



MÉMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotéchnologie végétale - **Option:** Production végétales et Microbiennes

THÈME

Isolement de souches de *Pseudomonas* à partir des sols et des nécroses d'oliviers de l'Ouest Algérien : Identification et caractérisation biochimique, sérotypique et phytopathologique. Recherche de l'antibiorésistance, d'antagonisme (bactériocine) et d'ADN plasmidique.

Présenté par : Benyoub Khéira

Soutenue le : / /2011 devant le jury composé de :

M ^{me} Kaid Harche- Meriém	Professeur,	Univ. U.S.T.O-MB	Présidente.
M ^{elle} Fortas- Zohra	Professeur,	Univ. Oran Es Sénia	Examinatrice 1.
M ^f Moussaoui- Abdellah	Professeur,	Univ de Bechar	Examineur 2.
M ^f Djaber - Abderezak	Maitre de conférence,	Univ. U.S.T.O-MB	Examineur 3.
M ^f Kacem - Mourad	Professeur,	Univ. Oran Es Sénia	Rapporteur.
M ^f Tandjaoui- Bakhti	Docteur,	(INPV) Mesreghin	Membre invité.

Année universitaire : 2010 /2011

SOMMAIRE

1. Introduction

2. Etude Bibliographique

2.1. Etude bibliographique sur la production des olives en Algérie

- 2.1.1. Systématique de l'olivier
- 2.1.2. Position des oliviers en Algérie
- 2.1.3. La production des olives dans le monde et en Algérie

2.2. Etude bibliographique sur le groupe des *Pseudomonas*

- 2.2.1. Historique
- 2.2.2. Définition
- 2.2.3. Habitat et pouvoir pathogène
 - 2.2.3.1. Habitat
 - 2.2.3.2. Pouvoir pathogène
 - 2.2.3.2. 1. Pouvoir pathogène chez l'homme
 - 2.2.3.2. 2. Pouvoir pathogène pour les animaux
 - 2.2.3.2. 3. Pouvoir pathogène pour les végétaux
- 2.2.4. Les propriétés des *Pseudomonas*
- 2.2.5. Caractéristiques des *Pseudomonas*
- 2.2.6. Les *Pseudomonas* dans la lutte biologique
- 2.2.7. Effet des *Pseudomonas* sur l'olivier
 - 2.2.7. 1. Le chancre bactérien de l'olivier
 - 2.2.7. 2. Les symptômes de la maladie et description des galles
 - 2.2.7. 3. Cycle de la maladie
 - 2.2.7. 4. Gestion de la maladie

2.3. Etude bibliographique sur les interactions entre bactéries

- 2.3.1. Définition
- 2.3.2. Classification des interactions
 - 2.3.2.1. Classification phénoménologique
 - 2.3.2.2. Classification mécaniste
- 2.3.3. Définition sur les bactériocines

3. Matériel & Méthodes

3.1. Matériel biologique

- 3.1.1. Sol et Arbuste d'oliviers utilisées
- 3.1.2. Provenance des souches bactériennes
- 3.1.3. Milieux de cultures
- 3.1.4. Les Galeries Api utilisées
- 3.1.5. Les antibiotiques testés

3.2. Méthodes

3.2.1. Prélèvement des échantillons

3.2.1.1. Prélèvement des échantillons à partir du sol

3.2.1.2. Prélèvement des échantillons de galles

3.2.2. Purification des souches utilisées

3.2.3. Isolement et mise en culture des microorganismes

3.2.2.1. Isolement à partir du sol

3.2.2.2. Isolement à partir des galles

3.2.4. Identification et caractérisation des isolats

3.2.4.1. Identification des isolats

3.2.4.1.1. Tests de microbiologie classiques

3.2.4.1.2. Tests physiologiques

3.2.4.1.3. Tests biochimiques

3.2.4.1.3.1. Test de LOPAT

3.2.4.1.3.2. Tests biochimiques classiques pour l'identification de l'espèce et la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*

3.2.4.1.4. Les tests Api

3.2.4.2. Caractérisation des isolats

3.2.4.2.1. Recherche du type sérotypique des isolats de *Pseudomonas*

3.2.4.2.2. Recherche de l'antibiorésistance

3.2.4.2.3. Recherche des inhibitions (antagonisme)

- Préparation de l'extrait de culture
- Méthode directe : (confrontation bactérie / champignon / bactérie)
- Méthode indirecte : (confrontation surnageant / bactérie)

3.2.4.2.4. Recherche de la nature de l'agent inhibiteur

3.2.4.2.5. Recherche de l'ADN chromosomique et l'ADN extra chromosomique (plasmide)

3.2.5. Test d'infection des plantules d'oliviers par les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi*

3.2.6. La conservation des souches isolées

4. Résultats & Discussion

4.1. Identification des isolats

4.1.1. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats

4.1.2. Caractéristiques physiologiques des isolats

4.1.3. Caractéristiques biochimiques des isolats

4.1.4. Identification de la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*

4.1.5. Confirmations de l'identification des isolats par les tests Api

4.2. Caractérisation des isolats

4.2.1. Résultats relatifs aux types sérotypiques

4.2.2. Résultats relatifs à l'antibiorésistance

4.2.3. Résultats relatifs à l'antagonisme

4.2.4. Caractéristiques et nature de l'agent inhibiteur apparenté aux bactériocines

4.2.5. Recherche de l'ADN chromosomique et extra chromosomique (plasmide)

4.2.6. Formation des tumeurs au niveau des oliviers après infection

5. Conclusion et perspectives

6. Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Infections cutanées due au *P. syringae*

Figure 2 : Maladies causées par les *Pseudomonas* sp.

Figure 3: Tumeurs dues au *P. syringae* pv. *savastanoi* sur le tronc, les branches et les rameaux d'un arbre d'olivier de la variété Chemlel

Figure 4: Coupe transversale d'une galle bactérienne évolutive sur un rameau d'olivier

Figure 5 : Représentation schématique de la classification de Fredericton (1977)

Figure 6 : Echantillon du sol plastifié étiqueté et numéroté

Figure 7 : Aspect de nécrose sur le rameau d'olivier collectée de la station d'Ain Temouchent

Figure 8 : Aspect d'une feuille nécrosée collectée de la station de Sig (Mascara)

Figure 9 : Ensemencement par la technique des quatre cadrans

Figure 10: Mode opératoire des galeries Api (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France)

Figure 11 : Présentation du réactif Latex *Pseudo* (Bio -Rad. Lot 4 J2027)

Figure 12 : le mouvement de rotation d'anti sérum polyvalents des *Pseudomonas* (*P. fluorescens* ou *P. aeruginosa*) avec une goutte de la suspension bactérienne des trente cinq souches de *Pseudomonas*)

Figure 13 : Le mode opératoire du test de sérotypage des isolats de *Pseudomonas* (selon le fournisseur : Bio-Rad)

Figure 14 : Préparation de l'extrait de culture (EC) bactérien

Figure 15 : Test d'infection des plantules d'oliviers par les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi*

Figure 16 : Aspect des colonies de *Pseudomonas* sur la gélose Héктоéne

Figure 17 : Aspect des colonies de *Pseudomonas* (lactose -) sur la gélose BCP (Pourpre de bromocrésol)

Figure 18 : Production de la pyocyanine sur le milieu King A (A) et la pyoverdine sur le milieu King B (B)

Figure 19 : Forme et mode de regroupement de l'isolat PNI (A) et l'isolat PS3 (B) après coloration de Gram

Figure 20 : Aspect du milieu Mannitol Mobilité avant (A) et après incubation (B) (Mise en évidence de la mobilité des *Pseudomonas*)

Figure 21 : Effet du pH sur la croissance des 40 isolats testés

Figure 22 : Aspect du milieu levane avant (A) et après polymérisation du fructose en poly fructose (B)

Figure 23 : Mise en évidence de l'enzyme oxydase sur papier filtre

Figure 24 : Mise en évidence de l'activité pectinolytique sur le milieu pectinase

Figure 25 : Confirmation de l'activité pectinolytique sur le milieu différentiel PH (Pectine Hildebrand)

Figure 26 : Aspect du milieu Möeller avant (A) et après incubation (B)

Figure 27 : Aspect de la feuille du Tabac avant (A) et après l'infection (B)

Figure 28 : Aspect du milieu MEVAG (incubée en aérobiose) avant (A) et après incubation (B)

Figure 29 : Culture bactérienne après 10 jours de culture sur des milieux contenant des pourcentages (%) différents du sodium et 5 % du saccharose

Figure 30 : Mise en évidence de l'enzyme estérase

Figure 31 : Mise en évidence de l'enzyme catalase

Figure 32 : Réactions alcalines des isolats sur le lait tournesolé

Figure 33 : Galerie Api 20 NE des trois espèces : *P. aeruginosa* (A), *P. fluorescens* (B) et *P. syringae* (C)

Figure 34 : Galerie Api 20 E (A), Api NH (B), Api AUXA COLOR™ 2 (C), Api 20 A (D) et la galerie Api 20 Strep

Figure 35 : Tests d'agglutination positive

Figure 36 : La sensibilité des souches de *P. fluorescens* aux antibiotiques

Figure 37 : Cas de résistance aux antibiotiques observée chez les souches de *Pseudomonas* isolées

Figure 38: Antagonisme entre des souches de *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens* et *syringae*) et de *Rhizobium* en milieu solide (méthode des touches)

Figure 39 : Antagonisme entre les deux champignons contre les souches de *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens* et *syringae*) en milieu solide (méthode des touches)

Figure 40 : Effets des surnageants des souches inhibitrices de *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens*) et des souches de *Rhizobium* en milieu solide (méthode des puits)

Figure 41 : Action du pH sur l'agent inhibiteur des souches de *Rhizobium* RNU9 (A) et de *P. fluorescens* PN5 (B)

Figure 42 : Action de la chaleur sur l'agent inhibiteur des souches de *Rhizobium* RNU9 (A) et de *P. fluorescens* PN5 (B)

Figure 43 : Action du froid sur l'agent inhibiteur des souches de *Rhizobium* RNU9 (C) et de *P. fluorescens* PN5 (D)

Figure 44 : Action du Tween 20 et du Tween 80 sur l'agent inhibiteur des souches de *Rhizobium* RNU9 (A) et de *P. fluorescens* PN5 (B)

Figure 45 : Action du SDS sur l'agent inhibiteur des souches de *Rhizobium* RNU9 (C) et de *P. fluorescens* PN5 (D)

Figure 46 : Action des Protéases sur l'agent inhibiteur des souches de *Rhizobium* RNU9 et de *P. fluorescens* PN5

Figure 47 : Contenu en ADN plasmidique chez les 20 souches de *P. aeruginosa* et les 5 souches de *P. syringae*

Figure 48 : Contenu en ADN plasmidique chez les 15 souches de *P. fluorescens*

Figure 49 : Formation d'une galle sur la plantule d'olivier après trois mois d'infection par la souche de *P. syringae* PN1

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Variétés Algérienne de l'olivier

Tableau 2 : Classification des mécanismes en fonction de la matrice des effets. D'après Odum (1953)

Tableau 3 : Espèce, Souche, Provenance et références des souches utilisées

Tableau 4 : Antibiotiques utilisés, leurs concentrations et leurs modes d'actions (Tableau extrait d'un document sur la standardisation de l'antibiogramme, 4^{ème} édition 2005)

Tableau 5 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les *Pseudomonas* sp. (tableau extrait du document sur la standardisation de l'antibiogramme, 4^{ème} Edition 2005)

Tableau 6 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats testés

Tableau 7 : Effet du pH sur la croissance des isolats testés

Tableau 8 : Effet des températures sur la croissance des 40 isolats testés

Tableau 9: Regroupement des isolats selon leurs températures de croissance

Tableau 10 : Fiche d'identification des *Pseudomonas* fluorescents selon Young & Triggs (1994)

Tableau 11 : Tests biochimiques pour l'identification de la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*

Tableau 12 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 NE (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France)

Tableau 13 : Caractéristiques distinctives entre les espèces de *Pseudomonas*

Tableau 14 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 E (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France)

Tableau 15 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 strep (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France)

Tableau 16 : Tableau de lecture de la galerie Api NH (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France)

Tableau 17 : Tableau de lecture de la galerie Api AUXA COLOR™ 2 (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France)

Tableau 18 : Tableau de lecture de la galerie Api 20A (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France)

Tableau 19 : Profils fermentaires des souches de *Pseudomonas* isolées

Tableau 20 : Caractéristiques des *P. syringae* pv. *savastanoi* l'agent causal de la maladie des nœuds d'olive selon Lelliott & Stead (1987)

Tableau 21 : Le sérotypage des souches de *P. fluorescens* isolées

Tableau 22 : Le sérotypage des souches de *P. aeruginosa* isolées

Tableau 23 : Résultats de l'antibiogramme des *P. fluorescens*

Tableau 24 : Résultats de l'antibiogramme des *P. aeruginosa*

Tableau 25 : Résultats de l'antibiogramme des *P. syringae*

Tableau 26 : Inhibitions obtenues par la méthode directe

Tableau 27 : Inhibitions obtenues par la méthode indirecte

Tableau 28 : Répartition de l'ADN plasmidique chez les souches testées

LISTE DES ABRÉVIATIONS

HCN : Cyanure d'hydrogène
INRA : Institut National De La Recherche Agronomique
Pb : Paire de base
D : Dilution
Do : Densité Optique
KDa : Kilo Dalton
Kpb : Kilo paire de base
pv : Pathovars
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
Qsp : Quantité suffisante pour
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
PGPR: Plant Growth Promoting *Rhizobactéria*
rpm : Rotation par minute
BGN : Bacille à Gram négatif
ADH : Arginine déshydrolyase
R : Résistance
S : Sensibilité
TE : Tris –EDTA
LP₂ VM : Laboratoire de Production Végétale et Microbienne
ATCC : American Type Culture Collection

REMERCIEMENT

Ce travail de magister a été réalisé au département de biotechnologie végétale de l'université d'Oran **USTO.M.B** (laboratoire de biochimie et de cytologie).

Après les louanges à Dieu l'unique, l'éternel je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Je remercie le tout puissant de m'avoir donné le courage et la force de réaliser mon rêve le plus cher et celui de mes défunts parents ;

Mes remerciements s'adressent à Madame : **Kaid.Harche.Mériem** (Professeur à l'université d'Oran, **USTO.M.B**), pour sa générosité et la grande patience dont elle a su faire preuve malgré ses charges professionnelles et je tiens à le remercier d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

J'exprime ma gratitude à M^{elle} : **Fortas. Zohra** (Professeur à l'université d'Oran Es sénia) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements au Professeur Monsieur : **Moussaoui. Abdellah** (Professeur à l'université de Bechar) d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

J'exprime mes vifs remerciements aussi à Monsieur : **Djaber .Abderrezak** (Docteur à l'université d'Oran, **USTO.M.B**) d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

J'exprime mes vifs remerciements aussi à Monsieur : **Tandjaoui. Bakhti** (Docteur à (INPV) Missereghin) d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur : **Kacem. Mourad** (Professeur à l'Université d'Oran Es sénia), qui tant qu'encadreur de ce mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Un grand merci à tous mes enseignants qui ont participé à enrichir mon cursus d'étudiante au sein du département de Biotechnologie.

Enfin, merci à toutes les équipes des laboratoires au niveau du département et à l'Hôpital Militaire d'Oran (**HMRUO**).

Khéira. B.

Dédicaces

En premier lieu mes remerciements s'orientent aux prunelles de mes yeux, mes très chers parents qui m'ont enseigné que le succès a pour l'unité la sueur et que ça se gagne et n'est jamais offert.

Je n'oublie pas mon frère Mohamed et mes sœurs : **Zohra, Zoubida, Fatma, Houaria** pour ces encouragements et ses prières pour moi tout le long de mes années d'étude.

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches : Tantes, Oncles, Cousins et Cousines. Ainsi que mes amis (ies) qui m'ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Khéira. B.

1- INTRODUCTION

Les plantes constituent la majorité des ressources énergétiques dont dépendent les hommes et les animaux. Malheureusement, lorsqu'une plante est atteinte d'une maladie, sa croissance, sa fertilité et sa productivité sont affectées. Des symptômes se développent et tout ou une partie de l'organisme peut mourir. Les agents responsables des maladies de plantes sont très similaires à ceux rencontrés chez l'homme et les animaux. Ils peuvent être biologiques ou physiques (Benizri *et al.*, 2001).

Les maladies des plantes sont parfois regroupées par types de symptômes, par type d'organes qu'elles affectent et par type de plantes affectées, mais le critère le plus utile reste la classification selon le pathogène responsable de la maladie (Benjama, 2003).

Les oliviers sont parmi les plus anciens arbres fruitiers cultivés dans le bassin méditerranéen y compris l'Algérie (Benjama, 2003). Ces dernières occupent toutefois une part très importante dans l'économie agricole de certains pays méditerranéens (source FAO, 2009).

L'oliveraie en Algérie occupe une superficie de 240 000 d'hectares, elle représente 3% de la production mondiale distribués essentiellement dans les zones montagneuses (Bartolini & Petrucelli, 2002).

L'Algérie (via le ministère de l'agriculture) a lancé un vaste programme (2009-2014) de plantation d'environ un million 1000 000 d'hectares à travers une quinzaine de wilayas. Il s'agit, en fait, d'un programme très ambitieux dont l'objectif principal est de hisser la filière oléicole algérienne au rang des pays producteurs d'olives.

Cependant, l'intensification de l'oléiculture pose un certain nombre de problèmes comme par exemple l'infection des arbres par les bactéries phytopathogène entre autres le genre *Pseudomonas* qui forment un large groupe de bactéries colonisant le sol, les plantes et l'eau. Certaines peuvent causer des infections mortelles chez l'humain (Mavrodi *et al.*, 2001).

P. syringae pv. *savastanoi* est une espèce considérée comme étant une bactérie phytopathogène causant des tumeurs (galles) chez l'olivier ce qui entraîne des pertes économiques dans ce secteur (Senhadji, 2005). Depuis l'apparition de cette bactérie dans l'ouest Algérien, à Ain Temouchent et à Sig (Mascara) le chancre bactérien prend de plus en plus d'ampleur ainsi la lutte contre ce chancre devient une priorité. La lutte contre cette maladie par les traitements chimiques devient pénible car la santé des consommateurs et le coût élevé des fongicides sont des éléments qui ne favorisent pas le développement de cette lutte chimique et oriente les chercheurs de penser à une lutte biologique.

Des études ont montré que l'inoculation des plantes à l'aide de certaines souches de *Pseudomonas* ont un effet sur la protection des plantes contre des microorganismes pathogènes (Digat, 1994 ; Chin *et al.*, 2003 & Duhoux *et al.*, 2004).

Ce travail a pour but l'isolement de souches de *Pseudomonas* en particulier *P. syringae* pv. *savastanoi* à partir des sols et des nécroses d'oliviers cultivés en Algérie (régions d'Ain Temouchent et Sig). Les isolats peuvent être caractérisés et identifiés par des méthodes microbiologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques. L'action antagoniste entre des souches de *Pseudomonas* isolées, d'autres souches de *Rhizobium* et de champignons (*Aspergillus niger* et *Penicillium citrinium*) contre les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* pathogène peut être évaluées ce qui conduira à la sélection de souches ayant un pouvoir inhibiteur (production de bactériocines ou d'autres agents inhibiteurs) vis-à-vis des souches pathogènes.

Ce document comporte :

1) Une étude bibliographique qui s'attache à définir et présenter :

- la production des olives en Algérie.
- les bactéries du genre *Pseudomonas* et leurs effets sur l'arbre d'olivier.
- les interactions inter-bactériennes ainsi que les différents facteurs antagonistes secrétés dans le milieu contre les *Pseudomonas* isolées.

2) Une méthodologie (Matériel & méthodes) relative à la microbiologie, la physiologie et à la biochimie des *Pseudomonas*, aux différents tests caractéristiques (le type sérotypique des souches isolées, antibiorésistance et le contenu plasmidique), à l'étude de l'interaction inter-bactériens et la nature de l'agent inhibiteur produits par des souches inhibitrices (souches de *Rhizobium* et de *Pseudomonas*).

3) Une présentation des résultats obtenus divisés en trois parties. La première expose les caractéristiques microbiologiques, physiologiques et biochimiques des souches de *Pseudomonas* isolées. Dans la deuxième partie sont rapportés les différents résultats des tests caractéristiques (le type sérotypique des souches isolées, antibiorésistance et le contenu plasmidique). La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats relatifs à l'étude de l'interaction inter-bactériens et la nature de l'agent inhibiteur.

4) Enfin, la quatrième partie permet de conclure sur les différents points abordés, tant d'un point de vue microbiologique et biochimique que d'un point de vue lutte biologique.

2- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Etude bibliographique sur la production des olives en Algérie

2.1.1. Systématique de l'olivier

L'olivier appartient :

- **Classe** : Dicotylédones.
- **Sous - classe** : Gamopétales.
- **Ordre** : Ligustrales.
- **Famille** : Oléacées.
- **Sous – famille** : Oliveae.
- **Genre** : *Olea*.
- **Espèce** : *europaea*.

L'espèce *Olea europaea* a longtemps été subdivisée en deux sous-espèces, *Olea europaea* var. *europaea* pour l'olivier domestique, et *Olea europaea* var. *sylvestris* pour l'oléastre, ou olivier sauvage. Il existe cependant six autres sous-espèces:

Olea europaea subsp. *africana* (Afrique et Madagascar).

Olea europaea subsp. *cerasiformis* (Canaries et Madère).

Olea europaea subsp. *cuspidata* (Afrique et Asie, de l'Iran jusqu'en Chine).

Olea europaea subsp. *guanchica* (Canaries).

Olea europaea subsp. *laperrinei* (Algérie, Argentine, Niger et Soudan).

Olea europaea subsp. *maroccana* (Maroc).

La famille des Oléacées comporte environ 30 genres et 600 espèces. Les variétés cultivées ; se composent souvent de spécimens se ressemblant d'un point de vue morphologique, mais aux caractères génétiques différent (Guignard & Dupont, 2004 & Tourte *et al.*, 2005).

2.1.2. Position des oliviers en Algérie

L'olivier fait partie de l'identité des peuples méditerranéens. En Algérie, l'huile d'olive colle à la définition du paysan kabyle. Les wilayas de la Kabylie, concentrent à elles seules les 2/3 du verger national oléicole. En Algérie, l'olivier occupe une superficie de 240 000 ha de plantation. L'olivieraie algérienne se répartie sur trois zones oléicoles importantes telle que la donne le ministère de l'Agriculture pour l'année 2010 (DSA, 2010).

- ***La zone de la région ouest :***

Représentant 31 400 hectares répartis entre 5 wilayas qui sont : Tlemcen, Ain Temouchent, Mascara, Sidi Belabes et Relizaine. Cette zone représente 16,40 % du verger oléicole national.

- ***La zone de la région centrale du pays :***

De loin la plus importante, couvre une superficie de 110 200 hectares répartis entre les wilayas de : Ain Defla, Blida, Boumerdes, Tizi-Ouzou, Boira et Bejaia. Dans la région du centre Kabylie (Tizi-Ouzou, Bouira et Bejaia) détient à elle seul pré de 44 % de la superficie

oléicole national, il s'agit surtout des vergers extensifs situés sur des sols à forte déclivité, ce qui constitue une contrainte à tous recours à l'intensification.

- ***La zone de la région Est :***

Cette zone est représentée par des oliveraies de 49 900 hectares, elle se répartit entre les wilayas de Jijel, Skikda, Mila et Guelma. Le patrimoine oléicole, constitue 40 % du verger arboricole national.

Depuis l'année 2001 la plantation des oliviers en Algérie, redémarre, sous l'effet du plan national de développement agricole. La plantation de l'olivier n'arrive malheureusement pas à remplacer, les pertes dues aux incendies, à la vieillesse, et aux multiples maladies.

La part des arbres en production dans le verger national est relativement faible. Dans la part des arbres considérés en production, près de 40% n'ont aucun rendement, ce qui révisé sévèrement à la baisse du verger productif.

2.1.3. La production des olives dans le monde et en Algérie

Le patrimoine oléicole mondial est d'environ 830 millions d'oliviers, dont 190 millions en Espagne. La production mondiale d'olives de table est d'environ 750 000 tonnes. Tandis que La production mondiale (2010) d'huile d'olive est de 3 200 000 tonnes, dont 80% sont produits par la Communauté Européenne, l'Espagne (47%) avec 1,5 m de tonnes, étant le premier producteur, l'Italie (31%) et la Grèce (20%) en produisent environ 1,6 m de tonnes. Le Portugal en produit environ 64000 tonnes soit 2% de la production européenne.

Hors de la CEE, les principaux pays producteurs sont : la Turquie (5%), la Syrie (5%), la Tunisie (4%), le Maroc (2%), l'Algérie (1%), la Palestine (1%) et la Jordanie (1%). Une même disparité s'observe pour la consommation d'huile d'olive. Ce sont les Grecs qui en consomment le plus, suivis par les Espagnols, les Italiens et les Portugais. La consommation d'huile d'olive dans les pays de l'Europe du Nord est beaucoup plus faible. En France la production est d'environ 4500 tonnes (2009/10) par an soit 0,2% de la production Européenne (anonyme, 2003).

L'olivier constitue à l'échelle nationale une des principales essences fruitières. Le verger oléicole occupe 240 000 ha et produit près de 20.103 tonnes d'huile.

La consommation moyenne nationale est de 13 kg/hab/an dont 12 kg sous forme de graines et 1kg sous forme d'huile. Le profil variétal est constitué essentiellement de cinq variétés très répandues Chemlal, Sigoise, Limli, Azeradj et Bouchouk. Cette faible diversité variétale contraste avec celle des milieux de production. Il existe des variétés de populations très rustiques et très adaptées aux conditions pédo-climatiques de leur milieu d'implantation mais qui ne sont pas multipliées tel que les variétés Agrarez, Aguenau et Aghenfas. Une prise de conscience s'est opérée récemment à ce sujet pour améliorer la conduite du verger, réfléchir à son extension et sur des terres où l'intensification de la production est possible. Ce regain d'intérêt pour l'arboriculture, d'une manière générale et pour l'oléiculture de façon particulière (anonyme, 2003).

Les principaux pays consommateurs sont également les principaux pays producteurs. L'ensemble des pays de l'Union européenne représente 71% de la consommation mondiale. Les pays du pourtour méditerranéen représentent 77% de la consommation mondiale. Les autres pays consommateurs sont les Etats-Unis, le Canada, l'Australie et le Japon.

2- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'évolution de la production et de la consommation depuis 1970 montre une faible croissance jusqu'au début des années 90, puis une brusque augmentation à la fois de la production et de la consommation pour les années 1996, 1997 et 2009. Malgré la chute de la production qui s'en est suivie, la consommation semble ne pas diminuer.

La consommation européenne est importante au cours des dernières années du fait de l'ouverture de nouveaux marchés pour l'huile d'olive.

Les principaux pays producteurs sont aussi les principaux pays exportateurs. Une fois encore, ce sont les pays du pourtour méditerranéen qui réalisent plus de 95% des exportations (anonyme, 2003).

Parmi les principales variétés d'oliviers qui existent dans notre pays (Algérie) nous avons :

La variété chemlal qui se rencontre dans toute la Kabylie du littoral au sud de mchedellah, et la vallée de la Soummam, elle est considérée comme étant bonne productrice d'huile de bonne qualité (Haas & Défago, 2005).

Les variétés Limli, Azeradj et Bouchouk, se rencontrent surtout dans la vallée de la Soummam (Cottier, 1999 ; Duffy *et al*, 2003). Ces variétés à elles seules représentent les trois quarts de la production oléicole nationale. Une autre variété mais plus destinée à la consommation (olives de table) que la production d'huile est **la sigoise**, de la région de Sig (Mascara) dans l'ouest du pays, elle produit d'excellentes olives de table.

Les variétés introduites, pour la majorité durant l'époque coloniale sont **Cornicabra, la Lucque, la Frontoio et la Leccino**, sont pour la majorité d'origine italienne ou française et se sont bien adaptées aux conditions climatiques de notre pays (Haas & Défago, 2005).

On distingue les différentes variétés d'olives en fonction de la destination finale du fruit, soit en 3 typologies :

- **les olives à l'huile** : leur production doit être constante et garantir une bonne rentabilité en terme de quantité et de qualité d'huile ;

- **les olives de table** : elles impliquent une certaine grosseur du fruit et un contenu riche en pulpe et en noyau mais faible en huile ;

-**les olives mixtes** : elles présentent des propriétés à cheval entre les deux groupes ; en fonction du moment de sa récolte et de son adaptation à la zone de culture, on destine le fruit soit à la table (une fois la taille adéquate atteinte) soit à l'extraction de l'huile (Tourte *et al.*, 2005).

La liste des variétés Algériennes de l'olivier est présentée dans le tableau 1

Tableau 1. Variétés Algérienne de l'olivier (Giani, 2006).

Variété	Diffusion	Utilisation	Rendement d'huile en %
Abani	restreinte	huile	16 à 20
Aberkane	restreinte	double aptitude	16 à 20
Aaleh	restreinte	huile	18 à 22
Aghchren d'el Ousseur	restreinte	double aptitude	16 à 20
Aghchren de Titest	restreinte	double aptitude	14 à 18
Aghenfas	restreinte	double aptitude	16 à 20
Agrarez	restreinte	double aptitude	16 à 20
Aguenauou	restreinte	double aptitude	16 à 20
Aharoun	restreinte	double aptitude	18 à 22
Aimel	restreinte	huile	18 à 22
Akerma	restreinte	double aptitude	18 à 22
Azeradj	10 % de la surface oléicole	double aptitude	24 à 28
Blanquette de Guelma	Nord-Est Constantinois	huile	18 à 22
Bouchouk Guergour	restreinte	double aptitude	22 à 26
Bouchouk Lafayette	restreinte	double aptitude	22 à 26
Bouchouk Soummam	Vallée Oued Soummam	double aptitude	22 à 26
Boughenfous	restreinte	huile	22 à 26
Bouichret	Association avec aharoun et chemlal	huile	20 à 24
Boukaila	restreinte	huile	16 à 20
Bouricha	restreinte	huile	18 à 22
Chemlal	40 % du verger oléicole Algerien	huile	18 à 22
Ferkani	Région des Aures	huile	28 à 32
Grosse du Hamma	restreinte	double aptitude	16 à 20
Hamra	Nord Constantinois	huile	18 à 22
Limli	8 % du verger oléicole Algerien	huile	20 à 24
Longue de Miliana	Khemis Miliana–Cherchell-Littoral	double aptitude	16 à 20
Mekki	Tenes	huile	12 à 16
Neb Djemel	restreinte	huile	16 à 20
Ronde de Miliana	restreinte	double aptitude	16 à 20
Rougette de Mitidja	restreinte	huile	18 à 20
Sigoise	25 % du verger oléicole Algerien	double aptitude	18 à 22
Souidi	Locale (Khenchla)	huile	
Tabelout	restreinte	huile	20 à 24
Tefah	restreinte	double aptitude	18 à 22
Takesrit	Basse vallée de la Soummam	huile	16 à 20
Zeletni	restreinte	huile	14 à 18

2.2. Etude bibliographique sur le groupe des *Pseudomonas*

2.2.1. Historique

En raison de leur présence généralisée dans l'eau et des graines de plantes telles que les dicotylédones, les *Pseudomonas* ont été observés au début de l'histoire de microbiologie. Le nom générique *Pseudomonas* créé pour ces organismes a été défini en terme assez vague, en 1894 par Migula, comme un genre de bactéries à Gram-négatives, en forme de tige et possédants des flagelles polaires. Peu de temps après, les *Pseudomonas* ont été isolées de nombreuses niches naturelles et un grand nombre de noms d'espèces a été initialement attribuée au genre. Selon la deuxième édition du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986 ». L'historique des *Pseudomonas* peut être comme suit.

- **18ième siècle** : Monas = formes droites par Müller.
- **1894** : Découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894).
- **1917** : Famille des *Pseudomonadaceae* (flagelles polaires).
- **1920 - 1950** : Description de nombreux nouveaux *Pseudomonas*.
- **1960** : Classification des *Pseudomonas* sur la base de critères phénotypiques par Stanier *et al.*, 1960).
- **1970-1980** : Eclatement du genre en 5 groupes génomiques sur la base de tests d'hybridation ADN-ADN (Palleroni, 1970) puis ARNr-ADN (de Vos, 1980) et des séquences de l'ARN 16S, l'ARN 23S, gyrB...
- **Depuis** : Création de nouveaux genres et attente de nouvelles subdivisions (Innoel *et al.*, 1987)..

2.2.2. Définition

Les *Pseudomonas* appartiennent aux Gamma- Protéobactéries. Ce groupe englobe la majorité des espèces de bactéries phytopathogènes.

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonaceae*, il comprend une soixantaine d'espèces. Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *Pseudomonas fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différentes biovars. Le groupe de *Pseudomonas* se compose de bactéries sous forme de bâtonnets, Gram négatifs, mobiles par ciliature polaire (sauf *Pseudomonas mallei*), non sporulant, elles sont aérobies obligatoires. Les *Pseudomonas* ont un métabolisme mésophile et chimio-organotrophe, peu exigeantes, et incapable de fermenter le glucose, se caractérisent par la pluralité des substances hydrocarbonées utilisées comme source de carbone et d'énergie, produisant des pigments, la plupart étant saprophytes et pouvant coloniser les cellules corticales mortes des racines (Cook *et al.*, 1996 & Frey *et al.*, 2006).

2.2.3. Habitat et pouvoir pathogène

2.2.3.1. Habitat

La plupart des *Pseudomonas* sont très ubiquistes et elles sont isolées de l'eau (eaux douces, eaux saumâtres, eaux de mer), du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Les souches ubiquistes ont généralement une très large versatilité nutritionnelle et elles peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses (Emmanuelle & El Amari, 2004 ; Botelho & Leda, 2006). En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (éviers, siphons, vases, linge et objets de toilette, récipients contenant de l'eau...etc). De nombreuses souches sont psychrotrophes et elles peuvent altérer des denrées alimentaires, des réactifs biologiques, des solutés injectables, le sang ou les dérivés sanguins conservés au froid (Ellis *et al.*, 2000).

2.2.3.2. Pouvoir pathogène

2.2.3.2.1. Pouvoir pathogène chez l'homme

Plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* sont des bactéries pathogènes ce qui explique aussi qu'une partie des données sur *P. Syringae* soient publiées par des revues médicales (Wimalajeewa & Flett, 1985).

Les *Pseudomonas* sp. Se comportent comme des agents opportunistes chez l'homme, comme chez les animaux, l'espèce la plus importante est *P. aeruginosa* ou bacille pyocyanique découvert par Gessard en (1882). Chez des individus immunodépressifs elle peut être la cause de diverses infections cutanées et viscérales voire même de septicémie. Elle comporte un risque particulièrement élevé d'infections nosocomiales (contractées par l'intermédiaire de soins en milieu hospitalier). Elle se retrouve en flore de transit sur la peau et les muqueuses et causes des surinfections de plaies ou brûlures comme indiquée dans la figure 1. Les autres espèces sont peu agressives par eux-mêmes mais se comportent en générale comme germes opportunistes profitant de conditions anormales d'implantation chez les individus débilisés, créant des flores de substitution ou des infections grave par introduction accidentelle dans l'organisme (Cathétismes, sondage,...) (Emmanuelle & El Amari, 2004).



Figure 1
Infection cutanée due au *P. syringae*.

2.2.3.2.2. Pouvoir pathogène pour les animaux

Outre *P. aeruginosa*, d'autres espèces du genre *Pseudomonas*, notamment, *P. fluorescens*, est isolée en médecine vétérinaire de divers prélèvements effectués chez de nombreux mammifères. Un pouvoir pathogène particulier de quelques espèces du genre *Pseudomonas* a été mis en évidence chez les oiseaux et les poissons.

- **Chez les oiseaux :** *P. fluorescens* est responsable de la mort des embryons de nombreux oiseaux suite au trempage des œufs dans des solutions d'antiseptiques contaminés par des *P. fluorescens*. Cette espèce a également été incriminée dans les troubles respiratoires des dindes et des poulets (Bergsma *et al.*, 2005).
- **Chez les poissons :** Des infections à *P. fluorescens* ont été décrites chez diverses espèces de poissons : carpe argenté (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpe chinoise ou à grosse tête (*Aristichthys nobilis*), cyprin ou caraassin doré (*Carassius auratus*), tanche (*Tinca tinca*), carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*), et les carpes noire (*Mylopharyngodon piceus*). Les poissons malades présentent des hémorragies cutanées et des ulcérations des nageoires et de la queue. *P. chlororaphis* biovar *Chlororaphis* a été isolé en culture pure de saumons amago (*Oncorhynchus masou rhodurus*) élevés au Japon. Les animaux malades présentent une distension de l'abdomen et des hémorragies superficielles (Hamdan *et al.*, 1991 & Mavrodi *et al.*, 2005).

2.2.3.2.3. Pouvoir pathogène pour les végétaux

Spécifiquement *P. syringae*. Cette espèce compte au moins 37 pathovars capables d'infecter de multiples espèces de végétaux. Face à l'arbre, le *P. syringae* semble opportuniste, infectant des plantes déjà affaiblies. Quatre cents souches de *P. syringae* ont été analysées avant la fin 2006, sur la base de caractères phénotypiques et sur des bases génétiques. *P. syringae* a été retrouvé presque partout, avec une large diversité interspécifique, dont

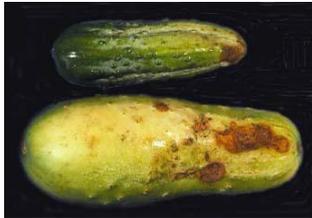
génétique dans ceux des vergers de poirier, cerisier doux, cerisier acide et prunier qui ont été étudiés dans les régions belges de Gembloux et de Gorseme (Bossis *et al.*, 2000 & Iacobellis, 2001), ses effets ont aussi été étudiés chez une plante modèle de laboratoire : *Arabidopsis*. (Janse, 1991 & Sekkour, 2008).

Autres maladies causées par les *Pseudomonas* sp :

- la bactériose du Soja causée par *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (anonyme, 2006).
- la bactériose à halo du haricot causé par *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (anonyme, 2006).
- le feu bactérien du tabac causée par *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* (anonyme, 2006).

La figure 2 montre certains exemples de maladies causées par les *Pseudomonas* sp.

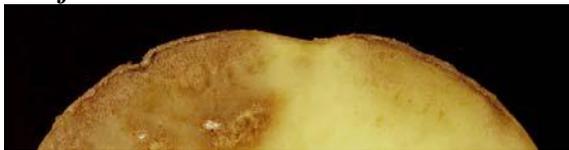
Pourriture molle sur des agrumes causée par des Pseudomonas.



P. fluorescens sur le concombre



P. viridiflava sur la carotte.



P. marginalis sur la pomme de terre.

Pourriture des Marronniers causée par des P. syringae.



Taches foliaires causées par P. syringae



Le cornouiller



Le poivron



La tomate

Figure 2
Maladies causées par les Pseudomonas sp. (Courboulex, 2002).

