BANNA,A.A.,SCOTT,P. , ... ; (1984) . Formation of trichotecenes by *Fusarium solanii* var.coerulem and *Fusarium sambucinum* in potatoes. APPL.ENV.MICROBIOL .47:1169-1171.
- 27-ELAD,Y., BAKER , R. ,(1985a). Influens of trace amounts of cations and siderophores-producing *Pseudomonas* on chlamidospore germination of *Fusarium oxysporum*; PHYTOPATH.75:1047-1052.
- 28-ELAD,Y. , BAKER,R., (1985b).The role of competition for ion and carbon in suppression of chlamyospore germination of *Fusarium spp.* by *Pseudomonas spp.*PHYTOPATHOL.75-1053-1059.
- 29-ELLIOTT,L.F,(1984). *Pseudomonas* as a factor in the growth of winter what (*Triticum aestivum l.*) SOIL.BIOL.BIOCHEM.16 :69-71.
- 30-ELLIOTT , L.F. , LYNCH, J.M ; (1985). Plant growth-inhibitory *Pseudomonas* , colonizing winter wheat (*Triticum aestivum*) l . Roots . Plant and soil. 83 : 57-65.
- 31-ELLIOTT ,L.F. FREDERICKSON,J.K , (1985a). Effects on winter wheat seedlings growth by toxin-producing rhizobacteria. Plant and Soil. 83: 399-409.
- 32-ELLIOTT , L.F., FREDERICKSON , J.K , (1985b) . Colonization of winter wheat roots by inhibitory rhizobacteria.SOIL . SCI . SOC . AM . J. 49 : 1172-1177.
- 33-ELLIOTT, L.F, CHERRINGTON , C.A., (1987). Incidence of inhibitory *Pseudomonas* in the pacific north-west . PLANT and SOIL . 101: 159-165.
- 34-ELLIOTT , L.F. , FREDERICKSON , J.K. ENGIBOUS , J.C. (1987) .Crop residues as substrate for host specific inhibitory *Pseudomonas* . SOIL. BIOL.BIOCHEM. 19 :127-134.
- 35-ELLIOTT , L.F. , STROO,H.F., PAPENDICK,R.I. (1988) .Growth, survival and toxin production of root inhibitory *Pseudomonas* crop residues , SOIL. BIOL. BIOCHEM.20: 201-207.
- 36-ELLIOTT , L.F. , BOLTON ,H. , (1989). Toxin production by a rhizobacterial *Pseudomonas sp.* That inhibit wheat root growth. PLANT and SOIL. 114: 269-278.

- 37-ELLIOTT ,L.F. , STROO,H.F.,FREDERICKSON, J.K., BOLTON,H. KENNEDY , A.C. , (1992). Competitive abilities of Tn5 tox mutants of a rhizobacterium inhibitory to wheat growth , PLANT and SOIL. 144: 143-153.
- 38-FAHY , P.C. , LOYD, A.B.,(1983) The fluorescent Pseudomonas . In Plant Bacterial diseases. A diagnostic guide : ACAD. PRESS. AUSTRALIA . pp.141-378
- 39-FALKOW , S. , (1988) . Molecular koch's postulates applied to microbial pathogenicity. REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES ; 10 :8274-8276.
- 40-FELICIELO , I , and CHINALIG , (1993) . A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *E. Coli* , ANALYT.BIO.CHEM.212 :394-401.
- 41-FETT ,W.F. ,OSMAN, S.F., FISHMAN, M.L., SIEBELES III , T.S. (1986) . Alginate production by plant-pathogenic Pseudomonas. APPL.ENV. MICROBIOL. 52: 466-473.
- 42-FETT.W.F. , OSMAN, S.F. , and DUNN, M.F. , (1987) . Auxin production by plant-pathogenic Pseudomonas and xanthomonas . APPL. ENV. MICROBIOL. 172 : 1839-1845.
- 43-FINLEY , B.B. FALKOW,S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. MICROBIOL. REV. 53 : 210-230.
- 44-GILARDI, R.G. , (1985) . Pseudomonas in manual of Clinical Microbiology.(Eds.LENNETTE , E.H. BALLOWS , HANSLER , W.J. , SHADOMY ,J.R.H.) Washington , pp 360-372.
- 45-GRAYSON , L.M., ELIOPOULOS , G.M. (1990). Antimicrobial resistance in the intensive care unit . SEMINARS IN RESPIRATORY INFECTIONS . 5 : 204-214.
- 46-GRINSTED ,J. And BENNETT , P.M. (1988) . Preparation and electrophoresis of plasmid DNA . METHODS IN MICROBIOLOGY . 21 :129-142.
- 47-GROSS , D.D. (1991). Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. ANN.REV.PHYTOPATH. 29 :247-278.
- 48-HAAS ,D. , RIESS , G. (1983) . Spontaneous deletions of the chromosome-mobilizing plasmid R68-45 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO.PLASMID. 9: 42-52.
- 49-ISENBERG , H.D. , (1988) . Pathogenicity and virulence : another view ; CLIN. MICROBIOL.REV. 1 : 40-53.
- 50-ISH-HOROVICZ , D. , and BURKE , J.F. , (1981). Rapid and efficient cosmid cloning NUCLEIC ACIDS 9:2989-2998.

