



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE  
ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecologie Microbienne

Intitulé :

**Recherche de *Pseudomonas syringae* Responsable du  
Chancre Bactérien à Partir  
des Arbres Fruitiers ; Abricotier et Cerisier de Hamma  
Bouziane**

Présenté et soutenu par :

Boukechiche Roufeida – Daoudi Sofiane

Soutenu le : 27/06/2018

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Melle Gaci Meriem	(MAA- UFM Constantine)
Rapporteur :	Dr. Boubekri Karima	(MCA- UFM Constantine)
Examinatrice :	Dr. Alatou Radia	(MCA-UFM Constantine)
Tuteur :	Mr. Lekikot Karim	(Directeur de l'INPV de Constantine)

Année universitaire  
2017-2018



# **Remerciements**

*Nous gardons notre premier remerciement à DIEU le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il nous a accordé pour mener à terme notre travail.*

*Nous remercions profondément notre encadreur Dr. BOUBEKRI (KHEDARA) Karima (Maitre de conférences A à l'université des Frères Mentouri, Constantine), pour son soutien et les efforts qu'elle a fourni tout au long de notre travail afin de nous orienter vers la bonne voie. Nous tenons aussi à la remercier pour ses critiques bénéfiques qui nous ont permis de développer un esprit scientifique plus sain et d'approfondir nos recherches.*

*Ce travail a été réalisé au niveau de la station régionale de Constantine de l'Institut National de Protection des Végétations (INPV). Ainsi, nous remercions le Directeur, Mr. LEKIKOT Karim pour son soutien et pour nous avoir libéré l'accès aux matériels et locaux pour réaliser cette étude au sein de son établissement. Nous tenons à exprimer nos remerciements à tous les membres de l'INPV de Constantine à leur tête Mme BOUGUERRA Akila, Inspectrice Principale Phytosanitaire et Mr. BOUNEFIKHA Noredidine, Inspecteur Divisionnaire Phytosanitaire qui nous ont énormément accompagné et aidé dans la réalisation du travail.*

*Nous tenons à remercier également Mr. Larraba Djamel Eddine, le responsable des équipements dans la faculté des sciences de la nature et de la vie, pour sa générosité et sa disponibilité. Sans oublier les efforts considérables des fonctionnaires de la Direction du Service*

*Agricole de la Wilaya de Constantine pour nous avoir informé d'avantage sur les maladies bactériennes de notre région. Les échantillons nécessaires pour notre étude étaient prélevés de la pépinière de l'Institut technique des arbres fruitiers et du verger de Mr Rahli à la commune de Hamma Bouziane, dont ont tient à remercier chaleureusement les gens qui nous ont aidé pour leur accueil et leur humilité.*

*Nous remercions également les membres du jury : l'examinatrice Dr. Alatou Radia et la présidente Mme.Gaci Meriem; qui nous ont fait un grand honneur en acceptant de participer à l'évaluation de notre travail de mémoire. Ainsi, merci à tous nos enseignants pour leurs efforts puissants au cours de toutes ces années. Nous leur exprimons toute notre gratitude pour leur aide si précieuse. Nous saluons également toutes leurs qualités humaines si rares de nos jours.*

*Un grand merci à tous nos collègues. Nous avons partagé ensemble nos doutes et nos craintes, nous n'oublierons jamais tous les moments que l'on a partagés ensemble.*

*Boukechiche Roufeida*

*Daoudi Soufiane*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents, « Slimane » et « Fatîha »;  
qui m'ont donné le droit d'être dans ce monde et  
m'ont soutenue pour arriver à ce moment  
inoubliable. Que*

*Dieu me les garde et protège.*

*A mes chères sœurs et frères.*

*A mes très chers amis sans citer les noms pour leur  
amitié sincère, leur disponibilité et leur gentillesse  
sans borne.*

*A toute ma famille, je les remercie du fond du cœur  
pour leurs encouragements et leur soutien.*

*Boukechiche Roufeïda*

## *Dédicace*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ;  
maman que j'adore.*

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à mon frère et à ma sœur, je dédie ce travail dont le grand plaisir leur revient pour leurs conseils, aides et encouragements.*

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amies, collègues d'études.*

*Daoudi Sofiane*

**Table des matières**

La liste des abréviations .....	ii
La Liste des figures .....	iii
Liste des tableaux .....	iv
Introduction .....	1
I. Généralité sur les abricotiers et cerisiers .....	4
I.1. Taxonomie et genres .....	4
I.2. Origines des abricotiers et cerisiers .....	4
I.3. La production et répartition géographique .....	6
I.4. Les bio-agresseurs et dégâts économiques .....	6
I.5. Les maladies Microbiennes des arbres fruitiers à noyaux .....	8
II. Chancre bactérien .....	11
II.1. Définition .....	11
II.2. Symptômes .....	11
II.3. Conservation, dissémination de la bactérie et voies d'infection .....	15
II.4. Cycle de la maladie .....	15
II.5. Facteurs favorisant l'infection .....	17
II.6. Gestion de la maladie .....	18
III. L'agent pathogène <i>Pseudomonas Syringae</i> .....	20
III.1. Le genre <i>Pseudomonas</i> .....	20
III.2. L'espèce <i>syringae</i> et ses pathovars .....	21
III.3. Pouvoir pathogène et Interaction avec l'hôte .....	22
III.4. Méthodes d'identifications et détection des phylogroupes .....	24
III.5. Lutte contre <i>Pseudonomas syringae</i> .....	27
IV. Matériel et méthodes .....	31
IV.1. Echantillonnage .....	31
IV.2. Traitements des échantillons .....	34
IV.3. Identification des isolats .....	37
V. Résultats et Discussions .....	44
VI. Conclusions et recommandations .....	64
Références bibliographiques .....	67
Annexes	
Résumé	

## La liste des abréviations

<b>ARA</b> : Arabinose	<b>LPGA</b> : milieu Levure Peptone Glucose
<b>AS</b> : aérobique stricte	Agar
<b>BCP</b> : milieu bromocresol purple	<b>Man</b> : Mannitol
<b>C</b> : cerisier	<b>McC</b> : McConkey
<b>CIT</b> : Citrate	<b>Mel</b> : Melibiose
<b>CS</b> : Cerisier Stark Hardy geant	<b>MOB</b> : Mobilité
<b>CT</b> : Cerisier Texraine	<b>NAS</b> : saccharose agar nutritive
<b>DSA</b> : direction des services agricoles	<b>ODC</b> : Ornithine Décarboxylase
<b>EDS</b> : Eau Distillée Stérile	<b>OF/F</b> : Fermentatif
<b>EPS</b> : exopolysaccharides	<b>OF/O</b> : Oxydatif
<b>ESFY</b> : European Stone Fruit Yellows	<b>ONPG</b> : Ortho-NitroPhényl- -Galactoside
<b>FAO</b> : Food and Agricultural Organisation	<b>Ox</b> : Oxidase
<b>GC%</b> : coefficient de Chargaff, pourcentage de guanine et de cytosine	<b>PCA</b> : milieu Plate Count Agar
<b>Gel</b> : Gelatine	<b>PCh</b> : Présence de champignons
<b>GLU</b> : Glucose	<b>PCR</b> : Polymérase Chain Réaction
<b>GN</b> : Gélose Nutritive	<b>pv</b> : pathovar
<b>ha</b> : Hectare	<b>RHA</b> : Rhamnose
<b>IAA</b> : auxines ou indole 3 acetic-acid	<b>SAC</b> : Saccharose
<b>IND</b> : Indole	<b>SOR</b> : Sorbitol
<b>INPV</b> : Institut Nationale de Protection des Végétaux	<b>spp</b> : plusieurs espèces possibles
<b>INO</b> : Inositol	<b>TDA</b> : Tryptophane Désaminase
<b>µl</b> : microlitre	<b>URE</b> : Uréase
<b>KB</b> : milieu B de King	<b>UV</b> : Ultras Violet
<b>LDC</b> : Lysine Décarboxylase	<b>VP</b> : piruvate de sodium
<b>LOPAT</b> : tests Levane-NAS, Oxidase, Pectinase, Agrinine dihydrolase, hypersensibilité du Tabac	

## **La liste des figures**

**Figure 1 :** Répartition de la production mondiale d'abricot et cerise (F.A.O., 2016).

**Figure 2 :** Les bio-agresseurs des arbres fruitiers à noyaux.

**Figure 3 :** Exemples de maladies microbiennes des arbres fruitiers à noyaux.

**Figure 4 :** Symptômes du chancre bactérien.

**Figure 5 :** Cycle de vie de la maladie du chancre bactérien et de la bactérie *P. syringae*.

**Figure 6 :** Les sites d'échantillonnage.

**Figure 7 :** Symptômes du Chancre bactérien observés sur les arbres d'Abricotier et de Cerisier dans les sites de prélèvements.

**Figure 8 :** Les échantillons transportés dans les conditions isothermes dans des sachets en papier avant le commencement des traitements.

**Figure 9 :** Les échantillons de l'espèce Abricotier.

**Figure 10 :** Les échantillons de l'espèce Cerisier.

**Figure 11 :** La préparation d'une macérât à partir du matériel végétal.

**Figure 12 :** La coloration de Gram.

**Figure 13 :** Le test de potasse indicateur de Gram.

**Figure 14 :** Test de Catalase.

**Figure 15 :** test d'oxidase.

**Figure 16 :** Test Mannitol-Mobilité.

**Figure 17 :** Test Hugh Leifson d'oxydation du glucose.

**Figure 18 :** Test de fermentation du lactose sur le milieu BCP.

**Figure 19 :** Test de levane (NAS).

**Figure 20 :** Test de pectinase.

**Figure 21 :** Hypersensibilité du Tabac.

**Figure 22 :** Culture des isolats sur milieu B de King.

**Figure 23 :** Test de fluorescence sous lumière UV des cultures sur milieu B de King.

## **La liste des tableaux**

- Tableau 1** : L'arbre phylogénétique du genre prunus.
- Tableau 2** : Clé de détermination des *Pseudomonas* fluorescents adaptée par Lelliot *et al.* (1966) permettant de déterminer l'espèce.
- Tableau 3** : Pathovars de *P. syringae* affectant les fruitiers à noyaux dans les pays tempérés.
- Tableau 4** : Caractères biochimiques de 3 pathovars de *P. syringae* sur arbres fruitiers à noyaux (Lelliot *et al.*, 1966).
- Tableau 5** : Liste des sites, espèces et variétés (avec leurs codes) d'où l'échantillonnage a été effectué.
- Tableau 6** : Poids tissus végétales et quantités d'eau distillée stérile utilisées dans la préparation des macérâtes de chaque échantillon.
- Tableau 7** : Descriptions de l'aspect macroscopique des souchesensemencées dans LPGA (avec B : Blanche, C : Crème, J : Jaune, Pch : Présence de champignons).
- Tableau 8** : Dénombrement des souchesensemencées dans PCA.
- Tableau 9** : Descriptions de l'aspect microscopique des souches étudiées par la coloration de Gram et le test de potasse.
- Tableau 10** : Résultats des tests : Calatase, Oxidase, Mannitol-mobilité, Hugh-Leifson et culture sur BCP.
- Tableau 11** : Résultats des tests LOPAT (Levane-NAS, Oxidase, Pectinase, Agrinine dihydrolase, hypersensibilité du Tabac) et fluorescence sous UV.
- Tableau 12** : Résultats des tests API 20E (partie 1)
- Tableau 12** : Résultats des tests API 20E (partie 2)
- Tableau 12** : Résultats des tests API 20E (partie 3)
- Tableau 13** : Tests API20E – Identification des souches par le logiciel spécifique.

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Les rosacées ont une place économique importante, marquée essentiellement par la production de fruits à noyaux. La production mondiale en fruits de rosacées est d'environ 113 millions de tonnes (F.A.O., 2016).

L'abricotier et le cerisier font partie des arbres fruitiers à noyaux du genre *Prunus*. Ces arbres peuvent atteindre de 5 à 15 m de hauteur, et ont une écorce et rameaux bruns rougeâtres. La floraison de l'abricotier et cerisier est précoce entre février et avril, ce qui les rend sensibles aux gels de printemps. Elle arrive au terme d'une phase hivernale de dormance qui est suivie d'une phase de réactivation des tissus, correspondant à la satisfaction de besoins en chaleur. Les fleurs sont assez grandes, blanches ou roses pâle, apparaissent avant les feuilles (Yilmaz et Gurcan, 2012).

En Algérie, malgré les conditions climatiques favorables au développement de variétés forestières et fruitières, la production algérienne d'abricots et de cerises demeure très faible et encore loin d'atteindre celle enregistrée dans certains pays du monde.

Malheureusement, ces arbres sont sujets à différents types de maladies parasitaires et d'attaques d'agents nuisibles réduisant la capacité de production et causant de lourdes pertes économiques.

Les maladies des plantes sont causées par des organismes pathogènes comme : insectes, nématodes, champignons, virus, et bactéries, qui sont présents en grande quantité dans leur environnement.

*Pseudomonas syringae* est une bactérie largement répandue dans le sol, l'eau et l'air, c'est un bacille à Gram négatif, mobile, épiphyte, glaçogène et phytopathogène causant plusieurs maladies affectant un large spectre de plantes, dont la maladie du chancre rencontrée chez les arbres fruitiers à noyaux. L'état affaibli des hôtes, dû aux différentes phases du cycle biologique, conditions physiologiques et climatiques, induit le passage au mode parasitaire de la bactérie. Cela cause une multitude de symptômes qui varient de simples dépérissements, à des lésions sur le tronc et même à la mort du sujet affecté.

A Constantine, l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) en collaboration avec la direction des services agricoles (DSA) et la chambre de l'agriculture sont responsables de mener des enquêtes phytosanitaires pour dépister et lutter contre plusieurs de ces maladies. D'importants efforts sont déployés pour dépister les maladies causées par les ravageurs et les maladies fongiques qui causent de grosses pertes, en courte période, de cultures et de récoltes. L'apparition des bactéries phytopathogènes avec un pouvoir pathogène très considérable comme *xylella fastidiosa* a ravivé l'attention aux maladies bactériennes qui nécessitent plus d'informations et de recherches.

Les objectifs de ce travail sont :

- l'observation et l'analyse des symptômes du chancre des arbres fruitiers à noyaux « abricotier et cerisier » et échantillonnages *in situ* en effectuant des sorties d'investigation en collaboration avec les experts de la station régionale de l'INPV de Constantine.
- Etude bibliographique de la maladie
- Isolement et identification de l'agent pathogène responsable de la maladie ainsi que d'autres bactéries présentes dans les tissus végétaux de l'hôte affecté. L'identification s'appuie sur des tests bactériologiques conventionnels.

**REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Généralités sur les abricotiers et cerisiers

### 1. Taxonomie et genres

Le genre *Prunus* appartient à la famille des *Rosaceae* (*Prunoideae*) et à l'ordre des *Rosales*. La famille des rosacées est la 19ème plus grande famille de plantes (Hummer et Janick, 2009) et inclut plus de 100 genres et espèces (Judd *et al.*, 1999) comprenant de nombreuses espèces comestibles, ornementales, médicinales ou encore quelques cultures de bois (Janick, 2005). Le genre *Prunus* regroupe les fruits à noyaux tels que l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.), le cerisier (*Prunus avium* et *Prunus cerasus*), le pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) et le prunier (*Prunus domestica* et *Prunus salicina*). Il existe d'autres espèces utilisées comme porte-greffe (*Prunus mahaleb*) ou pour la décoration des jardins, ou encore subsponsanées aux bordures de la forêt (*Prunus canescens*, *Prunus dawyckensis*, *Prunus incisa*, *Prunus subhirtella*, *Prunus padus*, ... etc).

Les abricotiers sont regroupés dans la section *Armeniaca* qui compte à ce jour cinq espèces, dont *Prunus armeniaca*, l'abricotier commun (Janick, 2005). Il en existe actuellement 200 regroupées en 5 sous-genres dont: *Prunus mandchurica* Koehne, *Prunus mume* Sieb. Et Zucc (abricot du Japon), *Prunus ansu* Komar, *Prunus dasycarpa*, *Prunus holoserica* (Batal.) Kost (Abricot du Tibet). Les cultivars de cerises douces sont très proches des formes du *Prunus avium* sauvage. On trouve le *Prunus avium* à l'état sauvage (Merisier) et *Prunus cerasus* qui représente les cerisiers doux.

### 2. Origines des abricotiers et cerisiers

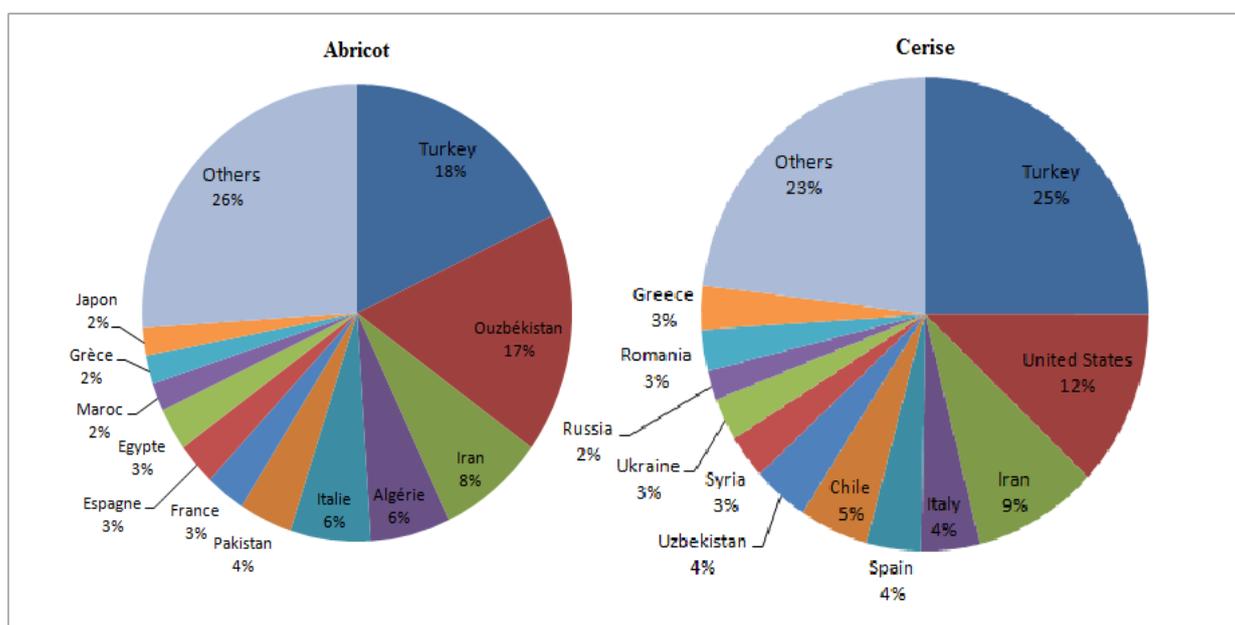
L'Arménie a été longtemps réputée comme le pays d'origine de l'abricotier ou il a été découvert par les expéditions guerrières des Romains (de 69 à 63 avant J-C). On sait à présent que son histoire commence il y a 5000 ans dans le Nord Est de la Chine (Janick, 2005). L'introduction des abricotiers a été progressive dans l'Asie centrale, l'Iran, l'Asie Mineure, et la Syrie puis en Europe et Afrique du nord (Faust *et al.*, 1998). En Afrique du Nord et en Algérie, son introduction coïncide avec l'expansion de l'Islam (Bourguiba *et al.*, 2012).

La Cerise était connue depuis 4 000 à 5 000 ans av. J.-C. On considère généralement que le *Prunus avium* est originaire d'Asie Occidentale et que *Prunus cerasus* provient d'Asie Mineure. On note que merisier se trouve principalement dans les parties montagneuses d'Europe tempérée. Le cerisier doux a été disséminé par les oiseaux et par les armées

romaines (Claverie, 2005). Il est actuellement développé dans de nombreux pays. On le trouve également en Afrique du Nord notamment en Algérie.

**Tableau 1** : L'arbre phylogénétique du genre prunus

Règne	Sous-règne	Division	Classe	Sous-classe	Ordre
Plantae	Tracheobionta	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Rosidae	Rosales
	Famille	Sous-famille	Tribu	Genre	
	Rosaceae	Amygdaloideae Prunoideae	Prunées	Prunus	



**Figure 1** : Répartition de la production mondiale d'abricot et cerise (F.A.O., 2016)

### 3. La production et répartition géographique

La production mondiale d'abricots et cerises est localisée dans les zones tempérées plutôt continentales et chaudes et est globalement en hausse. En 2016, la production d'abricots a atteint environ 4 millions de tonnes au total (F.A.O., 2016). La culture de l'abricotier s'est développée autour du bassin méditerranéen et en Asie centrale où se trouvent

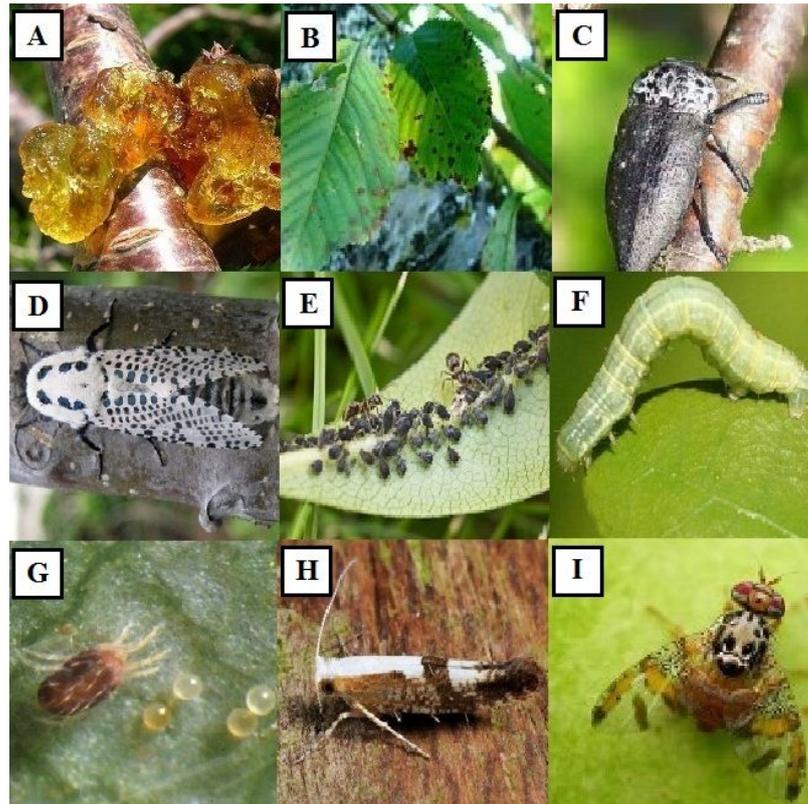
les principaux pays producteurs (Figure 1). Le cerisier possède une production mondiale est de l'ordre de 2.4 millions de tonnes par an. Les bassins privilégiés sont l'Europe, l'Asie et l'Amérique du nord.

En Algérie, la production nationale de la gamme des rosacées vient en 2ème rang après les pommes. La culture d'abricotier est en progression remarquable durant cette dernière décennie. La superficie est arrivée à 39.000 ha et la production à 260.000 tonnes, qui correspond à 6,5% de la production mondiale, occupe la huitième place mondiale (F.A.O., 2016). La production des cerises se situe à 7.000 tonnes en 2016 pour une superficie totale de 2900 ha. La culture des cerisiers a connu une régression la dernière décennie. La superficie de vergers de cerisiers perd du terrain à cause de plusieurs contraintes d'ordre climatique, où les disponibilités en froid accusent une tendance nette à la diminution.

#### **4. Les bio-agresseurs et dégâts économiques**

Les conditions d'hydromorphie excessive, de forte hygrométrie, des tailles sur gros bois et d'excès de fumure sont responsables du développement du chancre bactérien en facilitant la pénétration de l'agent pathogène. Les arbres fruitiers ont un risque plus élevé de développer des maladies dans les zones à forte humidité atmosphérique, lors des années particulièrement pluvieuses, ou par contre, lors de d'une sécheresse prolongée, ce qui favorise la croissance des ravageurs et parasites. Les espèces fruitières les plus touchées sont l'abricotier et le pêcher mais on le rencontre également sur l'amandier, le cerisier et le prunier (Dustan et Davidson, 1981).

La gommose est un exsudat de gomme souvent formé à l'aisselle des rameaux ou au niveau des bourgeons sur une grande partie des arbres à noyau. Elle est due au stress (par exemple sur les jeunes sujets replantés), la fertilisation déséquilibré (excès ou carence), ou au vieillissement des arbres. Cette sécrétion est parfois une réaction physiologique à une taille trop sévère et inadaptée à la vigueur de l'arbre et peut être à cause d'une maladie bactérienne (la gommose s'accompagne d'un dépérissement des branches ou des rameaux). L'apparition de gomme sur le tronc des arbres est souvent un signe de vieillissement avancé ou un signe du dépérissement de l'arbre, il faut donc penser à régénérer les plantations. La cylindrosporiose est la principale maladie cryptogamique du cerisier. Ses manifestations sont épisodiques. La maladie peut réduire significativement la qualité et la production des fruits en l'absence de



**Figure 2 :** Les bio-agresseurs des arbres fruitiers à noyaux : (A) gommose, (B) cylindrosporiose, (C) capnode, (D) zeuzère, (E) puceron, (F) cheimatobie, (G) acariens, (H) teigne et (I) cératite (Marcoux *et al.*, 2012)

traitement. C'est une maladie causée par un champignon qui se développe uniquement sur les feuilles.