2.2.4. Les propriétés des *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* semblent être des symbiotes des plantes dans la rhizosphère. Quelques souches non pathogènes de *Pseudomonas* sont utilisées en lutte biologique pour protéger certains fruits en antagoniste des microorganismes qui provoquent la pourriture. Plusieurs souches de *Pseudomonas* ont été appliquées sur des graines de céréales ou directement sur les sols pour concurrencer d'autres microbes et champignons pathogènes (Mazzola & White, 1994 & Gardan *et al.*, 1992).

- la souche *P. syringae* ESC-11 vendue sous le nom commercial **BioSave TM 110** est utilisée pour protéger les poires et les pommes, après récolte.

- la souche *P. syringae* ESC-10 vendue sous le nom de **Bio Save TM 100** est utilisée pour contrôler la pourriture du citron récolté. (Hamdan, 1991 & Bergsma *et al.*, 2005).

Une des propriétés de *P. syringae* a fait qu'on l'utilise pour augmenter les rendements de la production de neige artificielle, par exemple sous forme de bactérie lyophilisée pour la production de neige artificielle pour les pistes de Ski, un produit commerciale Snomax est vendu à cet effet. (Bergsma *et al.*, 2005).

De nombreux *Pseudomonas* jouent un rôle majeur pour la fertilité du sol. La production de pyoverdine est chez certains *Pseudomonas* testés, dotée par une teneur élevée en phosphate, qui est un autre produit (engrais, contenant souvent des résidus radioactifs et de cadmium ; deux facteurs de stress pour la plante) que l'agriculture utilise massivement. (Lugtenberg *et al.*, 2002 & Ramette *et al.*, 2003).

2.2.5. Caractéristiques des *Pseudomonas*

Selon Schroth *et al.* (2006), les espèces de *Pseudomonas* sont reconnues selon différents critères :

- **Les caractères biochimiques :**

- les possibilités d'assimilation de substrats carbonés.
- les besoins en facteurs de croissance.

- **L'analyse des profils de restriction (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism) des gènes d'ARN ribosomal :** permettant un classement des *Pseudomonas* en 5 groupes (I à IV).

- **Groupe I:** *Pseudomonas*.
- **Groupe II:** *Burkholderia*.
- **Groupe III:** *Acidovorax*, *Delftia*, *Comamonas* et *Hydrogenophaga*.
- **Groupe IV :** *Brevundimonas*.
- **Groupe V :** *Stenotrophomonas*.
- **Autres :** *Alcaligenes*, *Shewanella*, *Sphingomonas*...

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60 % de la microflore bactérienne totale du sol (Allaire, 2005).

Ces bactéries peuvent agir favorablement sur la plante en modifiant son environnement immédiat par des effets d'antibiose et /ou en stimulant directement sa croissance par des effets bénéfiques ou **PGPR** (**P**lant, **G**rowth, **P**romoting **R**hizobactéria).

En effet, ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis -à- vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération (multiplication) « *in situ* » relativement court, leur capacité à chélater les ions ferriques et à produire des substances antibiotiques. Chez les *Pseudomonas*, d'autres molécules antifongiques comme la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4 diacetylphloroglucinol, la pyrroïnitine, les phénazines et les butyrolactones sont impliquées dans le biocontrôle (Haas & Defago, 2005). Elles peuvent également agir sur le métabolisme de la plante par effet hormonal et/ou par solubilisation de formes de phosphore insolubles, rendant ainsi le phosphore bio disponible, il est également reconnu que des bactéries de la mycorrhizosphère, encore appelées bactéries auxiliaires de la mycorrhization, stimulent sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Picard *et al.*, 1992 & Girlanda *et al.*, 2001).

Les genres *Pseudomonas* produisent un pigment fluorescent jaune vert (Botelho & Leda, 2006) soluble sur le milieu King B contenant une faible concentration en fer. Elles forment toutes des colonies fluorescentes (Whipps & Walsh *et al.*, 2001).

2.2.6. Les *Pseudomonas* dans la lutte biologique

La lutte biologique repose sur l'utilisation de nombreux antagonismes existants entre les êtres vivants, son utilisation se répand de plus en plus. La protection croisée est basée sur l'utilisation de souches peu ou non pathogènes (souches hypo ou avirulentes) qui entrent en compétition avec le pathogène pour l'invasion de l'hôte ou déclenchent son mécanisme de résistance créant une prémunition. L'antagonisme des *Trichoderma* (champignons du sol) contre d'autres champignons peut être utilisé au niveau de lésions pour éviter les invasions ultérieures (*Fusarium*, *pytium*, *rhizoctonia*, ...). Le coût de production d'inoculum est peu compétitive comparé aux fongicides. La flore saprophyte de certaines terres rend les sols « résistants » ou « supprimeurs » et ne permet pas au pathogène de s'exprimer. Ce type de résistance semble pouvoir se transférer à d'autres sols par incorporation.

Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas & Défago, 2005). Cette grande rhizo compétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin *et al.*, 2003). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques.

Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes « *in vitro* ». Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers permettent de compétitionner farouchement pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie. On note également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène. On peut donc volontairement introduire dans une

parcelle infectée une bactérie ou un champignon inoffensif pour la plante mais qui présente des antagonismes forts avec une bactérie ou un champignon particulièrement pathogène. Comme par exemple on utilise *Erwinia herbicola* contre *Erwinia amylovora*. (Frey *et al.*, 2006).

Parmi les travaux effectués sur l'effet antagoniste de certaines souches de *Pseudomonas* :

1- la découverte au Maroc d'une bactériocine produite par *P. syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB 2355, souche qui inhibe la multiplication de *P. syringae* pv. *savastanoi* l'agent causal de la maladie de nœud d'olive (anonyme, 2006).

2- Benchabane *et al.* (2002) ont mis en évidence l'effet antagoniste de *P. fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate causée par *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici*. La bactérisation des semences et des plantules de tomate a induit l'inhibition, voire même l'annulation de l'expression des symptômes de la fusariose.

3- l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (Maroc) a présenté une communication sur deux espèces de *Pseudomonas* (*P. fluorescens* PS48 et *P. putida* P460) qui ont une forte activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries phytopathogènes, ces deux bactéries ont été confrontées à une gamme de 23 pathovars de *P. syringae*. Ils ont confirmé leur activité antagoniste sur ces derniers germes. Deux essais réalisés dans des conditions normales de culture de plein champ ont démontré la potentialité de ces antagonistes comme moyen de lutte contre la moucheture bactérienne, due à *P. syringae* pv. *tomato*. Des travaux complémentaires ont montré que l'activité antagoniste des deux germes inhibiteurs n'est pas semblable, l'un des deux agissant essentiellement par la production d'un sidérophore. Le mécanisme d'action du second germe n'est pas déterminé (anonyme, 2006).

4- Pascal & Sylvie (2009) ont mis en évidence un effet antagoniste de la souche *P. fluorescens* C7R12 vis-à-vis de souches de *L. monocytogenes*. Des résultats préliminaires suggèrent que la production de cyanure d'hydrogène (HCN) par *P. fluorescens* C7R12, en liaison avec la disponibilité en fer du milieu, pourrait être impliquée dans cet antagonisme. Par ailleurs, les *Pseudomonas* sp fluorescents ne possèdent pas tous la capacité à produire de l'HCN. En outre, les bactéries productrices d'HCN peuvent posséder des capacités de synthèse plus ou moins importantes. L'antagonisme vis-à-vis de *Listeria. monocytogenes* des bactéries de ce groupe pourrait donc être variable (anonyme, 2006).

2.2.7. Effet des *Pseudomonas* sur l'olivier

Comme beaucoup de végétaux l'olivier peut être confronté durant sa vie à diverses maladies, on peut diviser les maladies de l'olivier en quatre grandes catégories (Weller *et al.*, 2002 & Young, 2004) :

- les attaques dues à des insectes ;
- les maladies dues à des champignons ;
- les maladies dues à des dégénérescences ou à un manque de nourriture ;
- les maladies dues à des bactéries ou des virus.

2.2.7.1. Le chancre bactérien de l'olivier

C'est une maladie infectieuse causée par une bactérie *P. savastanoi* qui a été signalée au 4^{ème} siècle par le grec, Theophrastus. Le pathogène semble avoir été disséminé avec des plantes d'oliviers (*Olea europaea* subsp. *europaea*) puis étendus et propagés dans beaucoup

de régions dans le monde. Cette bactérie, à été isolée par Luigi savastanoi ((Bradbury, 1986). Le nom actuel est *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Gardan *et al.*, 1992). Cette bactérie est considérée comme le seul pathogène responsable de la formation des nœuds (nécroses) bactériennes des oliviers (Philippe, 2007). En Italie, la maladie est appelée « rogne » de l'olivier, en Espagne « verrue » ou « Tuberculose » de l'olivier, en France et en Afrique du Nord on lui donne le nom de tuberculose ou chancre bactérien de l'olivier.

La maladie agit sur la croissance des repousses et elle affecte les organes reproducteurs, et s'attaque même à d'autres plantes comme le laurier rose, le frêne, le troène, le jasmin, le forsythia...ect.

La maladie peut tuer les arbres si les infections se produisent sur la ceinture et les troncs de jeunes arbres pour cause de blessure par moissonneuses mécanique (taille mal conduite, coups, dégât de grêle et même effet du vent violent). Cette maladie très contagieuse sur certaines variétés, peut être également transmise par les techniques de multiplications (greffage et bouturage) à partir de rameaux provenant d'arbres contaminés. Cette maladie est parmi celles qui produisent le plus de dommages sur la culture de l'olivier, affectant même la qualité des fruits et donnant naissance à des odeurs indésirables. (Hall *et al.*, 2004 & Quesada *et al.*, 2008).

2.2.7.2. Les symptômes de la maladie et description des galles

Le nœud d'olive apparaît comme galles bruts ou gonflements d'environ 0,5 à 2cm de diamètre sur les rameaux, branches, troncs principal, racines, feuilles abîmées, tiges, fruits et les petites pousses. Après quelques mois les galles acquièrent un aspect spongieux et irrégulier, devenant dur et brun sur les petites pousses. Ces galles apparaissent isolément ou rapprochées sur toute la partie de la plante. Les galles peuvent endommager la structure de la tige et déformer l'échafaud de l'arbre si l'infection est sévère durant les premiers stades du développement des arbres (Icobellis, 2001 & Philippe, 2007).

Selon Nielsen (1990), l'impact de la maladie se traduit sous divers aspects:

- Perte de feuilles du fait de l'étranglement mettant hors circuit l'alimentation des feuilles en aval ;
- Dessèchement du bois par suite d'une photosynthèse défailante ;
- Réduction de production ;
- Dans une phase ultérieure, réduction même de la taille des arbres par suite d'une végétation désordonnée.

La figure 3 montre des tumeurs dues au *P. syringae* pv. *savastanoi* sur le tronc, les branches et les rameaux d'un arbre d'olivier de la variété Chemlel.

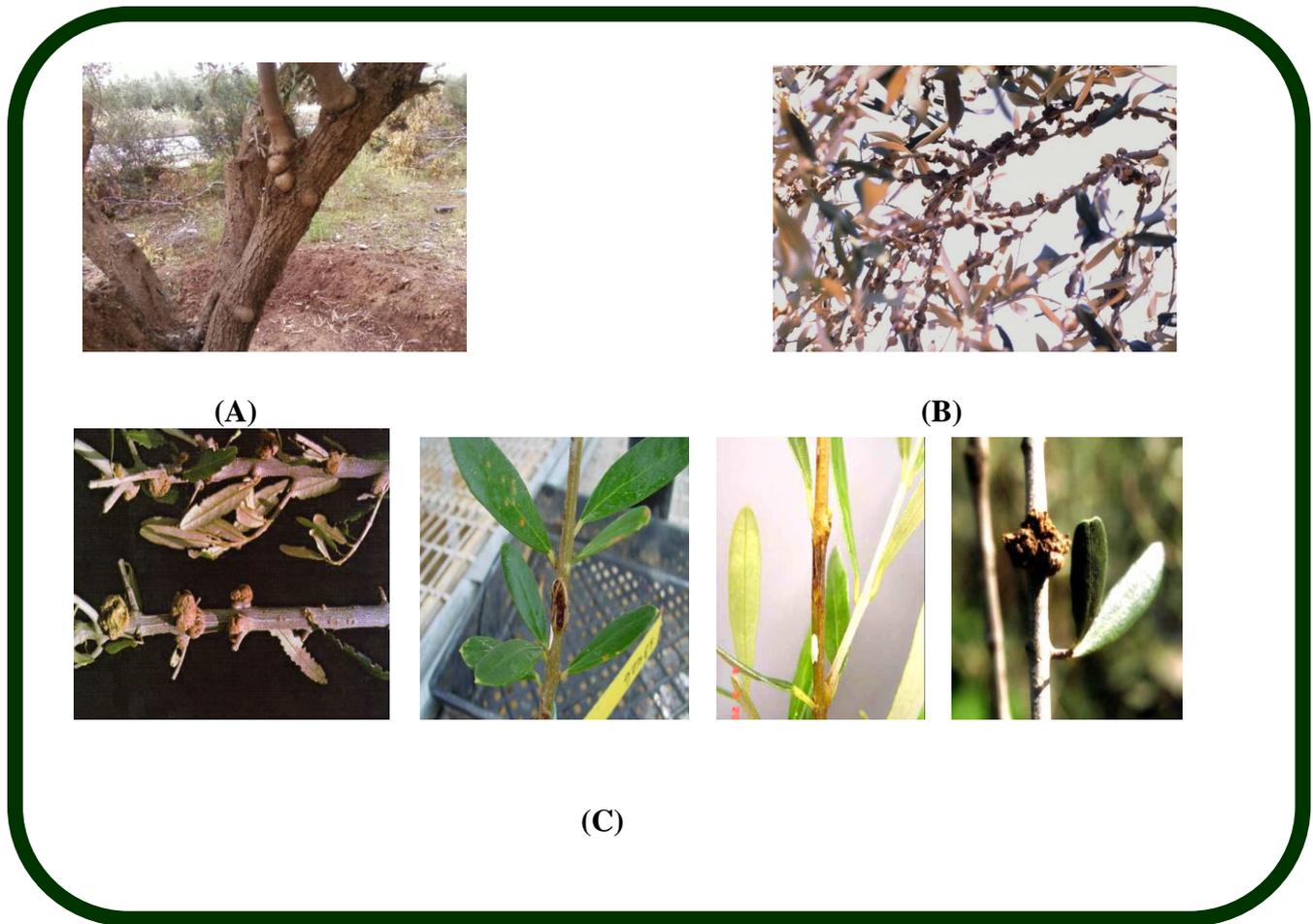


Figure 3

Tumeurs dues au *P. syringae* pv. *savastanoi* sur le tronc, les branches et les rameaux d'un arbre d'olivier de la variété Chemlel. (GARDAN, 1992).

- (A) : tumeurs sur le tronc.
- (B) : tumeurs sur les branches.
- (C) : tumeurs sur les rameaux.

2.2.7.3. Cycle de la maladie

Bien que la bactérie puisse être présente tout au long d'un verger, il ne peut inciter à la maladie qu'après l'entrée passive de l'hôte par des blessures ou des cicatrices foliaires (Savastano, 1987). La transmission de la maladie est liée à la pluie événement qui stimule la croissance de la population bactérienne et facilite la circulation de l'agent pathogène. Les pluies de printemps sont particulièrement propices au développement de la maladie en partie parce qu'un grand pourcentage de feuilles tombe entre Mai et Juin, laissant des cicatrices foliaires sensibles aux agents pathogènes. Les cicatrices foliaires sont plus sensibles à l'infection dans les deux jours après une pluie, mais peuvent rester sensibles pendant sept jours après la pluie. Une fois la bactérie infecte la plante, il produit des hormones de croissance des végétaux (l'auxine et cytokinines) qui stimulent la prolifération des tissus résultant en une galle ou nœud (Surico, 1989 & Smidt & Kosuge, 2000) comme indiquée

dans la figure 4. Des études récentes montrent que la bactérie peut être transportée dans la plante par les vaisseaux du xylème, ce qui provoque des noeuds "secondaire" le long de la tige. Cette nouvelle information souligne l'importance de la prévention des infections initiale et de la gestion des populations de l'agent pathogène à l'extérieur de l'arbre (Young & Triggs, 1994).



Figure 4

Coupe transversale d'une galle bactérienne évolutive sur un rameau d'olivier (Lavermicocca et al., 1999).

2.2.7.4. Gestion de la maladie

Il n'y a malheureusement, à ce jour, aucun remède connu et efficace contre ce fléau. Il faut cependant prendre quelques précautions afin de limiter la propagation de cette bactérie aux autres arbres (anonyme, 2001) :

- la principale est de désinfecter soigneusement tous les outils de taille en prenant la précaution de graisser par la suite les outils afin de leurs éviter de rouiller.
- toutes les parties atteintes seront, si possible, sectionner et détruites par le feu.

Les chercheurs de l'INRA qui sont parmi les meilleurs du monde dans cette discipline préfèrent l'utilisation de la flamme de chalumeau qui est le seul instrument de désinfection efficace contre les bactéries, cette opération prend moins d'une minute et évite de transmettre la bactériose d'un arbre à l'autre.

- éviter les excès d'irrigation de l'arbre.
- éviter de blesser l'arbre.

2- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- selon les conseils locaux de la société centrale d'agriculture de Nice et des Alpes – Maritimes (SCAH) il faut appliquer des produits cupriques au printemps et à la fin de l'automne tel que la bouillie Bordelaise à 1 % afin de désinfecter et cicatriser les plaies de taille.

Des travaux ont montré que les pulvérisations supplémentaires au printemps ainsi que l'application après la récolte habituelle permettront d'améliorer sensiblement le contrôle des maladies (Botelho & Leda, 2006). L'ajout d'un adjuvant peut aider la pénétration et améliorer l'efficacité du cuivre. Bien que la pulvérisation de cuivre de routine réduise les infections. Pour être totalement efficace une couverture continue de cuivre est requise pendant toute l'année. Mais Ceci n'est pas pratique, surtout quand les fruits sont sur les arbres. Des bouillies cupriques sont parfois utilisées sur les arbres à la chute des feuilles, mais au moins certaines souches sont résistantes au cuivre grâce à une protéine qui piège et immobilise le cuivre (Smidt & Kosuge, 2000).

2.3. Etude bibliographique sur les interactions entre bactéries

2.3.1. Définition

Les interactions entre deux populations microbiennes constituent un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes. Elles sont définies selon leurs effets avantageux. Des bactéries appartenant au même système taxonomique peuvent montrer des attitudes différentes. Qui dit association de souches, dit possibilité d'interaction. Si ces interactions sont bénéfiques pour une ou pour plusieurs souches, on parlera de « Coopération », si elles sont néfastes pour une plusieurs souches on parlera « d'inhibitions » (Juillard *et al.*, 1987).

2.3.2. Classification des interactions

Les effets des interactions bactériennes ont pu être observés bien avant que leurs mécanismes ne soient expliqués. Ceci explique qu'historiquement les interactions ont été caractérisées par leurs effets apparents (approche phénoménologique) avant qu'elles ne le soient en fonction du mécanisme biologique impliqué (approche mécaniste).

2.3.2.1. Classification phénoménologique

Dans la classification d'Odum (1953), les interactions sont répertoriées en fonction de leur effet bénéfique (stimulation de croissance) ou défavorable (inhibition de croissance, voire mort cellulaire) sur chacune des populations impliquées. Les définitions ne sont donc pas fondées sur les mécanismes biologiques mises en jeu mais uniquement sur les effets observables comme indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2. Classification des mécanismes en fonction de la matrice des effets. D'après Odum (1953).

		Effet de A sur B		
		Bénéfique	neutre	défavorable
Effet de B sur A	Bénéfique	Mutualisme ou protocoopération ^a	Commensalisme	Prédation ou Parasitisme ^b
	neutre	Commensalisme	neutralisme	amensalisme
	défavorable	Prédation ou parasitisme	amensalisme	compétition

(a) : le mutualisme diffère de la protocoopération par son caractère obligatoire.

(b) : la prédation diffère du parasitisme par son caractère destructeur.

2.3.2.2. Classification mécaniste

Fredericton (1977) a proposé une classification en fonction du mécanisme biologique impliqué. Il a distingué des interactions directes et interactions indirectes indiquées dans la figure 5.

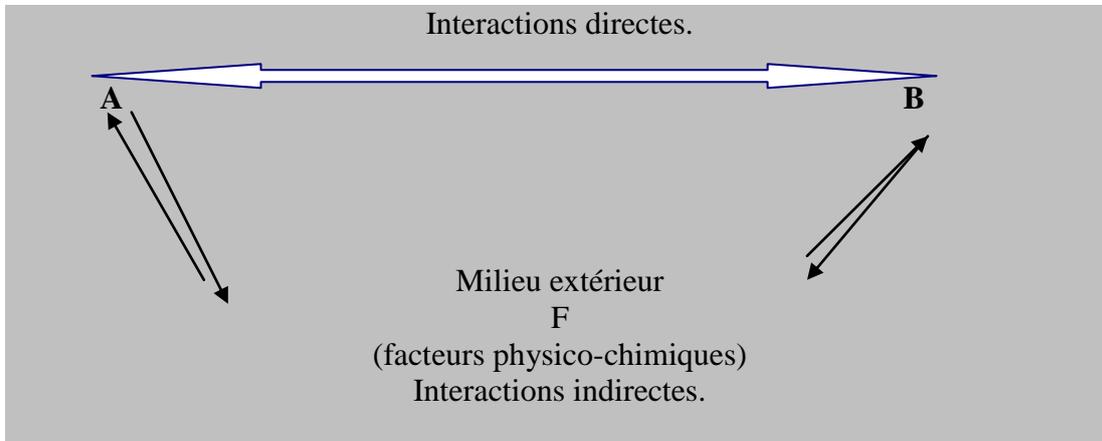


Figure 5
Représentation schématique de la classification de Fredericton (1977).

Les interactions directes impliquent obligatoirement un contact physique entre les individus. Fredericton (1977) limite les interactions directes au parasitisme et la prédation, qui sont surtout étudiées en écologie animale.

Pour une interaction indirectes, l'effet de A sur B se décompose en une modification du milieu extérieur par A et l'effet de cette modification sur B. le milieu extérieur peut être impliqué selon des mécanismes très divers : modification d'un paramètre physico-chimique, compétition pour l'adhérence à un support - concept d'adhérence compétitive (Bibel *et al.*, 1983) ou production / élimination d'une substance .

Parmi les interactions indirectes, une grande majorité implique une substance présente dans le milieu extérieur. Une classification en fonction de la substance impliquée est ici proposée. Si cette substance est un substrat du métabolisme de l'une au moins des populations, alors il s'agit d'interaction trophique. Si cette substance n'est métabolisable par aucune des populations en présence mais produite par une population et à un effet positif ou négatif sur la croissance de l'autre, alors il s'agit d'une interaction de type interférence.

L'expression « interférence bactérienne » a été utilisée dans plusieurs contextes, et a pu prendre des significations différentes (parfois synonyme d'interaction au sens large, parfois synonyme d'adhérence compétitive). La définition proposée semble toute fois correspondre à l'usage le plus répandu.

2.3.3. Définition sur les bactériocines

Certaines bactéries sont susceptibles, si les conditions de développement sont favorables de synthétiser des bactériocines (Klaenhammer, 1988).

L'origine du terme bactériocine est référée à des protéines de type colicines synthétisés par des bactéries à Gram négative. Ce sont généralement des petites protéines cationiques contenant généralement un point isoélectrique très élevé et possédant un caractère amphiphile (Hafeez *et al.*, 2005).

Pour qu'une molécule puisse être appelée bactériocine il faut qu'elle puisse répondre aux critères suivants (Tagg *et al.*, 1976) :

- elle doit avoir un spectre d'action étroit (elle inhibe des espèces proches taxonomiquement de la bactérie productrice) ;
- elle comporte une partie protéique utile à son activité ;
- son mode d'action est bactéricide ;
- pour agir, elle doit se lier avec un récepteur spécifique localisé sur la cellule cible ;
- la bactérie productrice synthétise également une molécule qui l'immunise contre sa propre bactériocine ;
- le support génétique des deux molécules (bactériocine et molécule d'immunité) est plasmidique.

Tagg *et al.* (1976) considèrent que des molécules répondant uniquement aux critères 2 et 3 sont aussi appelées bactériocines.

De nombreuses recherches ont été menées de puis plusieurs années pour connaître le mécanisme d'inhibition inter bactériennes (Klaenhammer, 1993). Parmi ces différents types d'inhibiteurs, c'est sur les bactériocines que toutes les recherches sont focalisées, du fait de leur utilisation potentielle dans une large variété d'application dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire.

Si l'on veut vérifier qu'il s'agit ou non de substances antibactériennes de type bactériocine, il convient d'abord de soulever le problème complexe de la définition de ces substances. En effet, les bactériocines, définies parmi les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif, représentent un groupe hétérogène de substances antibactériennes dont le poids moléculaire, les propriétés biochimiques, le spectre d'activité et le mode d'action peuvent être très différents.

Tagg *et al.* (1976) citent 5 critères pour qu'une substance chimique soit dénommée bactériocine :

La présence d'une partie biologiquement active de nature protéique, un spectre d'activité inhibitrice étroit et centré sur les espèces homologues, un mode d'action bactéricide, l'adsorption à des récepteurs spécifiques et la nature plasmidique des déterminants génétiques codant pour la production de la bactériocine et pour l'immunité à celle-ci. Des études ultérieures ont montré que parmi les bactériocines produites par les bactéries Gram négatives et spécialement parmi celles produites par les *Pseudomonas*, les exceptions à ces critères sont nombreuses.

En effet, la production de substances antibactériennes établies comme étant des bactériocines est déterminée dans de nombreux cas par des gènes situés sur le chromosome. Aussi la condition de la détermination génétique par un plasmide n'est plus retenue pour définir les bactériocines (Barefoot *et al* & Elkan, 1992 & Riley, 1998).

2- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Certaines bactériocines montrent une action bactériostatique dans des milieux moins favorables à leur activité, comme c'est le cas dans les aliments (Pucci *et al.*, 1988 ; Berry *et al.*., 1990 & Schillinger *et al.*., 1991).

Par ailleurs, le spectre d'activité des bactériocines peut ne pas être restreint aux espèces proches taxonomiquement ou même occupantes la même niche écologique que la bactérie productrice. D'un point de vue pratique, le champ d'activité d'une bactériocine peut être plus ou moins large suivant les conditions du milieu et la concentration en substance active (Klaenhammer, 1993).

La nature protéique des bactériocines semble être le seul critère immuable. Cela est généralement démontré par l'inactivation de celles-ci par un traitement avec des protéases. Toute fois, la bactériocine peut prendre la forme d'un complexe hétérogène incluant des groupements lipidiques ou saccharidiques (Berry *et al.*, 1990 & Jimenez *et al.*., 1993) ou d'une combinaison de protéines ou peptides distincts (Nissen *et al.*., 1992).

En définitive, deux définitions sont actuellement admises :

- 1- **Selon Konisky (1982)**, les bactériocines ont une nature protéique et sont inactives vis-à-vis des bactéries qui les produisent (il ne s'agit donc pas de substance suicide).
- 2- **Selon Klaenhammer (1988)**, les bactériocines ont une nature protéique, un spectre d'activité limité aux espèces taxonomiquement proches, ou occupant la même niche écologique, et un mode d'action bactéricide.

Il apparaît nécessaire de noter que la limite sépare les bactériocines et les peptides antibiotiques ne sont pas très bien définis. Selon Riley (1998), les antibiotiques, contrairement aux bactériocines, possèdent un spectre d'activité généralement large, et même lorsque celui-ci est relativement étroit, il ne montre pas cet aspect préférentiel, retrouvé chez les bactériocines, pour les souches taxonomiquement proches de la bactérie productrice.

Cependant, comme cela a été mentionné, beaucoup de bactériocines récemment caractérisées, montrent des spectres d'activité qui ne sont pas toujours limités aux espèces proches (Lotz, & Mayer, 1982 & Schved *et al.*, 1994). Selon Montville & Kaiser (1993), les antibiotiques sont des métabolites secondaires, synthétisés par des réactions enzymatiques, qui n'ont pas de fonction apparentes dans la croissance de l'organisme producteur. La plupart des peptides antibiotiques connus (Gramicidine S, Bacitracine A par exemple) répondent à cette définition. Par contre, la majorité des bactériocines caractérisées sont de « vraies protéines » c'est-à-dire qu'elles sont synthétisées par voie ribosomale (présence d'un gène correspondant à la séquence de la bactériocine) (Klaenhammer, 1993) et ceci bien qu'elles nécessitent souvent une transformation post traduction menant à la molécule active.

3- MATERIEL & METHODES

3.1. Matériel Biologique

3.1.1. Sol et Arbuste d'oliviers utilisés

Les échantillons de sols et des galls ont été obtenus dans deux zones de l'Ouest Algérien (Ain Temouchent et Sig). Les galls ont été prélevées à partir d'arbres d'oliviers de la variété sigoise qui est une variété destinée à la consommation qu'à la production d'huile car elle produit d'excellentes olives de table.

3.1.2. Provenance des souches bactériennes

En plus des souches de *Pseudomonas* que nous avons isolé, nous avons utilisé 40 autres souches de *Rhizobium* et deux souches de champignons (*Aspergillus niger* AS4 et *Penicillium citrinium* PS12). Le tableau 3 regroupe l'espèce, la souche, la provenance ainsi que les références des souches utilisées.

Tableau 3. Espèce, Souche, Provenance et références des souches utilisées.

Espèce	Souche	Provenance	Référence
<i>Rhizobium</i> sp	RNU1, RNU2, RNU4, RNU5, RNU8, RNU9, RNU11, RNU12, RNU13, RNU14, RNU16, RNU18, RNU20, RNU22, RNU23 et RNU26	Nodule du <i>Retama monosperma</i> Serre (USTO-MB) Oran	(Dahmani, 2010)
	RNB2, RNB5, RNB7, RNB9, RNB11, RNB13 et RNB17	Nodule du <i>Retama monosperma</i> (Boumo plage) Oran	
	RNM1, RNM4, RNM5, RNM6, RNM8, RNM10 et RNM12	Nodule du <i>Retama monosperma</i> (el Maktaa) Mostaghanem	
	RNb1, RNb5, RNb8, RNb6, RNb9, RNb12, RNb13, RNb14, RNb18 et RNb20	Nodule du <i>Retama monosperma</i> (Bousfer plage) Oran	
<i>Penicillium citrinium</i> <i>Aspergillus niger</i>	PS12 AS4	Sol Oran	(Ghiab, 2004)

3.1.3. Milieux de culture

Pour isoler les bactéries du genre *Pseudomonas*, plusieurs milieux sont utilisés. La composition des milieux est exprimée en gramme par litre d'eau distillée. Les milieux de culture doivent contenir les sources d'énergie nécessaire à la croissance des bactéries. Plusieurs milieux de cultures sélectifs et non sélectifs ont été utilisés. Ces milieux de cultures sont soit liquides, solides (1,5 % d'agar) ou semi- solides (0,7 % d'agar). Tous ces milieux étaient stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

Lors de notre étude nous avons utilisé les milieux de King (A et B) (King *et al.*, 1954), le milieu Cétrimide (Azad & Cooksey, 1995), la gélose Héктоéne (King *et al.*, 1954), la gélose BCP (Pourpe de Bromocrésol) (Nickerson, 1953) et la gélose nutritive (Lapage & Mitchell, 1970) pour isoler et cultiver les *Pseudomonas* sp (anonyme, 2003).

Le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1977) pour cultiver les *Rhizobium*.

Le milieu Sabouraud (Sabouraud, 1910) pour cultiver *Aspergillus niger* et *Penicillium citrinium* (anonyme, 2003). Ces milieux ont aussi servi de base pour certains tests d'identification et pour d'autres études biochimiques des bactéries. D'autres milieux de culture étaient également utilisés au cours de notre étude.

Les milieux utilisés sont :

▪ Milieu King A (King *et al.*, 1954)

C'est un milieu sélectif utilisé pour la mise en évidence de la pyocyanine : La pyocyanine est un pigment qui bleuit le milieu, soluble dans le chloroforme et l'eau sa production est favorisée par la présence d'ions inorganiques dans le milieu et la culture se fait à 30°C pendant 24 à 72 h. Il se compose de:

Peptone dite "A"	20,0g
Glycérol	10,0ml
Sulfate de potassium	10,0g
Chlorure de magnésium	1,4g
Agar	12,0
Eau distillée	qsp1000 ml
pH 7,2	

▪ Milieu King B (King *et al.*, 1954)

C'est un milieu sélectif utilisé pour la recherche de la production de la pyoverdine qui jaunit le milieu. Elle est insoluble dans le chloroforme. La production de la pyoverdine est favorisée par une teneur élevée en phosphate et la culture se fait à 30°C pendant 24 à 72 h. Il se compose de:

3- *MATERIEL & METHODES*

Peptone dite "B"	20,0g
Glycérol	10,0ml
Hydrogénophosphate de potassium	1,5g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1,5g
Agar	12,0g
Eau distillée	qsp 1000ml
pH 7,2	

▪ **Milieu Cétrimide (Azad & Cooksey, 1995)**

C'est un milieu sélectif, proche du milieu King A. Ce milieu favorise aussi la production des pigments par les *Pseudomonas* sp. Il inhibe de très nombreuses bactéries par la présence de l'antiseptique : cétrimide, ainsi que par la présence de l'antibiotique : acide nalidixique. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 72 h. Il se compose de:

Peptone de gélatine	16g
Peptone de caséine	2,0g
Bromure de tétradonium	0,2g
Acide nalidixique	15 mg
Sulfate de potassium	10g
Chlorure de magnésium	1,4g
Agar	10g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 7,1	

▪ **Milieu de la gélose nutritive (GN) (Lapage & Mitchell, 1970)**

C'est un milieu non sélectif contenant une base nutritive ordinaire permettant la culture des bactéries non exigeantes comme les *Pseudomonas*. Il met en évidence la production des deux pigments ; la pyoverdine et la pyocyanine. La culture se fait à 30°C pendant 24 à 72 h. Il se compose de:

Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure	3,0g
Peptone	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar	15,0g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 7,4	

▪ Milieu BCP (Pourpre de Bromocrésol) (Nickerson, 1953)

C'est un milieu non sélectif contenant une base nutritive ordinaire permettant la culture des bactéries non exigeantes. Il contient un critère de différenciation qui est la fermentation du lactose. La culture se fait à 30°C pendant 24 à 72 h. Il se compose de:

Peptone	5,0g
Extrait de viande de boeuf	3,0g
Lactose	10,0g
Pourpre de bromocrésol	25 mg
Agar	15g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 6, 8	

▪ Milieu de la gélose Héктоéne (King *et al.*, 1954)

C'est un milieu non sélectif qui permet l'isolement des bactéries à Gram négatif. Ce milieu permet de rechercher trois types de glucides qui sont : la salicine, le saccharose et le lactose ainsi que la production d'H₂ S. La culture se fait à 30°C pendant 24 à 72 h. Il se compose de:

Protéose peptone	12g
Extrait de levure	3,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Thiosulfate de sodium	5,0g
Sels biliaires	9,0g
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5g
Salicine	2,0g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fuschine acide	0,1g
Bleu de bromothymol	0,065g
Agar	14g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 6,8	

3- MATERIEL & METHODES

▪ **Milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1977)**

Ce milieu est utilisé pour cultiver les bactéries du genre *Rhizobium* à 28°C. Il se compose de :

Extrait de levure	1g
Solution minérale de Bergensen *	100ml
Mannitol	10g
Eau distillée	qsp1000ml
Agar	15g
pH 7,0	

* : **Solution minérale de Bergensen (Bergensen, 1961)**

Elle se compose de :

KCl : 1g , Fe Cl₃ : 0,02g , CaCl₂, 2H₂O : 0,53g , Na₂ HPO₄, 12H₂O : 4,5 g ; MgSO₄, 7 H₂O : 1g et l'eau distillée: 1000ml.

▪ **Milieu de la gélose Sabouraud (Sabouraud, 1910)**

C'est un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. La culture se fait à 20 - 25°C de 3 à 5 jours. Il se compose de:

Peptone pepsique de viande	10g
Glucose	35g
Agar	15g
Eau distillée	qsp 1000ml
pH 5,7	

▪ **Milieu Mueller Hinton (Kirby & Bauer, 1966)**

C'est un milieu utilisé pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Il se compose de:

Infusion de viande de bœuf	300,0g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	17,0g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 7,0	

▪ Milieu Levane (Surico & Lavermicocca, 1989)

C'est un milieu utilisé pour mettre en évidence la capacité de la sous espèce *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* de polymériser le fructose en polyfructose. Il se compose de :

D-glucose	2,5g
Saccharose	50g
Agar	23g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 8.4	

▪ Milieu au Tween 80 (Bien *et al.*, 1990)

Ce milieu est utilisé pour la mise en évidence de l'activité estérase de la sous espèce *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Il se compose de :

Peptone	10,1g
Bromure de potassium	10,0g
Chlorure de calcium	0,34g
Agar de type A	15,0g
pH 7,0	

Avant de couler le milieu, les produits suivants sont incorporés :

Tween 80 stérile	10,0 ml
Cycloheximide (dans 10 ml d'éthanol 70%)	75,0 mg
Céphaléxine (dans 40 ml d'eau stérile)	25,0g
5- Fluorouracil (dans 20 ml d'eau stérile)	6,0g
Tobramycine (dans 20 ml d'eau stérile)	5,0g

▪ Le milieu Pectinase (Hildebrand, 1971)

C'est un milieu utilisé pour la mise en évidence de l'activité pectinolytique des *Pseudomonas*. Il se compose de :

Extrait de levure	1,0 g
Solution aqueuse de glycérol à 87 %,	5,0 ml
Acide polygalacturonique à 2 %	5,0 ml
Tampon phosphate (0,1M)	200 ml
MgSO ₄ , 7H ₂ O (1,0M)	1,0 ml
Agar	15 g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 8, 0	

3- MATERIEL & METHODES

▪ **Milieu de Pectine Hildebrand (PH) (Hildebrand, 1971)**

C'est un milieu utilisé pour la mise en évidence de l'activité péctinolytique des *Pseudomonas*. Il se compose de :

Bleu de bromothymol	0,015g
Chlorure de calcium (CaCl. 2 H ₂ O)	0,15g
Acide polygalactouronique :	22,000g
Agar	100,0 ml
Eau distillée	qsp1000ml
pH 8,4	

▪ **Milieu de Möeller (Möeller, 1955)**

Ce milieu est utilisé comme milieu de base pour la recherche de l'arginine déshydrolase. Il se présente en petits tubes fins ce qui favorise l'anaérobiose sa composition est :

Extrait de levure	3,0g
L-arginine (monochlorhydrate)	5,0g (selon le cas)
Glucose	1,0g
Pourpre de bromocrésol	0,16 mg
Éthanol	1,0 ml
Chlorure de sodium	5,0g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 6,8	

▪ **Milieu de Clark et Lubs (Clark & Lubs, 1915)**

C'est un milieu recommandé pour les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer il mis en évidence la voie d'utilisation des acides organiques. Il se compose de :

Peptone	7,0g
Glucose	5,0g
Tampon phosphate	5,0g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 5, 7	

▪ **Milieu Mannitol- Mobilité (Van Schothorst & Van beek, 1987)**

C'est un milieu de culture caractérisé par l'utilisation de mannitol et de nitrate et permet la mise en évidence de la mobilité bactérienne. Il se compose de :

3- *MATERIEL & METHODES*

Hydrolysats trypsique de caséine	10,0g
Mannitol	7,5g
Rouge de phénol	0,4 mg
Nitrate de potassium	1,0g
Agar	3,5g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 7,6	

▪ **Milieu MEVAG (Milieu d'Étude de la Voie d'Attaque des Glucides) (Takao *et al.*, 1968)**

C'est un milieu gélosé semi-solide à base d'un sucre (ex : glucose) utilisé pour l'étude de la voie d'utilisation des glucides comme par exemple le glucose. Permet de caractériser les bactéries fermentaires de celles oxydatives ou indifférentes. Il se compose de :

Extrait de levures	1,0g
Peptone de caséine	2,0g
NaCl	5,0g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Rouge de phénol (solution aqueuse à 0,2%)	15ml
Agar	3,0g
Eau distillée	qsp1000ml
pH 8,4	

▪ **Milieu de lait tournesolé (Vincent, 1970)**

Le lait tournesolé est un milieu différentiel avec une variété d'utilisations. Les bactéries peuvent être différenciés sur la base de multiples réactions métaboliques dans ce milieu, il est utilisé pour la mise en évidence d'une protéolyse acide ou alcaline. Il se compose de deux solutions:

Solution 1 : contient :

Lait écrémé:	1000 ml
Teinture de tournesol à 40%	qsp obtenir une teinte violacée: 15 à 20 ml
pH = 7,2	

Solution 2 : contient :

Agar	3,0g
Eau distillée	100ml

Les deux solutions sont refroidies puis mélangées, pour constituer le milieu de culture et le pH doit être ajusté à 7,0.