- 51-JAMES, D.W. and GUTTERSON, N.I., (1986). Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* H.V37 a and their differential regulation by glucose. APPL. ENV. MICROBIOL. 52: 1183-1189.
- 52-JONES, R.N., BARRY, A.E., GAVAN, T.L., WASHINGTON, J.A., (1985). Susceptibility tests : microdilution and macrodilution broth procedures ; in Manual of Clinical Microbiology . (Eds : LENNETTE, E.H., BALLOWS, A., HANSLER, W. J. SHADOMY, J.RH.) WASHINGTON , pp : 972-977.
- 53-KADO, C.L., LIU, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of bacteriology. 145 : 1365-1373.
- 54-KAWAZAKI, H., TAKAO, M., KOISO, A., TONOMURA, K., (1985). Genetic rearrangement of plasmids : *in vivo* recombination between a dehalogenation plasmid and multiple-resistance plasmid RP4 in *Pseudomonas sp.* APPL. ENV. MICROBIOL. 49: 1544-1546.
- 55-KEMPE, J., SEQUEIRA, L., (1983). Biological control of bacterial wilt of potatoes : attempts to induce resistance by introducing treating tubers with bacteria. PLANT DISEASE . 67: 499-503.
- 56-KERR, A. (1987). The impact of molecular genetics on plant pathology. ANN.REV.PHYTOPAT. 25:87-110.
- 57-KING, G.J., (1989). Plasmid analysis and variation in *Pseudomonas syringae*. J.APPL.BACTERIOL. 67 : 489-496.
- 58-KROCKEL, L., FOCHT, D.D., (1987) Construction of chlorobenzene-utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare even. APPL. ENV. MICROBIOL. 53:2470-2474.
- 59-KUKOR, J.J., OLSEN, R.H., SIAK, J.S. (1989). Recuirment of a chromosomally encoded maleylacetate reductase for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by plasmid pJ P4 . Journal of Bacteriology . 171 : 3385-3390.
- 60-LAM, S.T., LAM, B.S., STROBEL, G., (1985). A vehicle for the detection of transposons into plant-associated *Pseudomonas*; Plasmid . 13 : 200-204.
- 61-LEMANCEAU, P., BAKKER, P.A.H.M., DE KOGEL, W.J., ALABOUVETTE, C., SCHIPPERS, B., (1992). Effet of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS 358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnation by non pathogenic *Fusarium oxysporum* FO47. APPL. ENV. MICROBIOL. 58: 2978-2982.
- 62-LEONG, J., (1986). Siderophores : their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant antifungal products of *Pseudomonas*. PHY. MOL. PLA. PATH. 40 : 163-171.