Il existe une large variété des parasites ennemis des arbres fruitiers à noyaux. Ces parasites rangent des espèces qui ne sont pas visibles à l'œil nu, aux mouches et papillons. Ils attaquent différentes parties de l'arbre cible : les racines et les collets comme le **capnode**, le tronc et les branches comme la **zeuzère**, les jeunes pousses et feuilles comme **puceron**, **cheimatobie** et **acariens**, les fleurs comme la **teigne** et les fruits comme la **cératite**. Ces parasites détruisent l'arbre en perçant l'écorce jusqu'au bois vivant, en piquant les feuilles ou en dévorant les parties aériennes de l'arbre. Les dégâts causés varient en fonction de la perte de la récolte de l'année et peuvent entraîner la mort du sujet. Les feuilles et fruits attaqués peuvent tomber prématurément. L'arbre s'affaiblit en réduisant sa capacité photosynthétique. La croissance de l'arbre est ralentie, les branches dépérissent et s'affaiblissent et finissent par se dessécher complètement. La faiblesse des arbres et les blessures causées sont des portes ouvertes aux maladies microbiennes bactérioses et autres.

## 5. Les maladies microbiennes des arbres fruitiers à noyaux

Un certain nombre de maladies microbiennes altèrent la qualité des fruits, réduisent le rendement des récoltes et affaiblissent les arbres. Peu de maladies graves transmises par des virus existent aujourd'hui chez les fruitiers. Au niveau fongique, le principal problème est le monilia, sur fleur et sur fruit, provoqué par *Monilinia laxa* et *Monilinia fructigena*. En revanche, des maladies bactériennes telles que le chancre bactérien (causé par *Pseudomonas syringae*) peuvent provoquer la mort des arbres dans des parcelles entières dans certaines conditions climatiques.

Une virose est un trouble systémique dont les agents infectieux sont présents dans la sève. Les symptômes peuvent être plus ou moins graves d'une saison à l'autre, mais les arbres malades ne retrouvent jamais leur état originel et ne peuvent être guéris par pulvérisation de produits chimiques. Tous les virus peuvent être transmis par un porte-greffe ou un greffon infecté. Quelques-uns le sont par les insectes qui se nourrissent des feuilles ou des rameaux, d'autres sont véhiculés d'un arbre à l'autre par le pollen. Enfin, certains sont transportés dans le sol par les nématodes ou les instruments aratoires. Les viroses sont souvent difficiles à diagnostiquer et les cas suspects doivent être signalés au phytopathologiste régional.

Les champignons pathogènes se conservent d'une saison à l'autre surtout pendant l'hiver et cela, dans plusieurs sites. Par exemple, les fruits momifiés qui sont restés sur l'arbre, dans les parties chancreuses des rameaux, dans les bourgeons dormants ou dans les fruits pourris et les feuilles infectées qui sont tombés sur le sol. Les spores de ces champignons se développent sur les feuilles infectées, logent sur les rameaux et le sol. Ils y demeurent durant l'été, l'automne et l'hiver. Les symptômes des maladies causées par les champignons touchent principalement les feuilles et les fruits, même si les branches et les rameaux sont affectés. Il y a plus de pertes lorsque ces maladies se développent dans les vergers, dans les établissements d'emballage, dans les entrepôts ou durant leur transport vers le marché. Durant certaines saisons, la maladie peut être endémique et peut entraîner de lourdes pertes.

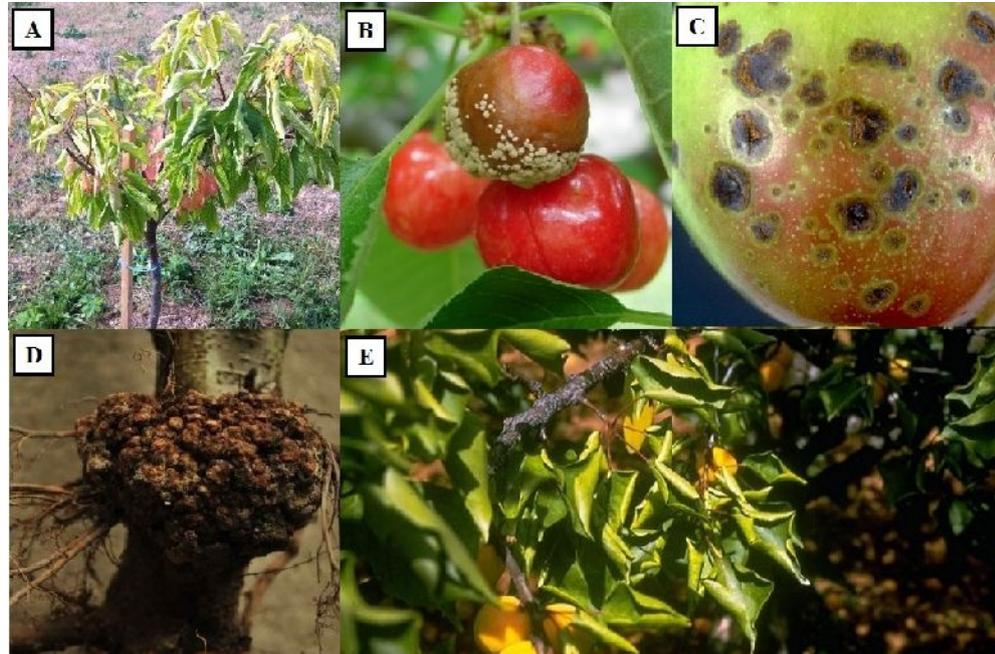
**La tache noire bactérienne** contrate le développement des feuilles, des fruits et rameaux. Sur les feuilles, la maladie se manifeste par des petites plaques irrégulières et imbibées d'eau, qui deviennent vite pourpres ou brunes. Souvent, ces plaques tombent, ce qui donne à la feuille un aspect criblé. Les feuilles atteintes jaunissent et tombent. Elles peuvent

entraîner une défoliation prononcée en début de saison. Sur les fruits, la maladie crée de petites taches circulaires de couleur brune; des piqûres et des crevasses se forment autour d'elles, ce qui réduit le rendement et la qualité des fruits. Après la pluie, un épanchement de gomme se développe au niveau de ces blessures. Sur les rameaux, on trouve des lésions de noir violacé à noires, peu profondes et de forme circulaire à elliptique. La maladie est plus répandue dans les régions chaudes et humides que dans les endroits secs et frais. Elle est plus fréquente et plus sévère dans les vergers dont la fertilité du sol est faible. La bactérie responsable de la maladie est *Xanthomonas pruni*. Elle hiverne dans les lésions des rameaux et dans les bourgeons terminaux. Au printemps, la bactérie est libérée de ces lésions qui s'agrandissent et est disséminée par la pluie sur les nouvelles feuilles, les rameaux et les fruits encore verts.

**La tumeur du collet et des racines** attaque plusieurs plantes différentes aussi bien que des arbres fruitiers. Elle est répandue dans les pépinières. Le collet crée aussi des tumeurs sur le tronc. Ces tumeurs sont pâles et molles au début mais plus tard elles deviennent foncées et dures. Leur taille varie de celle d'un pois à celle d'une balle molle, et elles sont habituellement de forme irrégulière. L'organisme responsable de la maladie est la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Ces bactéries vivent dans le sol naturellement et sont disséminées par les éclaboussures et le ruissellement de l'eau, les insectes, les nématodes, les outils de taille, ou lors de l'arrachage. Elles pénètrent le collet et les racines qui ont été blessés lors de la plantation, au cours des travaux culturaux ou par des insectes. Ces tumeurs réduisent l'absorption de l'eau et des éléments nutritifs, ce qui réduit sa croissance et augmente sa susceptibilité au stress.

**Le dépérissement bactérien** ou European Stone Fruit Yellows (ESFY) est le nom générique des maladies responsables de dépérissements incurables des *Prunus*. C'est un phytoplasme (bactérie sans paroi) qui est responsable de cette maladie : *Candidatus Phytoplasma prunorum*. Ce parasite colonise les cellules du phloème (le tissu conducteur de la sève élaborée). Ce phytoplasme provoque un dérèglement végétatif de l'arbre avec des conséquences visibles à chaque époque. Des chancres gommeux bruns rougeâtres apparaissent à la base des rameaux et sur les charpentières. Le débourrement sur certains rameaux devient difficile à voir au printemps, induisant un flétrissement et un dépérissement subits de rameaux. Les feuilles sont petites, rougissantes et s'enroulent de façon cylindrique et finissent par tomber. Les fruits manifestent un développement anormal et chutent quelques

jours avant leur maturité. La gravité de la maladie dépend de l'âge de l'arbre, de l'espèce, de la variété ou encore de l'intensité du froid. Cette maladie peut détruire chaque année jusqu'à 5 % des arbres d'un verger qui a atteint l'âge de production.



**Figure 3 :** Exemples de maladies microbiennes des arbres fruitiers à noyaux : (A) virose à feuille rouge, (B) moniliose, (C) tache noire bactérienne, (D) tumeur du collet et des racines et (E) dépérissement bactérien (Marcoux *et al.*, 2012)

Le psylle *Cacopsylla pruni* et *Cacopsylla pinhiemata* sont des insectes qui représentent les principaux vecteurs naturels de *Candidatus Phytoplasma prunorum*. Le psylle acquiert le phytoplasme en se nourrissant par piqûre sur un arbre contaminé mais ne devient pas immédiatement capable de transmettre la maladie aux arbres qu'il visitera ensuite. La maladie se transmet également par le greffage de matériel végétal contaminé. La transmission de la maladie par le système racinaire ou par la taille n'a pas été démontrée.

## II. Chancre bactérien

### 1. Définition

Le chancre bactérien (Bacterial canker; bacterial gummosis) est causé par la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae*. Deux autres bactéries phytopathogènes peuvent être à l'origine de cette maladie : *P. mors-prunorum* et *P. viridiflava*. Cette maladie affecte tous les arbres fruitiers à noyaux : abricotiers, cerisiers, pruniers, pêchers, nectarinier, tous les prunus à fleurs, les pommiers et les poiriers également. Le chancre bactérien est malheureusement difficile à maîtriser. Sa sévérité varie selon les conditions climatiques. Les dégâts de cette bactérie sont observés en automne parfois aussi lors d'un printemps frais, humide et pluvieux ou un gel printanier qui affecte les fleurs. Elle bénéficie de ces conditions pour infecter l'arbre.

Dans les vergers en production, les pertes causées par cette maladie sont souvent limitées à un dépérissement des pousses et des bouquets floraux, ce qui peut provoquer une diminution des rendements. Toutefois, à long terme et dans les vergers fortement infectés, les arbres présentent de nombreux chancres, ce qui affecte leur vigueur et leur résistance au gel. Dans les jeunes plantations, le chancre bactérien peut causer des retards de croissance importants et même parfois la mort des plants.

### 2. Symptômes

Les dégâts les plus caractéristiques des *Pseudomonas* sont observés sur les jeunes arbres (de plus de 2 ans jusqu'à 5 ans) qui ont un système défensif en développement. Les symptômes évolutifs sont visibles entre la floraison et la récolte. Cette maladie peut se manifester de différentes façons : présence de chancres et de gommose sur les tiges et sur le tronc, brûlure des fleurs et des tiges, mort des bourgeons ou taches sur les feuilles et sur les fruits. La présence de *P. syringae* conjuguée avec des gelées printanières de faible intensité peut entraîner une brûlure généralisée des organes en formation du fait du pouvoir du glucogène de la bactérie. Ces symptômes peuvent survenir en même temps ou non.

#### 2.1. Chancres et gommose sur les tiges et sur le tronc

Les chancres (ou ulcères) représentent le symptôme le plus caractéristique de la maladie. Ils se développent sur l'écorce de l'arbre : tronc, branches, les tiges, à la base des

bourgeons, près des plaies causées par la taille ou à la base des rameaux infectés. Un chancre forme une zone brun foncé ou noire nécrosée sur l'écorce, qui parfois se fendille de tissus morts qui peuvent s'étendre vers le bas et l'haut des branches à une grande distance d'un chancre visible. Les tissus sous-jacents sont complètement nécrosés et gorgés d'eau. La couleur des tissus internes varie d'orangé à brunâtre et des stries s'étendent jusque dans les tissus sains, au-dessus et au-dessous du chancre (Vigouroux, 1970).

Les chancres se forment sur les branches charpentières et sur le tronc. Les fourches des branches sont particulièrement sensibles à l'infection, qui s'y manifeste souvent par une production abondante de gomme. Cela est appelé gommose. La gomose est un liquide collant, visqueux, épais, clair ou ambré, blanc jaunâtre qui est sécrétée au printemps. Certains chancres peuvent s'agrandir de façon importante et gruger ou ceinturer les branches et le tronc, causant ainsi une détérioration de l'arbuste. Des branches entières et même des arbres cumulant plusieurs chancres dépérissent rapidement (Luisetti *et al.*, 1984).

La bactérie qui cause les chancres se propage surtout vers les points de croissance et descend rarement dans le système racinaire, qui demeure habituellement sain. Ensuite, lorsque le chancre s'élargit et se creuse, toute la partie supérieure de la branche se dessèche également. Les chancres peuvent provoquer une anhélation et tuer des branches maîtresses entières, réduisant ainsi le rendement en fruits de l'arbre. Les lésions sur les branches sont plus graves sur les jeunes arbres. Les bactéries détruisent les tissus du bois sous l'écorce et entravent la circulation de la sève. L'infection du tronc entraîne souvent la mort de l'arbre, surtout chez les jeunes sujets (Wimalajeewa *et al.*, 1983). Si la nécrose ceinture rapidement le rameau, elle entraîne son dessèchement plus ou moins brutal (dépérissement). Dans ce cas les tissus corticaux nécrosés se dessèchent et s'affaissent puis se déchirent au cours de l'été (chancre ouvert), mettant le bois à nu, qui deviendra la proie de parasites secondaires (;; (Luisetti *et al.*, 1992).

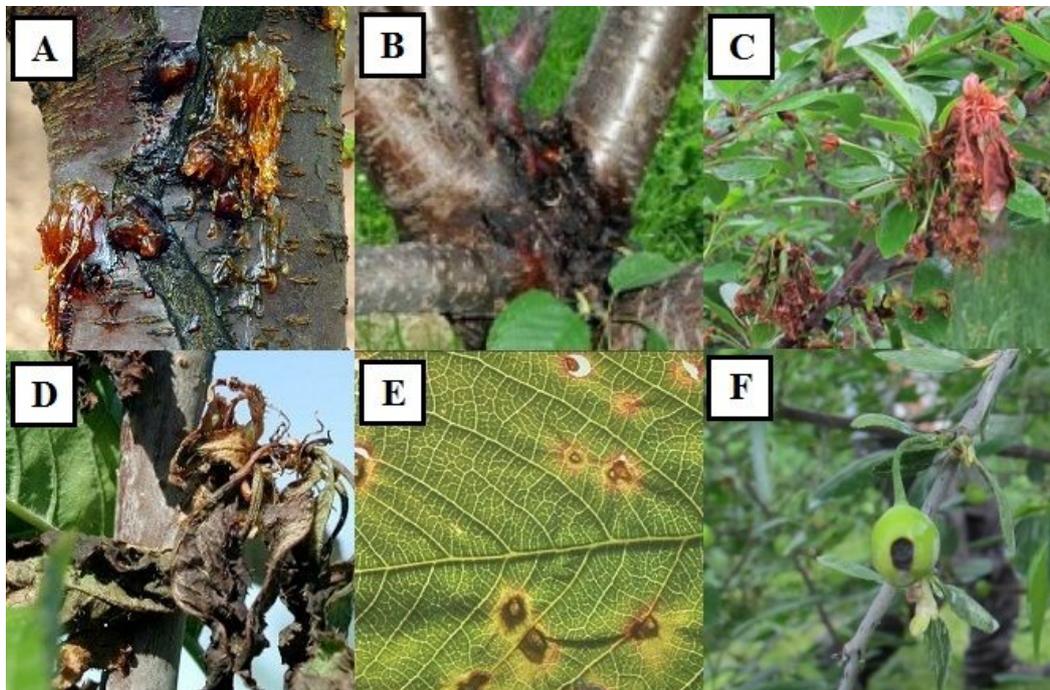
### **2.2. Brûlure des fleurs et des tiges**

Les nouvelles pousses et les bouquets floraux infectés sèchent, dépérissent, se flétrissent et pâlissent puis, après un temps, brunissent (Mansvelt et Hattingh, 1987; 1989). L'infection des inflorescences cause la coulure des fleurs et la perte de dards. Les fleurs restent toutefois accrochées à la tige. L'infection se poursuit vers la tige, où se forment des chancres. Ces symptômes sont couramment observés au printemps, peu après la floraison.

### 2.3. Mortalité des bourgeons

L'infection des bourgeons dormants les empêche de sortir de la dormance au printemps. C'est la première manifestation de la maladie, observable au moment de la floraison (Cameron, 1962 ; Luisetti *et al.*, 1984). Les bourgeons à feuilles et à fleurs infectés par la bactérie peuvent réagir de diverses manières :

- Certains ne débourrent pas au printemps parce qu'ils se sont desséchés.
- D'autres débourrent normalement, mais les pousses qui en émergent au début de l'été se flétrissent et se dessèchent, tout comme les fruits.
- D'autres encore ne montrent aucun symptôme et débourrent normalement.



**Figure 4 :** Symptômes du chancre bactérien : (A, B) chancre et gommose sur le tronc, (C, D) Mortalité des bourgeons et des fleurs, (E, F) taches sur les feuilles et les fruits.

(Cazelles et Grimm, 2015)

### 2.4. Taches sur les feuilles et sur les fruits

Sur les branches attaquées, le feuillage sèche, jaunit, flétrit et tombe brusquement. En cas d'attaque du tronc, c'est l'arbre entier qui peut se dessécher. Au printemps, l'infection se manifeste sur les feuilles sous forme de petites taches violacées (lésions), entourées d'une zone vert pâle à jaune (chlorose) et de 1 à 5 mm de diamètre. Ces lésions peuvent être de petites dimensions ou fusionner pour former de grandes zones infectées et nécrosées d'aspect

huileux. La partie centrale des lésions se déforment, virent au brun et se détachent de la feuille, qui devient alors criblée de trous (Vigouroux, 1970; Leben, 1981; Luisetti *et al.*, 1984; Luisetti *et al.*, 1992). Ce changement se fait en 1 à 2 semaines, il est observable seulement en mai. Sur les jeunes arbustes qui ont une croissance active, les feuilles prennent souvent un aspect fripé. En revanche, s'il s'agit d'arbustes matures, les feuilles ne présentent parfois aucun symptôme.

Sur les jeunes plants qui ne fleurissent pas encore, les taches sur les feuilles sont généralement les premiers symptômes observés. En présence de conditions climatiques favorables à la maladie, de gels ou de blessures causées par la taille ou par des insectes, la bactérie peut se propager rapidement dans la plante. Les jeunes arbres peuvent en mourir, surtout dans les deux années suivant la plantation, mais la maladie cause peu de mortalité chez les arbustes matures. Sur les fruits (Luisetti, 1978), les taches se présentent comme de petites lésions brunes, sèches et légèrement affaissées au niveau de la marge.

### 2.5. Symptômes similaires avec d'autres maladies

Il est difficile, souvent impossible, d'identifier le pathogène responsable à partir de ces symptômes (Dustan et Davidson, 1981).

- La brûlure des fleurs, le flétrissement des feuilles, le brunissement des tiges et les chancres peuvent aussi être des symptômes de la pourriture brune causée par le *Monilinia fructicola*.
- Chez les arbres âgés, la maladie X peut causer un dépérissement qui peut être confondu avec le chancre bactérien.
- Les chancres qui apparaissent sur les branches ou le tronc peuvent aussi être confondus avec le chancre cytosporéen.
- La présence de trous dans les feuilles peut être confondue avec la criblure causée par le champignon *Wilsonomyces carpophilus*.

Toutefois, quelques indices peuvent aider à déterminer la maladie en cause. Malgré ces indices, seule une analyse effectuée par un laboratoire de diagnostic permettra de déterminer précisément le pathogène responsable de l'infection.

### 3. Conservation, dissémination de la bactérie et voies d'infection

De nombreux sites de conservation ont été signalés : Bourgeons dormants (Burr et Kartz, 1984), Chambres sous-stomatiques (Hattingh *et al.* 1989), Chancre et lésions (Crosse, 1959), Débris végétaux (Hoitink *et al.* 1968), Graines et noyaux (Fryda et Otta, 1978), Plantes adventices et plantes relais (Baca et Moore, 1987), Scions pépinières (Dowler et Petersen, 1967) et Sol (Stout, 1960).

Daft et Leben (1972) ont vérifié que l'inoculum pouvait se disséminer de proche en proche par les éclaboussures de la pluie et par le vent. Lindemann *et al.* (1982) ont détecté des bactéries de l'espèce *P. syringae* dans des poussières en suspension dans l'air au-dessus de cultures. En 1990, Constantinidou *et al.* ont isolé à partir de l'eau de pluie, de l'eau douce, des eaux saumâtres et des eaux de mer des bactéries appartenant à l'espèce *P. syringae*. Gaignard (1992) a constaté le passage de cette bactérie de plants à plants issue d'*in vitro*, en cours d'acclimatation, dans une cellule climatisée en l'absence d'agitation de l'air ambiant.

Les bactéries peuvent s'y maintenir tout au long de la période végétative sans provoquer de lésions apparentes. Cette maladie se manifeste sur des arbres déjà affaiblis par les conditions de culture, la pollution et souvent suite à une blessure de l'écorce, à une plaie de taille, à une cassure ou autre. Toutes les blessures deviennent des portes d'entrée pour la bactérie. Ces blessures sont causées par le gel hivernal, le gel printanier durant la floraison ou encore par des lésions provoquées par les insectes. La pénétration peut aussi s'effectuer (Luisetti *et al.*, 1992) :

- par voie d'entrée naturelle (stomates, trichomes cassés et les cicatrices foliaires);
- à la faveur d'une lésion naturelle (plaie pétiolaire ou pédonculaire, base ouverte des trichomes, petites fissures microscopiques dans les dépressions de la couche cuticulaire);
- par un phénomène consécutif à une fusion de cristaux de glace dans les tissus.

### 4. Cycle de la maladie

Les arbres fruitiers à noyau sont particulièrement sensibles à l'infection à la fin de l'automne et au début du printemps. Les bactéries sont actives au printemps et en automne, par temps humide, mais faiblement actives à inactives en été et hiver (Hirano et Upper, 1985, 1990, Gaignard et Luisetti, 1993).



**Figure 5 :** Cycle de vie de la maladie du chancre bactérien et de la bactérie *P. syringae* (Peix *et al.*, 2009)

**En hiver**, la bactérie *Pseudomonas syringae* hiverne dans les chancres, mais aussi dans les bourgeons et dans les feuilles infectées. La bactérie peut être active au début de l'hiver selon les conditions climatiques. Elle peut également se déplacer et hiverner dans les tissus internes des arbres sans qu'ils ne montrent de symptômes. Donc, l'expansion des chancres ralentit.

**Au printemps**, la bactérie redevient active bien avant l'arbre de sorte que les chancres sont bien développés lors du débourrement. Elle se multiplie abondamment durant des périodes prolongées de froid, de pluie ou d'humidité relativement élevée. Présente dans les bourgeons et les chancres, elle infecte les fleurs puis les feuilles lors de leur émergence, causant le flétrissement des pousses et la brûlure des fleurs. Les chancres déjà présents reprennent leur expansion si la bactérie n'est pas contrôlée.

**En été**, la bactérie peut causer des taches sur les feuilles et sur les fruits. Toutefois, au cours des périodes de temps chaud et sec, elle ne fait que survivre dans les cellules des feuilles. C'est pourquoi les populations de bactéries sont à leur plus bas niveau d'activité

durant l'été et sont même difficiles à détecter en laboratoire. *P. syringae* survit, en période chaude et sèche, dans les chambres sous-stomatiques.

**En automne**, lorsque les températures fraîchissent et que l'humidité s'installe, les bactéries se multiplient à profusion dans les tissus infectés, puis des masses de bactéries sont dispersées dans l'environnement lors d'épisodes de pluie et de vent. C'est à ce moment que les bactéries s'infiltrent à la base des bourgeons autour des écailles; l'infection peut aussi se propager par les cicatrices dans les rameaux laissées par les pédoncules lors de la chute des feuilles. La plupart des nouveaux chancres deviennent apparents en automne.

### 5. Facteurs favorisant l'infection

Plusieurs conditions et facteurs favorisent la propagation de la maladie comme le climat humide en automne et des expositions froides, des alternances de températures négatives et positives, l'époque de taille en hiver ou pendant une période humide, les terres non fertiles comme les sols acides ou sableux, la sensibilité variétale et porte-greffe. Les périodes pluvieuses et ventées au printemps et en automne sont les plus favorables à la propagation de cette maladie bactérienne. Les bactéries présentes sur les feuilles mais inactives profitent d'une plaie pour pénétrer dans le système vasculaire de l'arbre (Clarkson et Hanson, 1980).

La qualité, la quantité d'inoculum et le moment de la pénétration de *P. syringae* conditionnent la réussite de l'infection (Crosse, 1956). Il y a une relation entre le nombre de bactéries présentes à la surface des feuilles et le nombre de nécroses observées. Selon Ercolani et Vannella (1986), le temps de réponse est inversement proportionnel à la dose d'inoculum. La phase épiphyte est un élément essentiel dans le cycle biologique des *Pseudomonas*. L'intensité des dégâts peut être liée à l'importance de cet inoculum. Certains pathovars sont pathogènes pour une espèce hôte et pathogènes faibles pour les autres espèces (Crosse et Garrett, 1970).

