

50376  
1993  
342

N° d'ordre : 1201

50376  
1993  
342

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

T H E S E

*présentée pour l'obtention du titre de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

*Spécialité : Microbiologie*

*par*

Elisabeth SINGER



XANTHOMONAS MALTOPHILIA : ASPECTS TAXONOMIQUES  
ET APTITUDES COLONISATRICES  
DE LA RHIZOSPHERE

*Soutenue le 23 novembre 1993 devant la Commission d'examen :*

*Président : Professeur R. TAILLIEZ, Université de Lille 1*  
*Rapporteurs : Professeur G. PRENSIER, Université de Clermont-Ferrand*  
*Professeur J. SWINGS, Université de Gand*  
*Examineurs : Professeur R. BLONDEAU, Université de Lille 1*  
*Docteur J. DEBETTE, Université de Lille 1*  
*Docteur M. LEMATTRE, INRA de Versailles*

A ma famille, pour le soutien  
constant qu'elle m'a témoigné

## REMERCIEMENTS

Je remercie M. le Professeur Roger TAILLIEZ de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Il me fait un grand honneur en acceptant de présider le Jury de cette Thèse.

A Mme Jacqueline DEBETTE, Maître de Conférences, j'exprime ma profonde reconnaissance et toute mon admiration. Elle m'a guidée tout au long de ce travail et a suivi de très près sa progression. Je ne saurais assez la remercier pour l'intérêt constant qu'elle m'a témoignée et pour tous les conseils qu'elle n'a cessé de me prodiguer.

Toute ma gratitude va également au Professeur Jean SWINGS de l'Université de Gand. Les longues discussions que nous avons eues sur la taxonomie du genre Xanthomonas avec tous les Membres de son Equipe m'ont beaucoup aidée pour la première partie de ce travail. Je souhaite vivement que notre collaboration se prolonge après cette Thèse.

J'adresse aussi mes plus vifs remerciements au Professeur Gérard PRENSIER de l'Université de Clermont-Ferrand pour avoir spontanément accepté d'être Rapporteur de cette Thèse. Ses compétences dans le domaine de la Microscopie électronique sont telles que j'éprouve une grande fierté à ce qu'il juge mon travail.

Ayant remarqué, lors de notre rencontre à Gand, tout l'intérêt que porte Mme Monique LEMATTRE, Directeur de Recherches à l'INRA de Versailles, au genre Xanthomonas, c'est un grand honneur pour moi qu'elle participe à ce Jury. Je l'en remercie beaucoup.

De même, je remercie pour sa participation le Professeur Roland BLONDEAU. Il possède tant de connaissances dans le domaine de la Microbiologie des sols que son avis sur ce travail est pour moi très riche d'enseignement.

L'aboutissement de cette Thèse a nécessité le concours de nombreuses personnes auxquelles je suis très reconnaissante :

- le Professeur Philippe GOULLET de l'Hôpital Beaujon de Paris, pour l'envoi de souches d'origine médicale ;
- les responsables de la collection de cultures du Laboratoire de Microbiologie de Gand pour les nombreuses souches aimablement transmises ;
- M. Alain LEPRETRE, Maître de Conférences, du Laboratoire d'Ecologie numérique de l'Université de Lille, qui a réalisé avec une totale disponibilité les analyses numériques ;
- M. Alain SLOMIANNY, Chercheur à l'INSERM (U42) qui a mis à profit ses compétences dans le domaine de la Microscopie pour réaliser les expériences d'immunodétection.

J'adresse aussi tous mes remerciements à Michèle DELECOURT qui a assuré la dactylographie de ce Mémoire, faisant preuve à mon égard d'une grande gentillesse et d'une totale disponibilité.

Enfin, un grand merci à tout le personnel du Laboratoire de Microbiologie.

## R E S U M E

La première partie de ce travail est une contribution à une vaste étude taxonomique de Xanthomonas maltophilia. Les caractéristiques électrophorétiques (point isoélectrique et mobilité) des estérases membranaires hydrolysant les esters du  $\beta$ -naphthol, ont été comparées chez 52 souches de collection pour la plupart identifiées à X. maltophilia, quelques autres étant reconnues d'affiliation incertaine. De plus, ces souches ont été soumises à 53 tests phénotypiques. L'analyse numérique de 29 d'entre eux, discriminants, a permis l'élaboration d'un dendrogramme par classification hiérarchique ascendante. Ces deux approches taxonomiques se complètent et révèlent une parenté certaine de quatre souches du genre Alcaligenes, de Pseudomonas hibiscicola et P. betle avec X. maltophilia. Par contre, P. boreopolis, P. pictorum ainsi que quatre souches appartenant au biovar II de X. maltophilia défini par IKEMOTO et coll. (1980) comme non-exigeant en méthionine, restent nettement à part.

Des travaux semblables, menés sur 70 souches sauvages d'origines rhizosphérique et médicale, ont montré une bonne homogénéité des caractéristiques estérasiques des souches environnementales opposée à une certaine hétérogénéité pour les souches pathogènes. Consécutivement, les valeurs de point isoélectrique des estérases membranaires de cette espèce semblent s'inscrire de manière exclusive dans une zone de pH de 5 à 6.

La deuxième partie du Mémoire analyse l'effet rhizosphérique favorable au développement de X. maltophilia. Des dénombrements répétés par utilisation d'un milieu sélectif, consécutifs à certains traitements de bactérisation des semences de quelques plantes, ont montré que la surface racinaire serait son habitat privilégié. Plus précisément, sa présence a été révélée au niveau des parois des cellules corticales racinaires par immunodétection. Ses aptitudes à coloniser la rhizosphère proche semblent toutefois d'une importance variable selon les plantes considérées. En particulier, l'organisation structurale des semences de Crucifères pourrait y faire obstacle de manière indirecte. Enfin, les effets de cette rhizobactérie sur les plantes qui l'hébergent, restent à élucider.

## A B R E V I A T I O N S

- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- ARN : Acide ribonucléique.
- ARNr : Acide ribonucléique ribosomal.
- AG : Acides gras.
- PGPR : "Plant Growth Promoting Rhizobacteria".
- TSA : Tryptic Soy Agar (Biomérieux).
- TSB : Tryptic Soy Broth (Biomérieux).
- BSA : Bovine Serum Albumine.
- TCA : Trichloroacetic acid.
- XMSM : "Xanthomonas maltophilia selective medium".
- FPSM : "Fluorescent Pseudomonas selective medium".
- C.A.H. : Classification ascendante hiérarchique.
- EDTA : Ethylène diamine tétra-acétate.
- IEF : Isoélectrofocalisation.
- DO : Densité optique.
- SDS : Sodium dodécyl sulfate.
- PNPG : p-nitro-phényl- $\beta$  D-galactopyranoside.
- CFU : Colony forming unit.
- SLS : Sodium lauroyl sarcosine.

# T A B L E D E S M A T I E R E S

- o o o -

## INTRODUCTION

I. -	OUTILS TAXONOMIQUES .....	13
	A. - <u>Etude des acides nucléiques</u> .....	13
	1 - Détermination de la composition en bases de l'ADN ..	13
	2 - Hybridation ADN/ADN .....	14
	3 - Hybridation ADN/ARN .....	15
	B. - <u>Analyse des protéines</u> .....	15
	1 - Sérologie comparative des protéines .....	15
	2 - Electrophorèse des protéines cellulaires en conditions dénaturantes .....	17
	3 - Analyse électrophorétique d'enzymes .....	18
	C. - <u>Analyse des lipides</u> .....	19
	D. - <u>RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)</u> <u>et ribotypie</u> .....	20
	E. - <u>Composition en polyamines</u> .....	21
II. -	LE GENRE <u>XANTHOMONAS</u> .....	23
	A. - <u>Présentation</u> .....	23
	B. - <u>Hétérogénéité du genre</u> .....	25
	C. - <u>Présentation de X. maltophilia</u> .....	27
	1 - Origine historique et distribution géographique ....	27
	2 - Débats suscités par la position taxonomique de <u>X. maltophilia</u> .....	29

III. - LE SOL : HABITAT MICROBIEN .....	35
A. - <u>Définitions</u> .....	35
B. - <u>Flores bactériennes rhizosphériques</u> .....	36
C. - <u>Interactions plantes-bactéries</u> .....	38
1 - Modifications de la microflore du sol par l'action des plantes .....	38
a) <u>Effet rhizosphérique</u> .....	38
b) <u>Influence du stade de développement</u> .....	38
c) <u>Autres facteurs d'interaction</u> .....	39
2 - Influence des rhizobactéries sur les plantes et les autres microorganismes .....	39
D. - <u>Xanthomonas maltophilia, colonisateur de la             rhizosphère</u> .....	41

## M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I. - CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE SOUCHES .....	46
A. - <u>Souches de provenances diverses</u> .....	46
B. - <u>Isolement de bactéries rhizosphériques identifiées             à X. maltophilia</u> .....	46
1 - Nature des échantillons et numérations bactériennes .....	46
2 - Méthode d'identification de <u>X. maltophilia</u> .....	49
C. - <u>Conservation des souches</u> .....	50
II. - CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES SOUCHES .....	50
A. - <u>Caractères biochimiques</u> .....	50
1 - Tests d'identification et galeries API 20 NE .....	50
2 - Utilisation de galeries API ZYM (Biomérieux) .....	51
3 - Autres activités enzymatiques .....	51
a) <u>Mise en évidence d'une catalase</u> .....	51
b) <u>Présence d'une élastase</u> .....	51

c) <u>Activité tributyrinase</u> .....	52
d) <u>Hydrolyse de l'albumine</u> .....	52
e) <u>Hydrolyse de l'arbutine</u> .....	53
B. - <u>Exigences en méthionine</u> .....	53
C. - <u>Utilisation d'un milieu sélectif de X. maltophilia</u> <u>(XMSM)</u> .....	54
D. - <u>Analyse numérique de caractères phénotypiques</u> .....	54
III. - <u>CARACTERISATION DES ESTERASES BACTERIENNES</u> .....	56
A. - <u>Extraction et solubilisation</u> .....	56
1 - Conditions de culture .....	56
2 - Extraction et solubilisation de l'estérase .....	57
3 - Dosage d'activité estérasique <u>in vitro</u> .....	58
4 - Dosage en protéines des échantillons .....	58
B. - <u>Analyse électrophorétique en conditions non</u> <u>dénaturantes</u> .....	58
1 - Préparation du gel de séparation en gradient .....	58
2 - Confection du gel de concentration .....	59
3 - Préparation et dépôt des échantillons .....	59
C. - <u>Isoélectrofocalisation</u> .....	60
D. - <u>Révélation des activités estérasiques dans les</u> <u>gels : utilisation de 5 substrats synthétiques</u> .....	61
IV. - <u>ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITIONS</u> <u>DENATURANTES (SDS-PAGE)</u> .....	62
A. - <u>Préparation des gels</u> .....	62
B. - <u>Préparation des échantillons</u> .....	62
C. - <u>Révélation des protéines au bleu de Coomassie</u> .....	63
V. - <u>RECHERCHE DE XANTHOMONAS MALTOPHILIA AU COURS D'UN</u> <u>CYCLE DE BLE D'HIVER</u> .....	63

VI. -	CULTURES EN SERRE .....	64
	A. - <u>Préparation des terrines de terre</u> .....	64
	B. - <u>Traitements réalisés sur les semences</u> .....	65
	1 - Stérilisation .....	65
	2 - Bactérisation .....	65
	a) <u>Préparation de la suspension bactérienne</u> <u>de X. maltophilia C17</u> .....	65
	b) <u>Bactérisation</u> .....	66
	C. - <u>Ensemencement</u> .....	66
	D. - <u>Prélèvements et numérations bactériennes</u> .....	67
	E. - <u>Utilisation de milieux sélectifs</u> .....	67
	F. - <u>Repérage des bactéries "in situ" par immuno-</u> <u>fluorescence</u> .....	67
VII. -	ETUDE DE LA SPERMOSPHERE DE QUELQUES SEMENCES .....	68
	A. - <u>Préparation des semences brutes</u> .....	68
	B. - <u>Semences en germination</u> .....	68

## R E S U L T A T S

I. -	RECHERCHE DE SOUCHES RHIZOSPHERIQUES IDENTIFIEES A XANTHOMONAS MALTOPHILIA .....	70
II. -	CHOIX DES SOUCHES SAUVAGES ENTRANT DANS LA COLLECTION "LILLE-GAND" PAR COMPARAISON DE PROFILS PROTEIQUES .....	70
III. -	EXTRACTION ET ANALYSES ELECTROPHORETIQUES DES ESTERASES .....	72
	A.- <u>Solubilisation par action du Triton</u> .....	72
	B. - <u>Evaluation de la distance de migration du</u> <u>complexe estérasique</u> .....	74

	10
C. - <u>Evaluation du point isoélectrique des complexes estérasiques</u> .....	77
D. - <u>Représentation bidimensionnelle des valeurs de pI et Rf</u> .....	77
IV. - ANALYSE NUMERIQUE PHENOTYPIQUE .....	82
A. - <u>Caractères uniformes pour toutes les souches</u> .....	82
1 - Tests à réponse positive .....	82
2 - Tests à réponse négative .....	82
B. - <u>Caractères discriminants</u> .....	83
C. - <u>Elaboration d'un dendrogramme phénotypique</u> .....	83
D. - <u>Distinction phénotypique de chaque groupe</u> .....	87
E. - <u>Regroupements phénotypiques</u> .....	87
V. - ANALYSE COMPAREE DE SOUCHES SAUVAGES D'ORIGINE RHIZOSPHERIQUE ET D'ORIGINE MEDICALE .....	90
A. - <u>Analyses électrophorétiques des estérases</u> .....	90
1 - Distances de migration relatives .....	90
2 - Comparaison des points isoélectriques des complexes estérasiques .....	90
3 - Représentation bidimensionnelle des valeurs de pI et Rf .....	93
B. - <u>Analyse numérique phénotypique</u> .....	93
1 - <u>Caractères phénotypiques uniformes</u> .....	96
a) <u>Réponses positives</u> .....	96
b) <u>Réponses négatives</u> .....	96
2 - <u>Caractères phénotypiques discriminants</u> .....	98
3 - <u>Dendrogramme phénotypique</u> .....	98
4 - <u>Différenciation des phénons</u> .....	98
VI. - DENOMBREMENT DE <u>X. MALTOPHILIA</u> DANS LA RHIZOSPHERE DE BLE D'HIVER A DIFFERENTS STADES DE SON DEVELOPPEMENT .....	103

VII. - DENOMBREMENT DE <u>X. MALTOPHILIA</u> DANS LA RHIZOSPHERE D'ESPECES VEGETALES CULTIVEES EN SERRE .....	105
A. - <u>Flores bactériennes totales</u> .....	105
B. - <u>Dénombrements de X. maltophilia par l'utilisation du milieu sélectif XMSM</u> .....	108
C. - <u>Localisation de X. maltophilia "in situ" dans les racines de Chicorée de Bruxelles</u> .....	113
D. - <u>Dénombrements des Pseudomonas fluorescents par l'utilisation du milieu FPSM</u> .....	115
VIII. - DENOMBREMENT DE <u>X. MALTOPHILIA</u> DANS LA SPERMOSPHERE (ENVIRONNEMENT DES SEMENCES) D'ESPECES VEGETALES : BLE, CHICOREE DE BRUXELLES ET COLZA .....	115

## D I S C U S S I O N

I. - COMPARAISON DE SOUCHES DE <u>XANTHOMONAS MALTOPHILIA</u> DE DIFFERENTES ORIGINES ET DE SOUCHES POUVANT ETRE APPARENTEES A CETTE ESPECE .....	122
A. - <u>Difficultés d'extraction de l'estérase</u> .....	123
B. - <u>Caractérisation du complexe "estérase-Triton" des différentes souches</u> .....	124
C. - <u>Classification phénotypique</u> .....	126
1 - Caractéristiques enzymatiques .....	126
2 - Regroupements phénotypiques .....	128
II. - INFLUENCE DE L'ORIGINE D'ISOLEMENT SUR L'HOMOGENEITE DE L'ESPECE .....	130
A. - <u>Caractérisation des estérases</u> .....	131
B. - <u>Classification phénotypique</u> .....	132

III. - PRECISIONS SUR L'HABITAT PREFERENTIEL DE <u>X. MALTOPHILIA</u> D'ORIGINE TELLURIQUE .....	133
A. - <u>Evolution de la population sauvage de X. maltophilia</u> <u>au cours du cycle de végétation de Blé d'hiver</u> <u>en champs</u> .....	134
B. - <u>Importance des Pseudomonas fluorescents dans les</u> <u>échantillons rhizosphériques au cours des</u> <u>expériences en serre</u> .....	140
C. - <u>Repérage "in situ" de X. maltophilia au niveau</u> <u>des racines</u> .....	142
 C O N C L U S I O N .....	145
 B I B L I O G R A P H I E .....	149
 A N N E X E S	
ANNEXE N°1 .....	171
ANNEXE N°2 .....	174
ANNEXE N°3 .....	175
ANNEXE N°4 .....	176
ANNEXE N°5 .....	178
ANNEXE N°6 .....	179
ANNEXE A .....	180

# INTRODUCTION

La taxonomie bactérienne a pour but de donner une classification complète de toutes les bactéries, qui permet de résumer un ensemble d'informations concernant les microorganismes. Elle constitue également un système d'identification facile pour la reconnaissance de nouvelles souches isolées. Enfin, elle fournit un aperçu de l'évolution bactérienne.

Jusqu'aux années 60, la taxonomie bactérienne était dominée par une approche phénotypique, basée principalement sur l'étude de caractères physiologiques et morphologiques qui a bénéficié ensuite des méthodes informatiques pour leur analyse. Depuis la fin des années 70, les progrès de la Biologie moléculaire ont ouvert de nouvelles perspectives. Les récentes techniques mises au point ont apporté des éléments importants sur les souches d'un point de vue Génétique. Les études taxonomiques actuelles sont beaucoup plus complètes qu'auparavant puisqu'elles associent la Biologie moléculaire à des analyses numériques phénotypiques.

## I. - OUTILS TAXONOMIQUES

### A. - Etude des acides nucléiques

#### 1 - Détermination de la composition en bases de l'ADN

Les progrès de la Biologie moléculaire ont été tout d'abord dirigés vers l'acide désoxyribonucléique (ADN) qui constitue le support de l'information génétique. L'analyse de la composition en bases de l'ADN : guanine (G) et cytosine (C) d'une part et adénine (A) et thymine (T) d'autre part, a d'abord été réalisée. La teneur en G + C (mol % G + C) diffère énormément entre les bactéries, allant de 25 % au minimum pour certains Mycoplasmes à un maximum d'approximativement 75 % pour certains Streptomyces. Cependant, elle reste constante pour un individu donné.

Une similitude dans le pourcentage des bases G + C entre deux individus n'implique pas nécessairement une parenté entre eux, car une même

composition en bases ne reflète pas forcément des séquences communes d'ADN et donc une même constitution en protéines. Par contre, une grande différence dans la composition en bases témoigne de l'éloignement de deux organismes. Cette technique constitue donc un bon outil pour révéler une certaine hétérogénéité génétique.

## 2 - Hybridation ADN/ADN

Simultanément, des techniques d'hybridation "in vitro" ADN/ADN ont été réalisées et ont révélé des homologies dans la séquence de nucléotides de l'ADN génomique de différentes souches. L'ADN est réduit à une seule chaîne par dénaturation thermique et alcaline. Il est ensuite mis en présence d'une seconde molécule d'ADN dénaturée d'un autre individu. Si les séquences nucléotidiques sont équivalentes, les bases des deux molécules s'apparient. Cette technique fournit, par conséquent, une estimation quantitative de l'homologie ADN/ADN entre deux organismes et témoigne d'une certaine parenté génétique fondée sur l'ensemble du génome (IKEMOTO et coll., 1980). Elle est largement reconnue et utilisée dans la différenciation des espèces au sein d'un même taxon : Xanthomonas (MURATA et STARR, 1973 ; VAN DEN MOOTER et coll., 1987), Bacillus (KANEKO et coll., 1978), Pseudomonas (PALLERONI et coll., 1972, IKEMOTO et coll., 1980). VAUTERIN et coll. (1991) considèrent cette méthode comme la plus sûre pour déterminer les relations taxonomiques entre les espèces et au sein d'une même espèce. WAYNE et coll. (1987) avaient eux-mêmes parlé de technique de référence.

Cependant, les comparaisons sont réalisées entre des souches de référence judicieusement choisies et une variété de souches à tester. La souche de référence choisie doit donc être représentative d'un taxon précis. Si elle ne l'est pas, des problèmes peuvent intervenir dans la classification. Il est donc, par conséquent, plus prudent d'associer les hybridations ADN/ADN à une étude d'analyse numérique phénotypique. Ainsi, les valeurs d'homologies obtenues après l'étude réalisée par PALLERONI et coll. (1972) sur différentes souches du genre Pseudomonas ont confirmé la classification phénotypique et ont permis le rattachement de quelques souches restées à l'écart d'après leurs seuls caractères phénotypiques.

### 3 - Hybridation ADN/ARN

L'ADN codant pour l'ARN ribosomal ayant subi moins de changements au cours de l'évolution que la totalité du génome bactérien, les homologues entre acides nucléiques furent élargies aux hybridations ADN/ARNr. Celles-ci, comme les hybridations ADN/ADN, présentent le désavantage de comparer les séquences de souches à tester avec des souches de référence. Mais, PALLERONI (1981) considère que cette technique dévoile des similitudes plus anciennes que celles révélées par les hybridations ADN/ADN.

L'étude des homologues ARNr de différentes espèces de Pseudomonas et Xanthomonas (PALLERONI et coll., 1973 ; DE VOS et DE LEY, 1983 ; DE VOS et coll., 1985) a permis la constitution de cinq groupes très éloignés phylogénétiquement. Ainsi, le genre Xanthomonas constitue à lui seul un groupe isolé : le groupe V (Fig. 1). La technique d'hybridation d'ADN/ARNr fut utilisée sur de nombreux autres genres bactériens : Agrobacterium (DE SMET et DE LEY, 1977), Chromobacterium et Janthinobacterium (DE LEY et coll., 1978), Acetobacter, Gluconobacter et Zymomonas (GILLIS et DE LEY, 1980)...

#### B. - Analyse des protéines

L'analyse des protéines constitue également un moyen d'étudier les relations entre différents microorganismes en comparant soit des séquences d'acides aminés ou des réactions sérologiques, soit des profils électrophorétiques de protéines cellulaires totales.

##### 1 - Sérologie comparative des protéines

Le développement de la sérologie quantitative a permis la détection rapide de similitudes dans la structure des enzymes de différentes bactéries et a abouti à un certain type de classification. Des enzymes purifiées de souches de référence sont utilisées pour produire des antisérum. Ces derniers révèlent la présence de ces enzymes dans les extraits cellulaires d'autres souches par précipitation (technique d'immunodiffusion) ou par réaction d'agglutination (STARR, 1981).

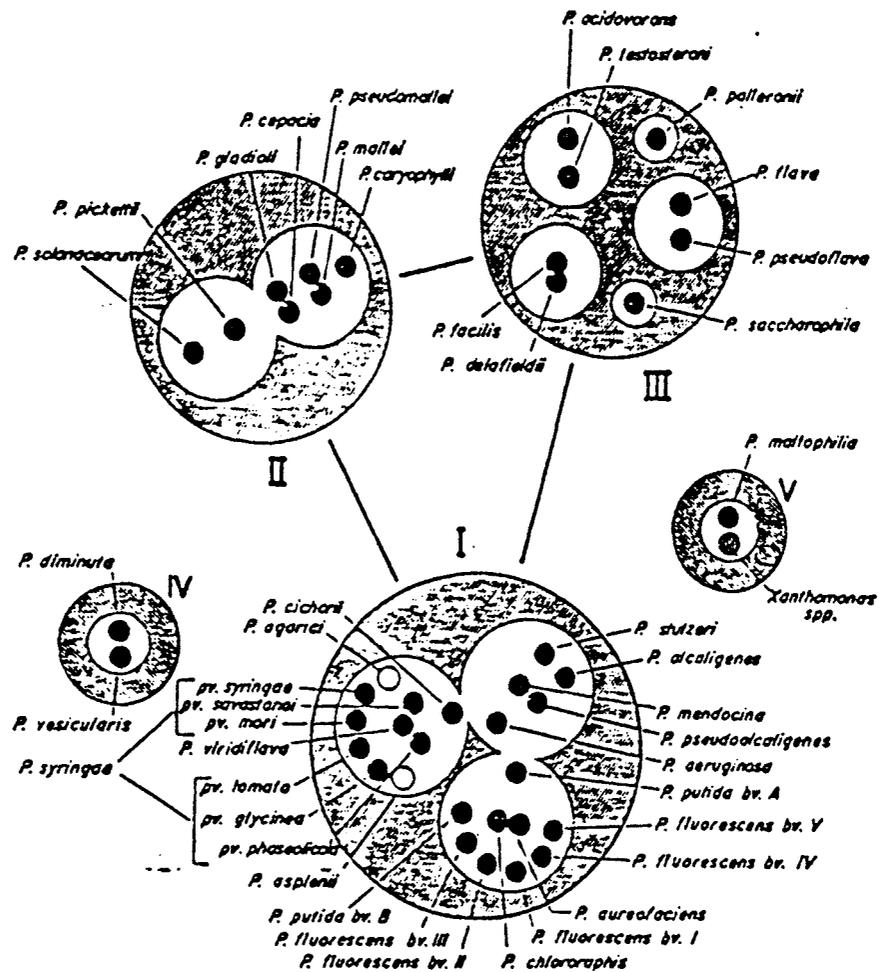


Figure 1 - Regroupement des espèces, biovars et pathovars de Pseudomonas selon leurs homologies ARNr et ADN.

Les grands cercles représentent les groupes d'homologie d'ARNr à l'intérieur desquels sont indiqués par des cercles blancs les groupes d'homologie d'ADN. Le groupe P. diminuta (groupe IV) et le groupe P. maltophilia - Xanthomonas (groupe V) sont inclus pour référence, mais apparaissent sans relation avec les groupes Pseudomonas (extrait de KRIEG et HOLT, 1984).

Utilisant des préparations antigéniques à base de ribosomes et de sous-unités ribosomales, SCHAAD (1976) a pu différencier X. vesicatoria de plusieurs espèces représentatives de Xanthomonas. D'autres préparations antigéniques à base de protéines membranaires (THAVEECHAI et SCHAAD, 1986 ; AZAD et SCHAAD, 1988 ; DEBETTE et PRENSIER, 1989) ont apporté des renseignements sur d'autres espèces de Xanthomonas. Enfin, 275 souches de X. maltophilia, provenant de l'environnement ou de milieux hospitaliers, ont été classées par SCHABLE et coll. (1989) par agglutination sur vingt six antisérum différents.

## 2 - Electrophorèse des protéines cellulaires en conditions dénaturantes

Le génome bactérien est à l'origine de la production d'un grand nombre de protéines ayant une fonction enzymatique ou structurale. Un profil protéique peut être obtenu en soumettant des protéines cellulaires totales à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Ce profil constitue une "empreinte" ("fingerprint") de la souche testée. Il peut alors être utilisé à des fins comparatives.

L'analyse des protéines en électrophorèse donne des résultats similaires aux hybridations ADN/ADN puisque les bactéries sont comparées sur les produits résultant de l'étape de traduction de l'ADN génomique. KERSTERS et DE LEY (1975) ont comparé les profils protéiques de différentes souches des genres Agrobacterium, Achromobacter, Alcaligenes et Zymomonas. Les auteurs ont obtenu des résultats cohérents avec ceux de l'analyse des caractères phénotypiques et des homologues ADN/ADN réalisées sur les mêmes souches.

L'intérêt de cette technique tient dans le fait qu'elle permet l'analyse d'un grand nombre de souches en peu de temps puisque vingt souches peuvent être incluses dans un même gel. Cependant, elle présente également un inconvénient. La reproductibilité des résultats ne pose pas de problème au sein d'un même laboratoire mais la comparaison de ces résultats entre différents laboratoires est moins sûre. C'est pourquoi, SWINGS et coll. (1976) parlent de la nécessité d'avoir des conditions standard rigoureuses afin d'atteindre la meilleure reproductibilité possible.

Utilisée pour le genre Xanthomonas et notamment pour l'espèce X. campestris qui est très hétérogène (VAN DEN MOOTER et coll., 1987), l'électrophorèse comparative des protéines est également appliquée à l'étude de la diversité des populations bactériennes de la rhizosphère de différentes plantes (LAMBERT et coll., 1987 ; McARTHUR et coll., 1988 ; PAAU, 1989).

### 3 - Analyse électrophorétique d'enzymes

Les enzymes étant le plus souvent l'expression d'une structure conservative du génome, l'enzymologie comparée est devenue un outil pour les taxonomistes afin d'étudier les relations entre bactéries. De nombreuses études taxonomiques, depuis celle de BAPTIST et coll. (1969) sur les Entérobactéries, ont consisté à comparer les propriétés de certaines enzymes communes dans un groupe et pouvant être facilement détectées sur gel d'électrophorèse par une réaction colorée. Les souches peuvent être, dans ce cas, classées d'après la présence ou l'absence d'enzymes particulières et d'après leur mobilité électrophorétique.

L'étude du polymorphisme enzymatique par les techniques électrophorétiques permet d'estimer la diversité génétique et la structure de populations variées d'espèces bactériennes (SELANDER et coll., 1986). HA et KOMAGATA (1984) ont caractérisé de cette façon des souches de X. maltophilia exigeantes et non exigeantes en méthionine par comparaison des profils électrophorétiques de six enzymes différentes.

De même, les estérases, enzymes reconnues comme de bons marqueurs taxonomiques, sont étudiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et isoélectrofocalisation. La distinction des souches est basée sur trois critères : la réaction spécifique de l'enzyme sur différents substrats, la mobilité électrophorétique et le point d'isoélectrofocalisation. Différentes espèces bactériennes ont été caractérisées de cette façon en épidémiologie (PICARD et GOULLET, 1984, 1987, 1990 ; PICARD et coll., 1988, 1989). L'analyse des estérases avait déjà été réalisée par d'autres auteurs chez différents groupes

bactériens (NORRIS, 1964 ; CONN et WILLOX, 1965 ; LUND, 1965 ; EL-SHARKAWY et HUISINGH, 1971). Enfin, le polymorphisme estérasique a été révélé chez quatre souches de X. maltophilia (DEBETTE, 1987).

### C. - Analyse des lipides

Les lipides, qui représentent plus de 20 % du poids des bactéries (LECHEVALLIER et LECHEVALLIER, 1988), peuvent fournir certaines informations taxonomiques intéressantes pour la classification et l'identification de souches. Les lipides sont compris dans trois classes : les quinones isoprénoïdes, les lipides polaires et les acides gras à longue chaîne.

Les quinones isoprénoïdes ou respiratoires se trouvent dans les membranes et sont divisées en deux catégories : les ménaquinones et les ubiquinones. Elles sont généralement extraites avec un solvant organique et analysées par chromatographie liquide haute performance (COLLINS, 1985). La plupart des bactéries contiennent l'un ou l'autre type de quinone, parfois même les deux. Par exemple, les germes à Gram négatif aérobies en forme de bâtonnets, possèdent des ubiquinones [les Xanthomonas se caractérisent par l'ubiquinone Q-8 (IKEMOTO et coll., 1980)], tandis que la plupart des Bacillus ont des ménaquinones.

Les lipides polaires forment les membranes bactériennes. Les plus courants sont les phospholipides. D'autres sortes incluent les glycolipides et les amides d'acides aminés. Certains de ces lipides sont d'une bonne valeur taxonomique, d'autres moins.

Les acides gras (AG) bactériens sont issus des lipides polaires et donc de la membrane cellulaire. Ils sont analysés par chromatographie gazeuse en phase liquide.

Les acides gras sont divisés en deux familles d'intérêt taxonomique différent : les AG à chaîne droite et les AG à chaîne ramifiée. La première famille représente des acides qui sont fréquents chez les bactéries. Leur analyse ne fournit donc pas assez d'informations permettant leur distinction les unes des autres. Par contre, les AG à

chaîne ramifiée sont eux relativement rares. Leur analyse apporte donc des éléments significatifs d'une bonne valeur d'un point de vue taxonomique (KANEDA, 1977 ; WILKINSON, 1988).

La composition en AG a été étudiée chez différents genres bactériens (Brucella : TANAKA et coll., 1977 ; Legionella : EHRET et coll., 1987 ; Porphyromonas : BRONDZ et coll., 1989 ; Pseudomonas : IKEMOTO et coll., 1978 ...). Lors de l'étude de différentes souches de P. maltophilia (synonyme de X. maltophilia), non exigeantes en méthionine, ainsi que d'autres espèces du genre Pseudomonas, IKEMOTO et coll. (1980) ne peuvent faire une nette distinction entre les espèces d'après leur composition en AG. Par contre, cette technique montre bien l'hétérogénéité ou l'homogénéité d'un groupe. VAUTERIN et coll. (1990) analysent les AG de différentes espèces de Xanthomonas. La plupart des espèces sont homogènes ; cependant, X. campestris, qui comprend de nombreux pathovars, semble hétérogène.

Un nouvel aspect intéressant de cette technique a été révélé plus récemment par JANSE (1991) lors de l'étude de quelques souches de P. solanacearum. Il est avéré que l'analyse des AG présente une relation avec le caractère phytopathogène de certaines souches. Au niveau de l'espèce, cet outil taxonomique supporte la classification et l'identification des bactéries d'après leur phytopathogénicité (DE BOER et SASSER, 1986 ; JANSE, 1991).

#### D. - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et ribotypie

Cette technique très récente permet d'observer des variations génétiques dans des régions du génome d'organismes où interviennent des mutations ou des réarrangements de l'ADN. Des endonucléases de restriction sont des enzymes qui coupent l'ADN en fragments distincts et en des zones bien définies. Des modifications ponctuelles du génome sont révélées par des altérations de la taille des fragments d'ADN apparaissant sur les électrophorèses en gel d'agarose.

Cette méthode d'analyse est employée dans le domaine médical pour identifier des profils d'ADN spécifiques de maladies héréditaires (BUFTON et coll., 1986). Elle est aussi appliquée aux plantes (HELENTJARIS et coll., 1985) et aux bactéries (GOTTLIEB et RUDNER, 1985). De même, LAZO et coll. (1987) distinguent quelques pathovars de X. campestris. Les regroupements effectués sont assez proches de ceux obtenus par l'étude phénotypique. La classification qui en découle est conforme à la phytopathogénicité des souches. De plus, des souches inconnues peuvent être identifiées ou apparentées à des pathovars connus.

Cette technique présente toutefois une difficulté d'exploitation des résultats, par le fait du grand nombre de bandes obtenues et de la résolution relativement faible rendant délicate la comparaison de plusieurs souches. De plus, VAUTERIN et coll. (1991) ont mis l'accent sur la limite à sa généralisation à cause de la diversité des procédés techniques. Par contre, elle devient intéressante lorsque sont utilisées des sondes d'ADNr marquées radioactivement afin de procéder à des recherches d'hybridation entre les fragments d'ADN obtenus, dénaturés et une sonde d'ADNr d'Escherichia coli. En effet, comme les séquences d'ADNr sont très bien conservées dans le règne des Eubactéries, le choix de cette sonde unique peut être retenu pour n'importe quelle espèce bactérienne : c'est la ribotypie (GRIMONT et GRIMONT, 1986).

#### E. - Composition en polyamines

Les polyamines sont des composés polycationiques qui ont été détectés dans de nombreux organismes (SCHERER et KNEIFEL, 1983). D'abord découverts dans les tissus animaux, leur biosynthèse et leur rôle biologique ont été montrés chez les microorganismes (TABOR et TABOR, 1985). Les polyamines sont impliquées dans la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques. Elles interviennent donc dans les phénomènes de croissance et de développement. Putrescine, spermidine et spermine sont les polyamines les plus fréquemment rencontrées.

Récemment, les polyamines ont été recommandées comme marqueur taxonomique fiable (BUSSE et AULING, 1988 ; AULING et coll., 1991) pour une grande part des bactéries de la classe des Protéobactéries (STACKEBRANDT et coll., 1988).

L'étude de la composition en polyamines a permis à AULING et coll. (1991) de différencier les genres Xanthomonas et Pseudomonas. La polyamine majeure présente chez la plupart des espèces de Xanthomonas est la spermidine alors que spermine et putrescine sont en quantité mineure. YANG et coll. (1993) ont montré la présence, en grande quantité, chez X. maltophilia de cadavérine en plus de la spermidine. Par contre, la putrescine est la principale polyamine des Pseudomonas. Cette technique confirme le rapprochement de X. maltophilia au genre Xanthomonas plutôt que Pseudomonas tandis qu'elle permet d'exclure des deux genres certaines souches mal nommées comme par exemple Xylophilus ampelinus dont la non-appartenance à Xanthomonas était déjà acquise par les hybridations ADN-ARNr (WILLEMS et coll., 1987).

Cette rapide revue des principales techniques utilisées pour améliorer la classification des microorganismes montre qu'une étude correcte doit être entreprise sur un grand nombre de souches. Elle doit associer une analyse numérique phénotypique basée sur un maximum de caractères et une analyse phylogénique établie par l'utilisation du plus grand nombre de techniques de Biologie moléculaire possible. Ces dernières donnent des résultats fiables qui sont utiles à différents niveaux de la Taxonomie (Tab. 1). Toutefois, chacune présente encore ses limites : diversité des procédés, interprétations différentes des résultats, difficulté d'application. YOUNG et coll. (1991) parlent de la nécessité de définir des conditions de description standardisées. L'idée avait déjà été émise par SNEATH en 1989. Les relations entre les différentes techniques sont elles-mêmes à déterminer (résultats contradictoires ou complémentaires ?). Quelle importance accorder à telle ou telle méthode pour obtenir des conclusions valides sur la Taxonomie ?

Il est bien convenu que les analyses d'acides nucléiques sont les techniques de base qui fournissent une classification fiable des bactéries. En effet, la composition des acides nucléiques ne varie pas avec les changements environnants. Les autres analyses (protéines cellulaires, composition en AG, en polyamines, ...) constituent davantage des supports d'information pouvant être mémorisés en ordinateurs et sur lesquels il est possible de s'appuyer pour l'identification rapide de nouvelles souches.

**Tableau 1 - Analyses des techniques d'étude de la cellule bactérienne à l'échelle moléculaire et leurs niveaux de valeur taxonomique, d'après : "Modern Bacterial Taxonomy (AUSTIN et PRIEST, 1986).**

Composant cellulaire	Analyse	Niveau taxonomique
ADN	Composition en base (% G + C)	Genre
	Homologies ADN-ADN	Espèce
ARNr	Séquence de nucléotides Hybridations ADN-ARNr	Genre et regroupements supérieurs
Protéines	Comparaisons sérologiques Electrophorèses Profils enzymatiques	Genre et espèce
Membranes	Acides gras Lipides polaires Quinones isoprénoïdes	Genre et espèce
Métabolites	Acides gras	Genre et espèce

## II. - LE GENRE XANTHOMONAS

### A. - Présentation

La famille des Pseudomonades rassemble des bactéries Gram négatives en forme de bâtonnets, chimioorganotrophes à métabolisme typiquement respiratoire. Décrite dans l'édition du Bergey's Manual de 1984 (PALLERONI, 1984), elle comprend 4 genres : Pseudomonas, Xanthomonas,

Zoogloea ainsi que le genre Frateria dont SWINGS et coll. (1980) ont montré l'étroite relation avec Xanthomonas.