3.1.4. Les Galeries Api utilisées

L'identification des souches bactériennes peut être affinée en utilisant des micro-méthodes adaptées aux microorganismes étudiés. Celles que nous avons choisies font intervenir six Kits miniaturisés (galeries biochimiques Api 20NE, Api 20 E, Api NH, Api 20 Strep, Api 20A et Api AUX A COLORTM2, commercialisés par Api system (Bio Mérieux sa 69280 Marcy. l'étoile- France. lot : 766991001) élaborés pour identifier des bactéries du genre *Pseudomonas*. Ces galeries biochimiques sont :

- **Galerie Api 20NE** utilisées pour l'identification des espèces du genre (*P. aeruginosa*, des souches de *P. fluorescens* et des souches de *P. syringae*).
- **Galerie Api 20 E, Api NH, Api 20 Strep, Api 20A et Api AUX A COLORTM 2** ont servi pour la réalisation de certains tests biochimiques à fin d'identifier la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*.

Les galeries Api comportent des micros- tubes contenant des substrats déshydratés. Les micros- tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (établi par les fournisseurs) et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (Lise & Michel, 2004).

La lecture de la galerie doit se faire après l'addition des réactifs (additifs) pour les tests spécifiques.

Cinq additifs ont été utilisés au cours de cette étude :

- Nitrate réductase 1 : acide sulfanilique + Nitrate réductase 2 : NN- diméthyle – naphthylamine et la poudre de Zinc (Institut Pasteur d'Algérie) : ceci pour la recherche de l'enzyme nitrate réductase.
- Réactif de Kovax (Institut Pasteur d'Algérie) : ceci pour la mise en évidence de la production d'indole.
- Réactif de Voges Proskauer 1: solution d'Alpha – naphthol à 6 % dans l'alcool absolu et le Voges Proskauer 2: 40 % d'hydroxyde de potassium dans l'eau distillée (Institut Pasteur d'Algérie) : ceci pour la mise en évidence de la production d'acétoïne.

3.1.5. Les antibiotiques testés

Les disques d'antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme sont : Ticarcilline (Tic, 75 µg), Ticarpen (Tcc, 75 µg), Pipéracilline (Pip, 75 µg), Ceftazidime (Caz, 30 µg), Aztréonam (Atm, 30 µg), Imipénème (Ipm, 10 µg), Céfopérazone (Cfp, 5 µg), Cefsulodine (Cfs, 30 µg), Amikacine (An, 30 µg), Gentamicine (Gm, 10 µl), Tobramycine (Tm, 10 µg), Ciprofloxacine (Cip, 5 µg), Ofloxacine (Ofx, 5 µg), Pefloxacine (Pef, 5 µg), Colistine (Cs, 50 µg), Netylmicine (Net, 30 µg) Fosfomycine (Fos, 50 µg), Ampicilline (Am., 10 µg), Amoxicilline (Amx., 25 µg), Céfaloïne (Cf., 30 µg), Céfazoline (Cz., 30 µg), Oxacicilline (OX., 01 µg), Streptomycine (S., 100 µl) et l'Acide Nalidixique (Na., 30 µg). Ces disques imprégnés d'antibiotiques sont commercialisés par l'Institut Pasteur d'Algérie (disques pour antibiogramme, Diagnostic Pasteur, 92430. Marnes – la – Coquette – France).

3.2. Méthodes

3.2.1. Prélèvement des échantillons

Deux types d'échantillons ont été utilisés dans cette étude : des sols et des galles (nécroses) prélevés sur des branches et des feuilles d'oliviers. Ces prélèvements ont été effectués en automne 2009-2010 dans deux zones de l'Ouest Algérien, la zone d'Ain Temouchent et la zone de Sig (Mascara).

3.2.1.1. Prélèvement des échantillons à partir du sol

Les échantillons de sol (40 échantillons) ont été collectés dans deux régions de l'Ouest Algérien : 28 échantillons à Ain Temouchent et 12 à Sig. Les températures enregistrées dans les deux régions étaient de 18°C à Ain Temouchent et 19°C à Sig. La surface du sol est d'abord débarrassée des feuilles mortes et des débris végétaux. Les échantillons sont prélevés de manière aléatoire à une profondeur de 30 à 40 cm d'épaisseur de terre. Au niveau du laboratoire, les échantillons sont pesés (environ 20g pour chaque échantillon) puis mis dans des sachets en plastiques étiquetés comme indiquer dans la figure 6. L'analyse des échantillons se fait dès l'arrivée au laboratoire.



Figure 6
Echantillon du sol plastifié étiqueté et numéroté.

3.2.1.2. Prélèvement des échantillons de galles

Nous avons détecté 20 arbres qui portent des galles sur toutes les parties de la plante y compris les pétioles et les limbes foliaires. Au total, 30 galles ont été prélevées (20) aux niveaux des rameaux comme le montre la figure 7 et 10 galles au niveau des feuilles comme l'indique la figure 8. Chaque galle est conservée dans un sachet en plastique étiqueté et transporté immédiatement au laboratoire.

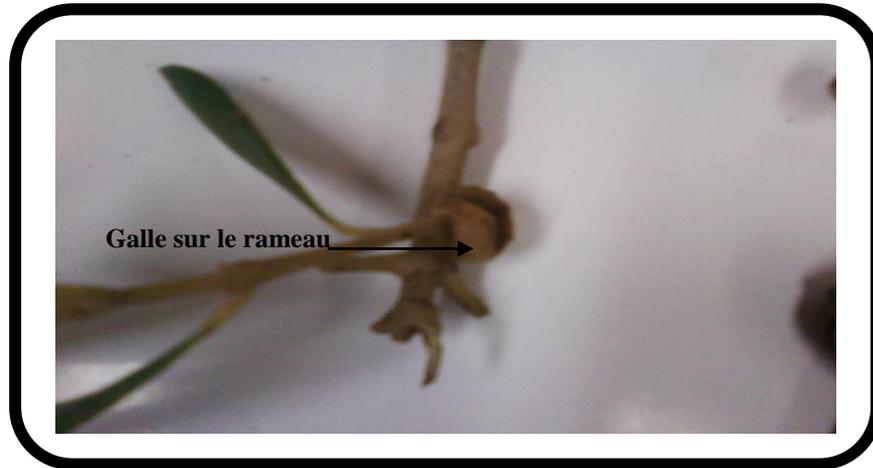


Figure 7
Aspect de nécrose sur le rameau d'olivier collectée de la station d'Ain Temouchent.



Figure 8
Aspect d'une feuille nécrosée collectée de la station de Sig (Mascara).

Pour une courte conservation ou pour une utilisation immédiate, les galles fraîches sont conservés au réfrigérateur à +4°C jusqu'à 48h (ne jamais les congeler afin d'éviter la nitrification de ces galles par les cristaux de glace). Pour une longue période de stockage allant de 6 à 12 mois, la dessiccation est vivement recommandée. La méthode utilisée est celle décrit par Vincent (1970), Somasegaran et Hoben (1994). Cette méthode consiste à remplir la moitié des flacons stériles par du CaCl₂ (meilleure absorption de l'humidité) ensuite mettre une quantité de coton sur lequel sont déposés les galles.

3.2.2. Purification des souches utilisée

Avant leur utilisation, les souches ont été revérifiées par une ou deux subcultures dans le milieu YEM (voir partie milieux de cultures) à 28°C pendant 24 à 72 heures pour les *Rhizobium* et le milieu Sabouraud à 25°C pendant 3 à 5 jours pour les champignons. Les bactéries sont purifiées par la méthode des stries. L'opération de purification est renouvelée à deux reprises en prenant chaque fois une colonie bien isolée sur gélose. Ceci conduit à l'obtention d'une culture pure vérifiée par observation macroscopique et microscopique. Après purification les souches sont conservés par deux méthodes jusqu'au moment de leur utilisation :

Pour la conservation des souches, les bactéries sont ensemencées dans des tubes de gélose inclinés (YEM ou Sabouraud) qui sont ensuite incubés à 28°C pendant 24 heures pour les *Rhizobium* ou à 25°C pendant 3 à 5 jours pour les champignons. Lorsque la croissance est visible, les tubes sont placés à +4°C ou ils sont conservés plusieurs semaines (3 mois).

Pour une conservation plus longue, les colonies des *Rhizobium* isolées sont ensemencées dans du YEM, incubées, puis la suspension bactérienne est mélangée en quantité égale avec du glycérol stérilisé à 40 % puis stockée à -20°C.

Pour les champignons la conservation était faite dans le milieu Sabouraud mélangée en quantité égale avec du glycérol stérilisé à 40 %.

3.2.3. Isolement et mise en culture des microorganismes

La technique d'isolement des bactéries est celle décrit par Vincent (1970), Somasegaran & Hoben (1985 et 1994) (anonyme, 2003).

3.2.3.1. Isolement à partir du sol

Une série de dilutions (10^{-1} jusqu'à 10^{-4}) des échantillons du sol est réalisée dans du NaCl (0,9%). Un volume de 100 µl de chaque dilution est étalé sur plusieurs milieux de cultures solides (sélectifs et non sélectifs) : King A, King B, la gélose cétrimide, la gélose Héктоéne, la gélose de BCP (Pourpre de Bromocrésol) et la Gélose nutritive. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 heures.

3.2.3.2. Isolement à partir des galles

Les galles fraîchement lavées sont utilisées directement, alors que celles qui sont conservées par dessiccation sont réhydratées en les plaçant dans l'eau pendant 24 heures au réfrigérateur à +4°C, puis pendant 1heure à la température ambiante.

- la surface des galles des rameaux est lavée d'abord à l'eau pour éliminer les particules de terre puis rincée trois fois à l'eau distillée stérile (Belaskri, 2006). Les tissus superficiels des galles sont décapés à l'aide d'un scalpel stérile. Les galles sont ensuite écrasées et mélangées avec de l'eau distillée stérile. Après écrasement et obtention d'un jus trouble (broyat), à l'aide d'une anse de platine, la suspension est étalée selon la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970) (figure 9) sur les géloses coulé en boîtes, puis incubées les boîtes à 30°C pendant 24 à 72 heures.

Toute cette manipulation est effectuée à proximité du bec Bensen, sous une hotte à flux laminaire.

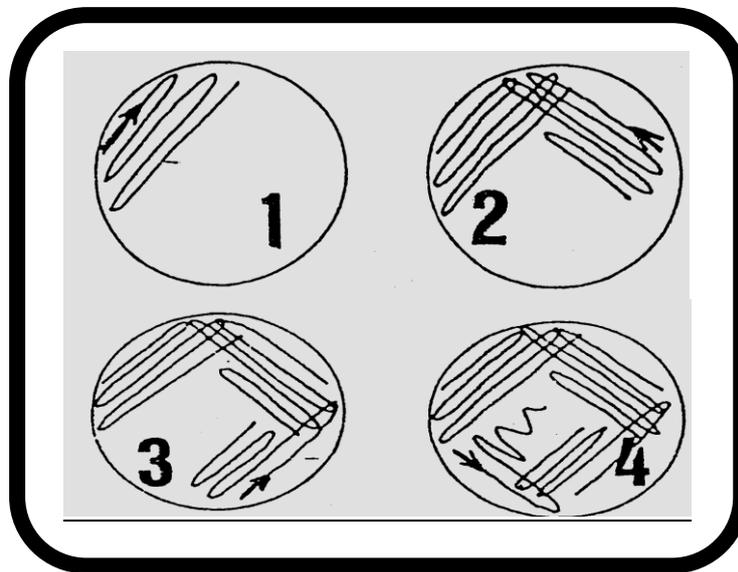


Figure 9

Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970).

- les feuilles nécrosées ont été d'abord lavées à l'eau de robinet, puis sont superficiellement désinfectées par immersion pendant 30 minutes dans une solution diluée à 50% d'eau de javel commerciale (12°) (Belaskri, 2006). Après la désinfection, le reste de la solution désinfectante est éliminée par trois lavages successifs avec de l'eau distillée stérile.

Les fragments des feuilles nécrosées ont été sectionnés en deux et ensemencés sur milieu de culture à l'aide d'une anse. Les boîtes de Pétri ont été étiquetées puis incubées à 30°C pendant 24 heures.

3.2.4. Identification et caractérisation des isolats

Cette étude a comporté :

- une identification microbiologique, physiologique et biochimique des isolats effectués grâce aux différents tests bactériologiques, biochimiques et des galeries Api décrits pour les *Pseudomonas*. Ces tests conduisent d'une part à l'identification de l'espèce ou parfois même la sous-espèce bactérienne.

- une caractérisation des souches portant sur quelques propriétés, à savoir le type sérotypique, l'antibiorésistance, les inhibitions inter bactériennes (antagonisme) et le contenu en ADN chromosomique et extra-chromosomique (plasmides).

3.2.4.1. Identification des isolats

L'identification des isolats se fait suivant une clé dichotomique qui va des caractères généraux aux plus spécifiques pour l'identification de l'espèce bactérienne donnée.

Pour identifier les *Pseudomonas*, des tests microbiologiques, physiologiques, biochimiques classiques ainsi que des systèmes Api ont été utilisés.

3.2.4.1.1. Les tests de microbiologie classiques

Nous avons réalisés les examens et les tests suivants :

➤ Examen macroscopique

L'observation macroscopique a été réalisée après 24 heures d'incubation à 30°C. Elle permet d'observer la taille, la forme, la couleur, l'aspect et la pigmentation des colonies. Ceci nous permet de prélever et de sélectionner seulement les colonies possédant les caractéristiques culturelles des *Pseudomonas*.

➤ Examen microscopique

Coloration de Gram:

Elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne car les bactéries qui seront dites « Gram négatives » ont une paroi pauvre en peptidoglycane donc plus fine qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile) et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une "couche" de peptidoglycane plus importante donc de ce fait ; plus épaisse. Elles resteront alors violettes. L'avantage de cette coloration est de classer les bactéries en deux grands groupes : Bactéries dites Gram positif et bactéries dites Gram négatif. Cette coloration permet aussi d'observer la morphologie des bactéries et leurs modes d'association. Rappelons que les *Pseudomonas* sont des Gram⁻ (voir annexe 1).

Examen de la mobilité :

A l'aide d'une anse de platine contenant une colonie pure de 24 heures une piqûre centrale est réalisée dans un tube de milieu Mannitol-Mobilité. Après incubation pendant 24h. L'apparition d'une culture bactérienne le long de la piqûre centrale indique que la bactérie est immobile tandis que l'apparition d'un trouble et d'une culture bactérienne dans toute la surface du tube indique que la bactérie est très mobile.

Coloration de Rhodes :

Cette coloration est utilisée pour la mise en évidence de la présence des flagelles. La réalisation de cette coloration a été effectuée comme suite : une application sur le frottis bactérien du mordant de Rhodes (mordant de Rhodes : Tanins, alun de potassium, huile d'aniline, chlorure ferrique) pendant 5 minute puis une application du nitrate d'argent ammoniacal porté préalablement à ébullition pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite examinées à immersion après le rinçage. Les flagelles et les corps bactériens se colorent en brun-noir (anonyme, 2001).

Observation sous lumière ultraviolette :

Certaines souches de *Pseudomonas* sont fluorescentes. Les cultures bactériennes sont observées sous une lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 375 nm (microscope à UV Nikon) afin de noter la présence ou l'absence de fluorescence.

Rappelons que les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram⁻, très mobiles et possédants des pigments fluorescents (Philippe, 2007).

3.2.4.1 .2. Tests physiologiques:

Croissance en présence du Sel (NaCl) :

Pour étudier la capacité des souches à croître dans un milieu hyper-salé. Les souches sont cultivées dans des bouillons nutritives ajustés à différentes concentrations de NaCl (0.5%, 1%, 2%, 3%, 5% et 10%). Après une incubation à 30°C pendant 24 heures. 100 µl de chaque bouillon a été étalé sur milieu solide (gélose nutritive) incubée à 30°C pendant 24 heures. On procède après incubation à une numération des colonies comme suite :

- De 1 à 10 colonies par boîte : (+).
- De 10 à 40 colonies par boîte : (++)
- Plus que 40 colonies par boîte : (+++).
- Absence de culture bactérienne : (-).

Généralement les bactéries du genre *Pseudomonas* ne poussent pas en présence de 10 % d'NaCl (Philippe, 2007).

Croissance à différentes valeurs de pH :

Les isolats sont mis en culture sur des bouillons nutritifs ajustés à des différents pH (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9 et 10) à l'aide du NaOH ou du HCl Après incubation à 30°C pendant 24 heures. 100 µl de chaque bouillon a été étalé sur milieu solide (gélose nutritive) incubée à 30°C pendant 24 heures. On procède après incubation à une numération des colonies comme suite :

On procède après incubation à une numération des colonies comme suite :

- De 1 à 10 colonies par boîte : (+).
- De 10 à 40 colonies par boîte : (++).
- Plus que 40 colonies par boîte : (+++).
- Absence de culture bactérienne : (-).

Croissance à différentes températures :

Dans le but d'étudier les températures maximales et optimales de croissance des bactéries, les isolats sont mis en culture sur le milieu King (A et B) et incubés à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 30°C, 37°C, 40°C et 50°C pendant 24 h. On procède après incubation à une numération des colonies comme précédent.

Rappelons que les *Pseudomonas* sont très tolérant thermiquement autour d'un optimum de croissance de 20-37°C (mésophile) en culture, mais supportant une large gamme de température : 4 à 50°C voire plus temporairement (Philippe, 2007).

3.2.4.1 .3. Tests biochimiques

Bien que les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous espèces de bactéries. Les tests biochimiques utilisés au cours de cette étude sont :

- Le test de LOPAT et des Galeries Api 20 NE pour identifier les espèces du groupe *Pseudomonas*.
- Des tests biochimiques classiques et des galeries Api 20 E , Api NH, Api 20 Strep, Api 20A et Api AUXACOLOR™ 2 pour identifier la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*.

3.2.4.1.3.1. Test de LOPAT :

Ce test se compose de :

Levane (Schaad, 1988) : Polymérisation du fructose en poly fructose sur le milieu Levane.

Oxydase (Schaad, 1988) : Mise en évidence de la présence de l'enzyme oxydase.

Pectinase (Rathore *et al.*, 2000) : Mise en évidence de la présence de l'enzyme pectinase .

Arginine déshydrolase (Schaad, 1988) : Mise en évidence de la transformation de l'arginine par l'enzyme arginine déshydrolase.

Hypersensibilité du **T**abac (Rathore *et al.*, 2000) : Mise en évidence du pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac. Tous ces tests sont réalisés à partir d'une culture pure de 24 heures à 30°C.

Test Levane:

Ce test est réalisé par ensemencement des isolats par la méthode des stries sur le milieu Levane, il permet de vérifier la polymérisation du fructose en poly fructose par la bactérie. Une réaction positive se traduit par la présence d'une zone opaques et verte en marge de la strie.

Test d'oxydase :

Ce test est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile la bactérie à identifier est prélevée et déposée sur le papier filtre humecter du réactif (Réactif oxydase, bio Mérieux) composé de phénylénediamine et d'acide ascorbique (agent réducteur). Après 30 secondes une réaction positive indique qu'il a eu oxydation du réactif phénylénediamine pour former un composé coloré en violet : l'indophénol. Une réaction tardive ou une absence de couleur indique une réaction négative.

Test de l'activité pectinolytique :

Le test pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie et se fait sur le milieu pectinase. Les isolats obtenus sont inoculés par piqûre centrale. Après 24 h d'incubation à 30°C, la boîte est inondée par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 7,5 % et la présence d'un halo blanc indique la présence d'une activité pectinolytique.

Confirmation sur milieu différentiel

Un milieu différentiel permet de reconnaître un genre ou une espèce grâce à son apparence unique et caractéristique. Le milieu PH (Pectine Hildebrand) permet la caractérisation des *Pseudomonas* sp. Après inoculation par piqûre centrale et incubation pendant 24 h à 30°C, la présence d'une zone de dépression entourant la colonie indique la présence d'une activité pectinolytique.

Test d'arginine déshydrolase (ADH):

Ce test sert à déterminer la présence ou l'absence d'enzyme : arginine déshydrolase. Ce test est réalisé, par ensemencement du milieu Möeller avec une goutte de la suspension bactérienne (le tube est couvert de vaseline stérile afin de créer une anaérobiose relative). La lecture des résultats se fait après 24 h d'incubation à 30°C :

- Une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac. Le milieu deviendra jaune.
- Une bactérie décarboxylante après avoir utilisé le glucose va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante, et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu : le milieu restera violet.

Test d'hypersensibilité sur Tabac :

Ce test met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie suite au dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac de la variété **White Burley** (*Nicotiana tabacum*) ayant atteint le stade de 5 à 6 feuilles (Enrique, 2003) collectée d'une station située à Hammam Bouhdjar (Ain Temouchent). Une suspension bactérienne ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml (standard McFarland) est injectée dans l'espace intercellulaire (nervure centrale) sur la surface inférieure de la feuille à l'aide d'une seringue de 1 ml, cette dernière est incubée à la température de la pièce (25°C) de 24 à 48 heures.

3.2.4.1.3.2. Tests biochimiques classiques pour l'identification de la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*.

Pour identifier la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi* des tests biochimiques ont été effectués :

- test du rouge de méthyle (RM) (Clark & Lubs, 1915) ;
- test OF (Oxydation / Fermentation) ;
- coagulation du lait (Lelliott & Stead, 1987) ;
- capacité des souches de *P. syringae* à survivre pendant dix jours dans des milieux contenant des pourcentages (%) différents de sodium et 5% du saccharose (Schaad *et al.*, 1988) ;
- hydrolyse du Tween 80 (Test estérase) (Bien *et al.*, 1990) ;
- test de la catalase ;
- réactions alcalines des isolats sur le lait tournesolé (Vincent, 1970).

Test du rouge de méthyle (RM) :

Ce test est réalisable en 24 heures à condition que le milieu de Clark et Lubs utilisé soit sous un petit volume, donc bien aéré et susceptible de bien libérer le CO₂ produit. Par une anse de platine contenant une colonie de 24 heures, une piqûre centrale est faite dans le tube du milieu Clark et Lubs. Après incubation à 30°C pendant 24 heures, 2 gouttes d'une solution alcoolique de rouge de méthyle à 0,2 % sont ajoutées sur le tube. Cela laisse supposer que :

- les bactéries RM (rouge de méthyle) positif sont des bactéries produisant des acides organiques (éthanoïque...) par la voie des acides mixtes. Coloration rouge.
- les bactéries RM (rouge de méthyle) négatif sont des bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO₂ par la voie butane-diolique. Aucune coloration.

Test OF (Oxydation / Fermentation) :

Ce test est mis en évidence sur le milieu MEVAG (Milieu de la Voie D'Attaque des Glucides). Ce milieu est destiné à vérifier le métabolisme oxydatif ou fermentatif des bactéries. A la suite de l'utilisation du sucre tel que le glucose il y a formation d'acide qui donne une couleur jaune au milieu. Par une anse de platine contenant une colonie de 24 heures, une piqûre centrale est faite dans les deux tubes du milieu MEVAG, l'un est recouvert d'huile de vaseline stérile pour créer l'anaérobiose incubé à 30°C pendant 24 heures l'autre est

3- MATERIEL & METHODES

incuber sans l'huile de vaseline en aérobiose. Après incubation trois cas peuvent être observées:

- tube incubé en anaérobiose sera jaune donc la bactérie utilise le glucose par métabolisme fermentaire.
- seul le tube incubée en aérobiose sera jaune donc la bactérie utilise le glucose par métabolisme oxydatif / respiratoire.
- deux tubes rouges donc la bactérie est inactive vis-à-vis du glucose.

Coagulation du lait :

Ce test permet la mise en évidence de l'enzyme coagulase chez les souches de *P. syringae*. Quelques colonies ont été inoculées dans un tube à hémolyse qui contient du lait. Une réaction positive se traduit par la coagulation du lait après 24 h d'incubation à 30°C.

Capacité des souches de *P. syringae* à survivre pendant dix jours dans des milieux contenant des pourcentage (%) différents de sodium et 5% du saccharose :

Les isolats possédant les caractéristiques des *P. syringae* sont inoculés sur des bouillons nutritifs contenant des pourcentages différents du sodium (0,1%, 1%, 5% et 10%) et 5% du saccharose. Suite à une incubation pendant 48 heures à 30°C des cultures ont étéensemencées à partir de chaque bouillon. L'obtention d'une culture bactérienne est une réaction positive.

Hydrolyse du Tween 80 (Test estérase) :

Ce test permet la mise en évidence de l'activité estérase des isolats par ensemencement des colonies (culture bactérienne de 24 h) en touches sur le milieu de culture contenant du Tween 80, puis les boites sont incubées pendant 72 h à 30°C. Le test est positif (présence d'une activité estérase) lorsque les acides gras libérés par les estérases se complexent aux ions pour former un précipité autour de la culture bactérienne sous forme d'un halo opaque. Le test est négatif (absence de l'activité estérase) lorsque le milieu reste inchangé.

Test de la catalase:

L'enzyme catalase sert à la détoxification de l'eau oxygénée produite au cours de certaines réactions métaboliques, présente chez beaucoup de bactéries aérobies ou aéroanaérobies et souvent absente chez les bactéries anaérobies. Sur une lame stérile on dépose une goutte de la solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur laquelle on met une colonie. L'observation est faite immédiatement. Le dégagement gazeux d'oxygène (apparition de bulles d'air) est une réaction positive.

Réactions alcalines sur le lait tournesolé :

Les réactions sur le lait tournesolé sont utilisées pour la mise en évidence d'une protéolyse acide ou alcaline. Les bactéries sontensemencées sur boîtes contenant le lait tournesolé et incubées à 30°C ou 37°C pendant 5 à 8 jours. Plusieurs modifications du lait peuvent être observées; elles sont dues à l'action d'enzymes diverses et à leurs interférences :

- Enzymes glucidolytiques** attaquant le lactose, et provoquant l'acidification et la coagulation.
- Enzymes protéolytiques** hydrolysant la caséine, cette attaque pourra se traduire par une alcalinisation, une prise en masse ou la digestion des caillots quel qu'en soit le processus de formation.

-**Réductases** entraînant la décoloration de l'indicateur de pH.

Rappelons que les *P. syringae* pv. *savastanoi* présentent les caractères suivants:

- production des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO₂ par la voie butane diolique (RM).
- dégradent le glucose par voie oxydatives.
- absence d'enzyme coagulase.
- présence d'enzyme estérase.
- présence d'enzyme catalase.
- présence de réactions alcalines sur le lait tournesolé.

3.2.4.1 .4. Les tests Api.

Six galeries biochimiques ont été utilisées pour l'identification des isolats. Toutes ces galeries ont le même mode opératoire indiqué dans la figure 10 :

Préparation de la galerie :

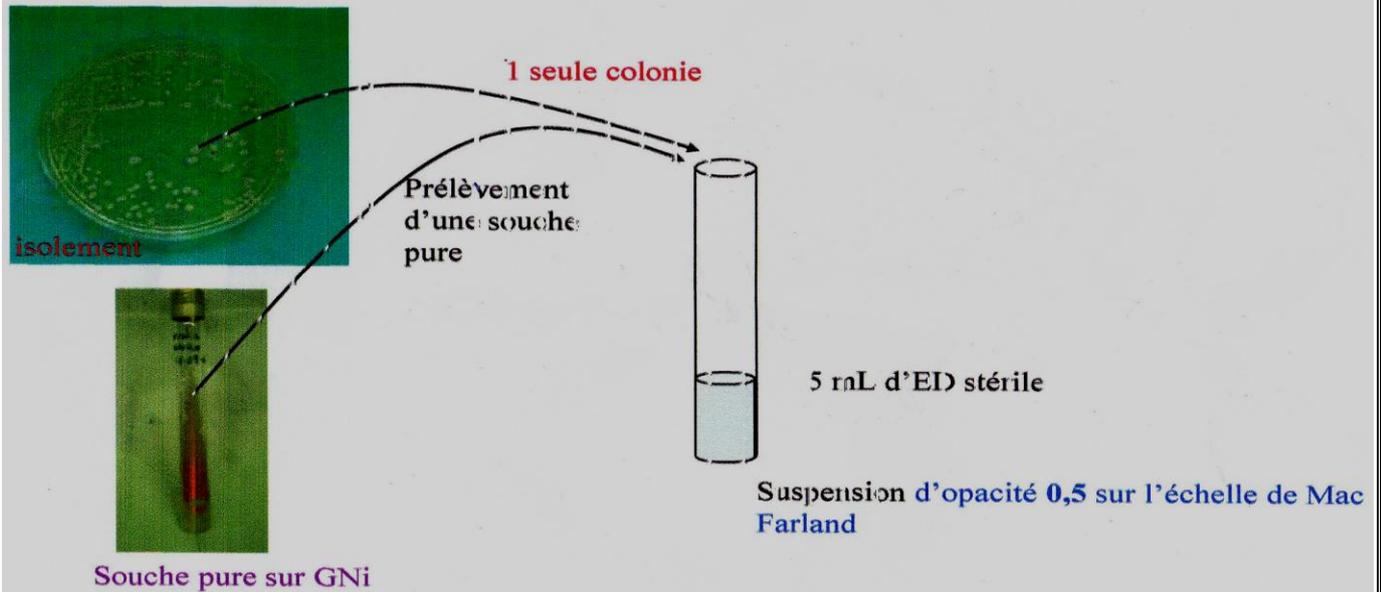
- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum :

- Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.

3- MATERIEL & METHODES

2- Préparation de l'inoculum



Inoculation de la galerie :

- Remplir les tubes et les cupules pour les tests **CIT VP et GEL** avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles d'air.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules).

Pour les tests : **ADH ; LDC ; ODC ; H₂S et URE** crée une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

- Refermer la boîte d'incubation
- Incuber **24 heures à 30°C**.

ADH : Arginine déshydrolase.

LDC : Lysine décarboxylase.

ODC: Ornithine décarboxylase.

CIT : Utilisation du citrate.

VP : Production d'acétoïne.

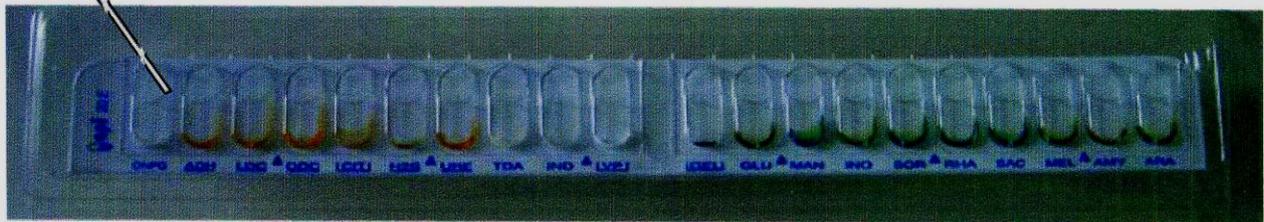
GEL : Gélatinase.

H₂S : Production d'H₂S.

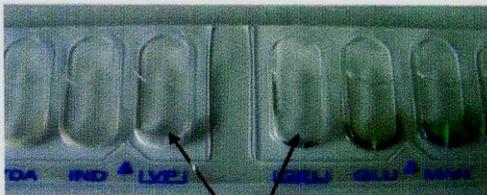
URE: Uréase.

3- Ensemencement de la galerie API 20 E

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles

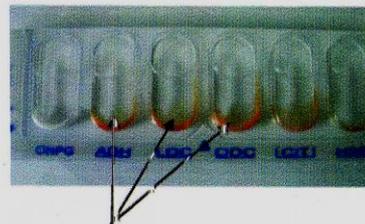


Pour certains caractères:



Remplir de suspension le tube et la cupule

CIT, VP, GEL



Remplir le tube de suspension et recouvrir d'huile de paraffine

ADH, LDC, ODC, H₂S, URE

La lecture de la galerie :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de Lecture (voir annex 2). Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats.

Identification des souches de *Pseudomonas* isolées :

- Avec le tableau d'identification :

Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celle du tableau ;

- Avec le catalogue analytique :

- Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun.
- Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs.
- On obtient un nombre de **7 chiffres** qui sert de **code d'identification**.

C'est une Identification en genre ou espèce : aisée, essentiellement biochimique en 24-48 h à l'aide de dispositifs commerciaux.

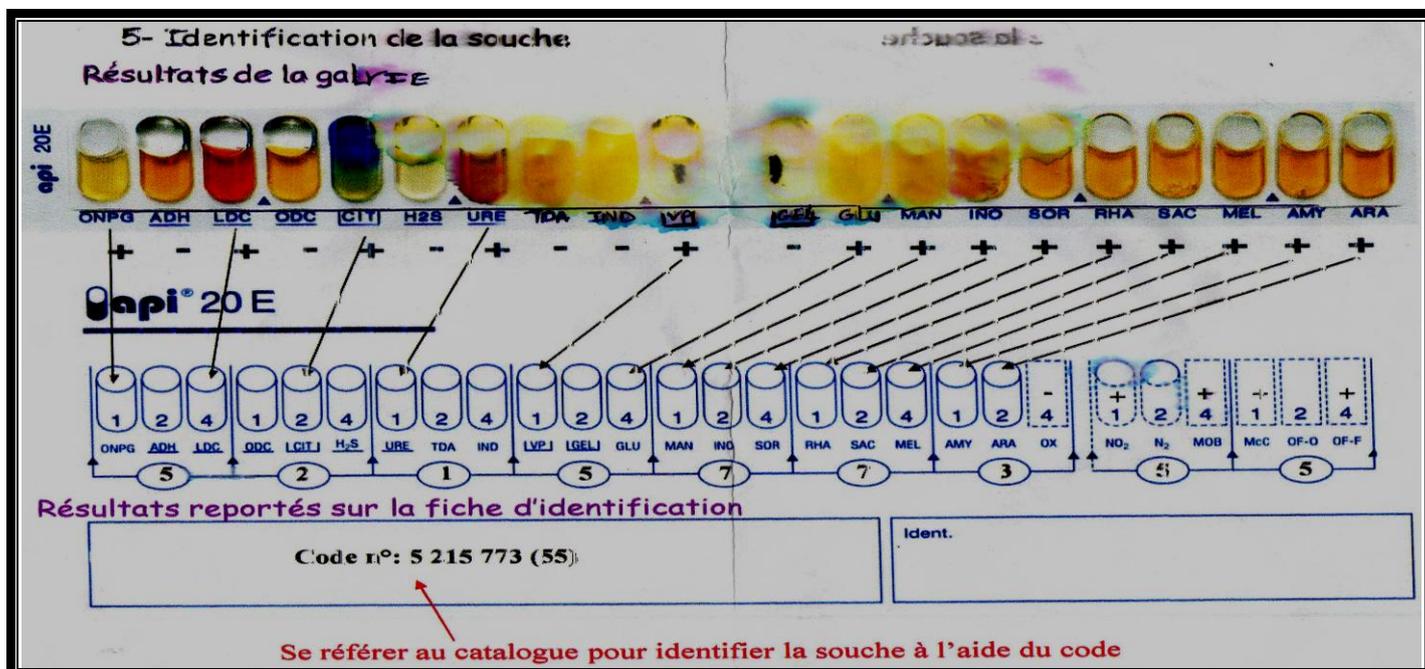


Figure 10
Mode opératoire des galeries Api (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France).

- La galerie Api 20NE a été utilisée pour l'identification des souches de *Pseudomonas* aux espèces : *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ou *P. syringae*, elle permet de réaliser les tests suivants:

NO₃ : réduction des nitrates par l'enzyme nitrate réductase.

TRP : formation de l'acide indole pyruvique à partir du tryptophane (acide aminé) grâce à l'enzyme tryptophane désaminase.

GLU : fermentation du glucose.

ADH : transformation de l'arginine par l'arginine déshydrolase.

URE : libération d'ammoniac à partir de l'urée grâce à l'uréase.

ESC : l'hydrolyse (β - glucosidase) de l'esculine.

GEL : liquéfaction de la gélatine (protéine).

PNPG : détermination de la présence de l'enzyme galactosidase.

Formation des acides à la suite de l'utilisation des hydrates de carbone suivants :

Le glucose, l'arabinose, le mannose, le mannitol, le N-acétyl-glucosamine, le maltose, le gluconate, la caprate, l'adipate, le malate, le citrate et le phényl-acétate.

- Les galeries Api 20 E, Api NH, Api 20 Strep, Api 20A, et Api AUX A COLOR™ 2 ont servi pour compléter quelques tests biochimiques à fin d'identifier la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*. Ces galeries ont permis de réaliser les tests suivants:

▪ *La galerie Api 20 E :*

Api 20 E est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif tel que les *Pseudomonas* comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés. Ce système est utilisé pour réaliser les tests suivants :

- production du sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir du thiosulfate (S₂O₃).
- formation d'acétoïne à partir du pyruvate de sodium (VP).
- formation d'acide à la suite de l'utilisation d'inositol (INO).

▪ *La galerie Api NH :*

La galerie Api NH comporte 10 micro-tubes contenant des substrats déshydratés pour réaliser 12 tests d'identification (réactions enzymatiques ou fermentation de sucres) des bacilles à Gram négatifs. Elle est utilisée pour réaliser le test de formation d'acide à la suite de l'utilisation du fructose (FRU).

▪ *La galerie Api 20 Strep:*

Api 20 Strep est une galerie standard associant 20 tests biochimiques qui représentent un pouvoir discriminant. Elle permet l'identification de la plus part des germes apparentes les plus courantes. Elle est utilisée pour mettre en évidence la formation d'acide à la suite de l'utilisation du ribose (RIB), l'inuline (INU) et l'Amidon (AMD).