Les éléments minéraux conditionnent également l'infection. L'aire d'extension de cette maladie est d'ailleurs limitée aux sols acides. Le rôle du calcium paraît prépondérant et plusieurs modes d'action sont envisageables et, en particulier, il pourrait consolider les parois cellulaires (Ginzburg, 1961; Simon, 1978), réduire les microlésions liées au gel et donc les possibilités de pénétration de la bactérie dans l'hôte (Durand *et al.*, 1967) et freiner la désorganisation des parois liée à l'activité bactérienne (Davis et English, 1969; Mc Guire et

Kelman, 1986). Le potassium a un rôle important dans le métabolisme de l'eau en général, y compris en hiver. Il pourrait donc influencer le comportement des plantes au froid, ce dernier facteur étant un élément essentiel de prédisposition du pêcher au dépérissement bactérien (Vigouroux, 1974).

Les températures négatives interviennent dans le développement des maladies bactériennes des plantes, soit en créant les conditions favorables à la pénétration bactérienne, soit en augmentant la sensibilité des tissus à ces micro-organismes. En Hongrie et en Yougoslavie, les dégâts les plus sévères de dépérissement bactérien de l'abricotier dû à *P.s.pv. syringae* sont observés après des hivers très rigoureux (Klement *et al.*, 1972). Les cycles de gel et de dégel, intervenant en hiver, en provoquant un afflux d'eau dans les espaces intercellulaires des tissus parenchymateux (water soaking), favorisent la pénétration et le développement de l'infection (Weaver, 1978).

### 6. Gestion de la maladie

Il est difficile de maîtriser efficacement le chancre bactérien étant donné le peu de moyens de lutte directe existants, autant en production conventionnelle qu'en production biologique. De plus, vu que la bactérie est présente dans la plante sans symptômes apparents durant certaines phases de son cycle de vie, il n'est pas facile de la détecter et d'intervenir au bon moment (Dustan et Davidson, 1981).

Par ailleurs, la bactérie *Pseudomonas syringae* peut aussi se développer sur d'autres plantes sans leur causer de dommages; elle croît, entre autres, abondamment sur les graminées. Cette particularité complique davantage la mise en place de méthodes de lutte, car les populations de bactéries deviennent une source importante de contamination pour les plantes hôtes sensibles.

Un certain nombre de techniques proposés par Luisetti *et al.* (1992), permettent de limiter la dissémination de la bactérie et l'explosion des maladies bactériennes dues aux *Pseudomonas* pour les arbres fruitiers. Il faut choisir de bons terrains de plantation en évitant les terrains froids, trop caillouteux ou sablo-caillouteux acides et les sols maigres. Il faut aussi installer des variétés peu sensibles à la bactérie et des plants indemnes de bactéries, provenant de pépinières contrôlées, d'adapter le porte-greffe au sol dans des parcelles irrigables, de tailler les arbres lorsque la sensibilité des tissus est moindre, de désinfecter le sécateur entre chaque arbre de surveiller en permanence les arbres et d'éliminer toute partie ou arbre malade.

Diverses pratiques préventives sont recommandées pour freiner la maladie. Tailler lorsque le temps est sec et selon les recommandations suivantes (Luisetti *et al.*, 1992) :

- Effectuer la taille de formation au début du printemps, avant le débourrement, lorsque le temps est sec et que la température se situe près du point de congélation ou légèrement au-dessus. Toutefois, selon certaines références, la maladie serait moins présente dans les vergers où les arbres sont taillés immédiatement après la récolte.
- S'abstenir de tailler à l'automne ou après le débourrement au printemps lorsque la bactérie est très active.
- Durant l'été, enlever toutes les branches mortes et les tiges flétries en taillant dans le bois sain. Il convient bien sûr d'éliminer ou brûler les branches et les arbres malades ou morts.
- Offrir des conditions optimales aux plants
- Planter dans un sol bien drainé.
- Fertiliser adéquatement.
- Choisir un site où le risque de gel est faible.
- Maîtriser les insectes et les maladies qui peuvent causer des dommages aux plants.
- Nettoyer la plaie en curetant convenablement le chancre jusqu'à retrouver du bois sain.

### III. L'agent pathogène *Pseudomonas Syringae*

#### 1. Le genre *Pseudomonas*

Créé en 1894 par Migula, le genre bactérien *Pseudomonas* est ubiquitaire et compte aujourd'hui de nombreuses espèces qui colonisent de différents milieux: le sol, la rhizosphère, la phyllosphère, les tissus végétaux et animaux en décomposition, l'eau douce et l'eau de mer (Gaignard et Luisetti, 1993; Peix *et al.*, 2009). Quelques espèces sont pathogènes des animaux ou de l'homme (Prévot, 1961). Les *Pseudomonas* sp. se comportent comme des agents opportunistes chez l'homme. L'espèce la plus importante est *P. aeruginosa*.

**Tableau 2 :** Clé de détermination des *Pseudomonas* fluorescents adaptée par Lelliot *et al.* (1966) permettant de déterminer l'espèce

Espèce	Groupe	Levane	Oxydase	Pectinolyse	Arginine dihydrolase	Tabac	Saccharose	Nitrates
<i>P. syringae</i>	1a	+	-	-	-	+	+	-
<i>P. syringae</i>	1b	-	-	-	-	+	+	-
<i>P. viridiflava</i>	2	-	-	+	-	+	-	-
<i>P. cichorii</i>	3	-	+	-	-	+	-	-
<i>P. marginaiis</i>	4	+/-	+	+	+	-	+/-	+/-
<i>P. fluorescens</i>	5	+/-	+	-	+	-	+/-	+/-

Aujourd'hui, les *Pseudomonas* phytopathogènes sont classés dans 2 groupes (Palleroni, 1984) en fonction de l'ADNr (*acide désoxyribonucléique ribosomique*). Le premier rassemble les bactéries qui (i) n'accumulent pas le *poly- -hydroxybutyrate* (réserve de carbone et d'énergie) et ii) produisent un pigment fluorescent, dans lequel on trouve les espèces phytopathogènes *P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. cichorii*. Les espèces de référence de ce groupe sont *P. aeruginosa* et une espèce saprophyte, fréquente sur les plantes et dans leur environnement, *P. fluorescens*. Le second, rassemble des bactéries phytopathogènes (i) accumulant le *poly- -hydroxybutyrate* et (ii) ne produisant pas de pigment fluorescent : il s'agit de *P. solanacearum*, *P. caryophylli*, *P. cepacia* et *P. gladioli* (Gaignard et Luisetti,

1993; Kersters *et al.*, 1996; Peix *et al.*, 2009; Young, 2010). Les genres *Pseudomonas* produisent un pigment fluorescent jaune vert (Botelho et Leda, 2006) soluble sur le milieu B de King carencé en fer. Elles forment toutes des colonies fluorescentes (Whipps et Walsh *et al.*, 2001).

## 2. L'espèce *syringae* et ses pathovars

L'espèce *P. syringae* appartient au genre *Pseudomonas* Migula (1984) et au groupe 1 selon l'ARNr (Palleroni *et al.*, 1973). Cette classification est reprise dans le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974). On regroupe toutes les espèces de *Pseudomonas* phytopathogènes précédemment classées dans les groupes 1 a et 1 b (Lelliott *et al.*, 1966) dans une seule espèce : *P. syringae*. Cette espèce a été récemment subdivisée en pathovars (ou pathotypes) distingués pour leur pouvoir pathogène différentiel (Young *et al.*, 1978; Dye *et al.*, 1980). Bradbury (1986) dénombre 52 pathovars à l'intérieur de l'espèce *P. syringae*, signalés pathogènes sur 400 espèces végétales. Dès 1962, Cameron note que l'espèce *P. syringae* a été isolée sur la plupart des arbres fruitiers. Certains pathovars sont spécifiques d'une seule espèce végétale, comme le pathovar *persicae* sur pêcher, alors que d'autres sont signalés sur un très grand nombre de plantes, comme le pathovar *syringae* isolé de 177 espèces végétales.

**Tableau 3 :** Pathovars de *P. syringae* affectant les fruitiers à noyaux dans les pays tempérés.

(Peix *et al.*, 2009)

Espèce, pathovar	Pays	Plantes
<i>P.s.pv. persicae</i>	France, Nouvelle-Zélande	Pêcher et prunier
<i>P.s.pv. morsprunorum</i>	Afrique du Sud, Angleterre, Etats-Unis, France, Italie, Japon, Pologne	Abricotier et Cerisier
<i>P.s.pv. syringae</i>	Allemagne, Afrique du Sud, Angleterre, Argentine, Canada, Chili, Espagne, Etats-Unis, France, Hongrie, Italie, Iran, Japon, Nouvelle-Zélande, Pays-Bas, Ukraine, Yougoslavie.	Abricotier, Cerisier, Prunier, Pêcher

### 3. Pouvoir pathogène et Interaction avec l'hôte

#### 3.1. *P. syringae* a une phase épiphyte

Le cycle des bactéries appartenant à cette espèce est caractérisé, dans la plupart des cas, par une phase épiphyte encadrant des périodes d'infection. Le terme épiphyte est utilisé pour décrire les micro-organismes capables de vivre à la surface des plantes et qui sont capables de se multiplier et donc, de la coloniser. En 1959, Crosse est le premier à démontrer que *P.s.pv. morsprunorum* est présent à la surface de feuilles saines de cerisier. Ces colonisations des cicatrices foliaires, des stomates et de leurs abords constituent un inoculum capable d'être à l'origine de l'infection des tiges et des branches. La présence épiphyte de l'espèce *P. syringae* a été par la suite confirmée sur une multitude d'espèces végétales cultivées et adventices, dont les arbres fruitiers à noyaux :

- **Abricotier** par *P.s.pv. morsprunorum* et *P.s.pv. syringae* (Bordjiba et Prunier, 1991) ;
- **Cerisier** par *P.s.pv. morsprunorum* (Crosse 1959 ; 1956 ; 1971) et *P.s.pv. syringae* (Cameron 1962).
- **Merisier** par *P.s.pv. syringae* (Cameron, 1970)
- **Prunier** par *P.s.pv. morsprunorum* (Crosse et Garrett, 1970) et *P.s.pv. syringae* (Roos et Hattingh, 1986)
- **Prunier du Japon** par *P.s.pv. persicae* (Young, 1988) et *P.s.pv. syringae* (Takanashi, 1988)
- **Pêcher** par *P.s.pv. persicae* (Gardan *et al.*, 1972) et *P.s.pv. syringae* (Endert et Ritchie, 1984)
- **Amandier** par et *P.s.pv. syringae* (English et Davis, 1960)
- **Plantes adventices** (Anderson *et al.* 1981) et **Plantes de pépinières** (Baca *et al.*, 1987) par et *P.s.pv. syringae*.

La nature de l'interaction bactérie épiphyte/plante connaît des variabilités de comportement car chaque feuille constitue un écosystème variable et dynamique. Luisetti et Gaignard (1984) ont montré que les bactéries se maintiennent essentiellement sur les pousses basses, sur la face inférieure des feuilles et au centre afin d'éviter l'environnement hostile de la surface de la feuille comme les fluctuations de température, les rayons ultra-violets, les périodes de dessiccation. La dynamique des bactéries durant la phase épiphyte peut être

également perturbée par des bactéries saprophytes et par des champignons (Crosse, 1971; Gaignard, 1992). Les bactéries sont groupées en amas localisés en un nombre réduit de sites.

### 3.2. Activité glaçogène des *P. syringae*

L'eau extra pure peut être maintenue en état de surfusion jusqu'à -40 °C. Mais dans la nature, l'eau est en contact avec de nombreuses particules et notamment avec des noyaux de cristallisation ou noyaux glaçogènes. Ces noyaux (particules minérales, poussières...) provoquent une rupture de la surfusion de l'eau à des températures négatives, plus ou moins proches de 0 °C. La formation de glace au niveau du végétal peut être provoquée par des acides aminés (Parungo et Lodge, 1967), de protéines (Zettlemoyer *et al.*, 1961), de terpènes (Rosinski et Parungo, 1966) actifs dans le déclenchement de la cristallisation à des températures de l'ordre de -5 °C. Une source biologique de cristallisation a été démontrée par Fresh en 1973. Il s'agit d'une souche bactérienne qui constitue un excellent initiateur de prise en glace à partir de -2 °C : c'est une bactérie de l'espèce *P. syringae*. (Maki *et al.*, 1974).

Les autres espèces bactériennes glaçogènes qui ont été signalées sont principalement *P. viridiflava* et *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* et plus occasionnellement de quelques souches de 2 espèces saprophytes, *P. fluorescens* et *Erwinia herbicola* (Arny *et al.*, 1976; Kim *et al.*, 1987). Depuis la mise en évidence du phénomène, de nombreux travaux ont permis de vérifier le rôle des bactéries glaçogènes dans le développement de dégâts de gel et/ou de bactériose. La teneur en eau et la teneur en bactéries glycogènes, *P.s.pv. syringae* en particulier, sont des éléments intervenants dans la rupture de surfusion à une température plus élevée. La cristallisation débute à la surface du végétal et colonise l'intérieur des tissus à travers les stomates et les blessures (Burke *et al.*, 1976).

### 3.3. Pouvoir pathogène

Les différents symptômes causés par les *Pseudomonas* phytopathogènes sur les plantes, sont dus aux substances excrétées par les bactéries, on retrouve: les enzymes capables d'attaquer une variété de composés cellulaires des tissus de plantes, des toxines, et des hormones de plantes. Les plantes rejettent la majorité des micro-organismes pathogènes avec lesquels elles sont en contact en adoptant des mécanismes de reconnaissance (Sequeira, 1978). Quelques pathogènes contournent cette difficulté : on assiste alors à des coévolutions hôte/parasite. Parmi les éléments intervenants lors d'une interaction, on peut citer les lectines produites par les plantes, les **exopolysaccharides** (EPS) synthétisés aussi par les bactéries

(Sequeira, 1985) entourant leurs cellules. Cette couche d'EPS leur permet de former des biofilms qui agissent comme des adhésines sur les surfaces des feuilles de plantes (Visca *et al.*, 2007).

Les bactéries phytopathogènes produisent des enzymes extracellulaires capables de dégrader les composants (les polymères pectiques) des parois des cellules végétales. On trouve notamment des pectinases : une **pectate lyase** a été mise en évidence chez *P. viridiflava* par Liao et Wells (1987) et des **cellulases**. Il s'agit en fait d'enzymes pectolytiques (Kerr 1987, Collmer 1986) qui, dans certains cas, vient les polymères pectiques de l'exoderme de la lamelle moyenne, facilitant ainsi la pénétration et la colonisation par le pathogène (Collmer 1986). La capacité de produire les **auxines** (ou IAA pour indole 3 acetic-acid) qui sont des phytohormones, est présente chez certaines pseudomonas exemple: *P. s. pv. savastanoi*. L'IAA est en fait responsable d'hypertrophie (Kerr 1987) mais peut être à l'origine de la multiplication cellulaire en absence d'hypertrophie, et contribue à la survie des phytopathogènes comme épiphytes sur les surfaces des plantes.

La production de toxine est également un élément important du pouvoir pathogène et sont les déterminants primaires de la pathogénicité. La **syringomycine** produite par *P.s.pv. syringae* perturbe les fonctions physiologiques et biochimiques localisées au sein des membranes plasmiques des cellules végétales hôtes. (Gross et Cody, 1985; Zhang et Takemoto, 1987). Xu et Gross (1988) ont précisé que la syringomycine contribue significativement dans le niveau de la virulence de la bactérie. La production de syringomycine est reprimée par une concentration de 1 mM de phosphate, mais est induite par les ions  $Fe^{3+}$ . Quelques minutes de production de toxines des pseudomonas sont nécessaires pour causer les symptômes de la maladie.

#### 4. Méthodes d'identifications et détection des phylogroupes

En 1966, Lelliott *et al.* ont défini un schéma de détermination des espèces de *Pseudomonas fluorescents* isolés de plantes. Ce schéma est basé sur quelques caractères biochimiques sélectionnés et sur le test d'hypersensibilité sur tabac (Klement, 1963), il permet de séparer les espèces phytopathogènes des non pathogènes.

### 4.1. Caractères biochimiques

Les bactéries du genre *Pseudomonas* se présentent sous forme de bâtonnets (bacille) droit (ou incurvé) de taille moyenne de 0,7-3 µm de longueur sur 0,7-1 µm d'épaisseur. Ils peuvent être isolés, en paires ou en chaînes, mobiles par plusieurs flagelles (ciliature) polaires (1 à 3 flagelles) et non sporulâtes (Gaignard et Luisetti, 1993; Kersters *et al.*, 1996; Young, 2010) et de Gram négatif. Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, blanches et généralement lisses (Gaignard et Luisetti, 1993) et convexes avec reflets bleus (Prévot, 1961). *P. syringae* est une bactérie aérobie stricte (obligatoires), chimio-hétérotrophe, chimio – organotrophes (puisque'elle peut croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone), possédant catalase et ne possédant pas de cytochrome C oxydase. La plupart des souches des différents pathovars cultivées en milieu B de King (King *et al.*, 1954) produisent un pigment jaune verdâtre et fluorescent sous UV : il s'agit d'un pigment hydrosoluble (*pyoverdine*).

### 4.2. Caractères métaboliques

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, mésophile, peu exigeant, et incapable de fermenter le glucose. Il se caractérise par la pluralité des substances hydrocarbonées utilisées comme source de carbone et d'énergie, la plupart étant saprophytes et pouvant coloniser les cellules corticales mortes des racines (Frey *et al.*, 2006). Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à un pH inférieur à 4,5, ni métaboliser le lactose sur Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer sont négatifs (Palleroni, 1984). Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les protéines et les polysaccharides complexes. De nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes. L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (Campbell *et al.*, 1995 ; Latour *et al.*, 1996). Le catabolisme des xénobiotiques par les *Pseudomonas spp fluorescents* se caractérise en effet par la variété et la plurifonctionnalité des enzymes dégradatives. Il présente de multiples voies périphériques permettant les premières attaques d'une gamme importante de composés (Golovleva *et al.*, 1992). Enfin, certaines populations de *Pseudomonas spp fluorescents* ont la possibilité de dissimiler l'azote (Clays-Josserand *et al.*, 1995). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982).

### 4.3. Caractères cytologiques, sérologiques et lysotypiques

La détermination des profils d'acides gras peut permettre une identification partielle des pathovars; Sasser et Miller (1984) arrivent à identifier le genre, l'espèce et un pathovar (pv. *tomato*). Dans une étude similaire, Stead (1987), parvient à séparer certains pathovars à l'intérieur de l'espèce *P. syringae*, mais il ne peut distinguer les 2 espèces différentes : *P. syringae* et *P. viridiflava*. En réalisant des électrophorèses des protéines pariétales des cellules bactériennes, Stead et Holland (1987), parviennent à identifier les pathovars présents sur pois (pv. *syringae* et pv. *pisi*). Some et Samson (1991) distinguent *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P.s.pv. pisi*, *P.s.pv. syringae* et *P.s.pv. tomato* sur la base de leur profil estérasique.

**Tableau 4 :** Caractères biochimiques de 3 pathovars de *P. syringae* sur arbres fruitiers à noyaux (Lelliot *et al.*, 1966)

Caractères	<i>P.s.pv. syringae</i>	<i>P.s.pv.morsprunorum</i>	<i>P.s.pv. persicae</i>
<b>Gram</b>	-	-	-
<b>Oxydation du glucose</b>	Oxydative	Oxydative	Oxydative
<b>Pigment fluorescent / KB</b>	+	+	-
<b>Pigment fluorescent/CSGA</b>	+	+	+
<b>Hydrolyse de la gélatine</b>	+	-	-
<b>Hydrolyse de l'esculine</b>	+	-	-
<b>Acidification / Alcalinisation de sources de carbon</b>			
<b>Méso-iositol</b>	+	+	-
<b>Erythritol</b>	+	Variante	-
<b>Sorbitol</b>	+	+	+
<b>D(-)tartrate</b>	-Variante	-	-
<b>L(+tartrate</b>	-	+	-
<b>DL-lactate</b>	+variante	-	-

Tous ces auteurs pensent que les protéines natives et les iso-enzymes permettent de différencier les pathovars de *P. syringae*. La capacité ou non de métaboliser par voie oxydative une gamme de substrats organiques est à la base de la méthodologie la plus utilisée pour identifier les différents pathovars de *P. syringae* (Lelliott *et al.*, 1966; Sands *et al.*, 1970;

Hildebrand et Schroth, 1972; Mansvelt et Hattingh, 1985; Gardan *et al.*, 1991). Les *Pseudomonas* possèdent un certain nombre de structures de surface : des molécules qui peuvent être des antigènes et des récepteurs pour les bactériophages qui sont connus par les porteurs de prophages (ou phages tempérés).

#### 4.4. Caractères génétiques

La valeur du GC% (coefficient de Chargaff, pourcentage de guanine et de cytosine dans les acides nucléiques) de l'espèce *P. syringae* varie de 58 à 61 % (Palleroni, 1984). Comme chez beaucoup de bactéries, la présence de plasmides de poids moléculaire variable a été démontrée chez *P.s.pv. syringae*. Ces plasmides sont conjugatifs (Gonzales *et al.*, 1984), et peuvent être porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds qui sont aussi transmissibles à d'autres bactéries. Le genre *Pseudomonas* est celui dans lequel Manceau (1984) a détecté le plus grand nombre de caractères de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds. D'après Gonzales *et al.*(1984), le plasmide PCG joue un rôle dans la virulence de certaines souches de *P.s. pv. syringae*. Moor et Gross (1991) ont vérifié que la production de syringomycine, réglée par le gène *syrB*, était modulée par la perception de 2 classes de signaux moléculaires émis par la plante. Les gènes *hrp* (*hypersensitive reaction pathogenicity*) qui contrôlent simultanément la pathogénèse de *P.s.pv. phaseolicola* et la réaction HR (*hypersensibilité sur plantes non hôtes*) ont été mis en évidence par Lindgren *et al.*(1986). Boucher *et al.*(1987). Arlat et Boucher (1989) ont également repéré les gènes *hrp* chez *P. solanacearum* et ils ont signalé l'existence de gènes *dsp* (*disease specific*) qui contrôlent l'apparition des symptômes de la maladie sur plante hôte. L'existence des gènes *hrp* chez d'autres pathovars de l'espèce *P. syringae*, dont *P.s.pv. syringae*, a été vérifiée par Mills et Mukhopadyay (1990).

#### 5. Lutte contre *Pseudomonas syringae*

La lutte est l'ensemble des opérations préventives et raisonnées qui conduit à intervenir lorsque la bactérie est accessible et durant ses périodes de multiplication. L'objectif d'une lutte efficace doit être de réduire le niveau de ces populations épiphytes au-dessous d'un seuil de nuisibilité.

### 5.1. Lutte chimique

Deux types de produits présentant une activité antibactérienne sont actuellement utilisés dans la lutte chimique préventive : il s'agit des antibiotiques et de sels de cuivre, comme la bouillie bordelaise. La *fluméquine* est un antibiotique actuellement autorisé pour lutter contre le feu bactérien des rosacées fruitières et ornementales (*E. amylovora*); il est aussi utilisé dans la lutte contre le dessèchement bactérien du poirier (*P.s.pv. syringae*) et contre le dépérissement bactérien du pêcher (*P.s.pv. persicae*) (Brisset *et al.*, 1991; Luisetti et Gaignard, 1991). Un autre antibiotique, la *kasugamycine*, a fait également l'objet d'essais vis-à-vis plusieurs pathovars de *P. syringae*. Le mélange de *kasugamycine* et de cuivre semble d'ailleurs plus efficace que les 2 produits appliqués séparément (Hiramatsu *et al.*, 1990). Le danger de l'usage intensif des antibiotiques, comme le cas de streptomycine, concerne leur action sur la composition de la microflore bactérienne épiphyte, et l'apparition de germes résistants à cet antibiotique, autant chez l'espèce *P. syringae* que chez les espèces saprophytes. Pour cette raison, l'emploi des antibiotiques n'est autorisé que dans le cas des maladies graves (Coléno *et al.*, 1982).

Trois formulations cupriques (**sulfate de cuivre, oxychlorure de cuivre, hydroxyde de cuivre et chélate de cuivre**) sont homologuées pour la lutte contre les maladies bactériennes des plantes dues aux *Pseudomonas* (Luisetti *et al.*, 1992; Gaignard et Luisetti, 1992). Sur le pêcher par exemple, Prunier *et al.*(1973) ont présenté les premiers résultats rapportant l'efficacité de ces produits pour abaisser les populations épiphytes de *P.s.pv. persicae* au cours de l'automne. Mais, la phytotoxicité des sels de cuivre est un problème sérieux qui limite leur utilisation. Par ailleurs, l'efficacité du cuivre est restreinte parce que le cuivre est un bactéricide de contact. Il ne peut donc pas atteindre les bactéries qui se trouvent déjà dans la plante et les maîtriser, notamment dans les bourgeons dormants ou dans les chancres. Cette méthode commence à perdre de l'efficacité après l'apparition de souches de *P.s.pv. syringae* résistantes au cuivre isolées à partir des arbres fruitiers. Le traitement à base de cuivre doit être appliqué avant le débournement, ce qui protège les arbres contre les infections du printemps. Le cuivre doit être appliqué de manière préventive mais ne présente pas une protection totale. Pour les vergers où le chancre bactérien est déjà présent, on recommande trois applications de cuivre au printemps. Le traitement d'automne vise à protéger les portes d'entrée créées par la chute des feuilles. Cependant, il ne peut pas prévenir la formation de chancres, qui résultent d'une infection s'étant produite au cours de l'été.