Le genre Xanthomonas regroupe des bactéries responsables de maladies chez les plantes (nécrose, maladies vasculaires et parenchymateuses des feuilles, tiges et fruits). C'est WAKKER (1883) qui, le premier, décrit une maladie causée par un Xanthomonas chez la Hyacinthe. Il nomme alors l'agent responsable "Bacterium hyacinthi". LEYNS et coll. (1984) ont dénombré des infections sur au moins 124 espèces de plantes Monocotylédones et 268 espèces de plantes Dicotylédones. Ces maladies sont répandues partout dans le monde et atteignent des plantes importantes d'un point de vue économique : Riz, Coton, Tomate, Citron, etc... Les membres de ce genre produisent un polysaccharide extracellulaire : le xanthane présentant un certain intérêt industriel en tant qu'agent gélifiant, émulsifiant ou stabilisant principalement dans l'industrie alimentaire (JEANNES, 1974). Les Xanthomonas sont cultivés en fermenteurs afin d'en obtenir une grande quantité. La production d'endonucléases de restriction par X. malvacearum (ENDOW et ROBERTS, 1977 ; MILLER et DAWES, 1979) constitue également une propriété intéressante. Ces différents aspects montrent l'importance de ce groupe.

Le genre Xanthomonas est proposé par DOWSON (1939) et comprend 19 espèces. Dans les années qui suivirent, le nombre d'espèces a beaucoup varié, allant de 60 dans la 7ème édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (BURKHOLDER, 1957) à 5 espèces dans l'édition suivante (DYE et LELLIOTT, 1974).

Selon la dernière classification des Xanthomonas pathogènes de plantes (BRADBURY, 1986) et la littérature récente, les espèces suivantes sont retenues :

- X. campestris (DOWSON P., 1939) : espèce type qui comprend plus de 140 pathovars responsables de diverses maladies sur une grande variété de plantes ;
- X. albilineans (DOWSON A., 1943) : agent causant des rayures blanchâtres sur la Canne à sucre ;

- X. axonopodis (STARR et GARCES, 1950) : espèce entraînant la formation de gomme chez Axonopodus spp. ;
- X. fragariae (KENNEDY et KING, 1962) : espèce formant des taches sur les feuilles de Fragaria spp. ;
- X. populi (RIDE et RIDE, 1978) : agent pathogène ("Chancre suintant") du Peuplier précédemment appelé Aplanobacter populi (RIDE, 1958) et rattaché au genre Xanthomonas après des hybridations ADN-ARNr (DE VOS et DE LEY, 1983 ; VAN DEN MOOTER et SWINGS, 1990 ; RIDE et RIDE, 1992) ;
- X. maltophilia (SWINGS et coll., 1983) : germe ubiquiste dont la phytopathogénicité n'est pas démontrée, d'abord connu comme pathogène occasionnel de l'Homme ;
- X. oryzae (SWINGS et coll., 1991) : pathogène du Riz comprenant les pathovars X. oryzae pv. oryzae et X. oryzae pv. oryzicola.

Enfin, lors d'une étude phénotypique approfondie de 268 souches de Xanthomonas (Fig. 2), VAN DEN MOOTER et SWINGS (1990) constatent que X. campestris pv. graminis doit être séparé des autres pathovars de X. campestris. Ils proposent de créer une nouvelle espèce : X. graminis.

#### B. - Hétérogénéité du genre

Les hybridations ADN-ARNr, réalisées par PALLERONI et coll. (1973) et DE VOS et DE LEY (1983) ont montré que le genre Xanthomonas constitue un groupe ARNr isolé au sein des Protéobactéries. Cette classe des Protéobactéries (STAKEBRANDT et coll., 1988) inclut la majorité des bactéries Gram négatives et fait référence aux bactéries pourpres photosynthétiques et aux souches non photosynthétiques qui leur sont apparentées (WOESE et coll., 1985).

La taxonomie du genre Xanthomonas a beaucoup évolué ces dernières années. MURATA et STARR (1973) ont constaté par l'étude des homologues en ADN une forte hétérogénéité du taxon et notamment chez l'espèce X.

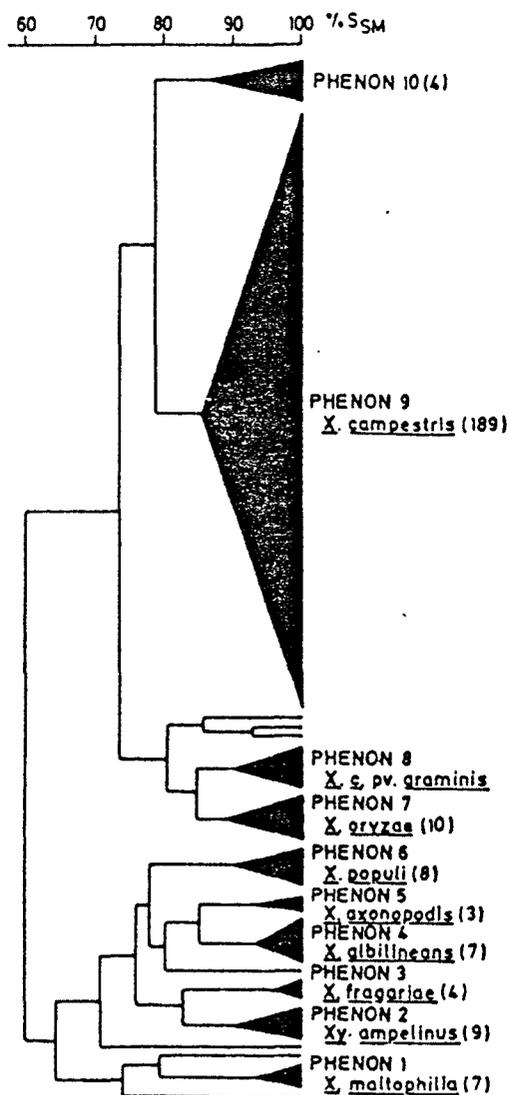


Figure 2 - Dendrogramme établi par l'analyse numérique de 295 caractères phénotypiques de 266 souches du genre Xanthomonas.

Les nombres de souches sont indiqués entre parenthèses (VAN DEN MOOTER et SWINGS, 1990).

campestris. Les travaux d'autres auteurs sur les différents pathovars de cette espèce ont confirmé ce point : VAN DEN MOOTER et coll. (1987), par électrophorèse des protéines totales ; JOHNSON et PALLERONI (1989), par hybridation ADN-ARNr ; VAUTERIN et coll. (1990), par l'étude de la composition en acides gras. L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 2 (VAUTERIN et coll., 1990).

Ce caractère hétérogène apparaît également chez X. maltophilia. JOHNSON et PALLERONI (1989) ont distingué un sous-groupe comprenant cette espèce et P. geniculata. IKEMOTO et coll. (1980) démontrèrent l'existence de souches de X. maltophilia non exigeantes en méthionine et différentes d'après leurs caractéristiques phénotypiques. Toutefois, il n'est pas sûr que les souches exigeantes et les souches non exigeantes constituent deux taxons séparés au sein de l'espèce.

### C. - Présentation de X. maltophilia

#### 1 - Origine historique et distribution géographique

X. maltophilia fut isolé du liquide pleural par J.L. EDWARDS en 1943 sous le nom de "Bacterium bookeri". L'espèce fut ensuite prénommée P. maltophilia par HUGH et RYSCHENKOW (1960) qui identifièrent également des souches provenant de l'eau, du lait cru et des souches d'origine clinique. En 1961, ils en déterminent une souche type : ATCC 13637 dont HUGH et LEIFSON (1963) font une description morphologique et physiologique.

Les premières observations de l'espèce sont faites dans les milieux hospitaliers, P. maltophilia étant le Pseudomonas le plus fréquent après P. aeruginosa (HOLMES et coll., 1979). Pathogène occasionnel de l'Homme, cet organisme affecte des patients immunodéficients ou soumis à des cathétérismes prolongés. Il est l'objet de problèmes d'identification (il a été souvent confondu, par exemple, avec Alcaligenes faecalis et Bordetella bronchiseptica). Sa grande résistance aux antibiotiques couramment disponibles : la plupart des  $\beta$ -lactams, des quinolones et des carbapénems (MARSHALL et coll., 1989 ; CULLMAN, 1991) aiguise l'intérêt qui lui est porté dans le monde médical.

Pathovars)	No. of strains investigated	Reference	Main method(s)	Main conclusions
<i>oryzae, oryzicola</i>	49	30	Phenotypic features and soluble protein PAGE	Both rice pathogens are differentiated phenotypically and by protein electrophoresis
<i>campestris</i>	35	25	Serological techniques, SDS-PAGE of membrane proteins	Strain identification by Ouchterlony double diffusion is possible; <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> is distinguished from other <i>X. campestris</i> pathovars by SDS-PAGE of membrane proteins
<i>manihotis, cassavae</i>	43	27	Phenotypic features, soluble protein PAGE, and DNA-DNA hybridizations	The cassava pathogens are differentiated from each other by protein electrophoresis and phenotypic analysis; DNA-DNA hybridizations reveal low levels of homology (18 to 37%) among <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>cassavae</i> , and <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<i>graminis, phleipratensis, poae, arthenatheri</i>	35	28	Phenotypic features and soluble protein PAGE	In protein electrophoresis each of the four pathovars forms a separate cluster; in the phenotypic analysis <i>X. campestris</i> pv. <i>arthenatheri</i> and <i>X. campestris</i> pv. <i>poae</i> cluster together; <i>X. campestris</i> pv. <i>graminis</i> and <i>X. campestris</i> pv. <i>phleipratensis</i> occur in two separate phena
107 pathovars	268	29	Physiological and biochemical tests	One <i>X. campestris</i> cluster exists without internal differentiation, except for <i>X. campestris</i> pv. <i>graminis</i> and <i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i> , which occur in separate phena
26 pathovars	117	14	RFLP analysis of plasmid DNA	Not all <i>X. campestris</i> strains contain plasmids; plasmid-containing strains are distinguishable on the pathovar level
26 pathovars	93	15	RFLP analysis of genomic DNA	Differentiation among pathovars is possible; RFLP analysis is suitable for identifying unknown <i>Xanthomonas</i> strains
<i>citri</i>	30	10	Total genomic fingerprinting by DNA restriction analysis	Two clonal <i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> groups correspond to pathological groups A and (B+D+C); pathological group E is heterogeneous
<i>citri</i>	24	7	RFLP analysis of genomic DNA	Clonal variation occurs among <i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> strains, analogous to the results of Hartung and Civerolo <sup>a</sup>
<i>citri, phaseoli, alfalfae, glycines, cyamopsidis, dieffenbachiae, pisi</i>		8	RFLP analysis of genomic DNA, phytopathological tests	Reinstatement of <i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> pathological group A to <i>X. citri</i> and reclassification of pathological groups (B+D+C) and E as <i>X. campestris</i> pv. <i>aurantifolii</i> and <i>X. campestris</i> pv. <i>citrumelo</i> , respectively; reinstatement of American <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> strains to <i>X. phaseoli</i>
15 pathovars from grasses and cereals	120	12	SDS-PAGE of whole-cell proteins and DNA-DNA hybridizations	Various pathovars display a characteristic protein pattern; <i>X. campestris</i> pv. <i>translucens</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>hordei</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>cerealis</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>secalis</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>undulosa</i> , and <i>X. campestris</i> pv. <i>poae</i> cannot be differentiated by SDS-PAGE and are genomically highly related
14 pathovars from grasses and cereals	63	22	Gas-chromatographic analysis of cellular fatty acids	Various pathovars display a distinct fatty acid pattern; <i>X. campestris</i> pv. <i>translucens</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>hordei</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>cerealis</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>secalis</i> , and <i>X. campestris</i> pv. <i>undulosa</i> cannot be differentiated

<sup>a</sup> Contributions since the publication of *Bergey's Manual* in 1984 (1).

<sup>b</sup> See reference 10.

Tableau 2 - Récentes contributions à la taxonomie du genre *Xanthomonas* et notamment des pathovars de *X. campestris* (VAUTERIN et coll., 1990).

Ces dernières années, cette espèce a été isolée de nombreux habitats (Tab. 3) avec une large répartition géographique et, de ce fait, peut être considérée comme un germe ubiquiste.

En 1983, SWINGS et coll. proposent le transfert de P. maltophilia dans le genre Xanthomonas en tant que X. maltophilia, ce qui est entériné officiellement par le Comité International de Systématique Bactérienne (MOORE et coll., 1985).

## 2 - Débats suscités par la position taxonomique de X. maltophilia

Dès les années 1980, la position taxonomique de X. maltophilia dans le genre Pseudomonas a été mise en cause.

Ainsi, IKEMOTO et coll. (1980) ont établi que la composition en acides gras cellulaires de X. maltophilia diffère de celle de P. aeruginosa mais se rapproche de celle de X. campestris. Des homologies d'ARNr ont également été constatées par ces mêmes auteurs. D'autres travaux ont révélé des similitudes entre X. maltophilia et X. campestris : études du système ubiquinone (COLLINS et JONES, 1981), de la chaîne enzymatique et notamment celle assurant la biosynthèse de la tyrosine (SWINGS et coll., 1983) ainsi que de la composition de la paroi (BRADBURY, 1984).

DE VOS et DE LEY (1983), dans leurs travaux sur les similarités des cistrons de l'ARNr entre différentes espèces des genres Pseudomonas et Xanthomonas, ont montré que P. maltophilia appartenait au groupe défini par l'ensemble des Xanthomonas. D'autres auteurs ont confirmé l'appartenance de X. maltophilia au groupe d'homologie d'ARNr des Xanthomonas (JOHNSON et PALLERONI, 1989).

En dépit de sa nouvelle position taxonomique, X. maltophilia présente toujours quelques caractères différents des autres espèces de Xanthomonas tels que le nombre de flagelles (unique chez les Xanthomonas, multiple chez X. maltophilia), le non-développement sur

SOURCE DES ISOLEMENTS	REFERENCES	PAYS D'ORIGINE
Pétrole marin ("oil brine")	IIZUKA et KOMAGATA (1964)	JAPON
	KOMAGATA et coll. (1974)	JAPON
Culture enrichie au phénol	IKEMOTO et coll. (1980)	JAPON
Rizières ("rice paddy")	IKEMOTO et coll. (1980)	JAPON
	KOMAGATA et coll. (1974)	
	IIZIKA et KOMAGATA (1963)	
Eaux d'égoûts	BOETHLING (1975a)	U.S.A.
Culture de levure polluée	KOBAYASHI et coll. (1979)	JAPON
Détergent pour laver les vitres	KOBAYASHI et coll. (1985)	JAPON
Pourriture de la toison des moutons "fleece-rot"	Mc DIARMID et BURRELL (1986)	AUSTRALIE
Sols enrichis		
- en fumure	IKEMOTO et coll. (1980) KATOH et SUZUKI (1979)	JAPON "
- en AgNO <sub>3</sub>	CHARLEY et BULL (1979)	Gde BRETAGNE
- en composés aromatiques	ARELLA et SYLVESTRE (1979)	CANADA
Terre avec ou sans végétation	DEBETTE et coll. (1977)	FRANCE
" rhizosphérique	KIPRIANOVA et coll. (1979)	U.R.S.S.

Tableau 3 - Quelques exemples démontrant l'ubiquité de Xanthomonas maltophilia, outre sa fréquente identification dans le domaine clinique, rapportée en particulier par HOLMES et coll. (1979) (extrait de DEBETTE, 1987).

l'amidon bien que X. maltophilia en utilise les produits de dégradation (PALLERONI, 1981), la capacité de réduire les nitrates en nitrites, la production limitée de lipopolysaccharides sur un milieu contenant du glucose, la croissance non inhibée par 0,1 % de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium et la phytopathogénicité non établie (DYE et LELLIOTT, 1974 ; BRADBURY, 1984 ; VAN DEN MOOTER et SWINGS, 1990).

Les xanthomonadines, ces pigments aryl-polyène dont STARR (1981) a montré la probable valeur taxonomique pour toutes les souches du genre Xanthomonas, restent une caractéristique imprécise chez X. maltophilia. Ils ont été utilisés particulièrement pour différencier le genre Xanthomonas des autres bactéries pigmentées en jaune et associées aux plantes : Pseudomonas, Erwinia et Flavobacterium (STARR et coll., 1977). STARR et STEPHENS (1964), STARR (1981) et PALLERONI (1984) ont constaté l'absence de ces pigments chez X. maltophilia. Toutefois, JENKINS et STARR (1985) ont mis en évidence la faible production de xanthomonadines d'un type différent (hexaènes avec chlorure) chez des souches pigmentées en jaune et notamment la souche type ATCC 13637.

Sur la base de quelques caractères phénotypiques, le tableau 4 met l'accent sur les différences entre X. maltophilia et les autres espèces du genre Xanthomonas.

VAN ZYL et STEYN (1992) proposent une réinterprétation de la nouvelle position taxonomique de X. maltophilia. Ces auteurs se réfèrent à leurs travaux (VAN ZYL et STEYN, 1990) comportant une analyse numérique phénotypique et une étude électrophorétique de protéines sur plusieurs espèces de Pseudomonas et de Xanthomonas. Les résultats montrent que X. maltophilia forme effectivement un groupe proche des Xanthomonas. Cependant, les auteurs pensent que cette proximité n'est pas assez significative pour inclure l'espèce dans le genre Xanthomonas. De plus, ils estiment que pour de nombreux caractères, X. maltophilia est trop souvent l'exception à la description du genre Xanthomonas. YOUNG et coll. (1991) avaient eux-mêmes remarqué que certaines espèces considérées comme appartenant à ce genre ne remplissaient pas tous les critères établis pour la validation dans l'"Approved Lists of Bacterial Names" (1980). VAN ZYL et STEYN (1992) proposent donc de créer un

Caractéristiques	<u>P. maltophilia</u> <sup>a</sup>	genre <u>Xanthomonas</u> <sup>b</sup>				
		<u>campestris</u>	<u>fragariae</u>	<u>albilineans</u>	<u>axonopodis</u>	<u>ampelina</u> <sup>g</sup>
Mobilité	100	+	+	+	+	+
Nb de flagelles	>3	1	1	1	1	1
Xanthomonadines	faible <sup>e</sup>	+	+	+	+	-
PBHB	+	-	-	-	-	-
Production d'acide <sup>c</sup>						
- arabinose	-	+	-	-	-	+
- cellobiose	+	+	-	-	-	-
- fructose	99	+	+	-	-	-
- galactose	32	+	-	d	-	+
- glucose	100	+	+	+	+	-
- inositol	-	-	-	-	-	-
- lactose	90	d	-	-	-	-
- maltose	100	d	-	-	-	-
- mannitol	0	-	-	-	-	-
- mannose	97	+	+	+	-	-
- melezitose	-	d	-	-	-	-
- melibiose	+	d	-	-	-	-
- raffinose	+	d	-	-	-	-
- rhamnose	0	-	-	-	-	-
- ribose	-	d	-	-	-	-
- saccharose	94	-	-	-	-	-
- tréhalose	+	-	-	-	-	-
- xylose	56	d	-	+	-	-
Utilisation de citrate	90	+	-	-	-	+
Arginine dihydrolase	0	-	-	-	-	-
Lysine décarboxylase	100	-	-	-	-	-
Ornithine décarboxylase	0	-	-	-	-	-
Croissance sur NaCl 6,5%	0	-	-	-	-	-
TTC 1%	0	-	-	-	-	-
Température de croissance	- à 5°C - à 42°C	maximum entre 30 et 39°C				
Exigences nutritionnelles	méthionine ou cystéine	éventuellement méthionine, acides glutamique et nicotinique				
Desoxyribonucléase	100					
Hydrolyse						
- esculine	100	+	-	+	+	-
- gélatine	100	d	+	d	-	-
- amidon	0	d	+	-	+	-
- tween	100		+ pour la plupart des espèces (DYE et LELLIOTT, 1974)			
- urée	0	-	-	-	-	+
H <sub>2</sub> S	0	+	-	-	+	d
Oxydase	1		négative ou faible			
Catalase	+	+	+	+	+	+
Production indole	-	-	-	-	-	-
(G+C) moles % <sup>f</sup>	66,9		62,6	63,1	62,6	66,9
			63,5	64,4		

PBHB = poly-β-hydroxybutyrate, TTC = triphenyltetrazolium chloride ;

- a) Informations extraites de BERGAN (1981) et FRENEY et coll (1983). Les résultats chiffrés indiquent le pourcentage de réactions positives : à défaut, + indique la présence et - l'absence du caractère.
- b) Informations extraites du Bergey's manual (1984). Les symboles + : 90% des souches ou plus sont positives ; - : 90% ou plus sont négatives ; d : 11-89% des souches sont positives.
- c) Résultats dans le milieu de Dye C (Bergey's manual 1984) pour le genre Xanthomonas, et en références à des concentrations de 1% dans le milieu Oxi-Ferm pour P. maltophilia.
- e) D'après JENKINS et STARR (1985).
- f) D'après MURATA et STARR (1973).
- g) Espèce exclue du genre Xanthomonas par DE VOS et DE LEY (1983)

Tableau 4 - Comparaison des caractéristiques de P. maltophilia (synonyme de X. maltophilia) avec celles de quelques espèces de Xanthomonas (DEBETTE, 1987).

nouveau genre pour X. maltophilia qui constituerait un nouveau-taxon avec Xanthomonas. PALLERONI (1984) avait déjà émis cette idée dans la 1ère édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. De fait, très récemment, PALLERONI et BRADBURY (1993) ont proposé le transfert de X. maltophilia dans un nouveau genre intitulé Stenotrophomonas. Ils émettent quelques critiques à l'égard des résultats obtenus par VAN DEN MOOTER et SWINGS (1990) telle que l'utilisation d'uniquement 7 souches de X. maltophilia dont 2 sont synonymes de l'espèce mais non d'origine : P. hibiscicola et P. betle. La même critique peut être retournée à VAN ZYL et STEYN (1990) puisque leur étude n'a été entreprise que sur 38 souches dont 13 Xanthomonas parmi lesquelles une seule souche de X. maltophilia. Le nombre de tests phénotypiques qui y sont analysés est également assez faible. De plus, dans leurs arguments, VAN ZYL et STEYN (1992) et PALLERONI et BRADBURY (1993) parlent de la non-production de xanthomonadines par X. maltophilia. Ils ne tiennent pas compte des résultats obtenus par JENKINS et STARR (1985). L'étude entreprise par VAN DEN MOOTER et SWINGS (1990), portant sur 295 caractères phénotypiques de 266 Xanthomonas ou souches apparentées, destinée à améliorer la taxonomie de ce genre, est certainement plus fiable pour tirer des conclusions. Toutefois, ces derniers auteurs pensent qu'il est encore prématuré de créer un nouveau genre, certaines propriétés restant encore à définir. Le nom Stenotrophomonas rappelle le spectre nutritionnel limité de l'espèce. Toutefois, en présence de méthionine, X. maltophilia est capable d'assimiler de nombreuses sources de carbone.

Si toutes les souches de Xanthomonas sont phytopathogènes, ce caractère n'a toujours pas été établi chez X. maltophilia. DE VOS et coll. (1985) ont montré une forte parenté de X. maltophilia à des espèces phytopathogènes : P. boreopolis, P. pictorum, P. betle et P. hibiscicola. Ces dernières sont elles-mêmes considérées comme mal-nommées, car elles appartiennent à la branche d'hybridation d'ARNr de Xanthomonas. A l'appui de cette hypothèse, il semblerait que la souche type de P. hibiscicola soit identique à X. maltophilia (BRADBURY, 1984) alors que dans le Bergey's Manual de 1974, elle avait été exclue des Pseudomonas pour ses caractéristiques atypiques.

VAN DEN MOOTER et SWINGS (1990) isolent un phénon contenant X. maltophilia, P. betle et P. hibiscicola. P. pictorum ne s'y trouve pas mais est très proche. Les mêmes conclusions sont tenues par VAN ZYL et STEYN (1990) en ce qui concerne X. maltophilia et P. hibiscicola.

La ressemblance de X. maltophilia avec ces souches phytopathogènes permet d'envisager sa possible association à des maladies de plantes. Selon l'"International Code of Nomenclature of Bacteria" (LAPAGE et coll., 1975), X. maltophilia devrait être renommé X. betle, P. betle étant la souche la plus ancienne.

VAN DEN MOOTER et SWINGS (1990) restent, quant à eux, plus prudents dans l'attribution d'une nouvelle appellation pour X. maltophilia et précisent que leur étude ne renferme qu'une seule souche de chaque espèce de Pseudomonas. Ces représentations uniques ne permettent pas de conclusions fiables.

Toutes ces informations montrent nettement la nécessité de revoir la position systématique de X. maltophilia en tenant compte de ces conclusions fragmentaires. Il importait de réaliser une étude de grande envergure en comparant les apports de techniques diverses. La première partie du travail de cette Thèse témoigne de notre contribution à cette étude centralisée au Laboratoire de Microbiologie de Gand (équipe de SWINGS). Nous avons entrepris, sur une collection de souches identifiées ou supposées apparentées à X. maltophilia, une analyse numérique de quelques caractères phénotypiques discriminants et avons comparé les profils électrophorétiques des estérases. Ce dernier travail original repose sur la diversité apparente de ces enzymes révélée pour quatre souches (DEBETTE, 1987). Par ailleurs, sur une collection de souches d'origine médicale d'une part et d'origine rhizosphérique d'autre part, nous avons, par la même approche, réfléchi sur l'homogénéité d'un groupe d'individus sauvages en fonction de la source d'isolement.

### III. - LE SOL : HABITAT MICROBIEN

#### A. - Définitions

Le sol constitue un habitat microbien complexe abritant une microflore riche composée pour une grande part d'organismes hétérotrophes utilisant des composés organiques comme source énergétique et source de carbone. Ces composés constituent le principal facteur limitant de l'activité microbienne dans le sol et sont apportés en partie par la végétation. Les relations entre la microflore du sol et les plantes sont donc très importantes et peuvent se manifester avec une grande intensité dans des sites précis tels que la rhizosphère, le rhizoplan, l'endorhizosphère, la spermosphère et la phyllosphère qu'il convient de définir.

La notion de rhizosphère fut utilisée pour la première fois par HILTNER en 1904 et désigne les parties du sol en contact avec les racines des plantes. KLEEBERGER et coll. (1983) parlent du sol immédiatement adjacent aux racines. Le sol rhizosphérique diffère du sol non rhizosphérique par sa teneur plus élevée en composés organiques utilisables comme substrats par la microflore et provenant de résidus racinaires divers ainsi que de l'exsudation des racines. Ces particularités entraînent en général une prolifération de la population microbienne dans cette zone.

Le concept de rhizoplan est plus récent et fut proposé par CLARK en 1949. Il désigne la surface des racines et le mucigel qui la recouvre (SCOTT et coll., 1958). Les microorganismes de cette région ne peuvent être enlevés par de simples lavages à l'eau.

Enfin, le terme endorhizosphère représente la couche de cellules mortes et "moribondes" adjacentes aux cellules vivantes de la racine. Il inclut également les espaces intercellulaires accessibles aux microorganismes (KLEEBERGER et coll., 1983).

La spermosphère et la phyllosphère sont deux habitats homologues de la rhizosphère. Le premier est localisé à la périphérie des graines et le deuxième constitue l'environnement des feuilles et gaines foliaires.

L'ensemble des microorganismes (Bactéries, Actinomycètes, Champignons, Algues, Virus et Protozoaires), qui vivent dans les sols à l'état libre ou associés parfois symbiotiquement aux plantes, sont responsables de certaines transformations chimiques et même physiques dans le sol. Ils agissent directement ou indirectement sur la nutrition des plantes. Les bactéries, qui colonisent les racines ou qui prolifèrent sous l'influence des racines, sont appelées rhizobactéries (SCHROTH et HANCOCK, 1982).

### B. - Flores bactériennes rhizosphériques

Un certain ordre a pu être constaté en ce qui concerne la nature des microorganismes ainsi que leur présence dans les sols. Comme les Champignons, les germes à Gram positif se trouvent principalement dans les sols non rhizosphériques (ALEXANDER, 1961). Les Arthrobacter et les Bacillus en sont les groupes les mieux représentés (BLONDEAU, 1970 ; SOUMARE et BLONDEAU, 1972).

Les germes à Gram négatif sont eux des habitants typiques de la rhizosphère (ALEXANDER, 1961 ; KLEEGERGER et coll., 1983) et colonisent beaucoup moins les sols dépourvus de racines. Ce sont les Pseudomonas qui prédominent la plupart du temps. Ainsi, les P. fluorescents (notamment P. fluorescens et P. putida) sont les plus fréquents. Capables de s'associer à des particules de matière organique, ils dépendent beaucoup de l'exsudation de ces composés par les racines (VANCURA, 1980). De nombreuses études, réalisées sur les populations bactériennes rhizosphériques de différentes plantes cultivées (GARDNER et coll., 1982 ; KLEEGERGER et coll., 1983 ; CURL et TRUELOVE, 1986 ; LAMBERT et coll., 1987 ; VAN OUYTRYVE et coll., 1988 ; ...) ont confirmé leur importance. D'autres groupes sont également présents en quantité moindre : Acinetobacter, Achromobacter, Agrobacterium (HOLDING, 1960), Flavobacterium, Xanthomonas et Alcaligenes (VAN OUYTRYVE et coll., 1988a). X. maltophilia est aussi une espèce bien représentée dans la rhizosphère de quelques plantes (Tab. 5).

BOWEN et ROVIRA (1976) ont remarqué dans l'environnement des racines, une graduation de différents types bactériens de la surface des racines

jusqu'au sol rhizosphérique en passant par le rhizoplan. Le pourcentage de P. fluorescents isolés du Blé diminue effectivement de la rhizosphère au rhizoplan jusqu'à devenir pratiquement inexistant dans l'endorhizosphère (MILLER et coll., 1990).

VAN OUTRYVE et coll. (1988 a et b, 1989) ont comparé les flores bactériennes de graines (spermosphère), de feuilles (phyllosphère) et de racines (rhizosphère) de Chicorée de Bruxelles. Les microflores au voisinage des racines et des feuilles sont semblables tandis que les graines présentent une population microbienne différente : Arthrobacter, Erwinia herbicola et Enterobacter agglomerans sont les groupes prédominants dans cette zone, tandis que X. maltophilia, P. paucimobilis et Agrobacterium radiobacter sont présents en quantités mineures. Il semble donc que les espèces bactériennes, issues des graines, ne soient pas capables de constituer des populations stables dans la rhizosphère.

Tableau 5 - Importance de X. maltophilia dans différentes terres rhizosphériques cultivées.

Références	Espèces végétales
DEBETTE et BLONDEAU (1980)	Betterave à sucre, Blé, Chou, Colza
DEBETTE et coll. (1983)	Avoine, Chou, Maïs, Pois, Tomate
JUHNKE et coll. (1987)	Blé
FAGES et LUX (1991)	Tournesol
LAMBERT et coll. (1987)	Maïs
LAMBERT et coll. (1990)	Betterave à sucre
LEYNS et coll. (1990)	Betterave à sucre, Chicorée, Maïs, Orge, Soja, Tournesol, Vigne
VAN OUTRYVE et coll. (1988)	Chicorée

## C. - Interactions plantes-bactéries

### 1 - Modifications de la microflore du sol par l'action des plantes

L'activité microbienne dans le système "sol-plante" est régie par un ensemble de facteurs de nature chimique, physique ou biologique.

#### a) Effet rhizosphérique

La rhizosphère abrite une microflore abondante qui est stimulée par les excréments racinaires. Ces dernières fournissent des facteurs de croissance, créant un environnement favorable pour la prolifération et la persistance des espèces dans cette zone. BOKHARI et coll. (1979) ont défini par "effet rhizosphérique" la résultante de ces interactions entre la microflore tellurique, les exsudats racinaires, le mucigel et les cellules intactes. MARTENS (1982) a montré que cet effet peut entraîner une multiplication de 5 à 10 des populations bactériennes présentes dans cette zone. Toutefois, le nombre des Champignons semble lui, peu affecté (CLARK, 1949).

#### b) Influence du stade de développement

La composition microbienne rhizosphérique évolue en fonction de l'âge de la plante. MATSUMOTO et coll. (1979) ont constaté qu'elle est en fait influencée par des changements de l'exsudation racinaire qui interviennent au cours de la croissance du végétal. LAMBERT et coll. (1987) observent dans la rhizosphère du Maïs des P. fluorescens sur toute la période de croissance tandis que X. maltophilia est plutôt présent durant les stades précoces. X. maltophilia peut être considéré comme un organisme rhizosphérique typique des premiers stades du développement (LEYNS et coll., 1990). D'autres auteurs ont également remarqué une population bactérienne plus importante pendant la période de floraison (RIVIERE, 1960 ; MARTIN, 1971). Ces différentes observations indiquent le rôle indirect que joue l'âge de la plante sur la diversité et l'importance de la flore bactérienne.

### c) Autres facteurs d'interaction

Il semble que certaines plantes soient capables de stimuler dans leur rhizosphère des groupes bactériens présentant des propriétés antagonistes vis-à-vis d'autres microorganismes phytopathogènes. Ainsi, NEAL et coll. (1970) ont constaté la présence de microorganismes nuisibles de "Cochliobus sativus" (Champignon phytopathogène du Blé) dans des cultivars de Blé résistants, tandis qu'ils sont absents dans des cultivars sensibles. Cette stimulation sélective des plantes vis-à-vis de certains groupes bactériens a également été observée par d'autres auteurs (ROVIRA, 1965 ; NEAL et coll., 1973 ; ATKINSON et coll., 1975). Elle constitue un moyen de défense mis en oeuvre par la plante pour combattre les organismes qui lui sont nuisibles.

## 2 - Influence des rhizobactéries sur les plantes et les autres microorganismes

Les interactions existant entre les différents constituants du sol dépendent des composants chimiques et physiques de celui-ci et forment un réseau très complexe de telle sorte qu'il est difficile d'élucider le comportement d'un microorganisme dans un tel système. Cependant, de nombreuses études, faites récemment, ont apporté quelques informations sur les relations entre la microflore bactérienne et les Végétaux.

Les rhizobactéries exercent sur les plantes des effets qui sont neutres, nuisibles (dans ce cas il s'agit de phytopathogènes comme par exemple beaucoup de Xanthomonas) ou favorables.

Les bactéries ayant un effet positif sont regroupées sous le nom de PGPR "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (KLOPPER et SCHROTH, 1978) et intéressent particulièrement les Scientifiques. La plupart de ces germes interviennent indirectement sur la plante (Fig. 3). Ils empêchent le développement de maladies par antagonisme vis-à-vis des microorganismes nuisibles. Dans ce cas, ils mettent en oeuvre différents procédés dont quelques uns sont maintenant connus : simple déplacement des microbes phytopathogènes, production de substances bloquant la croissance des Champignons [ex. des métabolites cellulaires

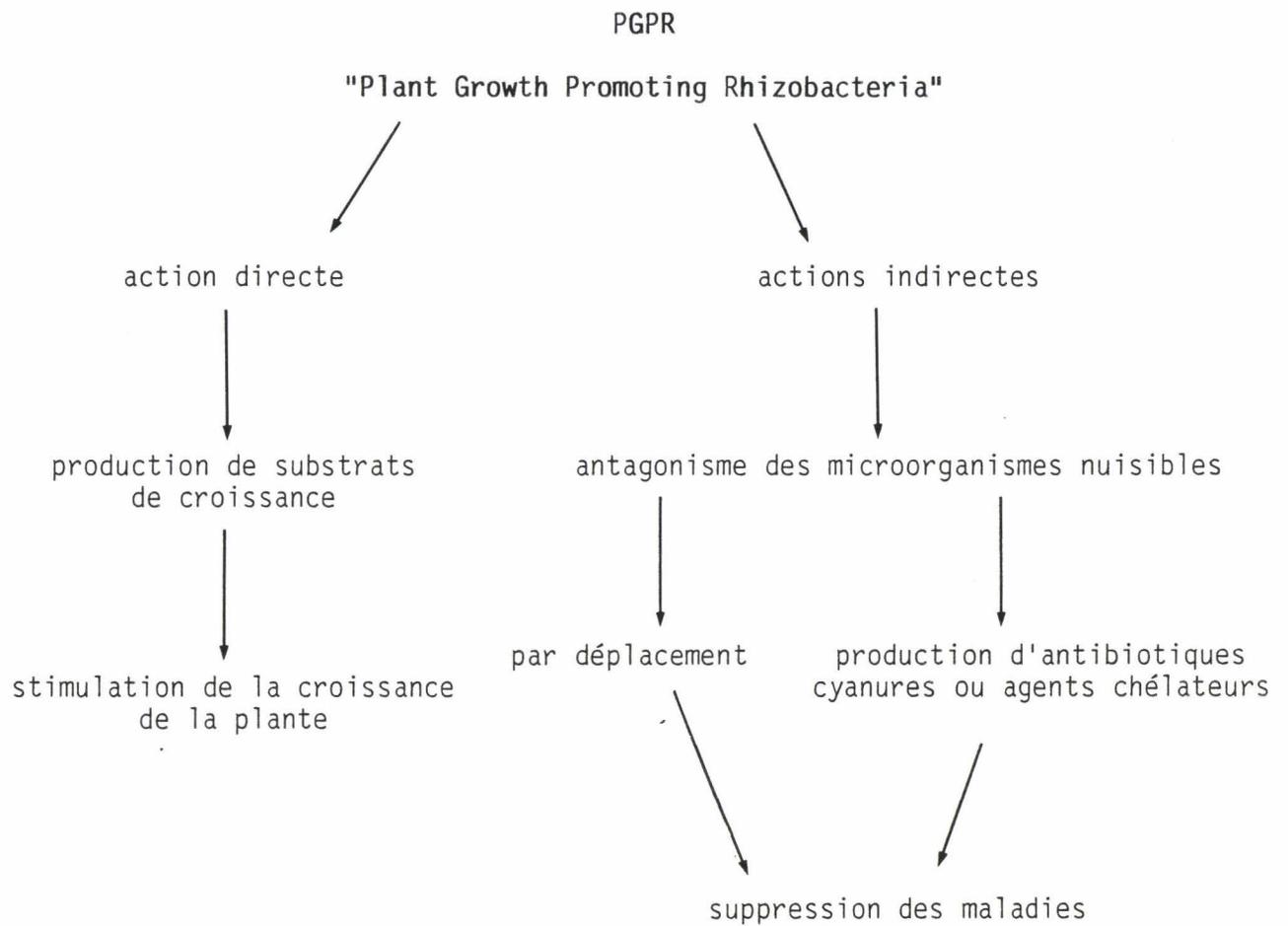


Figure 3 - Principaux modes d'action des "PGPR" pour favoriser la croissance des plantes.

à activité antibiotique de P. fluorescens (LEISINGER et MARGRAFF, 1979), cyanures (AHL et coll., 1985) ou encore libération dans le sol d'agents chélateurs (sidérophores) privant les Champignons du fer présent dans le sol (SCHROTH et HANCOCK, 1982 ; GEELS et SCHIPPERS, 1983)]. D'autres PGPR agissent directement sur la plante en stimulant sa croissance par la production de substrats. C'est le cas notamment des Pseudomonas fluorescents qui fabriquent des régulateurs de croissance comme les gibberellines et les cytokinines (SEQUERIA et WILLIAM, 1964 ; SWANSON et coll., 1979 ; BOWEN, 1980).

Il est probable que d'autres mécanismes interviennent encore dans ce type d'interaction puisque toutes les bactéries ne produisent pas nécessairement ces substances.

Des recherches récentes ont été orientées sur cet aspect de l'activité microbienne dans les sols qui, s'il est mieux connu, peut être utilisé pour accroître les rendements et augmenter la qualité des récoltes.