▪ *La galerie Api 20A:*

Le système Api 20A permet de rechercher rapidement et facilement 21 caractères biochimiques des bactéries à Gram⁺ tel que les *Pseudomonas*. Elle est utilisée pour réaliser les tests suivants :

- formation d'acide à la suite de l'utilisation des hydrates de carbone suivants : le saccharose (SAC), le maltose (MAL), la salicine (SAL), le xylose (XYL), le glycérol (GLY), le mannose (MAN), le melezitose (MLZ), le raffinose (RAF), le sorbitol (SOR) et le rhamnose (RHA).

▪ *La galerie Api AUX A COLORTM 2 :*

C'est un système d'identification des germes à Gram négatifs dont le principe repose sur l'utilisation des sucres. Elle est utilisée pour mettre en évidence la formation d'acide à la suite de l'utilisation du galactose (GAL) et l'adonitol (ADO).

3.2.4.2. Caractérisation des isolats

Au cours de la première étape de l'isolement des bactéries, les colonies ont été repiquées au hasard (c'est - à- dire, 5 à 8 colonies ont été prise par boîte de Pétri). Et donc il est probable qu'une même souche peut éventuellement être prise plusieurs fois, ce qui entraîne la présence dans notre collection de souches identiques ou biotypes.

Pour vérifier une telle incidence nous avons voulu préciser la caractérisation des souches et confirmer leur identité en les soumettant à différents tests. Cette étude permettra de détecter d'éventuelles autres différences entre les souches et d'affiner leur identification. Pour ce faire, Nous avons alors :

- rechercher les types sérotypique des isolats ;
- l'antibiorésistance des isolats ;
- l'antagonisme des isolats avec d'autres souches (*Rhizobium* et les champignons *Aspergillus niger* et *Penicillium citrinium*) contre les souches de *Pseudomonas* isolées dans cette étude ;
- rechercher l'ADN extra- chromosomique chez les différentes souches.

3.2.4.2.1. Recherche des types sérotypique des isolats.

La recherche du type sérotypique des isolats de *Pseudomonas* est réalisée à l'aide d'un test rapide d'agglutination. Nous avons utilisé le Kit (Slidex Pseudo) (Bio – Rad. F-92430. Lot 4 J2027) réservé pour le groupage des *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et *P. fluorescens*) car ils n'existent pas de Kit pour le sérotypage des *P. syringae*.

Les souches de *Pseudomonas* possèdent le plus souvent des antigènes spécifiques de groupe qui peuvent être extraits et identifiés avec des anti- sérums. Les réactifs sont constitués de particules de latex sensibilisées par des anticorps dirigés contre les antigènes de groupe. La présence des antigènes correspondants entraîne une agglutination visible des particules de latex.

L'antigène spécifique du groupe contenu dans la paroi est identifié par des particules de latex sensibilisées par un corps anti- antigène de groupe de *Pseudomonas*. Si l'antigène est présent, le réactif latex correspondant est agglutiné, si l'antigène est absent le réactif latex reste en suspension homogène.

Le mode opératoire de ce test est indiqué ci-dessous (figure 13) :

Composition des réactifs :

- contrôle positif (extrait enzymatiques des souches de *Pseudomonas* des groupes).
- antisérum *P. aeruginosa* et antisérum *P. fluorescens* polyvalents : PMA, PMC, PME et PMF et monovalents : (P9, P10, P13, P14), (P1, P3, P4, P6), (P2, P5, P15, P16) et (P7, P8, P11, P12). Chaque antisérum polyvalent regroupe quatre antisérums monovalents comme suite : **PMA** (P9, P10, P13 et P14) **PMC** (P1, P3, P4 et P6) **PME** (P2, P5, P15 et P16) **PMF** (P7, P8, P11 et P12).
- les réactifs ne doivent pas être utilisés directement sur le prélèvement. Les isolats à identifier doivent au paravent être isolés sur des milieux de cultures appropriés.
- après incubation de la gélose de 18-24 heures à 30-37°C s'assurer dans un premier temps qu'il peut s'agir d'un *Pseudomonas* par les réactions classiques (morphologiques, Gram, ...)
- préparer la suspension bactérienne à partir de 3-5 colonies à l'aide d'un agitateur de type vortex.

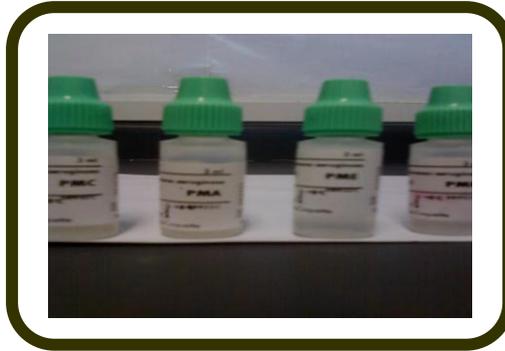


Figure 11
Réactif Latex Pseudo (Bio – Rad. Lot- 4 J2027).

Le groupage :

- 1- laisser les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant utilisation au moins 10 minutes.
- 2- bien remettre en suspension les réactifs latex. Chasser les bulles retenues dans les compte-gouttes.
- 3- noter la référence de la souche sur une carte (en dehors de la zone réactionnelle).
- 4- bien homogénéiser les suspensions de latex dans les emplacements correspondants. Veiller à tenir les flacons compte – gouttes verticalement lors de la distribution des gouttes.
- 6- déposer 15 ml de la suspension bactérienne à côté de chaque goutte de latex polyvalent.
- 7- à l'aide d'un bâtonnet, mélanger les deux gouttes (une goutte d'anti sérum polyvalents des *P. fluorescens* ou *P. aeruginosa* avec une goutte de la suspension bactérienne des trente cinq souches de *Pseudomonas* isolées (*fluorescens* et *aeruginosa*) en utilisant toute la surface de chaque zone réactionnelle.
- 8- donner à la carte un mouvement de rotation pendant 2 minutes maximum et lire sous éclairage normal sans utilisés de loupe.

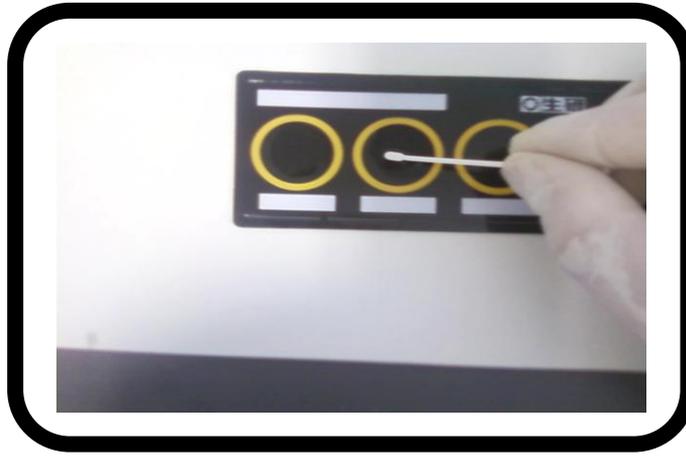


Figure 12

le mouvement de rotation d'anti sérum polyvalents des Pseudomonas (P. fluorescens ou P.aeruginosa) avec une goutte de la suspension bactérienne des trente cinq souches de Pseudomonas).

Lecture et interprétation des résultats :

- **un résultat positif** est indiqué par l'apparition d'une agglutination nette avec un réactif latex en 2 minutes maximum.
- **un résultat négatif** est indiqué par une absence d'agglutination : suspension homogène ou très fine agglutination à 2 minutes.
- **un résultat et non interprétable** : si on observe une agglutination dans plusieurs suspensions de latex. Ceci peut correspondre à une souche poly- agglutinante ou un mélange de souches dans ce cas refaire l'isolement et le test.
- **un résultat est non groupable** si on observe une absence d'agglutination avec tous les latex.

Figure 13

Le mode opératoire du test de sérotypage des isolats de Pseudomonas (selon le fournisseur : Bio-Rad).

3.2.4.2.2. Recherche de l'antibiorésistance

Nous avons étudié le comportement des bactéries vis-à-vis de 24 antibiotiques commercialisés par l'Institut Pasteur d'Algérie. Les antibiogrammes ont été réalisés sur le milieu Mueller Hinton couvert par un inoculum d'une densité optique de 0,5 McFarland. (Couvalin, 2007) : Le tableau 4 représente les antibiotiques utilisés ainsi que leur concentration et leur mode d'action.

La méthode que nous avons utilisée pour la réalisation de l'antibiogramme est celle de **Kirby et Bauer (1966)**, elle est recommandée par l'OMS. C'est la méthode par diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques ; elle se base sur la mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Deux normes (NCCLS et SFM) ont été appliquées. La mesure est comparée aux critères établis par la comité national pour les études cliniques de laboratoire (NCCLS) ou celle établis par la société française de microbiologie (SFM). La souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 a servi pour le contrôle de l'antibiogramme (catalogue analytique des antibiogrammes extrait d'un document sur la standardisation de l'antibiogramme, 4^{ème} édition 2005) ainsi que la résistance naturelle des *Pseudomonas* aux antibiotiques : Ampicilline (Am., 10 µg), Amoxicilline (Amx., 25 µg), Céfalotine (Cf., 30 µg), Céfazoline (Cz., 30 µg), Oxacilline (OX., 01 µg), Streptomycine (S., 100 µl) et l' Acide Nalidixique (Na., 30 µg). Ces antibiotiques ont été aussi testés sur les souches de *Pseudomonas* isolées.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, la lecture de l'antibiogramme se fait par comparaison des diamètres des zones d'inhibition obtenus avec celles décrites dans le tableau 5 qui montre les valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les *Pseudomonas* sp. (tableau extrait d'un document sur la standardisation de l'antibiogramme, 4^{ème} Edition 2005).

Tableau 4. Antibiotiques utilisés, leurs concentrations et leurs modes d'actions (tableau extrait d'un document sur la standardisation de l'antibiogramme, 4^{ème} édition 2005).

Famille	Mode d'action	Nom	Symboles	Quantité / disque
Béta - lactamines	Inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane.	Ticarcilline	Tic	75 µg
		Ticarpen	Tcc	75 µg
		Piperacilline	Pip	75 µg
		Ceftazidime	Caz	30 µg
		Aztreonam	Atm	30 µg
		Imipeneme	Ipm	10 µg
		Cefopérazone	Cfp	05 µg
		Cefsulodine	Cfs	30 µg
		Ampicilline	Am	10 µg
		Amoxicilline	Amx	25 µg
		Céfalotine	Cf	30 µg
		Céfazoline	Cz	30 µg
		Oxacilline	Ox	01 µg
Aminosides	Inhibent la synthèse des protéines en agissant préférentiellement sur la sous unité 30S.	Amikacine	An	30 µg
		Gentamicine	Gm	10 µl
		Tobramicine	Tm	10 µg
		Streptomycine	S	100 µl
Quinolones	Stoppent la synthèse de l'ADN par action sur des topo isomérases bactériennes.	Ciprofloxacine	Cip	05 µg
		Pefloxacine	Pef	05 µg
		Ofloxacine	Ofx	05 µg
		Acide Nalidixique	Na	30 µg
Polypeptides	Action sur la membrane cytoplasmique.	Coléistine	Cs	50 µg
Divers	La fosfomycine et la Netylmicine inhibent la conversion de l'UDP-N-acetylglucosamine en acide UDP-N acetylmurannique (UDP ; nucléotide uridine di phosphate) l'une des premières étapes de la biosynthèse du peptidoglycane.	Fosfomycine	Fos	50 µg
		Netylmicine	Net	30 µg

3- MATERIEL & METHODES

Tableau 5. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les *Pseudomonas* sp. (tableau extrait du document sur la standardisation de l'antibiogramme, 4^{ème} Edition 2005).

Les antibiotiques	Diamètres critiques (mm)		
	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Béta – lactamines			
Ticarpén	≤14	15-19	≥20
Piperacilline	≤17	18-20	≥21
Ceftazidime	≤14	15-17	≥18
Aztreonam	≤15	16-21	≥22
Imipénème	≤13	14-15	≥16
Céfopérazone	≤15	16-21	≥22
Cefsulodine	≤17	18-20	≥21
Ampicilline	≤13	14-16	≥17
Amoxicilline	≤13	14-17	≥18
Céfalotine	≤12	13-14	≥15
Céfazoline	≤13	14-17	≥18
Oxacicilline	≤12	13-14	≥15
Aminosides			
Amikacine	≤14	15-16	≥17
Gentamicine	≤12	13-14	≥15
Tobramicine	≤12	13-14	≥15
Streptomycine	≤14	15-16	≥17
Quinolones			
Ciprofloxacine	≤15	16-20	≥21
Pefloxacine	≤15	16-20	≥21
Ofloxacine	≤12	13-15	≥16
Acide Nalidixique	≤13	14-17	≥18
Polypeptides			
Coléistine	≤15	16-20	≥21
Divers			
Fosfomycine	≤12	13-15	≥16
Netylmicine	≤12	13-14	≥15

3.2.4.2.3. Recherche des inhibitions (antagonisme)

Nous avons testé l'effet inhibiteur des souches de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, des souches de *Rhizobium* et des champignons (*Aspergillus niger* et *Penicillium citrinium*) sur les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* isolées dans notre étude.

De plus, nous avons aussi testée l'effet inhibiteur des souches de *Rhizobium* et des champignons (*Aspergillus niger* et *Penicillium citrinium*) sur les souches de *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* isolées dans cette même étude.

Les inhibitions inter- bactériennes sont mises en évidence par deux méthodes :

- **Méthode directe** : (confrontation bactérie ou champignon / bactérie) (Fleming *et al.*, 1975).
- **Méthode indirecte** : (confrontation surnageant bactérien / bactérie) (Barefoot & Klaenhammer, 1983).

L'activité inhibitrice des bactéries était recherchée dans des extraits de cultures (brutes) natifs obtenus chez des souches retenues comme inhibitrices. Ces extraits de culture ont aussi servis dans l'étape de la recherche de la nature de l'agent inhibiteur.

• Préparation de l'extrait de culture bactérien (EC)

Les extraits de cultures sont préparés selon la méthode de Kacem *et al.* (2009). Les souches considérées comme inhibitrices sont ensemencées dans 100 ml du milieu YEM (pour les souches de *Rhizobium*) ou le milieu King (A ou B) (pour les souches de *Pseudomonas*). Les souches sont ensuite incubées à 28°C ou à 30°C, respectivement pendant 24 heures. Ensuite, les cellules bactériennes sont éliminées par centrifugation à 12000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré et ajusté à pH 7 avec de la soude (NaOH 3N) puis filtré sur une membrane de porosité 0,22 µm (millipore Minisart. SM 16584, Sartorius). Le filtrat stérile obtenu constitue l'extrait de culture (EC). Ce dernier est alors divisé en deux parts égales : une partie est conservée native à + 4°C ou à -20°C, l'autre est utilisée pour déterminer la nature de l'agent inhibiteur comme indiquée dans la figure 14.

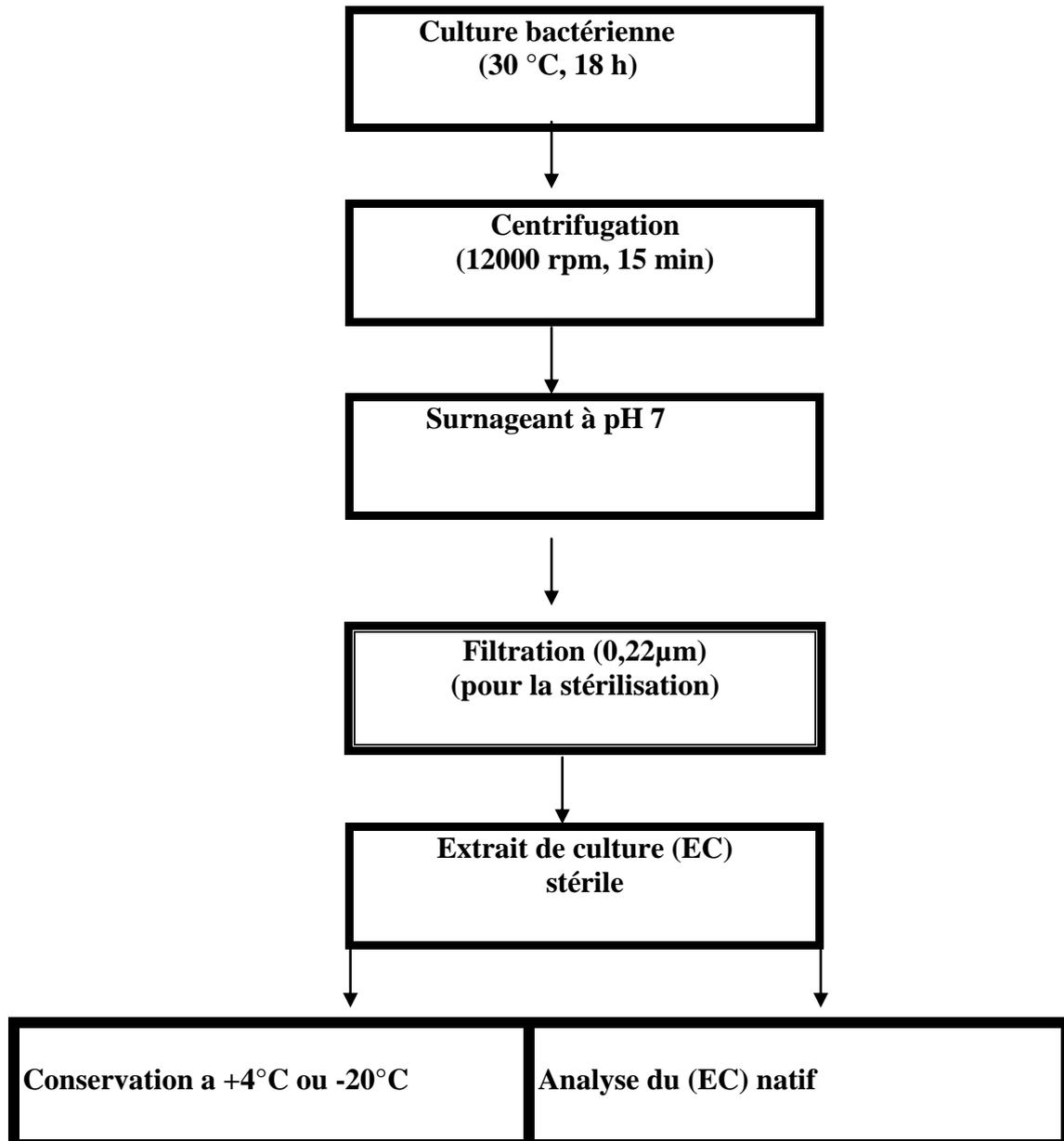


Figure 14
Préparation de l'extrait de culture (EC) bactérien.
(selon Kacem et al., 2009)

- **Méthode directe (confrontation bactérie ou champignon / bactérie) (Fleming *et al.*, 1975):**

Pour les bactéries :

Dans des boîtes de Pétri contenant le milieu King (A ou B) pour les *Pseudomonas* ou le milieu YEM pour les *Rhizobium*, les souches considérées comme inhibitrices étaient ensemencées en touches à l'aide d'un inoculateur multipoint. Les touches sont mises à sécher à température ambiante pendant 30 minutes, ensuite, les boîtes étaient incubées à 28°C pendant 24 heures pour les *Rhizobium* et 30°C pour les *Pseudomonas*. Sur ces touches, on coulait un mélange de 10 ml de milieu King (A ou B) ou YEM (gélose molle) maintenu à liquide à 45°C contenant 500 µl d'une culture de 18 heures de la souche considérée comme indicatrice. Après solidification, les boîtes de Pétri étaient alors incubées à 28°C ou 30°C selon la souche (*Pseudomonas* ou *Rhizobium*) pendant 72 heures.

Pour les champignons :

A l'aide d'un écouvillon stérile le milieu King (A ou B) est ensemencé par une suspension bactérienne de la souche indicatrice (*P. syringae* pv. *savastanoi*, *P. aeruginosa* ou *P. fluorescens*). Le champignon (souche inhibitrice) est ensuite déposé au centre. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 72 heures.

L'inhibition de croissance de la souche indicatrice conduit à la formation d'une zone claire (zone d'inhibition) autour des souches ensemencées en touches.

- **Méthode indirecte (Méthode des puits) (Barefoot & Klaenhammer, 1983) :**

Elle repose sur la diffusion d'agents inhibiteurs dans des puits creusés dans une gélose contenant dans sa masse une souche indicatrice. Les boîtes de Pétri étaient recouvertes avec 15 ml de milieu King (A ou B) dont chacune contient en masse 500 µl de culture bactérienne indicatrice. Après solidification du milieu, des puits de 4 mm de diamètre étaient réalisés à l'aide d'une pipette pasteur stérile, ensuite, chaque puit était rempli par 100 µl d'extrait de culture (EC) obtenu des souches inhibitrices. Les boîtes étaient ensuite laissées à température ambiante pendant 30 minutes puis incubées à 28°C pendant 24 heures. La lecture s'effectue après 24-72 heures d'incubation. L'inhibition est révélée par la présence des zones d'inhibitions (halo) autour des puits.

Ces méthodes que nous avons décrits précédemment (méthodes directes et indirectes) nous a permis de sélectionner parmi les souches des couples de souches (inhibitrice / indicatrice).

3.2.4.2.4. Recherche de la nature de l'agent inhibiteur

On sait que, généralement, l'antagonisme observé chez les bactéries de la rhizosphère peut être due à la production de bactériocines (Gabed, 2006 ; Kacem *et al.*, 2009).

Dans cette étude, l'activité et la nature de l'agent inhibiteur étaient recherchées dans les extraits de culture (EC) obtenue à partir des souches inhibitrices.

Des séries d'expériences sont effectuées sur ces extraits de culture (EC) afin de connaître la nature de l'agent responsable de l'inhibition. Pour cela, nous avons recherché la nature physico-chimique (sensibilité à la chaleur, au froid, aux détergents : Tween 20, Tween 80 et SDS et aux valeurs de pH), La sensibilité aux protéases et le mode d'action de l'agent antibactérien ont été également recherché.

Antagonisme par la production d'acide :

Pour éliminer la possibilité de l'inhibition due à la production d'éventuels acides (essentiellement les acides organiques), les extraits de cultures (EC) ont été ajustés (neutralisés) à pH =7 à l'aide de NaOH 3N (Daba *et al.*, 1993 ; Bahri, 1997 ; Kacem *et al.*, 2009).

Effet du pH :

Des extraits de cultures (EC) obtenus de souches inhibitrices ont été répartis en volumes de 300µl dans des tubes Eppendorfs stériles. Chaque volume était ajusté avec du NaOH (3N) ou du HCl (1N) aux valeurs de pH suivantes : 2, 6, 7, 8, 9 et 10 (Daba *et al.*, 1993 ; Saadi, 2009).

Effet de la température :

Chaque volume d'extrait de culture (300µl) était traité pendant 30 minutes à 0°C, +4°C, 50°C, 80°C et 100°C puis incubé pendant 24 heures à 28°C pour les *Rhizobium* et à 30°C pour les *Pseudomonas* (Daba *et al.*, 1993 ; Saadi, 2009).

Effet des détergents :

Un volume de 50 µl d'une solution de SDS (0,1%, 0,5% et 1%), Tween 20 ou Tween 80 a été additionné à un volume de 100µl d'extrait de culture. Après homogénéisation, les préparations étaient ensuite incubées pendant 4 heures à 28°C pour les *Rhizobium* et à 30°C pour les *Pseudomonas* (Daba *et al.*, 1993 ; Saadi, 2009).

Effet des enzymes protéolytiques :

Un volume de 0,5 ml des différentes fractions a été mélangé avec 50 µl d'enzyme (α -chymotrypsine, trypsine, protéinase K et Pronase E) à une concentration de 1 mg / ml. Toutes ces solutions enzymatiques sont préparées dans un tampon phosphate Na / Na₂ 0,1M, pH =7. Le mélange (enzyme / fraction) était incubé pendant 2 heures à 37°C. Après incubation les solutions ont été chauffées pendant 1 minute à 100°C pour stopper la réaction enzymatique. La sensibilité d'une substance antibactérienne à une enzyme donnée a été appréciée en déterminant l'activité résiduelle par mesure du diamètre de la zone d'inhibition (Gabed, 2006).

Mode d'action de l'agent antibactérien :

L'effet bactéricide ou bactériostatique de l'agent antibactérien sur les bactéries sensibles a été déterminé par la méthode de Toba *et al.* (1991) : des petits fragments de gélose étaient prélevés stérilement, à l'aide d'une anse, au niveau des zones d'inhibitions (la surface de gélose molle ou on observe aucune croissance bactérienne). Ces fragments ont été ensuite ensemencés en stries à la surface d'un milieu solide puis incubés à 30°C pour les *Pseudomonas* ou à 28°C pour les *Rhizobium* pendant 48 heures. La croissance (apparition des colonies) ou la non croissance bactérienne fait la différence entre activité bactériostatique et bactéricide de la substance testée.

3.2.4.2.5. Recherche de l'ADN chromosomique et extra-chromosomique (plasmide)

Diverses techniques d'extraction et d'analyse de l'ADN permettant de repérer les plasmides, d'estimer leur taille et d'en faire l'inventaire chez une souche.

L'extraction d'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules.
- Elimination des protéines.
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN...).
- Précipitation de l'ADN par l'alcool.

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

Dans notre cas, nous avons modifié la méthode décrite par Anderson et McKay (1983). Elle comprend une étape de dénaturation de l'ADN en milieu alcalin qui permet d'éliminer plus de 2/3 de l'ADN chromosomique sans diminuer le rendement en ADN plasmidique.

Les solutions utilisées ont été stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes à l'exception de la solution de SDS et les préparations d'enzymes. Après l'extraction d'ADN un marqueur de taille (ADN phage λ digéré avec l'enzyme de restriction Hind III) a été utilisé pour l'estimation du poids moléculaire de plasmides (voir annexe 3).

- ***Préparation des protoplastes :***

Les cultures étaient réalisées dans 10 ml du bouillon nutritif. Après 24 heures d'incubation à 30°C les cellules étaient récoltées par centrifugation (12000 rpm, pendant 10 minutes) et lavées avec l'eau distillée stérile puis remises en suspension dans 50 µl de TE (Tris : 50mM, EDTA : 10 mM, pH= 8). Après élimination du TE par centrifugation (12000 rpm, pendant 10 minutes), les culots étaient placés à 0°C pendant au moins une nuit. Après décongélation, les cellules étaient resuspendues dans 300µl de TEG (Tris : 50mM, EDTA : 10 mM, Glucose : 50mM pH =8). On y ajoutait 50 µl d'une solution extemporanément préparée de lysozyme (préparation 2 mg / ml d'eau distillée stérile). Cette étape de fragilisation des cellules dure de 5 à 15 minutes à 37°C.

- ***Lyse cellulaire :***

Après incubation, 48 µl de TE et 27 µl de solution de lyse (50mM Tris - HCl, 5mM, EDTA, 50 Mm Glucose, 3 % SDS, pH 12,4 avec NaOH 10N) ont été ajoutés à la suspension cellulaire. La lyse cellulaire était obtenue après une incubation de 15 minutes à 37°C. Après 30 secondes d'agitation vigoureuse, 27 µl de NaOH (3N) sont ajoutés. Les tubes sont agités puis placés dans la glace pendant 10 minutes. La suspension s'éclaircit et prend parfois une couleur jaunâtre. Le lysat était ensuite neutralisé par addition de 49 µl de Tris -HCL 2M, pH=7 puis lentement agité pendant environ 3 minutes. 72 µl de NaCl, 5M sont ajoutés alors.

- ***Purification des acides nucléiques :***

Le volume de l'échantillon a été estimé à l'aide d'une micropipette (en général 700 µl) puis on lui ajoute un volume égale de phénol saturé en TE. Après agitation le mélange est centrifugé (12000 rpm, pendant 10 minutes) et le surnageant (phase aqueuse supérieure) est récupéré dans un tube Eppendorf, puis mélangé à un volume égal (700 µl) d'un mélange phénol / chloroforme 1:1 (v/v).

Après une nouvelle centrifugation (12000 rpm, pendant 10 minutes) on obtient une phase aqueuse, de volume V, déprotéinisée et contenant l'ADN. On lui ajoutait 0,1 V d'une solution d'acétate de sodium 3M, pH= 5,2 et 2,5 V d'éthanol absolu froid. Les acides nucléiques précipitent à froid après 15 minutes à -70°C ou 2 heures à -20°C. Les acides nucléiques ainsi précipités étaient récoltés par centrifugation (12000 rpm, pendant 10 minutes). Dans certains cas, pour se débarrasser des sels résiduels, le culot d'ADN était lavé deux fois avec l'éthanol 70 % puis séché sous vide. Il est ensuite dissout dans 20 à 40 µl de TE.

Les ADN obtenus par cette méthode d'extraction contiennent souvent des ARN. Ces derniers étaient éliminés en incubant les échantillons pendant 1 heure à 37 °C en présence de 1 µl d'ARN ase : 51 mg/ml).

- ***Séparation des ADN par électrophorèse :***

Par électrophorèse sur gel d'agarose, on peut analyser et estimer la présence et la taille des acides nucléiques contenus dans la préparation. L'ADN étant une molécule chargée négativement en solution aqueuse, il migre dans un champ électrique vers le pôle positif ou anode.

La vitesse de migration d'une molécule est proportionnelle à l'inverse du logarithme de son poids moléculaire. Des fragments d'ADN peuvent donc être séparés selon leur taille dans un gel d'agarose. La réticulation du gel peut être ajustée selon la taille des fragments à analyser (gel d'agarose à 0,6 % pour la séparation de gros fragments et à 1,5 % pour la séparation de petits fragments). 20 µl de solution d'ADN, additionnés de 10 µl de Bleu de bromophénol ont été soumis à électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %, pendant 2 à 16 heures à voltage constant de 80 volts. Le tampon de migration (0,09 M Tris - HCl, 2,8 mM, E.D.T.A, 0,09M et acide borique, pH =8) contient du bromure d'éthidium à raison de 5µg, afin de pouvoir visualiser l'ADN sous lumière ultraviolette.

3.2.5. Test d'infection des plantules d'oliviers par les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* :

Afin de vérifier si nos souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* sont vraiment phytopathogènes, nous avons réalisé une expérience depuis fin Mars 2010 sur six plantules d'olivier de la variété Chemlel âgées d'un an obtenues de la pipinière de Bir El Djir, Oran). Nous avons réalisé l'expérience dans six pots. Un pot est rempli avec du sol stérile et quatre pots sont remplis avec du sol non stérile (chaque pots est inoculé par une de ces souches : *Rhizobium* RNU9, *P. fluorescens* PN5, *Aspergillus niger* AS4 et *Penicillium citrinium* PS12). Chaque plantule a été plantée dans un pot puis blessée, à l'aide d'un couteau, au niveau des tiges. Une plantule sans blessure a servi comme témoin (sans aucune infection). Après blessure les plantules ont été infectées par une souche de *P. syringae* pv. *savastanoi* PN1 que nous avons isolé et identifié comme le montre la figure 15. Les plants ont été ensuite placés dans des conditions naturelles.

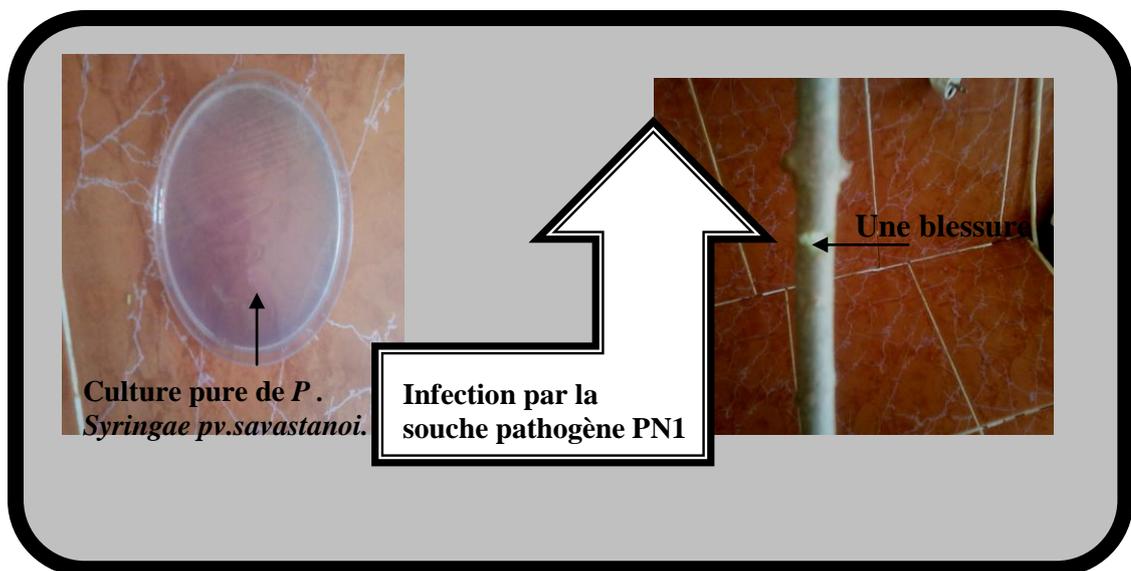


Figure 15
Test d'infection des plantules d'oliviers par les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi*.

3.2.6. Conservation des souches isolées :

Après purification des souches à partir d'une colonie bien isolée sur milieu solide, les souches (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. syringae* pv. *savastanoi*) sont désigné par un code : PS ou PN. **P** (*Pseudomonas*) et **S** (Sol) ou **N** (Nécrose) suivi d'un numéro d'ordre d'isolement comme par exemple PS25 ou PN5. Les cultures purifiées sont transférées dans des micro-tubes d'Eppendorf stérile, de 1,5 ml contenant du glycérol à 40 %. La conservation des souches est faite au congélateur à une température de -20°C.

4- RESULTATS & DISCUSSION

4.1. Identification des isolats

4.1.1. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats

Dans ce travail nous avons examiné 40 échantillons de sol rhizosphérique et 30 échantillons de nécroses (galles). Les différents échantillons sont étalés sur les milieux de cultures puis incubés à l'étuve. L'observation macroscopique était réalisée après 24 heures d'incubation à 30°C.

Les ensemencement de sol et de galles sur les différents milieux (King A, King B, la gélose cétrimide, la gélose nutritive, la gélose de pourpre de bromocrésol et la gélose Héктоéne), ont permis d'observer des colonies bactériennes présentant les caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas* citées dans la littérature (Botelho & Leda, 2006): des colonies blanchâtres, crémeuses, bombées sur gélose nutritive et bleuâtres sous forme d'œuf sur plat sur la gélose Héктоéne comme indique la figure 16. Par contre, la figure 17 montres des colonies bleuâtres bombées qui caractérisent les bactéries lactose négatif sur la gélose de BCP. Ces colonies présentent un contour régulier ou irrégulier avec un diamètre de 0,5 à 1,0 µm sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur selon le milieu de culture. Nous avons aussi noté la présence de pigments fluorescents (la pyoverdine, la pyocyanine et la pyorubine) sur les milieux de King (A et B) et la gélose cétrimide. Un exemple de résultat est montré dans la figure 18 (A et B) où on peut constater nettement la production de la pyocyanine en milieu King A et la production de la pyoverdine en milieu King B, ceci indique que les isolats n'appartiennent pas à la même espèce (Botelho & Leda, 2006).

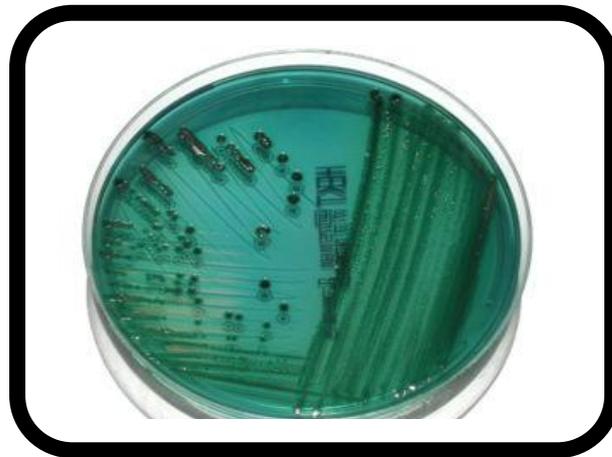


Figure 16
Aspect des colonies de Pseudomonas sur la gélose Héктоéne.

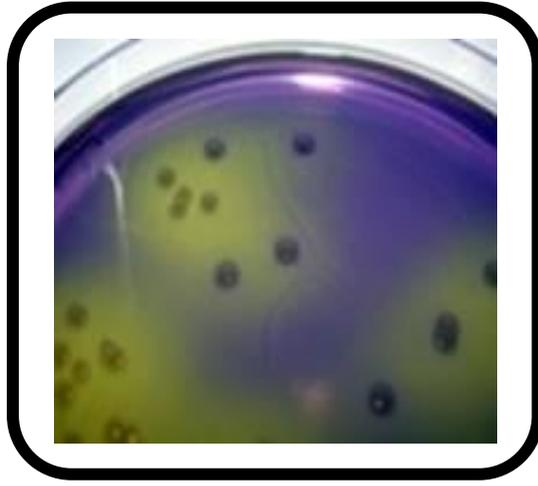
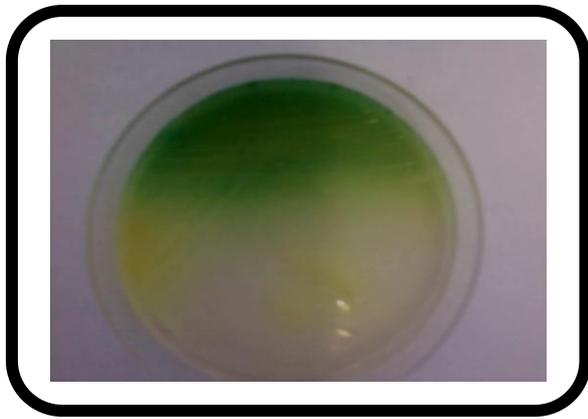
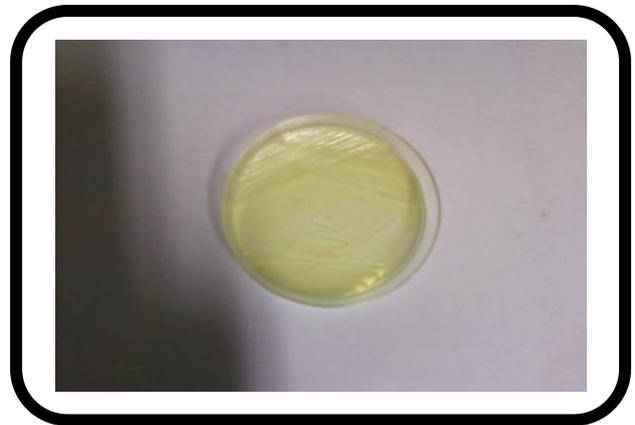


Figure 17
*Aspect des colonies de Pseudomonas (lactose -) sur la gélose BCP
(Pourpre de bromocrésol).*



(A)



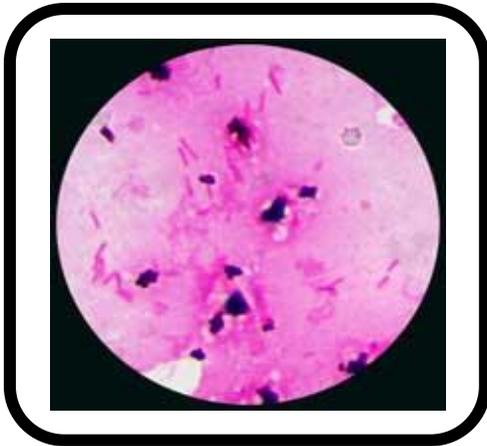
(B)

Figure 18
*Production de la pyocyanine sur le milieu King A (A) et la pyoverdine
sur le milieu King B (B).*

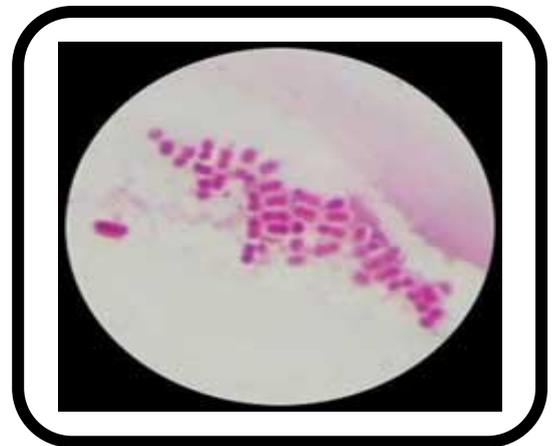
4- RESULTATS & DISCUSSION

L'examen microscopique des isolats (après coloration de Gram) a montré que tous les isolats sont des bacilles à Gram⁻ fins droits comme indiqués dans la figure 19. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles, dépourvus de spores et de capsules, mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (après coloration de Rhodes et culture sur milieu Mannitol-Mobilité) comme indique-la figure 20.