### 5.2. Lutte biologique

Cette voie de lutte consiste à obtenir une bonne installation sur la plante des souches qui présentent *in vitro* une activité antagoniste vis-à-vis une bactérie phytopathogène. L'activité antagoniste des souches sélectionnées *in vitro* ne s'exprime pas toujours sur la plante qui représente des difficultés de mise en œuvre d'une lutte biologique. Cette méthode a pour but la réduction de l'intensité des dégâts de gel relié au pouvoir glaçogène des *P. syringae*. Sobiczewski (1987) a isolé 4 souches (*Pseudomonas* non fluorescents, *E. carotovora*, *E. herbicola* et une Entérobactérie) capables de protéger les fruits verts de cerisiers contre *P. s. pv. syringae*. Lindow (1982) a réduit de 10 à 500 fois la population de *P. syringae* glaçogène par l'apport de bactéries antagonistes. Cody *et al.* (1987) ont réussi à abaisser de 10 à 100 fois les populations de *P.s.pv. syringae* sur poirier avec des souches de *P. fluorescens* et de *P. putida* antagonistes. Kim *et al.*(1989) ont obtenu des résultats après installation d'une levure (*Candida sp*) antagoniste de *P.s.pv. syringae*.

Une autre stratégie de lutte biologique a été proposée par Morris et Rouse (1985). Il s'agit de prendre en compte le rôle des éléments nutritifs qui régulent la vie épiphyte. Le but est d'obtenir une colonisation de la plante par une bactérie ayant les mêmes besoins nutritionnels que la souche sauvage glaçogène. Lindow (1988a, b) et Lindow et Panopoulos (1991) ont installé sur les plantes, très tôt au printemps, un mutant non glaçogène de *P.s.pv. syringae*, construit par délétion du gène responsable du pouvoir glaçogène. C'est d'ailleurs la première expérience d'utilisation d'un microorganisme génétiquement modifié dans la lutte contre les maladies bactériennes des plantes. Leurs résultats montrent une limitation des populations de *P.s.pv. syringae* naturelles glaçogènes. Cela affecte partiellement le pouvoir de pénétration de la bactérie et induit de faibles dégâts de gel.

# **MATERIEL ET METHODES**

## IV. Matériel et méthodes

### 1. Echantillonnage

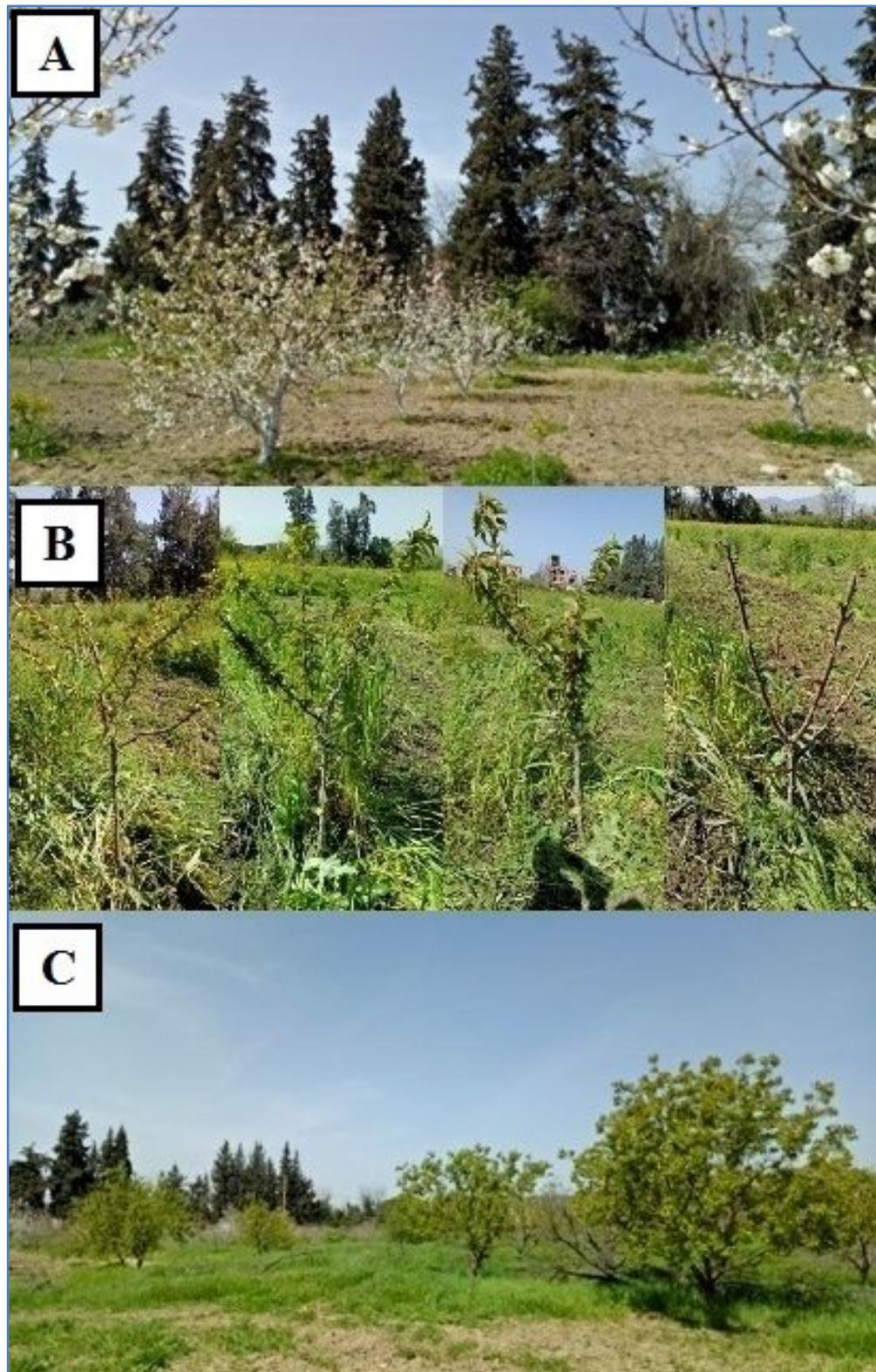
Une sortie a été organisée en collaboration avec l'équipe de l'INPV de Constantine. L'objectif est de diagnostiquer le chancre causé par *Pseudomonas Syringae* et réaliser l'échantillonnage. La sortie a été effectuée le 02/04/2018 aux vergers de la commune de Hamma Bouziane, Wilaya de Constantine. Le prélèvement d'échantillon a été fait de 2 sites : site 1 – premier verger proche de Hamma Bouziane contenant une pépinière et site 2 – ferme Rahli.

La prospection visuelle a permis la localisation des arbres atteints du chancre bactérien sur les lieux d'échantillonnages. Les symptômes recherchés affectent principalement toutes les parties aériennes contaminées par le pathogène. Les échantillons étaient pris à partir de 2 espèces d'arbres fruitiers à noyaux différentes : cerisier et abricotiers. Les variétés du site 1 sont identifiées, hors que celles du site 2 sont inconnues comme indiqué dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Liste des sites, espèces et variétés (avec leurs codes) d'où l'échantillonnage a été effectué

Site	Espèce	Variété	Code
Site 1 - verger 1 -	Cerisier	Texraine	CT
		Stark Hardy geant	CS
	Abricotier	Commun	A
Site 2 - Rahli -	Cerisier	Inconnu	C
	Abricotier	Inconnu	a

L'échantillonnage a été réalisé à l'aide d'un sécateur désinfecté à l'alcool 70° après chaque usage. Le prélèvement est fait à partir de plusieurs organes de la plante (feuilles, rameaux et fleurs) et à partir de plusieurs arbres infectés et espacés. Les échantillons ont été placés dans différents sacs en papier stérile et étiquetés pour chaque espèce et variété, puis ils ont été transportés directement au laboratoire de l'INPV dans des conditions isothermes de 4°C.



**Figure 6** : Les sites d'échantillonnage : (A - B) premier verger et (C) ferme Rahli



**Figure 7 :** Symptômes du Chancre bactérien observés sur les arbres d'Abricotier et de Cerisier dans les sites de prélèvements

## 2. Traitements des échantillons

### 2.1. Préparation des macérates

Afin de préparer les macérâtes, les rameaux prélevés sont premièrement désinfectés superficiellement à l'aide de coton imbibé d'éthanol à 70°; hors que les feuilles sont passées rapidement sur la flamme du bec Bunsen. Les rameaux et les feuilles désinfectées sont découpés en petits segments à l'aide d'un ciseau désinfecté puis pesées par une balance électrique. Ces segments sont mis en suspension dans de l'eau distillée stérile dans des boites de Pétri. Cela nous conduit à obtenir un macérât qu'on a laissé reposer pendant 10-20 min. Cette étape est effectuée pour tous les échantillons prélevés. Les poids et les quantités d'eaux ajoutées pour chaque échantillon sont résumés dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Poids tissus végétales et quantités d'eau distillée stérile utilisées dans la préparation des macérâtes de chaque échantillon

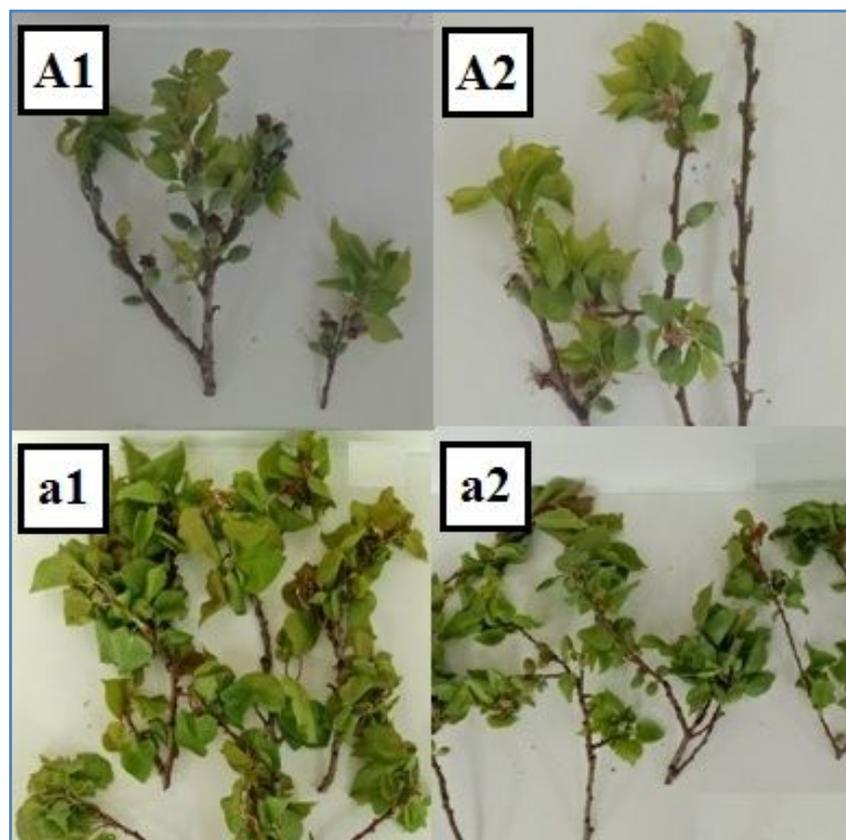
Code d'échantillon		Poids (g)	Quantité d'Eau Distillée Stérile (ml)
Cerisier	CT	CT1	9
		CT2	6
	CS	CS1	10
		CS2	6
	C	C1	20
		C2	20
Abricotier	A	A1	10
		A2	10
	a	a1	15
		a2	15

### 2.2. Le dénombrement

A partir du macérât (solution mère) de chaque échantillon, une série de dilutions décimales au 1/10 est préparée. 100µl de chaque dilution estensemencé par étalement sur la gélose PCA (Institut Pasteur, Algerie). Par la suite, les boitesensemencées sont retournées, mise à l'étuvé à 27°C pendant 3-5 jours. Chaque échantillon est analysé en duplicata pour augmenter la probabilité d'isoler l'agent pathogène. Après incubation, les résultats sont exprimés en UFC/ml en fonction de la dilution.



**Figure 8 :** Les échantillons transportés dans les conditions isothermes dans une glacière dans des sachets en papier avant le commencement des traitements



**Figure 9 :** Les échantillons de l'espèce Abricotier



**Figure 10** : Les échantillons de l'espèce Cerisier



**Figure 11** : La préparation d'une macérât à partir du matériel végétal

### 2.3. Test de présence ou absence de bactéries

En utilisant une anse de platine, quelques gouttes du macérât ont étéensemencées par la technique de trois quadrants sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LPGA (Levure Peptone Glucose Agar, Institut Pasteur, Algerie). Cette opération est faite en triplicata. Par exemple, la suspension obtenue de l'échantillon CT1 va donner 3 ensemencements en milieu LPGA : R1CT1, R2CT1 et R3CT1, de même que pour les autres échantillons. Ces boîtes de Pétri sont étiquetées et ensuite incubées à 27°C pendant 72 heures.

### 2.4. Repiquage sur le milieu B de King

Les colonies présentant des caractères culturels de la bactérie pathogène sur LPGA sont repiquées et déposées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile. Chaque suspension bactérienne a été utilisée pour ensemenecer des boîtes de Pétri contenant le milieu semi-sélectif B de King (KB) par la méthode des 3 quadrants. Après incubation à 27°C pendant 3-5 jours, une lecture des boîtes se fait par observation visuelle des caractères macroscopiques des isolats.

### 2.5. Purification et conservation des souches obtenues

Les bactéries sont purifiées par repiquage sur la gélose nutritive (GN) par la méthode des stries. L'opération de purification est renouvelée successivement. Le contrôle de la pureté de la souche consiste à des observations macroscopiques à l'œil nu et microscopiques après coloration de Gram. Une fois un aspect microscopique homogène est obtenu, la souche est considérée pure. Après purification, les souches isolées sont ensemencées par pique dans le culot et par stries sur la pente de la GN inclinée, puis incubées à 27°C pendant la durée recommandée. Après une croissance visible, la conservation est faite dans des tubes Eppendorf contenant le glycerol plus milieu bollion. Les tubes inclinés sont conservés à l'abri de la lumière à 4°C. Cette méthode nécessite un repiquage tous les 2-3 mois.

## 3. Identification des isolats

L'identification phénotypique des isolats est effectuée grâce aux examens macroscopique et microscopique, le test de LOPAT, sur milieux semi-sélectifs et sur galerie Api 20E. Ces tests conduisent d'une part à l'identification de l'espèce ou parfois même la sous-espèce bactérienne. Cette méthode vérifie la présence des caractères spécifiques des *Pseudomonas* et commence par des caractères généraux aux plus spécifiques. La composition des milieux de culture utilisés dans cette étude est mentionnée en annexe 01.

### 3.1. Examen macroscopique

L'observation macroscopique a été réalisée sur les colonies qui ont poussé sur le milieu LPGa après 72 heures d'incubation. 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 culturales des bactéries phytopathogènes et plus spécifiquement des *Pseudomonas*.

### 3.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une étape importante et essentielle pour l'identification d'une bactérie isolée et la vérification de la pureté de l'isolat. Dans le but d'effectuer cette étude, les frottis de chaque colonie d'un isolat bactérien de 24h-78h sont préparés et observés au microscope optique Motic à l'objectif 40X et à immersion 100X (Singleton, 2005). Les bactéries non décolorées par l'alcool sont dites à Gram positif, elles apparaissent en violet. Tandis que les bactéries à Gram négatif, décolorées par l'alcool et recolorées par le colorant de contraste, apparaissent en rose. Cette coloration permet aussi d'observer la morphologie des bactéries (bacille ou cocci) et leurs modes d'association.

### 3.3. Test de potasse (KOH) indicateur de Gram

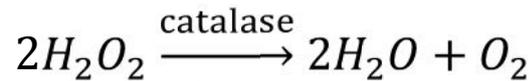
Ce test vise à déterminer si la bactérie est Gram positif ou négatif. Une colonie bactérienne de 24 à 48 heures est mélangée à une goutte de solution de KOH à 3% préalablement déposée sur une lame de microscope. Le Gram est considéré comme négatif s'il y a formation de filament en soulevant l'anse. En cas d'absence de filaments, le Gram est positif (Suslow *et al.*, 1982). Ce procédé utilise la destruction rapide de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif dans une solution alcaline, libérant l'acide désoxyribonucléique, ce qui provoque la viscosité de la solution.

### 3.4. Test de fluorescence

Les cultures bactériennes en boîte de Pétri du milieu B de King ont été observées sous une lampe de Wood émettant une lumière ultraviolette ayant une longueur d'onde de 360 - 375 nm afin de noter la présence ou l'absence de pigments fluorescents bleus ou verts qui permet la mise en évidence de la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent (Lelliott *et al.*, 1966). Les bactéries pathogènes des plantes produisent une variété de couleurs et de pigments, qui leur sont caractéristiques.

### 3.5. 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 aérobiques ou aéro-anaérobiques et souvent absente chez les bactéries anaérobies. Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène (ou l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène (Levy *et al.* 1992).



Il est effectué avec la mise en contact d'une suspension bactérienne avec une goutte d'eau oxygénée d'une solution fraîche. La technique consiste à prélever la crème bactérienne au moyen d'une boucle d'anse stérile (ou bien à l'aide d'une pipette Pasteur) et la déposer dans une goutte d'eau oxygénée à 3% sur une lame stérile (Prescott *et al.*, 2007). L'observation est faite immédiatement. L'apparition des bulles (dégagement gazeux de dioxygène) est une réaction positive et révèle la présence d'une catalase produit par la bactérie (Singleton, 2005).

### 3.6. Test de Mannitol-mobilité

L'ensemencement du milieu mannitol mobilité (Institut Pasteur, Algérie) s'est fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec une colonie pure et jeune de 24h de la souche à tester. Après incubation pendant 24-78h, l'apparition d'une culture bactérienne le long de la piqûre centrale indique que la bactérie est immobile. Les bactéries mobiles envahissent tout le milieu à partir de la piqûre centrale qui sera observé sous forme d'un trouble et d'une culture bactérienne dans toute la surface du tube indiquant que la bactérie est très mobile.

Après l'incubation à 27 C° durant 3 à 5 jours, la fermentation du mannitol provoque un virage au jaune du milieu. Si on ajoute quelques gouttes des réactifs de nitrate réductase I et II, le milieu change de coloration et devient rouge rose attestant la présence de la nitrate réductase (nitrates réduits en nitrites) et le test est positif. Si le test est négatif, il demeure incolore (Freney *et al.*, 1992).

### 3.7. Test Hugh et Leifson (Oxydation / Fermentation)

Le milieu de Hugh et Leifson contient un indicateur de pH qui permet de déterminer la voie métabolique empruntée par les différentes espèces bactériennes (Guiraud, 1998). Ce test

permet de déterminer si le métabolisme du glucose est oxydatif ou fermentatif. A l'aide d'un fil (ou une anse) de platine stérilisé, une jeune colonie est prélevée à partir de l'isolat bactérien qui est ensuite ensemencée par piqure centrale dans deux tubes à essai gélosés contenant le milieu Hugh et Leifson. Les deux tubes sont incubés à une température de 26°C pendant 3 à 5 jours. L'un des deux tubes est recouvert de 1 à 1,5 cm d'huile de vaseline stérile pour créer la condition d'anaérobiose et l'autre reste en condition d'aérobiose.

Le résultat positif se traduit par le virage de l'indicateur bleu de bromothymol au jaune. Lorsque les deux cultures ont une acidification rapide et égale et virent au jaune, la bactérie est dite « fermentative ». Si, par contre, la coloration jaunâtre se produit uniquement dans les cultures soumises aux conditions d'aérobiose, la bactérie est dite oxydative (Hugh et Leifson, 1953). Les bactéries dégradant le glucose de manière oxydative provoquent l'acidification lente du milieu dans le tube sans vaseline. Or, dans le tube vaseliné elles ne peuvent pas se développer (Marchall, 1982). Enfin pour les bactéries inactives, il y a peu ou pas de culture dans le tube fermé. Quant au tube ouvert, il y a une croissance sans modification du pH (pas d'acidification) ou avec une alcalinisation plus ou moins forte en surface (virage au rouge violet) (Maury, 1987).

### 3.8. Test de Levane

Ce test permet de vérifier la polymérisation du fructose en poly-fructose par la bactérie (Schaad, 1988). A l'aide de l'anse à inoculation, l'ensemencement d'une colonie bactérienne jeune se fait par une série de stries sur une boîte de Pétri contenant le milieu levane solide, puis incubées à 26 ° C pendant 3 à 5 jours. L'apparition d'une culture blanche, abondante, bombée, muqueuse, convexe, luisante et brillante indique que la bactérie possède une levane sucrase (test positif) (Goszczyńska *et al.*, 2000).

### 3.9. Test d'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence la présence (ou non) du complexe enzymatique : cytochrome-oxydase (cytochrome C19) dans la chaîne respiratoire des bactéries (Schaad, 1988). Le test est réalisé en utilisant des disques d'oxydase (Himedia laboratoires, Mumbai, India). On peut aussi utiliser un papier filtre imbibé de réactif oxydase (Tetra-méthyl-p-phenylenediamine dihydrochloride dilué à 1% dans de l'eau). Un de ces disques est placé dans une boîte de Pétri vide. On dépose sur celui-ci une colonie bactérienne en utilisant une pipette Pasteur stérilisée au préalable. Après 30 secondes une réaction oxydase positive

indique qu'il a eu oxydation du réactif phénylénediamine pour former un composé coloré en violet : l'indophénol. L'absence de la coloration violette est due à l'absence de l'enzyme recherchée, cela indique que la bactérie est dépourvue de cette enzyme respiratoire (Singleton, 2005).

### 3.10. Test Pectinase

Le test Pectinase permet d'identifier l'activité pectinolytique d'une bactérie, c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine présente dans un milieu de culture spécifique (Rathore *et al.*, 2000). Les tranches de pomme de terre sont stérilisées à l'éthanol 70% puis lavées à l'eau distillée stérile et ensuite séchées. Les tranches sont déposées dans une boîte de pétri contenant du papier filtre mouillé (ou de l'eau physiologique stérile). Des colonies bactériennes fraîchement prélevées ont été inoculées au centre des rondelles et incubés à 26° C pendant 7 à 14 jours. Une réaction positive se traduisant par la pourriture de la pomme de terre et la production d'une forte odeur indésirable et l'apparition de nécrose signifie la présence de l'enzyme pectinase.

### 3.11. Test d'hypersensibilité sur Tabac

Hypersensibilité du Tabac (Rathore *et al.*, 2000) met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie suite au dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac. Une suspension bactérienne de 1 ml ayant une concentration de  $10^8$  bactéries/ml d'une culture jeune (de 24 à 78h) est injectée, à l'aide d'une seringue, dans l'espace intercellulaire entre l'épiderme et le parenchyme palissadique d'une jeune feuille de tabac. L'eau distillée stérile est utilisée comme témoin négatif. Le test est considéré positif s'il y a apparition d'une tache nécrotique correspondant à la zone infiltrée. La lecture est faite après 3 à 5 jours et à température ambiante. Le dessèchement des zones foliaires inoculées signifie que la bactérie est phytopathogène. Le résultat est négatif si aucune réaction n'est observée (Schaad *et al.*, 2001).

### 3.12. Les galeries API 20 E

L'identification des souches bactériennes peut être affinée en utilisant le Kit miniaturisé et standardisé des techniques biochimiques conventionnelles l'API system (Appareillage et Procédé d'Identification). Ce kit est élaboré pour identifier différentes souches bactériennes dont des bacilles à Gram négatif non fastidieux et les anaérobies facultatives comme les Enterobacteriaceae. Les galeries API 20 E (commercialisées par

Biomerieux, SA., Marcy-L'Étoile, France) comportent 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée.

A partir d'une culture pure et jeune de 24h à 78h, une suspension bactérienne est préparée dans 5 ml d'eau distillée stérile. La suspension a une concentration de  $5 \times 10^8$  UFC/ml, ce qui correspond à une turbidité égale au standard McFarland N°5. A l'aide d'une micropipette, un volume de 150  $\mu$ l de cette suspension a été déposé dans chaque microtube. Le volume pour les microtubes CIT (citrate), VP (piruvate de sodium) et GEL (gélatine), est de 300  $\mu$ l par puits. Cela évite la formation de bulles d'air. Les microtubes ADH (arginine déshydrolase), LDC (lysine déshydrolase), ODC (ornithine décarboxylase), H<sub>2</sub>S (sulfure d'hydrogène) et URE (uréase) sont recouverts d'huile de vaseline stérile pour assurer la condition d'anaérobiose. La période d'incubation à 37°C est de 24-78h, dans une atmosphère humide permettant à la bactérie de réagir avec les substrats. Les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs :

- VP : une goutte d'hydroxyde de potassium (40%) et une goutte d'alpha-naphtol (6%) sont ajoutées (il faut attendre 10 minutes avant de faire la lecture de la réaction).
- TDA : une goutte de chlorure ferrique (10%) est additionnée. La lecture de la réaction se fait immédiatement.
- IND : la lecture de la réaction se fait immédiatement après l'ajout d'une goutte du réactif de James.
- Deux tests complémentaires sont effectués : la réduction des nitrates en nitrites (NO<sub>2</sub>) et en azote (N<sub>2</sub>) en ajoutant des réactifs NIT 1 et NIT 2, puis le Zinc dans le tube GLU.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture des couleurs obtenues (établi par les fournisseurs voir Annexe 2). L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique spécifique de la galerie API 20 E ou d'un logiciel d'identification. Les tests sont regroupés en groupe de 3. Une réaction négative donne 0 point tandis qu'une réaction positive donne 1, 2 ou 4 points. On additionne à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient enfin un code de sept chiffres qui correspond à l'identification de la souche.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

### V. Résultats et discussion

Comme annoncé en introduction, le diagnostic des maladies et la détection des pathogènes sont des éléments très importants dans le cadre des mesures de lutte et de prévention contre les maladies infectieuses des plantes. L'objectif de cette étude entre dans ce contexte. Il consiste à isoler l'agent phytopathogène à partir de deux espèces d'arbres fruitiers à noyaux (abricotier et cerisier) de différents stades de symptômes d'une maladie bactérienne comme la gommose et lésion sur le tronc, les taches nécrotiques et criblures sur les feuilles, ainsi que la mortalité des bourgeons. Ces symptômes sont caractéristiques au chancre bactérien causé par la bactérie *Pseudomonas syringae*. Pour effectuer une identification du germe à partir d'isolat, nous avons procédé à des tests morphologiques et biochimiques, finalisés par l'utilisation des galeries API 20E.