- 63-LEVY,E. , EYAL,Z., CHET,I. , and HOCHMAN,A., (1992). Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas* . PHY. MOL. PLA.PATH. 40 :163-171.
- 64-MARCHAL ,N., BOURDON,J.L. ,RICHARD, C. , (1982) . Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries ; Ed. DOIN PARIS.
- 65-MARQUES,A.M , ESTANOL, J.M, FUSTE , C. , SIMON-PUJOL , D. , JM. ALSINA, J. GUINEA, F. CONGREGADO (1986). Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp.* strain EPS- 5028. APPL. ENV. MICROBIOL. 52 :1221-1223.
- 66-MANRESA,A. , ESPUNY , M.J. ,GUINEA,J.COMELLES,F., (1987). Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas sp.* GSP-910 , MICROBIOL.BIOTECHNOL. 26:347-351.
- 67-MEDEIROS , A.A, COHENFORD,M., JACOBY, G.A. , (1985) . Five novel plasmid-determined β -Lactamase ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 27 : 715-719.
- 68-MICHEL-BRIAN , Y., LAPORTE,J.M, COUETDIC,G., SANSONETTI,P.J., (1986). Elimination of a virulence plasmid from *Shigella sonnei* and *E. Coli* by antibiotics. ANN. INST. PASTEUR. MICROBIOL. 137B: 291-295.
- 69 - MICHEL-BRIAN, Y.,DUPONT,M.J.,PLASIAT,P; -(1988). La sensibilité du bacille pyocyanique aux antibiotiques . SEM. HOP. PARIS. 64: 2099-2102.
- 70-MITCHELL , R.E., FREY, E.J and BENN, M.H. , (1986). Rhizobitoxine and L-threohydroxythreonine production by the plant pathogen *Pseudomonas andropogonis*. PHYTOCHEMISTRY. 25: 2711-2715.
- 71-MITCHELL , R.E., FREY,J., (1986) . Production of N-coronofacoyl-l-amino acid analogues of coronatine by *Pseudomonas syringae pv.atropurpure* in liquid cultures supplemented with l-amino acids . Journal G.M. 132: 1503-1507.
- 72-MITCHELL,R.E., (1991) . Implications of toxins in the ecology and evolution of plant pathogenic micro-organismes. BACTERIA EXPERIANCIA. 47: 491-803.
- 73-NORDMANN ,P., TREIEU, COUT, P., COURVALIN, P., (1987). Resistance bacterienne aux antibiotiques: mutations chromosomiques ou acquisition de genes. La lettre de l'infectiologue tome II , 16 : 491-497.
- 74-NOVICK,R.P. ,(1987) . Plasmid incompatibility. MICROBIOL. REV. 51 : 381-395.
- 75-CROSA, J.H. (1984), The relation ship of plasmid-mediated iron tranport and bacterial virulence. Ann. Rev. Microbiol. 38: 69-89.

- 76-O'SULLIVAN,D.J. O'GARA, F.,(1988). Delivery system for creation of one-step *in vivo* lacgene fusions in *Pseudomonas spp.* Involved in biological control. APPL.ENV.MICROBIOL. 54: 2877-2880.
- 77-O'SULLIVAN,D.J, MORRIS,J., O'GARA,F., (1990) Identification of an additional ferricsiderophore uptake gene clustered with receptor, biosynthesis, and fur-like regulatory genes in fluorescent *Pseudomonas sp.* strain M114. APPL. ENV. MICROBIOL 56: 2056-2064.
- 78-PALLERONI,J, (1984). Genes I. *Pseudomonas* in Bergey's Manuel of te systematic bacteriology 1: 141-199 , (KRIEG,N.R., HOLT, J.G., Eds) WILLIAMS and WILLIAMS BALTIMORE.
- 79-PALLERONI,J ,(1992). Present situation of the taxonomy of aerobic *Pseudomonas*. In *Pseudomonas : molecular biology and biotechnology*. Part3. Taxonomy and identification (Galli, Silver, S.Eds) American society of Microbiology. Washington.DC.pp: 105-115.
- 80-RICHAUME, A., BERNILLON,D. And FAURIE,G. (1992). Role of the intaspecific competition in the regulation of *Agrobacterium tumefaciens* transconjugant population level in soil experiments. FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY . 86: 321-330.
- 81-RONG,L., KARCHER, S.J., O'NEAL, K.Y., HAWES,M.C., C.D. YERKES, R.K. JAYASWAL, C.A. HALLBERG, S.B. GELVIN, (1990) . Pic A , a novel plant-inducible locus on the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome. Journal of Bacteriology. 127 : 5828-5836.
- 82-SAKAMURA,S., ISHIHARA,A., YOSHIHARA,T., (1988). Toxins of phyto pathogenic micro-organismes structural diversity and physiological activity. BIOLOGICALLY ACTIVE NATUREL PRODUCTS. pp : 57-64.
- 83-SCHIPPERS,B., BAKKER, A.W., and BAKKER , P.AH.M., (1987), Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere micro-organisms and the effect of cropping practices.ANN.REV.PHYTOPATH. 25: 339-358.
- 84-SCHOENKNECHT,F.D.,SABATH,L.D.,THORNSBERRY,C., (1985). Susceptibility tests : special tests In manual of Clinical Microbiology. (Eds: LENNETTE, E.H., BALLOWS,A., HANSLER, W.J.,SHADOMY, J.R.H Washington pp : 1000-1008.
- 85 - SCIOLI ,C., ESPOSITO,S. MARTINELLI,R., (1984) . In vivo activity of six- β - Lactam antibiotics against non- β -Lactamase producing and producing enterobacteria and antibiotic resistance transfer. BOLL.IST. SIOROTER. 63: 338-347.
- 86-SHAW,P.D., (1988) . Plasmids in phytopathogenic bacteria. EXPERIMENTAL and CONCEPTUAL PLANT PATOLOGY ; C : 221-234.