Nous avons donc confirmé les caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas* citées dans la littérature (Philippe, 2007).



(A)



(B)

Figure 19

Forme et mode de regroupement de l'isolat PNI (A) et l'isolat PS3 (B) après coloration de Gram (G : 16x100).



(A)



(B)

Figure 20

Aspect du milieu Mannitol-Mobilité avant (A) et après incubation (B) (Mise en évidence de la mobilité des *Pseudomonas*).

Au total, nous avons obtenu 40 isolats possédant les caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas*, soit 26 isolats à partir du sol et 14 à partir de nécroses d'oliviers. Ces isolats sont désignés :

PS1, PS3, PS4, PS5, PS7, PS9, PS10, PS12, PS14, PS15, PS16, PS18, PS20, PS22, PS23, PS24, PS25, PS27, PS29, PS30, PS31, PS33, PS35, PS36, PS38, PS40, PN1, PN2, PN3, PN4, PN5, PN6, PN9, PN12, PN18, PN20, PN22, PN24, PN25 et PN30.

4- RESULTATS & DISCUSSION

La suite de notre travail a été consacrée à l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats.

4.1.2. Caractéristiques physiologiques des isolats

Les 40 isolats ont été caractérisés par les trois tests physiologiques classiques suivants :

- Croissance en présence du sel (NaCl).
- Croissance à différentes valeurs de pH.
- Croissance à différentes températures.

Croissance en présence du NaCl :

Après culture des isolats sur des bouillons nutritives ajustés à différentes concentrations de NaCl (0.5%, 1%, 2%, 3%, 5% et 10%) nous avons obtenu les résultats indiqués dans le tableau 6.

Tableau 6. Effet du NaCl sur la croissance es isolats testées.

Concentration d'NaCl Isolats	0,5%	1%	2%	3%	5%	10%
PS1	+	++	++	+++	+	-
PS3	+	++	++	+++	+	-
PS4	+	++	++	+++	+	-
PS5	+	++	++	+++	+	-
PS7	+	++	++	+++	+	-
PS9	+	++	++	+++	+	-
PS10	+	++	++	++++	+	-
PS12	+	++	++	+++	+	-
PS14	+	++	++	+++	+	-
PS15	+	++	++	+++	+	-
PS16	+	++	++	+++	+	-
PS18	+	+++	++	+++	+	-
PS20	+	++	++	+++	+	-
PS22	+	++	++	+++	+	-
PS23	+	++	+++	+++	+	-
PS24	+	++	+	+++	+	-

Suite du tableau 6

Concentration d'NaCl Isolats	0,5%	1%	2%	3%	5%	10%
PS25	+	++	+++	+++	+	-
PS27	+	++	+	+++	+	-
PS29	+	++	+++	+++	+	-
PS30	+	++	+++	+++	+	-
PS31	+	++	++	+++	+	-
PS33	+	++	++	+++	+	-
PS35	+	++	+	+++	+	-
PS36	+	++	++	+++	+	-
PS38	+	+	++	+++	+	-
PS40	+	++	++	+++	+	-
PN1	+	+	++	+++	+	-
PN2	+	+	++	+++	+	-
PN3	+	+	++	+++	+	-
PN4	+	+	++	+++	+	-
PN5	+	+	++	+++	+	-
PN6	+	+	+	+++	+	-
PN9	+	+	++	+++	+	-
PN12	+	+	+	+++	+	-
PN18	+	+	++	+++	+	-
PN20	+	+	++	+++	+	-
PN22	+	+	+	+++	+	-
PN24	+	+	++	+++	+	-
PN25	+	+	++	+++	+	-
PN30	+	+	++	+++	+	-

(+) : De 1 à 10 colonies par boîte.

(++) : De 10 à 40 colonies par boîte.

(+++): Plus que 40 colonies par boîte.

(-) : Absence de culture bactérienne.

Les résultats obtenus montrent que jusqu'à 5% de NaCl, la croissance des bactéries n'est pas affectée comme le montrent le tableau 6. A une concentration de 10% aucune croissance n'est observée (pour les 40 souches). Globalement, ces résultats montrent une variabilité relative de tolérance vis-à-vis de la salinité chez les isolats étudiés. En général, les effets du NaCl semblent être un bon indicateur de la réponse des *Pseudomonas* aux conditions de salinité variable (Zahran *et al.*, 1994 & Tilak *et al.*, 2005).

Croissance à différentes valeurs de pH:

Après culture des isolats sur des bouillons nutritifs ajustés à des différents pH (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9 et 10), nous avons obtenu les résultats indiqués dans le tableau 7.

Tableau 7. Effet du pH sur la croissance des isolats testés.

Valeurs de pH Isolats	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	9	10
PS1	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS3	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS4	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS5	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS7	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS9	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS10	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS12	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS14	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS15	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS16	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS18	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS20	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS22	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS23	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS24	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+
PS25	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS27	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS29	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS30	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS31	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS33	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS35	+	+		++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS36	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PS38	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	-
PS40	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN1	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN2	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN3	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN4	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN5	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN6	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN9	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN12	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN18	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	-
PN20	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN22	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN24	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN25	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+
PN30	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+

(+) : De 1 à 10 colonies par boîte.

(++) : De 10 à 40 colonies par boîte.

(+++): Plus que 40 colonies par boîte.

(-) : Absence de culture bactérienne.

Les 40 isolats sont capables de pousser entre un pH 4 et un pH 10 avec un optimum de croissance de toutes les souches testées se situant entre pH 6.5 et 7.5 comme indiquée dans les courbes illustrées dans la figure 21. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Keyser & Munns (1979) et Appunu & Dhar (2006) qui ont détecté la croissance des souches

4- RESULTATS & DISCUSSION

de *Pseudomonas* a des valeurs de pH entre 4.5 et 6.3. Les mêmes résultats sont obtenus par Ali *et al.* (2009).

On sait que l'acidité du sol limite la fixation symbiotique de l'azote par limitation de la survie du *Pseudomonas* dans les sols (Appunu & Dhar, 2006). Mais, sur le plan biochimique et physiologique il y a encore peu d'informations sur la tolérance à l'acidité des souches de *Pseudomonas* (Correa & Barneix, 1997). Les *Pseudomonas* adoptent des mécanismes différents pour survivre dans les conditions acides du sol (Zahran *et al.*, 1994).

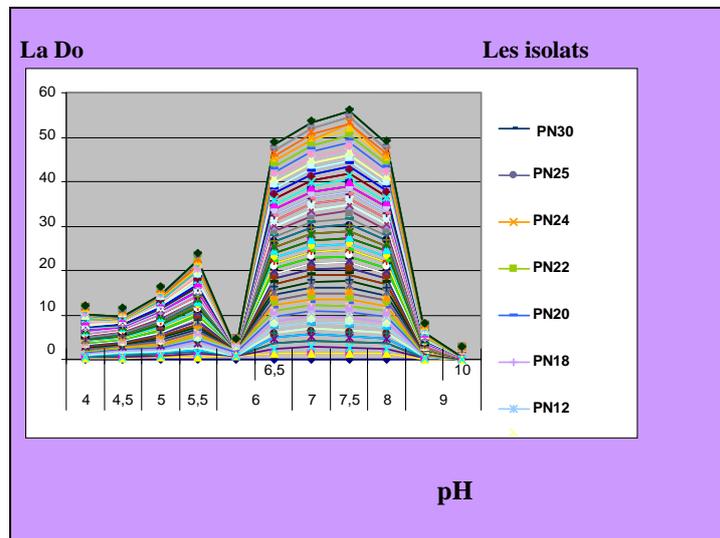


Figure 21
Effet du pH sur la croissance des 40 isolats testés.

Croissance à différentes températures :

Après culture des isolats sur les milieux King A ou B et après incubation à différentes températures : 4°C, 20°C, 28°C, 30°C, 37°C, 40°C et 50°C, nous avons constaté que parmi les 40 isolats testés, 25 isolats ont poussé à 4°C et 20 d'autres ont poussé à 40°C. Les résultats sont regroupés dans le tableau 8.

Les 40 isolats ont la capacité de croître dans une gamme de température située entre 20-37°C. D'autres supportant une large gamme de température : entre 4 à 50°C. D'autres sont psychrophiles se reproduisent à basse température (à partir de +4°C).

4- RESULTATS & DISCUSSION

Tableau 8. Effet des températures sur la croissance des 40 isolats testés.

Températures Isolats	4°C	20°C	28°C	30°C	37°C	40°C	50°C
PS1	+	+	+	++	+	-	+
PS3	+	+	+	++	+	-	+
PS4	+	+	+	++	+	-	+
PS5	+	+	+	++	+	-	+
PS7	-	+	+	++	+	+	+
PS9	+	+	+	++	+	-	+
PS10	+	+	+	++	+	-	+
PS12	+	+	+	++	+	-	+
PS14	+	+	+	++	+	-	+
PS15	+	+	+	++	+	-	+
PS16	+	+	+	++	+	-	+
PS18	-	+	+	++	+	+	+
PS20	-	+	+	++	+	+	+
PS22	-	+	+	++	+	+	+
PS23	+	+	+	++	+	-	+
PS24	-	+	+	++	+	+	+
PS25	+	+	+	++	+	-	+
PS27	+	+	+	++	+	-	+
PS29	+	+	+	++	+	-	+
PS30	+	+	+	++	+	-	+
PS31	+	+	+	++	+	-	+
PS33	+	+	+	++	+	-	+
PS35	+	+	+	++	+	-	+
PS36	-	+	+	++	+	+	+
PS38	+	+	+	+++	+	-	+
PS40	+	+	+	++	+	-	-
PN1	+	+	+	++	+	+	-
PN2	+	+	+	++	+	+	-
PN3	+	+	+	++	+	+	-
PN4	+	+	+	++	+	+	-
PN5	-	+	+	++	+	+	-
PN6	-	+	+	++	+	+	-
PN9	+	+	+	++	+	+	-
PN12	-	+	+	++	+	+	-
PN18	-	+	+	++	+	+	-
PN20	-	+	+	++	+	+	-
PN22	-	+	+	++	+	+	-
PN24	-	+	+	++	+	+	-
PN25	-	+	+	++	+	+	-
PN30	-	+	+	++	+	+	-

(+) : De 1 à 10 colonies par boîte.

(++) : De 10 à 40 colonies par boîte.

(+++): Plus que 40 colonies par boîte.

(-) : Absence de culture bactérienne.

Les 40 isolats peuvent être regroupés en trois catégories représentées dans le tableau 9.

Tableau 9. Regroupement des isolats selon leurs températures de croissance.

Température de croissance Isolats	4 °C	40 °C
PN1, PN2, PN3, PN4 et PN9.	+	+
PS7, PS8, PS20, PS22, PS24, PS36, PN5, PN6, PN12, PN18, PN20, PN22, PN24, PN25 et PN30.	-	+
PS1, PS3, PS4, PS5, PS9, PS10, PS12, PS14, PS15, PS16, PS23, PS25, PS27, PS29, PS30, PS31, PS33, PS35, PS38 et PS40.	+	-

(-) : Absence de croissance.

(+) : Présence de croissance.

4.1.3. Caractéristique biochimiques des isolats

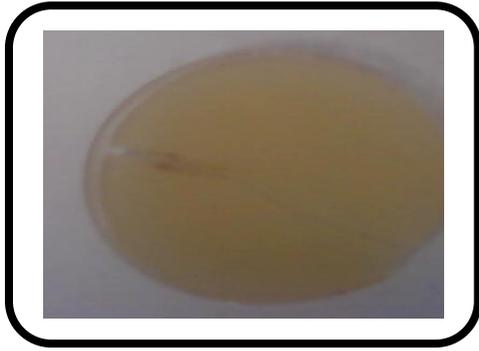
Les résultats obtenus sont comme suit :

4.1.3.1. Pour le test de LOPAT :

Ce test permet la mise en évidence de la polymérisation du fructose en polyfructose par la bactérie (test Levane), la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire (réaction d'oxydase), la capacité des bactéries à dégrader la pectine présente dans le milieu Pectinase et Pectine Hildebrand (test pectinase), la présence ou l'absence d'enzyme arginine déshydrolyase (ADH) et la mise en évidence du pouvoir pathogène des *Pseudomonas* sur les feuilles du tabac (test d'hypersensibilité sur Tabac).

Test levane :

Sur les 40 isolats, 20 ont présenté le caractère de polymérisation du fructose en polyfructose sur le milieu Levane et cela par la présence des zones opaques et vertes en marge de la strie. Un exemple de résultat est montré dans figure 22.



(A)



(B)

Figure 22

Aspect du milieu levane avant (A) et après polymérisation du fructose en poly fructose (B).

Réaction d'oxydase :

Parmi les 40 isolats testés pour la réaction d'oxydase, 35 isolats possèdent l'enzyme oxydase intracellulaire alors que cinq isolats présentent une oxydase variable et cela après l'apparition d'une coloration violacée sur le papier filtre. Un exemple de résultat est montré dans figure 23.



(A)



(B)

Figure 23

Mise en évidence de l'enzyme oxydase sur papier filtre.

(A) : Papier filtre avant la réaction.

(B) : Papier filtre après l'addition du réactif sur la colonie.

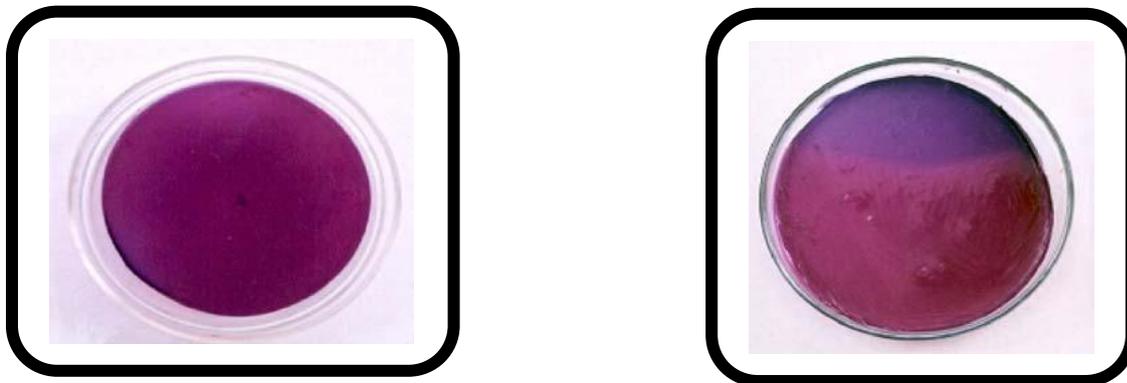
Test pectinase :

Un total de 25 isolats a montré la capacité à dégrader la pectine incorporée dans le milieu pectinase car après l'addition d'acétate de cuivre un halo se forme autour du point d'inoculation comme indique la figure 24. Pour ces 25 souches, sur milieu PH (Pectine Hildebrand), on observe une dépression entourant le point d'inoculation (figure 25).



Figure 24

Mise en évidence de l'activité pectinolytique sur le milieu pectinase.



Temoin

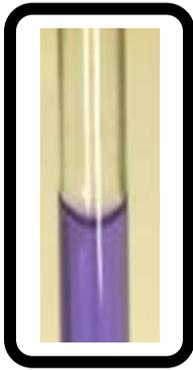
Souche

Figure 25

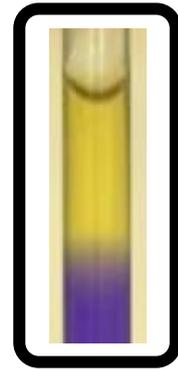
Confirmation de l'activité pectinolytique sur le milieu différentiel PH (Pectine Hildebrand).

Test d'arginine déshydrolase (ADH) :

Après incubation des isolats cultivés sur milieu Möeller, 05 isolats parmi les 40 testés ont viré la couleur du pourpre vers le jaune (figure 26), et donc sont incapable de transformer l'arginine, ce qui indique l'absence de l'enzyme arginine déshydrolase chez ces isolats.



(A)



(B)

Figure 26
Aspect du milieu Möeller avant (A) et après incubation (B).

Test d'hypersensibilité sur tabac (*Nicotiana tabacum*):

Le pouvoir pathogène des isolats a été mis en évidence chez 5 isolats car le tissu de la zone foliaire du tabac inoculée avec ces isolats est devenu légèrement translucide avec un aspect humide et par la suite, nous avons observé une coloration brun clair à beige des tissus comme indiquée dans la figure 27 (B).



(A)



(B)

Figure 27
Aspect de la feuille du Tabac avant (A) et après l'infection (B).

En résumé, le test LOPAT effectué sur les 40 isolats a permis de classer les isolats dans trois espèces différentes ceci en comparant nos résultats avec ceux décrits par Young & Triggs (1994) (caractéristiques des espèces du genre *Pseudomonas* indiquée dans le tableau 10).

Tableau 10. Fiche d'identification des Pseudomonas du groupe fluorescent selon Young & Triggs (1994).

Tests Espèces	Levane	Oxydase	Pectinase	Arginine déshydrolase	Hypersensibilité sur tabac	Fluorescence
<i>P. syringae</i>	+	-	+	-/+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	+	-	+
<i>P. fluorescens</i>	+	+	-	+	-	+

(+) : Réaction positive.

(-) : Réaction négative.

(-/+) : Réaction variable selon les isolats.

Nous avons donc réparti nos isolats comme suit :

Cinq (5) souches de *P. syringae* codées : PN1, PN2, PN3, PN4 et PN9. Ces isolats ont la capacité de polymériser le fructose en polyfructose sur le milieu Levane, ne possèdent pas une enzyme oxydase intracellulaire et parfois même l'enzymes arginine déshydrolase (ADH), capable de dégrader la pectine présente dans les milieux de culture (Péctinase et Péctine Hilderbrand) et leurs pouvoir pathogène sur les feuilles du tabac est positive.

Vingt (20) souches de *P. aeruginosa* codées : PS1, PS3, PS4, PS5, PS9, PS10, PS12, PS14, PS15, PS16, PS23, PS25, PS27, PS29, PS30, PS31, PS33, PS35, PS38 et PS40. Ces isolats sont incapables de polymériser le fructose en polyfructose sur le milieu Levane, possèdent une enzyme oxydase intracellulaire et une enzyme arginine déshydrolase (ADH), capable de dégrader la pectine présente dans les milieux de culture (Péctinase et Péctine Hilderbrand), et leurs pouvoir pathogène sur les feuilles du tabac est négatif.

Vingt (15) souches de *P. fluorescens* codées : PS7, PS8, PS20, PS22, PS24, PS36, PN5, PN6, PN12, PN18, PN20, PN22, PN24, PN25 et PN30, Ces isolats ont la capacité de polymériser le fructose en polyfructose, possèdent une enzyme oxydase intracellulaire et l'enzymes arginine déshydrolase (ADH), incapable de dégrader la pectine présente dans les milieux de culture (Péctinase et Péctine Hilderbrand) et leurs pouvoir pathogène sur les feuilles du tabac est négatif.

4.1.4. Identification de la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*

Par la suite et dans le but de rechercher la sous espèce *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* responsable de la maladie des nœuds des oliviers, les 5 souches de *P. syringae* (PN1, PN2, PN3, PN4 et PN9) ont été identifiées par d'autres tests biochimiques qui sont les suivants:

- la voie de production des acides organiques par le test du rouge de méthyle (RM) ;
- Le test OF (Oxydation/ Fermentation) sur le milieu MEVAG ;
- la présence d'enzyme coagulase par le test de la coagulation du lait ;
- la capacité des souches à survivre pendant dix jours dans des milieux contenant des pourcentages (%) différents du sodium et 5% de saccharose ;
- l'hydrolyse du Tween 80 (test estérase) ;
- la présence d'enzyme catalase (test catalase) ;
- les réactions alcalines sur le lait tournesolé ;

Tous les résultats de ces tests sont regroupés dans le tableau 11 :

Tableau 11. Tests biochimiques pour l'identification de la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*.

Test	Résultats	Conclusion
Test du rouge de méthyle (RM).	Le milieu reste le même (même couleur).	Bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO ₂ par la voie butane-diolique.
Test OF (Oxydation/Fermentation).	Couleur jaune du milieu MEVAG dans le tube incubée en aérobiose (Figure 28).	les bactéries dégradent le glucose par voie oxydatives.
Coagulation du lait.	Le milieu reste le même (pas de coagulation du lait).	Absence d'enzyme coagulase.
la capacité des souches de <i>P. syringae</i> à survivre pendant dix jours dans des milieux contenant des pourcentages différents du sodium (0,1%, 1%, 5% et 10%) et 5% de saccharose	Présence des cultures bactériennes sur toutes les milieux (Figure 29).	la capacité des souches de <i>P. syringae</i> à survivre pendant dix jours dans des milieux contenant des pourcentages différents du sodium (0,1%, 1%, 5% et 10%) et 5% de saccharose.
Hydrolyse du Tween 80.	Présence d'un précipité autour de la culture bactérienne (Figure 30).	Présence d'enzyme estérase.

La suite du tableau 11.

Test	Résultats	Conclusion
Test de la catalase.	Apparition des bulles d'air (Figure 31).	Présence d'enzyme catalase.
Réactions alcalines sur le lait tournesolé.	Des réactions alcalines ont été observées chez toutes les souches : Le bleu, La coagulation alcaline et la compensation du milieu.	Le bleu indique que le lait a changé de couleur en raison de la rupture de la lactalbumine, due aux enzymes protéolytiques, aboutissant à la formation d'ammoniac et d'amines de base. La coagulation alcaline est causée par la conversion de la caséine à la paracaséine. La compensation du milieu est causée par peptonisation en raison de la digestion de la caséine (Figure 32).



(A)



(B)

Figure 28

Aspect du milieu MEVAG (incubée en aérobiose) avant (A) et après incubation (B).



Figure 29

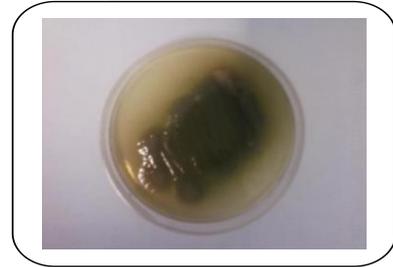


Figure 30

Culture bactérienne après 10 jours de culture Sur des milieux contenant des pourcentages (%) différents du sodium et 5% de saccharose. Mise en évidence de l'enzyme estérase.



Figure 31

Mise en évidence de l'enzyme catalase.



Figure 33

Réactions alcalines des isolats sur le lait tournesolé.

4.1.5. Confirmations de l'identification des isolats par les tests Api.

Rappelons que des galeries Api 20NE, Api 20 E, Api NH, Api 20 Strep, Api 20A et Api AUX A COLORTM 2 ont été utilisées pour l'identification des souches.

Les galeries Api 20NE ont été utilisées pour l'identification des *Pseudomonas* sp. Alors que les galeries Api 20 E, Api NH, Api 20 Strep, Api 20A et Api AUX A COLORTM2 ont été utilisées pour la réalisation de certains tests biochimiques a fin d'identifier la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*.

▪ Résultats relatifs à l'Api 20NE :

Après incubation de la galerie, nous avons ajouté 2 gouttes d'acide sulfanilique (0,8%) (NIT1) et 2 gouttes de NN- diméthyle - naphthylamine (0,05 %) (NIT2) puis la poudre de Zinc (10 minutes) sur la cupule NO₃ et 2 gouttes du réactif Kovax sur la cupule TRP (voir annexe 2).

La lecture de la galerie est faite en se référant au tableau de lecture 12.

Nous avons noté que les isolats présentent les caractères suivants :

- la présence de l'enzyme nitrate réductase varie selon les souches ;
- la production d'indole à partir du tryptophane est absente chez les 40 isolats testés ;
- la dégradation de l'urée par l'enzyme uréase varie selon les souches ;
- les réactions de désamination ou de décarboxylation des acides aminés varient selon les souches ;
- l'hydrolyse de la gélatine et l'esculine varie selon les souches ;
- l'utilisation des divers sucres (Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, N- acetyl – glucosamine, Maltose, Gluconate, Caprate, Adipate, Malate, Citrate et le phenyl – acétate avec production d'acides de fermentation et parfois de gaz) varie selon les souches.

Les 20 codes d'identifications des souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont :

0054575(PS1), 1354475(PS3),1150175(PS4), 1354575(PS5), 1344475(PS9), 1150565(PS10), 1354455(PS12),1344575(PS14),1150475(PS15),1354175(PS16),1144475(PS23),1244575(PS 25), 1174575(PS27), 1150535 (PS29), 1350475(PS30), 1144555 (PS31), 1154075 (PS33), 1150555 (PS35), 1150575 (PS38) et 1174475(PS40).

Les 15 codes d'identifications des souches de *Pseudomonas fluorescens* sont :

0047457(PS7), 1157455 (PS8), 134 456 1(PS20), 1157557(PS22), 1147555(PS24), 1143557 (PS36), 1147557(PN5), 1143 555 (PN6), 1147575(PN12) 1153555 (PN18), 1156455, (PN20), 1156555(PN22), 1157575(PN24) 1157455(PN25) et 1157555 (PN30),

Les 05 codes d'identifications des souches de *Pseudomonas syringae* sont :

2206046(PN1), 2200006(PN2), 2203004(PN3), 52200040(PN4) et 1510146 (PN9).

La figure 33 montre l'identification des trois espèces de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. syringae* après tests des galeries Api 20 NE.

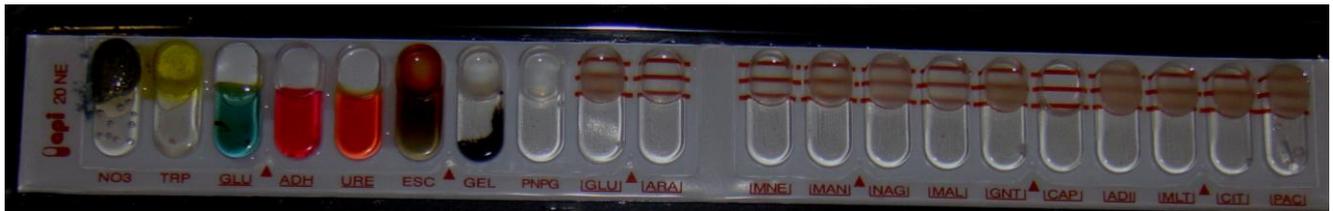
4- RESULTATS & DISCUSSION

Tableau 12. Tableau de lecture de la galerie Api 20 NE (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France).

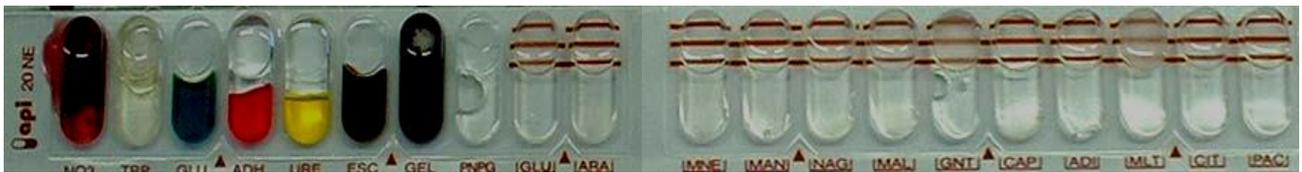
Tests	Substrats	Réactions / Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1+NIT	2/5 min
		Réduction des nitrates en azote	Incolore	Rose – rouge
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	Rose.	Incolore
			Kovax	Immédiate
			Incolore. Vert pâle / jaune.	Rose
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dishydrolase	Jaune	Orange / rose / rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange / rose / rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse (β - glucosidase)	Jaune	Gris / marron / noir
GEL	Gelatine	Hydrolyse (protease)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophényl- β -D-galactopyranoside	β - galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose	Assimilation	Transparence	Trouble
MNE	Mannose	Assimilation	Transparence	Trouble
MAN	Mannitol	Assimilation	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl- glucosamine	Assimilation	Transparence	Trouble
MAL	Maltose	Assimilation	Transparence	Trouble
GNT	Gluconate	Assimilation	Transparence	Trouble
CAP	Caprate	Assimilation	Transparence	Trouble
ADI	Adipate	Assimilation	Transparence	Trouble
MLT	Malate	Assimilation	Transparence	Trouble
CIT	Citrate	Assimilation	Transparence	Trouble
PAC	Phenyl- acetate	Assimilation	Transparence	Trouble



(A)



(B)



(C)

Figure 33
**Galerie Api 20 NE des trois espèces : *P. aeruginosa* (A),
P. fluorescens (B) et *P. syringae* (C).**

(A) : Le code d'identification de la souche *P. aeruginosa* PS3 : 135 4475.

(B) : Le code d'identification de la souche *P. fluorescens* PS20: 134 456 1.

(C) : Le code d'identification de la souche *P. syringae* PN9 : 151 014 0.

Le tableau 13 résume les caractéristiques distinctives entre les espèces de *Pseudomonas* isolées à partir du sol et des gales d'oliviers collectés dans deux régions de l'ouest Algérien : d'Ain Temouchent et de Sig.

Tableau 13. Caractéristiques distinctives entre les espèces de *Pseudomonas*.

Caractères	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. syringae</i>
Réaction d'oxydase	+	+	-
Réspiration des nitrates	+	V	V
Croissance à 4 °C	-	+	+
Croissance à 40 °C	+	-	+
Production de la pyocyanine	+	-	-
Production de la pyoverdine	+	+	+
Arginine déshydrolase	+	+	V
Hydrolyse de l'esculine	-	-	+
Gélatinase	V	+	+
Levane	-	+	+
Péctinase	+	-	V
Hypersensibilité sur tabac	+	-	+

(V): *Réaction variable.*

- **Résultats relatifs aux Api 20^E, Api NH, Api 20 Strep, Api 20A et Api AUX A COLORTM 2:**

Après incubation, la lecture des galeries Api 20 E, Api NH, AUX A COLORTM 2, Api 20A et Api 20 Strep est faite en se référant aux tableaux de lecture désignés pour chaque galerie (tableaux : 14, 15, 16,17 et 18).

L'aspect de ces cinq galeries est indiqué dans la figure 34.

Les résultats des tests biochimiques des cinq souches de *P. syringae* testées sont comme suit :

La Galerie Api 20 E ne montre pas une production d'acétoines (VP), une production d'H₂S et une production d'acide à partir du sucre inositol (INO).

La Galerie Api NH ne montre pas une production d'acide à partir du fructose (FRU)

4- RESULTATS & DISCUSSION

La Galerie Api 20 strep montre :

- une production d'acide à partir du ribose (RIB) et d'amidon (AMD).
- absence de production d'acide à partir d'inuline (INU).

La Galerie Api 20A montre :

- une production d'acide à partir du mannose (MAN), saccharose (SAC), xylose (XYL), glycerol (GLY), raffinose (RAF), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA) positive.
- absence de production d'acide à partir maltose (MAL), salicine (SAL), melezitose (MLZ).

La Galerie Api AUXACOLOR™ 2 montre :

- une production d'acide à partir du galactose (GAL).
- absence de production d'acide à partir de l'adonitol (ADO).

Tableau 14. Tableau de lecture de la galerie Api 20 E (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France).

Test	Substrat	Réactions / Enzymes	Résultat	
			Négatif	Positif
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne (Voges Priskauer)	VP1+VP2 / 10 min	
			Incolore	Rose / rouge
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d' H ₂ S	Incolore / grisâtre	Dépôt noir
INO	Inositol	Acidification	Bleu	Jaune

Tableau 15. Tableau de lecture de la galerie Api 20 strep (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France).

Test	Substrat	Réactions / Enzymes	Résultat	
			Négatif	Positif
RIB	Ribose	Acidification	Orange / rouge	jaune
INU	Inuline	Acidification	Orange / rouge	jaune
AMD	Amidon	Acidification	Orange / rouge	jaune

Tableau 16. Tableau de lecture de la galerie Api NH (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France).

Test	Substrat	Réactions / Enzymes	Résultat	
			Négatif	Positif
FRU	Fructose	Acidification	Rouge orange	Jaune orange

4- RESULTATS & DISCUSSION

Tableau 17. Tableau de lecture de la galerie Api AUXA COLOR™ 2 (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France).

Test	Substrat	Réactions / Enzymes	Résultat	
			Négatif	Positif
GAL	Galactose	Acidification	Bleu ou vert	Jaune ou incolore
ADO	Adonitol	Acidification	Bleu ou vert	Jaune ou incolore

Tableau 18. Tableau de lecture de la galerie Api 20A (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France).

Test	Substrat	Réactions / Enzymes	Résultat	
			Négatif	Positif
MAN	Mannitol	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
LAC	Lactose	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
SAC	Saccharose	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
MAL	Maltose	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
SAL	Salicine	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
XYL	Xylose	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
ARA	Arabinose	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
GLY	Glycérol	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
MAN	Mannose	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
MZL	Melezitose	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
RAF	Raffinose	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
SOR	Sorbitol	Acidification	Pourpre	Jaune /jaune vert
RHA	Rhamnose	Acidification.	Pourpre	Jaune /jaune vert

(A)



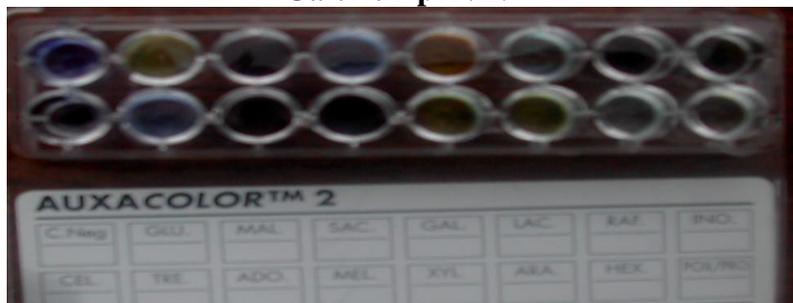
Galerie Api 20 E .

(B)



Galerie Api NH.

(C)



Galerie Api AUXACOLOR™ 2.

(D)



(E)



Galerie Api 20 Strep.

Figure 34
Galerie Api 20 E (A), Api NH(B), Api AUXACOLOR™ 2(C), Api 20 A(D) et la galerie Api 20 Strep (E).

4- RESULTATS & DISCUSSION

Les galeries biochimiques utilisées montrent que les souches de *Pseudomonas* appartenant à la même espèce peuvent présenter des profils fermentaires différents comme indiqués dans le tableau 19.

Tableau 19. Profils fermentaires des souches de *Pseudomonas* isolées.

isolats hydrates de carbone	PS1	PS3	PS4	PS5	PS7	PS9	PS10	PS12	PS14	PS15	PS16	PS18	PS20	PS22	PS23	PS24	PS25	PS27	PS29	PS30
Glucose	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Arabinose	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
Mannose	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
N- acetyl- glucosamine	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caprate	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adipate	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Malate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Phényl – acetate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

(+) : Réaction positive (fermentation).

(-) : Réaction négative (pas de fermentation).

Suite du tableau 19.

isolats hydrates de carbone.	PS31	PS33	PS35	PS36	PS38	PS40	PN1	PN2	PN3	PN4	PN5	PN6	PN9	PN12	PN18	PN20	PN22	PN24	PN25	PN30
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N- acetyl- glucosamine	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
Gluconate	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Caprate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malate	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Phényl – acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Réaction positive (fermentation).

(-) : Réaction négative (pas de fermentation).

4- RESULTATS & DISCUSSION

Tableau 20. Etude comparative entre les Caractéristiques des *P. syringae* pv. *savastanoi* selon Lelliott & Stead (1987) et les cinq souches de *P. syringae* isolée (voir annexe 4).

<i>Caractéristiques</i>	<i>P. syringae</i> PN1	<i>P. syringae</i> PN2	<i>P. syringae</i> PN3	<i>P. syringae</i> PN4	<i>P. syringae</i> PN9	<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> Souche de référence CCPPB 524 (Lelliott & Stead, 1987).
Réaction de Gram	-	-	-	-	-	-
Arginine déshydrolase	-	-	-	-	-	-
Réaction d'oxydase	-	-	-	-	-	-
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	+	+++	++	+	+	+
Test du gluconate	-	-	-	-	-	-
La production de la pyocyanine	-	-	-	-	-	-
Production d'acétoïne (Voges Priskauer).	-	-	-	-	-	-
Test du rouge de méthyle (RM)	-	-	-	-	-	-
Production d' H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Production d'indole	-	-	-	-	-	-
La coagulation du lait	-	-	-	-	-	-
la capacité des souches de <i>P. syringae</i> à survivre pendant dix jours dans des milieux contenant des pourcentages (%) différents du sodium (0,1%, 1%, 5% et 10%) et 5% de saccharose	+	++	+	++++	+	+
Formation du levane	+	+	+	+	+	+
La tolérance en NaCl	+	++	+	+++	++	+
La mobilité	+	+	+++	++	+	+
Production de pigments fluorescents	+	+	+++	+++	+++	+
Réactions alcalines sur le lait tournesolé	+	+	+	+	+	+
Hypersensibilité sur Tabac	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse du Tween 80	+	+	+++	+	+	+
La croissance à 35 °C	+	+	++	+	++	+
Utilisation du citrate.	+	+	+	+	+	+
Production d'acide à partir du :						
Maltose	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	-	+	+	+
Mélézitose	-	-	-	-	-	-
Inuline	-	-	-	-	-	-

Suite du tableau 20.

Adonitol	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	-	-
L- Arabinose	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	-	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	-	+	+	+	+
Glycérol	+	+	-	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	-	+	-	+	+
Sorbitol	-	+	+	+	-	+
Ribose	+	-	+	+	+	+

(+) : Réaction positive.

(-) : Réaction négative.