L'agent pathogène recherché est une bactérie bacille de Gram négatif. Elle est mobile et non sporulante et peut être isolée en paires ou en chaînes. Elle est une catalase positive, d'oxydase négative et un métabolisme oxydatif et non fermentatif. La plupart des souches produisent un pigment jaune verdâtre et fluorescent sous UV sur milieu B de King. Les colonies de *P. syringae* sont de taille petite à moyenne de 1,7 - 2 mm de diamètre, de couleur crème à blanc crème. Le profil est légèrement relevé, bombé et convexe. Ces colonies sont de consistance crémeuse, lisses, translucides, d'un aspect brillant et collant.

#### 1. Purifications des isolats

Le protocole de détection de la bactérie *P. syringae* commence par plusieurs cultures sur des milieux nutritifs et semi-sélectifs. Lors de cette étude, les principaux milieux de culture utilisés sont : LPGA, PCA, GN, le milieu B de King et le milieu BCP. Plusieurs colonies ayant poussé sur milieu LPGA présentent de différents caractères résumés dans le tableau 7. Les colonies du milieu LPGA présentant une morphologie typique et suspectes d'être phytopathogène et *P. syringae* ont été isolées sur milieu KB. Ces colonies sont de couleur jaune et blanche pour l'espèce Cerisier et Jaune, blanche et crème pour l'espèce Abricotier. Des boîtes séparées sont utilisées pour chaque type de colonies. Par conséquent, les 21 isolats sont réensemencés avec les codes suivants : CS1J, CS2B, CS2J, CT1B, CT1J, CT2B, C1B, C1J, C2B, C2J, a1BB, a1J, a1BJ, a2B, A1J, A1C, A2B, A2J, A2C, et A1B. Le processus de purification des isolats s'est répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention de cultures pures. Le milieu GN est utilisé pour croître le nombre des bactéries facilitant la réalisation des

différents tests. Le milieu PCA est utilisé pour faire le dénombrement avec différentes dilutions de la solution mère. Voir tableau 8 pour les résultats du dénombrement.

**Tableau 7 :** Descriptions de l'aspect macroscopique des souches ensemencées dans LPGA  
(avec B : Blanche, C : Crème, J : Jaune, PCh : Présence de champignons)

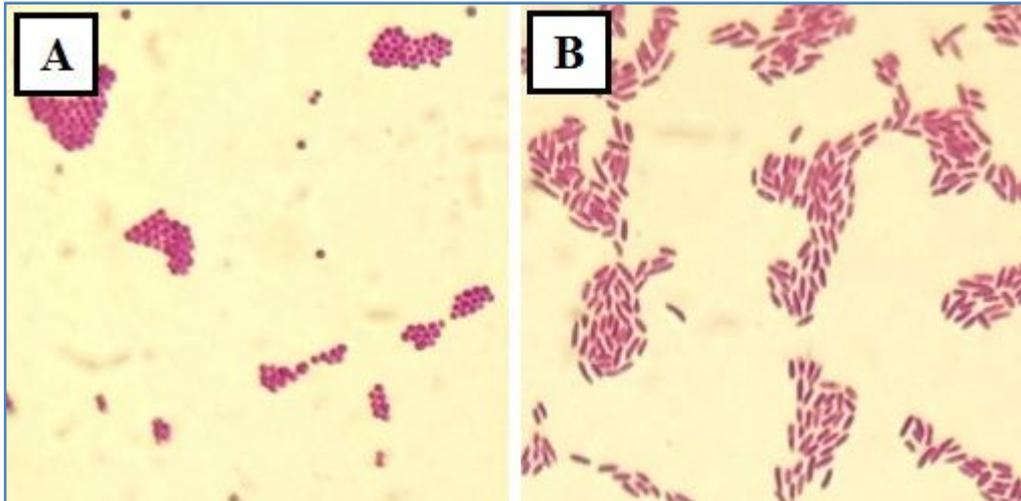
Souche	Forme	Relief	Conteur	Taille	Couleur	Surface	Opacité	Odeur
a1 (R1-R2-R3)	Ronde	Plate	Régulier	<1mm	B-C-J	Lisse	Bouillonnante	PCh
a2 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	<1mm	B-C-J	Lisse	Bouillonnante	PCh
A1 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	1-2mm	B-C-J	Lisse	Bouillonnante	PCh
A2 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	1-2mm	B-C-J	Lisse	Bouillonnante	PCh
C1 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	<1mm	B-J	Lisse	Bouillonnante	PCh
C2 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	<1mm	B-J	Lisse	Bouillonnante	PCh
CS1 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	1-2mm	B-J	Lisse	Bouillonnante	-
CS2 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	1-2mm	B-J	Lisse	Bouillonnante	-
CT1 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	1-2mm	B-J	Lisse	Bouillonnante	PCh
CT2 (R1-R2-R3)	Ronde	Bombé	Régulier	1-2mm	B-J	Lisse	Bouillonnante	PCh

**Tableau 8 :** Dénombrement des souches ensemencées dans PCA

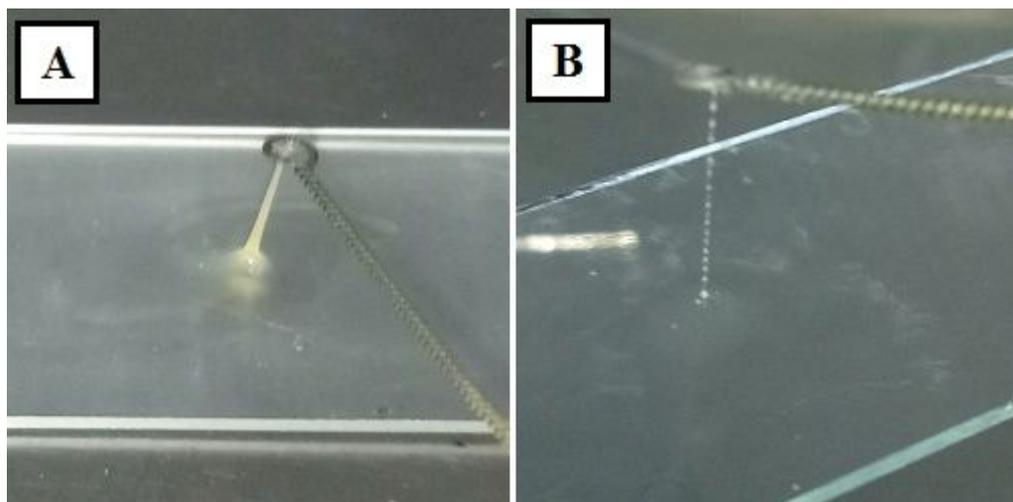
Souche	Nombre des colonies	Souche	Nombre des colonies
a1 (-1)	+ 300	C1 (-3)	17
a2 (-2)	50	C2 (-4)	+ 100
a1 (-3)	+ 100	CS1 (-1)	93
a2 (-4)	0	CS2 (-2)	15
A1 (-1)	+ 200	CS1 (-3)	1
A2 (-2)	17	CS2 (-4)	0
A1 (-3)	87	CT1 (-1)	35
A2 (-4)	28	CT2 (-2)	Tapi
C1 (-1)	+ 100	CT1 (-3)	2
C2 (-2)	+ 100	CT2 (-4)	Tapi

### 2. Tests biochimiques classiques

Les cultures pures et jeunes (24 heures) de chaque isolat sont prélevées à partir du milieu KB. Une succession de tests sont effectués pour identifier les espèces présentes qui sont: coloration de Gram, test de potasse KOH, catalase, oxydase, mannitol-mobilité, oxydation/Fermentation, levane, pectinase, test de fluorescence sur KB, le test d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac et identification par système API 20E.



**Figure 12 :** La coloration de Gram : (A) cocci à Gram négatif (souche C2B) et (B) bacille à Gram négatif (souche CT1J) ; les deux bactéries se regroupent en amas



**Figure 13 :** Le test de potasse indicateur de Gram : La formation d'un filament mucoïde confirme le Gram négatif (A) souche a1J et (B) souche CT1B

**Tableau 9 :** Descriptions de l'aspect microscopique des souches étudiées par la coloration de Gram et le test de potasse

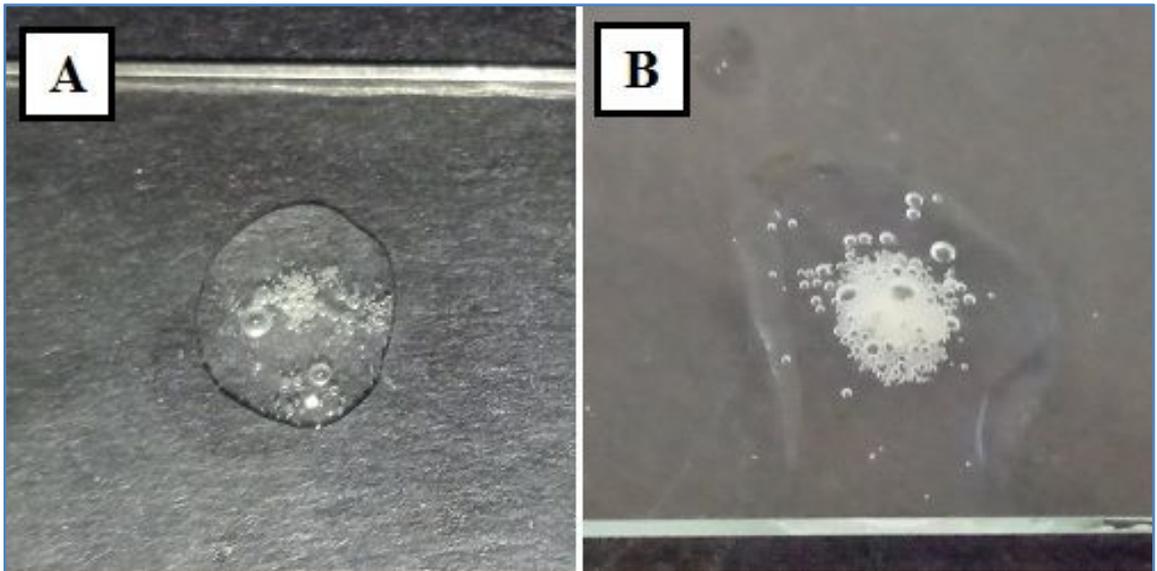
Souche	Aspect microscopique				
	Gram	Aspect des cellules	Présences de spores	Regroupement	KOH à 3%
a1BB	-	Bacille	non	Amas	+
a1BJ	-	Cocci	non	Amas	+
a1J	-	Bacille	non	Amas	+
a2B	-	Bacille	non	Amas	+
A1B	-	Bacille	non	Amas	+
A1C	-	Cocci	non	Amas	+
A1J	-	Bacille	non	Amas	+
A2B	-	Bacille	non	Amas	+
A2C	-	Bacille	non	Amas	+
A2J	-	Bacille	non	Amas	+
C1B	-	Cocci	non	Amas	+
C1J	-	Bacille	non	Amas	+
C2B	-	Cocci	non	Amas	+
C2J	-	Bacille	non	Amas	+
CS1B	-	Bacille	non	Amas	+
CS1J	-	Bacille	non	Amas	+
CS2B	-	Cocci	non	Amas	+
CS2J	-	Bacille	non	Amas	+
CT1B	-	Bacille	non	Amas	+
CT1J	-	Bacille	non	Amas	+
CT2B	-	Bacille	non	Amas	+

### 2.1. Coloration de Gram et test de potasse :

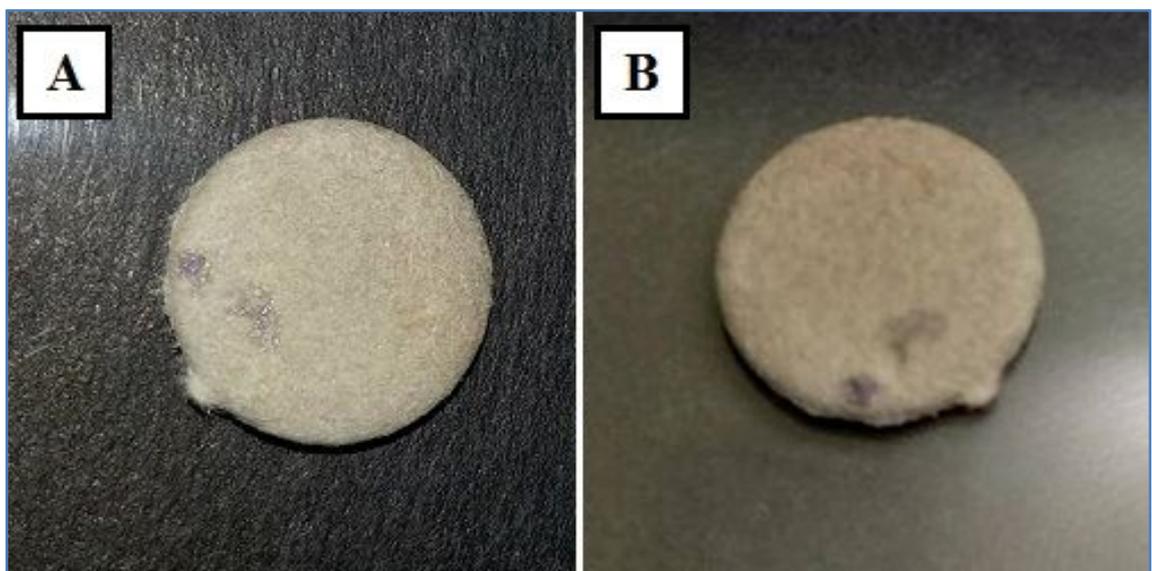
La coloration de Gram a révélée que tous les souches sont de Gram négatif. Ce constat est vérifié par le test de potasse indicateur de Gram. L'augmentation de la viscosité du KOH et la formation d'un filament mucoïde confirme que ces bactéries sont à Gram négatif. L'observation microscopique des colorations de Gram divise nos bactéries selon l'aspect des cellules à 16 bacilles et 5 cocci. Les différents isolats se regroupent en amas. Ces résultats sont résumés dans le tableau 9.

### 2.2. Test catalase et oxydase

Dans le test de catalase, l'apparition de bulles est due à un dégagement gazeux de dioxygène est observée pour les 21 isolats signifiant qu'elles possèdent la catalase, et sont dites catalase positive. Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire aérobique stricte (AS) et aéro-anaérobique facultatif (AAF) qui peuvent décomposer les peroxydes. L'oxydase représente un intérêt taxonomique pour les bactéries à Gram négatif. L'absence de tache rose violette après trente secondes signifie que nos bactéries ne possèdent pas l'activité oxydase, elles sont dites oxydase négative.



**Figure 14** : Test de Catalase : le test positif pour les souches (A) A1B et (B) CT1B

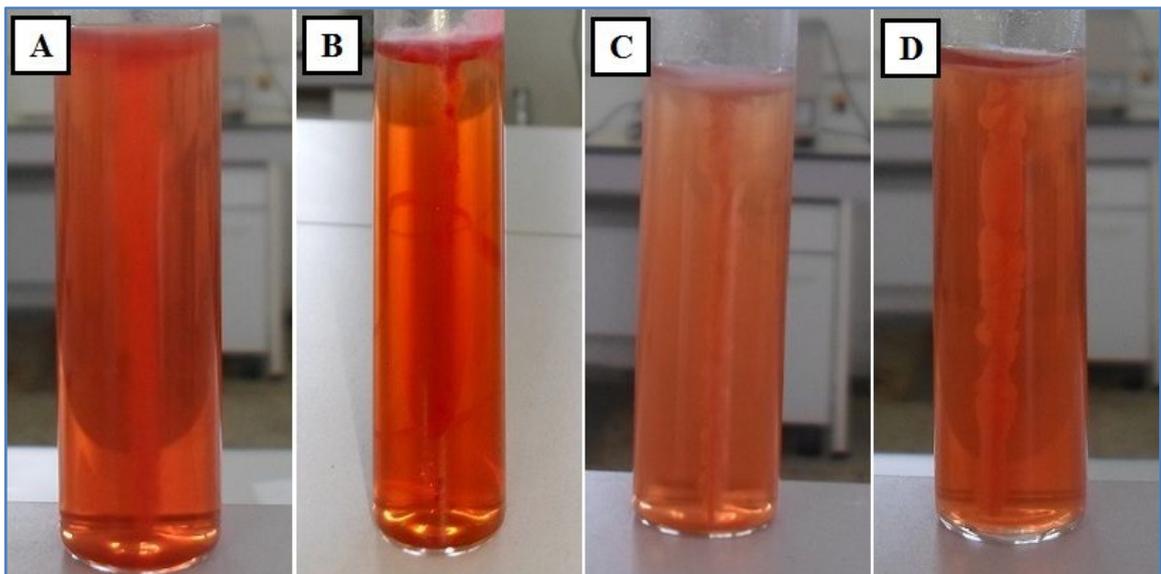


**Figure 15** : test d'oxydase : le test négatif pour les souches : (A) A1B et (B) C2J

Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* sont des bacilles à Gram négatif, mobiles ou immobiles, aéro-anaérobies facultatifs (AAF), oxydase négative, catalase positive, nitrate positif et non sporulées. Les résultats obtenus des Gram et tests de catalase et d'oxydase, signifie que nos souches appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Cela permet leur identification par la galerie API 20E.

### 2.3. Test Mannitol-Mobilité et Hugh-Leifson :

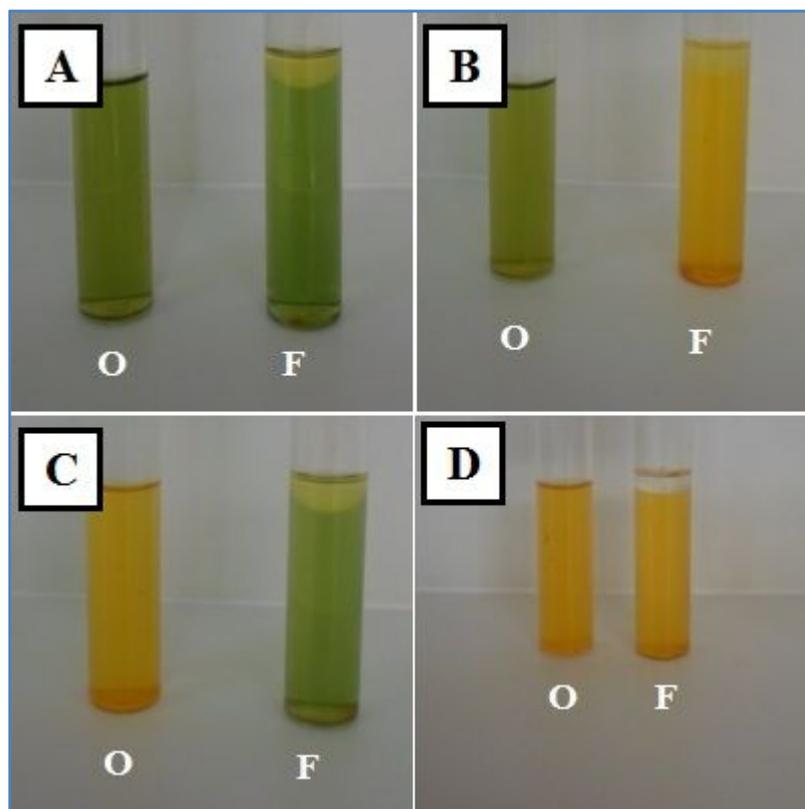
Pour toutes les 21 souches, aucun virage au jaune n'a été observé dans les tubes du mannitol-mobilité. Ce qui indique que toutes les souches ne fermentent pas le mannitol, et elles sont dites mannitol négative. Les bactéries qui se reproduisent seulement le long de la pique sont des espèces immobiles. Ce cas est observé pour 12 souches. La croissance des bactéries dans tout le tube du test indique la présence de bactéries mobile, qui est le cas pour 9 souches. Les résultats sont résumés dans le tableau 10.



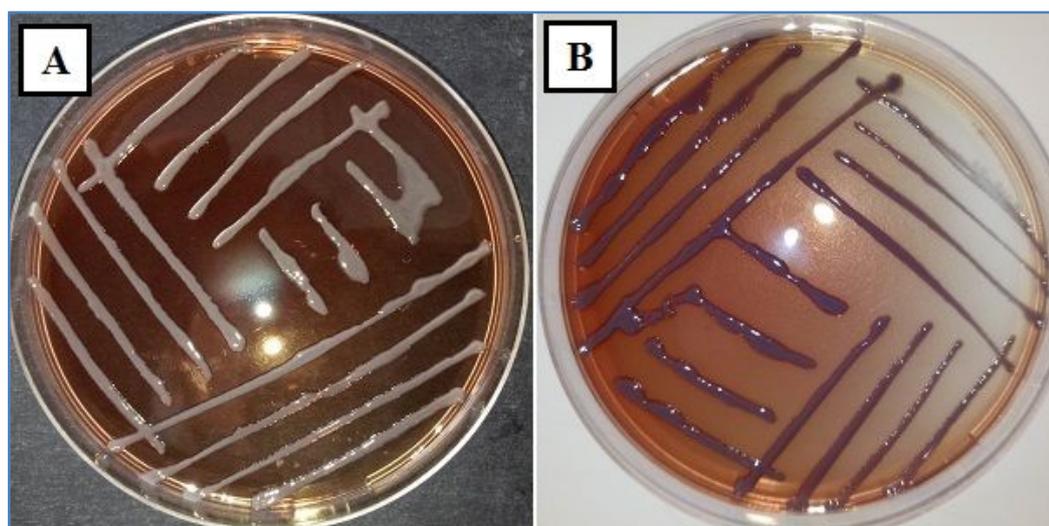
**Figure 16 :** Test Mannitol-Mobilité : le test pour les souches sont (A) souche a1J, (B) A1C, (C) CT1B et (D) CT1J

Pour le test Hugh Leifson, le virage des tubes en jaune est l'indice de la manière de la dégradation du glucose. Seuls les tubes en aérobiose ont virés vers le jaune pour les souches : CS1B, C2J, A1C et a2B, indiquant que se sont des bactéries oxydatives. Seuls les tubes en anaérobiose se transforment en jaunâtre pour la souche a1BB, qui est donc fermentative. Les deux tubes en aérobiose et anaérobiose virent vers le jaune pour les souches : CT1B, CT1J, CT2B, CS2B, CS2J, C1B, A1B, A2B, A2J, A2C et a1J; indiquant que ces bactéries sont

fermentatives facultatives. Pour les souches a1BJ, A1J, C1J, C2B et CS1J, les bactéries ne représentent aucune activité et les deux tubes restent verts.



**Figure 17 :** Test Hugh Leifson d'oxydation du glucose: Le test des souches (A) A1J inactif, (B) a1BB fermentatif, (C) C2J oxydatif et (D) CS2J fermentatif facultatif (O : oxydatif, F : fermentatif)



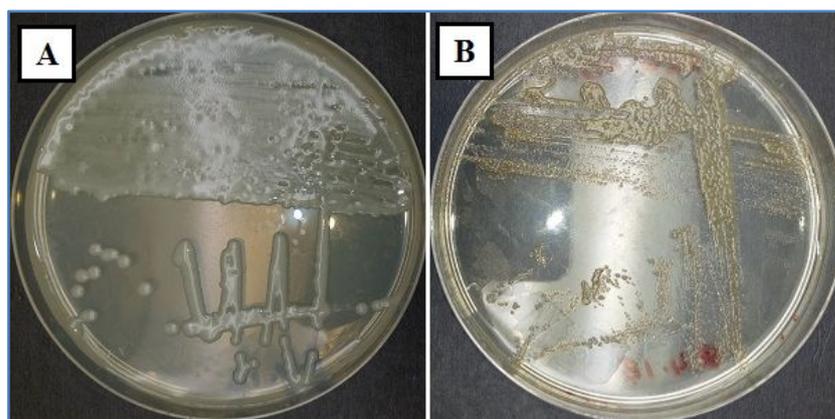
**Figure 18 :** Test de fermentation du lactose sur le milieu BCP : Test des souches (A) CT1B et (B) A2J

### 2.4. Test lactose et levane :

Une culture de ces souches est faite sur le milieu BCP (bromocresol purple) pour déterminer si le lactose du milieu est utilisé par les bactéries, par fermentation. Cela est indiqué par un virage au jaune. Ce changement de couleur n'est observé dans aucune des boîtes ensemencées par les 21 souches ; indiquant que toutes ces souches sont de lactose négatif. L'apparition d'une culture blanche bombée et brillante a indiqué un test positif et la présence du levane sucrase pour les souches : CT2B, C1B et C1J. L'absence de ce type des colonies a confirmé un test négatif pour les souches : C2B, CT1B, CT1J et CS1B.