Des souches ont été introduites dans la rhizosphère de plantes en tant que contrôle biologique. Toutefois, ces essais d'inoculation se sont révélés très inconsistants et ont présenté une grande variabilité de réponses comme pour le Blé lorsque les expériences sont réalisées en champs (JUHNKE et coll., 1987). Il faut dire que l'influence des bactéries sur la croissance des plantes dépend de multiples facteurs de l'environnement tels que le type de sol, la température, la nutrition ou l'humidité. De plus, certaines souches éprouvent quelques difficultés à s'établir sur les semences ou les racines à la place de la flore initiale. Cette absence de régularité des résultats constitue un obstacle au développement commercial d'un tel procédé.

#### **D. - Xanthomonas maltophilia, colonisateur de la rhizosphère**

Une analyse numérique de bactéries telluriques à Gram négatif non fermentantes a permis à DEBETTE et coll. (1975) d'isoler un groupe de souches d'abord comparé au genre Acinetobacter. La sélection d'une souche de référence C17 (fiche signalétique : Tab. 6) dans ce groupe et sa caractérisation par analyse génomique (% GC + hybridation ADN/ADN)

Tableau 6 - Fiche signalétique de la souche Xanthomonas maltophilia C17 (DEBETTE et coll. 1983).

	C17
Mobilité	-
Absence de pigments	+
Présence d'un cytochrome oxydase	-
d'une uréase	-
d'une phosphatase acide	+
d'une catalase	+
d'une gélatinase	+
d'une amylase	-
d'une DNase	+
Dissolution du CaHPO <sub>4</sub>	-
Présence d'une lipase	+
Oxydation du glucose lente	-
du xylose	-
du saccharose	-
Utilisation du citrate de Na	+
de l'acétate de Na	+
du succinate de Na	+
du benzoate de Na (lente)	+
Résistance à la pénicilline (100 UI/ml)	+
au chloramphénicol (25 µg/ml)	+
à la streptomycine (25 µg/ml)	+
Tolérance au NaCl 3 % (forte)	+
au NaCl 6 %	-
Croissance à 4°C	-
à 8°C	-
à 37°C	+
Résistance au lauryl sulfate de Na	+
Croissance sur milieu minéral	-
Exigences en acides aminés	+
en vitamines	-
en extrait de terre et de levure	-
Dégradation de l'arginine en anaérobiose	-
Production de cétolactose à partir de lactose	-
Réduction des nitrates en nitrites	+
Production de SH <sub>2</sub>	-
Réduction du lait tournesolé	+
Alcalinisation du lait tournesolé	-
Acidification du lait tournesolé	-
Coagulation du lait tournesolé	-
Production de NH <sub>4</sub> à partir des peptones	+
d'indole	-
Décarboxylation de la lysine	-
Dénitrification	-

ont conduit à assimiler l'ensemble du phénon à X. maltophilia (DEBETTE et BLONDEAU, 1977).

D'autres travaux ont permis de préciser la présence de X. maltophilia dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées (DEBETTE et BLONDEAU, 1980). L'espèce, qui est un bon représentant des bactéries Gram négatives de la rhizosphère, semble être sensible à l'effet rhizosphérique (KIPRIANOVA et coll., 1979 ; DEBETTE et BLONDEAU, 1980). La rhizosphère proche constitue son habitat préférentiel. La localisation de X. maltophilia dans la rhizosphère est probablement le résultat de l'exigence que l'espèce témoigne vis-à-vis des acides aminés et notamment des acides aminés soufrés. De plus, CHABOUD et ROUGIER (1981) pensent que la présence de cellules exfoliées dans cette zone peut favoriser la microflore protéolytique. Or, les capacités protéolytiques de X. maltophilia sont bien connues (BOETHLING, 1975a ; DEBETTE, 1991) et sont contrôlées différemment selon la nature des substrats carbonés (BOETHLING, 1975b ; SINGER et DEBETTE, 1993). Il est donc possible qu'elles jouent un rôle dans la colonisation des racines (DEBETTE et coll., 1983).

L'analyse d'échantillons de sol prélevés en champs et en serre a révélé la stimulation de X. maltophilia par certaines plantes. Il semble qu'il y ait une relation spécifique entre l'espèce végétale colonisée (notamment les Crucifères) et la bactérie (DEBETTE et coll., 1983). Les Crucifères libèrent des exsudats racinaires riches en acides aminés soufrés. Ce qui peut expliquer la prolifération observée.

Toutefois, des augmentations occasionnelles du pourcentage de X. maltophilia ont été mises en évidence dans la rhizosphère d'autres plantes, telles que le Maïs, l'Avoine et le Blé. Ces différentes stimulations sont difficilement explicables. LAMBERT et coll. (1987) ont déjà mentionné le caractère occasionnel de la colonisation des plantes par les bactéries, en constatant de faibles similitudes au sein d'un même champ entre les populations bactériennes rhizosphériques de plantes d'espèces identiques. Une répartition non uniforme des bactéries dans le sol pourrait être une explication à ces phénomènes.

Peu de travaux ont été réalisés pour déterminer le rôle que joue l'espèce bactérienne sur le développement des plantes qu'elle colonise et vis-à-vis des autres microorganismes de son entourage. Même si le caractère phytopathogène de X. maltophilia n'a pas encore été démontré, la similitude de cette bactérie avec d'autres espèces phytopathogènes permet d'envisager une possible implication de l'espèce dans les maladies de plante. Les relations possibles entre X. maltophilia et les autres microorganismes du sol sont peu connues. Toutefois, LEYNS et coll. (1990) ont montré les propriétés antifongiques de quelques souches telluriques de X. maltophilia, sans pour autant déterminer les composés qui en étaient responsables. GREGORY et coll. (1986) avaient déjà suggéré l'utilisation de X. maltophilia comme possible agent de contrôle biologique de pathogènes du Chêne et KWOK et coll. (1986) avaient fait de même pour le Concombre.

La recherche de X. maltophilia sauvages dans l'environnement racinaire de diverses plantes, réalisée pour la constitution des collections de souches, a conduit à vérifier une fois de plus l'influence rhizosphérique et une certaine prolifération occasionnelle de l'espèce bactérienne notamment dans l'environnement du Blé. De ce fait, afin de préciser l'habitat préférentiel de cette bactérie, nous avons entrepris un suivi de sa prolifération au cours d'un cycle de végétation de Blé d'hiver. Possédant des anticorps polyclonaux spécifiques à notre souche "type" : X. maltophilia C17, nous avons tenté de localiser l'espèce "in situ" par immunodétection.

Cultivant diverses plantes en serre, nous avons recherché de manière systématique simultanément X. maltophilia et les P. fluorescents, colonisateurs rhizosphériques et éventuels compétiteurs. Les semences sont soumises au préalable à différents traitements qui permettront de noter les effets d'un dérèglement momentané de la "balance microflorale". Ces traitements consistent à mettre les semences en contact avec une suspension bactérienne de C17, ce qui permet, en outre, de faire la recherche par immunodétection au niveau des racines des plantules.

Enfin, ces expériences ont été complétées par des études similaires de la spermosphère pour ces mêmes espèces végétales, afin de connaître l'influence de la germination des semences sur la prolifération de X. maltophilia.

MATERIEL ET METHODES

## I. - CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE SOUCHES

### A. - Souches de provenances diverses

Cf. tableau 7.

### B. - Isolement de bactéries rhizosphériques identifiées à *Xanthomonas maltophilia*

#### 1 - Nature des échantillons et numérations bactériennes

Divers échantillonnages sont réalisés à différentes périodes du développement de plantes cultivées en terrain argileux dans la région de Cambrai (Etablissement HOQUET-Graines) : la Chicorée Witloof d'une part, et le Blé d'autre part.

Les échantillons dits rhizosphériques correspondent à l'homogénéisation de 10 g de terre adhérente aux racines, dans 90 ml d'eau physiologique, à l'aide d'un homogénéiseur de type "Virtis 45" utilisé à vitesse maximum pendant 1 min (SOUMARE et BLONDEAU, 1972).

Les échantillons appartenant au rhizoplan sont obtenus de manières différentes selon les plantes.

Pour la Chicorée, c'est un grattage superficiel avec un scalpel stérile des racines tubérisées préalablement utilisées, qui constitue le matériel dispersé dans 90 ml d'eau physiologique stérile par le même homogénéiseur, utilisé à vitesse lente pendant 10 min. Pour le Blé, les mêmes racines, débarrassées de leur terre adhérente, sont coupées sous le collet de la plante, puis mises en agitation comme précédemment.

Ces diverses préparations constituent les dilutions au 1/10e à partir desquelles sont réalisées des suspensions-dilutions successives du même ordre.

Les numérations bactériennes sont faites après étalement sur le milieu de SIERRA (1957) (Annexe n°1) en boîtes de Pétri. Il a été démontré

A**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	88 08 116 LMG 11115	brosse bronchique	GOULLET (1988)
B**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	88 10 105 LMG 11116	hémoculture	GOULLET (1988)
C**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	88 07 60	hémoculture	GOULLET (1988)
D**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	89 08 84	hémoculture	GOULLET (1989)
E**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	89 01 88 LMG 11114	hémoculture	GOULLET (1989)
F**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	90 01 136 LMG 11112	ponction pleurale	GOULLET (1990)
G**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	88 10 145	hémoculture	GOULLET (1988)
H**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	89 06 33 LMG 11113	cathéter	GOULLET (1989)
I**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	88 08 146	hémoculture	GOULLET (1988)
J**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	89 01 140	hémoculture	GOULLET (1989)
K**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	89 02 149	hémoculture	GOULLET (1989)
L**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	89 03 134	hémoculture	GOULLET (1989)
M**	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	90 05 164 LMG 11111	cathéter	GOULLET (1990)
N*	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	LMG 10851	hémoculture	GOOSSENS (1989)
O*	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	LMG 10874 ATCC 17671	hémoculture	THIBAUT
HA*	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	LMG 10996	ulcère de jambe	HANSEN
HB*	<u>Xanthomonas maltophilia</u>	LMG 11002	frottis de tétou	HANSEN

Tableau 7 - Souches de provenances diverses.

- \* : souches transmises par le Dr. J. SWINGS, Laboratoire de Microbiologie et de Génétique, Université de Gand (Belgique).
- \*\* : souches transmises par le Prof. P. GOULLET, Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon, Paris.
- LMG : Laboratorium Mikrobiologie, Ghent, Belgium.
- ATCC : American Type Culture Collection, Rockville, Md.
- NCMB : National Coll. of Marine Bacteria, Ecosse.
- JCM : Japon Coll. of Microorganism.
- NRRL : Northern Regional Research Laboratory, USA.

précédemment que l'utilisation de ce milieu plutôt qu'une gélose nutritive traditionnelle ne perturbait pas de manière significative les numérations (DEBETTE, 1987).

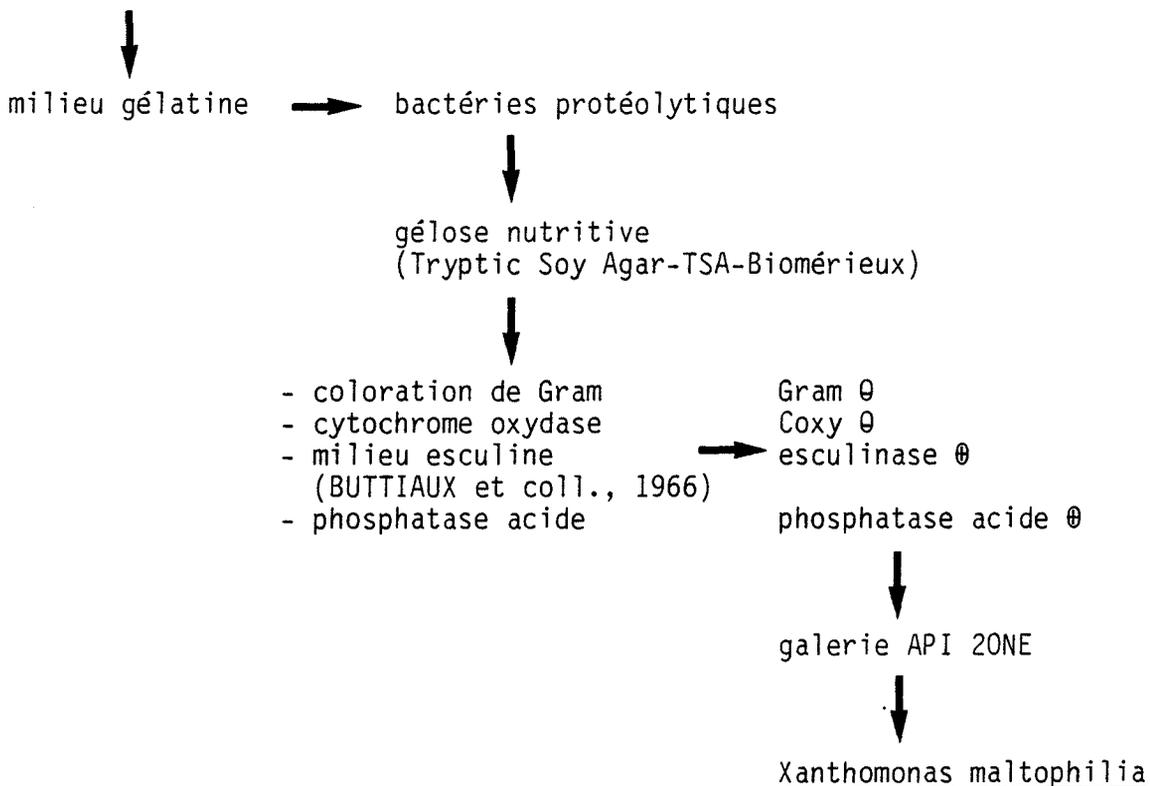
Pour chaque échantillon, le pH de la décoction est mesuré. Le taux d'humidité de la terre du lieu de prélèvement est évalué par comparaison du poids sec au poids initial après un séjour en étuve à 105°C, ayant permis l'obtention d'un poids constant.

## 2 - Méthode d'identification de Xanthomonas maltophilia

La méthode utilisée pour l'identification de Xanthomonas maltophilia correspond à la méthodologie n°3 mise au point par DEBETTE (1987). Cette technique, rapide et suffisamment fiable, consiste en l'application successive de tests auxquels les souches de Xanthomonas maltophilia répondent toujours de façon uniforme.

prélèvement de bactéries

lipolytiques sur milieu de SIERRA



Les bactéries lipolytiques, prélevées sur le milieu de SIERRA, sont ensemencées sur un milieu renfermant de la gélatine (Annexe n°1). Après une incubation de 5 jours à 28°C, les souches gélatinolytiques sont transférées sur du milieu Tryptic Soy Agar (TSA, Biomérieux) pour être soumises à d'autres tests classiques : coloration de Gram, hydrolyse de l'esculine (Annexe n°1), recherche d'une cytochrome oxydase et d'une phosphatase acide.

L'absence de cytochrome oxydase est mise en évidence par l'action de tétraméthyl-p-phénylène diamine (réactif Ox Api, Biomérieux). La réaction positive d'une souche de référence, Pseudomonas fluorescens Cip5690, est utilisée comme témoin positif.

La phosphatase acide est recherchée à l'aide d'un kit Biomérieux, avec du phénylphosphate disodique comme substrat.

L'ultime étape de l'identification est l'utilisation de galeries API 20NE (Biomérieux) pour toutes les souches précédemment retenues. Le plus souvent, ce n'est qu'une confirmation.

### C. - Conservation des souches

Toutes les 2 à 3 semaines, les souches sont réensemencées sur le milieu TSA. Le milieu GYCA (Annexe n°1) a ensuite été adopté puisqu'il permet d'espacer les réensemencements (jusqu'à 2 mois). Enfin, pour une conservation à long terme, les souches sont congelées en milieu glycéroiné selon la technique de QUADLING (1960).

## II. - CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES SOUCHES

### A. - Caractères biochimiques

#### 1 - Tests d'identification et galeries API 20NE

Les souches de la collection (Xanthomonas maltophilia et souches apparentées), autres que les bactéries rhizosphériques isolées par nos soins, sont soumises aux mêmes tests de sélection.

## 2 - Utilisation de galeries API ZYM (Biomérieux)

Ces systèmes d'identification standardisés et commercialisés rassemblent 19 activités enzymatiques évaluées par colorimétrie selon le protocole donné par le fournisseur.

L'utilisation de ces galeries présente ici plus un intérêt qualitatif que quantitatif. Elle ne vise pas à atteindre la précision de dosages spectrophotométriques mais permet simplement la détection des activités enzymatiques d'une suspension bactérienne, selon les réponses notées 1 ou 0 ou F dans le cas de réactions faiblement positives (graduations 1, 2 et 3 du fournisseur).

## 3 - Autres activités enzymatiques

### a) Mise en évidence d'une catalase

La catalase est détectée en déposant, sans agitation, 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée à 30 % dans un tube contenant des bactéries en suspension dans de l'eau physiologique stérile.

Une technique plus sensible a été utilisée pour quelques souches ne donnant pas une réponse très nette à cette première expérience. Elle consiste à disperser des bactéries, provenant directement d'un milieu gélosé incliné, dans une goutte d'eau oxygénée brute déposée sur une lame de verre propre. Pour les souches donnant un dégagement de bulles, seulement dans cette condition, la réponse est notée faiblement positive.

### b) Présence d'une élastase

L'activité élastasique des souches est recherchée selon la méthode de O'BRIEN et DAVIS (1982) modifiée.

De l'élastine Congo red (Sigma) est mise en suspension (0,25 %) dans du tampon Tris-HCl 0,05 M - pH 7 additionné d'agar (15 g/l). Le milieu gélosé de couleur rouge est réparti en boîtes de Pétri. Les bactéries

déposées ponctuellement, se développant par dégradation de l'élastine, sont repérées facilement par une décoloration du milieu alentour. Les réponses sont notées 1 lorsque celle-ci apparaît au bout de 4 jours d'incubation, F, après 6 jours et 0 lorsqu'elle n'apparaît pas.

### c) Activité tributyrinase

Le milieu de SIERRA (1957), qui contient du Tween, est couramment utilisé pour analyser les capacités lipolytiques des bactéries. Toutefois, le Tween 80 est un substrat spécifique des estérases. L'utilisation d'un autre substrat tel que la tributyrine présente un avantage par rapport aux Tweens puisque ce composé n'est pas un substrat synthétique et est très sélectif. Sous l'effet d'une lipase, ce substrat insoluble se dégrade en glycérol et en acide butyrique.

Le protocole opératoire de cette expérience s'inspire de celui préconisé par O'BRIEN et DAVIS (1982). 10 ml de tributyrine sont ajoutés à 1 l de milieu TSA contenant 1 g d'extrait de levure. Le mélange est émulsionné à l'aide d'un homogénéiseur. Le milieu, d'apparence trouble, est ensuite autoclavé 120°C durant 20 min, puis réparti en boîtes de Pétri. Les souches bactériennes jeunes sont déposées ponctuellement à la surface de la gélose. Après une incubation de 7 jours à 28°C, une clarification du milieu apparaît autour de l'inoculum si l'enzyme est présente. Cette clarification s'accompagne d'une acidification due à la formation d'acide tributyrrique, qui peut être mise en évidence de surcroît par l'adjonction de 4 ml/l de bleu de bromothymol à 2 % dans le milieu avant autoclavage.

### d) Hydrolyse de l'albumine

Cette activité est recherchée selon la technique d'O'BRIEN et DAVIS (1982) modifiée.

De la sérum albumine bovine stérile (BSA, Sigma) est incorporée, à l'aide d'une seringue, à un milieu minéral stérile (pH 6,5) contenant (en g/l) :  $K_2HPO_4$  : 1 ;  $NH_4H_2PO_4$  : 1 ; NaCl : 5 ; magnésium sulfate : 0,1 ; agar : 16, de façon à avoir une concentration finale de BSA de

1 %. Ce milieu est réparti en boîtes de Pétri. L'hydrolyse de l'albumine permet, après 7 jours d'incubation à 28°C, une bonne croissance des colonies déposées ponctuellement en surface. Une solution d'acide trichloracétique (TCA 10 %) est alors déposée à la surface de la gélose. Lorsque l'albumine a été utilisée par la bactérie, un halo translucide est visible aux alentours, contrastant avec le reste du milieu devenu opaque. Une évaluation quantitative est pratiquée en mesurant la taille de la colonie et le diamètre de l'auréole. La réponse est notée 1 lorsque ces deux mesures sont supérieures à 1 cm, F pour un diamètre inférieur à 0,5 cm et 0 lorsque la colonie n'a pas poussé.

#### e) Hydrolyse de l'arbutine

L'arbutine est un glycoside comme l'esculine. Le protocole expérimental suivi est donc le même, la nature du substrat seule changeant.

#### B. - Exigences en méthionine

L'exigence en L-méthionine est mise en évidence dans le milieu de culture liquide minéral de OWENS et KEDDIE (1969) modifié (Annexe n°1). Afin de noter l'influence qualitative de l'apport en carbone, différents substrats carbonés ont été utilisés : le maltose, le glucose, l'acétate de sodium et le succinate de sodium. Le substrat carboné est stérilisé par filtration et introduit dans le milieu minéral autoclavé, pour obtenir une concentration finale de 0,2 %. Réparti en tubes neufs stériles, rincés au préalable à l'eau distillée, le milieu est inoculé par des bactéries en croissance sur milieu gélosé, mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile (une goutte distribuée à l'aide d'une pipette Pasteur). Les tubes qui présentent un trouble après 7 jours d'incubation à 28°C indiquent une non-exigence en méthionine des souches. Cette expérience est effectuée en double exemplaire et est interprétée par rapport à des cultures témoins renfermant le même milieu additionné de 20 mg/l de méthionine avant autoclavage.

### C. - Utilisation d'un milieu sélectif de *Xanthomonas maltophilia* (XMSM)

Les souches de la collection sont ensemencées sur le milieu XMSM (JUHNKE et DESJARDIN, 1989) composé de : 10 g/l de maltose, 5 g/l de tryptone, 15 g/l d'agar et de 4 ml d'une solution aqueuse à 2 % de bleu de bromothymol. Son pH est ajusté à 7,1 après autoclavage avec de la soude 1 N autoclavée séparément, ce qui lui donne une couleur verte. Les antibiotiques suivants sont ajoutés au milieu gélosé avant refroidissement :

- cycloheximide	(antifongique) .....	100 µg/ml
- nystatine	" .....	50 µg/ml
- bacitracine	(anti-Gram $\theta$ ) .....	25 µg/ml
- pénicilline G	" .....	25 µg/ml
- céphalexine	(anti-Gram $\theta$ autres que <u><i>Xanthomonas maltophilia</i></u> ) .....	50 µg/ml
- novobiocine	" .....	10 µg/ml
- néomycine sulfate	" .....	30 µg/ml
- tobramycine	" .....	1 µg/ml

Les souches *X. maltophilia* se développent bien sur ce milieu sous forme de colonies oranges ou jaunes, circulaires et convexes, entourées ou non par un halo jaune indiquant une acidification produite par la dégradation du maltose. Un tel aspect des colonies apparaît nettement au bout de 48 h.

Ce milieu, ainsi décrit, a été largement utilisé. Toutefois, une modification portant essentiellement sur la source protéique [tryptone remplacé par de l'extrait de levure (1 g/l) XML ou par de la méthionine (50 mg/l) XMM] a permis l'obtention systématique d'une acidification environnante rendant la lecture plus certaine.

### D. - Analyse numérique de caractères phénotypiques

La comparaison des souches a été réalisée à l'aide de classifications automatiques suivant la procédure de classification ascendante

hiérarchique (C.A.H.). L'indice de ressemblance utilisé est l'indice de SOKAL et MICHENER (1958) ("Simple Matching Coefficient") modifié en vue de tenir compte non seulement des réactions positives et négatives (+ ou -) mais aussi des réactions "imparfaites" ("plutôt +").

En codant "0" la réaction négative et "1" la réaction positive, on calcule la ressemblance entre deux souches  $i$  et  $j$ , sur la base de  $n$  tests, à l'aide de l'expression :

$$S_{i,j} = (a + b)/n$$

où  $a$  est le nombre de tests pour lesquels la réaction est positive à la fois pour  $i$  et  $j$ ,  $b$  le nombre de réactions négatives à la fois pour  $i$  et  $j$ , et  $n$  le nombre total de tests pratiqués.

Dans notre étude, nous avons voulu attribuer une valeur particulière aux réactions positives peu franches. La valeur 0.75 a été retenue. Un test codé "0.75" ressemble donc plus à un test positif qu'à un test négatif.

Pour utiliser ce codage flou, il est nécessaire que les valeurs attribuées aux tests (à savoir 0, 1 et 0.75) ne soient plus de simples codes mais deviennent des valeurs numériques. Il faut donc dériver l'indice qualitatif de SOKAL et MICHENER à partir d'un indice quantitatif.

Or, si l'on considère la distance euclidienne (au carré) entre deux individus  $i$  et  $j$  comparés sur  $n$  variables quantitatives, on a :

$$D_{i,j} = 1/n \sum_{k=1}^n (x_{i,k} - x_{j,k})^2$$

La ressemblance est la notion complémentaire de la distance et peut donc être donnée par :

$$S_{i,j} = 1 - (D_{i,j})^2$$

Puisque les valeurs  $x_{i,k}$  et  $x_{j,k}$  ne peuvent prendre que les valeurs 0 et 1, le calcul de  $S_{i,j}$  par cette méthode aboutit au même résultat qu'avec la méthode qualitative originale :

$$S_{i,j} = 1 - (D_{i,j})^2 + (a + d)/n$$

L'intérêt de la nouvelle formulation est de pouvoir intégrer des valeurs intermédiaires entre 0 et 1, tel que le 0.75 défini ci-dessus. Du point de vue mathématique, cet indice est un indice dit "flou".

Soit donc un ensemble de  $n$  souches, on calcule pour tout couple  $(i,j)$  l'indice modifié "flou" de SOKAL et MICHENER et on obtient un tableau carré symétrique (car  $S_{i,j} = S_{j,i}$ ) de ressemblances entre souches. La CAH procède alors au regroupement progressif des souches ayant la plus forte ressemblance. La fusion de 2 souches en un groupe (noeud sur l'arbre de classification ou dendogramme) est réalisée à l'aide de l'algorithme du point moyen, qui consiste à donner au groupe  $(i + j)$  nouvellement formé, comme ressemblance par rapport à une autre souche  $l$ , la ressemblance moyenne  $(S_{i,l} + S_{j,l})/2$  (voir par exemple LEGENDRE et LEGENDRE, 1984).

### III. - CARACTERISATION DES ESTERASES BACTERIENNES

#### A. - Extraction et solubilisation

##### 1 - Conditions de culture

Les bactéries sont cultivées dans des fioles Erlenmeyer de 1 litre contenant 200 ml d'un milieu composé de 20 g de TSB (Tryptic Soy Broth, Biomérieux) et de 1,5 g d'extrait de levure (Difco) dans 1 l d'eau distillée (pH 7,4). Après autoclavage, les fioles sontensemencées avec 10 ml d'une culture bactérienne de 18 h réalisée dans le même milieu. La culture est incubée à 28°C sans agitation et arrêtée après 2 à 3 jours d'incubation.

## 2 - Extraction et solubilisation de l'estérase

L'extraction enzymatique est réalisée d'après le protocole utilisé par DEBETTE et PRENSIER (1989) (Annexe n°2).

La suspension bactérienne est recueillie par centrifugation 30 min à 4 000 g (centrifugeuse Beckman 21000). Le culot est lavé avec du tampon Tris HCl 0,05 M (pH 8) et les cellules sont remises en suspension dans 20 ml du même tampon contenant en plus du saccharose 0,04 M. La suspension bactérienne est ensuite plongée dans de la glace et soniquée sur un sonicateur Branson B30 (puissance : 350 W, fréquence : 50 kHz) pendant 6 min. Une rapide centrifugation (5 000 g - 15 min) permet de laisser de côté les cellules restées intactes. Une ultracentrifugation de 35 000 g - 45 min récupère la "fraction membranaire brute", c'est-à-dire les enveloppes cellulaires qui sont remises en suspension dans le même tampon. Le surnageant contient l'ensemble du contenu cellulaire (cytoplasme, organites, ...) et des protéines de surface de la membrane qui ont été libérées lors de la sonication. Ces protéines sont précipitées avec du sulfate d'ammonium saturé à 50 %, recueillies par une centrifugation à 8 000 g durant 30 min et remises en suspension dans le tampon. Elles constituent "l'extrait soluble"  $S_3$  que nous utiliserons pour les analyses électrophorétiques.

La fraction membranaire brute est reprise dans une quantité infime (1 ml) de tampon contenant 1 % de  $MgCl_2$  et 2 % de Triton X-100, laissée au repos 30 min à 4°C et ultracentrifugée (35 000 g - 45 min) deux fois de suite. Le surnageant constitue l'"extrait  $Mg^{2+}$ -Triton". Les enveloppes cellulaires sont reprises dans 1 ml de tampon + EDTA 2,5 mM et 2 % de Triton X-100 et centrifugées deux fois comme précédemment. Le surnageant constitue l'"extrait EDTA-Triton".

Ce protocole diffère légèrement de celui utilisé par DEBETTE et PRENSIER (1989). Les cellules sont cassées par sonication plutôt qu'à la presse de French pour des raisons matérielles.

### 3 - Dosage d'activité estérasique in vitro

L'activité estérasique est dosée sur tous les extraits récupérés au cours de l'extraction. Ce dosage est effectué selon le protocole de BREUIL et KUSHNER (1975) (Annexe n°3).

### 4 - Dosage en protéines des échantillons

La teneur en protéines des extraits solubles est mesurée par la méthode de PETERSON (1977) (Annexe n°4).

#### B. - Analyse électrophorétique en conditions non dénaturantes

La séparation des protéines des extraits solubles est réalisée sur un support de polyacrylamide afin de révéler les activités estérasiques dans les gels.

#### 1 - Préparation du gel de séparation en gradient

Le gel en gradient est réalisé à partir de deux gels de concentrations différentes en acrylamide préparés avec les solutions suivantes :

gel le plus concentré  
(8 % d'acrylamide)

gel le moins concentré  
(4 % d'acrylamide)

5 ml	Tampon Tris-HCl 3 M (pH 8,9)	5 ml
6 ml	Acryl- 28 % et Bis-Acrylamide 0,73 %	3 ml
4 ml	H <sub>2</sub> O	12 ml
5 ml	Glycérol	0 ml
300 µl	Triton (10 %)	300 µl
10 µl	Temed	10 µl
80 µl	Persulfate d'ammonium (10 %)	100 µl

Le mélange des deux solutions est réalisé progressivement dans un système à double réservoir actionné par une pompe péristaltique puis versé directement entre deux plaques de verre verticales (Biorad), séparées par des espaceurs de 1,5 millimètres d'épaisseur.

Nous obtenons ainsi un gel de séparation en gradient linéaire de 4 à 8 % d'acrylamide. Les gels sont laissés en polymérisation durant la nuit.

## 2 - Confection du gel de concentration

Ce gel est composé de :

- 2 ml de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,7),
- 4 ml d'Acryl- 10 % et de Bis-Acrylamide 2,5 %,
- 4 ml de saccharose à 12,5 %,
- 200 µl de Triton à 10 %,
- 25 µl de persulfate d'ammonium 16,5 %,
- 15 µl de Temed.

Un peigne est placé entre les 2 plaques avant de couler le gel afin de réaliser les logettes dans lesquelles sont effectués les dépôts. Lorsque celui-ci est polymérisé, le peigne est enlevé.

## 3 - Préparation et dépôt des échantillons

Les extraits solubles sont dilués dans du tampon Tris-HCl 0,05 M - pH 8. Cette dilution est réalisée en fonction de la mesure d'activité estérasique effectuée au préalable sur chaque extrait. 20 µl d'un mélange Triton X-100 et désoxycholate (3 vol./1 vol.) sont ajoutés afin d'améliorer la solubilisation de l'estérase. 25 µl d'une solution de bleu de bromophénol (10 mg/ml dans du saccharose à 20 %) sont également incorporés à 100 µl d'échantillon.

Les logettes sont rincées avec le tampon de migration (6 g/l Tris + 28,8 g/l glycolle) pH 8,3 qui est dilué extemporanément au 1/10ème.

Des fractions de 20 à 50 µl des échantillons y sont déposées à l'aide d'une seringue Hamilton, après avoir été soigneusement agités au Vortex.

La migration se déroule en chambre froide durant 16 h à 140 V.

### C. - Isoélectrofocalisation

Cette technique consiste à réaliser une électrophorèse de protéines dans un gradient de pH établi à l'aide d'électrolytes appropriés. La migration des protéines s'effectue selon leur charge initiale vers l'une ou l'autre électrode jusqu'à une zone où cette charge devient nulle. Cette zone correspond au point isoélectrique.

Les extraits "EDTA-Triton", obtenus à la fin du protocole d'extraction de l'estérase, sont soumis à la technique de focalisation électrique en présence d'une gamme d'ampholines 3-10 (Serva), selon la méthode de O'FARREL (1975) modifiée, dans un système vertical à tubes capillaires (Biorad) de 14,2 cm de haut (diamètre intérieur de 2 à 2,5 mm).

Le gel d'isoélectrofocalisation (IEF) est préparé dans une fiole à vide, de la manière suivante :

- 8,25 g d'urée,
- 1,99 ml d'une solution d'Acryl- 28,8 % et de Bis-Acrylamide 1,62 % (p/V),
- 3,00 ml de Nonidet-P-40 (NP 40) à 10 %,
- 2,96 ml d'eau distillée,
- 0,75 ml d'ampholines 3-10 (prélevées stérilement).

L'ensemble est dissous au bain-marie à 37°C sous agitation, dégazé durant 1/4 d'heure environ puis filtré sur unité de filtration Swinnex 0,45 µm. Deux catalyseurs sont ajoutés ensuite : le persulfate d'ammonium à 10 % (15 µl) et le Temed (10 µl).

Après une bonne homogénéisation, le gel d'IEF est coulé à l'aide d'une seringue surmontée d'un tube en Téflon, dans les tubes capillaires. Il est recouvert jusqu'en haut des tubes par une solution d'urée 8 M (préparée au préalable et conservée au congélateur par aliquotes de 1 ml).

Après 3 h environ, le gel a polymérisé. L'urée est alors remplacée par 20 µl d'une solution contenant : urée 9,5 M ; NP 40 2 % ; 2 %

d'ampholines + 5 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol, au-dessus de laquelle est ajoutée de l'eau distillée jusqu'au sommet des tubes.

Ces derniers sont placés sur un portoir circulaire provenant de l'appareil Biorad qui contient deux compartiments. Le compartiment inférieur (pôle +) est rempli d'acide orthophosphorique 0,05 N alors que le supérieur (pôle -) contient une solution de soude 0,1 N dégazée au préalable pendant au moins 2 h.

Le gradient de pH est réalisé par une mise sous tension à 200 V pendant 1/4 d'heure, à 300 V durant 1/2 h et à 400 V durant 1/2 h.

Les échantillons sont dilués au 1/10ème dans une solution de la composition suivante : 5,97 g d'urée ; 4 ml de NP 40 à 10 % ; 0,5 ml d'ampholines et 1,12 ml d'eau. 20  $\mu$ l sont déposés au-dessus du gel après avoir pris soin d'enlever la solution précédente.

Le dessus du dépôt est protégé de la soude par 10  $\mu$ l d'une solution d'urée 9 M contenant 1 % d'ampholines. Les deux compartiments de la cuve sont remplis de nouveau.

Les protéines sont focalisées à un voltage constant de 480 V durant 15 h puis 800 V pendant 1 h, à 28°C pour éviter la cristallisation de l'urée dans les gels. Ceux-ci sont ensuite démoulés, rincés à l'eau distillée puis soumis à la révélation des activités estérasiques.

Des gels n'ayant reçu aucun échantillon sont utilisés pour mesurer le gradient de pH. Ils sont coupés en rondelles de 2 mm et deux rondelles consécutives sont à chaque fois placées dans 1 ml d'eau préalablement dégazée pendant 2 h. Le pH est ensuite mesuré afin de faire une relation entre la longueur du gel et la valeur du pH.

#### D. - Révélation des activités estérasiques dans les gels : utilisation de 5 substrats synthétiques

Les activités estérasiques sont révélées sur 5 substrats :  $\alpha$  et  $\beta$ -naphthyl acétate,  $\alpha$  et  $\beta$ -naphthyl butyrate et indoxyl acétate selon

les techniques de LAWRENCE et coll. (1960), URIEL (1961), EL-SHARKAWY et HUISINGH (1971) et GOULLET (1980) (Annexe n°5).

#### IV. - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITIONS DENATURANTES (SDS-PAGE)

Une telle électrophorèse permet de révéler l'éventuelle structure multimérique d'une protéine.

##### A. - Préparation des gels

\* Composition du gel de séparation :

- 8,0 ml de Tris-HCl 1,5 M - pH 8,9,
- 16,0 ml d'une solution contenant 20 % d'acrylamide, 0,5 % de bis-acrylamide et 0,2 % de SDS,
- 9,2  $\mu$ l de Temed.

\* Composition du gel de concentration :

- 4,0 ml de Tris-HCl 0,5 M - pH 6,8,
- 4,0 ml d'une solution contenant 12 % d'acrylamide, 0,3 % de bis-acrylamide et 0,4 % de SDS,
- 4,0 ml d'H<sub>2</sub>O,
- 4,0 ml de persulfate d'ammonium 0,6 %,
- 9,2  $\mu$ l de Temed.

##### B. - Préparation des échantillons

Les cellules bactériennes sont mises en culture dans le milieu liquide TSB à 28°C.

Un aliquote (1 ml) est prélevé lorsque la densité optique à 580 nm est voisine de 0,15. Les échantillons sont alors centrifugés 30 min à 300 g. Le surnageant est mis de côté tandis que le culot est lavé avec du tampon PBS et recentrifugé. Les nouveaux culots sont incubés durant

30 min à 37°C dans une solution de lysozyme (1 mg/ml) puis mis à ébullition 10 min dans 50 µl d'un tampon contenant : 2,5 % de Sodium Dodécyl Sulfate, 0,125 M de β -mercaptoéthanol, 150 mM de Tris-HCl 0,5 M à pH 8,8, 4 mM de EDTA, 0,75 M de saccharose et 0,075 % de bleu de bromophénol. Après refroidissement dans la glace, 7 µl de iodoacétamide 0,5 M sont ajoutés à l'échantillon. Les dépôts peuvent alors être effectués.

La migration se déroule sous un voltage constant de 200 V pendant 4 h dans un tampon (30 g/l de Tris + 144 g de glycolle) à pH 8,3, dilué extemporanément au 1/10ème et additionné de 1 g/l de SDS.

### C. - Révélation des protéines au bleu de Coomassie

Les protéines sont fixées et colorées en immergeant le gel 30 min dans une solution de bleu de Coomassie à 0,1 %, préparée dans un mélange de méthanol-acide acétique-eau (50-10-40). La décoloration est effectuée ensuite avec un mélange méthanol-acide acétique-eau (25-10-65).

## V. - RECHERCHE DE XANTHOMONAS MALTOPHILIA AU COURS D'UN CYCLE DE VEGETATION DE BLE D'HIVER

Divers échantillonnages de terre rhizosphérique sont réalisés à différents moments du cycle de végétation d'un Blé d'hiver (variété anglaise HERWARD), cultivé en champs dans la région d'Orchies (semis des Ets FLORIMOND-DESPREZ).