4.2. Caractérisation des isolats

Comme décrit précédemment dans les méthodes, les souches ont été soumises à différents tests afin de les caractériser ceci en recherchant :

- leurs types sérotypiques ;
- leurs antibiorésistances ;
- leurs antagonismes et leurs contenus en ADN chromosomique et extra chromosomique.

4.2.1. Résultats relatifs aux types sérotypiques

La recherche du type sérotypique des isolats de *Pseudomonas* est réalisée à l'aide d'un test rapide d'agglutination. Nous avons utilisé le Kit (Slidex Pseudo) réservé pour le groupage des *Pseudomonas*. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une agglutination nette avec le réactif latex pendant 2 minutes maximum comme le montre la figure 35. Les résultats des tests d'agglutination montrent que les souches possèdent des sérotypes différents par exemple la souche de *P. fluorescens* PS7 possède le sérotype P1 et la souche de *P. fluorescens* PS8 possède le sérotype P3. Les autres résultats sont représentés dans les tableaux 21 et 22.

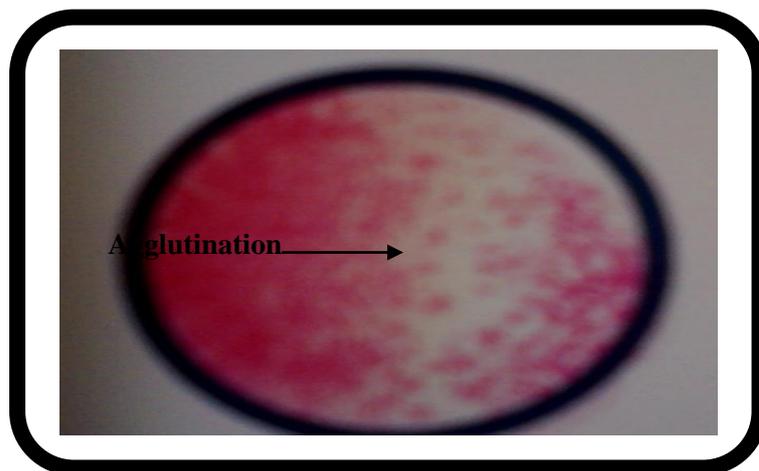


Figure 35
Tests d'agglutination positive.

4- RESULTATS & DISCUSSION

Tableau 21. Le sérotypage des souches de *P. fluorescens* isolées.

Antisérums <i>P. fluorescens</i>		PS7	PS8	PS20	PS22	PS24	PS36	PN5	PN6	PN12	PN18	PN20	PN22	PN24	PN25	PN30
Polyvalents	Monovalents															
PMA	P9					+										
	P10												+			
	P13				+											
	P14			+												
PMC	P1	+														
	P3		+													
	P4									+						
	P6															+
PME	P2											+				
	P5														+	
	P5							+								
	P16															
PMF	P7								+							
	P8													+		
	P11						+									
	P12										+					

(+) : présence d'agglutination.

PMA : Antisérums Polyvalents Monovalents du groupe A.

PMC : Antisérums Polyvalents Monovalents du groupe C.

PME : Antisérums Polyvalents Monovalents du groupe E.

PM F : Antisérums Polyvalents Monovalents du groupe F.

PS7-PN30 : souches de *P. fluorescens* isolées.

4- RESULTATS & DISCUSSION

Tableau 22. Le sérotypage des souches de *P. aeruginosa* isolées.

Antisérums <i>P. aeruginosa</i>		PS1	PS3	PS4	PS5	PS9	PS10	PS12	PS14	PS15	PS16	PS23	PS25	PS27	PS29	PS30	PS31	PS33	PS35	PS38	PS40
Polyvalents	Monovalents																				
PMA	P9				+																
	P10							+													
	P13						+														
	P14										+										
PMC	P1	+																+			
	P3		+																		
	P4					+															
	P6			+																	
PME	P2									+											
	P5											+									
	P5													+							
	P16															+					
PMF	P7																	+			
	P8								+												
	P11																		+		+
	P12														+					+	

(+) : présence d'agglutination.

PMA : Antisérums Polyvalents Monovalents du groupe A.

PMC : Antisérums Polyvalents Monovalents du groupe C.

PME : Antisérums Polyvalents Monovalents du groupe E.

PM F : Antisérums Polyvalents Monovalents du groupe F.

PS1-PS40 : Souches de *P. aeruginosa* isolées.

4.2.2. Résultats relatifs à l'antibiorésistance

Il est bien établi que les bactéries du genre *Pseudomonas* résistent à de nombreux inhibiteurs bactériens, particulièrement aux agents chimiques (Couvalin, 2007). Elles continuent leur développement dans certaines solutions antiseptiques (notamment le cétrimide) et sont résistantes à de nombreux antibiotiques (Chikhi & Demouche, 2010).

Les résultats des antibiogrammes effectués sur les isolats sont présentés dans les tableaux 23, 24 et 25.

Parmi les 40 souches testées 27 ont montré une sensibilité à la quasi-totalité des antibiotiques testés. Cette sensibilité varie selon les espèces et les souches de la même espèce comme le montre la figure 36. Par exemple le diamètre de la zone d'inhibition à la Coléistine (CS) est de 24 mm chez la souche de *P. fluorescens* PS7 et de 21mm chez la souche de *P. fluorescens* PS8.

Nous avons noté :

-quatre (04) cas de résistance à certains β -lactamines tel que la Ticarcilline observé chez les souches PS40 et PN4, la Céf sulodine observé chez les souches PN22 et PN24, la Ceftazidime observé chez la souche PN24, et la Ciprofloxacine chez la souche PN12.

-neufs (09) cas de résistance à la Fosfomycine observés chez les souches (PN3, PS27, PS30, PS31, PS24, PN6, PN12, PN18 et PN22).

-un (01) cas de résistance à la Tobramycine observé chez la souche PN24.

La figure 37 montre les cas de résistances des *Pseudomonas* observées au cours de cette étude. La résistance naturelle des *Pseudomonas* aux antibiotiques : Ampicilline (Am., 10 μ g), Amoxicilline (Amx., 25 μ g), Céf alotine (Cf., 30 μ g), Céf azoline (Cz., 30 μ g), Oxacielline (OX., 01 μ g), Streptomycine (S., 100 μ l) et l'Acide Nalidixique (Na., 30 μ g) ont été aussi testés sur les souches de *Pseudomonas* isolées.

Selon l'analyse faite par le logiciel **WHONET** englobant 16 laboratoires nationaux, le pourcentage de résistance des *Pseudomonas* à la Ceftazidime (Caz) est de 13,3%. (Chikhi & Demouche, 2010). Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes. Soit des mutations dans le génome, on parlera alors de transmission verticale à la descendance, soit l'acquisition d'information génétique étrangère en provenance d'autres bactéries, par transfert horizontal (Walsh, 2003).

Cette étude nous a conduit à distinguer des souches présentant des antibiorésistances variées, et inattendue chez des bactéries isolées de leur milieu naturel (sol et nécroses) qui sont supposés être dépourvus d'antibiotiques.

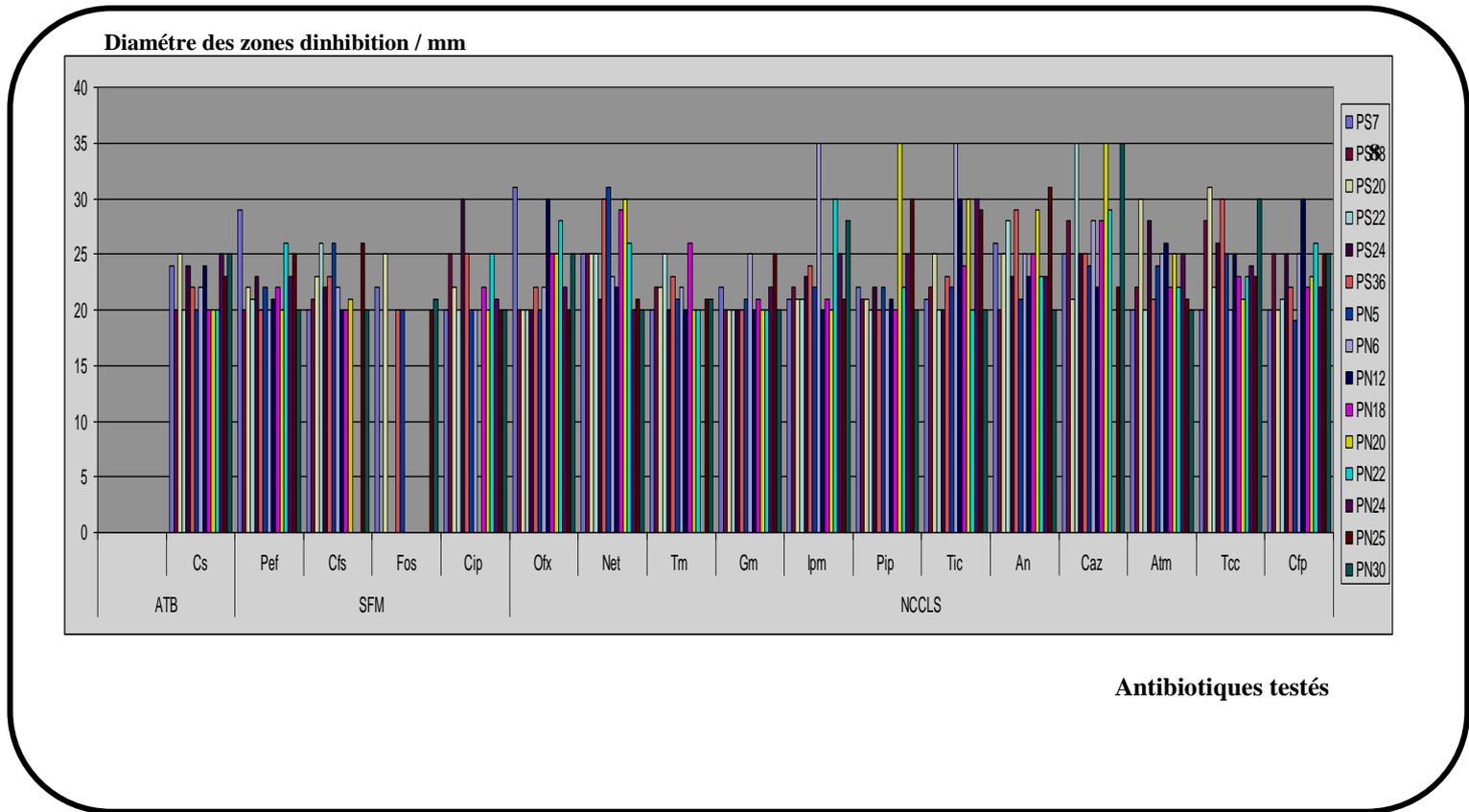


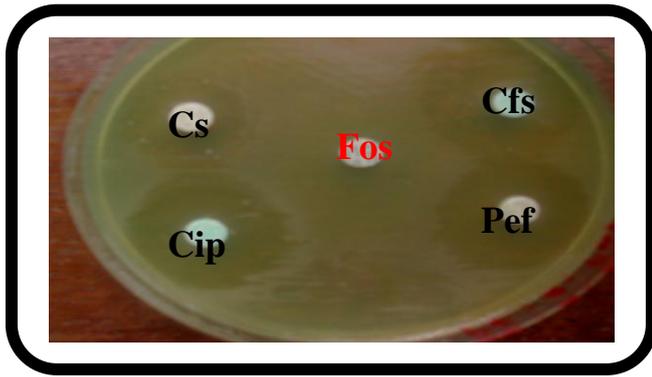
Figure 36
La sensibilité des souches de *P. fluorescens* aux antibiotiques.

SFM : Société française de microbiologie.

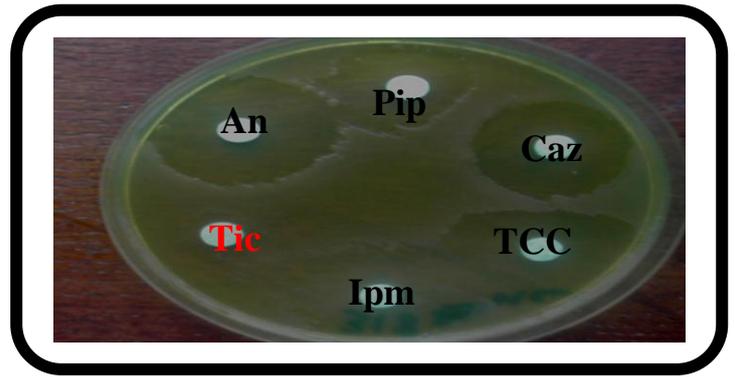
NCCLS : Comité national pour les études cliniques de laboratoire.

ATB :Antibiotique.

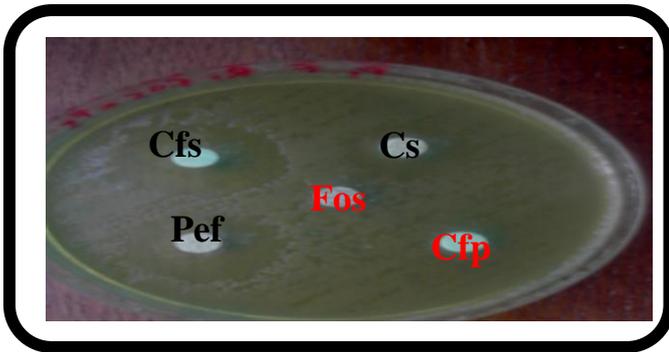
PS7-PN30 : Souches testées.



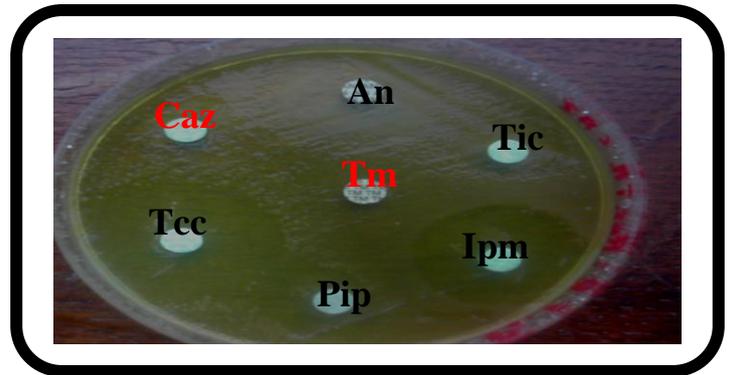
(A)



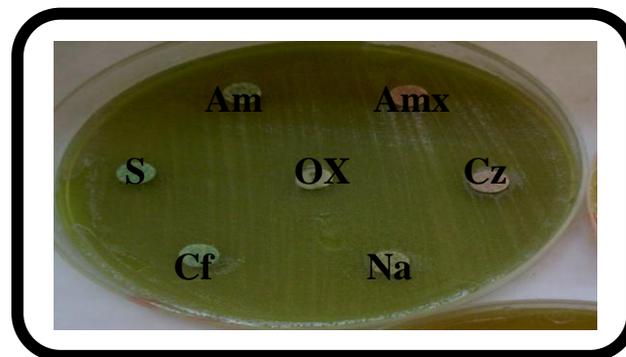
(B)



(C)



(D)



(E)

Figure 37

Cas de résistance aux antibiotiques observée chez les souches de *Pseudomonas* isolées.

(A): Résistance à la Fosfomycine.

(B): Résistance à la Ticarcilline.

(C): Résistance à la Ciprofloxacine.

(D): Résistance à la Tobramycine et la céftazidime.

(E): Résistance naturelle des *Pseudomonas* aux antibiotiques : Ampicilline (Am., 10 µg), Amoxicilline (Amx., 25 µg), Céfalotine (Cf., 30 µg), Céfazoline (Cz., 30 µg), Oxacilline (OX., 01 µg), Streptomycine (S., 100 µl) et l' Acide Nalidixique (Na., 30 µg).

4- RESULTATS & DISCUSSION

Tableau 23. Résultats de l'antibiogramme des *P. fluorescens*.

<i>P. fluorescens</i>		PS7	PS8	PS20	PS22	PS24	PS36	PN5	PN6	PN12	PN18	PN20	PN22	PN24	PN25	PN30
ATB																
SFM	Cs	24	21	25	22	24	22	25	22	24	21	22	24	25	23	25
	Pef	29	20	22	21	23	25	22	20	21	22	20	26	23	25	20
	Cfs	20	21	23	26	22	20	26	25	20	21	21	R	R	26	20
	Fos	22	25	25	20	R	23	20	R	R	R	20	R	29	20	21
NCCLS	Cip	20	25	22	20	30	25	20	20	R	22	20	25	21	20	20
	Ofx	31	20	20	20	20	22	20	22	30	25	25	28	22	20	25
	Net	25	25	25	25	21	30	31	23	22	29	30	26	20	21	20
	Tm	20	22	22	25	20	23	21	22	20	26	20	20	R	21	21
	Gm	22	20	20	20	20	20	21	25	20	21	20	20	22	25	20
	Ipm	21	22	21	21	23	24	22	35	20	21	20	30	25	21	28
	Pip	22	21	21	20	22	20	22	20	21	20	35	22	25	30	20
	Tic	21	22	25	20	20	23	22	35	30	24	30	20	30	29	20
	An	26	20	25	28	23	29	21	25	23	25	29	23	23	31	20
	Caz	25	28	21	35	25	25	24	28	22	28	35	29	R	22	35
	Atm	20	22	30	20	28	21	24	25	26	22	25	22	25	21	20
	Tcc	20	28	31	22	26	30	25	20	25	23	21	23	24	23	30
Cfp	20	25	20	21	25	22	19	25	30	22	23	26	22	25	25	

R : Résistance à l'antibiotique.

S : Sensible à l'antibiotique.

SFM : Société française de microbiologie.

NCCLS : Comité national pour les études cliniques de laboratoire.

ATB : Antibiotique.

PS7-PN30 : Souches testées.

Tableau 24. Résultats de l'antibiogramme des *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>		PS1	PS3	PS4	PS5	PS9	PS10	PS12	PS14	PS15	PS16	PS23	PS25	PS27	PS29	PS30	PS31	PS33	PS35	PS38	PS40	
ATB																						
SFM	Cs	24	22	25	24	24	22	25	22	24	26	22	24	25	23	25	22	21	24	25	25	
	Pef	29	20	22	21	20	20	22	20	21	22	20	20	22	25	20	20	21	20	25	20	
	Cfs	20	21	23	25	22	22	26	25	20	24	21	20	25	26	20	23	21	20	20	20	
	Fos	22	20	25	21	21	20	20	26	22	25	20	25	R	20	R	R	22	25	20	25	
NCCLS	Cip	20	25	22	20	30	25	20	20	21	22	20	25	21	20	20	20	25	20	30	20	
	Ofx	31	20	20	20	20	22	20	22	30	25	25	28	22	20	25	25	21	20	19	20	
	Net	25	25	25	25	21	30	31	23	22	29	30	25	20	21	20	30	20	30	22	20	
	Tm	20	22	22	25	20	23	21	22	20	26	20	20	21	21	21	20	20	30	22	22	
	Gm	22	20	20	20	20	20	21	25	20	21	20	20	22	25	20	20	22	30	21	20	
	Ipm	21	22	21	21	23	24	22	35	20	21	20	30	25	21	28	20	25	20	21	20	
	Pip	22	21	21	20	22	20	22	20	21	20	35	22	25	30	20	29	20	20	20	20	
	Tic	21	30	25	31	22	31	25	25	30	25	22	20	22	25	30	20	21	25	29	R	
	An	23	25	30	21	23	35	20	25	30	20	20	29	20	22	35	20	23	20	22	26	
	Caz	23	29	30	25	25	22	23	35	31	21	25	23	25	31	29	23	29	20	31	22	
	Atm	30	29	23	30	20	21	26	20	22	20	21	20	23	26	25	20	25	21	35	25	
	Tcc	25	22	26	22	21	22	35	25	20	20	25	25	23	29	25	25	30	35	29	35	
	Cfp	30	22	25	20	20	25	20	20	25	20	26	23	25	30	22	21	25	21	31	20	

R : Résistance à l'antibiotique.

S : Sensible à l'antibiotique.

SFM : Société française de microbiologie.

NCCLS : Comité national pour les études cliniques de laboratoire.

ATB :Antibiotique.

Tableau 25. Résultats de l'antibiogramme des P. syringae.

<i>P. syringae</i>		PN1	PN2	PN3	PN4	PN9
ATB						
SFM	Cs	25	21	22	22	25
	Pef	20	21	22	16	22
	Cfs	22	20	20	25	20
	Fos	30	20	R	25	20
NCCLS	Cip	20	22	20	18	22
	Ofx	25	25	25	22	22
	Net	22	28	25	28	28
	Tm	22	25	25	28	25
	Gm	22	20	25	20	20
	Ipm	22	25	25	20	26
	Pip	25	25	15	22	22
	Tic	20	22	25	R	20
	An	22	28	25	28	28
	Caz	20	20	18	20	30
	Atm	25	26	22	20	25
	Tcc	25	20	22	26	25
	Cfp	30	26	25	22	25

R : Résistance à l'antibiotique.

S : Sensible à l'antibiotique.

SFM : Société française de microbiologie.

NCCLS : Comité national pour les études cliniques de laboratoire.

ATB :Antibiotique.

4.2.3. Résultats relatifs à l'antagonisme

L'antagonisme a été recherché par deux interactions réalisées par deux méthodes. Une méthode directe (confrontation bactérie ou champignon / bactérie) et une méthode indirecte (confrontation surnageant bactérien / bactérie).

Dans le cas d'inhibition, des zones claires apparaissent sous forme d'un halo autour des touches ou des puits des bactéries à tester.

La méthode directe a permis de mettre en évidence des inhibitions et de sélectionner les couples de souches (inhibitrices / indicatrices).

La confrontation bactérie / bactérie :

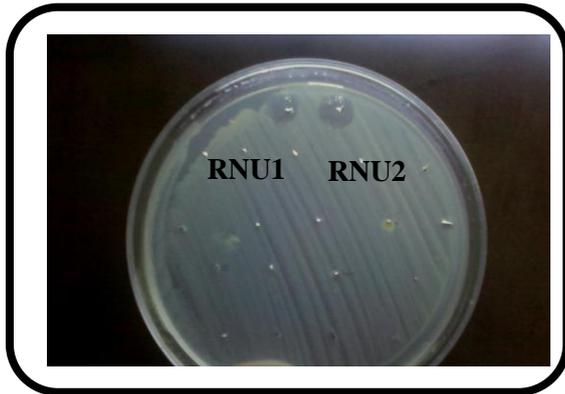
Les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* ont été inhibées par des souches de *Rhizobium*, et par des souches de *Pseudomonas* (*fluorescens* et *aeruginosa*). La figure 38 (A) montre l'inhibition de la souche de *P. syringae* pv. *savastanoi* PN1 par les souches de *Rhizobium* RNU1 et RNU2. La figure 38 (B) montre l'inhibition des souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* PN1 et PN2 par la souche de *P. fluorescens* PN5.

Des zones d'inhibition ont été observées au cours de l'interaction entre les isolats de *Pseudomonas* (*aeruginosa* et *fluorescens*) et les isolats de *Rhizobium* c'est le cas de la souche de *Rhizobium* RNU9 qui inhibe la souche de *P. aeruginosa* PS14 (figure 38 C). Tandis que la plus part des *P. fluorescens* ont été inhibés par un nombre important de souches de *Rhizobium*. C'est le cas par exemple de la souche de *Rhizobium* RNB11 qui inhibe les souches de *P. fluorescens* PS18, PS20 et PN6 comme indique la figure 38 (D). Il faut signaler qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée chez les souches isolées à partir des nodosités du *Retama monosperma* du Bousfer plage.

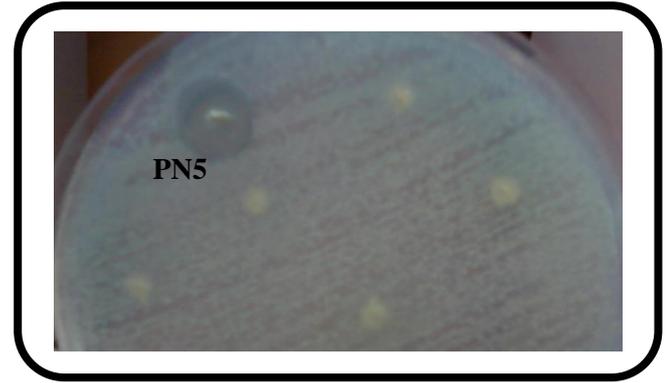
Nous pouvons noter que des zones d'inhibitions de 5 mm, de 4 mm et de 3,5 mm étaient observées chez les couples de souches (*P. fluorescens* PN5 / *P. syringae* PN3), (*Rhizobium* RNU9 / *P. aeruginosa* PS14) et (*Rhizobium* RNU4 / *P. syringae* PN9) respectivement.

La confrontation champignon / bactérie :

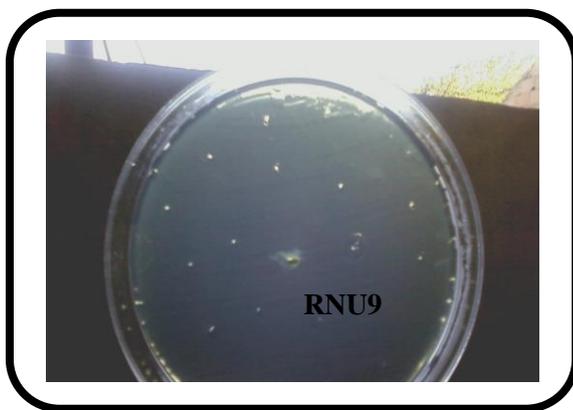
Les cinq souches de *P. syringae* ont été inhibées par le champignon *Penicillium citrinum* (PS12) montré dans la figure 39 (A) et par *Aspergillus niger* (AS4) indiqué dans la figure 39 (B). D'autres résultats obtenus par la méthode directe sont représentés dans le tableau 26.



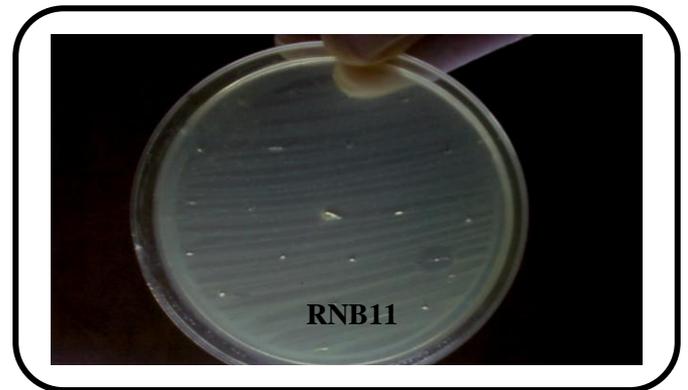
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 38

Antagonisme entre des souches de Pseudomonas (aeruginosa, fluorescens et syringae) et de Rhizobium en milieu solide (méthode des touches).

(A) : Souche en masse est *P. syringae* P N1.

(B) : Souche en masse est *P. syringae* P N1 et P N2.

(C) : Souche en masse est *P. aeruginosa* P S14.

(D) : Souches en masse sont les souches de *P. fluorescens* P S18, P S20 et P N6.

Pour la suite de ce travail, nous avons testé les surnageants des souches inhibitrices par la méthode des puits (méthode indirecte).



Figure 39

Antagonisme entre les deux champignons contre les souches de Pseudomonas (aeruginosa, fluorescens et syringae) en milieu solide (méthode des touches).

(A) : Souches en masse sont les souches de *P. syringae* (PN1, PN3, PN4, PN5 et PN9).

(B) : Souches en masse sont les souches de *P. syringae* (PN1, PN3, PN4, PN5 et PN9).

Le reste des résultats obtenus par la méthode directe sont représentés dans le tableau 26.

Tableau 26. Inhibitions obtenues par la méthode directe.

<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Souches Indicatrices Souches inhibitrices </div>	PN1	PN2	PN3	PN4	PN9	PS9	PS14	PN6	PS18	PS20
PN5	3 mm	3 mm	5 mm	2 mm	1,5 mm	-	-	-	-	-
PS4	-	-	-	4 mm	-	-	-	-	-	-
PS8	-	-	2,5 mm	-	-	-	-	-	-	-
PN18	4 mm	-	-	-	4 mm	-	-	-	-	-
RNU1	2 mm	-	-	-	-	-	-	2 mm	2 mm	2 mm
RNU2	3 mm	2 mm	1,5 mm	1 cm	2 mm	-	-	-	-	-
RNU4	2 mm	2 mm	2,5 mm	1,5 mm	3,5 mm	-	-	-	-	-
RNU5	-	-	-	-	-	2 mm	-	-	-	-
RNU8	2 mm	1,5 mm	2 mm	1,5 mm	3 mm	-	-	-	-	-
RNU9	2 mm	1,5 mm	2 mm	2 mm	2,5 mm	-	4 mm	-	-	3 mm
RNU11	-	-	-	-	-	-	2 mm	-	-	-
RNU12	2 mm	1,5 mm	3 mm	2,5 mm	1,5 mm	-	-	-	-	-
RNU13	3 mm	2 mm	2 mm	1,5 mm	1 mm	-	-	-	-	-
RNU14	2 mm	1,5 mm	1,5 mm	2,5 mm	1,5 mm	-	-	-	-	-
RNU16	-	-	-	2 mm	-	-	2 mm	-	-	-
RNB2	-	2 mm	-	-	-	-	-	-	-	-
RNB5	-	-	-	-	-	-	-	-	2 mm	-
RNB11	-	-	-	-	-	-	-	2 mm	2 mm	2 mm
RNM1	-	2,5 mm	-	-	-	-	-	-	-	-
RNM5	-	-	1,5 mm	-	-	-	-	-	-	-

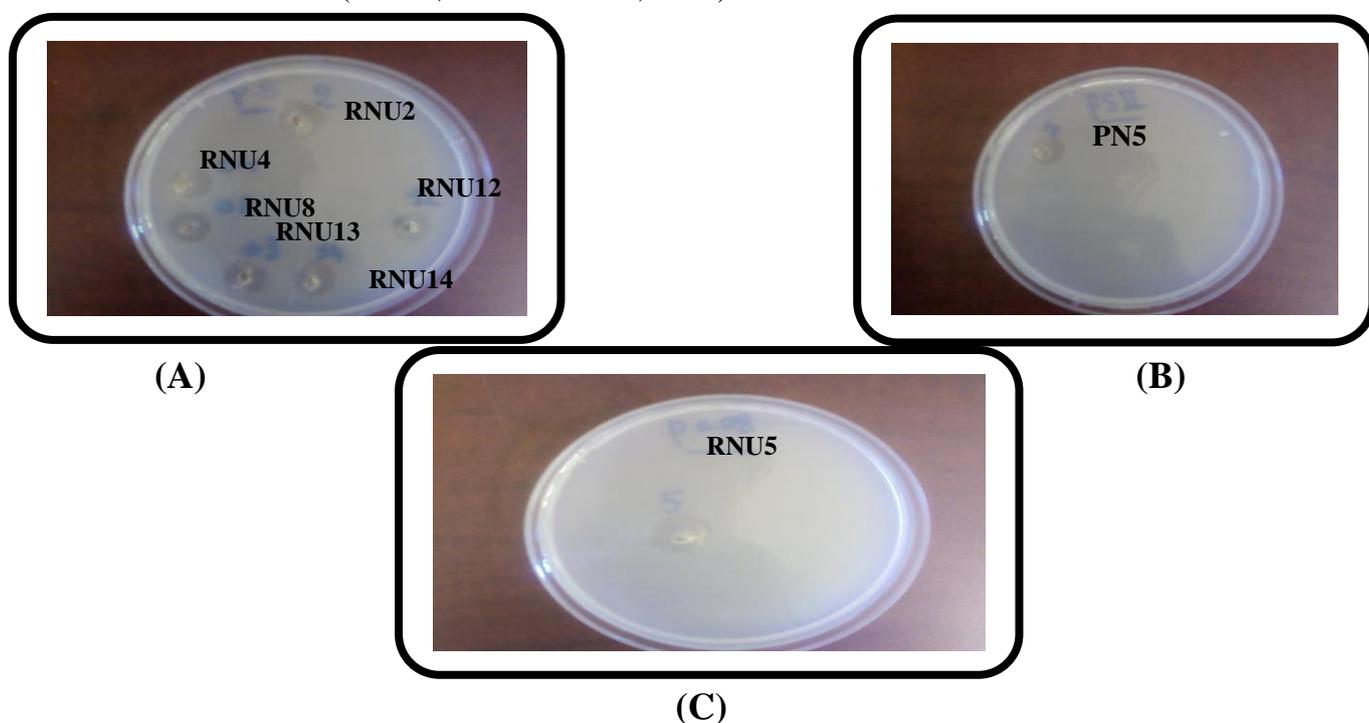
(-): Pas de zone d'inhibition.

4- RESULTATS & DISCUSSION

La détection des substances inhibitrices par la méthode indirecte a été réalisée en milieu solide en utilisant des surnageants des souches inhibitrices ce qui favorise une bonne diffusion de la substance. Des zones d'inhibitions sont obtenues autour des puits contenant le surnageant des souches inhibitrices de *P. fluorescens* PN5, PS8 et PN18 et des *Rhizobium* RNU1, RNU2, RNU4, RNU5, RNU8, RNU9, RNU11, RNU12, RNU13, RNU14, RNU16, RNB2, RNB5, RNB11, RNM1 et RNM5.

La figure 40 (A) montre l'inhibition des cinq souches de *P. syringae* par les 6 souches de *Rhizobium* RNU2, RNU4, RNU8, RNU12, RNU13 et RNU14. Les mêmes résultats ont été obtenus chez les souches de *Pseudomonas* inhibitrices comme par exemple l'inhibition de la souche de *P. syringae* PN2 par la souche de *P. fluorescens* PN5 indiquée dans la figure 40 (B) et l'inhibition de *P. aeruginosa* PS9 par le *Rhizobium* RNU5 dans la figure 40 (C).

Nous avons remarqué que ces zones d'inhibitions sont beaucoup plus marquées que celles obtenues par la méthode directe. Des résultats similaires ont été rapportés pour d'autres souches bactériennes (Hirsch, 1979 & Saadi, 2009).



(A)
(B)
(C)

Figure 40
Effets des surnageants des souches inhibitrices de *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens*) et des souches de *Rhizobium* en milieu solide (méthode des puits).

(A): Inhibition de la croissance des cinq souches de *P. syringae* par les souches de *Rhizobium* RNU2, RNU4, RNU8, RNU12, RNU13 et RNU14.

(B): Inhibition de la croissance de la souche de *P. syringae* PN2 par la souche de *P. fluorescens* PN5.

(C): Inhibition de la croissance de la souche de *P. aeruginosa* PS9 par la souche de *Rhizobium* RNU5.

4- RESULTATS & DISCUSSION

Globalement, les résultats regroupés dans le tableau 27 confirment l'importance de ces zones d'inhibition obtenues, la plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec le surnageant de la souche de *Rhizobium* RNU9 et la souche indicatrice *P. syringae* PN1 (7 mm de diamètre) et de la souche de *P. fluorescens* PN5 avec le surnageant de la souche de *P. syringae* PN1 (8 mm de diamètre). Les diamètres des autres zones d'inhibitions varient de 3 à 6 mm.

Tableau 27. Inhibitions obtenues par la méthode indirecte (Barefoot & Klaenhammer, 1983).

Souches. Indicatrices Souches. inhibitrices	PN1	PN2	PN3	PN4	PN9	PS9	PS14	PN6	PS18	PS20
PN5	8 mm	5 mm	5 mm	4,5 mm	5 mm	-	-	-	-	-
PS4	-	-	-	6 mm	-	-	-	-	-	-
PS8	-	-	4,5 mm	-	-	-	-	-	-	-
PN18	6 mm	-	-	-	4 mm	-	-	-	-	-
RNU1	5,5 mm	-	-	-	-	-	-	5 mm	3 mm	3 mm
RNU2	6 mm	5 mm	5,5 mm	4 mm	2 mm	-	-	-	-	-
RNU4	6 mm	6 mm	3,5 mm	4 mm	5,5mm	-	-	-	-	-
RNU5	-	-	-	-	-	6 mm	-	-	-	-
RNU8	3 mm	1,5 mm	6 mm	2,5 mm	3 mm	-	-	-	-	-
RNU9	7 mm	4,5 mm	5 mm	4 mm	5,5 mm	-	5,5 mm	-	-	5 mm
RNU11	-	-	-	-	-	-	5 mm	-	-	-
RNU12	6 mm	4,5 mm	3 mm	4,5 mm	4,5 mm	-	-	-	-	-
RNU13	4,5 mm	4 mm	4,5 mm	2 mm	3 mm	-	-	-	-	-
RNU14	5 mm	5,5 mm	5,5 mm	6 mm	4,5 mm	-	-	-	-	-
RNU16	-	-	-	4 mm	-	-	4,5 mm	-	-	-
RNB2	-	6 mm	-	-	-	-	-	-	-	-
RNB5	-	-	-	-	-	-	-	-	4 mm	-
RNB11	-	-	-	-	-	-	-	4 mm	2 mm	2 mm
RNM1	-	3,5 mm	-	-	-	-	-	-	-	-
RNM5	-	-	2,5 mm	-	-	-	-	-	-	-

(-): pas de zone d'inhibition.

4.2.4. Caractéristiques de l'agent inhibiteur apparenté aux bactériocines

Cette caractérisation a été réalisée sur les surnageants des souches de *Rhizobium* RNU9 Isolés à partir des nodules de *Retama monosperma* (Dahmani, 2010) et de *P. fluorescens* PN5 isolés dans cette étude à partir de nécrose d'olivier. Ces souches ont été choisies pour la suite de ce travail car elles ont montré un antagonisme vis-à-vis des cinq souches de *P. syringae*.

▪ Action du pH :

L'effet des différentes valeurs de pH sur l'agent inhibiteur produit par la souche de *Rhizobium* RNU9 est donné dans la figure 41 (A) et dans la figure 41 (B) pour la souche de *P. fluorescens* PN5.

Nous remarquons que les deux agents inhibiteurs résistent aux pH (6, 7 et 8) puisque les diamètres des zones d'inhibitions sont presque comparables au diamètre obtenu avec l'agent inhibiteur du témoin. Ces mêmes agents perdent leurs activités à pH acide (2) et à des valeurs de pH basique (9 et 10).

Les résultats font donc apparaître une meilleure stabilité de l'activité inhibitrice à des valeurs de pH compris entre 6 et 8. Ces mêmes résultats ont été obtenus par d'autres chercheurs (Hirsch, 1979 & Rodelas *et al.*, 1998) qui ont travaillé sur les bactériocines des souches de *Rhizobium* ou sur des bactériocines produites par d'autres bactéries (Kacem *et al.*, 2006). L'effet du pH sur l'activité des bactériocines produites par les bactéries est en relation avec l'interaction électrostatique ayant lieu entre la bactériocine et la bactérie sensible (Schved *et al.*, 1994). En effet, la paroi (peptidoglycane) et la surface membranaire de celle-ci étant chargées négativement, la bactériocine doit être chargée positivement pour pouvoir entrer en contact avec les cellules bactériennes. Yang *et al.* (1992) ont rapporté que l'adsorption de plusieurs bactériocines est en fonction de pH et que plus le pH baisse, plus la concentration des bactériocines au niveau de la paroi bactérienne augmente et plus l'effet létal est important. L'effet du pH sur l'activité des bactériocines peut être lié à un problème de solubilité : les bactériocines ou les antibiotiques n'étant pas actifs lorsqu'ils ne sont pas en solution (la nisine qui est active en milieu acide et peu ou pas active à pH basique) (Lavermicocca *et al.*, 1999).