**Tableau 10** : Résultats des tests : Catalase, Oxidase, Mannitol-mobilité, Hugh-Leifson et culture sur BCP

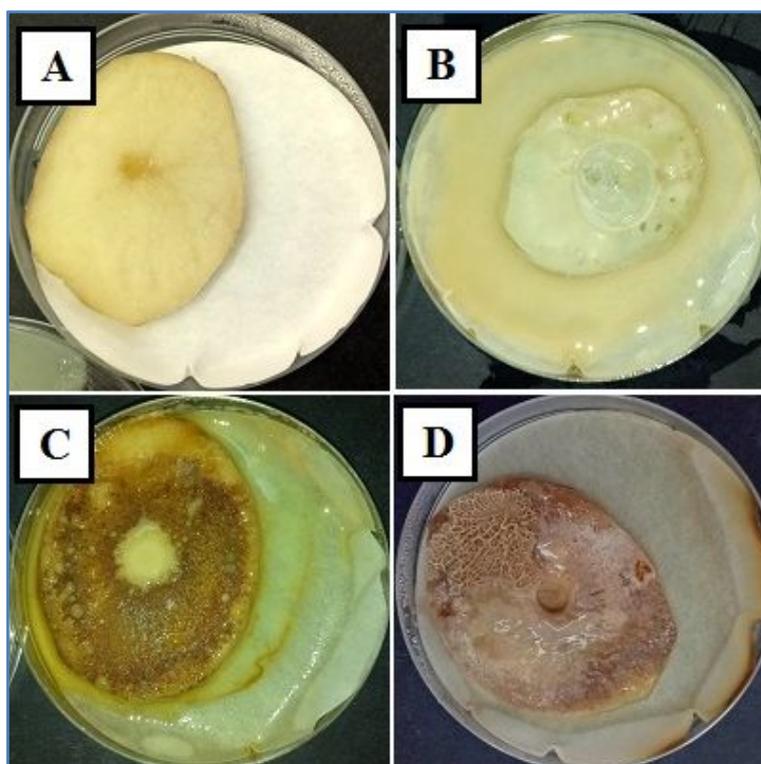
Souche	Catalase	Oxidase	Mannitol-Mobilité		Hugh-Leifson		BCP
			Mannitol	Mobilité	aérobiose	anaérobiose	Lactose
a1BB	+	-	-	Immuable	Vert	Jaune	-
a1BJ	+	-	-	Immuable	Vert	Vert	-
a1J	+	-	-	Immuable	Jaune	Jaune	-
a2B	+	-	-	Immuable	Jaune	Vert	-
A1B	+	-	-	Immuable	Jaune	Jaune	-
A1C	+	-	-	Immuable	Jaune	Vert	-
A1J	+	-	-	Mobile	Vert	Vert	-
A2B	+	-	-	Immuable	Jaune	Jaune	-
A2C	+	-	-	Mobile	Jaune	Jaune	-
A2J	+	-	-	Mobile	Jaune	Jaune	-
C1B	+	-	-	Mobile	Jaune	Jaune	-
C1J	+	-	-	Immuable	Vert	Vert	-
C2B	+	-	-	Mobile	Vert	Vert	-
C2J	+	-	-	Immuable	Jaune	Vert	-
CS1B	+	-	-	Mobile	Jaune	Vert	-
CS1J	+	-	-	Immuable	Vert	Vert	-
CS2B	+	-	-	Immuable	Jaune	Jaune	-
CS2J	+	-	-	Immuable	Jaune	Jaune	-
CT1B	+	-	-	Mobile	Jaune	Jaune	-
CT1J	+	-	-	Mobile	Jaune	Jaune	-
CT2B	+	-	-	Mobile	Jaune	Jaune	-



**Figure 19** : Test de levane (NAS) : résultat positif pour la souche C1B (A) et négatif pour la souche C2B (B)

### 2.5. Test Pectinase :

La pourriture de la pomme de terre est constatée pour les souches : CT1B, CT1J, CT2B, CS1B, CS2B, CS2J, C1B, C1J, C2B, A2B, A2C, a1BB et a1BJ ; indiquant la présence de l'enzyme pectinase. Le test est négatif pour les souches : a1J, a2B, A2J, A1B, A1J, A1C et C2J.



**Figure 20** : Test de pectinase : test négatif pour la souche A1J (A) et positif pour les souches a1BB (B), CT1B (C) et C1B (D)

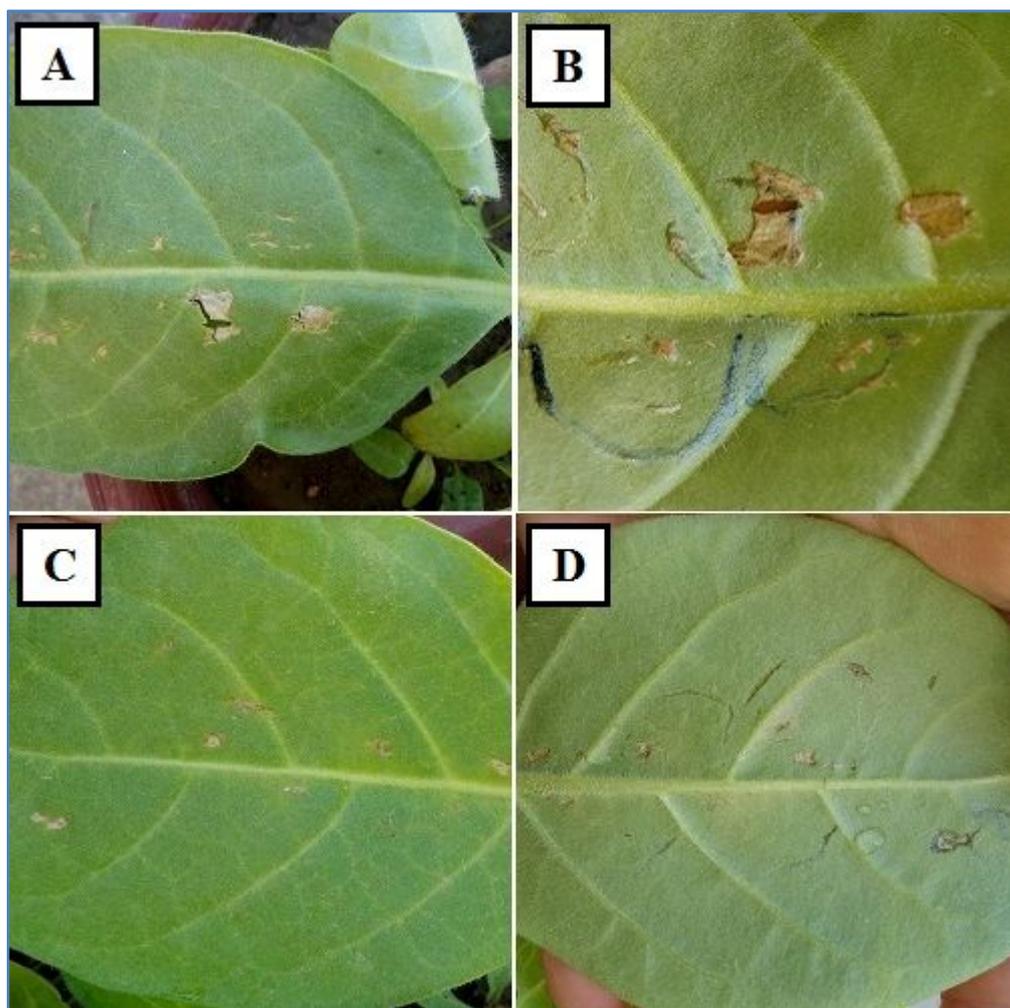
**Tableau 11** : Résultats des tests LOPAT (Levane-NAS, Oxidase, Pectinase, Agrinine dihydrolase, hypersensibilité du Tabac) et fluorescence sous UV

Souche	Fluorescence	Couleur des pigment	Levane	Oxidase	Pectinase	Arginine Dihydrolase	Hypersensibilité du Tabac
a1BB	-	/	/	-	+	-	-
a1BJ	+	Bleu	/	-	+	-	-
a1J	-	/	/	-	-	-	-
a2B	+	Blue	/	-	-	+	-
A1B	+	Bleu	/	-	-	-	-
A1C	+	Bleu	/	-	-	-	-
A1J	+	Bleu	/	-	-	+	-
A2B	+	Bleu	/	-	+	-	-
A2C	+	Vert	/	-	+	-	-
A2J	-	/	/	-	-	-	-
C1B	+	Bleu	+	-	+	+	-
C1J	-	/	+	-	+	-	-
C2B	-	/	-	-	+	-	-
C2J	-	/	/	-	-	+	-
CS1B	+	Bleu	-	-	+	-	-
CS1J	-	/	/	-	/	+	+
CS2B	-	/	/	-	+	+	-
CS2J	-	/	/	-	+	+	-
CT1B	+	Bleu	-	-	+	-	-
CT1J	+	Bleu	-	-	+	-	-
CT2B	+	Bleu	+	-	+	+	-

### 2.6. Test de la fluorescence et hypersensibilité du tabac :

Des pigments fluorescents de couleur bleu sont observés pour les colonies des souches sur milieu B de King : C1B, CT1B, CT2B, A1B, A1J, A2B et a1BJ. Des pigments de couleur verte sont observés pour une seule souche A2C. Les autres souches n'ont présenté aucune fluorescence. L'apparition des taches nécrotiques sur les feuilles de tabac est considérée comme un résultat positif du test de pathogénicité. Un tel résultat est observé dans une seule souche CS1J. Le test est considéré comme négatif pour les 20 souches restantes. Le test de

fluorescence est considéré comme positif pour 11 souches et elles présentent des pigments de couleur bleu et vert. Le test est négatif pour les 10 autres souches.

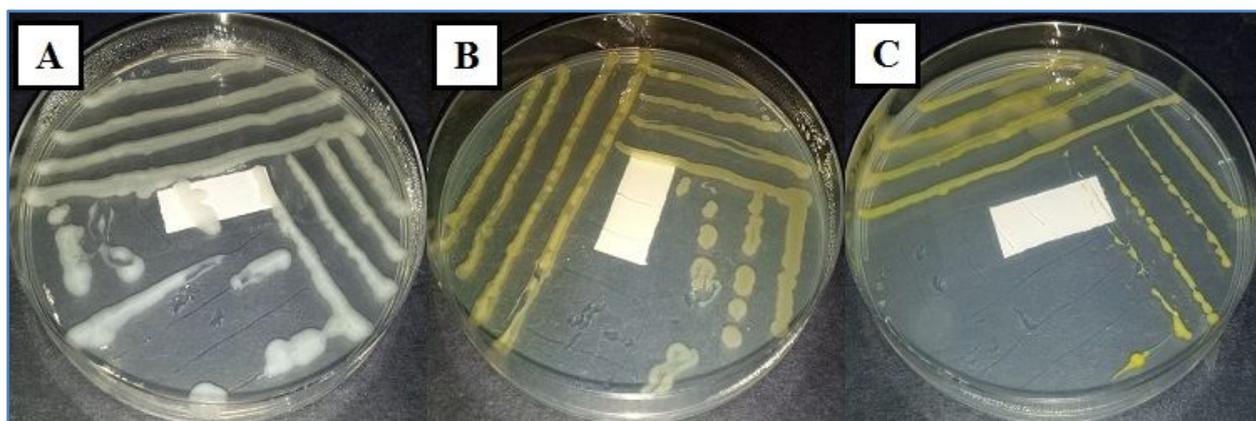


**Figure 21** : Hypersensibilité du Tabac : test positif pour la souche CS1J (A-B) et test négatif pour la souche A2B (C-D)

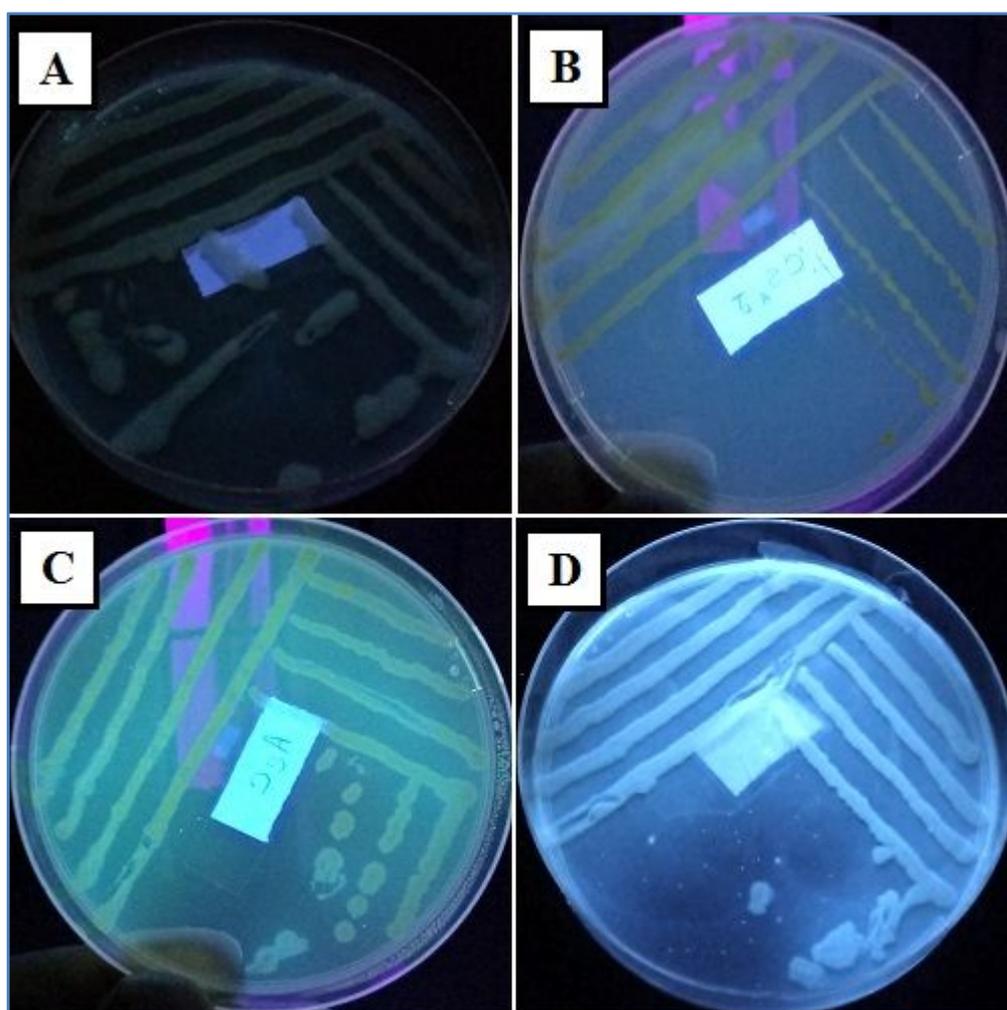
### 3. Identification par les galeries API 20E:

Les galeries API 20E sont utilisées afin d'identifier les souches à Gram négatif appartenant à la famille des *Entérobacteriaceae*. Les suspensions bactériennes des différents isolats ont été introduites dans les microtubes des galeries et incubées à 25°C pendant 24 heures. La lecture des différentes galeries, nous a conduits aux résultats résumés dans le tableau 12 donné dans les pages 56 jusqu'à 58. Plusieurs genres et espèces sont identifiées à l'aide des galeries API 20E depuis les 21 isolats, voir tableau 13, dont : *Pasteurella pneumotropica*/*Mannheimia haemolytica*, *Pantoea spp 1*, *Pantoea spp 2*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*, *Serratia odorifera 1* et

*Pseudomonas aeruginosa*. L'interprétation des codes d'identification est faite en utilisant un logiciel contenant le catalogue analytique des galeries API 20E.



**Figure 22 :** Culture des isolats sur milieu B de King : les souches CS2B (A), A2C (B) et CS1J (C)



**Figure 23 :** Test de fluorescence sous lumière UV des cultures sur milieu B de King : les souches CS2B (A), CS1J (B), A2C (C) et a1BJ (D)

Tableau 12 : Résultats des tests API 20E (partie 1)

Souches Tests	a1BB	a1BJ	a1J	a2B	A1B	A1C	A1J
Ortho- Nitro-phényl-Galactoside (ONPG)	+	+	+	+	+	+	+
Arginine Dihydrolase (ADH)	-	-	-	+	-	-	+
Lysine Décarboxylase (LDC)	-	-	-	-	+	+	-
Ornithine Décarboxylase (ODC)	-	-	-	+	-	-	+
Citrate de Simmons (CIT)	-	-	-	+	+	+	-
Thiosulfate de sodium (H2S)	-	-	-	-	-	-	-
Uréase (URE)	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane (TDA)	+	-	-	-	-	-	-
Indole (IND)	-	-	-	-	+	+	-
Pyruvate de sodium (VP)	-	-	-	-	+	-	-
Gélatinase (GEL)	-	+	-	+	+	-	-
Glucose (GLU)	-	+	+	+	+	+	+
Mannitol (MAN)	-	-	+	+	+	+	+
Inositol (INO)	-	-	-	-	+	+	-
Sorbitol (SOR)	-	-	-	+	+	+	+
Rhamnose (RHA)	-	-	-	+	+	+	+
Saccharose (SAC)	-	-	+	+	+	+	+
Melibiose (MEL)	-	-	-	-	+	+	+
Amygdalin (AMY)	-	+	-	+	+	+	+
Arabinose (ARA)	-	-	+	+	+	+	+
Oxidase (OX)	-	-	-	-	-	-	-
Nitrite (NO2)	-	-	+	-	+	-	-
Azote (N2)	+	+	-	+	-	+	+
Mobilité (MOB)	-	-	-	-	-	-	+
McConkey (McC, remplacé par BCP)	-	-	-	-	-	-	-
Oxydatif (OF/O)	-	-	+	+	+	+	-
Fermentatif (OF/F)	+	-	+	-	+	-	-

**Tableau 12 : Résultats des tests API 20E (partie 2)**

Souches Tests	A2B	A2C	A2J	C1B	C1J	C2B	C2J
<b>Ortho- Nitro-phényl-Galactoside (ONPG)</b>	-	+	+	+	-	-	-
<b>Arginine Dihydrolase (ADH)</b>	-	-	-	-	-	-	+
<b>Lysine Décarboxylase (LDC)</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>Ornithine Décarboxylase (ODC)</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Citrate de Simmons (CIT)</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>Thiosulfate de sodium (H2S)</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Uréase (URE)</b>	-	-	-	-	-	+	+
<b>Tryptophane (TDA)</b>	-	-	-	+	+	-	-
<b>Indole (IND)</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>Pyruvate de sodium (VP)</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gélatinase (GEL)</b>	+	-	-	-	-	-	+
<b>Glucose (GLU)</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Mannitol (MAN)</b>	-	+	+	+	-	-	-
<b>Inositol (INO)</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sorbitol (SOR)</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>Rhamnose (RHA)</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>Saccharose (SAC)</b>	-	+	+	+	-	+	-
<b>Melibiose (MEL)</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>Amygdalin (AMY)</b>	-	+	+	+	-	-	-
<b>Arabinose (ARA)</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Oxidase (OX)</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nitrite (NO2)</b>	-	-	-	-	-	+	+
<b>Azote (N2)</b>	+	+	+	+	+	-	+
<b>Mobilité (MOB)</b>	-	+	+	+	-	+	-
<b>McConkey (McC, remplacé par BCP)</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Oxydatif (OF/O)</b>	+	+	+	+	-	-	+
<b>Fermentatif (OF/F)</b>	+	+	+	+	-	-	-

Tableau 12 : Résultats des tests API 20E (partie 3)

Souches / Tests	CS1B	CS1J	CS2B	CS2J	CT1B	CT1J	CT2B
Ortho- Nitro-phényl-Galactoside (ONPG)	+	+	+	+	+	+	+
Arginine Dihydrolase (ADH)	-	+	+	+	-	-	-
Lysine Décarboxylase (LDC)	-	+	+	+	+	+	+
Ornithine Décarboxylase (ODC)	-	+	+	+	-	-	-
Citrate de Simmons (CIT)	-	+	+	+	+	+	+
Thiosulfate de sodium (H <sub>2</sub> S)	-	-	-	-	-	-	-
Uréase (URE)	-	-	-	-	-	-	+
Tryptophane (TDA)	+	-	-	-	-	-	+
Indole (IND)	-	-	-	-	+	+	-
Pyruvate de sodium (VP)	-	+	+	-	-	-	-
Gélatinase (GEL)	+	-	-	-	-	+	-
Glucose (GLU)	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol (MAN)	+	+	+	+	+	+	+
Inositol (INO)	-	-	-	-	+	+	+
Sorbitol (SOR)	-	+	+	+	+	+	+
Rhamnose (RHA)	-	+	+	+	+	+	+
Saccharose (SAC)	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose (MEL)	-	+	+	+	+	+	+
Amygdalin (AMY)	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose (ARA)	+	+	-	-	+	+	+
Oxidase (OX)	-	-	-	-	-	-	-
Nitrite (NO <sub>2</sub> )	+	+	-	+	+	-	+
Azote (N <sub>2</sub> )	-	+	+	-	-	+	-
Mobilité (MOB)	+	-	-	-	+	+	+
McConkey (McC, remplacé par BCP)	-	-	-	-	-	-	-
Oxydatif (OF/O)	+	-	+	+	+	+	+
Fermentatif (OF/F)	-	-	+	+	+	+	+

**Tableau 13** : Tests API20E – Identification des souches par le logiciel spécifique

Souche	Code d'Identification	Bactérie	Probabilité	Identification
a1BB	102400024	<i>Pasteurella pneumotropica</i> / <i>Mannheimia haemolytica</i>	17.2%	Mauvaise
a1BJ	100600120	<i>Pasteurella pneumotropica</i> / <i>Mannheimia haemolytica</i>	2.6%	Mauvaise
a1J	100412216	<i>Pantoea spp 1</i>	92.2%	Excellente
a2B	330653322	<i>Enterobacter cloacae</i>	74.2%	Très bonne
A1B	524777316	<i>Klebsiella oxytoca</i>	89.8%	Excellente
A1C	524477322	<i>Klebsiella oxytoca</i>	91.4%	Excellente
A1J	310457360	<i>Enterobacter cloacae</i>	56.2%	Très bonne
A2B	000600026	<i>Pasteurella pneumotropica</i> / <i>Mannheimia haemolytica</i>	12.5%	Mauvaise
A2C	100412166	<i>Pantoea spp 1</i>	99.9%	Excellente
A2J	100412166	<i>Pantoea spp 1</i>	99.9%	Excellente
C1B	526477166	<i>Pantoea spp 2</i>	82.8%	Excellente
C1J	002400020	xxx	1.1%	Mauvaise
C2B	001402050	<i>Pasteurella pneumotropica</i> / <i>Mannheimia haemolytica</i>	98.8%	Excellente
C2J	201600032	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65.4%	Très bonne
CS1B	102612352	<i>Pantoea spp 1</i>	59.0%	Très bonne
CS1J	730557330	<i>Enterobacter cloacae</i>	93.8%	Excellente
CS2B	730557126	<i>Enterobacter cloacae</i>	89.2%	Excellente
CS2J	730457116	<i>Enterobacter cloacae</i>	44.1%	Bonne
CT1B	524477356	<i>Klebsiella oxytoca</i>	41.0%	Bonne
CT1J	524677366	<i>Serratia odorifera 1</i>	48.5%	Bonne
CT2B	523477356	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	87.0%	Excellente

### 4. Discussion des souches identifiées :

Comme déjà discuter dans notre revue bibliographique, la bactérie pathogène responsable du chancre bactérien est *P. syringae* et précisément les pathovars (pv. *Persicae*, pv. *morsprunorum* et pv. *syringae*) pour les arbres fruitiers à noyaux. Le test d'hypersensibilité des feuilles du tabac qui révèle le pouvoir pathogène, a donné des résultats négatifs pour 20 souches testées. Ce qui indique qu'il ne s'agit pas des *P. syringae*. Pour la souche CS1J, elle a donné un test positif de la feuille du tabac, mais cette bactérie est immobile et inactive dans le test d'oxydation du glucose au contraire du pathogène recherché qui est mobile et oxydatif. Cela signifie que aucun de ces isolats est le parasite qui est supposé de causer les symptômes observés.

L'identification des souches avec les galeries API 20E a donnée un nombre de bactéries ubiquitaires et opportunistes. Les probabilités d'identifications varient de faible pour quelque souches à très bonne et excellente pour la plupart. La comparaison des caractères supplémentaires des profils biochimiques des souches et des bactéries identifiées révèle une grande ressemblance pour celles ayant les probabilités les plus élevées. Les bactéries *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella pneumotropica* et *Serratia odorifera* biogroup 1 appartiennent à la flore normale des intestins, voies respiratoires et urinaires de l'homme. Etant des bactéries opportunistes, ces bactéries peuvent provoquer de graves infections chez l'homme. *Pseudomonas aeruginosa* est un germe ubiquitaire, vivant dans les sols et en milieu humide. Il peut survivre dans de l'eau distillée ou salée. Toutes ces espèces sont isolées des plantes (légumes, champignons, mousses), du tube digestif des rongeurs, des insectes, de l'eau et du sol.

L'arbre atteint de la maladie du chancre bactérien est affaibli avant et après l'apparition des symptômes. Cela laisse la voie ouverte pour l'envahissement de l'arbre par plusieurs genres et espèces bactériennes et fongiques opportunistes ; ce qui explique l'existence de ces bactéries identifiées. La présence de ces bactéries dans l'entourage des arbres malades facilitent donc leurs pénétrations par la pluie, insectes, animaux et même des personnels des fermes spécialement avec des chancres ouvertes. Les insectes sont un vecteur important pour la plupart de ces bactéries (Yuval *et al.*2009). *Enterobacter cloacae* a été utilisé dans le contrôle biologique des maladies des plantes. *Klebsiella oxytoca* est un diazotrophe, capable de coloniser les hôtes végétaux et de fixer l'azote atmosphérique sous une forme que la plante peut utiliser. Pour leurs pouvoirs phytopathogènes, il est signalé que

*Enterobacter cloacae* peut être pathogène des plantes comme l'oignon (Humann *et al.*, 2011) et ce qui explique le résultat positif de la feuille de tabac de la souche CS1J identifié étant *Enterobacter cloacae* à une probabilité de 93.8%.