La terre adhérente aux racines et les échantillons appartenant au rhizoplan sont obtenus par le mode opératoire indiqué précédemment (page 35).

La microflore de l'endorhizosphère est recherchée de la manière suivante : les racines de quelques plants, après avoir été débarrassées de la terre adhérente par simple agitation, sont lavées dans de l'eau physiologique stérile. Elles sont ensuite stérilisées superficiellement par un trempage de 15 secondes dans de l'eau oxygénée à 10 % (VAN PEER

et SCHIPPERS, 1988), puis abondamment rincées avec de l'eau distillée stérile en plusieurs fois, avant d'être coupées en segments de quelques millimètres. Ceux-ci sont homogénéisés 10 min à vitesse réduite puis 1 min à vitesse maximale (homogénéiseur Virtis) dans 90 ml d'eau physiologique stérile.

Les suspensions-dilutions successives sont réalisées à partir de cette préparation qui constitue la première dilution.

Pour permettre une certaine comparaison entre les populations de la rhizosphère, du rhizoplan et de l'endorhizosphère, on fait en sorte de prendre à chaque fois le même nombre de plantules. Pour chaque échantillon, le pH de la décoction est mesuré. Les parties aériennes des plantules utilisées sont pesées. Les fragments de racines sont récupérés sur un filtre en papier et séchés à l'étuve pour en évaluer le poids sec.

Les numérations bactériennes sont faites après étalement sur le milieu de SIERRA (1957) (Annexe n°1).

La méthode d'identification, indiquée précédemment (page 49), est appliquée pour la recherche de Xanthomonas maltophilia afin d'en évaluer l'importance numérique.

## VI. - CULTURES EN SERRE

### A. - Préparation des terrines de terre

Des terrines (50 x 25 cm) de 10 cm de hauteur sont remplies jusqu'à mi-hauteur avec de la terre de jardin passée dans un tamis de mailles de 1 cm recouverte de terre tamisée plus finement (mailles < 0,5 cm) pour la partie supérieure.

La terre est laissée en stabilisation durant une semaine, recouverte d'un papier filtre pour limiter l'évaporation.

Certaines terrines sont ensuite ensemencées avec des semences de Blé de Printemps, variété WIM (fourni par les Ets DESPREZ, Orchies), de Chicorée de Bruxelles, variété BEA (Ets HOQUET, Cambrai), de Colza dénaturé fourni en vrac par une graineterie et de Chou de Milan d'Aubervilliers, race Amor (graines Caillard), après avoir subi au préalable différents traitements.

## **B. - Traitements réalisés sur les semences**

Toutes les semences sont préalablement trempées dans de l'eau stérile.

### **1 - Stérilisation**

Les semences de Blé sont trempées 30 secondes dans de l'alcool absolu avec un peu d'eau, puis rincées abondamment avec de l'eau stérile. Un deuxième trempage de 20 min est réalisé dans une solution d'hypochlorite de calcium (40 g/l) préparée extemporanément, filtrée puis additionnée d'une goutte de Tween 80. Les graines sont ensuite rincées plusieurs fois avec de l'eau stérile.

Les semences de Chicorée, de Colza et de Chou sont stérilisées en surface par un trempage de 2 min dans du chlorure mercurique à 0,1 % dans un mélange alcool-eau (50-50) (VAN OUTRYVE et coll., 1988b). Elles sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile.

### **2 - Bactérisation**

#### **a) Préparation de la suspension bactérienne de *Xanthomonas maltophilia* C17**

La souche C17 est mise en culture sous agitation dans 500 ml du milieu de OWENS et KEDDIE (1969) modifié, additionné de méthionine (20 mg/l) et de glucose (2 g/l).

Après 72 h de culture, la culture bactérienne [qui est en phase stationnaire de croissance ( $DO_{580\text{ nm}}$  environ 0,6)] est centrifugée à 8 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot bactérien est remis en

suspension dans 50 ml d'eau distillée stérile puis divisé en 2 lots de volumes égaux dont l'un est autoclavé 30 min à 110°C.

### b) Bactérisation

Les semences, simplement humidifiées d'une part et les semences stérilisées en surface d'autre part, sont immergées dans la suspension bactérienne et laissées en douce agitation pendant 2 h à 10°C. Les lots témoins sont constitués de semences qui ont subi le même traitement à l'exception du fait que la suspension bactérienne a été au préalable autoclavée (DE FREITAS et GERMIDA, 1990).

### C. - Ensemencement

Les semences, différemment traitées, sont séchées entre des feuilles de papier filtre stériles et réparties à la surface des terrines de terre. Dans chaque série expérimentale, une terrine est laissée vierge afin de constituer le témoin "terre sans végétation".

Les surfaces des terrines ainsiensemencées sont ensuite recouvertes d'une feuille de papier filtre humidifiée jusqu'aux premiers stades de la germination. Elles sont alors découvertes puis des graviers de quartz (de type aquarium), préalablement stérilisés, y sont répartis afin de limiter l'évaporation.

Traitements des semences	Symboles utilisés			
	Blé	Chicorée	Colza	Chou
- Semences non traitées	B	E	Co	Ch
- Semences "bactérisées" par <u>X. maltophilia</u> C17	Bb	Eb	Cob	Chb
- Semences traitées par des bactéries (C17) autoclavées	Ba	Ea	Coa	Cha
- Semences stérilisées et "bactérisées"	Bsb	Esb	Cosb	Chsb
- Semences stérilisées et traitées par des bactéries (C17) autoclavées	Bsa	Esa	Cosa	Chsa
- Terre sans végétation	Te1	Te2	Te3	Te4

Conditions expérimentales pour chaque espèce végétale

#### D. - Prélèvements et numérations bactériennes

Après quelques semaines de culture (la durée sera précisée ultérieurement), les prélèvements sont effectués de manière à avoir des échantillons de rhizosphère proche, du rhizoplan et de l'endorhizosphère. Les numérations bactériennes sont réalisées par des étalements des suspensions-dilutions en eau physiologique stérile sur le milieu TSA.

#### E. - Utilisation de milieux sélectifs

- \* Milieu "XMSM" (Xanthomonas maltophilia Selective Medium, JUHNKE et DESJARDIN, 1989) (page 54).
- \* Milieu "FPSM" (Fluorescent Pseudomonas Selective Medium) ou milieu S<sub>1</sub> de GOULD et coll. (1985) (Annexe n° 6).

200 colonies sont prélevées au hasard parmi celles qui se développent de manière bien isolée sur le milieu TSA et sont repiquées sur "XMSM" et 140 d'entre elles sur "FPSM".

Le dénombrement des X. maltophilia se fait après 3 jours de culture sur XMSM et celui de Pseudomonas fluorescents après 5 à 6 jours de culture sur FPSM : colonies émettant un pigment fluorescent sous irradiation UV.

#### F. - Repérage des bactéries "in situ" par immunofluorescence

Ce travail a été réalisé par Christian SLOMIANNY à l'INSERM-U42.

Les racines sont fixées dans un mélange de paraformaldéhyde à 4 % et de glutaraldéhyde à 0,1 % dans du tampon phosphate sodique (PBS : tampon phosphate 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) pendant 30 min à 4°C. Elles sont ensuite incubées avec des IgG anti-estérase de C17 (préparation décrite par DEBETTE, 1987 et DEBETTE et PRENSIER, 1989) dilués au 1/100 dans du tampon PBS pendant 1 h à 37°C, en chambre humide. Les racines sont ensuite soigneusement lavées plusieurs fois avec du tampon PBS, puis

sont mises en contact avec des anticorps de chèvre anti-lapin marqués au FITC (fluorescéine isothiocyanate), préalablement dilués au 1/100 dans du tampon PBS. Après une incubation de 30 min à 37°C en chambre humide, les racines sont lavées plusieurs fois dans du tampon PBS et sont montées dans du lymphoprep. Les racines sont observées au microscope à fluorescence (Axiophot, ZEISS). Les témoins correspondent à des racines ne recevant pas d'IgG anti-estérase de C17.

## VII. - ETUDE DE LA SPERMOSPHERE DE QUELQUES SEMENCES

### A. - Préparation des semences brutes

Les semences des mêmes espèces végétales que précédemment (Blé, Chicorée de Bruxelles, Colza) ont été utilisées afin de rechercher le pourcentage de X. maltophilia au sein de la spermosphère, en référence aux travaux de VAN OUTRYVE et coll. (1988b) sur la Chicorée de Bruxelles.

Dans chacun des cas, les semences (1 g) sont mises en suspension et agitation pendant 30 min à 28°C dans du liquide de Ringer dilué au quart, pH 7, stérile, additionné de 0,025 % de Tween 20 stérile. A partir de ce milieu d'incubation, des dilutions au tiers sont réalisées avec de l'eau physiologique stérile, puis des étalements sur du milieu TSA dilué au 1/10 additionné de cycloheximide (Sigma) à 0,1 % empêchant le développement des Champignons. Ce milieu permet de faire les numérations bactériennes totales et de prélever 150 colonies bien individualisées, au hasard, pour les ensemencements sur le milieu sélectif XMSM.

### B. - Semences en germination

Ces semences sont également mises en germination pendant 5 jours sur du milieu gélosé stérile (eau distillée + gélose à 15 g/l), soit à l'état brut après avoir été humidifiées par de l'eau distillée stérile, soit après avoir été sensibilisées dans les mêmes conditions que précédemment à une suspension bactérienne de C17 autoclavée ou non

(page 65). Ces semences en germination sont ensuite plongées dans du liquide de Ringer dilué au quart, stérile et additionné de 0,025 % de Tween 20 pendant 30 min à 28°C en agitation. Les numérations de microflore et de X. maltophilia sont réalisées comme précédemment.

## RESULTATS

## I. - RECHERCHE DE SOUCHES RHIZOSPHERIQUES IDENTIFIEES A XANTHOMONAS MALTOPHILIA

Dans un premier temps, nous avons choisi de rechercher des souches identifiées à X. maltophilia dans la rhizosphère de la Chicorée de Bruxelles, plante qui présente une racine tubérisée. Les différents prélèvements qui ont été effectués dans le Cambrasis, chez HOQUET Graines, sont répertoriés, accompagnés de leurs caractéristiques, dans le tableau 8.

L'identification des X. maltophilia a été menée selon le protocole indiqué p. 49 de Matériel et Méthodes. Remarquons que les échantillons rhizosphériques (terre accrochée aux racines et détachée par agitation) ne nous ont fourni aucun X. maltophilia, tandis que les échantillons en contact étroit avec la surface des racines en présentent toujours, parfois en grande quantité, comme par exemple après conservation du matériel en atmosphère humide et réfrigérée.

Les souches conservées sont en nombre moindre par rapport à celui des souches identifiées car certaines n'ont pas proliféré au cours des repiquages successifs sur milieu TSA. Dans un second temps, nous avons fait la même recherche au sein de la microflore rhizosphérique de Blé, dans la même région, cette Graminée ayant été mise en culture sur la même parcelle de terre que celle qui avait permis le développement de la Chicorée du mois d'octobre. Cette étude a révélé un important dénombrement de X. maltophilia surtout au contact direct des racines (Tab. 8).

## II. - CHOIX DES SOUCHES SAUVAGES ENTRANT DANS LA COLLECTION "LILLE-GAND" PAR COMPARAISON DE PROFILS PROTEIQUES

Toutes les souches figurant sous forme de symboles dans le tableau 8 sont retenues automatiquement pour la collection à l'exception des souches RB. Etant donné leur nombre important, la sélection est réalisée par comparaison des profils électrophorétiques de leurs protéines totales. Une rapide analyse des gels nous a permis de

Plante	Mois de prélèvement et stade de végétation (âge approximatif du semis)	Nature des échantillons	pH de la décoction et (% humidité de la terre environnante)	Numération bactérienne totale (CFU par g d'échantillon)	Nb. de souches lipolytiques prélevées au hasard	Gélatine	Gram	Nb. de <i>X. maltophilia</i> isolés (en % des souches lipolytiques)	Souches conservées numéros et symboles attribués
	Octobre (environ 5 mois)	terre rhizosphérique	7,20 (9,3 %)	$41,5 \times 10^6$	95	20	7	0 (0 %)	-
		rhizoplan plus endorhizosphère	5,60	$70,4 \times 10^6$	113	51	31	15 (13,3 %)	P1 : 1,24,25,34,37,41,44,47
	Novembre (environ 5 mois)	terre rhizosphérique	7,40 (20 %)	$15,1 \times 10^6$	91	27	3	0 (0 %)	-
		rhizoplan plus endorhizosphère	ND	$59,6 \times 10^6$	97	32	7	2 (2,06 %)	P2 : 2
Chicorée de Bruxelles		même matériel après conservation des racines pendant 1 semaine au réfrigérateur dans un sachet plastique	6,15	$69,0 \times 10^7$	120	78	-	20 (16,7 %)	S : 3,50,51,53,61
		radicelles et terreau des bacs de forçage	6,70	$39,0 \times 10^8$	96	32	7	2 (2,08 %)	
		rhizoplan plus endorhizosphère	6,15 (11,6 %)	$69,2 \times 10^6$	80	44	24	3 (3,75 %)	C : 18,41
Blé	Juin en épisaison	rhizoplan	5,70 (11,7 %)	$32,8 \times 10^7$	98	59	27	3 (3,06 %)	B : 5,15,30
		endorhizosphère	6,80	-	89	83	55	32 (36 %)	RB : 3,8,12,14,20,29,30,31,33,37,38,40,41,42,43,44,45,47,49,50,52,54,56,58,60,67,72,75,76,77,82,83

Tableau 8 - Numérations bactériennes totales et présence de *X. maltophilia* dans les différents échantillons rhizosphériques de Chicorée de Bruxelles et de Blé.

distinguer trois types de profils (Photos 1 et 2) et donc de sélectionner 3 souches : RB 42, 52 et 76, appartenant à chacune de ces catégories.

La révélation des protéines au Bleu de Coomassie laisse apparaître dans certains cas de longues traînées dans le gel. Diverses variantes de techniques d'électrophorèse ont été testées afin de résoudre ce problème notamment en remplaçant le bis-acrylamide par de la pipérazine (Biorad) mais toutefois sans atteindre de meilleurs résultats.

De même, parmi les treize souches sauvages d'origine hospitalière, transmises par le Professeur P. GOULLET (Hôpital Beaujon, Paris), cinq ont été choisies après examen des profils électrophorétiques de leurs protéines pour certaines distinctions phénotypiques .

Donc, la collection "Lille-Gand" comprend 52 souches :

- 25 X. maltophilia d'origine rhizosphérique ;
- 11 X. maltophilia d'origine médicale : HA, HB, N, M, E, A, H, O, P1 (cf. Matériel et Méthodes, p. 47) ;
- 16 souches pouvant être apparentées à X. maltophilia (cf. p. 47 : de A1 1 à Pbo).

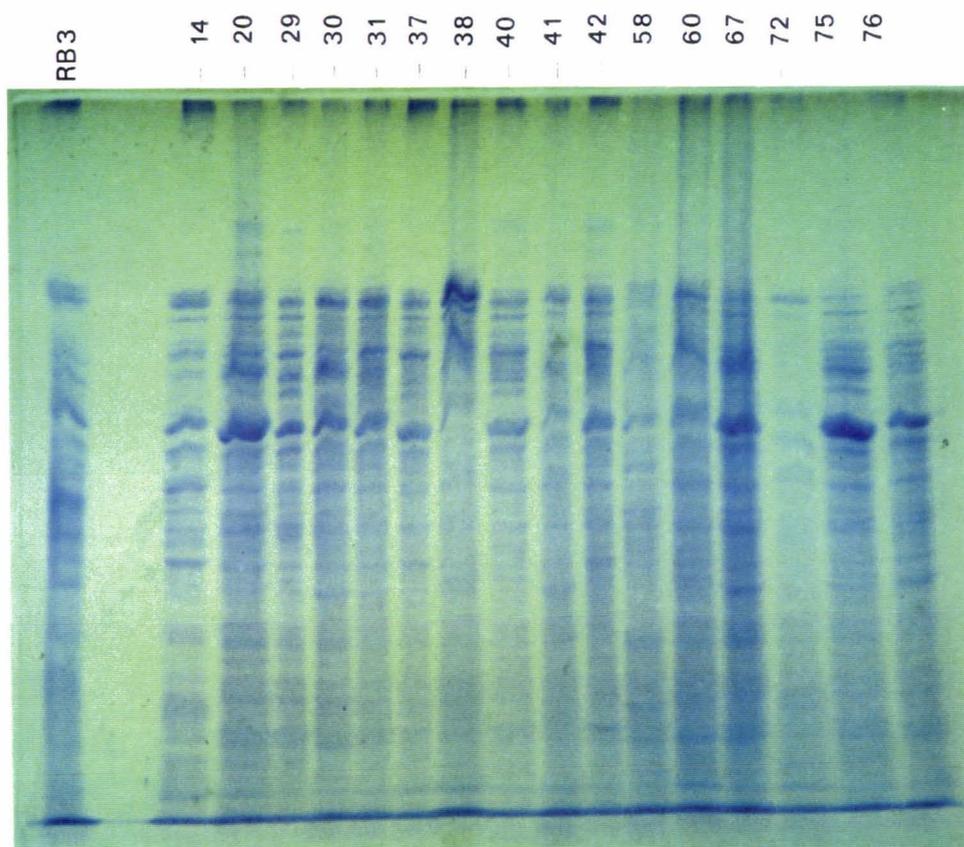
### III. - EXTRACTION ET ANALYSES ELECTROPHORETIQUES DES ESTERASES

#### A. - Solubilisation par action du Triton

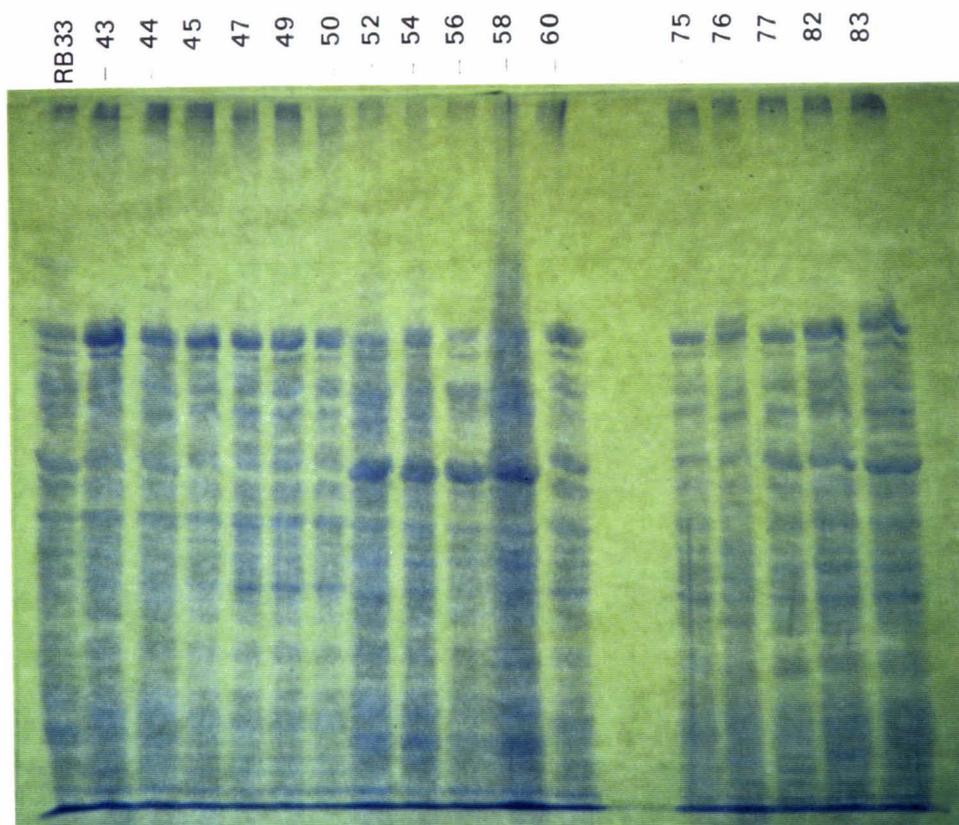
Les différents extraits issus de la fraction membranaire brute sont soumis à l'action du Triton X-100 afin de solubiliser l'estérase. Compte-tenu du fort caractère hydrophobe de cette enzyme, le traitement de l'extrait soluble (S3) par du Triton X-100 associé à du désoxycholate est nécessaire pour permettre la migration de l'enzyme dans le gel.

De plus, l'incorporation du détergent nonionique dans le gel empêche la formation de longues traînées (DEBETTE, 1987). L'activité estérasique

①



②



Photos 1 et 2 -

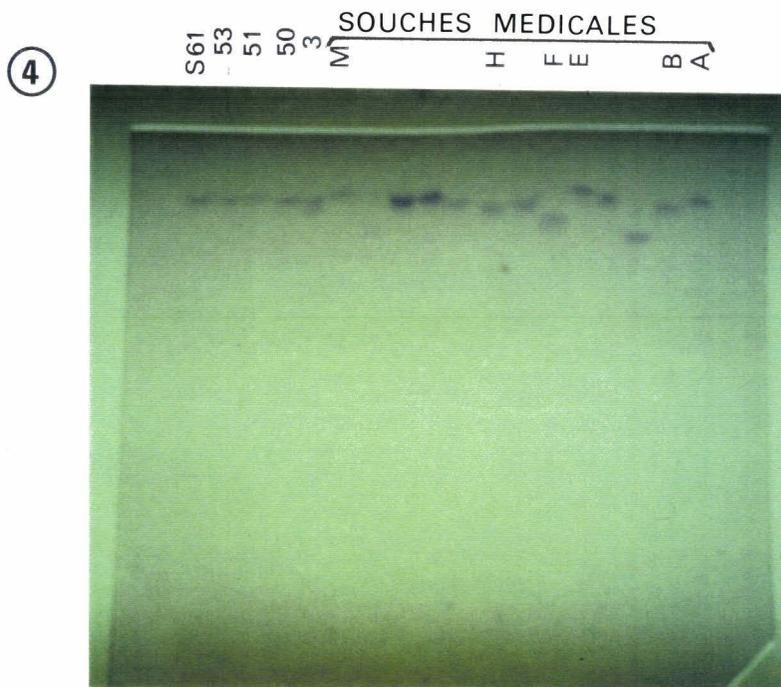
Profils protéiques en SDS-PAGE des souches sauvages de *X. maltophilia* provenant de l'endorhizosphère du Blé en épisaison.

est dosée dans les différents extraits pour chaque souche. Afin d'incorporer dans les logettes d'électrophorèse une quantité d'enzymes ayant une activité équivalente, nous adaptons une dilution éventuelle des échantillons dans du tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8.

#### B. - Evaluation de la distance de migration du complexe estérasique

Les trois types d'extraits ("soluble", " $Mg^{2+}$ -Triton" et "EDTA-Triton") permettent la mise en évidence d'une seule et même bande d'activité intensément colorée en présence de  $\beta$ -naphthyl acétate. Ce résultat confirme celui déjà obtenu par DEBETTE (1987). Cette même estérase hydrolyse aussi les quatre autres substrats :  $\alpha$  et  $\beta$ -naphthyl butyrate,  $\alpha$ -naphthyl acétate et indoxyl acétate. Toutefois, l'intensité de coloration des bandes est moins importante qu'en présence de  $\beta$ -naphthyl acétate. Les photos 3 et 4 témoignent du niveau de migration du complexe estérasique de quelques souches. La distance de migration relative du complexe estérase-Triton de chaque bactérie a été déterminée par rapport à celle du complexe de la souche C17. Un échantillon estérasique de cette souche-type est soumis à migration dans chaque gel afin d'avoir la meilleure reproductibilité possible.

La répartition électrophorétique des estérases de toutes les souches est schématisée dans la figure 4. La mobilité électrophorétique ( $R_f$ ) de l'estérase de C17 est utilisée comme valeur de référence et fixée à 50. La mobilité relative des estérases des autres souches est soit inférieure à 50 dans le cas d'une distance de migration plus faible, soit supérieure dans le cas inverse. La différence entre le  $R_f$  le plus fort (souche Pbo) et le  $R_f$  le plus faible (souche HA) est de 52. Le hasard fait que le niveau de migration de l'estérase de C17 est proche de la valeur moyenne. Les estérases de 31 souches migrent moins loin que celle de C17, 12 plus loin et 8 au même niveau, notamment Ph (*Pseudomonas hibiscicola*) et Pb (*Pseudomonas betle*). Les estérases des souches des séries rhizosphériques P1 et S et celles du genre *Alcaligenes* se retrouvent à des niveaux de migration très voisins. Les mobilités électrophorétiques des estérases des souches médicales sont elles beaucoup plus variables. Les souches dont la mobilité estérasique



Electrophorèse sur gel de polyacrylamide - Activité estérasique sur le  $\beta$ -naphthyl acétate des extraits dits "solubles" S3 des :

Photo 3 - souches apparentées ou supposées apparentées à X. maltophilia

Photo 4 - souches d'origine médicale et des souches (S) provenant de la rhizosphère de Chicorée de Bruxelles.

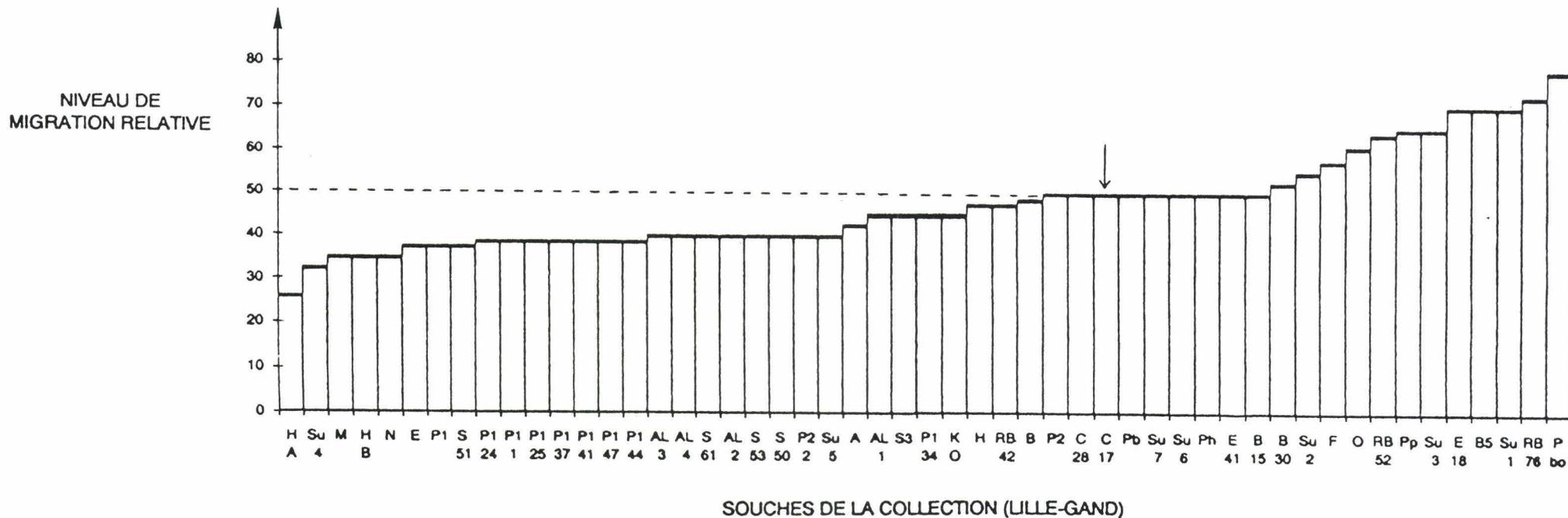


Figure 4 - Mobilité électrophorétique relative des complexes estérasiques des souches de la collection "Lille-Gand".

est supérieure à 50 n'appartiennent pas à une catégorie précise, mais sont de différentes origines.

### C. - Evaluation du point isoélectrique des complexes estérasi- siques

Les extraits dits "solubles" (S3) ont été analysés par isoélectrofocalisation dans un gradient de pH 3-10. Etant donné l'absence de résultats pour certains extraits, probablement parce que l'activité estérasiqye y est trop faible, l'analyse des échantillons "EDTA-Triton" (S7) a été entreprise, ces extraits présentant une activité estérasiqye égale et parfois même supérieure à celle des extraits solubles (S3).

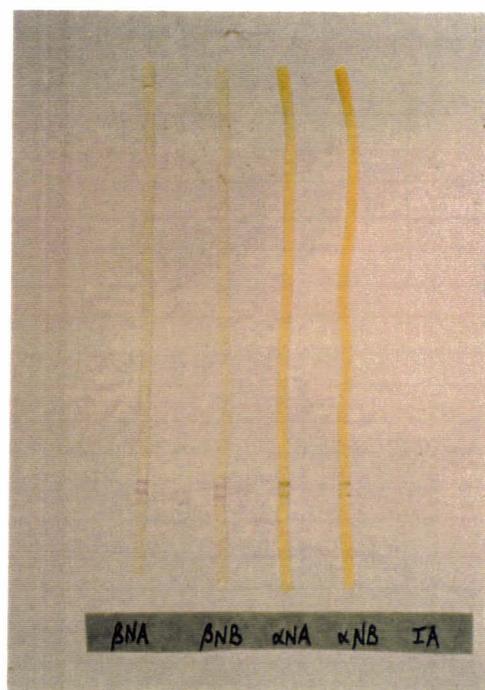
Le dosage des protéines, réalisé au préalable, nous a permis de déposer une même quantité de protéines au-dessus du gel. Les échantillons S7 donnent une meilleure résolution pour l'ensemble des souches et, par conséquent, ce sont ces extraits qui sont utilisés pour notre analyse.

Comme dans les électrophorèses précédentes, les résultats sont identiques quels que soient les substrats. La photo 5 montre l'exemple de la souche Su3. Seule, l'intensité de coloration est plus faible avec les quatre substrats autres que le  $\beta$ -naphthyl acétate. En isoélectrofocalisation, l'estérase donne pour la plupart des souches deux à trois bandes dans la même zone de pH dont toujours une de coloration plus intense (Photo 6). Quelques souches ne donnent qu'une seule bande de faible intensité. Le point isoélectrique a été déterminé avec la bande majeure pour chaque bactérie. L'ensemble des valeurs obtenues se situe entre 4,6 et 6, et principalement entre 5 et 5,6 (Fig. 5).

### D. - Représentation bidimensionnelle des valeurs des pI et Rf

Les résultats indépendants d'électrophorèse et d'isoélectrofocalisation sont combinés sous forme d'un graphique selon 2 axes (Fig. 6), une telle représentation ayant été préconisée par GOULLET et PICARD (1985). Celui-ci laisse apparaître un bon regroupement des souches dans une zone délimitée par un pI compris entre 5 et 6 et une mobilité

⑤



⑥

C17 P1 C28 P2 S3 S61 E H M P<sub>1</sub> P<sub>1</sub>24

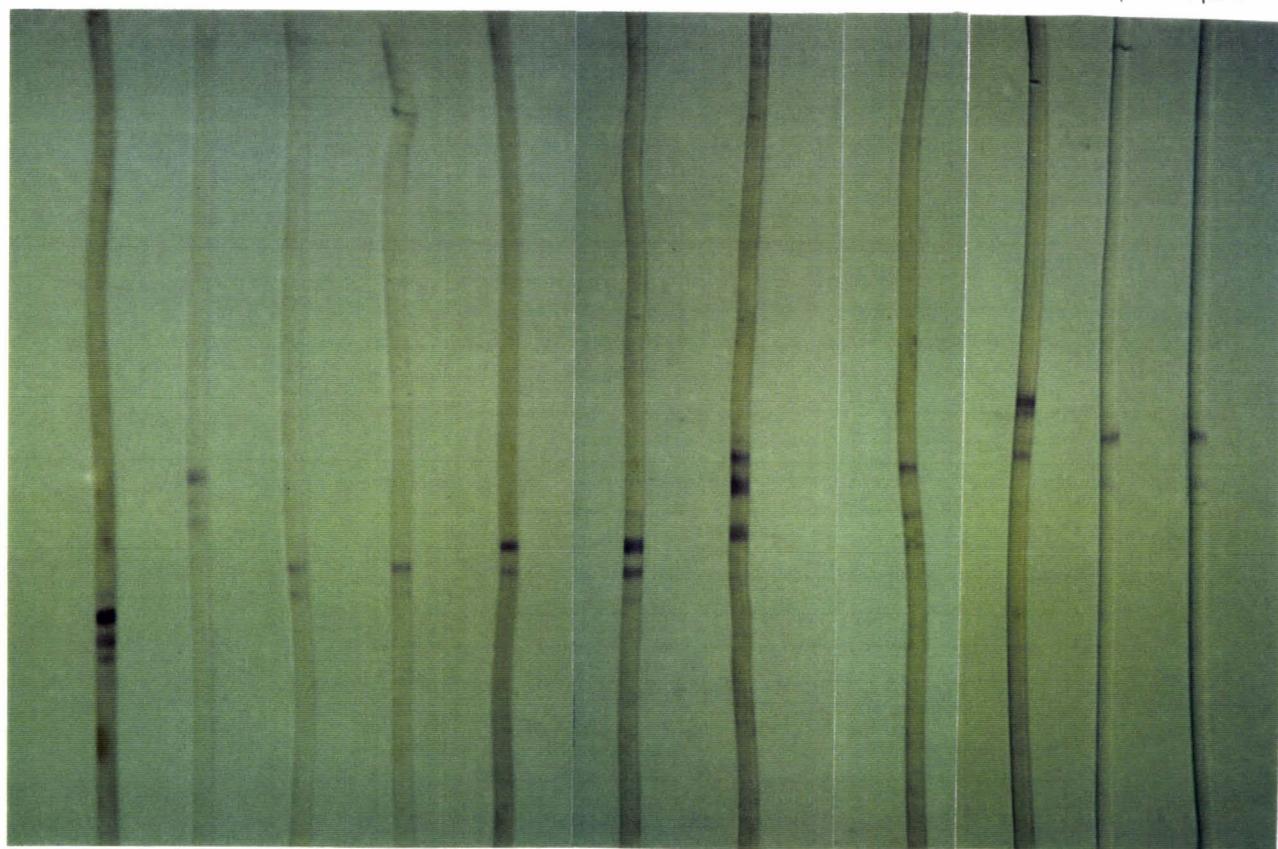


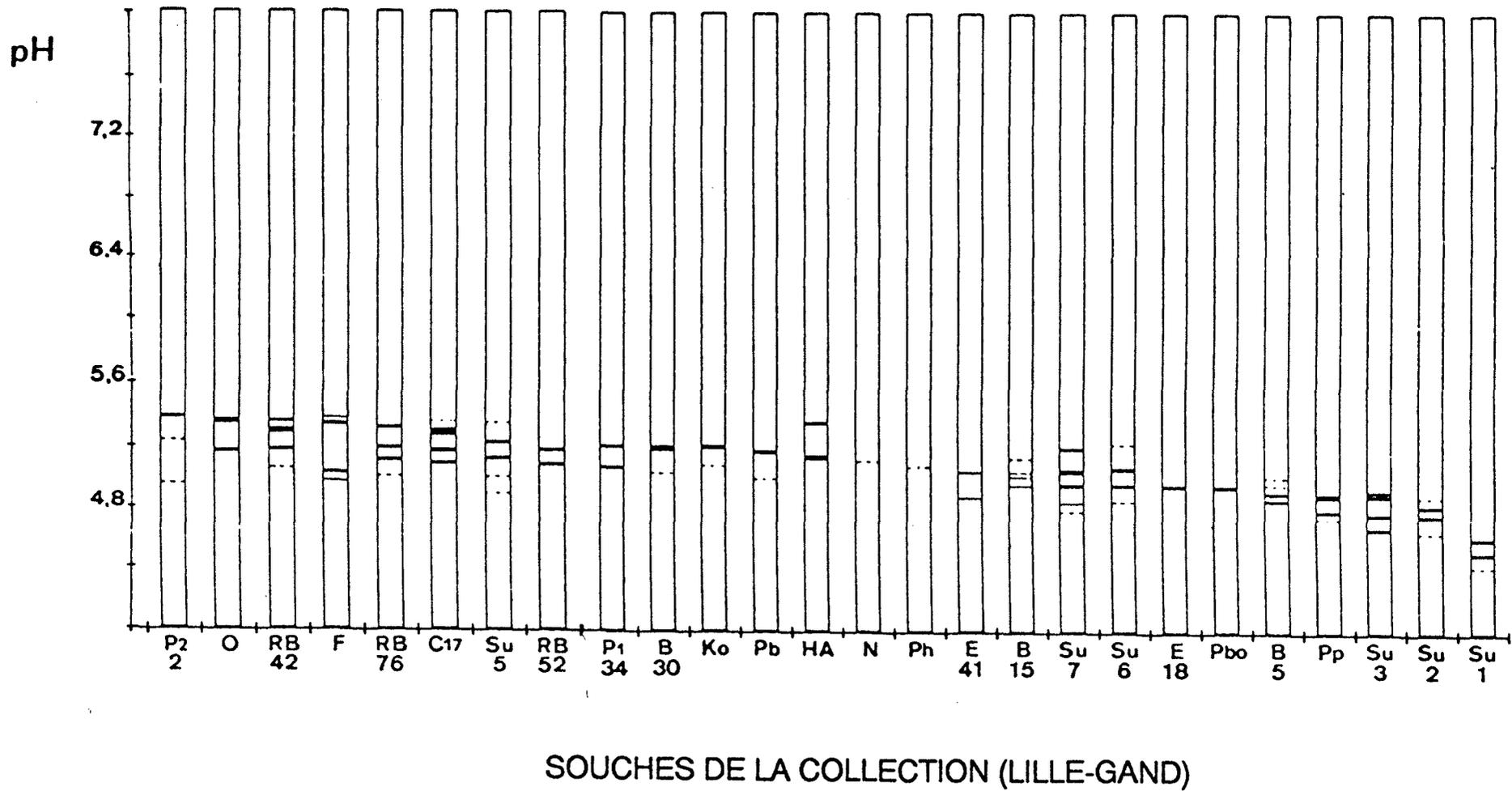
Photo 5 - Isoélectrofocalisation dans un gradient d'ampholytes 3-10 de l'extrait "EDTA-Triton" de X. maltophilia Su3.

Activité sur l' $\alpha$  - et le  $\beta$  -naphthyl acétate ( $\alpha$  NA et  $\beta$  NA), l' $\alpha$  - et le  $\beta$  -naphthyl butyrate ( $\alpha$  NB et  $\beta$  NB) et sur l'indoxy acétate (IA).

Photo 6 - Isoélectrofocalisation dans un gradient d'ampholytes 3-10 des extraits "EDTA-Triton" de quelques souches médicales et rhizosphériques de X. maltophilia.

Activité sur le  $\beta$ -naphthyl acétate.

Figure 5 - Représentation schématique des gels d'isoélectrofocalisation des souches de la collection "Lille-Gand" en fonction du gradient de pH.