(A)



(B)

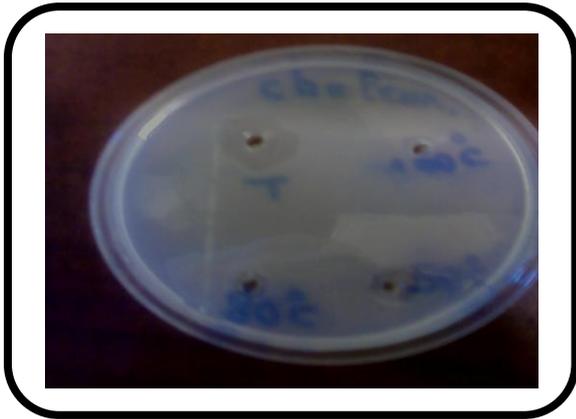
Figure 41

Action du pH sur l'agent inhibiteur de la souche de *Rhizobium* RNU9 (A) et la souche de *P. fluorescens* PN5 (B).

- **Action de la température :**

La chaleur :

L'effet des différentes températures sur le surnageant inhibiteur produit par la souche inhibitrice de *Rhizobium* RNU9 en présence de la souche indicatrice de *P. syringae* est montré dans la figure 42 (A). Nous remarquons que l'agent inhibiteur résiste à la chaleur puisqu'il garde son activité inhibitrice à 50°C et on remarque une légère résistance à 80°C par rapport aux témoins et absence de résistance à 80°C chez l'agent inhibiteur de *P. fluorescens* PN5 comme montré dans la figure 42 (B). A 100°C aucune activité n'a été observée pour les deux souches. Les agents inhibiteurs produits par la souche de *Rhizobium* RNU9 et la souche de *P. fluorescens* PN5 sont thermolabiles car elles ne résistent pas à 100°C. Les mêmes résultats ont été obtenus par Sridevi & Mallaiiah (2008) et Kazouz (2008) qui ont remarqué que lorsqu'il y a une augmentation de la température, il y a une diminution de l'activité inhibitrice.



(A)



(B)

Figure 42

Action de la chaleur sur l'agent inhibiteur de la souche de *Rhizobium* RNU9 (A) et la souche de *P. fluorescens* PN5 (B).

Le froid :

La figure 43 (C) montre que l'agent inhibiteur de la souche de *Rhizobium* RNU9 ne résiste pas à +4°C et à 0°C. Ces résultats indiquent que l'agent inhibiteur est cryo-sensible. Ce résultat ne rejoint pas celui trouvé par Kazouz (2008). En effet cet auteur a montré que la substance produite par les souches de *Rhizobium* résiste à +4°C et à 0°C alors que l'agent inhibiteur de *P. fluorescens* PN5 indiquée dans la figure 43 (D) présente une légère résistance à +4°C et ne résiste pas à 0°C.



(C)



(D)

Figure 43

Action du froid sur l'agent inhibiteur de la souche de *Rhizobium* RNU9 (C) et la souche *P. fluorescens* PN5 (D).

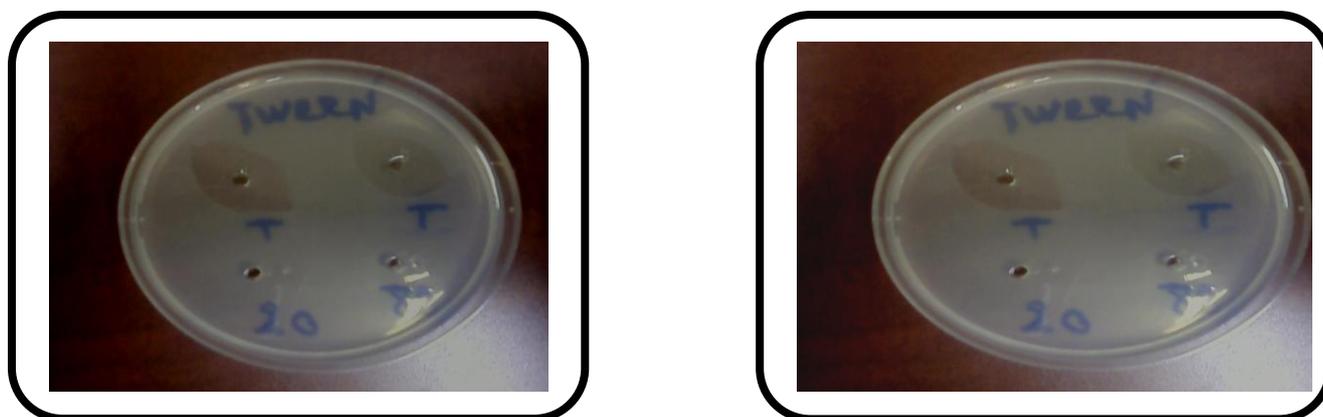
4- RESULTATS & DISCUSSION

- **Action des détergents :**

Le Tween 80 et 20 :

L'activité inhibitrice de l'agent inhibiteur de la souche de *Rhizobium* RNU9 disparaît complètement en présence de Tween 80 et 20 (figure 44 A). Ces détergents agissent sur les protéines qui ont une structure oligomérique. Celui-ci a tendance à dissocier ces molécules complexes en leurs sous unités constitutives, ce qui a pour résultat une perte totale de l'activité inhibitrice de ces substances (Tagg *et al.*, 1976 ; Kacem *et al.*, 2006 & Ali *et al.*, 2009).

L'effet du Tween 80 et du Tween 20 sur l'agent inhibiteur provoque une disparition totale de l'activité inhibitrice ceci confirme qu'au moins une partie de la molécule de ces agents inhibiteurs est de nature lipidique. Ces mêmes résultats ont été obtenus par Tagg *et al.* (1976) et Kazouz (2008), d'autre parts, l'agent inhibiteur de *P. fluorescens* PN5 indiqué dans la figure 44 (B) présente une légère résistance en présence du Tween 20 et du Tween 80.



(A)

(B)

Figure 44

Action du Tween 20 et du Tween 80 sur l'agent inhibiteur de la souche de *Rhizobium* RNU9 (A) et la souche *P. fluorescens* PN5 (B).

Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) :

Nous avons constaté que l'activité inhibitrice de l'agent inhibiteur du *Rhizobium* RNU9 disparaît à 1% de SDS comme le montre la figure 45 (C). Tandis que l'agent inhibiteur du *P. fluorescens* PN5 présente une légère résistance à 1% de SDS (figure 45 D). Par contre à 0,1% et à 0,5% de SDS les deux agents gardent leurs activités inhibitrices presque identiques en comparaison avec le témoin.

On sait que le SDS est un agent dénaturant des protéines. Il peut avoir les mêmes effets que le Tween 80 et Tween 20. Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs tels que Sridevi & Mallaiah (2008). Généralement les bactériocines sont caractérisées vis-à-vis des agents dénaturants (détergents : SDS, Tween 20, ...) (Kacem *et al.*, 2005 ; Kazouz, 2008 & Sridevi *et al.*, 2008).



(C)



(D)

Figure 45

Action du SDS sur l'agent inhibiteur de la souche de *Rhizobium* RNU9 (C) et la souche *P. fluorescens* PN5 (D).

- **Action des protéases :**

Nous avons remarqué que l'agent inhibiteur produit par les deux souches (*Rhizobium* RNU9 et *P. fluorescens* PN5) perdent leurs activités inhibitrices complètement en présence de la trypsine, l' α -chymotrypsine, la protéinase K et la Pronase E comme indique la figure 46. D'après ces résultats obtenus, nous pouvons suggérer que les deux agents inhibiteurs sont de nature protéique. Ceci est une des caractéristiques des bactériocines produites par les souches de *Rhizobium* et les *Pseudomonas* (Roslycky 1967 & Schwinghamer, 1975) en particulier et pour d'autres bactériocines de façon générale (Tagg 1976 & Klaenhammer, 1988).



Figure 46

Action des Protéases sur l'agent inhibiteur de la souche de *Rhizobium* RNU9 et la souche *P. fluorescens* PN5.

- **Action bactéricide ou bactériostatique de l'agent inhibiteur:**

Les fragments de gélose prélevés au niveau des zones d'inhibition, ont été ensemencés à la surface du milieu King B pour les *Pseudomonas* et le milieu YEM pour les *Rhizobium*. Après incubation prolongée à 28°C pour les *Rhizobium* et à 30°C pour les *Pseudomonas*, aucune croissance bactérienne n'a été observée. Ceci démontre que les agents inhibiteurs possèdent une action bactéricide sur les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi*. La méthode de Toba *et al* (1991) a révélé donc que les deux agents inhibiteurs ont une activité bactéricide. Cela rejoint les résultats obtenus par Tagg *et al.* (1976). Cela rejoint aussi les résultats obtenus par Tagg *et al.* (1991) et Braun *et al.* (1994) qui parlent d'un effet bactéricide des bactériocines. Dans la littérature les bactériocines sont souvent décrites comme substance douée d'une activité bactéricide (Hirsch, 1979 ; Selami, 2001 & Kazouz, 2008).

4.2.5. Recherche de l'ADN chromosomique et extra-chromosomique (plasmide)

Les ADNs plasmidiques et chromosomiques sont extraits selon la méthode modifier d'Anderson et MacKay (1983) puis séparés selon leurs tailles par électrophorèse sur gel d'agarose. La présence d'ADN dans le gel a été révélée sous éclairage UV en présence de bromure d'éthédium. L'estimation de la taille des fragments est faite grâce à la comparaison avec le marqueur de taille moléculaire (DNA-ladder) (ADN phage λ digéré avec l'enzyme de restriction Hind III).

Un total de 40 souches de *Pseudomonas* regroupant 20 souches de *P. aeruginosa*, 15 souches de *P. fluorescens* et 5 souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* ont été soumises à cette extraction.

Nous avons détecté des plasmides chez plusieurs souches pouvant avoir une relation avec les différentes propriétés que présentent les souches isolées (Scortichini *et al.*, 2004).

Les figures (47 et 48) illustrent des exemples de profils d'extraction d'ADN plasmidique chez les différentes souches testées. La bande commune à toutes les souches correspond à l'ADN chromosomique. On voit bien que l'ADN plasmidique est distribué jusqu'à 2 bandes chez la même souche. Certaines souches n'ont pas montré de plasmides.

On remarque que le nombre et la taille des plasmides varie selon les souches par exemple la souche de *P. aeruginosa* PS3 héberge un plasmide qui migre dans la région 1,98 Kpb alors que la souche de *P. Syringae* PN2 héberge un plasmide qui migre dans les deux régions 9,46 Kpb et 1,98 Kpb (figure 48). Aucune bande d'ADN extra chromosomique n'a pu être détectée chez les souches PS1, PS5, PS14, PS23, PS7, PS8, PN25 et PS24.

Les résultats sont représentés dans le tableau 28.

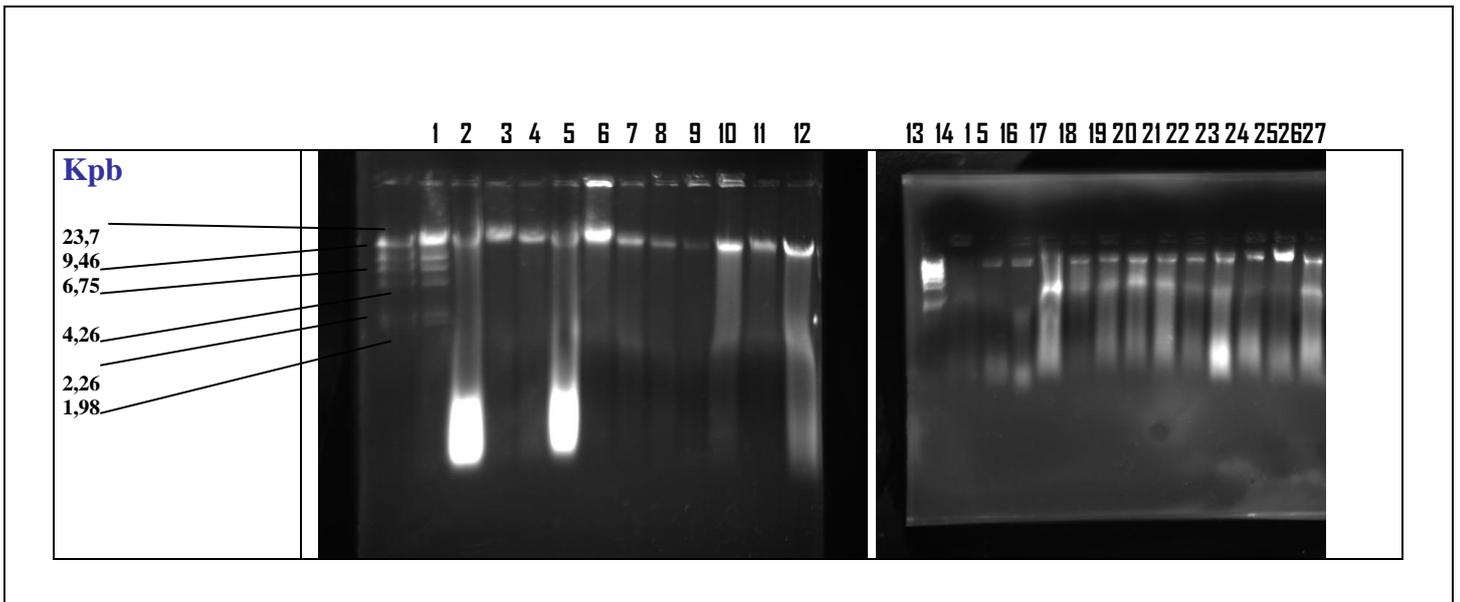


Figure 47
Contenu en ADN plasmidique chez les 20 souches de *P. aeruginosa* et les 5 souches de *P. syringae*.

Les fragments d'ADN sont séparés selon leurs tailles par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % pendant 6 heures à voltage constant de 80 V. La présence d'ADN dans le gel a été révélée sous éclairage UV. L'ADN du phage λ digéré par l'enzyme de restriction Hind III est utilisé comme étalon de poids moléculaires.

Ligne de dépôt : canaux de 2-22 pour les souches de *P. aeruginosa* et de 23-27 pour les souches de *P. syringae*.

Canal 1 : ADN phage λ digéré avec l'enzyme de restriction Hind III.	Canal 14 : PS27
Canal 2 : PS1	Canal 16 : PS29
Canal 3 : PS3	Canal 17 : PS30
Canal 4 : PS4	Canal 18 : PS31
Canal 5 : PS5	Canal 19: PS33
Canal 6 : PS9	Canal 20 : PS35
Canal 7 : PS10	Canal 21 : PS38
Canal 8 : PS12	Canal 22: PS40
Canal 9: PS14	Canal 23 : PN1
Canal 10 : PS15	Canal 24 : PN2
Canal 11 : PS16	Canal 25 : PN3
Canal 12 : PS23	Canal 26: PN4
Canal 13 : PS25	Canal 27 : PN9

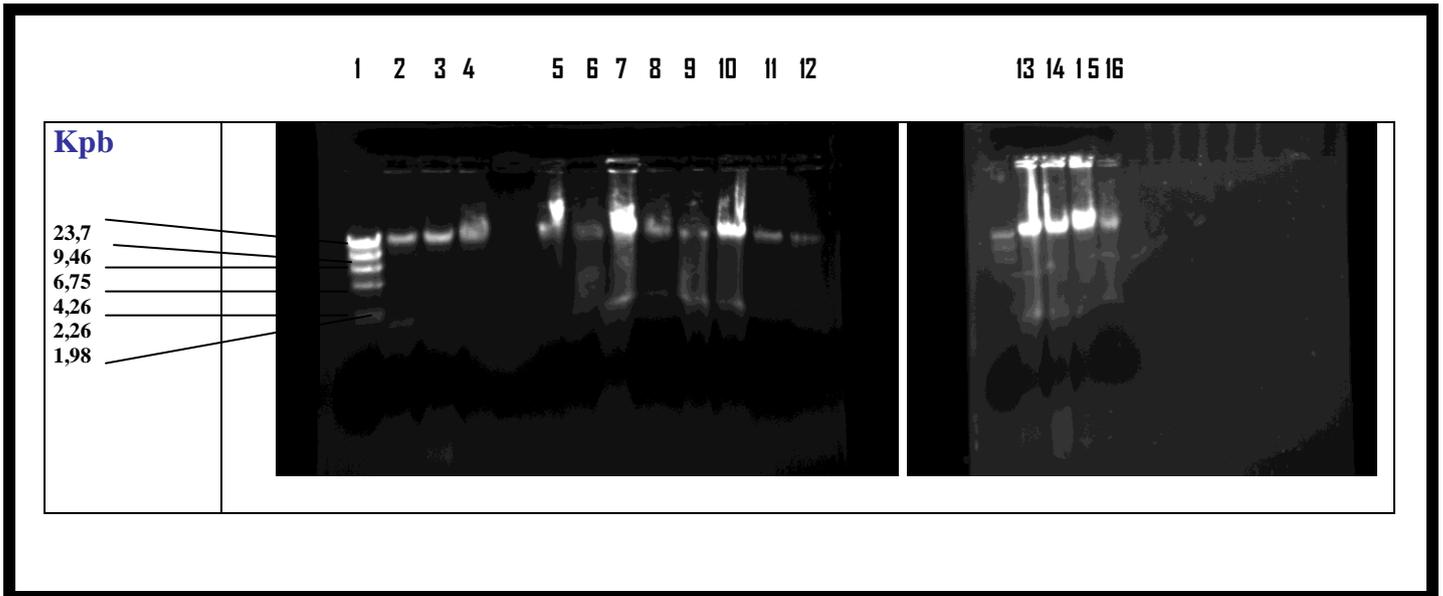


Figure 48
Contenu en ADN plasmidique chez les 15 souches de *P. fluorescens*.

Les fragments d'ADN sont séparés selon leurs tailles par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % pendant 6 heures à voltage constant de 80 V. La présence d'ADN dans le gel a été révélée sous éclairage UV. L'ADN du phage λ digéré par l'enzyme de restriction Hind III est utilisé comme étalon de poids moléculaires.

Ligne de dépôt : canaux 2-16 pour les souches de *P. fluorescens*.

Canal 1 : ADN phage λ digéré avec l'enzyme de restriction Hind III.	
Canal 2 : PN5	Canal 10 : PN24
Canal 3 : PN6	Canal 11 : PN25
Canal 4 : PS7	Canal 12 : PN30
Canal 5 : PS8	Canal 13 : PS20
Canal 6 : PN12	Canal 14 : PS22
Canal 7 : PN18	Canal 15 : PS24
Canal 8 : PN20	Canal 16 : PS36
Canal 9 : PN22	

Tableau 28. Répartition de l'ADN plasmidique chez les souches testées.

Souches	Nombres de bandes apparentes	PM apparents (Kpb)
<i>P. aeruginosa</i> PS1	0	-
<i>P. aeruginosa</i> PS3	1	1,98
<i>P. aeruginosa</i> PS4	1	1,46
<i>P. aeruginosa</i> PS5	0	-
<i>P. aeruginosa</i> PS9	1	1,98
<i>P. aeruginosa</i> PS10	1	1,98
<i>P. aeruginosa</i> PS12	1	1,98
<i>P. aeruginosa</i> PS14	0	-
<i>P. aeruginosa</i> PS15	1	1,98
<i>P. aeruginosa</i> PS16	1	1,98
<i>P. aeruginosa</i> PS23	0	-
<i>P. aeruginosa</i> PS25	2	9,46 et 6,75
<i>P. aeruginosa</i> PS27	1	6,75
<i>P. aeruginosa</i> PS29	1	6,75
<i>P. aeruginosa</i> PS30	2	4,26 et 1,98
<i>P. aeruginosa</i> PS31	1	9,46
<i>P. aeruginosa</i> PS33	1	9,46
<i>P. aeruginosa</i> PS35	1	9,46
<i>P. aeruginosa</i> PS38	1	9,46
<i>P. aeruginosa</i> PS40	1	9,46
<i>P. syringae</i> PN1	1	9,46
<i>P. syringae</i> PN2	2	9,46 et 1,98
<i>P. syringae</i> PN3	1	9,46
<i>P. syringae</i> PN4	1	9,46
<i>P. syringae</i> PN9	1	9,46

La suite du tableau 28. Répartition de l'ADN plasmidique chez les souches testées.

Souches	Nombres de bandes apparentes	PM apparents (Kpb)
<i>P. fluorescens</i> PN5	1	1,98
<i>P. fluorescens</i> PN6	1	1,98
<i>P. fluorescens</i> PS7	0	-
<i>P. fluorescens</i> PS8	0	-
<i>P. fluorescens</i> PN12	1	6,75
<i>P. fluorescens</i> PN18	2	6,75 et 1,98
<i>P. fluorescens</i> PN20	1	1,98
<i>P. fluorescens</i> PN22	1	1,98
<i>P. fluorescens</i> PN24	1	1,98
<i>P. fluorescens</i> PN25	0	-
<i>P. fluorescens</i> PN30	1	1,98
<i>P. fluorescens</i> PS20	2	4,26 et 1,98
<i>P. fluorescens</i> PS22	2	4,26 et 1,98
<i>P. fluorescens</i> PS24	0	-
<i>P. fluorescens</i> PS36	2	4,26 et 2,26

Il reste cependant que ces valeurs trouvées sont vraisemblablement en delà de la réalité car les méthodes de détection de plasmides sont souvent trop générales pour être appliquées avec la même efficacité chez toutes les souches : il faudrait adapter ces méthodes pour chaque souche étudiée afin de déterminer les meilleures conditions de lyse des cellules et d'extraction de l'ADN plasmidique.

Le fait de ne pas détecter de plasmides chez une bactérie ne signifie pas forcément qu'ils n'existent pas mais simplement que la méthode n'est peut être pas assez sensible (Vidaver, 1976 ; Scortichini & Salerno, 2004).

4.2.6. Formation des galles au niveau des oliviers après infection

La figure 49 montre bien une galle obtenue après trois mois d'infection d'un rameau d'olivier par la souche de *P. syringae* pv. *savastanoi* PN1. L'arbre infecté était planté sur sol stérile. Ceci confirme bien que nos souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* étaient bien des souches de *Pseudomonas* phytopathogènes. Sur sol non stérile nous n'avons détecté aucune nécrose ce qui confirme encore une fois la phythopathogénicité de nos souches. Les mêmes résultats ont été obtenus par Saadi (2009).



Après 02 mois d'infection



Après 03 mois d'infection

Figure 49
Formation d'une galle sur la plantule d'olivier après trois mois d'infection par la souche de P. syringae PN1.

5- CONCLUSION & PERSPECTIVES

5- CONCLUSION & PERSPECTIVES

Notre travail a commencé par l'isolement des bactéries du genre *Pseudomonas* à partir du sol et des nécroses (Galles) d'oliviers collectés dans deux régions de l'ouest Algérien (Ain Temouchent et Sig). Cela nous a permis d'identifier et de caractériser 40 souches de *Pseudomonas* (15 souches de *P. fluorescens*, 20 de *P. aeruginosa* et 05 de *P. syringae*) qui font partie maintenant de la collection de bactéries du genre *Pseudomonas* du laboratoire LP₂ VM du département de Biotechnologie (USTO-MB).

L'étude des propriétés des souches nous a conduit à distinguer des souches présentant des antibiorésistances variées, assez inattendues chez des bactéries isolées de leur habitat naturel (sol et nécroses) qui est censé être dépourvu d'antibiotiques. Pour le moment nous n'avons aucune explication à ce phénomène.

Nous avons aussi mis en évidence des inhibitions inter bactériennes causées par des agents inhibiteurs des souches de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* inhibitrices. Nous avons recherché la nature physico-chimique (sensibilité à la chaleur, au froid, aux détergents, et à différentes valeurs de pH), la sensibilité aux enzymes protéolytiques et le mode d'action de l'agent antibactérien ceci nous a conduits à sélectionner des souches bactériocinogènes.

De plus, nous avons détecté des plasmides chez plusieurs souches pouvant avoir une relation avec les différentes propriétés que présentes les souches isolées.

Dans notre étude nous apportons l'inhibition des souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* (agent responsable des galles d'oliviers) par deux champignons (*Penicillium citrinium* et *Aspergillus niger*) ainsi que par des agents inhibiteurs produites par des souches de *Pseudomonas* et de *Rhizobium*. Ceci ouvre des perspectives pour le bio contrôle et la conservation des végétaux et surtout leur protection contre les effets phytopathogènes des bactéries. D'autant plus que, le bassin Méditerranéen constitue depuis très longtemps un site de production oléicole très important, constituant jusqu'à présent la source d'alimentation et l'activité commerciale d'olive et d'huile d'olive dans différentes régions d'Algérie entre autres Sig, Relizane, Mohammadia, Remchi, Mascara, Bouira et Bejaia .

Il resterait à vérifier tout d'abord que les souches de *Pseudomonas* et de *Rhizobium* productrices des bactériocines produisent bien ces bactériocines de manière stable et en quantités suffisantes et actives « *in natura* » contre les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* dans les conditions édapho-climatiques (température, pH, salinité, froid, sécheresse, ..) de notre environnement Algérien.

Ces résultats préliminaires sont originaux. En effet les deux souches de champignons (*Penicillium citrinium* PS12 et *Aspergillus niger* AS4) présentent une action inhibitrice vis-à-vis des cinq souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* et ne présentent aucune action inhibitrice vis-à-vis des souches de *Pseudomonas* (*aeruginosa* et *fluorescens*). Contrairement à ceux qui a été rapporté jusqu'ici dans la littérature à savoir que les *Pseudomonas* sp. attaquent les champignons par ces molécules antifongiques car ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération in situ relativement court, leur capacité à chélater les ions ferriques et à produire des substances antibiotiques comme le HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4 diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phénazines et les butyrolactones (Dwevedi & Johri, 2003 ; Raaijmakers *et al.*, 2002, 2005). Ceci ouvre des perspectives à des recherches ultérieures plus approfondies. En perspectives aussi l'étude histologique de la feuille infectée nécessite d'être réalisé pour comprendre les mécanismes d'infection et pour voir quels sont les tissus affectés.

ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX ANNEXE

Tableau 1 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 NE

Tableau 2 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 E

Tableau 3 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 Strep

Tableau 4 : Tableau de lecture de la galerie Api NH

Tableau 5 : Tableau de lecture de la galerie Api 20 A

Tableau 6 : Tableau de lecture de la galerie Api AUXAL COLOR™ 2

Tableau 7 : Caractéristique de la sous espèce *P. syringae pv. savastanoi* NCPPB 524
(Lelliott & Stead, 1987)

LISTE DES FIGURES ANNEXE

Figure 1 : Etapes de la coloration de Gram

Figure 2 : Catalogue analytique de la galerie Api 20 NE

Figure 3 : Catalogue analytique de la galerie Api 20 E

Figure 4 : Catalogue analytique de la galerie Api 20 Strep

Figure 5 : Catalogue analytique de la galerie Api NH

Figure 6 : Catalogue analytique de la galerie Api 20 A

Figure 7 : Catalogue analytique de la galerie Api AUXACOLOR™ 2.

Figure 8 : Enzyme de restriction Hind III.

Figure 9 : Marqueur de taille (ADN phage λ digéré avec Hind III).

Annexe 1 : Coloration de Gram

La **coloration de Gram** doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme. Voici succinctement les différentes étapes de cette coloration :

- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de **30 secondes à 1 minute**. Rincer à l'eau déminéralisée.
- Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée): étaler le lugol et laisser agir **20 secondes** ; Rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
- Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone): verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (**5 à 10 secondes**). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée;
- Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de **30 secondes à 1 minute**. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à **40°C, 10 à 15 minutes**.
- Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif **100 (grossissement x1000)**.

Les étapes 1 et 2 colorent en violet le contenu de la bactérie. Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne.

L'étape 3 (alcool) sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ». En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycane - donc plus fine - qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile) ou le mélange alcool-acétone, et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une "couche" de peptidoglycane plus importante donc de ce fait ; plus épaisse. Elles resteront alors violettes.

L'étape 4 est une contre coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme (anonyme, 2001).

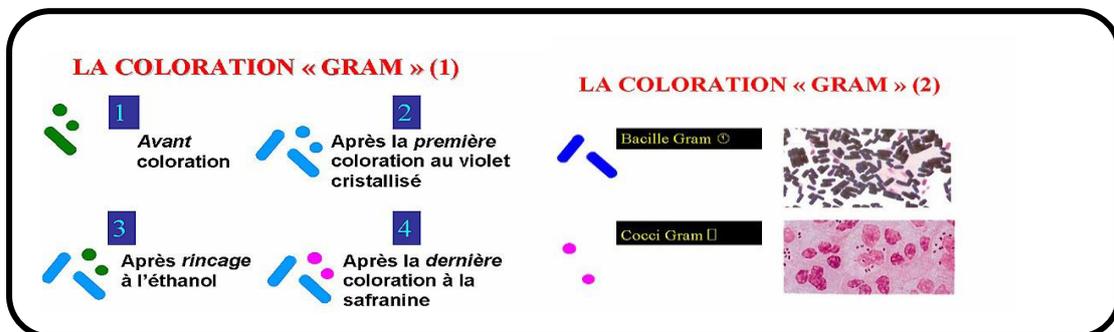


Figure 1

Etapes de la coloration de Gram

Annexe 2 : Tableaux de lectures et catalogues analytiques des galeries Api utilisées (selon le fournisseur : Bio Mérieux, France).

TABLEAU DE LECTURE				
TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO ₃	nitrate de potassium	réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min incolore / rose-rouge	
		réduction des nitrates en azote	Zn / 5 min rose / incolore	
TRP	tryptophane	formation d'indole	JAMES / immédiat incolore / rose vert pâle / jaune	
GLU	glucose	fermentation	bleu à vert	jaune
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	uréase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine	hydrolyse (β-glucosidase)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (à l'encre de chine)	hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophényl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	incolore	jaune
[GLU]	glucose	assimilation	transparence	trouble
[ARA]	arabinose	assimilation	transparence	trouble
[MNE]	mannose	assimilation	transparence	trouble
[MAN]	mannitol	assimilation	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	assimilation	transparence	trouble
[MAL]	maltose	assimilation	transparence	trouble
[GNT]	gluconate	assimilation	transparence	trouble
[CAP]	caprate	assimilation	transparence	trouble
[ADI]	adipate	assimilation	transparence	trouble
[MLT]	malate	assimilation	transparence	trouble
[CIT]	citrate	assimilation	transparence	trouble
[PAC]	phényl-acétate	assimilation	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Tableau 1
Tableau de lecture de la galerie Api 20 NE.

Figure 2
Catalogue analytique de la galerie Api 20 NE.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
[CIT]	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
H ₂ S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incolore / grisâtre	dépot noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	jaune	TDA / immédiat marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	incolore vert pâle / jaune	JAMES / immédiat rose
[VP]	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	incolore	VP 1 + VP 2 / 10 min rose / rouge (5)
[GEL]	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAmmose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-Oxydase	(voir notice du test oxydase)	

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.
 (2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.
 (3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).
 (4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
 (5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

Tableau 2
Tableau de lecture de la galerie Api 20 E.

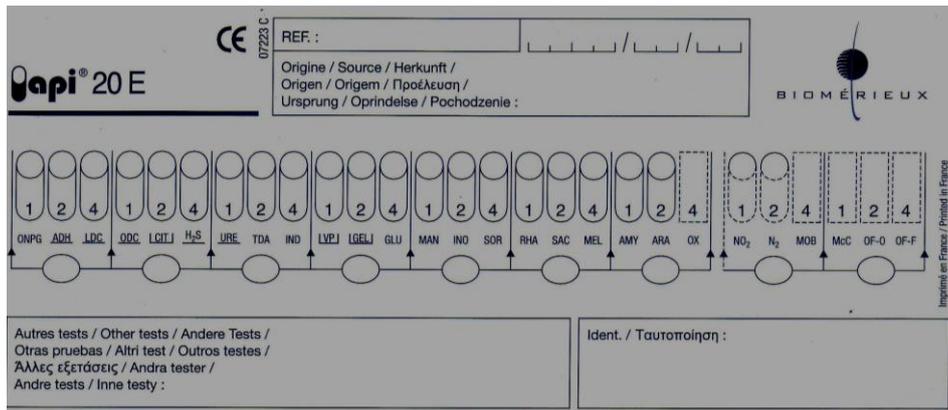


Figure 3
Catalogue analytique de la galerie Api 20 E.

TABLEAU DE LECTURE							
TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétolne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β-glucosidase (ESculine)	4 h		24 h	
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique-β-naphtylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM.A + ZYM.B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
αGAL	β-bromo-2-naphtyl-α-D-galactopyranoside	0,0376	α-GALactosidase	Incolore		Orange	
βGUR	acide naphtol-ASβI-glucuronique	0,0537	β-GLUcuRonidase	Incolore		Bleu	
βGAL	2-naphtyl-β-D-galactopyranoside	0,0306	β-GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine-β-naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
RIB	D-ribose	1,4	acidification (RIBose)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
ARA	L-arabinose	1,4	acidification (ARAbinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
SOR	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACTose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
INU	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
RAF	D-raffinose	3,12	acidification (RAFFinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
AMD	amidon (2)	2,56	acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
GLY	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

Tableau 3
Tableau de lecture de la galerie Api 20 Strep.

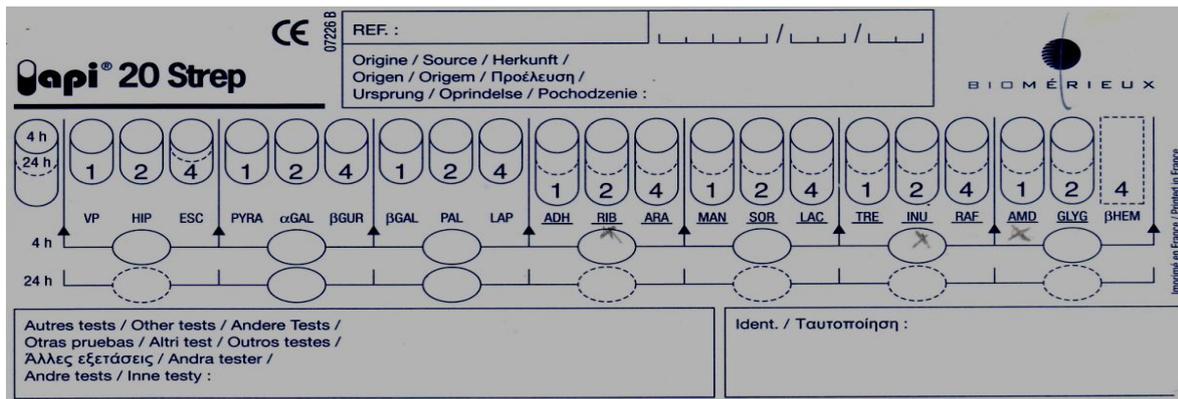


Figure 4
Catalogue analytique de la galerie Api 20 Strep.

READING TABLE					
TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
1) PEN	potassium benzylpenicillin	1.36	PENicillinase	blue (penicillinase absent)	yellow yellow-green yellow-blue (penicillinase present)
2) GLU	D-glucose	0.5	acidification (GLUcose)		
3) FRU	D-fructose	0.1	acidification (FRUctose)	red	yellow
4) MAL	D-maltose	0.1	acidification (MALtose)	red-orange	orange
5) SAC	D-saccharose (sucrose)	0.5	acidification (SACccharose)		
6) ODC	L-ornithine	0.552	Ornithine DeCarboxylase	yellow-green grey-green	blue
7) URE	urea	0.41	UREase	yellow	pink-violet
8a) LIP	5-bromo-3-indoxyl-caprate	0.033	LIPase	colorless pale grey	blue (+ precipitate)
9a) PAL	4-nitrophenyl-phosphate 2CHA	0.038	ALkaline Phosphatase	colorless pale yellow	yellow
10a) BGAL	4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.04	β GALactosidase	colorless	yellow
8b) ProA	proline-4-methoxy-β-naphthylamide	0.056	Proline Arylamidase if LIP is +, ProA is always -	ZYM B / 3 min yellow pale orange (brown if LIP +)	
9b) GGT	γ-glutamyl-4-methoxy-β-naphthylamide	0.049	Gamma Glutamyl Transferase	ZYM B / 3 min yellow pale orange (yellow-orange if PAL +)	
10b) IND	L-tryptophane	0.036	INDole	JAMES / 3 min colorless pink	

Tableau 4
Tableau de lecture de la galerie Api NH.

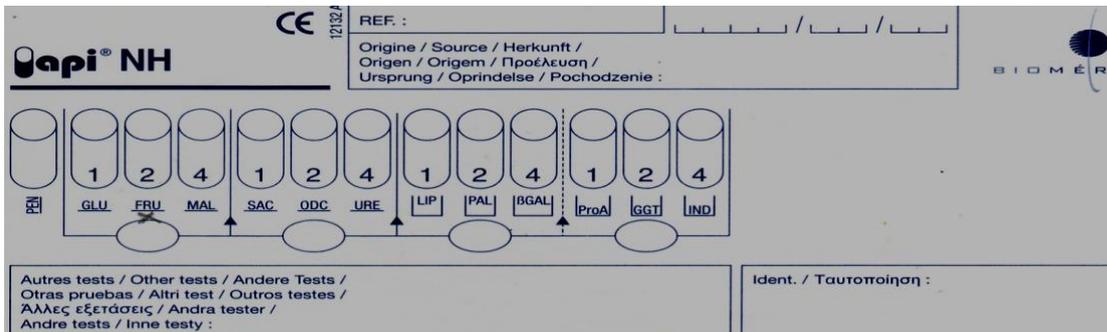


Figure 5
Catalogue analytique de la galerie Api NH.

READING TABLE					
TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
IND	L-tryptophane	0.98	INDole formation	XYL - mix / 2-3 min + EHR / 5 min yellow	red
URE	urea	0.648	UREase	yellow-orange	red
GLU MAN LAC	D-glucose D-mannitol D-lactose (bovine origin)	1.96 1.96 1.96	acidification (GLUcose) acidification (MANnitol) acidification (LACtose)	BCP	
SAC MAL SAL XYL ARA	D-saccharose (sucrose) D-maltose salicin D-xylose L-arabinose	1.86 1.96 1.64 1.64 1.64	acidification (SACcharose) acidification (MALtose) acidification (SALicin) acidification (XYLose) acidification (ARABinose)	purple	yellow / yellow-green
GEL	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	no diffusion of pigment (1) yellow (2)	diffusion of black pigment (1) brown-black (2)
ESC	esculin ferric citrate	0.36 0.11	hydrolysis (β-glucosidase) (ESCUlin)	in UV (365 nm) fluorescence no fluorescence	
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glycerol D-cellobiose D-mannose D-melezitose D-raffinose D-sorbitol L-rhamnose D-trehalose	1.82 1.86 1.96 1.96 2.18 2.18 1.96 1.96	acidification (GLYcerol) acidification (CELlobiose) acidification (ManNosE) acidification (MeLeZitose) acidification (RAFfinose) acidification (SORbitol) acidification (RHAmnose) acidification (TREhalose)	purple	yellow / yellow-green
CAT		-	CATalase	After 30 min in air H ₂ O ₂ in a positive tube no bubbles bubbles	
SPOR		-	spores	absent	present
GRAM		-	Gram reaction	pink	violet
COCC		-	morphology	rod	coccus

Tableau 5
Tableau de lecture de la galerie Api 20 A.