Le genre *Pantoea gen. nov* est découvert par Gavini *et al.* en 1989. Parmi les 24 espèces de *Pantoea* décrites à nos jours, cinq ont été signalées jusqu'à 46 fois dans 21 pays comme phytopathogènes d'au moins 31 cultures. En effet, *P. ananatis* et *P. agglomerans* ont été signalés comme étant des bactéries phytopathogènes pour au moins dix cultures économiquement importantes, y compris le riz. *Pantoea agglomerans* anciennement appelé *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck, 1888), *Erwinia herbicola* (Löhnis, 1911) ou *Erwinia milletiae* (Kawakami et Yoshida, 1920) est un bacille à Gram négatif. La plupart des souches sont mobiles à flagelles péritriches. Les colonies sur gélose nutritive sont lisses, translucides, plus ou moins convexes avec bord entier et peuvent être pigmentées en jaune. Elle est anaérobie facultative, à oxydase négative.

*Pantoea agglomerans* est ubiquiste dans la nature et est présente naturellement sur les arbres fruitiers. Cette bactérie est considérée comme épiphyte dans plusieurs plantes hôtes (Brocklehurst *et al.*, 1987, Hashidoki *et al.*, 2002, Asis et Adachi, 2003, Golec *et al.*, 2004). Elle est aussi endophyte des racines et des tiges de riz et possède un potentiel pour le contrôle des maladies des plants de riz et pour la promotion de la croissance de la plante (Adhikari *et al.*, 2001). *P. agglomerans* est également une importante bactérie de nucléation de la glace. Les souches de *P. agglomerans* sont efficaces contre quelque bactérioses et maladies fongiques. Plusieurs souches de *P. agglomerans* sont disponibles dans le commerce comme agents de lutte biologique contre le feu bactérien du pommier et du poirier dû à *Erwinia amylovora* (Pusey *et al.*, 2008). Cette souche produit également deux antibiotiques, l'herbicoline O et I qui pourraient contribuer à l'effet protecteur.

Dans une étude faite entre 2011 et 2012 en Iran (Sherafati *et al.*, 2014), des chercheurs ont étudié la maladie du chancre des arbres de citron vert mexicain (*Citrus aurantifolia*) et du pamplemousse (*Citrus paradisi*). Ils ont pu prélever des colonies jaunes et Gram négatifs de certains isolats provoquant une hyperplasie tissulaire, une hypertrophie et des lésions calleuses semblables à celles des hôtes initiales, alors que d'autres isolats stimulaient les lésions plates nécrotiques et aqueuses sur les feuilles. Certains de ces isolats ont été identifiés comme *Pantoea agglomerans*. Ces bactéries sont capables d'inciter les symptômes du chancre

sur les semis de pamplemousse et sont réisolées après deux mois, en particulier dans les régions plus chaudes et plus sèches.

Les souches a1J (92.2%), A2C (99.9%), A2J (99.9%), (CS1B 59.0%) et C1B (82.8%) sont identifiées comme *Pantoea*. La probabilité d'identification est excellente et la comparaison des profils biochimiques met *P. agglomerans* comme le candidat le plus probable. A partir de nos résultats et ceux des chercheurs de l'Iran, on peut considérer la possibilité que *Pantoea agglomerans* représente l'agent pathogène qui a causé les symptômes du chancre bactérien dans l'abricotier et le cerisier.

# **CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### Conclusions et Recommendations

Cette étude préliminaire, a pour but d'isoler et d'identifier l'agent pathogène responsable de la maladie du chancre bactérien des arbres fruitiers. Les multiples études précédentes ont révélé que ce germe est la bactérie *Pseudomonas syringae* et ses pathovars. Les échantillons ont été prélevés de deux vergers de la région de Hamma Bouziane Wilaya de Constantine et de deux espèces d'arbres fruitiers à noyaux : abricotier et cerisier. Ces prélèvements ont été effectués depuis toutes les parties aériennes des arbres présentant des symptômes caractéristiques de la maladie du chancre.

L'étude a débuté par une multitude de culture de suspensions bactériennes sur des milieux nutritifs et semi-sélectifs comme LPGA, GN et milieu B de King. Le but est de multiplier le nombre de bactéries, d'isoler les souches phytopathogènes et enfin d'arriver à des isolats purs. Une série de tests microscopiques et biochimiques ont été effectués sur les 21 souches isolées et purifiées. Les galeries API 20E ont permis l'identification de 20 souches avec des probabilités variantes de bonne à excellente. Les résultats de cette étude révèlent une diversité des espèces bactériennes présentes dans les tissus végétaux testés.

8 espèces bactériennes ont été identifiées : *Pasteurella pneumotropica* / *Mannheimia haemolytica*, *Pantoea ssp 1*, *Pantoea spp 2*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*, *Serratia odorifera 1* et *Pseudomonas aeruginosa*. La plupart de ces souches sont des bactéries ubiquitaires dans l'environnement de l'arbre et viennent profiter de son état affaibli dans un comportement opportuniste. Les isolats n'ont pas été identifiés et ne présentent pas les caractéristiques du profil biochimique des *Pseudomonas syringae*. Cela peut être dû à la dominance de la population bactérienne présente dans les tissus végétaux par des bactéries secondaires, saprophytes et opportunistes. Cette dominance est due à la sévérité des symptômes de la maladie surtout pour les arbres de la pépinière, qui sont très jeunes (de 2 ans seulement).

Une possibilité plus intéressante s'illustre par la présence des *Pantoea spp* confirmée par une excellente probabilité d'identification. Une compatibilité presque totale des profils biochimiques est notée entre nos souches et *P. agglomerans*. Cette bactérie a été signalée étant l'agent pathogène de la maladie du chancre des arbres de Citron et Pamplemousse dans

## *Conclusions et Recommandations*

---

une étude récente de 2014 en Iran. Notre étude pourra être la première à associer cette bactérie avec le chancre des arbres fruitiers à noyaux dans notre région.

Pour une confirmation, un test de pathogénicité est effectué en injectant les souches isolées et identifiées dans des sujets sains pour suivre l'apparition ou pas des symptômes du chancre. Une identification de l'espèce existante doit être aussi effectuée à l'aide de la technique de PCR. L'importance de ces résultats consiste à orienter les spécialistes et les chercheurs vers des méthodes adéquates d'identification future de l'agent pathogène du chancre bactérien et aussi développer des méthodes de lutte adéquate contre *Pantoea agglomerans*.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adhikari, T.B., Joseph, CM., Yang, G., Phillips, DA. et Nelson, LM. (2001).** Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Canadian Journal of Microbiology*. **47**:916-924
- Anderson, JA., Buchanan, DW., et Ingram, DL. (1981).** The role of *Pseudomonas syringae*, an ice nucleation active bacterium, in frost damage of tender annual plants. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. **94**: 72-74
- Arlat, M. et Boucher, C. (1989).** Les gènes hrp : des gènes clés contrôlant le pouvoir pathogène des bactéries. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*. **75**(6): 73-77
- Arny, DC., Lindow, SE. et Upper, GD. (1976).** Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature*. **262**: 282-284
- Asis, CA. et K. Adachi (2003).** Isolation of Endophytic Diazotroph *Pantoea agglomerans* and Nondiazotroph *Enterobacter asburiae* From Sweet Potato Stem in Japan. *Letters in Applied Microbiology*. **38**:19–23
- Baca, S., Canfield, ML. et Moore, LW. (1987).** Variability in ice nucleation strains of *Pseudomonas syringae* isolated from disease woody plants in Pacific northwest nurseries. *Plant Disease*. **71**: 412-415
- Baca, S. et Moore, LW. (1987).** Variations in *Pseudomonas syringae* isolated from grass species occurring in woody plant nurseries in the Pacific Northwest. *Plant Disease*. **71**: 724-726
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974).** (Buchanan RE, Gibbons NE, eds) ed 8, Williams & Wilkins, Baltimore 1246 p
- Bordjiba, O. et Prunier, J.P. (1991).** Establishment of an epiphytic phase by three species of *Pseudomonas* on apricot trees. *Acta Horticulturae*. **293**: 487-494
- Botelho, GR. et Leda, CM. (2006).** Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of Crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. **37**: 401-416
- Boucher, CA., Van Gijsegem, F., Barberis, PA., Arlat, M. et Zischek, C. (1987).** *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *Journal of Bacteriology*. **169**: 5626-5632

- Bourguiba, H., Audergon, J.-M., Krichen, L., Trifi-Farah, N., Mamouni, A., Trabelsi, S., D'Onofrio, C., M Asma, B., Santoni, S., et Khadari, B. (2012).** Loss of genetic diversity as a signature of apricot domestication and diffusion into the mediterranean basin. *BMC Plant Biology*. **12**: 1-16
- Bradbury, JF. (1986).** Guide to Plant Pathogenic Bactéria. CAB International Mycological Institute, Kew, UK. 332p.
- Brisset, MN., Luisetti, J. et Gaignard, JL. (1991).** Firestop: a chemical against bacterial diseases of fruit trees recently available in Europe. *Agronomie*. **11**: 93-99
- Brocklehurst, TF., Zaman-Wong, CM. et Lund, BM. (1987).** A Note on the Microbiology of Retail Packs of Prepared Salad Vegetables. *Journal of Applied Bacteriology*. **63**:406–415
- Burke, MJ., Gusta, LA., Quamme, HA., Weiser, CJ. et Li PH (1976).** Freezing and injury to plants. *Annual review of plant physiology*. **27**: 507-528
- Burr, TJ. et Katz, BH. (1984).** Overwintering and distribution pattern of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* and pv. *syringae* in apple buds. *Plant Disease*. **68**: 383-385
- Cameron, HR. (1962).** Mode of infection of sweet cherry by *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology*. **52**: 917-921
- Cameron, HR. (1970).** *Pseudomonas* content of cherry trees. *Phytopathology*. **60**: 1343-1346
- Campbell, JIA., Jacobsen, CS. et Sorensen, J., (1995).** Species variation and plasmid incidence among *fluorescent Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS Microbiology Ecology*. **18**: 51-62
- Cazelles, O. et Grimm, R. (2015).** Chancre bactérien du cerisier. Agroscope RAC. 30p.
- Clarkson, DT. et Hanson, JB. (1980).** The mineral nutrition of higher plants. *Annual review of plant physiology*. **31** : 239-298
- Claverie, (2005).** De la taille à la conduite des arbres fruitiers. Edition Rouergue. P, 60-70
- Clays-Josserand, A., Lemanceau, P., Philippot, L. et Lensi, R., (1995).** Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within *fluorescent Pseudomonas spp.* *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 1745-1749.

- Cody, YS., Gross, DC., Proebsting, EL. et Spotts, RA. (1987).** Suppression of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* by antagonistic bacteria in fruit tree orchards and evaluation of frost control. *Phytopathology*. **77** : 1036-1044
- Coléno, A., Gardan, L., Luisetti, J. et Paulin, JP. (1982).** Les antibiotiques et la lutte contre les maladies bactériennes des plantes. In : Les Maladies des plantes 2e journées françaises d'études et d'informations, Paris, octobre 1979 (Acta, Paris éd) 355-362
- Collmer, A. et Keenn, T. (1986).** The rôle of the pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*. **25**: 141-157
- Constantinidou, HA., Hirano, SS., Baker, LS. et Upper, CD. (1990).** Atmospheric dispersal of ice nucleation active bacteria: the role of rain. *Phytopathology*. **80**: 934-937
- Crosse, JE. (1956).** Bacterial canker of stone-fruits. 2. Leaf scar infection of cherry. *Journal of Horticultural Science*. **31**: 212-224
- Crosse, JE. (1959).** Bacterial canker of stone-fruits. 4. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Annals of Applied Biology*. **47**: 306-317
- Crosse, JE. (1971).** Interaction between saprophytic and pathogenic bacteria in plant disease. In: Ecology of Leaf Surface Microorganisms (London Acad, ed) 283-290
- Crosse, JE. et Garrett, CME. (1970).** Pathogenicity of *Pseudomonas morsprunorum* in relation to host specificity. *Journal of Bacteriology*. **62**: 315-327
- Daft, GC. et Leben, C. (1972).** Bacterial blight of soybeans: epidemiology of blight outbreaks. *Phytopathology*. **62**: 57-62
- Davis, SR. et English, H. (1969).** Factors related to the development of bacterial canker in peach. *Phytopathology*. **59**: 588-595
- Dowler, WM. et Petersen, DH. (1967).** Transmission of *Pseudomonas syringae* in peach trees by bud propagation. *Plant Disease Report*. **51**: 666-668
- Durand, R., Luisetti, J., Meynier, M. et Ridé, M. (1967).** Infektion durch *Pseudomonas syringae* nach leichtem Frost. X Agrar Dreilander Bavendorf Dye DW (1956) Blast of Pear. *The Orchardist Horticulture New Zealand*. **29**: 5-7

- Dustan, GG. et Davidson, TR. (1981).** Maladies, Insectes et acariens des fruits à noyau. Ottawa, Canada: Ministre des Approvisionnements et Services Canada. 72p.
- Dye, DW., Bradbury, JF., Goto, M., Hayward, AC., Lelliott RA. et Schorth MN. (1980).** International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review Plant Disease*. **66**: 993-994
- Endert, E. et Ritchie, DF. (1984).** Overwintering and survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and symptom development in peach trees. *Plant Disease*. **68**: 468-470
- English, H. et Davis, JR. (1960).** The source of inoculum for bacterial canker and blast of stone fruit trees. *Phytopathology*. **50**: 634-650
- Ercolani, GL. et Vannella S. (1986).** Characterisation of the distribution of individual response times in bacterial infection of plants. *Annals of Applied Biology*. **108** : 275- 290
- F.A.O. (2016).** Productions agricoles, Cultures primaire. Banc des données statistiques, F.A.O. STAT. [En ligne : <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>] (page consultée le 12/06/2018)
- Faust, M., Surányi, D. et Nyujtö, F. (1998).** Origin and dissemination of apricot. *Horticultural Reviews*. **22**: 263–319
- Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. et Bollet, C. (1992).** Manuel de bacteriologie Clinique ELSEVIER Collection Option Bio. Volume 1, 79-143.
- Fresh, RW. (1973).** Microbiological production of freezing nuclei from decomposing tree leaves. Pep AR 106, Dept Atmos Res, Univ Wyoming, Larami, 15 p
- Frey, P., Chavatte, M., Clausse, M. L., Courrier, S., Le Roux, C., Gloria, G., Botelho, R. et Ieda Cristina, H. (2006).** Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. **37**: 401-416
- Fryda, SJ. et Otta, JD. (1978).** Epiphytic movement and survival of *Pseudomonas syringae* on spring wheat. *Phytopathology*. **68** : 1064-1067
- Gaignard, JL. (1992).** Apport de la culture in vitro dans l'étude de l'interaction de *Pseudomonas syringae* avec des plantes ligneuses. Mémoire Diplôme Rech Univ Nantes  
Gaignard JL, Luisetti J (1992a) Criblage de molécules chimiques actives contre

- Pseudomonas syringae* pv. *syringae* sur plants de vigne cultivés *in vitro* et *in situ*. *Agronomie*. **12**: 401-409
- Gaignard, J.L. et Luisetti, J. (1992)**. Efficacy of copper chelate to control bacterial dieback of peaches. Abstr 8th Int Conf Plant Pathogen Bacteria. Versailles, June 1992
- Gaignard, J.L. et Luisetti, J. (1993)**. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie*. **13** : 333–370
- Gardan, L., Luisetti, J. et Prunier, J.P. (1972)**. Variation in inoculum level of *Pseudomonas morsprunorum persicae*. *Comptes Rendus Séances Académie d'Agriculture de France* 6/10/71, 1090-1094
- Gardan, L., Cottin, S., Bollet, C. et Hunault, G. (1991)**. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas syringae* Van Hall. *Research in Microbiology*. **142**: 995-1004
- Ginzburg, B.Z. (1961)**. Evidence for a protein gel structure crosslinked by metal cations in the intercellular cement of plant tissue. *Journal of Experimental Botany*. **12**: 85-107
- Golec, M., Skórska, C., Backiewicz, B. et Dutkiewicz, J. (2004)**. Immunologic Reactivity to Work-related Airborne Allergens in People Occupationally Exposed to Dust from Herbs. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. **11**:121–127
- Golovleva, L.A., Maltseva, O.V. et Solyanikova, I.P. (1992)**. Metabolism of foreign compounds in *Pseudomonas* spp. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (Galli, E., Silver, S., Witholt, B.,eds), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 231-238.
- Gonzales, C.F., Layher, S.K., Vidaver, A.K. et Olsen, R.H. (1984)**. Transfer, mapping and cloning of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* plasmid pCG131 and assessment of its role in virulence. *Phytopathology*. **74**: 1245-1250
- Goszczyńska, T., Serfontein, J.J., Serfontein, S. et Safrinet. (2000)**. Introduction to practical phytopathology: A manual for phytobacteriology. ISBN: 0-620-25487-4. Ultra litho (Pty) Ltd, Heriotdale. Johannesburg.
- Gross, D.C., et Cody, Y.S. (1985)**. Mechanism of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. *Canadian Journal of Microbiology* **31**: 403-410
- Guiraud, J.P. (1998)**. Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris. 300p.

- Hashidoki, Y., E. Itoh., K. Yokota., T. Yoshida et S. Tahara (2002).** Characterization of Five Phyllosphere Bacteria Isolated From *Rosa rugosa* Leaves, and Their Phenotypic and Metabolic Properties. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **66**:2474–2478
- Hattingh, MJ., Roos, IMM. et Mansvelt, EL. (1989).** Infection and systematic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. *Plant Disease*. **73**: 784-789
- Hildebrand, DC. et Schroth, MN. (1972).** Identification of the *fluorescent pseudomonads*. Proc 3rd Int Conf Plant Path Bact 281-287. Wageningen, April 1971
- Hiramatsu, M., Wada, T., Kanda, M. et Yamamura, H. (1990).** Effect of kasugamycin on the control of bacterial diseases. Proc 7th Int Conf Plant Patho Bact 219- 224. Budapest, June 1989. Plant Pathogenic Bacteria (Z Klement, ed)
- Hirano, SS. et Upper, CD. (1985).** Ecology and physiology of *Pseudomonas syringae*. *Biotechnology*. **3**: 1073-1078
- Hirano, SS. et Upper, CD. (1990).** Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annual Review of Phytopathology*. **28**: 155-177
- Hoitink, HAJ., Hagedorn, DJ. et Mc Coy, E. (1968).** Survival, transmission, and taxonomy of *Pseudomonas syringae* Van Hall, the causal organism of bacterial brown spot of bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Canadian Journal of Microbiology*. **14**: 437-441
- Hugh, R. et Leifson, E. (1953).** The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of bacteriology*. **66**: 24-26
- Humann, JL., Wildung, M., Cheng, C.-H., Lee, T. , Stewart, JE., Drew, JC., Triplett, EW., Main, D. et Schroeder, BK. (2011).** Complete genome of the onion pathogen *Enterobacter cloacae* EcWSU1. *Standards in Genomic Sciences*. **5** (3): 279–286
- Hummer, KH. et Janick, J. (2009).** Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In: Folta KM, Gardiner (eds) Genetics and genomics of Rosaceae. Series plant Genetics and Genomics: Crops and models, vol 6, Springer, New York, pp 1-17.
- Janick, J. (2005).** The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant Breeding Reviews*. **25**: 255–320

- Judd, WS., Campbell, CS., Kellogg, EA. et Stevens, PF. (1999).** Plant Systematics: A phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc Sunderland MA. 290–306.
- Kerr, A. (1987).** The impact of molecular genetics on plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*. **25**:37-110.
- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M. et Schleifer, KH. (1996).** Recent changes in the classification of the *Pseudomonads*: an overview. *Systematic Applied Microbiology*. **19**: 465–477.
- Kim, HK., Orser, C., Lindow, SE. et Sands, DC. (1987).** *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. *Plant Disease*. **71**: 994-997
- Kim, KC., Kim, IC., Cho, BH. (1989).** Antagonistic activity of an isolate of *Candida* species to ice nucleation active *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology*. **79** : 275-277
- King, EO., Ward, MK. et Raney, DE. (1954).** Deux médias simples pour la démonstration de pyocyanine et de fluorescéine. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **44**:301-307
- Klement, Z. (1963).** Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonads*. *Nature*. **199**: 299–300
- Klement, Z., Rozsnyay, S. et Visnyovsky, E. (1972).** Apoplexy of apricots. I. Bacterial die-back and the development of the disease. *Acta Phytopathology*. **7**: 1-12
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. et Lemanceau, P., (1996).** The composition of *fluorescent Pseudomonas* populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 2449-2456
- Leben, C. (1981).** How plant-pathogenic bacteria survive. *Plant Disease*. **65**: 633-637
- Lelliott, RA., Billing, E. et Hayward, AC. (1966).** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *Journal of applied Bacteriology*. **29**: 470-489
- Levy, E., Eyal, Z., Chet, I. et Hochman, A. (1992).** Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Molecular Plant Pathology*. **40**(1): 63-71

- Liao, CH. et Wells, JM. (1987).** Diversity of pectolytic, *fluorescent Pseudomonads* causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*. **77**: 673–677
- Lindemann, J., Constantinidiou, HA., Barchet, WR. et Upper, CD. (1982).** Plants as source of airborne bacteria including ice nucleation-active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **44**: 1059-1063
- Lindgren, PB., Peet, RC. et Panopoulos, NJ. (1986).** Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. “*phaseolicola*” controls pathogenicity of beans plants and hypersensitivity on non host plants. *Journal of Bacteriology*. **168**: 512-522
- Lindow, SE. (1982).** Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. In: Plant cold hardiness and freezing stress (Li PH, Sakai A, eds) Acad Press, New York 349-416
- Lindow, SE. (1988a).** Lack of correlation of in vitro antibiosis with antagonism of ice nucleation active bacteria on leaf surfaces by non-ice nucleation active bacteria. *Phytopathology*. **78**: 444-450
- Lindow, SE. (1988b).** Construction of isogenic icestrains of *Pseudomonas syringae* for evaluation of competition of leaf surfaces. In: Microbiological Ecology (Megusar F, Gantar M, eds) Slovene Soc Microb, Lublijana 509-515
- Lindow, SE. et Panopoulos, NJ. (1991).** Biological control of frost injury to potato using recombinant icemutants of *Pseudomonas syringae*. Proc 4th Int working group *Pseudomonas syringae* pathovars 428-432. Firenze, June 1991
- Luisetti, J. (1978).** L'influence du gel sur le développement des phyto bactérioses. Lutte contre les gelées. In : Journées nationales d'information INVUFLEC 89-98. Angers, février 1978
- Luisetti, J., Gaignard, JL., Pacquetteau, B. et Lafuste, JP. (1984).** Le dépérissement bactérien du Pêcher. *Phytoma*. **358** : 29-32
- Luisetti, J., Gaignard, JL., Vigouroux, A., Saunier, R., Lafuste, JP. et Charras, J. (1992).** Pêcher, le dépérissement bactérien. *Arboric Fruit*. **447** : 19-28

- Luisetti, J. et Gaignard, JL. (1991).** Le dessèchement bactérien du Poirier dû à *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. In : Protection intégrée du verger, Pommier, Poirier 115-117 (CTIFL-INRA, éd) C R Entretiens techniques d'Angers, Nv 1990
- Maki, LR., Galyan, EL., Chang-Chien, MM. et Caldwell, DR. (1974).** Ice Nucleation Induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology*. **28**: 456–459
- Manceau, C. (1984).** Utilisation des antibiotiques en agriculture : étude des risques potentiels de sélection et de dissémination des gènes d'antibiorésistance et caractérisation du support génétique de ces caractères. Thèse 3e cycle. Univ Clermont-Ferrand
- Mansvelt, EL. et Hattingh, MJ. (1985).** Pear blossom blast in South africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology*. **35**: 337-343
- Mansvelt, EL. et Hattingh, MJ. (1987).** Scanning electron microscopy of pear blossom invasion by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Canadian Journal of Botany*. **65**: 2523-2529
- Mansvelt, EL. et Hattingh, MJ. (1989).** Scanning electron microscopy of invasion of apple leaves and blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 533-538
- Marchall, N., Bourdon, JL. et Richard, C. (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries; Eds DOIN Paris.
- Matsubara, T. et Zumft, WG. (1982).** Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) *pseudomonads*. *Archives of Microbiology*. **132**: 322-328
- Maury, M. (1987).** Milieux et réactifs du laboratoire Pasteur. Paris, France.
- Mc Guire, RG. et Kelman, A. (1986).** Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. *Phytopathology*. **74**: 1250-1256
- Migula, W. (1894).** Über ein neues System der Bakterien. *Arboric Bakteriologie Institut Karlsruhe* **1**: 235-238
- Mills, D. et Mukhopadyay, P. (1990).** Organisation of hrpM locus of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and its potential function in pathogenesis. In: *Pseudomonas*:

biotransformations, pathogenesis, an evolving biotechnology (Silver S, Chakrabarty AM, Iglewski B, Kaplan S, eds) Am Soc Microbiol, Washington, DC 45-47

- Moor, YY. et Gross, DC. (1991).** Plant signal molecules activate the *syrA* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Journal of Bacteriology*. **173**: 5784-5792
- Morris, CE. et Rouse, DI. (1985).** Role of nutrients in regulating bacterial populations. In: Biological control on the phylloplane (CE Windels, SE Lindow, eds) American Phytopathological Society. St Paul 63-82
- Palleroni, NJ., Kunisawa, R., Contopoulou, R. et Doudoroff, M. (1973).** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **23**: 333–339
- Palleroni, NJ., (1984).** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- Parungo, FP. et Lodge, JPJr. (1967).** Amino acids as ice nucleators. *Journal of the Atmospheric Sciences*. **24**: 274-277
- Peix, A., Ramirez-Bahena, MH. et Velazquez, E. (2009).** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*. **9**: 1132–1147
- Prescott., Harly. et Kelin. (2007).** Microbiologie. 2th Ed. Boeck-wesmael. Bruxelles.
- Prévot, AR. (1961).** Traité de systématique bactérienne. Dunod, Paris.
- Prunier, JP., Luisetti, J. et Gardan, L. (1973).** Études sur les bactérioses des arbres fruitiers. V. Étude du pouvoir pathogène de *Pseudomonas morsprunorum* f *sp persicae*, agent du dépérissement bactérien du pêcher. Méthodologie : premiers résultats sur l'influence de la date d'inoculation. *Annals of Phytopathology*. **5**: 327-346
- Pusey, PL., Stockwell, VO. et Rudell, DR. (2008).** Antibiosis and acidification by *Pantoea* agglomerans strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. **98** :1136-1143

- Rathore, MS., Shekhawat, NS. et Gehlot, HS. (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**: 115-127
- Roos, IMM. et Hattingh, MJ. (1986).** Resident populations of *Pseudomonas syringae* on stone fruit tree leaves in South Africa. *Phytophylactica*. **18**: 55-58
- Rosinski, J. et Parungo, F. (1966).** Terpene-iodine compounds as ice nuclei. *Journal of Applied Meteorology*. **5**: 119-123
- Sands, DC., Schroth, MN., Hildebranb, DC. (1970).** Taxonomy of phytopathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Bacteriology*. **101**: 9-23
- Sasser, M. et Miller, L. (1984).** Identification of *pseudomonads* by fatty acid profiling. Proc 2nd working group on *Pseudomonas syringae* pathovars 45-46 Sounion, April 1984
- Schaad, NW. (1988).** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2ème Eds. 44-81p.
- Schaad, NW., Jones, JB. et Chun, W. (2001).** Laboratory guide for Identification of plant Pathogenic Bacteria. APS Press. Third edition 373p.st Paul, Minnesota (US).
- Sequeira, L. (1978).** Lectins and their role in hostpathogen specificity. *Annual Review of Phytopathology*. **16**: 453-481
- Sequeira, L. (1985).** Surface components involved in bacterial pathogen-plant host recognition. *Journal of cell science Supplement*. **2**: 301-316
- Sherafati, F., Khodaygan, P., Azadvar, M., Sedaghati, E., Roholah, et Ravari, SB. (2014).** Association of *Pantoea agglomerans* with the citrus bacterial canker disease in Iran. *Journal of Crop Protection*. **3** (3): 345-355
- Simon, EW. (1978).** The symptoms of calcium deficiency in plants. *New Phytologist*. **80** : 1-15
- Singleton, P. (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6th ed. DUNOD. Paris.