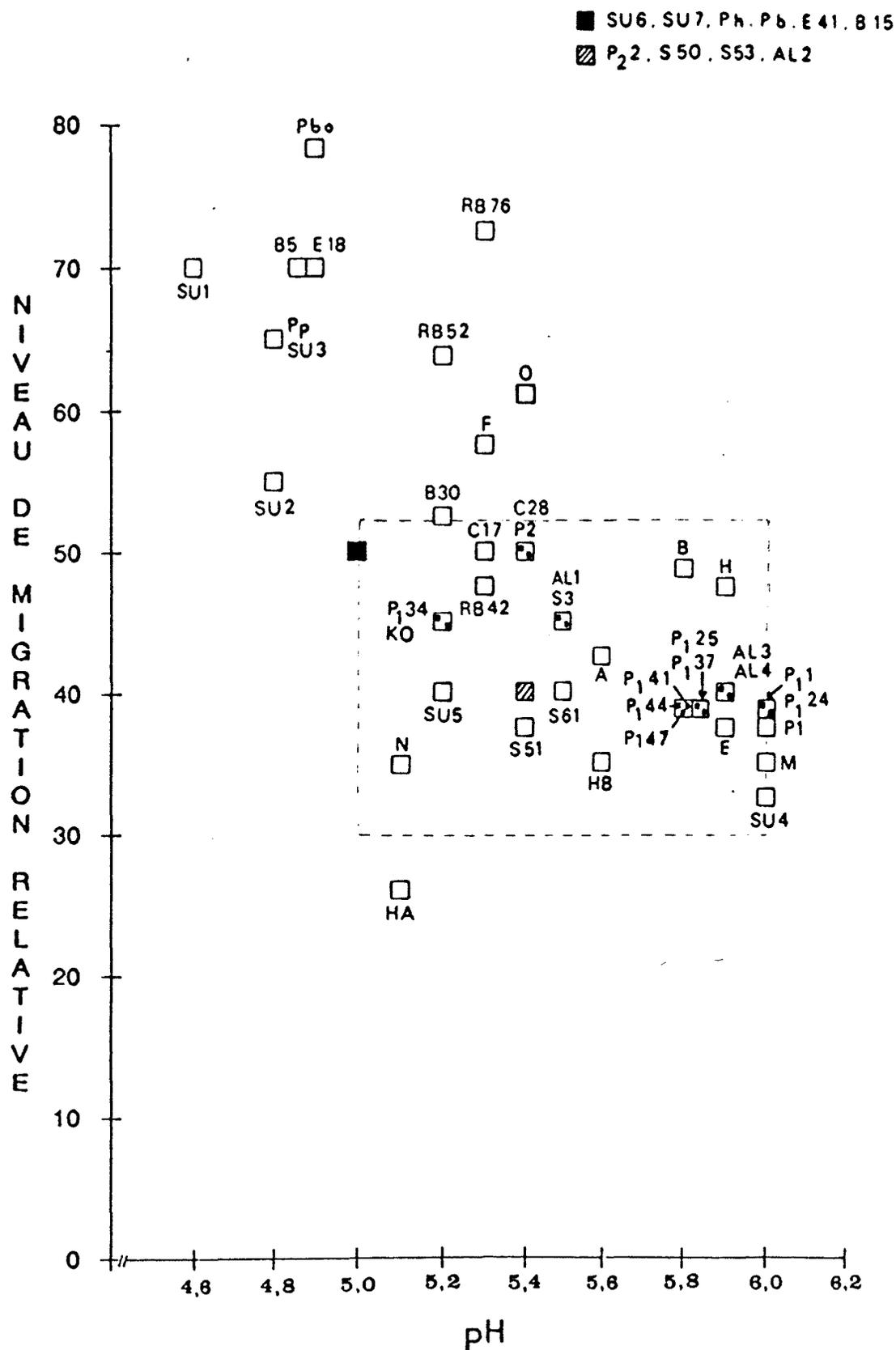


Figure 6 - Représentation bidimensionnelle des complexes estérasiques des souches de la collection "Lille-Gand" selon deux paramètres : valeur des pI et mobilité électrophorétique relative.

électrophorétique allant de 30 à 52. Douze souches n'en font pas partie : la souche médicale HA est la seule à présenter une Rf inférieure à 30, tandis que F, O, Pp (*P. pictorum*), Su3, RB52, Su1, B5, E18, RB76 et Pbo (*P. boreopolis*) sont également à l'écart pour une mobilité en électrophorèse supérieure à 50 ou un pI inférieur à 5.

#### IV. - ANALYSE NUMERIQUE PHENOTYPIQUE

##### A. - Caractères uniformes pour toutes les souches

###### 1 - Tests à réponse positive

- Hydrolyse de l'esculine.
- Assimilation du N-acétyl-glucosamine.
- Assimilation du maltose.
- Aspect sur le milieu sélectif XML (avec extrait de levure) (cf. p. 54).
- Présence d'une phosphatase alcaline.
- Présence d'une estérase hydrolysant les composés à 4 atomes de carbone.
- Présence d'une estérase hydrolysant les composés à 8 atomes de carbone.
- Présence d'une leucine arylamidase.
- Présence d'une naphthol-AS-BI-phosphohydrolase.
- Présence d'une phosphatase acide.

###### 2 - Tests à réponse négative

- Formation d'indole.
- Fermentation du glucose.
- Assimilation de l'adipate.
- Assimilation de phényl-acétate.
- Assimilation de gluconate.
- Assimilation de caprate.
- Présence d'une  $\alpha$ -mannosidase.
- Présence d'une cytochrome oxydase.

- Présence d'une arginine dihydrolase.
- Présence d'une uréase.
- Présence d'une cystine arylamidase.
- Présence d'une  $\alpha$ -galactosidase.
- Présence d'une  $\beta$ -glucuronidase.
- Présence d'une  $\alpha$ -fucosidase.

### **B. - Caractères discriminants**

Vingt-neuf caractères phénotypiques sont variables selon les souches. La nature de ces caractères et les réponses obtenues sont rassemblées dans le tableau 9.

Rappelons que les réponses positives ont été notées 1, les résultats négatifs 0. Les réponses intermédiaires (F) ont été codifiées pour l'étude informatique par 0,75 et sont donc considérées plus "positives" que "négatives" (cf. Matériel et Méthodes).

### **C. - Elaboration d'un dendrogramme phénotypique**

La technique de classification hiérarchique ascendante aboutit à l'élaboration d'un dendrogramme (Fig. 7). Trois groupes phénotypiques, numérotés I, II et III, sont individualisés à un niveau de coupure hiérarchique de 94 % de similitude, choisi de manière empirique.

Le groupe I comprend 23 souches dont C17, P1, C28 et P2, la plupart des souches rhizosphériques provenant de prélèvements de la Chicorée ainsi que quelques souches médicales. Les groupes II et III, plus petits, contiennent respectivement 11 et 7 souches.

Onze bactéries restent isolées à ce niveau de coupure. La souche A1 2 se situe entre les groupes II et III. Les autres : RB76, N, S53, Su1, Pbo, Su3, Su2, Su6, Su7 et Pp, à l'extrémité du dendrogramme, peuvent être considérées comme non classées. Certaines d'entre elles sont toujours à l'écart, même pour un niveau de coupure de 92 %.

Tests phenotypiques	S O U C H E S																											
	S61	E18	E41	B 5	B 15	B 30	RB 42	RB 52	RB 76	Pb	Ph	Pp	Al 1	Al 2	Al 3	Al 4	RO	Su 1	Su 2	Su 3	Su 4	Su 5	Su 6	Su 5	Pbo	F		
TVB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
GEL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	F	1	1	1	1	1	1	F	1	1	
MAN	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
MAL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F	0	1	1	
CIT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	F	F	1	1	
GLA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
RED	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
PNB	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	
LIP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	F	0	0	F	F	F	F	0	0	0	1	1	0	0	F	1	1	
VAL	F	F	F	F	F	F	F	F	F	1	F	F	1	F	1	F	F	0	F	0	F	0	F	0	F	0	1	1
TRI	F	1	1	1	F	1	F	0	1	1	1	1	1	F	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	F	1	1	
CHV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
AGL	F	0	0	F	0	F	0	F	0	1	0	0	0	0	F	F	F	0	0	0	0	0	F	0	0	1	0	
BGL	1	F	F	1	F	F	F	1	F	1	1	0	F	F	1	1	1	0	0	0	F	F	0	0	F	1	1	
NAB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	F	0	0	0	0	F	0	0	0	0	1	1	F	0	
CAT	1	1	F	1	F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
ELA	1	F	1	1	1	F	F	1	1	1	F	0	F	F	1	1	F	F	0	0	F	1	0	0	F	0	0	
TBB	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F	1	1	1	1	0	F	1	1	
ALB	1	F	F	F	F	F	F	F	F	1	F	1	1	1	1	1	1	F	0	1	1	1	1	F	F	1	F	
EMA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	
GLU	1	1	1	1	1	1	1	1	F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
ACH	1	F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	
SUN	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F	F	1	
ARB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F	1	1	1	1	1	F	1	1	1	
EN	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
JMN	1	1	1	1	1	1	1	1	F	F	1	1	0	F	1	1	1	1	F	1	1	0	1	F	1	1	1	
ARA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MAT	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tableau 9 (suite)

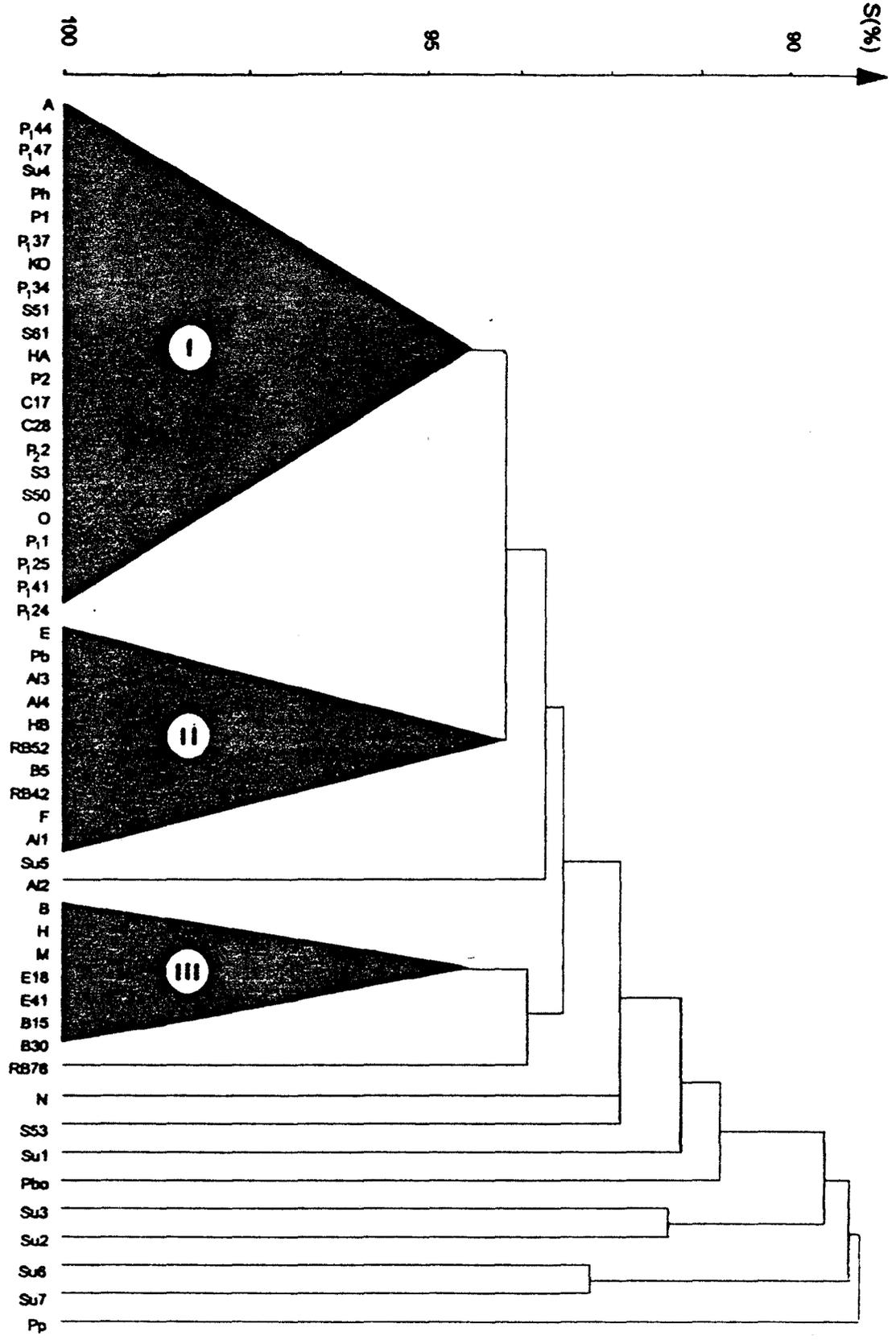


Figure 7 - Dendrogramme établi par l'analyse numérique de 29 caractères discriminants des souches de la collection "Lille-Gand".

#### D. - Distinction phénotypique de chaque groupe

Le tableau 10 présente une différenciation des groupes d'après leurs caractères phénotypiques.

Les caractères : réduction des nitrates en nitrites et hydrolyse du p-nitro-phényl- $\beta$  D-galactopyranoside (PNPG) constituent les principales différences entre les trois phénons. D'autres tests présentent une variabilité des réponses commune aux trois groupes.

La non-exigence en méthionine de X. maltophilia fut rapportée pour la première fois pour IIZUKA et KOMAGATA (1964) puis par STANIER et coll. (1966). Notre étude montre que seules quelques souches sont non exigeantes en méthionine. De plus, comme l'ont montré LOWE et INGLEDEW (1975), ce caractère est influencé par la source de carbone présente dans le milieu de culture, des souches non exigeantes en méthionine en présence de maltose pouvant perdre cette propriété avec d'autres sources carbonées.

Enfin, certaines souches se distinguent des autres par leur aspect sur le milieu sélectif XSM (JUHNKE et DESJARDIN, 1989) et notamment par l'absence d'acidification résultant de la dégradation du maltose. VAN DEN MOOTER et coll. (1987) ont déjà noté une différence de production d'acide due à l'utilisation de ce sucre chez des souches de X. campestris pv. manihotis. Il est possible que quelques souches de la collection "Lille-Gand" présentent également cette particularité. Toutefois, l'acidification qui apparaît corrélativement à la diminution de la source protéique dans les milieux modifiés (XML et XMM), montre que ces souches utilisaient préférentiellement, dans le milieu sélectif initial, la source protéique plutôt que le sucre.

#### E. - Regroupements phénotypiques

Différentes études taxonomiques et phénotypiques, concernant le genre Xanthomonas et incluant X. maltophilia, ont déjà été réalisées (VAN DEN MOOTER et SWINGS, 1990 ; VAN ZYL et STEYN, 1990) mais le nombre de X.

Tests phénotypiques	Pourcentages de réponses positives													
	Phénon I (%)	Phénon II (%)	Al <sub>2</sub>	Phénon III (%)	RB 76	N	S 53	Su 1	Pbo	Su 3	Su 2	Su 6	Su 7	Pp
TW8	100	100	+	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
GEL	100	100	+	100	+	+	+	F	+	+	+	+	F	-
MAN	100	100	+	100	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
MAL	100	100	+	100	+	+	+	+	+	+	+	F	-	-
CIT	100	100	+	100	+	+	+	-	+	+	+	F	F	-
GLA	82,6	100	+	100	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
RED	100	0	-	14,2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
PNB	100	100	+	0	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
LIP	86,9	63,7	F	42,8	-	+	F	-	F	-	-	-	-	-
VAL	78,2	90,8	F	100	F	F	F	-	+	-	F	F	-	F
TRI	100	90,9	F	100	+	+	+	-	+	+	-	+	F	+
CHY	4,35	0	-	14,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F
GAL	4,35	0	-	0	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
AGL	56,5	54,6	-	14,2	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
BGL	100	100	F	100	F	F	F	-	F	-	-	-	-	-
NAB	4,35	0	F	0	-	-	-	-	F	-	F	+	+	-
CAT	100	100	+	100	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ELA	100	81,8	F	100	+	+	+	F	F	-	-	-	-	-
TRB	100	100	+	100	+	+	+	+	+	+	F	-	F	+
ALB	100	100	+	100	F	+	+	F	+	+	-	F	F	+
EMA	95,5	90,9	+	100	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
GLU	100	100	+	100	F	+	-	+	+	+	+	-	-	+
ACN	95,7	100	+	100	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
SUN	100	100	+	100	-	-	+	+	F	+	+	+	F	+
ARB	100	100	+	100	+	+	+	F	+	+	+	F	+	+
XM	100	100	-	100	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
XMM	100	81,8	F	100	F	+	+	+	+	+	F	+	F	+
ARA	8,7	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAT	4,35	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 10 - Analyse comparative des 3 groupes phénotypiques et des souches isolées en fonction de leurs réponses aux 29 tests discriminants.

Les réponses intermédiaires (F) sont comptabilisées dans les pourcentages de réponses positives.

- + : réponse positive.
- F : réponse faiblement positive.
- : réponse négative.

maltophilia y est toujours assez faible. Notre analyse numérique a porté uniquement sur cette espèce.

Caractéristiques nettes de distinction des 3 phénons principaux :

- Phénon I : - réduction des nitrates  
 - hydrolyse du PNPG  
 - quelques souches assimilant l'arabinose et le mannitol
- Phénon II : - pas de réduction des nitrates  
 - hydrolyse du PNPG
- Phénon III : - pas de réduction des nitrates  
 - non hydrolyse du PNPG  
 - absence d'une  $\alpha$ -glucosidase

La souche du genre Alcaligenes A1 2 possède des caractères communs avec le phénon II (non réduction des nitrates, dégradation du PNPG) et aussi avec le phénon III (absence de  $\alpha$ -glucosidase). Ceci explique la position de cette souche dans le dendrogramme.

Les souches RB76 et S53 présentent une non-exigence en méthionine en présence de certains hydrates de carbone tels l'acétate et le succinate de sodium. De plus, RB76 ainsi que A1 2 et Su6 apparaissent sur le milieu sélectif XMSM sous forme de colonies verdâtres sans acidification de ce milieu. D'autres souches [Su1, Su2, Su3, Su6 et Su7, Pbo (P. boreopolis) et Pp (P. pictorum)] présentent des caractères particuliers : non-assimilation du citrate, du mannose ou du glucose, absence de trypsine pour Su1, absence d'élastase pour Su2 et Su3, présence de N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase pour Su6 et Su7, etc... Enfin, la présence d'une  $\beta$ -galactosidase et l'absence d'une albuminase sont des caractères propres à Pbo et Su2 respectivement. Pp est la seule souche de la collection à ne pas hydrolyser le Tween 80 et la gélatine.

## V. - ANALYSE COMPAREE DE SOUCHES SAUVAGES D'ORIGINE RHIZOSPHERIQUE ET D'ORIGINE MEDICALE

Des travaux similaires, analyses électrophorétiques d'estérase et analyse numérique de caractères phénotypiques, ont été entrepris sur la collection complète de nos souches d'origine rhizosphérique (cf. Tab. 8) ainsi que sur l'ensemble des 17 souches d'origine médicale dont nous disposons (cf. Tab. 7). A ces souches sont seulement ajoutées C17, C28 (souches types de notre Laboratoire) et P1 et P2 (souches type ATCC, cf. Tab. 7), l'ensemble rassemblant donc 72 souches.

### A. - Analyses électrophorétiques des estérases

#### 1 - Distances de migration relatives

Comme précédemment, nous avons évalué les distances de migration des estérases des souches (extraits solubles S3) après action sur le  $\beta$ -naphthyl acétate, en référence à celle de l'estérase de la souche C17 (Rf 50).

Une certaine hétérogénéité est remarquable au niveau des distances de migration des estérases des souches médicales (écart maximum 41,5) (Fig. 8). Par contre, une certaine homogénéité se dégage pour les estérases des souches rhizosphériques, excepté celles qui migrent au delà de l'estérase de C17, en particulier celles des souches RB67, 52, 76, B5 et E18. Un certain ordre de répartition apparaît parmi les bactéries rhizosphériques en fonction de leur origine d'isolement. Les estérases des souches provenant d'échantillons de la Chicorée migrent de manière générale moins loin que celles de souches issues du Blé, exception faite de E18 et E41.

#### 2 - Comparaison des points isoélectriques des complexes estérasiques

Comme précédemment, ce sont les échantillons S7 du protocole d'extraction qui sont soumis à une isoélectrofocalisation dans un gradient de pH 3-10 (Photos 7 et 8). En majorité, 2 à 3 bandes sont

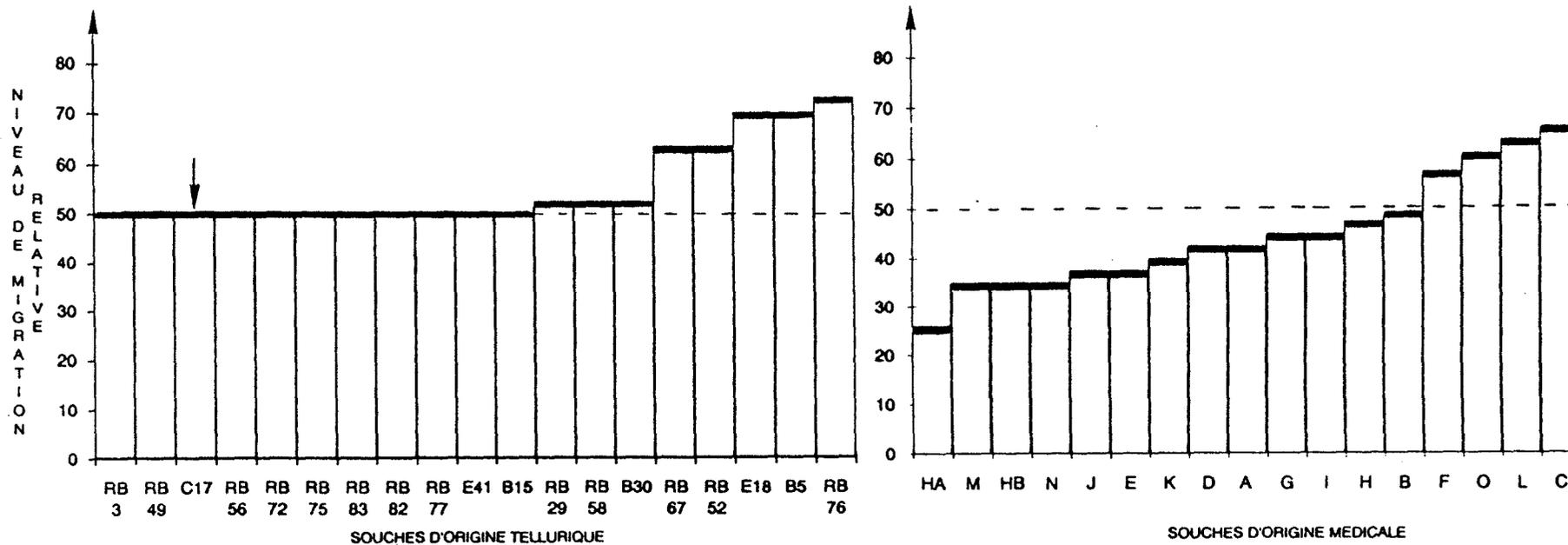
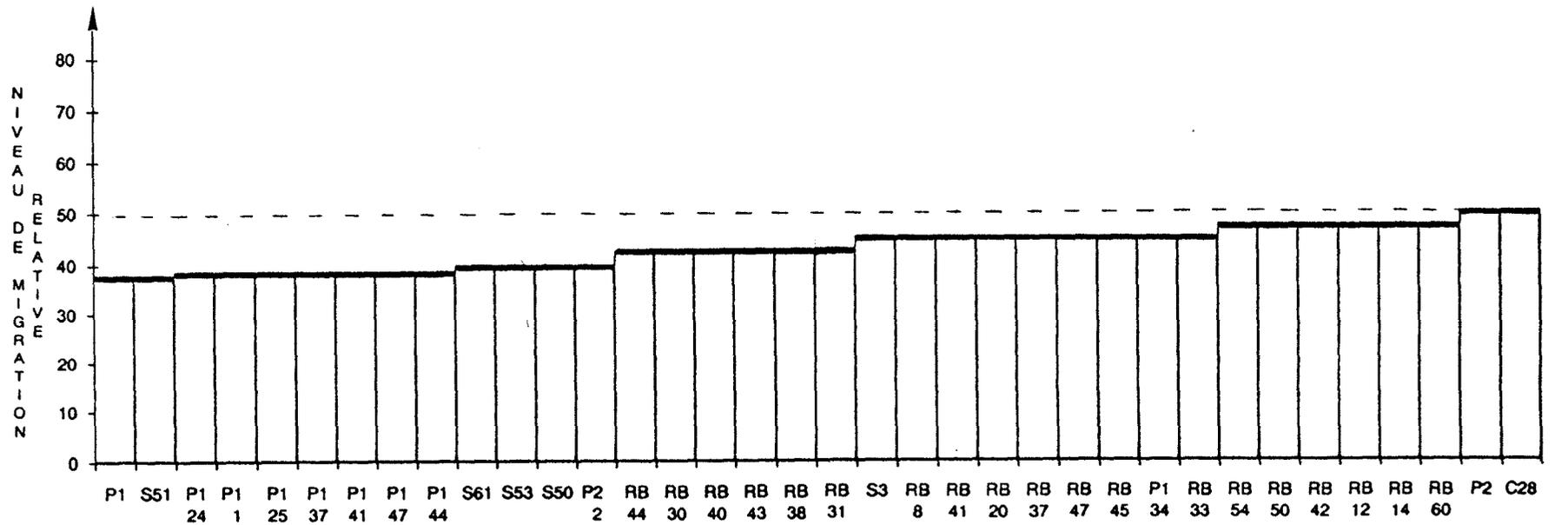


Figure 8 - Mobilité électrophorétique relative des complexes estératiques des souches de *X. maltophilia* d'origine rhizosphérique ou médicale.

révélées après action sur du  $\beta$ -naphthyl acétate. Une représentation schématique des gels avec évaluation du point isoélectrique des estérases des souches est donnée dans la figure 9.

67 % des souches d'origine hospitalière ont des estérases à pI compris entre 5,5 et 6 tandis que pour une grande partie (82 %) des bactéries telluriques il est plus acide et compris entre 5 et 5,5. Toutefois, les 18 % restant des souches de cette seconde origine, principalement constitués des bactéries de la série P1, présentent, à ce point de vue, une certaine ressemblance avec les 67 % d'origine médicale.

### 3 - Représentation bidimensionnelle des valeurs de pI et Rf

La figure 10 donne la répartition des souches en fonction de deux paramètres : mobilité électrophorétique et point isoélectrique des estérases.

Seules, deux souches B5 et E18 présentent un point isoélectrique légèrement inférieur à 5. Quelques souches apparaissent à l'écart du cadre artificiellement fixé précédemment, mais uniquement du fait de la valeur de mobilité plus élevée (seule HA présente une mobilité estérasiqque plus faible). De nouveau, les souches rhizosphériques semblent être placées selon leur origine d'isolement. La majorité des souches RB et toutes les souches S se situent dans la zone centrale, en même temps que C17, C28 et P2. Les bactéries provenant de la terre adhérente de l'Endive (P1) se situent davantage dans une zone de pH proche de 6, comme la souche de collection P1. Il est notable que les 3/4 des souches médicales s'y trouvent également. Les autres sont très dispersées, voire à l'extérieur du "cadre".

### B. - Analyse numérique phénotypique

Les souches de cette collection sont comparées sur la base des réponses aux 53 tests phénotypiques déjà utilisés en première partie. 27 tests donnent des résultats uniformes pour toutes les souches tandis que 26

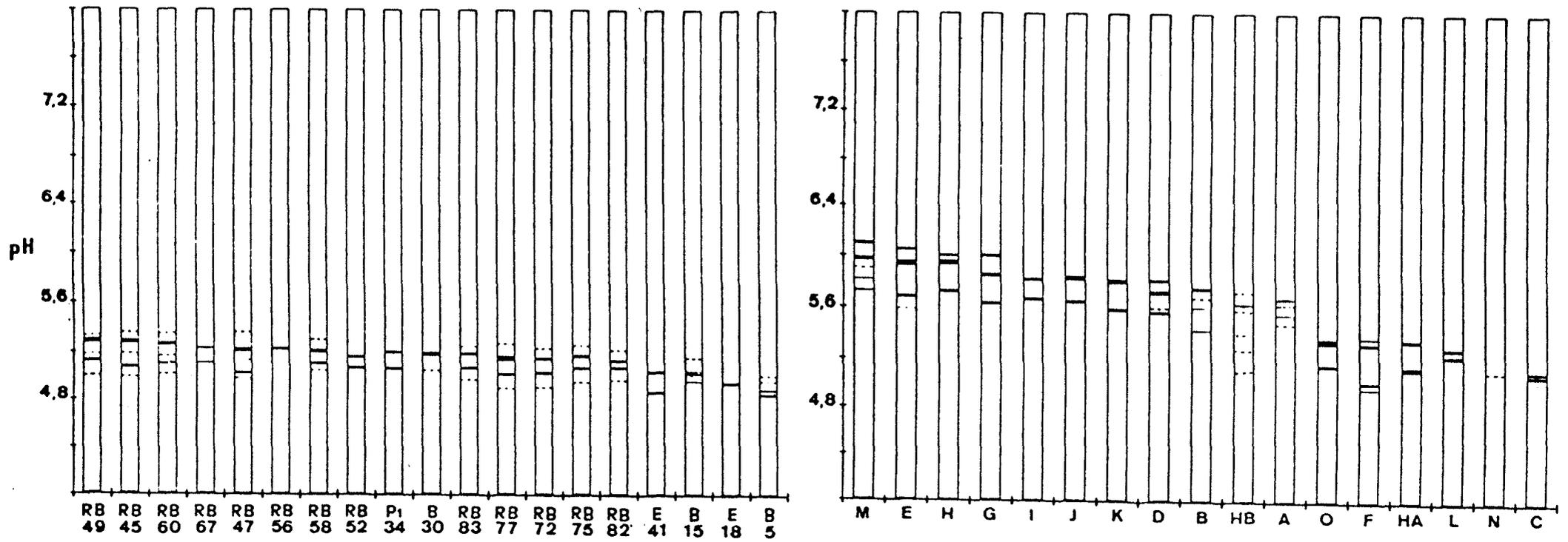


Figure 9 - Représentation schématique des gels d'isoélectrofocalisation des souches de *X. maltophilia* d'origine rhizosphérique ou médicale en fonction du gradient de pH.

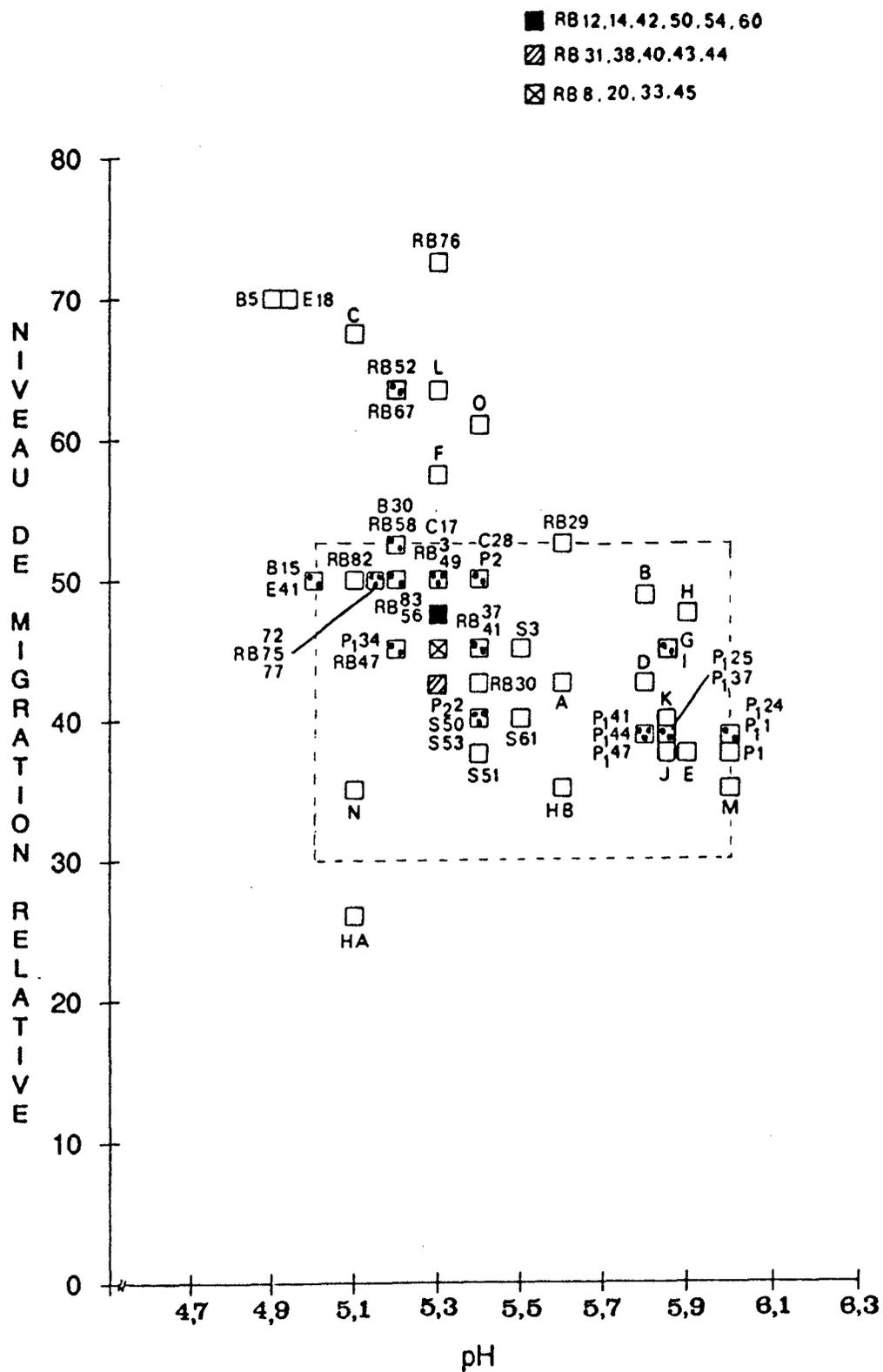


Figure 10 - Représentation bidimensionnelle des complexes estérasiques des souches de *X. maltophilia* d'origine rhizosphérique ou médicale selon deux paramètres : valeur des pI et mobilité électrophorétique relative.

sont discriminants. Ceux-ci ont été traités par informatique comme précédemment.

## 1 - Caractères phénotypiques uniformes

### a) Réponses positives

- hydrolyse du Tween 80,
- hydrolyse de la gélatine,
- hydrolyse de l'esculine,
- assimilation du mannose,
- assimilation du malate,
- assimilation du citrate,
- assimilation de N-acétyl-glucosamine,
- assimilation du maltose,
- présence de phosphatase alcaline,
- présence de phosphatase acide,
- présence d'une estérase hydrolysant les composés à 4 atomes de carbone,
- présence d'une estérase hydrolysant les composés à 8 atomes de carbone,
- présence d'une leucine arylamidase,
- présence d'une naphthol-AS-BI-phosphohydrolase
- aspect sur milieu sélectif XML,
- aspect sur milieu sélectif XMM.

### b) Réponses négatives

- présence d'une cytochrome oxydase,
- présence d'une arginine dihydrolase,
- présence d'une uréase,
- présence d'une cystine arylamidase,
- présence d'une  $\alpha$ -galactosidase,
- présence d'une  $\beta$ -glucuronidase,
- présence d'une  $\alpha$ -fucosidase,
- formation d'indole,
- fermentation du glucose,

- assimilation de l'adipate,
- assimilation de phényl-acétate.

## 2 - Caractères phénotypiques discriminants

La variabilité des réponses aux 26 caractères phénotypiques est donnée dans le tableau 11.

## 3 - Dendrogramme phénotypique

Un dendrogramme est établi par la technique de classification hiérarchique ascendante déjà utilisée (Fig. 11). Au même niveau de coupure (94 % de similitude), 6 groupes phénotypiques (nommés de I à VI) sont individualisés. Sept souches se situant à l'extrémité du dendrogramme restent non classées.

Les groupes I, II et III contiennent respectivement 16, 2 et 4 souches des deux origines (rhizosphérique et médicale). Ils sont très proches les uns des autres puisqu'ils ne forment plus qu'un seul et même groupe à un niveau de similitude de 93 %. De même, les phénons IV, V et VI sont regroupés en un seul phénon à ce même niveau. Le groupe VI est le plus important puisqu'il comprend 30 souches, pour la plupart provenant de l'endorhizosphère du Blé.

## 4 - Différenciation des phénons

Les groupes I, II et III se distinguent des groupes IV, V et VI par la faculté de leurs souches à réduire les nitrates (Tab. 12).

Ces trois premiers phénons diffèrent les uns des autres par quelques caractères. Ainsi, les deux individus ( $P_2$  et  $P_{2,2}$ ), constituant le phénon II, sont non-exigeants en méthionine en présence d'acétate de sodium. Les souches du phénon III ne possèdent pas de valine arylamidase et n'hydrolysent pas le PNPG. A l'inverse des trois premiers groupes, les phénons IV, V et VI contiennent des souches incapables de réduire les nitrates. Ils présentent également leurs caractéristiques propres : toutes les souches du groupe IV sont sans



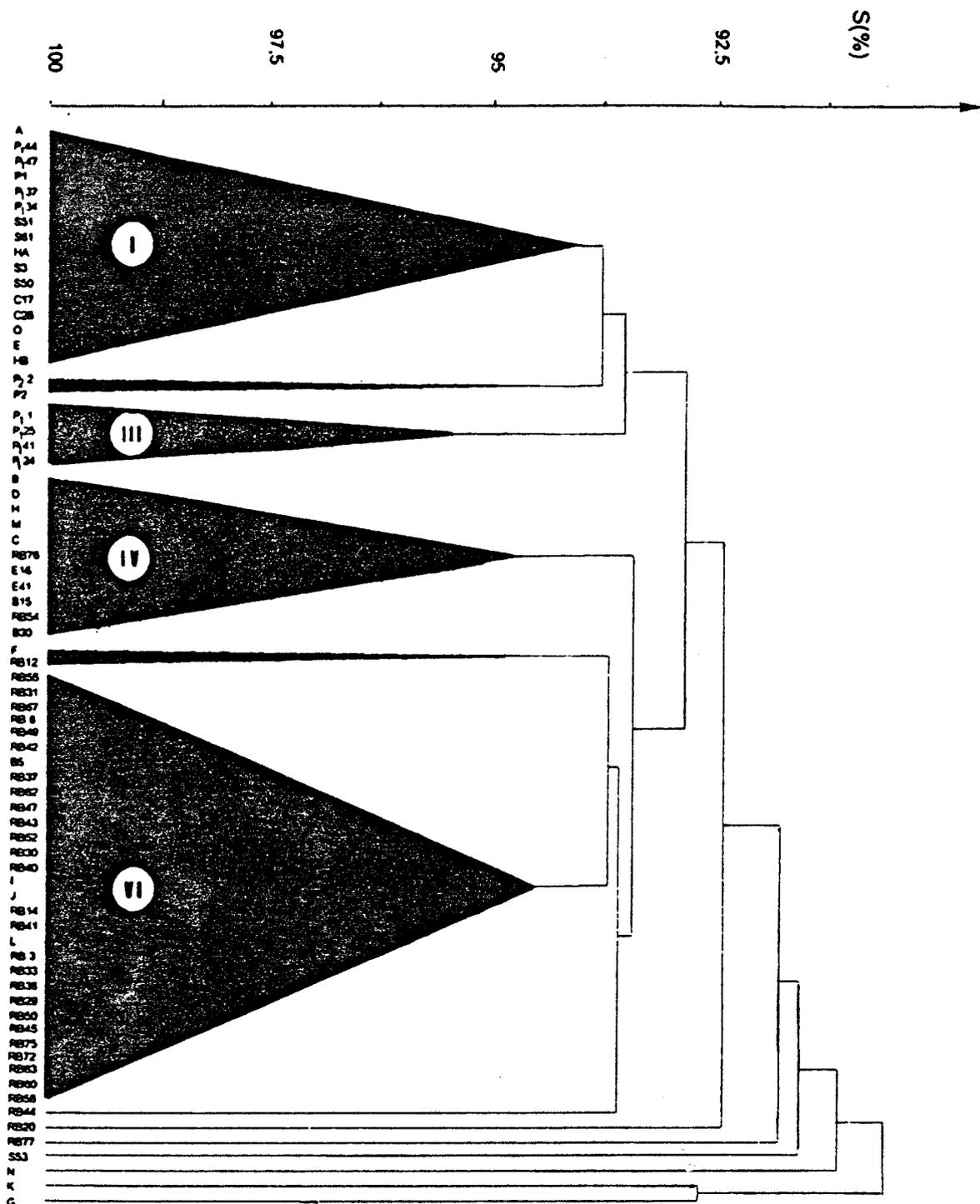


Figure 11 - Dendrogramme établi par l'analyse numérique de 26 caractères discriminants des *X. maltophilia* d'origine rhizosphérique ou médicale.