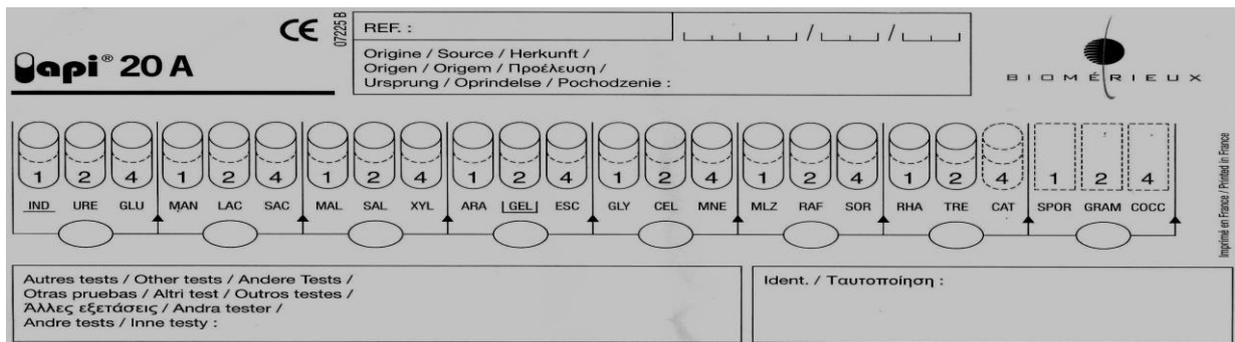


Figure 6
Catalogue analytique de la galerie Api 20 A.

Sugar assimilation tests	GAL	Galactose	Blue (a) or Green	Yellow (b) or Colourless
	LAC	Lactose		
	RAF	Raffinose		
	INO	Inositol		
	CEL	Cellobiose		
	TRE	Trehalose		
	ADO	Adonitol		
	MEL	Melezitose		
	XYL	Xylose		
	ARA	Arabinose		
	Enzyme tests	HEX		
POX/PRO		Detection of the phenoloxydase activity of <i>Cryptococcus neoformans</i> (POX)	Colourless or	Brown

Tableau 6
Tableau de lecture de la galerie Api AUXACOLOR™ 2.

AUXACOLOR™ 2

12# REF

	C.Neg	GLU.	MAL	SAC.	GAL.	LAC.	RAF.	INO.	CEL.	TRE.	ADO.	MEL.	XYL.	ARA.	HEX.	POX./PRO.	PI.	AR.	CA.	MY. PS-MY.	CHL. 37°C		
24 h	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	+	+	+	+	+	+
48 h	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-
72 h	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-	-
		1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4	⊕/⊖	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1 2 4			

Identification / Identificación / Identifizierung :
 Identificazione / Identificação / Identifikation :

880133

Figure 7
Catalogue analytique de la galerie Api AUXACOLOR™ 2.

Annexe 3: Marqueur de taille (ADN phage λ digéré avec Hind. III)


SIGMA

3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
 Fax (314) 286-7828
 email: techserv@sial.com
 sigma-aldrich.com

Product Information

RESTRICTION ENDONUCLEASE Hind III

Product No. R 1137
 Storage: 0 to -20 °C

PRODUCT SUMMARY

Recognition Sequence: 5'A/AGCTT'3
 Activity: 10,000 units/ml
 Cutting: 100%
 Ligation: >95%
 Recutting: >95%
 No degradation detected with >30 units for 16 hrs.
 Fold over digestion: 480 (30 units x 16 hrs.)
 Package Size: 1,000 units and 5,000 units

Specificity
 Hind III recognizes the sequence A/AGCTT and generates fragments with 5'-cohesive termini.¹ Hind III is inhibited by N-methyladenine and 5'-methyl and 5'-hydroxymethylcytosine at ^mA/AG^mCTT. The recognition specificity of Hind III is altered by addition of increasing amounts of hydrophobic reagents and glycerol to the incubation mixture. This activity is named Hind III activity.

Comments
 Digestion Buffer SB is supplied as a 10x concentrate.

Information is not available for heat inactivation of Hind III.

Hind III Storage and Dilution Buffer Composition
 10 mM Tris-HCl
 250 mM NaCl
 0.1 mM EDTA
 1.0 mM dithioerythritol
 50% (v/v) glycerol
 pH 7.5

QUALITY CONTROL TESTING

1x Digestion Buffer SB (B 8781) Composition for Hind III: 100 % Digestion at 37 °C.
 10 mM Tris-HCl
 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 1 mM 2-mercaptoethanol
 pH 8.0

Unit Definition
 One unit is the enzyme activity that completely cleaves 1 μ g λ DNA in 1 hr. at 37 °C in a total volume of 25 μ l of Buffer SB for restriction enzymes.

Absence of unspecific endonuclease activities:
 1 μ g λ DNA or T7DNA is incubated for 16 hrs. in 50 μ l buffer SB with excess units of Hind III.

Ligation and Recutting Assay
 Hind III fragments obtained by complete digestion of 1 μ g λ DNA are adjusted to pH 7.5 at 20 °C. The Hind III fragments are then ligated with 0.1 unit T4-DNA ligase at pH 7.5 at 4 °C. A 10 μ l reaction mixture, incubated for 16 hrs. at 4 °C, contained: 0.1 unit T4-DNA ligase, 66 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithioerythritol, and 1 mM ATP.

The degree of ligation and subsequent recutting with Hind III to yield the typical pattern of λ x Hind III fragments is determined.

References
 1. Old, R., et al., J. Mol. Biol., 92, 331(1975).

9/99

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.
 Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications.
 Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.
 Please see reverse side of the invoice or packing slip.

Figure 8
Enzyme de restriction Hind III.



3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone (800) 325-5832 (314) 771-5765
 Fax (314) 286-7328
 email: techserv@sial.com
 sigma-aldrich.com

Product Information

Lambda phage DNA

Methylated
 from *Escherichia coli* host strain W3110

Product Number **D 9768**
 Storage Temperature 2–8 °C

CAS# 91080-14-7

Product Description

The lambda phage has an icosahedral head and a long tail terminating in a single fiber. At both ends of the 5' termini are complementary 12-nucleotide single strand sequences that contribute to the cohesive ends (*cos* region) of the lambda DNA. The tail of the phage latches on the host outer membrane receptor and injects phage DNA into the cell. The phage converts the *E. coli* to a lysogenic state in which the phage functions are repressed and the phage genome may remain dormant (prophage) for a long time. This property is seen in bacteriophages that carry CII and CIII genes that are responsible for CI expression. Bacteriophages with CI mutation in the CI gene are able to maintain a lysogenic state at defined temperatures.

Infecting *E. coli* strain W3110 with lambda C1857 strain creates *E. coli* lysogen cultures. The phage is released from *E. coli* cell pellets by lysing with a high salt buffer, pH 8.0. The crude mixture is passed through a series of enzymatic steps, multiple cesium gradients, and phage DNA is dialyzed against 1 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 1 mM magnesium chloride. The DNA is phenol-chloroform extracted and then lyophilized from a solution in 1 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM NaCl, 1 mM EDTA.

This product is provided as a lyophilized powder.

Molecular weight: 48,502 bp (31.5×10^3 kDa)

Source: *Escherichia coli* W3110
 Strain: *λ*C1857, Sam 7

One A_{260} unit is equivalent to ~50 µg of DNA.

Lambda phage DNA is a suitable substrate for restriction endonucleases. Unique sites include *Apa* I, *Nae* I, *Nar* I, *Nhe* I, *Pae*R7 I, *Sna*B I, *Xba* I, and *Xho* I. Methylated lambda is partially cleaved by *Bcl* I, *Cla* I, *Mbo* I, *Mbo* II, *Taq* I and *Xba* I.

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

Store at 2–8 °C.

References

1. Sanger, F., et al., Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.*, **162**, 729-773 (1982)
2. Bacteriophage lambda, complete genome, NCBI Accession: NC_001416.

KTA 09/05-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.
 Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications.
 Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.
 Please see reverse side of the invoice or packing slip.

Figure 9
Marqueur de taille (ADN phage λ digéré avec Hind III).

Annexe 4: Caractéristique de la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi*.

Table 2. Comparison of bacteriological characteristics between present isolates and reference strains						
Characteristics	Present isolates from chestnut (144)	Reference strains				
		<i>Pseudomonas syringae</i>				
		pv. <i>eribotryae</i> ^{a,b}	A	B	C	pv. <i>syringae</i> ^b pv. <i>morsprunorum</i> ^b NCCPB 524 NCCPB 330
Gram reaction	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-
Kovacs oxidase	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-
Liquefaction of gelatin	-	-	-	-	+	-
Gluconate test	-	-	-	-	-	-
Pyocyanin production	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer reaction	-	-	-	-	-	-
Methyl-Red test	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-	-
Coagulation of milk	-	-	-	-	-	-
Survival for more than 10 days on NA containing 5% sucrose	-	-	-	-	+	-
Levan formation	+	+	+	+	+	+
OF test	0	0	0	0	0	0
NaCl tolerance (%)	4~6	4~6	4~6	4~6	4~6	4~6
Motility	+	+	+	+	+	+
Fluorescent pigment production	+	+	+	+	+	+
Alkali production in litmus milk	+	+	+	+	+	+
Tobacco hypersensitivity reaction	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of						
Tween 80	+	+	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+	+	+
Catalase activity	+	+	+	+	+	+
Growth at 35 C	+	+	+	+	+	+
Utilization of Lactate	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+
Acid production from						
Maltose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	+	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	-	-	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	-	+	+	+

Tableau 7

Caractéristique de la sous espèce *P. syringae* pv. *savastanoi* (Lelliott & Stead, 1987).

6- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

➤ Références bibliographiques en français :

- **Azad, H et Cooksey, D. (1995).** Un milieu semi sélective pour détecter les populations épiphytes et systémiques de *Pseudomonas syringae* de lauriers roses. *Phytopathologie* **85**:740-745.
- **Allaire, M. (2005).** Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Maîtrise en microbiologie agricole. Université laval, Faculté des Sciences De L'agriculture et De L'alimentation. 22-25p.
- **Bahri, F. (1997).** Effet de la salinité sur la croissance de huit (08) souches de *Rhizobium ciceri* isolées de certaines régions de Mostaganem. Thèse de Magister, Centre Universitaire de Mostaganem. 105p.
- **Belaskri, A. (2006).** Incidence de la maladie du Grown gall de l'Eucalyptus dans les pépinières forestières de l'Ouest Algérien. Diplôme d'Etudes Universitaire Supérieure. Option Microbiologique. Université d'ORAN (Es - Sénia). 30-35p.
- **Benizri, E., Baudoin, E., Di Battista, L et Guckert, A. (2001).** Des bactéries pour la santé des plantes. *Bio futur Vol. 210* :52-56.
- **Benjama, A. (2003).** Méthode d'évaluation rapide du degré d'attaque de l'olivier par la tuberculose causée par *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, en verger au Maroc. *Fruits. 58* : 213-219. DOI : 10.1051/fruits : 2003009.
- **Benchabane, M. (2002).** Communication sur l'effet antagoniste de *P. fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate causée par *Fusarium oxysporum* F. sp. *Lycopersici*, 11/12/2002. 23 p.
- **Chikhi, Z et Demouche, H. (2010).** Les bactéries multi résistantes à Oran. Diplôme d'Etudes Universitaire Supérieure. Option Microbiologique. Université d'ORAN (Es – Sénia). 24-30 p.
- **Cook, R., Bruckart, W., Coulson, J., Goettel, M., Lumsden, R., Maddox, J., McManus, M., Moore, L., Meyer, S., Quimby, P., Stack, J et Vaughn, J. (1996).** Sécurité des micro-organismes destinés à la lutte antiparasitaire et de lutte contre les maladies des plantes: un cadre pour l'évaluation scientifique. *Biol. Contrôle.* 14-24p.
- **Cottier, A. (1999).** *Les olives de table et leur cueillette à votre assiette*, Eds. Edison. 25p.
- **Courboulex, M. (2002).** *La culture de l'olivier*. Eds. De Vecchi S .A-Paris. 9-35 p.
- **Couvalin, P. (2007) :** La résistance des bactéries aux antibiotiques : Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull. Acad. Vét. France* 2008 Tome 161 - N°1. 7-12p.

6-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Dahmani, H. (2010).** Isolement et caractérisation des souches de *Rhizobium* isolées des nodules de *Rétama monosperma*. Mémoire de Master de l'université d'Oran (USTO-MB). Option : Exploitation des Interactions Plantes – Microorganisme. 22-25p.
- **Digat, B. (1994).** Les bactéries stimulatrices de la croissance des plantes : le cas des *Pseudomonas*. C.R.Acad . Agric. fr. **80** : 125-140.
- **Duhoux, E et Nicole, M. (2004).** Biologie végétale : associations et interactions chez les plantes. Atlas, Dunod, Paris. 166 p.
- **Emmanuelle, B et El Amari. (2004).** Traitement et pronostic des Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse n° 10406. Thèse présentée à la Faculté de Médecine De l'Université de Genève pour obtenir le grade de docteur en médecine.
- **Ghiab, F. (2004).** Isolement des champignons du sol. Diplôme d'ingénieur en biotechnologie. Option : Génie Microbiologique. Université d'ORAN (Es – Sénia).
- **Giani, B. (2006).** *L'huile d'olive*, éditions equinoxe, collection « Carrés Gourmands ». 28 p.
- **Gabed, N. (2006).** Etude des interactions entre les souches de *Rhizobium* « Mise en évidence d'inhibition ». Diplôme d'ingénieur en biotechnologie. Option : Génie Microbiologique. Université d'ORAN (Es – Sénia).
- **Guignard, J.L ., Dupont, F. (2004) :** Botanique : systématique moléculaire. 13^{ème} Eds, Masson. Paris. France. 164-179p.
- **Iacobellis, N. S. (2001).** Olive Knot. In, « Encyclopaedia of Plant Pathologie ». Vol. 2. (Eds Oc Malloy. ID Murroy). 713-715p.
- **Janse, J. D. (1991).** Discrimination des pathovars au sein de *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* utilisant des acides gras des cellules entières et la pathogénicité comme critères. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**:79-84.
- **Juillard, V., Spindler, H., Desmazeaud, M et Boquien, C. (1987).** Phénomène de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait*, **67** :149-172.
- **Kazouz, H. (2008).** Détection et caractérisation des bactériocines produites par des souches de *Rhizobia* isolées de différentes régions d'Algérie. Mémoire de magister de l'université d'ORAN (Es – Sénia). 22-29p.
- **King, E. O., Ward, M. K et Raney, D. E. (1954).** Deux médias simples pour la démonstration de pyocyanine et de fluorescéine. *J. Lab. Clin. Med.* **44**:301-307.
- **Lise, V et Michel, L. (2004).** Communication sur les tests biochimiques classiques pour l'identification des *Pectobacterium (Erwinia Pectinolytique)* et des *Pseudomonas* fluorescents (Direction de l'innovation scientifique et technologique). 28-30 p.

6-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Lavermicocca, P., Lonigro, S.L. et Andolfi, A. (1999).** La production par bactériocine *Pseudomonas syringae* pv. *Ciccaronei* NCPPB2355 *ciccaronei*. Isolement et caractérisation partielle du composé antimicrobien. *J. Appl. Microbiol.* **86**:257-265.
- **Mazzola, M et White, F. (1994).** Une mutation de l'indole-3-acétique voie de biosynthèse de l'acide *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecte la croissance dans *Phaseolus vulgaris* et la production syringomycin. *J. Bacteriol.* **176**:1374-1382.
- **Pascal, A et Sylvie, J. (2009).** Communication sur les effets antagonistes de la souche *P. fluorescens* C7R12 vis-à-vis de souches de *L. monocytogenes*. 35p.
- **Philippe, L. (2007).** Les procaryotes phytopathogènes. Chapitre 4 de phytopathologie. Ed; Freeman, New York. 432p.
- **Smidt, M et Kosuge, T. (2000).** Le rôle de l'indole-3-acétique par l'accumulation d'acide alpha-méthyl-tryptophane mutants résistants du *Pseudomonas syringae* dans la formation de galles au laurier-rose. *Physiol. Plant Pathol.* **13**:203-214.
- **Surico, G et Lavermicocca, P. (1989).** Un milieu semi sélective pour l'isolement de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytopathology.* **79**:185-190.
- **Saadi, S. (2009).** Détection et caractérisation de bactériocines produites par des souches de *Rhizobium* contre des souches de *Pseudomonas* (*P. savastanoi* phytopathogène). Mémoire de Magister en Biotechnologie de l'université d'Oran (USTO). 3-38p.
- **Selami, N. (2001).** Contribution à l'étude de *Rétama monosperma*. Etude du système racinaire et recherche des associations de type *Rhizobium*. Diplôme d'ingénieur en Biotechnologie. Option : Production et Valorisation Végétales. Université d'ORAN (USTO- MB). 2-9p.
- **Sekkour, S. (2008).** Essai d'introduction d'un couple symbiotique *Rhizobium –Acacia s'aligna* pour la revégétalisation de la sablière de Sidi Lakhdar (Wilaya de Mostaganem). Mémoire de Magister de l'université d'Oran (Es – Sénia). 23-26p.
- **Senhadji, A. (2005).** Problématique de la tuberculose de l'olivier dans le plateau du Saiss. Journée nationale sur la protection de l'olivier, Marrakech. le 27 mai 2005. 12p.
- **Tourte, Y., Bordonean, M et Henry, M. (2005).** *Le monde des végétales* : organisations, Physiologie et génomique. Eds. DUNOD. Paris. France. 25-26p.
- **Vidaver, A. K. (1976).** Les perspectives pour le contrôle des bactéries phytopathogènes par les bactériophages et les bactériocines. *Annu. Phytopathol Rev.* **14**:451-465.
- **Young, J. M. et Triggs, C. M. (1994).** L'évaluation des tests déterminant pour pathovars de *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. *J. Appl. Bacteriol.* **77**:195-207.

➤ Références bibliographiques en anglais :

- **Anderson, D.G. and McKay, L. L. (1983).** Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from Lactic *streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 549-552.
- **Appunu, C and Dhar, D. (2006).** Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. *African Journal of Biotechnology* .Vol. 5(10): 842-845p.
- **Ali, S. F., Rawat, L. S ., Meghvansi, M. K. and Mahna, S. K. (2009).** Selection of stress tolerant *rhizobial* isolates of wild legumes growing in dry region of Rajasthan, India. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*. Vol. 4, N°1.
- **Bauer, A.W and Kirby, W. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin Pathol.* **45**: 493-496.
- **Barefoot, S, F and Klaenhammer, T. R .(1983).** Detection and activity of lactacin B, a bactériocin produced by *L. acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology.* **45**: 1808-1815.
- **Barefoot, S. F., Harmon, K. M., Grinstead, D. and Nettles, G. (1992).** Bactériocine, moléculaire biology In: *Encyclopédia of Microbiology*, Vol, J. Lederberg. (Ed). Academic, San Diego. 191-202p.
- **Bartolini, G and Petrucci, R. (2002).** Classification, origin, diffusion and history of the olive. FAO (Ed), Rome: 26-28p.
- **Bergsma, V. M., M. E. Prins., Staats, M and Raaijmakers, J. M. (2005).** Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing *Pseudomonas* species in the rhizosphère by Denaturing gradient gel électrophoresis. *Applied and Environnemental Microbiology.* **71**: 993-1003.
- **Bien, E. D., Eicholorn, K and Plapp, R (1990).** Isolation and characterization of *Agrobactérium tumefaciens* from the German Vineregion. Rheinpfalz. *J. Plant Disea. Protea.* **97**: 313-322.
- **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X and Gardan, L. (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomies.* **20**:51-53.
- **Botelho, G. R and Leda, C. M. (2006).** Fluorescent *Pseudomonad* associated with the rhizosphère of Crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology.* **37**: 401-416.
- **Braun, V., Pils, H and Grob, P. (1994).** The ecological rôle bactériocins in the bacterial competition. *Trends Microbiology.* **17**: 151-158.
- **Bibel, D. J., Rly, A. R., Bayles, C., Strauss, W ., Shinefield, G and Maibach, H. I. (1983).** Competitive adherence as a mechanism of bacterial interference. *Can. J. Microbiol.* **29**:700-703.

6-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Berry, E. D., Liewen, M. B., Mandigo, R.W and Hutkins, R.W. (1990).** Inhibition of *Listéria monocytogenes* by bactériocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semi- drysausage. *J. Food Prot.* **53**: 194-197.
- **Bergensen, F. J. (1961).** The growth of *Rhizobium* in synthétic media .*Aust. J. Biol. Sci.* **14**: 349-360.
- **Bergey's. (1984).** Manuel of systematic bacteriology. Vol. 1(Ed) Noel, R., Krieg. Paris. 122p.
- **Bradbury, J. F. (1986).** *Guide to Plant Pathogenic Bactéria.* CAB International Mycological Institute, Kew, UK. 332p.
- **Correa, O.S and Barneix, A. J. (1997).** Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 153-157p.
- **Chin, A. T. F. Woeng ., G. V., Bloemberg and Lugtenberg, B. J. (2003).** Phenazines and their role in bio control by *Pseudomonas* bacteria. *New. Phyto.* **157**: 503-523.
- **Duffy, B., Schouten, A and Raaijmakers, J. M. (2003).** Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**:501-538.
- **Dwevedi, D and Johri, B. N. (2003).** Antifungals from fluorescent *Pseudomonads* : Biosynthesis and regulation. *Curr. Sci.* Vol. 85, No. 12. 1693-1673p.
- **Daba, H ., Lacroix, C ., Huang, J and Simard, R. E.(1993) .** Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *leuconostoc mesenteroïdes*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **39**:166-173.
- **Ellis, R. J., T. M., Timms, W and Bailey, M. J. (2000).** Identification of conserved traits in fluorescent *Pseudomonads* with antifungal activity. *Environ. Microbiol.* **2**:274-28.
- **Elkan, G. H. (1992).** Taxonomy of *Rhizobia*. *Canadian, Journal of Microbiology.* **38**: 446-450.
- **Fleming, H . P., J. L and Costilow, R. N. (1975).** Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Applied and Environmental Microbiology.***30**: 1040-1042.
- **Frederickson, A. G. (1977).** Behaviour of mixed cultures of micro organisms. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**, 63-87.
- **Frey, P., Chavatte, M., Clause, M. L., Courrier, S., Le Roux, C., Gloria, G., Botelho, R and Ieda cristina, H. (2006).** Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphère of crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology.* **37**:401-416.

- **Gardan, L ., Bollet, C ., Abu Ghorrah, M ., Grimont, F and Grimont, P. A. (1992) .** DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bactériology*. **42**: 606-12.
- **Gloux, K., and Rudulier, D. (1989).** Transport and catabolism of proline betaine in salt Stressed *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* N°151. 143-148p.
- **Gloria, R. Botelho and Leda cristina, M. H. (2006).** Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. **37**: 401-416.
- **Graham, P. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradirhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. **38**: 475-484.
- **Gross, D.C. and Vidaver, A. K. (1978).** Bactériocins-like substance produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*. **36**: 936-943.
- **Girlanda, M ., Perotto, S ., Moenne,Y., Bergero, R., Lazzari,A., Defago,G ., Bonfante, P and Luppi, A.M.(2001).** Impact of bio control *Pseudomonas fluorescens* CHAO and a genetically modified derivative on the diversity of cultivable fungi in the cucumber rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1851-1864.
- **Haas, D and Défago, G (2005).** Biological control of soil – borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nature Rev. Microbial.* **3(4)**: 307-349.
- **Hafeez, F. Y., Naeem, F. I; Naeem, R., Zaidi, A. H. And Malik, K. A. (2005).** Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* pv. *Viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad. *Environ. Experimental of. Botanany.* **54**: 142-147.
- **Hall, B. H., Cother, E. J., Whattam, M., Noble, D., Luck, J and Cartwright, D. (2004).** First report of olive Knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* on olives (*Olea europea*) in Australia. *Australasian. Plant. Pathology.* **33**: 219-228.
- **Hirsch, P. R. (1979).** Plasmid determined bacteriocin production by *Rhizobium Léguminosarum*. *Journal of General Microbiology.* **113**: 219-228.
- **Hildebrand, D.C. (1971).** *Pectate and pectin gels for differentiation of Pseudomonas sp. and other bacterial plant pathogens.* **12**: 1430-1436.
- **Hamdan, H., Weller, D.M and L. S. Thomashow. (1991).** Relative importance of Fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3270-3277.
- **Innoel, R., Krieg, G and John, H. (1987).** Bergeys manual of systematic bactériology. Vol.1. Williams and wilkins baltimore. Md.

6-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Icobellis, N. S. (2001).** Olive Knot. In “*Encyclopaedia of Plant Pathology*” Vol. 2. (Eds OC Malloy, TD Murray). 713-715p. (John Wiley and Sons).
- **Jimenez, D. R., Rio sanchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz, B and Piard, J.C. (1993).** Plantaricins S and T, two new bactériocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPC0100 Isolated from green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbial.* **59**:1416-1424.
- **Kacem, M., Zadi, K. H and Karam, N. (2005).** Detection and activity of plantaricin OL15, a bactériocin produced by *lactobacillus plantarum* isolated from Algerian fermented olives, *Grasas Y Aceites* (Spain). **56**: 192-197.
- **Kacem, M., Zadi, K .H. and Karam, N. (2006).** Testing of *lactobacillus plantarum* isolates from fermented green olives for their inhibitory activity against lactic acid bacteria and characterization of a bactériocine- like substance produced by *L. plantarum* OT2 isolate. *Dirasat, Pure Sciences.* **33**: 224-234.
- **Kacem, M., Kazouz, F., Meraber, C., Rezki, M., Delajudie, P and Bekki, A. (2009).** Antimicrobial activities of *Rhizobium* sp. Strains against *Pseudomonas savastanoi*, the agent for the olive Knot disease in Algéria . *Grasas Y Aceites.* **60 (2)**: 139-146.
- **Keyser, H. H and Munns, D. N. (1979).** Acid tolerance of *Rhizobia* in culture and in Symbiosis with Cowpea. *SOIL SCI. SOC. AM. J.*, VOL. 42-52p.
- **Klaenhammer, T. R. (1988).** Bactériocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**: 337-349.
- **Klaenhammer, T. R. (1993).** Genetics of bactériocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Biological.* **12** : 39-86.
- **Konisky, J. (1982).** Colicins and other bactériocins with an established mode of action. *Annu. Rev. Microbiol.* **63** :125-144.
- **Lugtenberg, B. J., Chin, A.W.T. F and Bloemberg, G.V. (2002).** Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**:373-383.
- **Lotz, W and Mayer, F. (1982).** Isolation and characterization of a bactériophage tail – like bactériocin from a strain of *Rhizobium*. *Journal of Virology.* **9**: 160-173.
- **Lelliott, R. A and Stead, D. E. (1987).** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology.* Vol.2. 182-193p. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection.
- **Montville, T.J. and Kaiser, A.L. (1993).** Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relations hip to bactériocins. In “*Bactériocins of Lactic Acid Bacteria*”., D.G.Hoover et L.R. Steenson ,Ed., Academic Press Inc . (San Diego, USA). 1-22p.
- **Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. G., Phillips, G and Thomashow, L. S. (2001).** Genetic diversity of phlD from 2,4-DAPG-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* **91**: 35-43.

- **Nielsen, J. W., Dickson, J.S. and Crousse, J.D. (1990).** Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2142-2145.
- **Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, I.S., Sletten, Kand Nes, I.F. (1992).** Anovel lactococcal bactériocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* **174**: 5686-5692.
- **Odum E.P. (1953).** *Fundamentals of Ecology*. Saunders, Philadelphia. 1-11p.
- **Puci, M. J., Vedamaathu, E. R., Kunka, B. S and Vandenberg, P. A. (1988) .** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bactériocin PA -1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1-0. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2349-2353.
- **Picard, C ., Frascaroli, E and Bosco, M. (1992).** Frenquency and biodiversity of 2,4-Diacetylphoroglucinol-producing rhizobacteria are differentially affected by the genotype of two maize inbred lines and their hybrid. *Fems. Microbiol. Ecol.* **49**:207-215.
- **Philippe, L. (2007).** Les procaryotes phythopathogènes chapitre 4 de phytopathologie 2^{ème} Eds., Freeman, New York. 432p.
- **Rathore, M.S., Shekhawat, N.S and Gehlot, H.S. (2000).** Need of assessing *Rhizobia* for their plant growth promoting activities associated with native wild legumes inhabiting aravalli ranges of Rajasthan, *India. Botany Research International* 2. 115-12p.
- **Quesada, J. M., Penyalver, R. and Lopez , M. M.(2008).** Epidemiological Basis for an Efficient Control of *Pseudomonas savastanoi* pv . *savastanoi* on olive Trees. springer Science + Business Media B.V . DOI : 10.1007/978-1-4020-6901. **7**: 57-64.
- **Raaijmakers, M., Funnell, M. D. L. and Raaijmakers, J. M. (2005).** Weath cultivar-specific selection of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species from resident soil populations. *Microb. Ecol.* **48**: 338-3484.
- **Raaijmakers, J. M., Vlami, M and Desouza, J.T. (2002).** Antibiotic production by Bacterial bio control agents. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **81**:537-547.
- **Ramette, A.Y., Moëne, L and Défago, G. (2003).** Prevalence of fluorescents *Pseudomonads* producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils Naturally suppressive or conductive to tobacco black root rot. *FEMS. Microbiol*: 35-43p.
- **Rodelas, B., Gonzalez, L ., Salmeron,J ., Martinez, V and Pozo, C. (1998).** Symbiotic effectiveness and bactériocin by *Rhizobium leguminosarum* pv. *viceae* isolated from agricultural soils in Spain. *Applied of Soil Ecology.* **8**: 51-60.
- **Riley, M. A. (1998).** Molecular mechanisms of bactériocin evolution. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 255-278.
- **Roslycky, E. B. (1967).** Bactériocin production in the *Rhizobia* bactéria. *Canadian journal of Microbiology.* **13** : 431-432.

- **Savastano, L . (1987).** Tuberculosi , iperplasie tumpru dell' olivo. *Annali della Regia Scuola Superiore di Agraria di Portic . 5:* 1-117.
- **Schaad, N.W. (1988).** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2^{ème} Eds. 44-81p.
- **Sridevi, M and Mallaiah, K.V. (2008).** Production of Bactériocins by root nodule bacteria. *International journal of Agricultural Reseach. 3:* 167-165.
- **Schroth, M.N., Hillenbr and Panopoulos, N .(2006).** Phytopathologinic *Pseudomonads* and Related Plant – Associated *Pseudomonads*. *Prokaryotes. 6:* 714-740. DOI/10.1007/0-387-30746-23.
- **Schwingamer, E. A. (1975).** Properties of some bactériocins produced by *Rhizobium tyrifolii*. *J. Gen. Microbial. 91:* 403-413.
- **Scortichini, M ., Rossi , M . P and Salerno, M. (2004).** Relations hip of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populationd from Italian olive trees and patterns of host génetic diversity . *Plant. Pathology. 53:* 491-197.
- **Schillinger, U., Kaya, M and Lucke, F .K (1991).** Behaviour of *Listeria monocytogènes* in meat and its control by a bactériocin- producing strain of *Lactobacillus sake*. *J. Appl. Bactriol. 70:*473-478.
- **Schved, F., Lindner, P and Juven, B. J. (1994).** Identification and first characterization of bactériocins produced by lactic acid bacteria isolated from ovine cheese Pecorino del Poro. *Int. J. Dairy. Technol. 1-* 6p.
- **Somasegaran, P and Hoben, H. J. (1994).** Handbook for *Rhizobia*. Springer verlage New York.Inc. 450p.
- **Tilak, K. V. B. R ., Ranganayaki, N., Pal, K. K., Saxena, A. K., Shekhar, C., Shilpi ,M., Tripathi, A. K and Johri, B. N. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, Vol. 89, N° 1. 136-150p.
- **Tagg, J. R ., Dajani, A and Wannamaker, L.W. (1976).** Bactériocins of Gram positive *Bacteriology Review. 40:* 722-756.
- **Toba , T., Samant, S.K ., Yoshioka, E and Itoh, T. (1991).** Reuterin 6, a new bactériocine produced by *Lactobacillus reuteri* LA.6- *Letter of Applied Microbiology. 13:* 281-286.
- **Vincent, J.M. (1977).** Root nodule symbiosis with *Rhizobium* . In the biology of nitrogen fixation quispel. A. Eds. North – Holland. Amsterdam. 256-341p.
- **Whipps, J. M. (2001).** Microbial interaction and bio control in the rhizosphère. *J. Exp. Bot. 52:* 487-511.
- **Walsh, U. F., Morrissey, J.P and O'Gara, F. (2001).** *Pseudomonas* for bio control of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnology. 12:*289-295.

- **Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B and Thomashow, L.S. (2002).** Microbial populations for specific soil suppressive ness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* **40**:309-348.
- **Walsh, C. (2003).** Antibiotics: actions, origins, resistance, American society for *Microbiology Press*. Washington, D.C. 26p.
- **Wimalajeewa, D. L. S and Flett, J. D. (1985).** A study of populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on stone fruits in Victoria. *Plant. Pathology.* **34**: 248-254.
- **Young, J. M. (2004).** Olive knot disease and its pathogens. *Australasian Plant Pathology.* **33**: 34-39.
- **Yang, R., Johnson, M.C and Ray, B. (1992).** Novel method to extract large amounts of bactériocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3355-3359.
- **Zahran, H.H., Karsitol, A. M and Lindstrom, K. (1994).** Alternation of lipopolysaccharides and protéin profiles in SDS-PAGE of *Rhizobia* by osmotic and heat stress. *Word J. Microbial. Bio tech.* **10**: 100-105.

➤ Bibliog. Net.

- **Anonymous, (2001).** *Pseudomonas syringae* sp. *savastanoi* pv. *oleae*.
<http://www.inra.fr/internet/produits/HYP3/pathogen/6pssysa.htm>.
- **Anonymous, (2003).** Olive Knot Information.
http://www.australianolives.com.au/chempermits/archives/olive_knot.htm.
- **Anonymous, (2003).** UC pest Management Guidelines, Olive knot.
[http://www. Actaho Http://www.inra.fr/internet/produits/HYP3/pathogen/6pssysa.htm](http://www.ActahoHttp://www.inra.fr/internet/produits/HYP3/pathogen/6pssysa.htm).
- **Anonyme. (2006).** le Magreb-Quotidien de l'économie-édition du 26/11/2006.
<http://www.agroconsult.org>.

➤ Numéro de Téléphones utilisées.

- Société Azo chime : 041 36-47-41.
- Société Khoyati:041 45-73-10. /041 45-38-24.
- Société F.midale : 048 57-66-01.

Résumé – Isolement et caractérisation des souches de *Pseudomonas* à partir du sol et des nécroses d'oliviers.

Ce travail est consacré à l'isolement de souches de *Pseudomonas* à partir de sol (40 échantillons) et des nécroses d'oliviers (30 échantillons) cultivés en Algérie (régions d'Ain Temouchent et Sig). Cela nous a conduit à isoler 20 souches de *P. aeruginosa*, 15 souches de *P. fluorescens* et 5 souches de *P. syringae*. Les souches isolées ont été caractérisées et identifiées par des méthodes microbiologiques, biochimiques et génétiques.

Quarante (40) souches de *Rhizobium*, 35 de *Pseudomonas* et 2 champignons (*Aspergillus niger* **AS4** et *Penicillium citrinium* **PS12**) ont été étudiées pour leur activité antagonique contre cinq souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* l'agent causal de la maladie des nœuds d'olives. Ceci nous a permis de sélectionner 20 souches inhibitrices (16 souches de *Rhizobium* et 4 de *P. fluorescens*) et les deux champignons.

Afin de déterminer la nature des agents inhibiteurs celui qui est produit par la souche de *Rhizobium* RNU9 et la souche de *P. fluorescens* PN5, les surnageants ont été caractérisés vis-à-vis de la température, du pH, des détergents (SDS, Tween 80 et le Tween 20) et des protéases. Le mode d'action de l'agent antibactérien est également recherché.

Les résultats ont révélé que les deux agents inhibiteurs sont bactéricides, thermolabiles, sensibles au SDS, au Tween 80 au Tween 20 et aux protéases. Les deux agents ont montré une résistance aux pH (6, 7 et 8) mais une sensibilité aux pH basiques (9 et 10) et pH acide (2). De plus ces mêmes agents inhibiteurs ont montré une résistance à 50°C et 80°C mais une sensibilité à 100°C, à 0°C et à +4°C. Le test d'infection des arbres d'oliviers par les souches de *P. syringae* pv. *savastanoi* a montré l'apparition des galles ce qui confirme bien que nos souches de *P. syringae* étaient bien des souches de *Pseudomonas* phytopathogènes.

Mots clés : *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, antagonisme, oliviers, phytopathologie, bactériocine.

Abstract - Insulation and characterization of the stocks of *Pseudomonas* starting from the ground and of necrosis olive-trees.

This work is devoted to the insulation of the stocks of *Pseudomonas* starting from ground (40 samples) and of necrosis olive-trees (30 samples) cultivated in Algeria (areas of Ain Temouchent and Sig). That led us isolated 20 stocks from *P. aeruginosa*, 15 stocks of *P. fluorescens* and 5 stocks of *P. syringae*. The insulated stocks were characterized and identified by microbiological, biochemical and genetic methods.

Forty (40) stocks of *Rhizobium*, 35 of *Pseudomonas* and 2 mushrooms (*Aspergillus Niger* **AS4** and *Penicillium citrinium* **PS12**) were studied for their antagonistic activity against five stocks of *P. syringae* pv. *savastanoi* the causal agent of the disease of the olive node. This enabled us to select 20 inhibiting stocks (16 stocks of *Rhizobium* and 4 of *P. fluorescens*) and the two mushrooms.

In order to determine the nature of the two inhibiting agents that which is produced by the stock of *Rhizobium* RNU9 and the stock of *P. fluorescens* PN5, the supernatants were characterized with respect to the temperature, the pH, the detergents (SDS, Tween 80 and the Tween 20) and of the proteases. The mode of action of the agent antibactérien is also required.

The results revealed that the two inhibiting agents are bactericidal, thermolabile, and sensitive to the SDS, Tween 80 and Tween 20 and the proteases. The two agents showed a strength to the pH (6, 7 and 8) but a sensitivity to the basic pH (9 and 10) and acid pH (2). Moreover these same inhibiting agents showed a resistance to 50°C and 80°C but a sensitivity to 100°C, 0°C and +4°C. The test of infection of the trees of olive-trees by the stocks of *P. syringae* pv. *savastanoi* with shown the appearance of galls what confirms well that our stocks of *P. syringae* were many stocks of *Pseudomonas* phytopathogènes.

Key words: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, antagonism, olive-trees, phytopathology, bactériocine.