- 87-SHENG HUANG,J., (1986) . Ultrastructure of bacterial penetration in plants. ANN.REV.PHYTOPATH.24: 141-157.
- 88-SILVER,S., MISRA, T.K., (1988) . Plasmid-mediated heavy metal resistances . ANN.REV.PHYTOPATH.42: 717-743.
- 89-SMIRNOV,V.V., KIPRIANOVA, E.A., GARAGULYA, A.D., DODATCO,T.A., and pilyashenko,I.I., (1990).Antibiotic activity and siderophores of *Pseudomonas capacia*. PRIKLADNAYA BIOKIMIYA MIKROBIOLOGIYA. 26: 75-80.
- 90-SMITH, H., (1991). The influence of the host on microbes that cause disease. PROC.NAT.SOC.BACTERIO. 246: 95-105.
- 91-THOMASHOW ,L.S., and WELLER, D.M., (1988). Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var.tritici*. Journal of Bacteriology . 170: 3499-3508.
- 92-THOMASHOW, L.S., and PIERSON, L.S., (1992) . Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-80. MOL.PLANT.MICROBE. INTERACTIONS . 5: 330-339.
- 93-THOMASHOW, L.S., WELLER, D.M., OWNLEY, B.H. , (1992) . Influence of in situ and in vivo pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis var.tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 . PHYTOPATH. 82: 178-184.
- 94-THOMASHOW, L.S.,and WELLER, D.M.,(1993a) . Microbial metabolites with biological activity against plant pathogens. pp: 174-180, by the american chemical society.
- 95-THOMASHOW, L.S.,and WELLER, D.M.,(1993b) . Use of rhizobacteria for biocontrol. Current opinion in biotechnology . 4: 306-311.
- 96-THORNSBERRY ,C., SHERRIS,J.C., (1985) . General considerations in Manual of Clinical Microbiology. (Eds : LENNETTE,E.H., BALLOWS, A., HANSLER, W, J., SHADOMY, J.R.H.,) Washington pp :959-966.
- 97-TREVORS, J.T., and BERG, G., (1989). Conjugal RP4 transfer between *Pseudomonas* in soil and recovery of RP4 PLASMID DNA from soil. SYSTEM.APPL.MICROBIOL. 11: 223-227.
- 98-VINCENT , M.A., HARRISSON, L.A., BRACKIN, J.M., KOVACEVICH, P.A., MUKERJI, P. WELLER, D.A.,PIERSON, L.S. (1991) . Genetic analysis of the antifungal activity of a soil borne *Pseudomonas aureofaciens* APPL.ENV. MICROBIOL. 57: 2928-2934.
- 99-VISSER , R., HOLZAPFEL,W.H., BEZUIDENHOUT, J.J., and KOTZE, j,m, (1986) . Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. APPL. ENV.MICROBIOL. 52: 552-555.

100-WELLER,D.M., (1988) . Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria ANN.REV.PHYTOPATH. 26: 379-407.

101-ZANNONI ,D. , (1989) . The respiratory chains of pathogenic Pseudomonas . BIOCHIMIA ET BIOPHYSICA Acta . 975: 299-316.