Tests phénotypiques	Pourcentages de réponses positives												
	P H E N O N S						RB 44	RB 20	RB 77	S 53	N	K	G
	I	II	III	IV	V	VI							
GLA	87,5	50	75	100	100	100	+	+	+	+	+	+	+
RED	87,5	100	100	9	0	0	-	+	-	+	+	-	+
PNB	100	100	0	100	100	100	+	+	+	+	-	+	+
LIP	100	100	25	45	50	10	-	-	-	F	+	F	+
VAL	100	50	0	91	100	100	F	F	F	F	F	F	+
TRI	100	100	100	100	100	94	F	+	F	+	+	+	+
CHY	6	0	0	9	0	0	-	-	-	-	-	-	-
GAL	6	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	F
AGL	75	100	0	9	0	37	-	-	+	-	+	-	+
BGL	100	100	100	100	100	100	F	F	F	F	F	+	+
NAB	0	0	25	0	50	16	F	-	F	-	-	-	-
AMA	0	0	0	0	0	0	-	-	+	-	-	-	-
CAT	100	100	100	100	100	100	+	+	+	+	+	+	+
ELA	100	100	100	100	0	100	+	+	F	+	+	+	+
TRB	100	100	100	91	100	100	+	+	-	+	+	+	+
ALB	94	100	100	100	100	100	F	F	F	+	+	+	+
GLU	100	100	100	100	100	83	+	+	+	-	+	+	+
ACN	100	0	100	100	100	94	-	+	+	-	+	+	+
SUN	100	100	100	91	100	100	+	-	+	+	-	+	+
EMA	87	100	100	100	100	97	+	+	+	-	-	+	+
ARB	100	100	100	100	100	100	+	F	+	+	+	+	+
XM	100	100	100	91	100	77	-	-	+	+	+	+	+
ARA	12	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	+	+
MAT	6	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	+	+
GNT	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	+	+
CAP	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	+

Tableau 12 - Analyse comparative des 6 groupes phénotypiques et des souches isolées en fonction de leurs réponses aux 26 tests discriminants.

Les réponses intermédiaires (F) sont comptabilisées dans les pourcentages de réponses positives.

- + : réponse positive.
- F : réponse faiblement positive.
- : réponse négative.

tributyrylase, celles du groupe V sont sans élastase ; enfin, quelques bactéries du groupe VI n'ont pas de trypsine et sont non-exigeantes en méthionine en présence de glucose.

Hors dendrogramme, en plus des individus déjà non classés dans l'analyse précédente (N, S53), nous trouvons 3 souches rhizosphériques de même origine (RB44, 20 et 77) et deux souches médicales (K et G). RB20 et 44 se caractérisent par leur non-exigence en méthionine en présence respectivement de succinate de sodium et d'acétate de sodium. RB77 n'hydrolyse pas la tributyrine. Elle est de plus la seule souche de la collection à manquer d'une  $\alpha$ -mannosidase. Enfin, K et G, qui ont le plus faible coefficient de similitude, ont la particularité d'assimiler l'arabinose, le mannitol, le gluconate et aussi, pour G, le caprate.

Enfin, il est intéressant de noter que la souche RB76, non classée dans l'étude précédente, est incorporée au groupe IV dans cette analyse parmi des souches qui formaient elles-mêmes un groupe voisin de RB76 antérieurement.

## VI. - DENOMBREMENT DE X. MALTOPHILIA DANS LA RHIZOSPHERE DE BLE D'HIVER A DIFFERENTS STADES DE SON DEVELOPPEMENT

Lors de la recherche de X. maltophilia, d'origine rhizosphérique, nous avons remarqué fortuitement une forte prolifération au contact même de racines de Blé cultivé en champ. De telles proliférations occasionnelles ayant déjà été remarquées (DEBETTE et BLONDEAU 1980 ; DEBETTE et coll., 1983 ; LAMBERT et coll., 1987), nous avons entrepris le dénombrement systématique de cette bactérie au cours d'un cycle de végétation de Blé d'hiver tardif (variété Hereward) cultivé dans le Pévêle (Etablissements DESPREZ). Les résultats de cette étude sont récapitulés dans le tableau 13.

La numération bactérienne totale augmente progressivement au cours du développement de la plante, l'échantillon de terre rhizosphérique proche présentant, logiquement tous les cas, une flore microbienne

Date du prélèvement et stade de développement de la plante	Nature des échantillons	pH et humidité (%)	Numération totale (CFU/g d'échantillon)	Nb. de souches lipolytiques <sup>1</sup>	Nb. de souches gélatinolytiques	Nb. de <i>X. maltophilia</i> (pourcentage)
3/12/90 stade 2 feuilles (prétallage) 30 plantules	rhizosphère proche	7,65 (18,4 %)	68,0 x 10 <sup>6</sup>	67	22	5 ( 7,4 %)
	rhizoplan	6,65	6,7 x 10 <sup>6</sup>	84	60	31 (36,9 %)
12/3/91 stade 4 feuilles (tallage) 13 plantules	rhizosphère proche	7,85 (18,3 %)	40,0 x 10 <sup>6</sup>	97	53	3 ( 3,0 %)
	rhizoplan	7,55	22,5 x 10 <sup>5</sup>	83	39	2 ( 2,4 %)
2/4/91 8 plantules	rhizosphère proche	7,90 (16,0 %)	104,0 x 10 <sup>6</sup>	94	61	7 ( 7,4 %)
	rhizoplan	7,40	27,1 x 10 <sup>6</sup>	120	90	11 ( 9,1 %)
	endorhizosphère	7,00	22,9 x 10 <sup>5</sup>	120	55	18 (15,0 %)
21/6/91 (épiaison) 5 pieds	rhizosphère proche	8,20 (16,0 %)	36,2 x 10 <sup>7</sup>	120	42	7 ( 5,8 %)
	rhizoplan	7,40	6,6 x 10 <sup>7</sup>	115	40	6 ( 5,2 %)
	endorhizosphère	6,60	34,2 x 10 <sup>5</sup>	120	64	0 ( 0,0 %)

Tableau 13 - Numérations bactériennes totales et présence de *X. maltophilia* dans les échantillons rhizosphériques, à différents stades du développement de Blé d'hiver cultivé en champs.

Semis le 24/10/92, suivi par herbicide - Fongicide le 15/6.

- 1 souches lipolytiques prélevées au hasard etensemencées sur le milieu gélatine.
- 2 pourcentage exprimé par rapport au nombre de souchesensemencées sur le milieu gélatine.

plus importante que celles des autres échantillons. De manière générale, X. maltophilia se situe davantage au contact même des racines. Cependant, le dernier prélèvement endorhizosphérique n'a mis en évidence aucun individu de cette espèce, alors qu'au début de la culture nous en avons dénombré un pourcentage élevé.

## VII. - DENOMBREMENT DE X. MALTOPHILIA DANS LA RHIZOSPHERE D'ESPECES VEGETALES CULTIVEES EN SERRE

Des expériences de cultures en serre sont réalisées afin d'éliminer au maximum l'influence de paramètres extérieurs (température, pH, humidité, ...) et de mettre les différentes espèces végétales étudiées dans des conditions équivalentes. Il est alors possible de comparer les effets des différents traitements effectués sur les semences et notamment ceux d'une "bactérisation" avec une suspension bactérienne de X. maltophilia C17, le témoin étant fait avec une suspension bactérienne autoclavée (DE FREITAS et GERMIDA, 1990).

Quatre plantes sont cultivées en serre pour différentes raisons :

- la Chicorée de Bruxelles, déjà utilisée pour l'isolement de souches sauvages dans la première partie de ce travail ;
- le Blé au niveau duquel des proliférations importantes occasionnelles sont remarquées ;
- le Colza, puis le Chou, Crucifères choisies en raison de leur susceptibilité à favoriser la prolifération de X. maltophilia (DEBETTE et coll., 1983).

### A. - Flores bactériennes totales

Les numérations bactériennes totales résultant de notre étude sont récapitulées dans les tableaux 14, 15, 16 et 17.

La flore bactérienne, quelle que soit la nature des échantillons et des plantes, est comprise entre  $10^6$  et  $10^8$  CFU/g d'échantillon. C'est le Blé qui présente la population la plus importante. De manière générale,

Semences traitées (ou non traitées)	% humidité de la terre	pH de la décoction	Nb. de plantules prélevées	Poids frais des parties aériennes des plantules (g)	Numération bactérienne totale ( $\times 10^6$ CFU/g de matériel)
Te <sub>1</sub>	8,3	7,9			9,2
B	ND	7	77	13,75	1 350,0
		6,9			50,0
		6,8			6,2
Bb	11,4	7,4	45	9,5	35,7
		7,45			104,0
		6,65			76,0
Ba	13,8	7,6	50	10,35	300,0
		7,05			131,0
		6,4			7,8
Bsb	6,21	7,5	35	25,2	67,2
		7,3			87,0
		6,65			10,2
Bsa	9,1	7,2	27	31,9	978,0
		7			69,0
		6,7			9,3

Semences traitées (ou non traitées)	% humidité de la terre	pH de la décoction	Nb. de plantules prélevées	Poids frais des parties aériennes des plantules (g)	Numération bactérienne totale ( $\times 10^6$ CFU/g de matériel)
Te <sub>2</sub>	15,4	7,7			30,4
E	20,7	7,6	58	4,7	226,0
		6,7			1,74
		6,3			4,5
Eb	23,6	7,75	50	8,65	29,3
		6,1			0,95
		6,2			4,0
Ea	14,5	7,4	21	11,25	38,2
		6,5			3,6
		6,3			4,0
Esb	24,8	7,35	56	9	73,6
		6,6			14,7
		7,15			0,63
Esa	18,1	7,6	43	4,4	38,1
		6,8			5,1
		6,9			5,0

Tableaux 14 et 15 - Numérations bactériennes totales et caractéristiques des échantillons.

(T : rhizosphère proche ; R : rhizoplan ; E : endorhizosphère) provenant de Blé (B) et de Chicorée (E) dont les semences ont été traitées ou non ; b : "bactérisation" avec *X. maltophilia* C17 ; a : traitement avec C17 autoclavé ; S : stérilisation préalable au traitement ; après 7 à 8 semaines de culture. Te : terre sans végétation.

Semences traitées (ou non traitées)	% humidité de la terre	pH de la décoction	Nb. de plantules prélevées	Poids frais des parties aériennes des plantules (g)	Numération bactérienne totale (x10 <sup>6</sup> CFU/g de matériel)
Te <sub>3</sub>	2,94	8,1			26,4
CO T R E	19,4	7,6			234,0
		7,6	44	6,4	66,5
		7,4	44	7,3	28,5
CO <sub>b</sub> T R E	9,9	7,7			57,7
		7,4	33	9,5	22,8
		6,9	33	7,3	42,0
CO <sub>a</sub> T R E	12,8	7,7			ND
		8,1	50	8,35	27,8
		7,3	50	5,9	38,2
CO <sub>sb</sub> T R E	11,1	7,9			65,3
		7,9	45	5	53,0
		7,29	45	5,5	23,7
CO <sub>sa</sub> T R E	8,82	7,7			48,5
		7,4	26	5,8	64,0
		7,9	26	4,5	6,5

Semences traitées (ou non traitées)	% humidité de la terre	pH de la décoction	Nb. de plantules prélevées	Poids frais des parties aériennes des plantules (g)	Numération bactérienne totale (x10 <sup>6</sup> CFU/g de matériel)
Te <sub>4</sub>	9	ND			29,0
CH T R E	18	7,8			144,0
		7,7	42	10	48,0
		7,7	42	10	66,3
CH <sub>b</sub> T R E	16,3	7,8			48,9
		7,3	45	11,8	69,2
		7,15	45	9,5	63,6
CH <sub>a</sub> T R E	12,8	7,7			35,3
		7,3	40	10,35	42,0
		7,05	40	11	36,0
CH <sub>sb</sub> T R E	10	7,85			31,3
		8	40	9,1	16,6
		7,3	40	7,95	6,9
CH <sub>sa</sub> T R E	14	8			33,0
		7,7	30	8,1	11,4
		7,3	30	7	5,2

Tableaux 16 et 17 - Numérations bactériennes totales et caractéristiques des échantillons rhizosphériques de Colza (Co) après 7 à 8 semaines de culture et de Chou (Ch) après 5 à 6 semaines de culture.

Les traitements des semences et les symboles utilisés sont les mêmes que dans les tableaux 14 et 15.

elle est plus faible dans l'endorhizosphère que dans le rhizoplan et la terre adhérente aux racines.

La numération bactérienne totale dans la rhizosphère proche est toujours plus élevée lorsqu'aucun traitement n'a été réalisé sur les semences, que les semences aient été sensibilisées à une suspension de bactéries vivantes ou à une suspension de bactéries mortes. La population microbienne est identique dans tous les cas, excepté chez le Blé pour lequel la numération est dix fois plus élevée lorsque la "bactérisation" a été réalisée avec une suspension autoclavée (Ba).

Dans le rhizoplan, peu de changements de la flore totale apparaissent, quel que soit le traitement pour une plante donnée.

Dans l'endorhizosphère, une forte augmentation de la flore est visible chez le Blé dont les semences ont été traitées avec une suspension de cellules vivantes (Bb) par rapport aux autres échantillons. Dans le cas de la Chicorée, nous pouvons constater une baisse de la numération après stérilisation et "bactérisation" aux cellules vivantes (ESb) par rapport aux autres échantillons.

#### B. - Dénombrements de *X. maltophilia* par l'utilisation du milieu sélectif XMSM

Les souches *X. maltophilia* sont dénombrées sur le milieu sélectif XMSM par ensemencement de 200 colonies prélevées au hasard sur le milieu TSA servant aux numérations bactériennes totales (Photo 9). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage dans les histogrammes des figures 12 et 13.

Les dénombrements systématiques, réalisés dans les terres laissées sans végétation au long des expériences, réaffirment l'absence quasiment totale de *X. maltophilia* dans ce type de terre. Précisons que dès la mise en route des travaux, nous avons fait la même recherche sur cette terre ( $21,1 \times 10^6$  CFU/g - 0,1 % de *X. maltophilia*). Par contre, quelle que soit l'espèce végétale considérée, *X. maltophilia* est quasiment toujours présent, avec une fréquence d'autant plus élevée que le

9

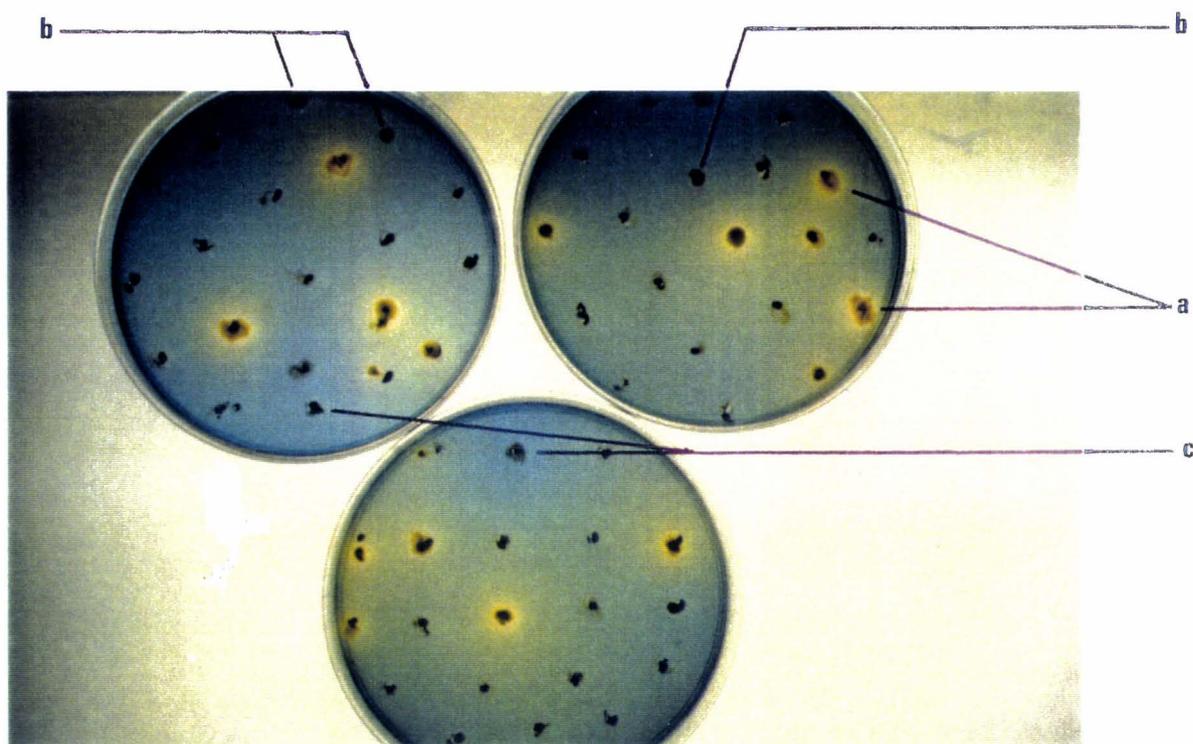
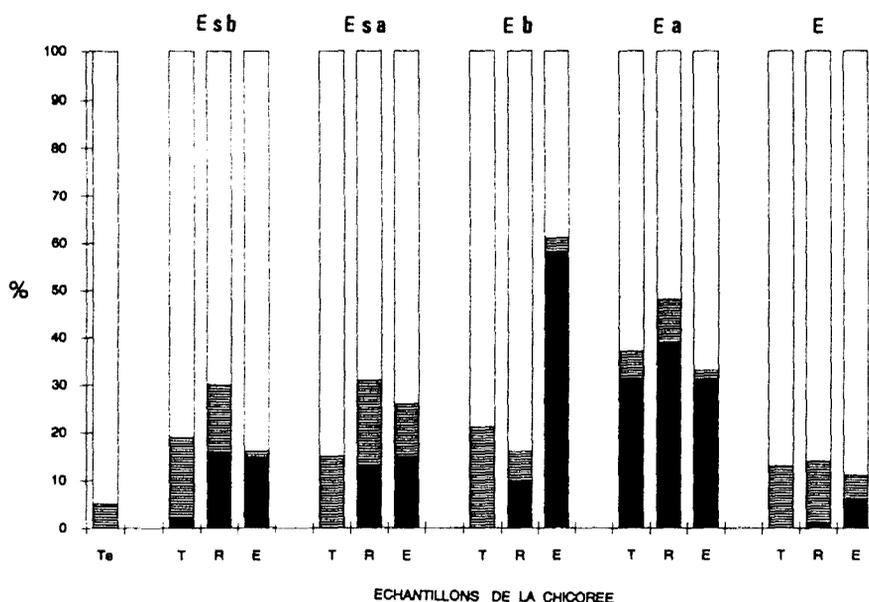
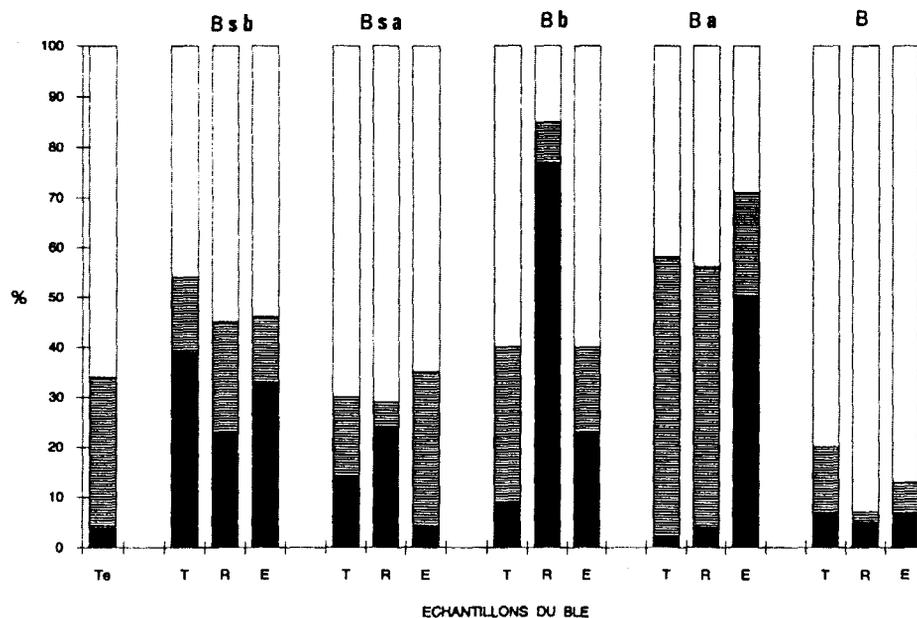


Photo 9 - Aspect des souches rhizosphériques après ensemencement du milieu sélectif XMSM.

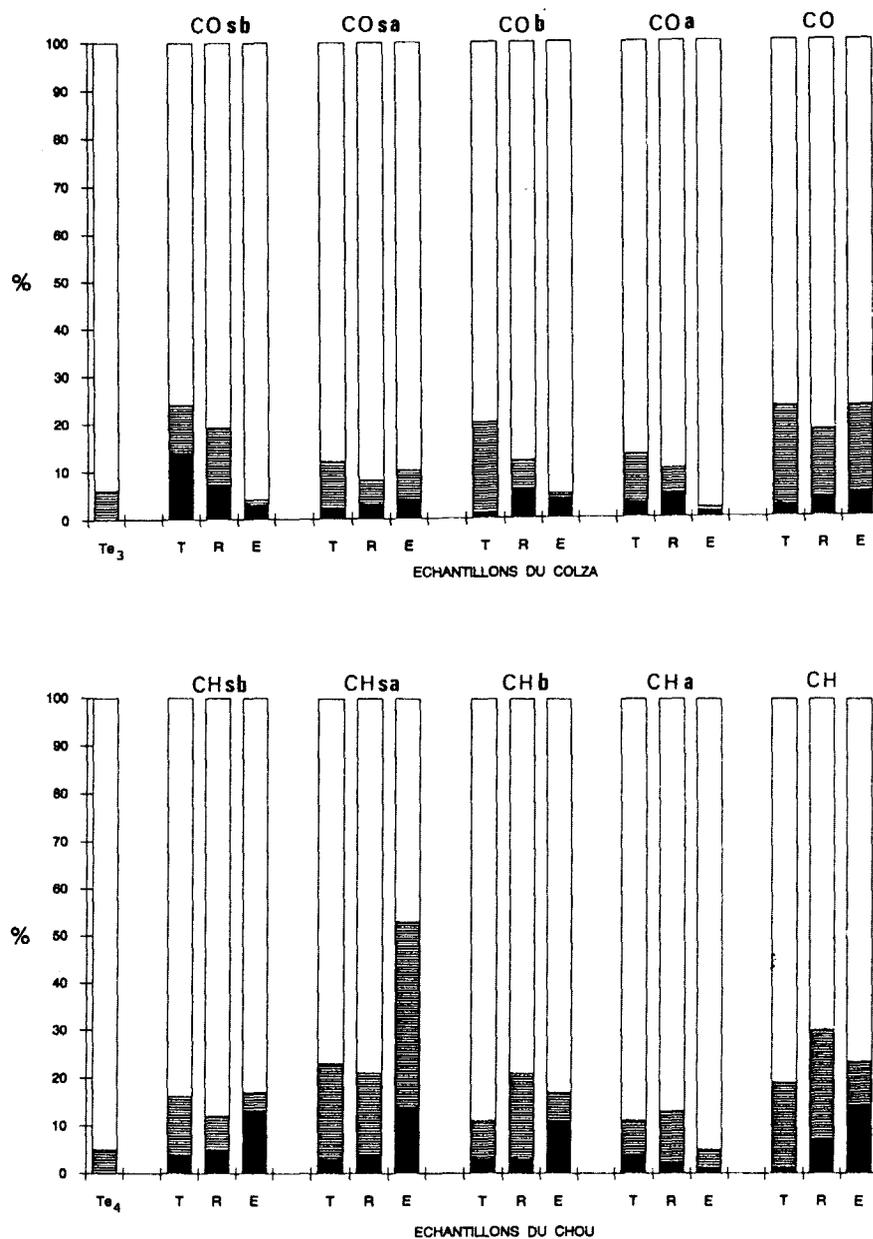
- a : exemples de colonies identifiables à X. maltophilia (acidification locale du milieu).
- b : exemples de colonies non identifiables à X. maltophilia
- c : exemples de colonies non identifiables à X. maltophilia avec alcalinisation locale du milieu.



- Souches identifiables à X. maltophilia
- ▨ Souches non identifiables à X. maltophilia
- Souches ne se développant pas sur XMSM

Figure 12 - Dénombrements des X. maltophilia dans les différents échantillons.

(T : rhizosphère proche ; R : rhizoplan, E : endorhizosphère) de Blé (B) et de Chicorée (E) dont les semences ont été traitées ou non.  
 Mêmes symboles que dans les tableaux 14 et 15.  
 Te : terre sans végétation.  
 Les pourcentages sont exprimés par rapport à 200 colonies prélevées au hasard sur le milieu TSA et ensemencées sur le milieu XMSM.



- Souches identifiables à X. maltophilia
- ▨ Souches non identifiables à X. maltophilia
- Souches ne se développant pas sur XMSM

Figure 13 - Dénombrements des X. maltophilia dans les différents échantillons rhizosphériques de Colza (Co) et de Chou (Ch) dont les semences ont été traitées ou non.

Mêmes symboles que dans les tableaux 16 et 17.  
 Te : terre sans végétation.  
 Les pourcentages sont exprimés par rapport à 200 colonies prélevées au hasard sur le milieu TSA et ensemencées sur le milieu XMSM.

prélèvement est proche, voire au sein des racines. Un gradient rhizosphérique est notable, toutefois moins net dans le cas du Blé du fait d'une population de X. maltophilia aussi importante dans la rhizosphère proche.

Dans tous les échantillonnages, l'utilisation du milieu sélectif nous a conduit à remarquer qu'outre les colonies bien identifiables à X. maltophilia (colonies orangées avec décoloration alentour du milieu, dont l'identification fut vérifiée pour certaines d'entre elles par galerie APi 20NE), d'autres colonies pouvaient se développer, montrant un tout autre aspect : exemples de colonies verdâtres, parfois très muqueuses, sans décoloration locale du milieu, exemples de colonies provoquant une alcalinisation alentour du milieu, etc... Etant donné parfois l'importance relative de ce genre de colonies, nous en avons indiqué le résultat relatif sur ces mêmes histogrammes. Sans le faire de manière systématique, nous avons procédé à quelques investigations d'identification qui aboutissaient, selon les clés associées aux galeries APi 20NE, à des espèces telles que "Pseudomonas luteola" (à présent nommé Chryseomonas luteola), P. oryzihabitans (Flavimonas oryzihabitans) et P. fluorescens. Notons l'importance de cette "population" bactérienne dans certains échantillons du Blé.

Une prolifération de la population de X. maltophilia est visible dans les échantillons rhizosphériques du Blé et de la Chicorée dont les semences ont été sensibilisées à une suspension de C17. Cette stimulation est plus importante au contact des racines. Elle est très remarquable par rapport aux plantes issues des semences non traitées.

Par contre, elle l'est moins si on se réfère aux plantes dont les semences ont été sensibilisées à la suspension bactérienne autoclavée (Ba et Ea). L'efficacité de l'autoclavage a été vérifiée. Donc, c'est sans doute un apport protéique important sous forme de débris bactériens qui peut être la raison des proliférations de X. maltophilia d'origine sauvage dans les échantillons Ba et Ea.

De même, peu de différences sont visibles entre ESb et ESa. Par contre, la prolifération de X. maltophilia au niveau des plantules de Blé, dont

les semences ont été stérilisées, est plus importante suite à la bactérisation.

Les résultats obtenus avec le Colza, Crucifère utilisée en premier lieu, n'ont montré aucun effet consécutif aux traitements des semences par rapport aux non traitements. Etonnés par ces résultats et ne connaissant rien de la provenance du Colza acheté dans le commerce ("Colza dénaturé"), nous avons, en second lieu, fait des expériences similaires avec une autre Crucifère : le Chou de Milan d'Aubervilliers race Amor (graines Caillard). Les mêmes constatations ont été faites : les différents traitements des semences restent sans effet. La répartition de X. maltophilia selon le gradient rhizosphérique est le seul phénomène constant, quasiment dans tous les cas. L'aspect physique de la graine (enveloppe cireuse) peut être soupçonné d'être un obstacle, c'est pourquoi d'autres expériences, et notamment l'étude de la spermosphère, ont été envisagées plus loin.

Curieux de voir l'évolution des résultats dans le temps au sein d'une espèce, nous avons fait les mêmes recherches au niveau de la Chicorée de Bruxelles (Ea, Eb et E) dont la végétation n'avait pas souffert, sept à huit semaines plus tard (Tab. 18). Il faut remarquer, tout d'abord, le plus souvent une diminution dans la microflore bactérienne totale, sauf pour certains prélèvements de Eb pour lesquels c'est le contraire. Ensuite, le pourcentage de X. maltophilia, dans tous les cas, est très faible. Pour un poids frais des parties aériennes équivalent, un nombre de plantules inférieur est prélevé dans Ea par rapport à Eb. Les plantules, issues de graines traitées avec une suspension autoclavée, se sont donc mieux développées que celles provenant de semences sensibilisées à la suspension de cellules mortes. Cette différence apparaissait déjà dans les résultats obtenus après 7 à 8 semaines de culture de la Chicorée.

#### C. - Localisation de X. maltophilia "in situ" dans les racines de Chicorée de Bruxelles

La possession d'anticorps polyclonaux spécifiques de la souche type C17 et le traitement de "bactérisation" des graines avec une suspension

Semences traitées (ou non traitées)		% humidité de la terre	pH de la décoction	Nb. de plantules prélevées	Poids frais des parties aériennes des plantules (g)	Numération bactérienne totale (CFU/g de matériel)	% de <u>X. maltophilia</u> *
	T	12	7,7	-	-	$37,2 \times 10^5$	0
E	R	-	6,9	37	4,2	$4,63 \times 10^5$	1
	E	-	6,5	37	5,0	$6 \times 10^5$	0
	T	11	7,8	-	-	$13,4 \times 10^7$	0
Eb	R	-	6,5	39	7,5	$30,1 \times 10^5$	0
	E	-	6,9	39	6,1	$8,5 \times 10^5$	3
	T	46	7,7	-	-	$14,8 \times 10^6$	1
Ea	R	-	8,8	23	8,8	$6 \times 10^5$	0,5
	E	-	6,8	23	6,8	$2,1 \times 10^5$	0,8

Tableau 18 - Numérations bactériennes totales et présence de X. maltophilia dans les différents échantillons.  
(T : rhizosphère proche, R : rhizoplan, E : endorhizosphère) de Chicorée de Bruxelles, après 15 semaines de culture, dont les semences ont été traitées (Ea et Eb) ou non traitées (E).

- \* : pourcentage exprimé par rapport aux 200 colonies prélevées au hasard sur le milieu TSA (utilisé pour les numérations bactériennes totales) et ensemencées sur le milieu XMSM.  
a : sensibilisation des graines avec une suspension de X. maltophilia C17 autoclavée.  
b : sensibilisation des graines avec une suspension de X. maltophilia C17.

bactérienne de cette même souche nous a permis de localiser ces bactéries par les techniques d'immunodétection dans les racines de Chicorée de Bruxelles.

X. maltophilia C17 est visible à la surface de la racine complète et se présente, à plus fort grossissement, sous forme d'alignements de bactéries au niveau des parois végétales des cellules corticales (Photos 10 et 11). Cet aspect est absent des racines des plantes provenant de semences non traitées.

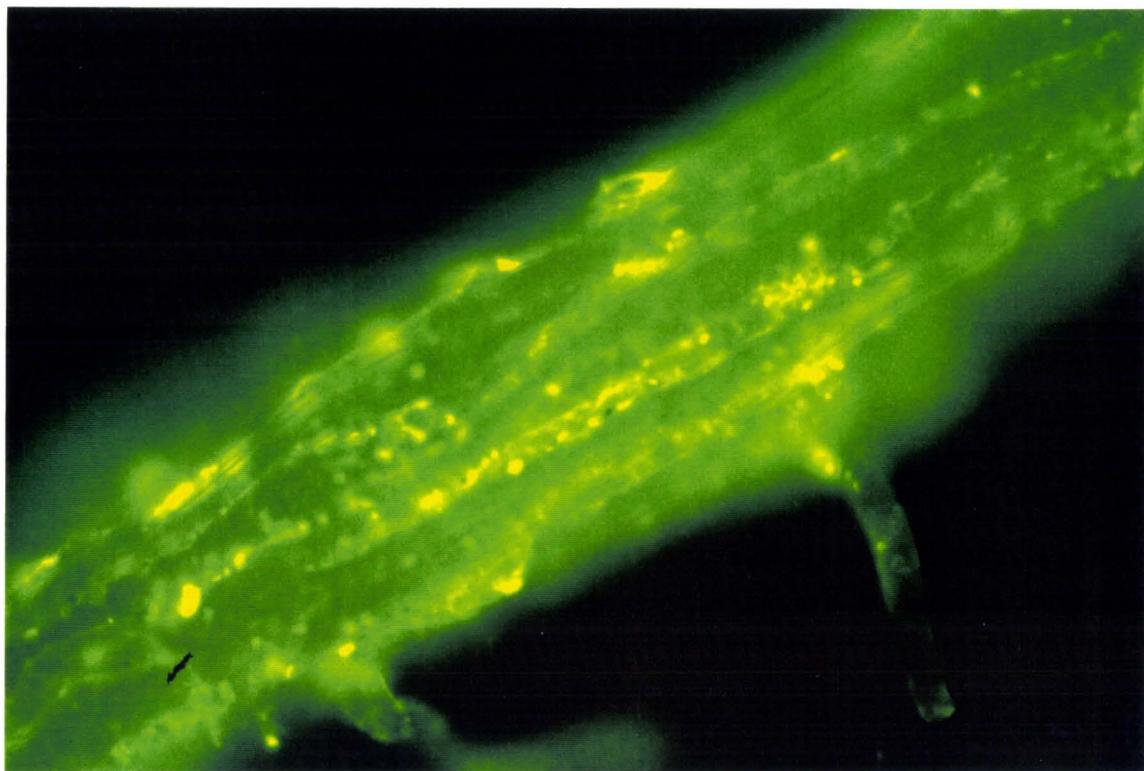
#### D. - Dénombrements des Pseudomonas fluorescents par l'utilisation du milieu FPSM

Les P. fluorescents, dénombrés sur milieu FPSM (aspect photo 12) sont à des pourcentages très faibles dans les divers échantillons (Figs. 14 et 15). Dans le cas des plantes issues des semences traitées de Blé et de Chicorée, il est remarquable que leur nombre soit très largement inférieur à celui de X. maltophilia, y compris suite au traitement avec les bactéries autoclavées. Leur répartition se fait souvent selon un gradient inverse de celui de cette espèce, puisqu'ils se situent préférentiellement dans la terre adhérente aux racines et dans le rhizoplan tandis qu'ils sont pratiquement inexistants dans l'endorhizosphère, dans les 3/4 des cas. Peu de variations de leur population sont visibles en fonction des traitements. Seules, quelques augmentations apparaissent chez le Colza et la Chicorée après stérilisation et "bactérisation". Néanmoins, ce phénomène reste tout à fait restreint.

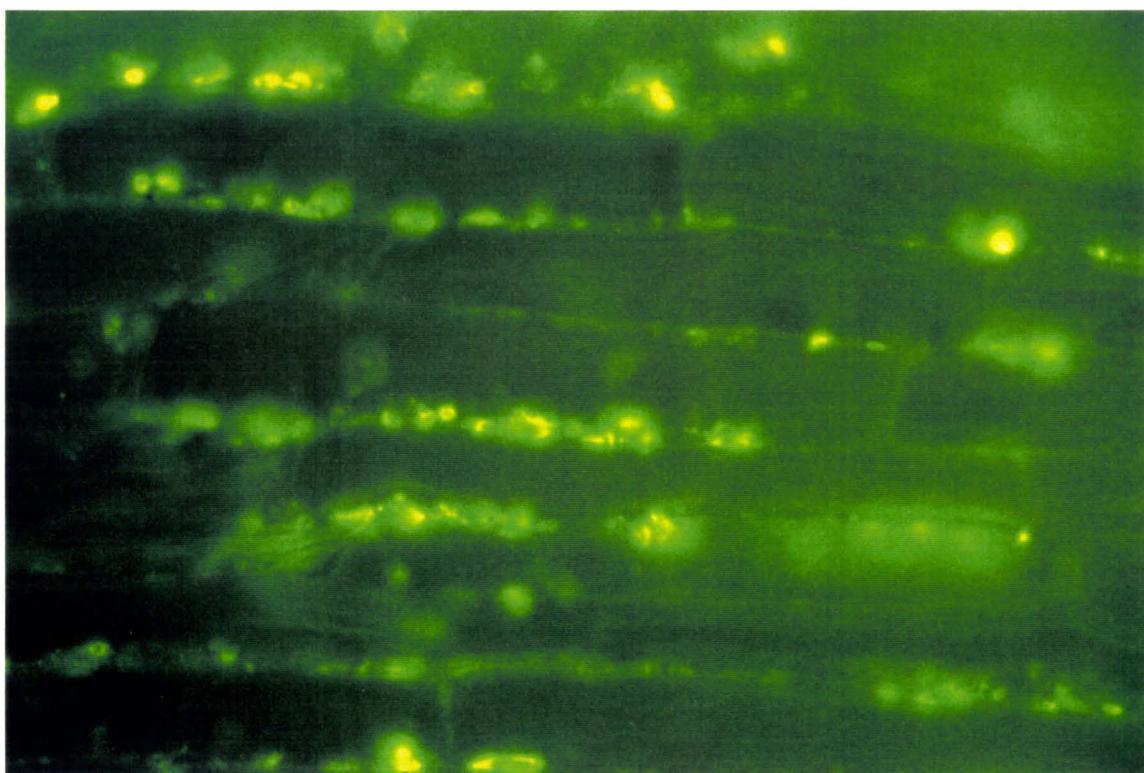
#### VIII. - DENOMBREMENT DE X. MALTOPHILIA DANS LA SPERMOSPHERE (ENVIRONNEMENT DES SEMENCES) D'ESPECES VEGETALES : BLE, CHICOREE DE BRUXELLES ET COLZA

L'environnement bactérien naturel des semences des espèces utilisées pour les cultures en serre, ainsi que celui des premiers jours de germination de celles-ci sur un support non nutritif gélosé, a également été étudié. Il pouvait permettre de trouver une explication

⑩



⑪



Images obtenues au microscope à fluorescence d'une racine de Chicorée de Bruxelles observée in toto, après "bactérisation" de la graine avec *X. maltophilia* C17.