- Sobiczewski, P. (1987).** Antagonistic bacteria in relation to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* occurring in necrosis and cankers of sour cherry trees. *Fruit Science Report*. **14**(4) : 179-185
- Some, A. et Samson, R. (1991).** Critères protéiques et enzymatiques pour la caractérisation des *Pseudomonas fluorescents* phytopathogènes. *Comptes Rendus Séances Académie des Sciences Paris*. **312**(3): 203-208
- Stead, DE. (1987).** Identification of *Pseudomonas syringae* pathovars by fatty acid profiling. Proc 3rd int working group *Pseudomonas syringae* pathovars 14-16. Lisboa, Sept 1987
- Stead, DE. et Holland, DT. (1987).** Identification of *Pseudomonas syringae* pathovars from peas by computer assisted polyacrylamide gel of electrophoresis of whole cell proteins. Proc 3rd Int working group *Pseudomonas syringae* pathovars 27-29. Lisboa, Sept 1987
- Stout, JD. (1960).** Biological studies of some tussockgrassland soils. Bacterial of two cultivated soils. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. **3**: 214-223
- Suslow, TV., Schroth, MN. et Isaka, M. (1982).** Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*. **72**: 917-918
- Takanashi, K. (1988).** Bacterial canker of Japanese plum caused by *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. *Bull Fruit Tree Research Station, A (Yatabe)*. **15**: 117-129
- Marcoux, J., Turcotte, C. et Pettigrew, A. (2012).** Outil diagnostic des maladies dans les cerisiers nains rustiques. MAPAQ de l'Estrie. 39p.
- Vigouroux, A. (1970).** Études sur les bactérioses des arbres fruitiers. 1. Une nouvelle bactériose du Pêcher : description, étiologie, développement du parasite. *Annals of Phytopathology*. **2** : 155-179
- Vigouroux, A. (1974).** Obtention de symptômes de bactériose du Pêcher (*Pseudomonas morsprunorum f sp persicae*) sur rameaux de Pêcher détachés et conservés en survie. Effet du froid. *Annals of Phytopathology*. **6**: 95-98
- Visca, P., Imperi, F. et Lamont, IL. (2007).** Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiology*. **15**: 22–30

- Weaver, DJ. (1978).** Interaction of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. *Phytopathology*. **68**: 1460-1463
- Whipps, JM. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. **52**: 487-511.
- Wimalajeewa, DLS., Hayward, AC. et Greenhalgh, FC. (1983).** A bacterial leaf spot of *Protea cynaroides* (king protea). *Annals of Applied Biology*. **102**: 339-344
- Xu, GW. et Gross, DC. (1988).** Evaluation of the role of syringomycin in plant pathogenesis by using Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae pv syringae* defective in syringomycin production. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 1345-1353
- Yilmaz, KU. et Gurcan, K. (2012).** Genetic diversity in apricot. In Genetic Diversity in Plants, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0185-7, 249-270.
- Young, JM., Dye, DW., Bradbury, JF., Panagopoulos, CG. et Robbs, CF. (1978).** A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. **21**: 153-177
- Young, JM. (1988).** *Pseudomonas syringae pv persicae* from nectarine, peach, and Japanese plum in New Zealand. *Bulletin OEPP* 18, 141-151
- Young, JM. (2010).** Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*. **92**(1): 5-14
- Yuval, B., Ben-Ami, E., Behar, A., Ben-Yosef, M. et Jurkevitch, E. (2009).** The Mediterranean fruit fly and its bacteria – potential for improving sterile insect technique operations. *Journal of Applied Entomology*. **137** (1): 39-42
- Zettlemoyer, AC., Tcheurekdlian, N. and Chessick, JJ. (1961).** Surface properties of silver iodide. *Nature*. **192**: 653-660
- Zhang, L. et J.Y. Takemoto (1987).** Effects of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin on plasma membrane functions of *Rhodoturula pilimanae*. *Phytopathology*. **77** : 297-303

# **ANNEXES**

## Annexe I : Milieux de culture

### **Milieu L.P.G.A (Levure-Peptone-Glucose-Agar)** (g / 1 L d'eau distillée)

Extrait de levure	5
Peptone	5
Gélose	15
Glucose	10

### **Milieu PCA (Plate Count Agar)** (g / 1 L d'eau distillée)

Tryptone	6
extrait de levure	2.5
glucose	1
agar	15

### **Milieu B de King** (g / 1 L d'eau distillée)

Protéase peptone n°3	20
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O)	1.5
Potassium phosphate dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.5
Agar bactériologique	15
Glycérine bi distillé (Glycérol)	10 à 15 ml

Ou

Gélose base King B	43
Glycérol	10 à 15 ml

### **Milieu gélose nutritive (GN)** (g / 1 L d'eau distillée)

Extrait de viande	1
Extrait de levure	3
Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15

**Milieu Mannitol- Mobilité** (g / 1 L d'eau distillée)

Hydrolysate tryptique de caséine	10
Mannitol	7.5
Rouge de phénol	0.0004
Nitrate de potassium	1
Agar	3.5

Ou

Milieu déshydraté	28
-------------------	----

**Milieu Hugh –Leifson** (g / 1 L d'eau distillée)

Peptone	2
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de potassium	0.3
Glucose	10
Bleu de bromothymol	0.03

**Milieu Levane (NAS)** (g / 1 L d'eau distillée)

Agar	28
Saccharose	50

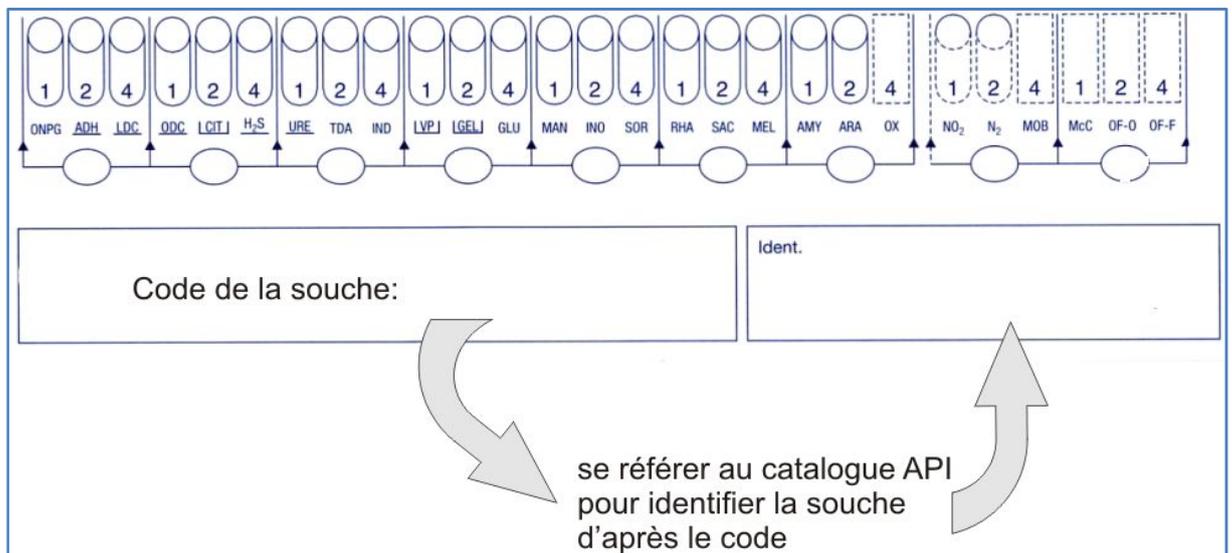
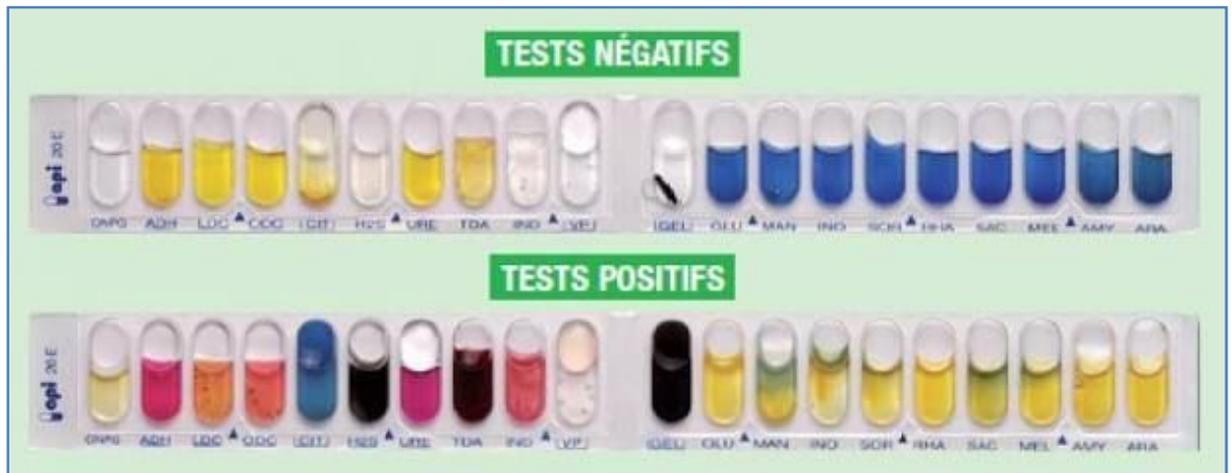
**Milieu de BCP** (g / 1 L d'eau distillée)

Peptone	5
Extrait de viande de bœuf	3
Lactose	10
Pourpre de bromocrésol	0.025
Agar	15

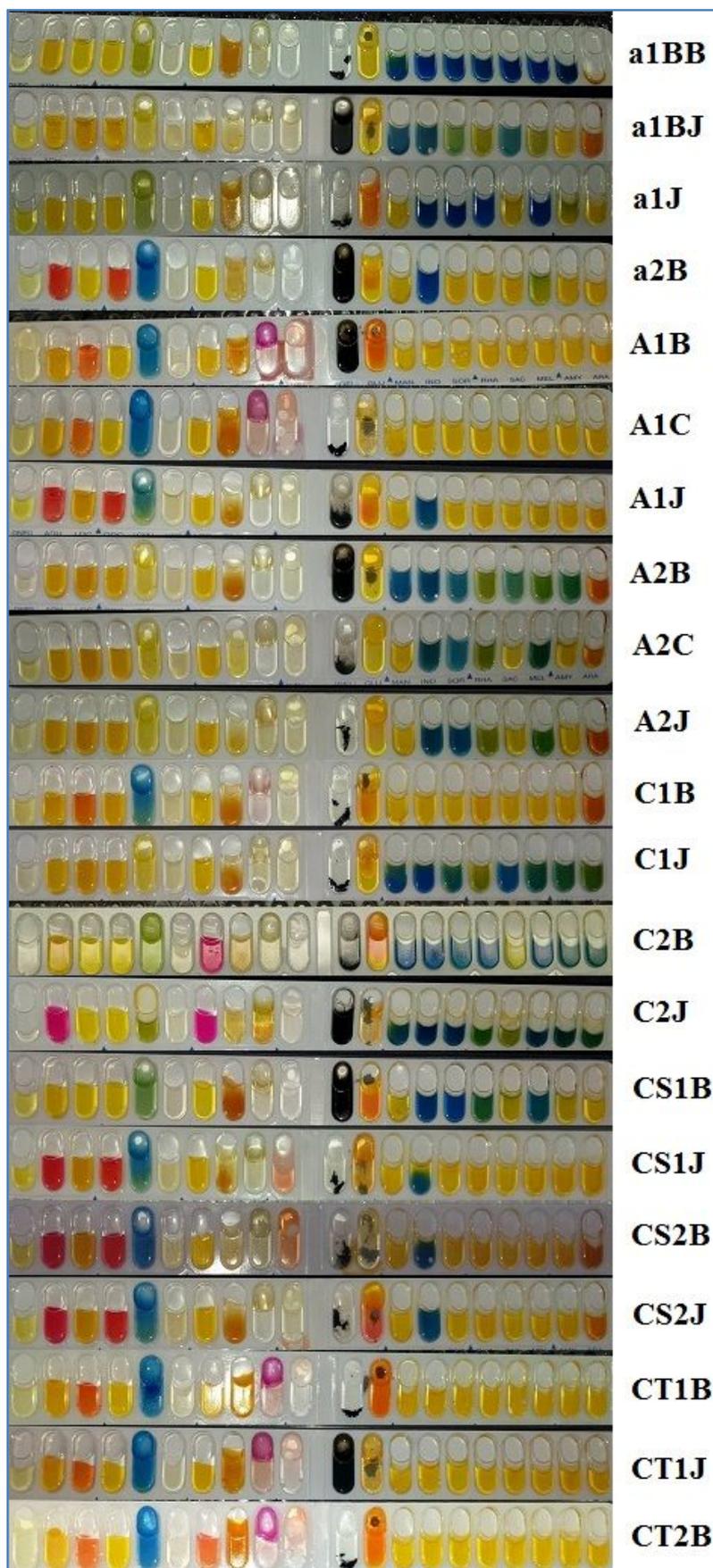
## **Annexe II : Coloration de Gram**

Dans le but d'effectuer cette étude, chaque colonie d'un isolat bactérien de 24h-78h est étalée sur des lames stériles contenant de l'eau distillée stérile. Après séchage près de la flamme, la coloration de Gram est effectuée selon les étapes suivantes : Le frottis est coloré avec une solution de Crystal violet (de Gentiane) pendant une minute. Il est ensuite rincé sous un filet d'eau. Puis, une solution iodo-iodurée de Lugol est ajoutée et le frottis est maintenu dans ce milieu pendant une minute. Après lavage à l'eau, on verse goutte à goutte sur la lame inclinée un mélange alcool-acétone (ou bien de l'éthanol) pendant 20 secondes. Dès que le solvant s'écoule claire, il faut sans tarder arrêter son action par un grand lavage à l'eau et bien égoutter. Le frottis est alors soumis à une coloration de contraste en le traitant avec une solution de fuchsine pendant 30 secondes et rincer soigneusement à l'eau claire et séché à l'air libre ou délicatement entre deux feuilles de papier buvard. Ensuite, on passe à l'observation du frottis coloré au microscope optique Motic à l'objectif 40X et à immersion 100X (Singleton, 2005).

**Annexe III : Tableau et fiche de lecture AP20E**



Annexe IV : galeries AP20E utilisés



## Résumé

Les fruits de rosacées occupent une place importante dans l'économie mondiale. Cette branche d'arboriculture a un grand potentiel en Algérie. Le chancre bactérien est l'une des maladies parasitaires attaquant les arbres fruitiers et causants des pertes dans la production. Cette maladie est causée par la bactérie *Pseudomonas syringae*. Elle est une bactérie ubiquitaire et pathogène de multiples plantes.

Le but de cette étude préliminaire est d'isoler et d'identifier l'agent pathogène de la maladie du chancre depuis les échantillons prélevés de deux vergers de la région de Hamma Bouziane Wilaya de Constantine et de deux espèces d'arbres fruitiers à noyaux : abricotier et cerisier. Ces prélèvements ont été effectués depuis toutes les parties aériennes des arbres présentant les symptômes caractéristiques de la maladie du chancre.

Le protocole comporte des tests biochimiques conventionnels dont fait partie les tests LOPAT et les galeries API 20E. A partir de 21 isolats, 8 espèces bactériennes de 6 genres ont été identifiées, comme exemple on cite : *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, et *Pseudomonas aeruginosa*. La pluparts de ces souches sont des bactéries opportunistes qui ont envahi l'arbre après le développement de la maladie. Aucun des isolats n'a été identifié étant *Pseudomonas syringae*. Cela peut être dû à la dominance des bactéries secondaires, saprophytes et opportunistes.

Une possibilité plus intéressante s'illustre par la présence des *Pantoea spp* et plus exactement *P. agglomerans*. Cette bactérie a été signalée étant l'agent pathogène de la maladie du chancre des arbres fruitiers en Iran. Notre étude pourra être la première à associer cette bactérie avec le chancre d'abricotier et cerisier. La confirmation d'un tel résultat nécessite un test de pathogénicité et une identification exacte à l'aide de la technique de PCR. L'importance de ces résultats consiste à orienter les spécialistes et les chercheurs vers des méthodes adéquates d'identification future de l'agent pathogène du chancre bactérien et aussi développer des méthodes de lutte adéquate contre *Pantoea agglomerans*.

**Mots clefs :** Chancre bactérien, arbres fruitiers, agent pathogène, *Pseudomonas syringae*, tests biochimiques, *Pantoea agglomerans*, abricotier, cerisier

## ملخص

تحتل الأشجار المثمرة مكانة هامة في الاقتصاد العالمي، حيث تشغل هذه الزراعة مكانة كبيرة في الجزائر. القرحة الجرثومية هي واحدة من الأمراض الطفيلية التي تصاب أشجار الفاكهة وتسبب خسائر معتبرة في الإنتاج. يحدث هذا المرض بسبب بكتيريا *Pseudomonas syringae* وهي بكتيريا مسؤولة عن العديد من الأمراض النباتية. الغرض من هذه الدراسة الأولية هو عزل وتحديد مسببات مرض القرحة الجرثومية، حيث تم معاينة بستانيين لنوعين من أشجار الفاكهة ذات النواة: المشمش والكرز في منطقة الهامة بوزيان بولاية قسنطينة و تم أخذ العينات من جميع أجزاء الأشجار التي تظهر عليها الأعراض المميزة لهذا المرض.

يتضمن البروتوكول اختبارات كيميائية حيوية من بينها اختبارات LOPAT و API 20E. من بين 21 عزلة بكتيرية، تم تحديد عدة أنواع بكتيرية من 6 أجناس مختلفة نذكر على سبيل المثال: *Enterobacter cloacae*، *Klebsiella oxytoca*، *Pseudomonas aeruginosa*. معظم هذه السلالات هي من البكتيريا الانتهازية التي خزت الشجرة بعد تطور المرض. لم يتم عزل بكتيريا *Pseudomonas syringae* وهذا يمكن أن يكون بسبب هيمنة البكتيريا الثانوية والانتهازية.

من خلال نتائج هذه الدراسة، توصلنا إلى احتمال كون بكتيريا *Pantoea spp* المسؤولة عن القرحة الجرثومية. حيث أن *Pantoea agglomerans* تم تشخيصها على أنها الجرثومة المسؤولة عن هذا المرض في إيران. قد تكون دراستنا هي الأولى من نوعها التي تربط هذه البكتيريا بمرض القرحة الجرثومية لأشجار المشمش والكرز. تأكيد هذه النتيجة يتطلب اختبار القدرة الإمراضية لهذه البكتيرية وتحديد دقيق للبكتيريا المعزولة باستخدام تقنيات جينية مثل PCR. أهمية هذه النتائج تتمثل في تأثيرها على طرق تحديد مسبب المرض البكتيري مستقبلا وتطوير أساليب المكافحة.

الكلمات المفتاحية: القرحة الجرثومية، أشجار المثمرة، مسببات الأمراض، *Pseudomonas syringae*، الاختبارات البيوكيميائية، *Pantoea agglomerans*، شجرة المشمش، شجرة الكرز.

## Abstract

The fruits of rosaceae occupy an important place in the world economy. Their cultivation in Algeria has great potential. Bacterial canker is one of the parasitic diseases that attacks fruit trees and causes losses in production. This disease is caused by the bacterium *Pseudomonas syringae*. It is a ubiquitous and pathogenic bacterium for multiple plants.

The purpose of this preliminary study is to isolate and identify the pathogen of canker disease. Sampling is done from two orchards in the region of Hamma Bouziane, Constantine and from two species of stone fruit trees: apricot and cherry. These samples were taken from all aerial parts of trees with the characteristic symptoms of canker disease.

The protocol includes conventional biochemical tests such as LOPAT and API 20E strips tests. From 21 strains, 8 bacterial species of 6 genera were identified, such as: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Most of these strains are opportunistic bacteria that have invaded the tree after the development of the disease. None of the isolates were identified as *Pseudomonas syringae*. This may be due to the dominance of secondary, saprophytic and opportunistic bacteria.

A more interesting possibility is illustrated by the presence of *Pantoea spp* and more precisely *P. agglomerans*. This bacterium has been reported to be the pathogen of canker disease in Iran. Our study may be the first to associate this bacterium with apricot and cherry canker. Confirmation of such a result requires a pathogenicity test and an exact identification using the PCR technique. The importance of these results is to orient specialists and researchers towards more suitable methods for the future identification of the pathogen of bacterial canker and also to develop adequate control methods against *Pantoea agglomerans*.

**Key words:** Bacterial canker, fruit trees, pathogen, *Pseudomonas syringae*, biochemical tests, *Pantoea agglomerans*, apricot tree, cherry tree

**Thème : Recherche de *Pseudomonas syringae* Responsable du Chancre Bactérien à partir des arbres fruitiers ; cerisier et abricotier de la région de Hamma Bouziane.**

**Nature du diplôme :** Master

**Domaine :** Science de la Nature et de la Vie

**Filière :** Science Biologiques

**Spécialité :** Ecologie Microbienne

Les fruits de rosacées occupent une place importante dans l'économie mondiale. Cette branche d'arboriculture a un grand potentiel en Algérie. Le chancre bactérien est l'une des maladies parasitaires attaquant les arbres fruitiers et causants des pertes dans la production. Cette maladie est causée par la bactérie *Pseudomonas syringae*. Elle est une bactérie ubiquitaire et pathogène de multiples plantes.

Le but de cette étude préliminaire est d'isoler et d'identifier l'agent pathogène de la maladie du chancre depuis les échantillons prélevés de deux vergers de la région de Hamma Bouziane Wilaya de Constantine et de deux espèces d'arbres fruitiers à noyaux : abricotier et cerisier. Ces prélèvements ont été effectués depuis toutes les parties aériennes des arbres présentant les symptômes caractéristiques de la maladie du chancre.

Le protocole comporte des tests biochimiques conventionnels dont fait partie les tests LOPAT et les galeries API 20E. A partir de 21 isolats, 8 espèces bactériennes de 6 genres ont été identifiées, comme exemple on cite : *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, et *Pseudomonas aeruginosa*. La pluparts de ces souches sont des bactéries opportunistes qui ont envahi l'arbre après le développement de la maladie. Aucun des isolats n'a été identifié étant *Pseudomonas syringae*. Cela peut être dû à la dominance des bactéries secondaires, saprophytes et opportunistes.

Une possibilité plus intéressante s'illustre par la présence des *Pantoea spp* et plus exactement *P. agglomerans*. Cette bactérie a été signalée étant l'agent pathogène de la maladie du chancre des arbres fruitiers en Iran. Notre étude pourra être la première à associer cette bactérie avec le chancre d'abricotier et cerisier. La confirmation d'un tel résultat nécessite un test de pathogénicité et une identification exacte à l'aide de la technique de PCR. L'importance de ces résultats consiste à orienter les spécialistes et les chercheurs vers des méthodes adéquates d'identification future de l'agent pathogène du chancre bactérien et aussi développer des méthodes de lutte adéquate contre *Pantoea agglomerans*.

**Mots clés :** Chancre bactérien, arbres fruitiers, agent pathogène, *Pseudomonas syringae*, tests biochimiques, *Pantoea agglomerans*, abricotier, cerisier

**Lieu de travail :** Station régionale de l'Institut national de protection des végétaux INPV, Constantine

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Melle Gaci Meriem (MAA- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Dr. Boubekri Karima (MCA- UFM Constantine).

**Examinatrice :** Dr. Alatou Radia (MCA- UFM Constantine).

**Tuteur :** Mr. Lekikot Karim (Directeur de l'INPV de Constantine)