La détection est faite à l'aide d'anticorps anti-estérase spécifiques de la souche.

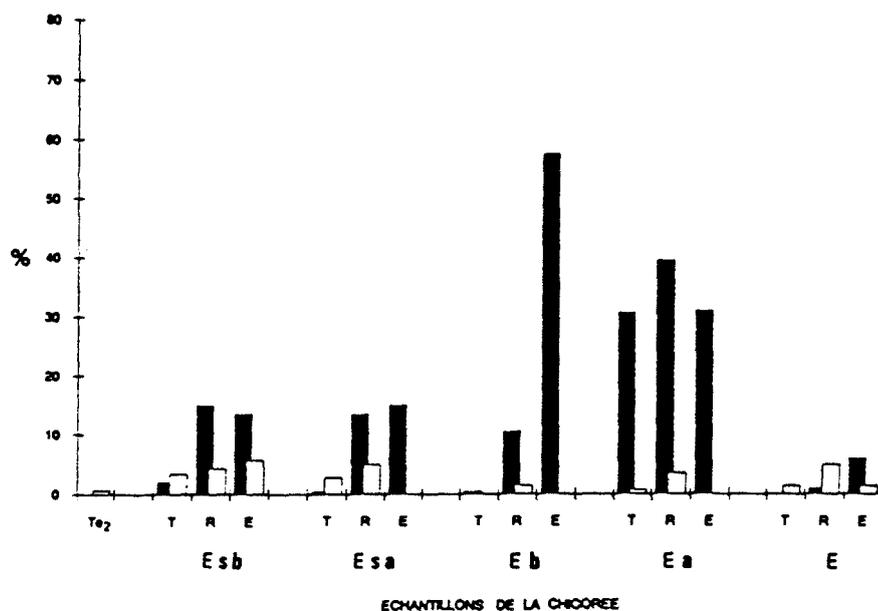
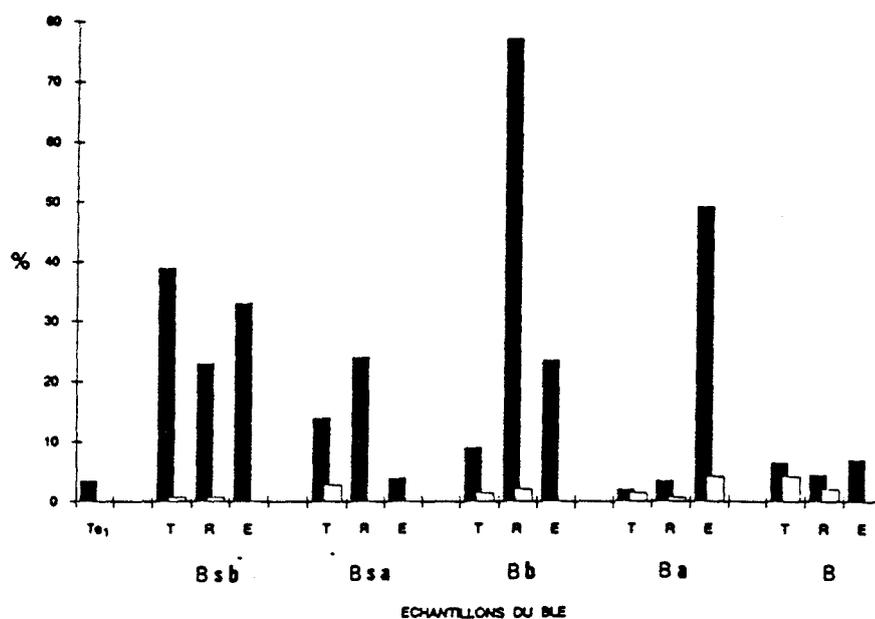
Photo 10 - Grossissement microscopique = 400 x.

Photo 11 - Grossissement microscopique = 1 000 x.

⑫



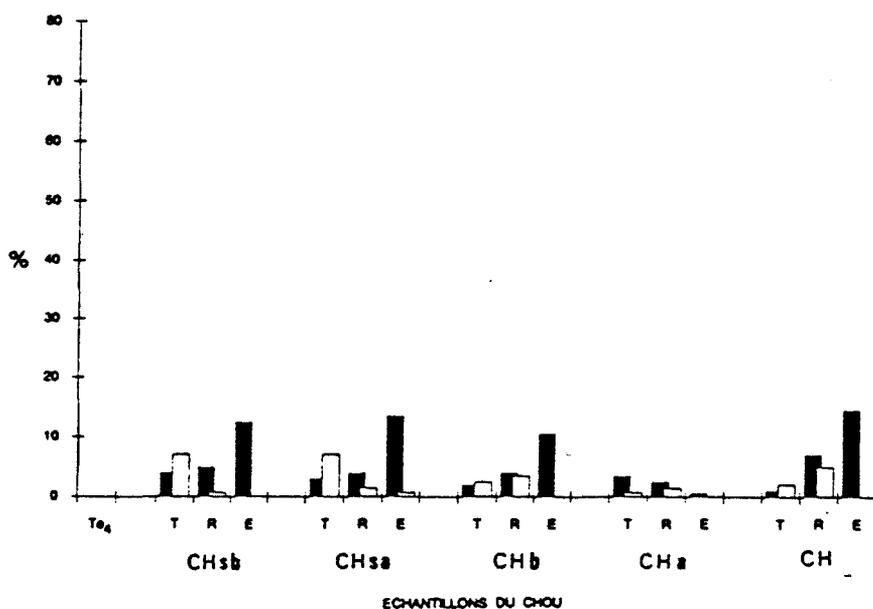
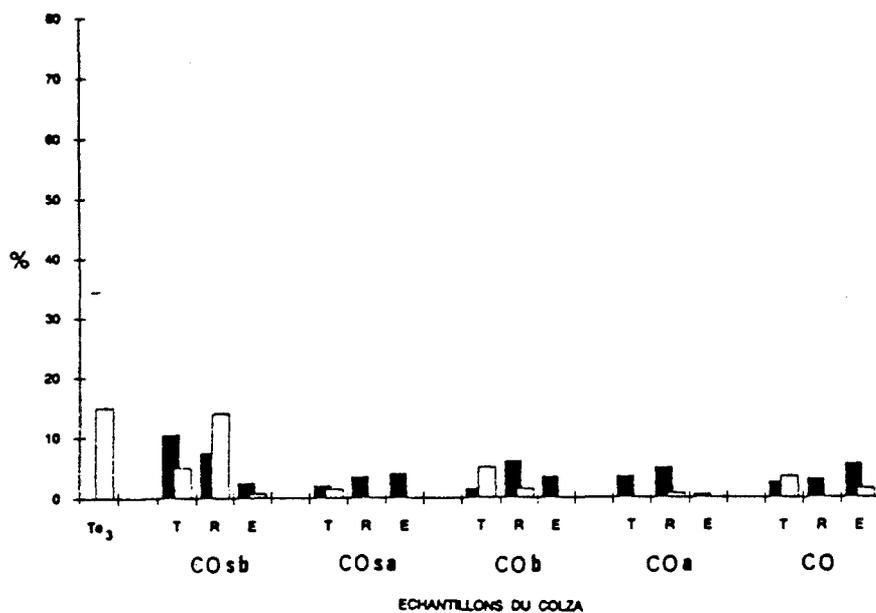
Photo 12 - Photo prise en lumière visible : la pigmentation diffusible dans le milieu FPSM des *Pseudomonas fluorescens* (PSF) et de *P. putida* (Pp) est observable sans fluorescence. *X. maltophilia* (C17) ne se développe pas.



- Souches identifiable à *X. maltophilia* sur XMSM  
 □ *Pseudomonas fluorescens* sur FPSM

Figure 14 - Dénombrements des *P.* fluorescents et de *X. maltophilia* dans les échantillons rhizosphériques du Blé (B) et de la Chicorée (E) dans les différentes conditions expérimentales.

Mêmes symboles que dans les tableaux 14 et 15. Les pourcentages sont exprimés par rapport aux nombres de colonies prélevées au hasard et ensemencées sur FPSM (pour les *P.* fluorescents) et XMSM (pour *X. maltophilia*).



- Souches identifiable à X. maltophilia sur XMSM
- Pseudomonas fluorescents sur FPSM

Figure 15 - Dénombrements des P. fluorescents et de X. maltophilia dans les échantillons rhizosphériques du Colza (Co) et du Chou (Ch) dans les différentes conditions expérimentales.

Mêmes symboles que dans les tableaux 16 et 17. Les pourcentages sont exprimés par rapport aux nombres de colonies prélevées au hasard et ensemencées sur FPSM (pour les P. fluorescents) et XMSM (pour X. maltophilia).

aux traitements des semences de Crucifères restés sans effet apparent lors des prélèvements consécutifs à une culture sur sol.

Les résultats (Tab. 19) montrent une faible prolifération bactérienne totale au niveau de toutes les semences brutes et un pourcentage de X. maltophilia notablement élevé uniquement chez les graines de Chicorée de Bruxelles (résultat confirmé par une deuxième étude plus tardive). Consécutivement à la germination des semences, les numérations bactériennes totales augmentent considérablement, les effets d'une bactérisation se répercutant partout, sauf pour la Chicorée de Bruxelles. La bactérisation des semences avec C17 conduit à une explosion de la prolifération de X. maltophilia, ce à quoi on pouvait s'attendre. Toutefois, les résultats les plus élevés, constatés chez le Colza, permettent d'estimer que la sensibilisation de ces graines, mise en doute précédemment, est effective. Par ailleurs, les faibles pourcentages consécutifs aux traitements de semences avec les bactéries autoclavées confirment l'hypothèse que lors des cultures en terre, l'apport protéique important consécutif suffisait sans doute à stimuler les quelques X. maltophilia préexistants.

Espèce végétale et état des semences	Nb. de plantules prélevées	Numération bactérienne totale <sup>1</sup>	% de <i>X. maltophilia</i> , (% d'autres souches) <sup>2</sup>
<b>Chicorée</b>			
Semences brutes	-	68 x 10 <sup>3</sup>	12 %
Semences en germination			
gE	225	54,4 x 10 <sup>8</sup>	1,3 %
gEa	225	11,3 x 10 <sup>10</sup>	2 % ( 4,6 %)
gEb	225	49,4 x 10 <sup>9</sup>	57,3 %
<b>Blé (variété Wim)</b>			
Semences brutes	-	218,4	0,6 %
Semences en germination			
gB	15	212 x 10 <sup>7</sup>	1,4 %
gBa	15	165 x 10 <sup>7</sup>	0,6 %
gBb	15	> 40 x 10 <sup>10</sup>	49,3 %
<b>Colza</b>			
Semences brutes	-	903	0 %
Semences en germination			
gCo	50	342 x 10 <sup>8</sup>	8,6 %
gCoa	50	280 x 10 <sup>8</sup>	2 % (39 %)
gCob	50	444 x 10 <sup>9</sup>	70 %

<sup>1</sup> numération exprimée en CFU/g de semences dans le cas de semences brutes et en CFU/nb. de plantules prélevées pour des semences en germination (5 jours).

<sup>2</sup> souches autres que *X. maltophilia* poussant sur le milieu XMSM.

Tableau 19 - Numérations bactériennes totales et dénombrements de *X. maltophilia* dans la spermosphère de Blé (B), de Chicorée de Bruxelles (E) et de Colza (Co).

a : semences traitées par C17 autoclavé.

b : semences "bactérisées" par C17.

Les pourcentages sont exprimés par rapport aux 150 colonies prélevées au hasard sur le milieu TSA et ensemencées sur XMSM.

D I S C U S S I O N

## I. - COMPARAISON DE SOUCHES DE XANTHOMONAS MALTOPHILIA DE DIFFERENTES ORIGINES ET DE SOUCHES POUVANT ETRE APPARENTEES A CETTE ESPECE

Les propriétés d'une estérase liée à la membrane externe de Xanthomonas maltophilia ont été étudiées par DEBETTE et PRENSIER (1989). La présence d'une telle enzyme membranaire chez cette espèce est un fait important dans la mesure où de nombreuses activités enzymatiques sont connues pour être associées à la membrane cytoplasmique (CLAUS et coll., 1985) mais peu à la membrane externe des bactéries à Gram négatif. De plus, depuis les travaux de NORRIS (1962), les estérases constituent les systèmes enzymatiques les plus fréquemment étudiés comme critère de distinction en Taxonomie bactérienne (EL SHARKAWY et HUISINGH, 1971 ; PICARD et GOULLET 1984, 1987, 1990). Chez les Entérobactéries, ces enzymes ont permis la discrimination de plusieurs taxons et la différenciation au niveau spécifique et infraspécifique (GOULLET, 1981 ; GOULLET et PICARD, 1984). L'analyse électrophorétique des estérases permet de distinguer les souches d'après leur spécificité d'activité sur plusieurs substrats et d'après leur mobilité électrophorétique, tandis que des enzymes telles que des oxydoréductases et des transférases ne peuvent être différenciées que sur un seul substrat (SELANDER et coll., 1986).

L'analyse comparée des estérases de X. maltophilia a été réalisée par DEBETTE (1987) sur les 4 souches C17, C28, P1 (ATCC 13637, souche type) et P2 (ATCC 17806). Certaines caractéristiques discriminatives sont apparues : ainsi la souche type P1 se différencie-t-elle des autres souches par une mobilité légèrement plus faible du complexe estérasique dans un champ électrique. Cette distinction est confirmée par les résultats d'une isoélectrofocalisation. C28 et P2 (ATCC 17806) montrent une totale similitude dans le nombre de bandes et leurs valeurs de pI et C17 offre un profil très proche. Par contre, P1 s'en distingue par un nombre de bandes plus important avec des valeurs de pI moins acides. Etant donné la valeur taxonomique reconnue des estérases et les problèmes taxonomiques suscités par Xanthomonas maltophilia, il était intéressant de comparer de cette façon un nombre plus important de souches. De plus, l'estérase de X. maltophilia est active sur des

substrats variés et réagit intensément sur les esters à chaîne courte du  $\beta$ -naphthol.

#### A. - Difficultés d'extraction de l'estérase

L'estérase de X. maltophilia présente l'inconvénient d'être liée à la membrane externe et d'être très hydrophobe. DEBETTE et PRENSIER (1989) ont utilisé le Triton X-100, détergent anionique se révélant le plus efficace pour solubiliser l'enzyme. Il a déjà été employé pour la solubilisation de macromolécules insolubles telles que les protéines membranaires (HELENIUS et SIMONS, 1975 ; HEARING et coll., 1976 ; TANFORD et REYNOLDS, 1976). Le Triton présente l'avantage de solubiliser les protéines tout en préservant leur structure tridimensionnelle et leur activité biologique. Toutefois, ce détergent est difficile à manipuler du fait de son faible niveau de concentration micellaire et de sa grande faculté d'agrégation (HACKENBERG et KLINGENBERG, 1980).

Quand le détergent, petite molécule amphiphile, est mélangé aux membranes, ses terminaisons hydrophobes ont tendance à se lier aux parties hydrophobes des protéines membranaires en déplaçant les molécules lipidiques. Comme l'autre partie de la molécule du détergent est hydrophile, cette association aboutit à solubiliser les protéines membranaires sous forme de complexe "détergent-protéine".

Pour extraire des protéines membranaires pouvant former un complexe avec des lipides, diverses méthodes peuvent être utilisées : des méthodes physiques telles que la presse de French ou le sonicateur pour casser les cellules et solubiliser les protéines, des méthodes chimiques (extraction avec de la soude, agents chélateurs, solvants organiques, ...) ou des méthodes enzymatiques (TZAGOLOFF et PENEFSKY, 1971). Contrairement à DEBETTE et PRENSIER (1989), qui ont utilisé une presse de French pour l'extraction de l'estérase, nous avons réalisé une sonication des cellules bactériennes, notre choix étant guidé par des raisons pratiques. En effet, CARLONE et coll. (1986) ont montré la rapidité de ce procédé pour l'extraction de protéines extramembranaires insolubles associées à un détergent chez différentes espèces de

Haemophilus. Le traitement aux ultrasons est couramment utilisé par de nombreux auteurs dans l'isolement d'enzymes variées et notamment d'estérases (EL SHARKAWY et HUISINGH, 1971 ; HA et KOMAGATA, 1984 ; NISHIMURA et coll., 1988 ; PICARD et GOULLET, 1990 ; CULLMAN, 1991). L'efficacité de ce traitement n'est pas semblable à celle de la presse de French, en particulier en raison d'un échauffement plus important lors de son déroulement. La comparaison de ces deux méthodes a été réalisée pour la souche type ATCC 13637. Une légère différence d'activité estérasique est obtenue, l'activité étant sensiblement plus faible dans les extraits issus de la sonication. Toutefois, cette différence reste peu significative.

L'activité estérasique obtenue dans les "extraits dits solubles" (S3) est produite par les molécules enchâssées dans la membrane, qui sont libérées lors de la sonication des cellules. Toutefois, de l'activité est encore détectée dans le culot membranaire. Des molécules estérasiques y étant encore associées, une extraction est réalisée avec du Triton X-100. Comme l'ont montré OKHAWA et coll. (1979), l'association du détergent avec le sel  $Mg^{2+}$  permet la solubilisation des protéines de la membrane interne tandis que celle du Triton EDTA facilite plutôt celle des protéines associées à la membrane externe.

#### **B. - Caractérisation du complexe "estérase-Triton" des différentes souches**

Les extraits issus des différentes étapes de l'extraction se comportent tous de manière identique en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ce qui indique que notre extraction est très progressive. La révélation de l'activité estérasique sur les différents substrats en une seule bande au même niveau dans le gel montre que c'est la même enzyme qui hydrolyse les cinq substrats. Contrairement à PICARD et GOULLET (1990) et GOULLET et PICARD (1991) qui obtiennent, respectivement chez Acinetobacter et Pseudomonas aeruginosa, des enzymes différentes hydrolysant divers substrats, seul le critère de mobilité intervient dans notre étude comparative.

La technique d'isoélectrofocalisation permet, par rapport à l'électrophorèse zonale, l'observation de plusieurs bandes (la plupart du temps 2 majeures et 2 mineures) avec le  $\beta$ -naphthyl acétate. Ces bandes se retrouvent généralement lors de la révélation sur les autres substrats, avec une intensité de coloration plus faible. Elles peuvent correspondre à l'expression d'isoenzymes, c'est-à-dire à des enzymes ayant les mêmes capacités catalytiques mais résultant de l'expression de gènes de structure différente (MOSS, 1982) ou à des formes multiples d'enzymes.

Une grande majorité des souches (77 %) présente des estérases aux caractéristiques semblables : mobilité électrophorétique relative (Rf) entre 30 et 55 et point isoélectrique (pI) compris entre les valeurs de pH 5 et 6. Nous constatons la présence dans cette zone majoritaire de 29 X. maltophilia dont C17, C28, P1 (ATCC 13637) et P2 (ATCC 17806), souche type de P. melanogenum. Les résultats de DEBETTE (1987), concernant le rapprochement de C17, C28 et P2 et la différence de P1, sont ici confirmés.

11 souches apparentées appartiennent également à ce groupe :

- les quatre Alcaligenes d'origines variées (A1 1, A1 2, A1 3, A1 4) ;
- Ko (ATCC 17807), souche isolée par IIZUKA et KOMAGATA (1963) dans un rizière au Japon sous le nom de P. melanogenum et considérée comme un synonyme de X. maltophilia par KOMAGATA et coll. (1974) ;
- Su4 (LMG 10884), Su5 (LMG 10885) Su6 et Su7 (LMG 10886<sup>t1</sup> et <sup>t2</sup>), souches isolées l'une d'une culture d'enrichissement en phénol et les autres d'engrais et caractérisées par IKEMOTO et coll. (1980) ;
- P. hibiscicola (Ph) ;
- P. betle (Pb).

Ces deux dernières espèces ont été classées comme espèces phytopathogènes atypiques du genre Pseudomonas (YOUNG et coll., 1978). Par les hybridations ADN/ARNr, DE VOS et coll. (1985) ont montré l'appartenance de ces souches au même groupe que Xanthomonas maltophilia, démontrant ainsi une forte parenté entre ces espèces, déjà suggérée par BRADBURY (1984).

12 souches se distinguent par des estérases aux caractéristiques particulières :

- la souche médicale HA est la seule dont l'estérase a un  $R_f < 30$  ;
- les souches rhizosphériques : B5, E18, RB52, RB76, les souches médicales O et F, P. boreopolis, P. pictorum et Su1, Su2, Su3 ont des estérases aux  $R_f \geq 55$  et aux  $pI < 5$ .

Après leur isolement par SHIGA (1957) et KOMAGATA et OGAWA (1974), Su1, Su2 et Su3 avaient été classées dans le genre Flavobacterium. Elles furent ensuite identifiées à Xanthomonas maltophilia par IKEMOTO et coll. (1980) qui montrèrent, en plus, leur non-exigence en méthionine.

P. pictorum et P. boreopolis sont des souches toutes deux isolées du sol par enrichissement avec des composés aromatiques, et classées dans la section V du genre Pseudomonas dans la première édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (PALLERONI, 1984). Ces deux souches sont restées non classées lors d'une analyse numérique phénotypique réalisée par VAN DEN MOOTER et SWINGS (1990). P. pictorum était néanmoins assez proche du phénon contenant X. maltophilia tandis que P. boreopolis présentait une lointaine parenté avec X. campestris.

### C. - Classification phénotypique

#### 1 - Caractéristiques enzymatiques

Les souches présentent une bonne uniformité de leurs activités enzymatiques puisque sur 53 caractères étudiés, 24 sont identiques pour toutes.

Parmi ceux-ci, citons évidemment des caractères servant à l'identification de X. maltophilia : hydrolyse de l'esculine, présence de phosphatases acide et alcaline, absence de formation d'indole, de fermentation du glucose, d'uréase, d'arginine dihydrolase et de cytochrome oxydase, assimilation du maltose, ... C'est l'occasion de faire remarquer que l'absence de cytochrome oxydase est une propriété sujette à contradictions, comme le signalait déjà DEBETTE (1987). La

réaction oxydasique peut être faible ou négative (PALLERONI, 1981, 1984 ; RICHARD, 1983 ; SWINGS et coll., 1983). Toutefois, 71 % des souches sont indiquées comme oxydase positives (VAN DEN MOOTER et SWINGS, 1990) ou la majorité des souches (PALLERONI et BRADBURY, 1993). Ces différences d'appréciations peuvent être dues à la sensibilité des réactifs utilisés (HOLMES et coll., 1979). En ce qui concerne nos résultats, le test employé ne nous a jamais donné de réponses douteuses. D'autres résultats sont des caractéristiques déjà signalées chez X. maltophilia par certains auteurs : absence de  $\beta$ -glucuronidase et de cystine arylamidase (O'BRIEN et DAVIS, 1982), présence de  $\beta$ -galactosidase (GILARDI, 1976 ; VON GRAEVENITZ, 1973 ; LOWE et INGLEDEN, 1975). Par contre, LAPAGE et coll. (1973) n'avaient pas décelé cette dernière enzyme chez X. maltophilia. Ces résultats divergents sont sans doute liés à la nature différente des substrats utilisés (HAYWARD, 1977). De même, la dégradation de l'esculine n'implique pas forcément celle de l'arbutine. Bien que ces deux composés soient dégradés par des enzymes semblables, BARNETT et coll. (1956) ont montré, au cours d'une étude sur les levures, qu'un organisme capable d'hydrolyser un glucoside n'en dégrade pas forcément un autre. Différentes  $\beta$ -glucosidases peuvent être mises en jeu.

La dégradation du Tween 80 et la présence d'une gélatinase constituent également des tests de diagnostic dans l'identification de X. maltophilia (VON GRAEVENITZ, 1973 ; GILARDI, 1976). Il est notable que P. pictorum soit la seule souche à ne pas manifester ces propriétés. Rappelons que cette espèce était déjà bien à l'écart de l'ensemble des X. maltophilia dans l'étude électrophorétique des estérases. Les résultats concernant l'hydrolyse de la tributyrine sont moins uniformes que ceux sur la dégradation du Tween. NORD et coll. (1975) avaient eux-mêmes obtenu une hétérogénéité dans leurs travaux. Selon HOWE et WARD (1976), la digestion de la tributyrine est déterminée par une enzyme différente de celle qui hydrolyse le Tween. En effet, ce dernier est un substrat spécifique des estérases, ces enzymes hydrolysant les liaisons esters de divers substrats lipidiques solubles. La tributyrine est un substrat plus sélectif dont l'hydrolyse indique la présence de lipases, enzymes capables de catalyser les esters du glycérol en émulsion.

## 2 - Regroupements phénotypiques

Au niveau de similitude que nous avons choisi (94 %), trois groupes sont individualisables, dont deux contiennent 65 % du total des souches. Les deux souches de collection P1 (ATCC 13637) et P2 (ATCC 17806) se situent dans le même groupe que notre souche type C17 et que C28. Ko (*P. melanogenum*, comme P2) appartient également à ce groupe, tout comme *P. hibiscicola*. Ces souches sont donc très proches les unes des autres tant phénotypiquement que par leurs estérases. *P. betle*, autre souche apparentée à *X. maltophilia* (DE VOS et coll., 1985), est positionnée dans le second groupe. Toutefois, celui-ci est relié au groupe I à un niveau de similitude de 93,5 %, donc très proche. Les résultats de notre étude sont semblables à ceux obtenus par VAN DEN MOOTER et SWINGS (1990) pour lesquels *X. maltophilia*, *P. betle* et *P. hibiscicola* formaient un groupe homogène à 93,7 % de similitude. VAN ZYL et STEYN (1990) ont trouvé 99 % de similitude entre *X. maltophilia* et *P. hibiscicola* dans une étude phénotypique portant sur les *Pseudomonas* et *Xanthomonas* phytopathogènes. Faisons toutefois remarquer que, dans ce travail, ne figurait qu'un seul représentant de chacune des deux espèces ci-dessus nommées, ce qui peut expliquer ce fort pourcentage. Cette étroite parenté a été confirmée par une analyse électrophorétique des protéines totales, par ces mêmes auteurs.

Dix souches restent non classées par l'analyse phénotypique. Il est remarquable que six d'entre elles étaient déjà repérées par les caractéristiques particulières de leurs estérases : Su1, Su2, Su3, *P. pictorum*, *P. boreopolis* et RB76. Cette dernière est toutefois assez proche du phénon III, auquel elle se rattache à un niveau de similitude de 93,6 %. Les quatre autres souches non classées ont des positions variables dans l'analyse électrophorétique des estérases puisque Su6 et Su7, souches dont la non-exigence en méthionine a été révélée par IKEMOTO et coll. (1980), sont à la limite du cadre établi, notamment par la valeur du pI (pH = 5), N se situe à la périphérie et S53 est par contre bien centrée. La souche A1 2 est également isolée et positionnée à part dans le dendrogramme entre les phénons II et III. Elle se rattache toutefois aux phénons I et II à un niveau de similitude de 93,3 %. Remarquons que les autres *Alcaligenes* appartiennent toutes au

phénon II. A1 3 et A1 4 possèdent les mêmes caractéristiques d'estérases et de phénotypes. Ces deux souches, ici apparemment identiques, proviennent d'isolements d'un Poisson (la Raie) dans un même laboratoire (cf. Tab. 7).

A quelques exceptions près, nous pouvons dire que les phénons I, II et III regroupent la plupart des souches situées dans le cadre établi virtuellement lors de l'analyse des estérases. A côté d'une concordance totale entre les résultats apportés par les deux approches, certaines contradictions apparaissent toutefois. Si l'éloignement de P. pictorum et de P. boreopolis, de Su1, Su2, Su3 et de RB76, remarqué par l'étude des estérases, est confirmé par l'analyse phénotypique, d'autres souches telles que RB52, B5, E18, O, F et HA, "marginales" par leurs estérases, sont classées phénotypiquement. Inversement, N et S53, non classées dans le dendrogramme phénotypique, appartenaient au groupe majoritaire dans l'étude des estérases. Citons également des exemples de souches présentant des caractéristiques estérasiques semblables : A1 1 et S3, A1 2 et P<sub>2</sub>2 ; S50 et S53 et pourtant appartenant à des phénons différents.

L'exigence en méthionine ou en un autre acide aminé soufré chez X. maltophilia fut reportée en premier par IIZUKA et KOMAGATA (1964) et confirmée par la suite par de nombreux auteurs (STANIER et coll., 1966 ; GILARDI, 1968 ; SHIGETA et ISHIDA, 1974 ; YOSHIDA et coll., 1974). Cette caractéristique constitue une aide dans l'identification des souches de cette espèce. Toutefois, HUGH et GILARDI (1974) reportaient que 4 % des souches de leur étude se révélaient non-exigeantes en méthionine. IKEMOTO et coll. (1980) identifiaient également des X. maltophilia, qualifiés d'abord de Flavobacterium, non-exigeants en méthionine (Su1, Su2, Su3 et Su6). Lors de la caractérisation de ces souches et d'autres bactéries exigeantes par des homologues en ADN et par l'étude de leur composition en acides gras, ces auteurs ont différencié deux biovars au sein de l'espèce X. maltophilia : l'un comprenant les souches exigeantes et l'autre les souches non exigeantes. Nous n'avons pas constaté, et ceci quelle que soit la source carbonée présente dans le milieu, la non-exigence en méthionine de Su1 et Su3 remarquée par IKEMOTO et coll. (1980).

L'exigence en méthionine est une propriété très variable selon les conditions de croissance. Ainsi, LOWE et INGLEDEW (1975) ont montré l'influence de la nature de la source de carbone sur la croissance des bactéries. Dans notre étude, certaines souches sont effectivement non exigeantes avec un sucre mais exigeantes avec un autre. La différence de concentration du substrat carboné peut également expliquer les résultats autres que nous obtenons à propos des exigences de Su1 et Su3 : IKEMOTO et coll. (1980) ont incorporé une concentration en sucre de 1 % tandis que nous avons utilisé une quantité moindre (0,2 %). Nous constatons que les souches non exigeantes d'après IKEMOTO et coll. (1980) ainsi que deux souches sauvages : l'une médicale N, l'autre rhizosphérique S53 non exigeantes en méthionine dans certaines conditions nutritionnelles, restent non classées après notre étude phénotypique. Il semble donc que le caractère "non exigence en méthionine" ait un certain poids lors de la classification phénotypique. Nos résultats ne contredisent donc pas la répartition en deux biovars au sein de l'espèce X. maltophilia, établie par IKEMOTO et coll. (1980).

D'autres caractères sont importants pour la classification phénotypique. Ainsi, la réduction des nitrates et l'hydrolyse des PNPG sont les principales différences entre les groupes phénotypiques.

## II. - INFLUENCE DE L'ORIGINE D'ISOLEMENT SUR L'HOMOGENEITE DE L'ESPECE

Les recherches précédentes ont permis de comparer un certain nombre de X. maltophilia et de souches apparentées ou susceptibles de l'être par l'analyse électrophorétique de leurs estérases et par une analyse numérique phénotypique dans l'intention de préciser leur position taxonomique.

Dans un second temps, les mêmes recherches ont été réalisées sur toutes les souches sauvages identifiées à X. maltophilia et provenant de deux origines : médicale et rhizosphérique, afin de découvrir une relation éventuelle entre le polymorphisme estérasique de ces bactéries et

l'origine de leur isolement comme cela a déjà été fait pour Escherichia coli (GOULLET et PICARD, 1986). De cette façon, il était intéressant de noter l'influence de la source d'isolement sur une certaine homogénéité de l'espèce.

#### A. - Caractérisation des estérases

L'analyse estérasique montre un bon regroupement des souches dans la zone de pH et de Rf déjà établie auparavant puisque 86 % des individus étudiés s'y trouvent. Remarquons dans cette analyse que, P1, souche type d'origine hospitalière, est très proche de 11 souches médicales sur les 17 étudiées (pI d'un pH compris entre 5,5 et 6). Toutes les souches RB (excepté trois d'entre elles) sont regroupées dans une zone restreinte, bien distincte de la précédente, délimitée par un pH entre 5,1 et 5,6 et un Rf compris entre 42 et 55, où l'on trouve déjà C17, C28 et P2, toutes trois d'origine rhizosphérique. Les autres souches rhizosphériques, issues d'un même prélèvement fait chez la Chicorée de Bruxelles (souches "S"), sont très proches les unes des autres et se distinguent des souches RB par un Rf plus faible. Par contre, les bactéries de la catégorie P1 (provenant d'un autre prélèvement rhizosphérique) ont des caractéristiques estérasiques très proches de la souche type P1 (ATCC 13637) et des souches médicales précédemment citées.

Quelques bactéries présentent, bien sûr, des caractéristiques d'estérases plus "marginales" : HA est encore la seule souche à posséder une estérase avec un Rf aussi faible. Quatre souches médicales (C, L, O et F) présentent une mobilité électrophorétique relative supérieure à 55. C'est également le cas pour 5 souches rhizosphériques : E18, B5, RB52, 67 et 76.

Il est remarquable qu'aucune estérase n'ait un point isoélectrique inférieur au pH 5 contrairement à ce que nous avons obtenu dans la première partie de ce travail. Ceci nous permet de penser que cette valeur de pH pourrait être une limite intéressante dans la définition de l'espèce X. maltophilia. Mais, nous constatons également qu'aucune valeur ne dépasse le pH de 6 et ceci dans les deux études. Cette limite supérieure est aussi à considérer.

## B. - Classification phénotypique

A 94 % de similitude (nombre arbitrairement choisi dans l'analyse précédente), 6 groupes phénotypiques sont individualisés. Un ordre est constaté dans la répartition des souches d'origine rhizosphérique. Les phénons I, II, III et IV contiennent essentiellement les souches provenant de la Chicorée. C17, C28, P1 appartiennent au phénon I. Dix souches pathogènes sont également réparties dans ces 4 groupes. La plupart des RB sont rassemblées dans le phénon VI. Quelques-unes d'entre elles sont cependant dispersées : RB52 appartient au phénon I, RB76 et RB54 sont dans le phénon IV. Il semble que nous ayons fait le bon choix dans la sélection de 3 souches RB pour le travail précédent, étant donné que les 3 individus choisis se situent dans cette étude dans les 3 phénons les plus importants. Trois autres RB (20, 44 et 77) sont non classées dans le dendrogramme. Quatre autres souches le sont également : S53, N, G et K. Nous constatons que ces 7 souches ont des caractéristiques estérasiqes tout à fait conformes au grand ensemble des souches. D'autres exemples de souches semblables d'après leurs estérases mais différentes phénotypiquement peuvent être donnés : B5 et E18, P1-34 et RB47, P<sub>2</sub>2 et S53, G et I.

Parmi les souches non classées phénotypiquement, nous retrouvons les souches N et S53 dont la non-exigence en méthionine est une caractéristique. RB58 (à l'extrémité du groupe VI) et RB44 non classée sont également non-exigeantes dans au moins une condition. Ces observations confirment l'importance, déjà remarquée précédemment, de ce caractère dans la classification phénotypique. De même, à un niveau de coupure de 93,4 %, deux ensembles (l'un regroupant les phénons I, II et III et l'autre IV, V, VI) se différencient par le caractère de réduction des nitrates qui avait déjà permis la distinction des groupes dans la première analyse phénotypique.

Signalons que **toutes** les souches sauvages peuvent être regroupées à un niveau de similitude voisin de 91 %. Or, pour cette même valeur, seules les souches de la collection "Lille-Gand", étant marginales par leurs caractéristiques estérasiqes, restent inclassables (cf. Fig. 7, p. 86 ).

Ces remarques montrent de toute évidence que seules les souches se trouvant marginalisées dans les deux approches (phénotypique et analyse estérasique) peuvent présenter une parenté douteuse avec l'espèce X. maltophilia. Cette suspicion demanderait alors d'être confirmée par d'autres approches, telles que celles réalisées par l'équipe de J. SWINGS à Gand. Quant aux souches mises à l'écart par une seule approche (phénotypique ou analyse estérasique), le doute sur leur parenté ne doit pas être retenu.

De ce fait, cette étude restreinte aux souches médicales et rhizosphériques permet d'observer une certaine homogénéité parmi les souches rhizosphériques. Celle-ci est d'autant plus nette que les souches sont issues d'un même prélèvement. Il est possible, cependant, qu'elle reflète les risques d'isoler des germes issus d'un même clone. Pourtant, les colonies, bien isolées sur le milieu nutritif, sont prélevées tout à fait au hasard sur des boîtes de Pétri différentes, réduisant ainsi la probabilité qu'elles soient issues d'une seule et même cellule. De plus, C17, C28 et P2, qui proviennent de prélèvements différents, bien antérieurs, sont très proches les unes des autres et présentent, d'une part, les mêmes caractéristiques d'estérases que les RB et sont, d'autre part, très proches phénotypiquement des souches de la catégorie P1. En ce qui concerne les souches médicales, nous pouvons parler d'une certaine hétérogénéité aussi bien en estérases qu'au niveau phénotypique. Cette variabilité peut peut-être s'expliquer par le fait que chaque bactérie a été isolée sur un patient différent.

Enfin, aucune souche dans cette étude n'est mise à l'écart par les deux approches.

### III. - PRECISIONS SUR L'HABITAT PREFERENTIEL DE X. MALTOPHILIA D'ORIGINE TELLURIQUE

Lors de la recherche de souches sauvages de X. maltophilia d'origine rhizosphérique, nous avons constaté que cette bactérie était toujours plus fréquente au contact étroit de l'appareil racinaire plutôt que dans la terre adhérente aux racines (Chicorée de Bruxelles : Tab. 8).

De plus, un dénombrement exceptionnellement important a été remarqué lors d'un prélèvement effectué dans l'endorhizosphère du Blé en épiaison (36 % : Tab. 8). A la suite de ces observations, nous avons cherché à préciser l'habitat préférentiel de X. maltophilia par différentes approches.

**A. - Evolution de la population sauvage de X. maltophilia au cours du cycle de végétation de Blé d'hiver en champs**

De nouveau et de manière générale, X. maltophilia est plutôt présent au contact des racines. Dans cette zone, les exsudats et les sécrétions libérés, le mucigel, les cellules sénescents (ROVIRA et coll., 1979), riches en éléments organiques créent certainement un environnement favorable à la croissance de la bactérie. Un fort pourcentage est obtenu au tout début du développement de la plante. Cette colonisation précoce de X. maltophilia a déjà été reportée par LAMBERT et coll. (1987) dans la rhizosphère du Maïs, par LEYNS et coll. (1990) dans celles de la Chicorée, de l'Orge et du Soja et enfin par MILLER et coll. (1990) chez le Blé. Toutefois, il ne semble pas y avoir de relations directes entre la prolifération de la bactérie et le stade de croissance de la plante. En effet, lors de cette expérience, un faible pourcentage de X. maltophilia a été obtenu au stade de l'épiaison. Or, le prélèvement effectué sur du Blé au même stade, en première partie de ce travail, avait fourni un nombre très important de souches. Il est à noter cependant, que le champ de Blé avait subi un traitement fongicide une semaine avant le prélèvement ayant révélé une faible colonisation par X. maltophilia. Or les exsudats fongiques contribuent avec les exsudats racinaires à apporter des nutriments disponibles dans les environnements naturels pour lesquels s'exerce une compétition bactérienne intense (SCHER et coll., 1985).

Ces stimulations occasionnelles de X. maltophilia au niveau du Blé rappellent des observations similaires de DEBETTE et coll. (1983) au voisinage des racines de Blé, d'Avoine et de Maïs, au cours d'expériences en serre. Les auteurs pensaient alors à des perturbations liées aux conditions optimales de croissance utilisées. Il ne semble pas que ce soit une raison à retenir puisque les mêmes proliférations fortuites sont constatées en champ.

Des expériences en serre ont été ensuite réalisées sur 4 types de plantes, de manière à pouvoir suivre les effets consécutifs à une "bactérisation" ou trempage des semences dans une suspension de X. maltophilia C17 en phase exponentielle de croissance, soit en utilisant les semences brutes, soit après les avoir stérilisées superficiellement. Les témoins étaient constitués par des lots de semences identiques "traitées" par une suspension bactérienne préalablement autoclavée (DE FREITAS et GERMIDA, 1990). Des semences ne subissant aucun traitement étaient également dispersées dans d'autres terrines, sur le même type de terre et constituaient nos références. De même, une terrine restait non semée, exposée aux mêmes conditions, ce qui nous a permis de vérifier à quatre occasions que X. maltophilia n'était quasiment jamais représenté dans une telle terre sans végétation. Par contre, pour les 4 espèces végétales, X. maltophilia est toujours présent au voisinage des racines. L'origine rhizosphérique, remarquée pour les premières fois par KIPRIANOVA et coll. (1979) et DEBETTE et BLONDEAU (1980) est ici confirmée avec une précision supplémentaire : la racine elle-même semble créer l'habitat le plus favorable puisque les pourcentages vont toujours croissants de la rhizosphère vers le rhizoplan et l'endorhizosphère, et ceci de manière marquée chez le Chou. L'influence positive des racines de Crucifères avait déjà été soulignée (DEBETTE et BLONDEAU, 1980).

Par "bactérisation" des semences, il nous était possible d'étudier les facultés de X. maltophilia à coloniser les racines de ces mêmes espèces végétales, ce que BAKER (1991) nomme la "compétence rhizosphérique". Les premières études de ce type ont été effectuées en Russie et rapportées par ALLISON (1947) et MISHUSTIN et NAUMOVA (1962). A l'heure actuelle, de nombreux essais sont faits avec les bactéries PGPR ("Plant Growth Promoting Rhizobacteria") dans l'intention d'améliorer le rendement des récoltes en engageant des compétitions avec les microorganismes phytopathogènes (KLOEPPER et BEAUCHAMP, 1992). Ces essais d'inoculation, réalisés en champs, ont donné des résultats variables en ce qui concerne la colonisation des racines par les bactéries introduites (KLOEPPER et coll., 1989).

Nos propres expériences ont été réalisées sur des cultures en serre. Comme l'ont déjà fait remarqué GASKINS et coll. (1985), elles ne reflètent pas ce qu'il pourrait se passer en champs dans les mêmes conditions.

Différentes méthodes sont utilisées pour recueillir les bactéries nichant dans le système racinaire : simple agitation dans l'eau (BAHME et coll., 1988), agitation avec utilisation de billes de verre (VAN PEER et SCHIPPERS, 1988), sonication (PARKE et coll., 1990) ou broyage dans un mortier avec un pilon (WELLER et COOK, 1983).

Dans nos expériences, le milieu "rhizosphère proche" est la terre restant encore adhérente aux racines après secouement, laquelle est récupérée par simple agitation dans l'eau. Le "rhizoplan" est obtenu en coupant sous le collet les racines entières ainsi débarrassées de leur terre, et en les passant dans un malaxeur. KLOEPPER et coll. (1991) ont montré que l'étude gagnait en précision lorsque les racines sont entières. En comparant cinq méthodes différentes pour isoler les rhizobactéries du Coton, ces auteurs ont constaté que l'utilisation d'un malaxeur est la technique la plus efficace pour obtenir les bactéries. L'étude de l'"endorhizosphère" nécessite la désinfection externe préalable des racines. Différents produits sont utilisés selon les auteurs : hypochlorite de calcium, éthanol ou eau oxygénée (KLOEPPER et BEAUCHAMP, 1992). Nous avons opté, dans tous les cas, pour l'eau oxygénée suivant l'exemple de VAN PEER et SCHIPPERS (1988). Cette pratique expérimentale est sans doute critiquable dans ces effets dans la mesure où la taille en diamètre des racines varie d'une espèce végétale à l'autre.

Enfin, même si les concepts de rhizosphère, rhizoplan et endorhizosphère sont bien définis en théorie, pratiquement ces microhabitats ont des frontières qui ne sont pas nettement marquées (DOMMARGUES, 1975 ; BALANDREAU et KNOWLES, 1978). Ainsi, le rhizoplan peut comprendre des débris cellulaires et microbiens de l'endorhizosphère (GASKINS et coll., 1985).

Nous avons recherché X. maltophilia par l'utilisation du milieu sélectif XMSM (JUHNKE et DESJARDIN, 1989) déjà éprouvé dans la première partie de ce travail. Ceci nous avait permis de remarquer que la substitution de la forte quantité de peptone par une plus faible proportion d'extrait de levure (test XML) permettait de recouvrer tous les X. maltophilia, sans exclusion des souches préférant métaboliser une protéine plutôt que le maltose disponible. Le milieu XMSM présente une grande rapidité de sélection par rapport à la méthodologie d'identification utilisée en première partie de ce travail.

Des colonies n'ayant pas l'aspect de X. maltophilia tel qu'il est attendu sur ce milieu (JUHNKE et DESJARDIN, 1989) s'y développent fréquemment, quelle que soit la source azotée utilisée (milieux modifiés XML et XMM indiqués dans Matériel et Méthodes). Tenant compte de l'affirmation de BRUNEL et coll. (1988) et de LINDSTROM et coll. (1990) selon laquelle l'introduction d'une bactérie dans la rhizosphère peut modifier la morphologie des colonies et les résistances aux antibiotiques, nous avons identifié à l'aide de galeries API 20NE quelques unes de ces souches afin de vérifier qu'il ne s'agissait pas de X. maltophilia dont l'aspect des colonies aurait changé. Notre investigation personnelle a abouti entre autres à l'identification présumée à des Pseudomonas fluorescents, à P. luteola ou bien à P. oryzihabitans (anciens noms respectifs de Chryseomonas luteola comb. nov. et Flavimonas oryzihabitans gen. nov., comb. nov., HOLMES et coll., 1987). Ce qui est surtout remarquable, c'est le dénombrement constant de ce type de colonies, à des pourcentages parfois très élevés, en particulier dans les échantillons du Blé dont les semences ont été traitées (jusqu'à 55 % des souches ensemencées sur milieu sélectif). JUHNKE et DESJARDIN (1989) ont également noté, au cours de l'analyse de ce milieu sur divers échantillons rhizosphériques, la présence très variable en nombre de colonies non identifiables à X. maltophilia. Il serait peut être intéressant de faire une analyse plus systématique sur l'identification de ces souches, c'est pourquoi nous avons jugé opportun d'en indiquer les proportions.

La population de X. maltophilia est stimulée lorsque les semences de Blé et de Chicorée ont été "bactérisées" par comparaison à la

population obtenue chez une plante aux semences non traitées. Il est remarquable que cette stimulation ait lieu également lorsqu'une suspension bactérienne autoclavée a servi au traitement. La vérification de l'efficacité de l'autoclavage de cette suspension indique que ce sont probablement les cellules mortes qui en résultent, qui constituent une source protéique pour les X. maltophilia présents. Les bonnes capacités protéolytiques de cette espèce (BOETHLING, 1975 ; DEBETTE, 1991) lui permettent d'utiliser ces ressources supplémentaires pour croître plus facilement.

Par contre, la "bactérisation" des graines de Colza et de Chou ne modifie nullement la répartition de cette espèce dans leur rhizosphère (les résultats dépassent rarement 8 % chez le Colza). Cette absence d'effet est assez inattendue puisqu'elle ne se produit que dans l'environnement des Crucifères. La richesse en acides aminés soufrés des exsudats de ces plantes aurait plutôt laissé présager du contraire. Des interactions compétitives entre X. maltophilia et d'autres populations spécifiques de cet environnement pourraient expliquer ce phénomène. Dans ce cas, cette compétition doit être amoindrie lorsque les semences sont stérilisées et une stimulation de X. maltophilia apparaîtrait dans ces conditions. Ce n'est pas ce que nous observons. Il faut signaler cependant que la stérilisation n'est, en réalité, qu'une désinfection incomplète de la surface des graines (VAN OUTRYVE et coll., 1988b).

Ayant utilisé des graines de Colza "dénaturé" du commerce, nous avons choisi une autre Crucifère : le Chou, pour laquelle les pourcentages sont un peu plus élevés (jusqu'à 15 %) mais aucune différence n'apparaît entre les semences "bactérisées" ou non.

Reprenant une idée de KREMER (1987) selon laquelle les caractéristiques structurales des semences pourraient jouer un rôle sur la présence et la fréquence des bactéries dans cette zone, nous avons pensé que l'organisation des graines des 2 Crucifères, et notamment leur enveloppe cireuse, pouvait être une barrière à la "bactérisation".

VERONA (1959), lors de sa définition du concept "spermosphère", c'est-à-dire le microhabitat qui environne la semence en germination, a mis l'accent sur la difficulté de maîtriser tous les phénomènes intervenant au niveau de la spermosphère, qui sont peut-être différents de ceux de la rhizosphère. Les métabolismes préliminaires ou concomitants à la germination influencent sans doute la microflore environnante. L'auteur évoquait l'exemple des semences des Crucifères, enveloppées d'une couche plus ou moins dense de substances mucilagineuses constituées de polysaccharides, qui aurait une fonction de défense et une influence sur la constitution du milieu chimique environnant.

Afin de vérifier si cette enveloppe n'était pas un obstacle à la "bactérisation", nous avons fait l'étude de la spermosphère de ces graines, après traitement ou non, dans des conditions de germination en milieu stérile et exempt de substrats de croissance ; ce travail étant réalisé sur les 3 espèces végétales initiales : Blé, Chicorée et Colza.

Autour des semences brutes, les pourcentages de X. maltophilia sont très faibles chez le Blé et le Colza alors qu'ils sont plus élevés chez la Chicorée (microflore totale beaucoup plus élevée également). MUNDT et HINCKLE (1976), qui ont fait l'inventaire de la microflore se trouvant au sein même des ovules et des semences de diverses plantes, ne découvrent pas systématiquement de populations bactériennes. La germination des graines entraîne une augmentation considérable de la microflore. Ce phénomène est le résultat de la libération d'exsudats spécifiques (VAN OUTRYVE et coll., 1988b).

La "bactérisation" provoque une importante augmentation de la population de X. maltophilia chez le Blé, la Chicorée mais plus encore chez le Colza : ce traitement ne reste pas sans effet au niveau des graines de cette Crucifère. Il semble donc que leur enveloppe ne soit pas une barrière au traitement. Nous pensons davantage à des modifications chimiques locales de la terre environnante se répercutant éventuellement sur la microflore totale. Un élément de réponse pourrait être fourni en envisageant l'évolution de la population de X. maltophilia dans l'environnement de graines en germination sur une terre autoclavée.

Afin de voir l'évolution dans le temps de l'importance de X. maltophilia dans la rhizosphère, nous avons dénombré à nouveau la bactérie dans divers échantillons de la Chicorée de Bruxelles, après 15 semaines de développement en serre. Le choix de cette espèce plutôt que le Blé a pour seule raison le meilleur état des plantes. La comparaison des résultats des deux séries de prélèvements montre clairement une diminution notable dans la présence de la bactérie allant jusqu'à la disparition complète dans certains échantillons, ainsi que des numérations bactériennes totales bien affaiblies (sauf échantillon T de Eb). Cette dernière constatation témoigne d'un milieu tellurique particulièrement appauvri, dû sans doute aux conditions expérimentales : hauteur de terre dans les terrines assez faible (environ 8 cm), régulation de la température plus aléatoire en période estivale, arrosage régulier avec de l'eau du robinet sans autre apport d'aucune sorte, densité importante de plantes par terrine. Toutefois, LEYNS et coll. (1990) avaient qualifié X. maltophilia de bactérie rhizosphérique, typique des premiers stades de croissance chez le Maïs, et dont la fréquence déclinait au fur et à mesure du temps.

Une autre remarque doit être faite : au cours de ces deux expériences à 8 semaines d'écart, les parties aériennes des plantules manifestent un développement très nettement supérieur lorsque les semences ont été traitées avec la suspension bactérienne autoclavée plutôt qu'avec les bactéries vivantes, ou non traitées. Nous pouvons penser que l'apport protéique que constituent les débris bactériens profite soit directement au développement de la plante, soit à des populations bactériennes de la spermosphère ou telluriques qui seraient bénéfiques à la plante.

#### **B. - Importance des Pseudomonas fluorescents dans les échantillons rhizosphériques au cours des expériences en serre**

L'idée de rechercher les Pseudomonas fluorescents, simultanément aux dénombrements de X. maltophilia, résulte du fait acquis que ces germes forment le groupe de bactéries Gram négatives le plus important de la rhizosphère d'un grand nombre de plantes (KLEEBERGER et coll., 1983 ; CURL et TRUELOVE, 1986 ; VAN OUTRYVE et coll., 1988a, 1989). Ils

constituent donc des compétiteurs éventuels de X. maltophilia dans cette zone. De nombreux aspects de leur comportement dans le sol ont été étudiés et notamment leur faculté à promouvoir le développement des plantes (BOWEN, 1980), ou tout au moins à avoir un impact sur la croissance des plantes : favorable, neutre ou délétère (LAMBERT et coll., 1987 ; KLOEPPER et coll., 1989). Des essais d'inoculation de ces germes en champ au voisinage du Blé ont été rapportés par JUHNKE et coll. (1987) mais les résultats présentaient une grande variabilité.

Dans notre étude, les Pseudomonas fluorescents sont répartis dans la rhizosphère selon une distribution inverse de celle de X. maltophilia. En effet, les plus forts pourcentages sont obtenus dans la rhizosphère proche et le rhizoplan ; par contre, ils sont très peu représentés dans l'endorhizosphère, à quelques exceptions près. Cette quasi-inexistence dans cette zone fut remarquée par différents auteurs (KLEEBERGER et coll., 1983 ; MILLER et coll., 1990). Tandis que KLEEBERGER et coll. (1983) ainsi que MEYER et LINDERMAN (1986) obtenaient davantage, ou autant, de P. fluorescents dans le rhizoplan que dans la rhizosphère proche, MILLER et coll. (1990) démontraient une plus grande présence de ces germes dans la rhizosphère proche. Nos résultats sont comparables aux conclusions des deux premières publications citées. Toutefois, il faut remarquer que le pourcentage des P. fluorescents par rapport à la flore bactérienne totale est très faible en comparaison des X. maltophilia isolés. Il représente rarement plus qu'environ 5 % de la population bactérienne totale. Signalons que MILLER et coll. (1989) rapportaient des résultats encore plus faibles (environ 1 %) dans des rhizosphères de Blé et de Maïs. Ils ont utilisé, comme nous, le milieu sélectif S1 récemment conçu par GOULD et coll. (1985) mais aussi, en parallèle le milieu B de KING et coll. (1954), lequel a toujours donné des chiffres un peu plus élevés. GOULD et coll. (1985) ont proposé deux milieux sélectifs des Pseudomonades fluorescents pour remplacer les milieux préexistants : milieux de KADO et HESKETT (1970), SANDS et ROVIRA (1970), SIMON et coll. (1973), KATOH et ITOH (1983) aux nombreux désavantages et milieu de KING et coll. (1954) qui est relativement peu sélectif (SANDS et ROVIRA, 1970). La sélectivité de leur milieu S1 repose sur l'incorporation de triméthoprime, un antibiotique, et de lauryl sarcosine de sodium (SLS), détergent plus faible que le dodécyl

sulfate de sodium (SDS) et n'interférant pas trop avec la fluorescence. X. maltophilia peut éventuellement se développer sur ce milieu, mais sans qu'il y ait production de fluorescence (GOULD et coll., 1985). Occasionnellement, quelques rares colonies ne produisant pas de fluorescence se développaient sur ce milieu au cours de nos dénombrements. Etant donné leur extrême rareté, nous n'en avons pas tenu compte.

De nos résultats, il ne semble pas que les P. fluorescents soient des compétiteurs éventuels de X. maltophilia dans l'endorhizosphère. Pour vérifier cette supposition, il faudrait peut-être mener des expériences similaires à celles que nous avons engagées pour X. maltophilia, avec une souche de P. fluorescens rhizosphérique puisque ce sont deux espèces ayant la faculté reconnue de se développer dans ce microhabitat (JUHNKE et coll., 1989 ; LAMBERT et JOOS, 1989). De plus, l'apport protéique occasionné par les traitements des semences avec les bactéries autoclavées ne paraît pas spécialement favoriser la prolifération des P. fluorescents, contrairement à ce qu'on peut observer chez X. maltophilia.

### C. - Repérage "in situ" de X. maltophilia au niveau de racines

La "bactérisation" des semences avec une suspension de X. maltophilia C17 était également réalisée dans le but de localiser la bactérie "in situ" dans les racines mêmes, par immunodétection grâce à la possession d'anticorps polyclonaux spécifiques de cette souche.

Différentes techniques sont utilisées pour visualiser la colonisation des racines par les bactéries : profils de restriction ou hybridation d'acides nucléiques, immunologie, etc... (KLOEPPER et BEAUCHAMP, 1992). Les anticorps ou les séquences spécifiques d'acides nucléiques sont utilisés comme sondes permettant la détection des germes inoculés. Par immunodétection, UNDERBERG et VAN VUURDE (1990) ont visualisé "in situ" la colonisation de Erwinia chrysanthemi dans les racines de Pomme de terre.

Les pourcentages élevés de X. maltophilia au niveau de l'endorhizosphère, obtenus au cours de nos expérimentations en serre, pouvaient nous permettre d'espérer un repérage des bactéries au microscope par immunofluorescence, puisque nos anticorps avaient été testés comme étant spécifiques de X. maltophilia et même plus particulièrement de C17 (DEBETTE, 1987 ; DEBETTE et PRENSIER, 1989). Le travail de repérage ne devait être réalisé que sur des racines in toto, sinon les particules de terre restant plus ou moins solidaires de la racine, auraient endommager le couteau-diamant d'un microtome. Des alignements de bactéries très fluorescentes ont été observés au niveau des parois intercellulaires longitudinales de la première assise de cellules des racines de Chicorée de Bruxelles dont les semences ont été "bactérisées" contrairement au matériel témoin. Cette observation permet de penser que X. maltophilia est un vrai colonisateur racinaire au sens où KLOEPPER et BEAUCHAMP (1992) le définissent : la colonisation racinaire est un processus actif impliquant la croissance de bactéries introduites, sur ou autour des racines, et n'est pas simplement une chance passive pour qu'une bactérie du sol rencontre une racine et ceci en présence de la microflore indigène (SCHROTH et HANCOCK, 1982). Il est nécessaire pour cela de différencier les bactéries introduites des bactéries indigènes du même taxon. Par cette méthode d'observation, nous pensons que ce sont les bactéries introduites qui se sont développées dans la mesure où les anticorps sont apparus spécifiques d'un individu : C17. De même, pour SCHER et coll. (1984), un bon colonisateur racinaire est une bactérie qui, après avoir été introduite, se distribue le long de la racine, aussi bien à l'intérieur qu'en surface ou au voisinage immédiat dans le sol naturel, se propage et survit pendant plusieurs semaines en présence des compétitions émanant de la microflore indigène, à des taux supérieurs à  $5 \times 10^3$  CFU/g de racine. Ces propriétés sont bien vérifiées ici.

La motilité ou la présence de flagelles effective pour X. maltophilia ne semble pas des pré-requis dans toutes les associations plantes-microbes (LAMBERT et JOOS, 1989). Toutefois, les facultés d'attachement de X. maltophilia aux cellules végétales seraient intéressantes à élucider, peut-être par l'utilisation de cultures cellulaires végétales, comme cela a été fait par Azospirillum (EYERS et coll., 1988).

La première étape, dans les colonisations racinaires par les bactéries, est le rapide envahissement de semences en germination qui exsudent à profusion un large éventail d'acides aminés, d'hydrates de carbone, d'acides organiques, etc... durant cette phase active. La chimiotaxie envers de tels exsudats peut représenter un avantage compétitif pour certaines bactéries dans leur installation précoce sur la semence et la radicule (SCHER et coll., 1985). De telles facultés seraient intéressantes à approfondir pour X. maltophilia.

Par ailleurs, il faudrait déterminer si X. maltophilia est une rhizobactérie ayant une influence bénéfique, neutre ou délétère sur la croissance des plantes. Dans les cultures en serre sur sol naturel, nous n'avons remarqué ni effet bénéfique, ni effet délétère. Par contre, les quelques expériences réalisées sur les semences en germination sur milieu gélosé stérile afin d'étudier la répartition de X. maltophilia dans la spermosphère, ont permis les constatations suivantes, exigeant des confirmations : beaucoup de poils absorbants sur les racines de plantules de Chicorée provenant de graines "bactérisées" et localisation préférentielle de X. maltophilia à leur niveau, jamais à la pointe des racines (repérage par immunofluorescence) ; allongement plus important de l'hypocotyle des plantules de Colza dont les graines ont été "bactérisées" comparativement aux plantules de graines non "bactérisées", alors que l'épicotyle grandit de manière similaire.

Occasionnellement, la littérature relate quelques résultats sur les aptitudes de X. maltophilia. FAGES et ARSAL (1991) indiquent un effet bénéfique après inoculation de graines de Tournesol, 6 jours après la germination ; par ailleurs, des souches rhizosphériques de X. maltophilia se révèlent inhibitrices de Champignons tels que Pythium ultimum, Gaeumannomyces graminis var. tritici et Rhizoctonia solani sans que leurs composés antifongiques soient déterminés. Ceci n'est pas sans rappeler les effets antagonistes signalés pour des mutants de cette espèce envers Rhizoctonia et Pythium chez les racines de Concombre (KWOK et coll., 1986, 1987) d'une part et Ceratocystis ulmi, C. fagacearum et Verticillium dahlia chez le Chêne d'autre part (GREGORY et coll., 1986).

## CONCLUSION

Des souches de X. maltophilia d'origines diverses et des souches susceptibles d'être apparentées à cette espèce ont été comparées par deux approches, toutes deux à valeur taxonomique reconnue : analyse numérique des caractères phénotypiques et analyse électrophorétique des estérases. Cette dernière étude constituait l'originalité de ce travail, puisque cet "outil" taxonomique n'a jamais été utilisé pour cette espèce, à notre connaissance, sauf dans le cadre de travaux préliminaires pour quatre souches (DEBETTE, 1987).

Les conclusions dégagées après l'analyse des résultats doivent rester prudentes, dans la mesure où les outils taxonomiques actuels sont très diversifiés, et où, chacun pris isolément, présente certaines limites d'interprétation. Elles prendront plus de significations dans la confrontation des résultats des collaborations interlaboratoires centralisées au Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gand.

C'est l'analyse phénotypique, qui, à elle seule, présente une certaine faiblesse, dans la mesure où les souches utilisées sont au sein d'une espèce ou au proche voisinage. C'est la raison pour laquelle sur 53 caractères phénotypiques, seuls 29 sont discriminants. Par contre, l'analyse électrophorétique des estérases bactériennes donne des informations discriminatives et sûres pour des différenciations spécifiques et infraspécifiques (GOULLET, 1981 ; GOULLET et PICARD, 1984).

Par conséquent, lorsque les mêmes souches se révèlent "marginales" dans les deux approches en question par rapport aux autres souches qui constituent un ensemble homogène, il est indispensable de reconsidérer leur parenté avec X. maltophilia grâce à d'autres analyses de nature phénotypique mais surtout génomique. Les souches ainsi mises à l'index, sont P. pictorum, P. boreopolis et les souches Su1, Su2, Su3, Su6 et Su7. Il est notable que ces cinq dernières correspondent exactement aux souches qui ne manifestaient pas d'exigences en méthionine dans les conditions expérimentales de IKEMOTO et coll. (1980). Ces auteurs en étaient arrivés à la distinction de deux biovars dans l'espèce X. maltophilia, différents l'un de l'autre non seulement pour leur non-exigence mais aussi par la composition en acides gras, en ADN et par hybridation ADN-ADN.

Par ailleurs, nos résultats confirment la parenté de P. hibiscicola et P. betle avec X. maltophilia que VAN DEN MOOTER et SWINGS (1990) et VAN ZYL et STEYN (1990) avaient déjà constatée. Enfin, les quatre souches précédemment identifiées au genre Alcaligenes s'intègrent parfaitement à l'ensemble homogène. Ce genre, qualifié d'affiliation incertaine dans la 8ème édition du Bergey's (HOLDING et SHEWAN, 1974) rassemble un groupe hétérogène de bactéries aux niches écologiques très diversifiées, aux caractéristiques phénotypiques très différentes et à l'homogénéité génétique très contestable (KERSTERS et DE LEY, 1984). Notre travail témoignerait d'une parenté certaine de ces quatre souches avec X. maltophilia.

Il est également à remarquer que pour un niveau de similitude de 94 %, choisi arbitrairement, l'analyse phénotypique aboutit à la séparation en 3 groupes, le groupe I (23 souches, soit 56 % des souches classées) se distinguant des autres par son aptitude à réduire les nitrates.

Lorsque l'analyse phénotypique est réalisée sur un plus grand nombre de souches toutes d'origine sauvage (rhizosphérique ou médicale) et deux souches X. maltophilia de collection ATCC, nous parvenons à la même discrimination concernant ce caractère, pour un degré de similitude de 93,5 %. En effet, le rassemblement des groupes I, II, et III s'oppose à celui des groupes IV, V et VI concernant la réponse à ce caractère avec des nombres d'individus équivalents. Il serait sans doute intéressant d'approfondir les fondements de cet aspect afin de déterminer si ce caractère a un poids suffisant pour distinguer deux sous-groupes. Toutefois, aucune relation ne peut être faite entre cette remarque et les caractéristiques estérasiques.

L'isoélectrofocalisation des estérases indique clairement de par la distribution des résultats que les valeurs 5 et 6 pour le pI sont des valeurs frontières pour l'espèce, puisque toutes les souches sauvages (à l'exception de deux qui en sont très proches) rentrent dans ce cadre. Les souches de la collection "Lille-Gand" non classées phénotypiquement, ont, en effet, des estérases avec des valeurs de pI inférieures ou égales à 5. De plus, elles ont des estérases avec un niveau de migration plus éloigné que l'ensemble des autres. Si ce

dernier critère semble moins restrictif, il est toutefois remarquable que 75 % des souches environ présentent des complexes estérasiques ayant une migration réduite dans les gels de polyacrylamide, sans doute du fait de leur grande hydrophobicité.

Remarquons également que l'ensemble des souches d'origine sauvage sont toutes regroupées pour un degré de similitude voisin de 91 % ; pour cette valeur, les souches jugées "marginales" dans la collection commune, le sont toujours.

L'analyse électrophorétique offre une plus grande diversité relative au sein des souches, avec toutefois un bon regroupement de 75 % d'entre elles. Ce sont les souches médicales qui présentent des caractéristiques estérasiques les plus à la périphérie de l'ensemble avec une concentration remarquable pour des valeurs de pI plus proches de 6 que de 5 (les 2/3 d'entre elles entre 5,5 et 6) comme la souche de collection ATCC 13637, elle-même d'origine médicale. Par contre, les souches d'origine rhizosphérique ont des estérases ayant des pI compris entre 5 et 5,5 pour plus des 3/4 comme la souche de collection ATCC 17806 elle-même rhizosphérique.

Etant donné la parenté génomique avec le genre Xanthomonas aujourd'hui discutée (VAN ZYL et STEYN, 1992), au point d'en faire un genre à part entière (PALLERONI et BRADBURY, 1993), il serait d'un grand intérêt d'analyser les caractéristiques estérasiques de souches de diverses espèces de Xanthomonas.

Dans une seconde partie, nous avons tenté de préciser la localisation de X. maltophilia dans la rhizosphère de quelques plantes et nous avons étudié son aptitude à coloniser les racines. D'après les différents prélèvements réalisés sur des plantes cultivées en champs, X. maltophilia se répartit selon un gradient rhizosphérique puisqu'il est toujours plus fréquent dans l'endorhizosphère. Cela se vérifie également lors des expériences en serre. Des traitements particuliers ont permis la visualisation de la bactérie, par immunodétection, au niveau des parois intercellulaires longitudinales de la première assise de cellules de racines de Chicorée.

X. maltophilia est une rhizobactérie à part entière puisque l'espèce est quasiment inexistante dans les sols sans végétation alors qu'elle est toujours présente au contact même des racines. Il s'agit plutôt d'un colonisateur précoce même s'il ne semble pas y avoir de relations directes avec le stade de développement de la plante comme nous avons pu le remarquer au voisinage du Blé cultivé en champs. Des proliférations très importantes et occasionnelles de X. maltophilia, déjà constatées par d'autres auteurs, sont également observées dans ce travail.

La colonisation des racines de X. maltophilia a été étudiée en pratiquant une "bactérisation" des semences. Celle des racines de Blé et de Chicorée est importante alors que la "bactérisation" reste sans effet dans la rhizosphère du Colza et du Chou. Des expériences réalisées dans la spermosphère de ces mêmes plantes laissent présager que la structure des graines des Crucifères entraînerait des modifications du milieu environnant, elles-mêmes à l'origine de changements de la microflore. Ces résultats obtenus par des expériences faites en serre ne préfigurent pas ce qui se passerait dans les mêmes conditions sur des plantes cultivées en champs. Il serait intéressant d'étudier davantage les effets que X. maltophilia exerce sur les plantes. La parenté confirmée de X. maltophilia à des espèces dont la phytopathogénicité est connue : P. hibiscicola et P. betle, peut laisser penser à des effets nuisibles. Toutefois, nos observations des plantes après "bactérisation" des semences ne permettent pas de faire une relation entre le traitement et le développement des plantules. Cet aspect des interactions entre X. maltophilia et les plantes mérite d'être approfondi d'autant plus que KWOK et coll. (1986, 1987) ou encore GREGORY et coll. (1986) ont déjà proposé l'utilisation de cette espèce comme contrôle biologique du Concombre et du Chêne.

Les importantes fluctuations remarquées dans les dénombrements de cette bactérie et sa localisation au contact même des racines laissent supposer une grande réactivité à des perturbations d'équilibre locales.

BIBLIOGRAPHIE

- AHL P., C. VOISARD and G. DEFAGO  
Iron-bound siderophores, cyanic acid and antibiotics involved in the suppression of Thielaviopsis basicola by Pseudomonas fluorescens strains.  
J. Phytopath., 1986, 116 : 131-134.
- ALEXANDER M.  
Microbiology of the rhizosphere.  
In : Introduction to soil Microbiology. WILEY J., New-York - London - Sydney, 1961, 444-445.
- ALLISON F.E.  
Azotobacter inoculation of crops.  
J. Historical. Soil Sci., 1947, 64 : 413-429.
- ARELLA M. and M. SYLVESTRE  
Production of an extracellular ribonuclease of Pseudomonas maltophilia.  
Can. J. Microbiol., 1979, 25 : 321-328.
- ATKINSON T.G., J.L. NEAL and R.I. LARSON  
Genetic control of the rhizosphere microflora of wheat.  
In : Biology and control of soil-borne plant pathogens. BRUEHL G.W. (Ed.), American Phytopathological Society, St-Paul, 1975, 116-122.
- AULING G., H.J. BUSSE, F. PILZ, L. WEBB, H. KNEIFEL and D. CLAUS  
Rapid differentiation by polyamine analysis of Xanthomonas strains from phytopathogenic Pseudomonads and other members of the class Proteobacteria interacting with plants.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1991, 41(2) : 223-228.
- AUSTIN B. and F.G. PRIEST  
Modern bacterial taxonomy.  
Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd. Molly Millars Lane, Wokingham, Berkshire, England, 1986.
- AZAD H. and N.W. SCHAAD  
Serological relationships among membrane proteins of strains of X. campestris pv. translucens.  
Phytopathology, 1988, 78 : 272-277.
- BAHME J.B., M.N. SCHROTH, S.D. VAN GUNDY, A.R. WINHOLD and D.M. TOLENTINO  
Effect of inocula delivery systems on rhizobacterial colonization of underground organs of potato.  
Phytopathology, 1988, 78 : 534-542.
- BAKER R.  
Induction of rhizosphere competence in the biocontrol fungus Trichoderma.  
In : The rhizosphere and plant growth. KEISTER D.L. and P.B. CREGAN (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston and London, 1991, 221-228.

- BALANDREAU J. and R. KNOWLES  
The rhizosphere.  
In : Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. DOMMERGUES Y.R. and S.V. KRUPA (Eds), Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam - Oxford - New-York, 1978, 243-268.
- BAPTIST J.N., C.R. SHAW and M. MANDEL  
Zone electrophoresis of enzyme in bacterial taxonomy.  
*J. Bacteriol.*, 1969, 99 : 180-188.
- BARNETT J.A., M. INGRAM and T. SWAIN  
The use of  $\beta$ -glucosidases in classifying yeasts.  
*J. Gen. Microbiol.*, 1956, 15 : 529-555.
- BLONDEAU R.  
Les Arthrobacter de la microflore rhizosphérique des plantules de Colza.  
*Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1970, 21 : 295-305.
- BLONDEAU R.  
Contribution à l'étude des interactions plantes-bactéries au niveau de la rhizosphère.  
Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Lille I, 1972.
- BOETHLING R.S.  
Purification and properties of a serine protease from Pseudomonas maltophilia.  
*J. Bacteriol.*, 1975a, 121 : 933-941.
- BOETHLING R.S.  
Regulation of extracellular protease secretion in Pseudomonas maltophilia.  
*J. Bacteriol.*, 1975b, 123(3) : 954-961.
- BOKHARI U.G., D.C. COLEMAN and A. RUBINK  
Chemistry of root exudates and rhizosphere soils of prairie plants.  
*Can. J. Bot.*, 1979, 57(12) : 1473-1477.
- BOWEN G.D.  
Misconceptions, concepts and approaches to the study of growth of organisms around roots.  
In : Contemporary microbial ecology. ELLWOOD D.C., J.N. HEDGER, M.J. LATHAM, J.M. LYNCH and J.H. SLATER (Eds), Acad. Press Inc., London, 1980, 283-304.
- BOWEN G.D. and A.D. ROVIRA  
Microbial colonization of plant roots.  
*Ann. Rev. Phytopath.*, 1976, 14 : 121-144.
- BRADBURY J.F.  
Genus II. Xanthomonas DOWSON 1939, 199-210.  
In : Bergey's manual of systematic bacteriology. KRIEG N.R. and J.G. HOLT (Eds), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984, Vol. 1.

- BRADBURY J.F.  
Guide to plant pathogenic bacteria.  
C.A.B. International Mycological Institute, Ferry Lane, Kew,  
Surrey, England, 1986.
- BREUIL C. and D.J. KUSHNER  
Lipase and esterase formation by psychrophilic and mesophilic  
Acinetobacter species.  
Can. J. Microbiol., 1975, 21 : 424-433.
- BRONDZ I., J. CARLSSON, M. SJOSTROM and G. SUNDQVIST  
Significance of cellular fatty acids and sugars in defining the  
genus Porphyromonas.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1989, 39 : 314-318.
- BRUNEL B., J.C. CLEYET-MAREL, P. NORMAND and R. BARDIN  
Stability of Bradyrhizobium japonicum inoculants after introduction  
into soil.  
Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54 : 2636-2642.
- BUFTON L., G.A.P. BRUNS, R.E. MAGENIS, D. TOMAR, D. SHAW, D. BROOK  
and M. LITT  
Four restriction fragment length polymorphisms revealed by probes  
from a single cosmid map to chromosome 19.  
Ann. J. Human Genet., 1986, 38 : 447-460.
- BURKHOLDER W.H.  
Genus II. Xanthomonas DOWSON 1939.  
In : Bergey's manual of determinative bacteriology. BREED R.S.,  
E.G.D. MURRAY and N.R. SMITH (Eds), The Williams and Wilkins Co.,  
Baltimore, 1957, 7th ed., 152-183.
- BUSSE J. and G. AULING  
Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the Proteo-  
bacteria.  
System. Appl. Microbiol., 1988, 11 : 1-8.
- BUTTIAUX R., H. BEERENS and A. TACQUET  
Manuel de techniques bactériologiques.  
Flammarion, Paris, 1966.
- CARLONE G.M., M.L. THOMAS, H.S. RUMSCHLAG and F.O. SOTTNEK  
Rapid microprocedure for isolating detergent. Insoluble outer  
membrane proteins from Haemophilus species.  
J. Clin. Microbiol., 1986, 24(3) : 330-332.
- CHABOUD A. et M. ROUGIER  
Sécrétions racinaires mucilagineuses et rôle dans la rhizosphère.  
Ann. Biol., 1981, 4 : 313-326.
- CHARLEY R.C. and A. BULL  
Bioaccumulation of silver by a multispecies community of bacteria.  
Arch. Microbiol., 1979, 123 : 239-244.

- CLARK F.E.  
Soil microorganisms and plant roots.  
**Adv. Agronomy**, 1949, 1 : 241-288.
- CLAUS R., B. FISCHER and H.P. KLEBER  
An esterase as marker enzyme on the outer membrane of Acinetobacter calcoaceticus.  
**J. Basic Microbiol.**, 1985, 25 : 299-304.
- COLLINS M.D.  
Isoprenoid quinone analysis in bacterial classification and identification.  
In : Chemical methods in bacterial systematics. GOODFELLOW M. and D.E. MINNIKIN (Eds), Academic Press, London, 1985, 267-288.
- COLLINS M.D. and D. JONES  
Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications.  
**Microbiol. Rev.**, 1981, 45 : 316-354.
- CONN D.C. and M.E. WILLOX  
Analysis of multimolecular enzymes as an acid to the identification of certain rapidly growing Mycobacteria, using starch-gel electrophoresis.  
**J. Appl. Bacteriol.**, 1965, 28 : 165-173.
- CULLMANN W.  
Antibiotic susceptibility and outer membrane proteins of clinical Xanthomonas maltophilia isolates.  
**Chemotherapy**, 1991, 37 : 246-250.
- CURL E.A. and B. TRUELOVE  
Factors affecting exudation.  
In : The rhizosphere. CURL E.A. and B. TRUELOVE (Eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York and Tokyo, 1986, 79-91.
- DEBETTE J.  
Etude de Xanthomonas maltophilia (Pseudomonas maltophilia Hugh et Ryschenkow 1960), bactéries isolées du sol ; capacités protéolytiques et estérasiques.  
Thèse de Doctorat d'Etat, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 1987.
- DEBETTE J.  
Isolation and characterization of an extracellular proteinase produced by a soil strain of Xanthomonas maltophilia.  
**Curr. Microbiol.**, 1991, 22 : 85-90.
- DEBETTE J. et R. BLONDEAU  
Caractérisation de bactéries telluriques assimilables à Pseudomonas maltophilia.  
**Can. J. Microbiol.**, 1977, 23 : 1123-1127.

- DEBETTE J. et R. BLONDEAU  
Présence de Pseudomonas maltophilia dans la rhizosphère de quelques plantes cultivées.  
*Can. J. Microbiol.*, 1980, 26(4) : 460-463.
- DEBETTE J. and G. PRENSIER  
Immunolectron microscopic demonstration of an esterase on the outer membrane of Xanthomonas maltophilia.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55(1) : 233-239.
- DEBETTE J., J. LOSFELD et R. BLONDEAU  
Taxonomie numérique de bactéries telluriques non fermentantes à Gram-négatif.  
*Can. J. Microbiol.*, 1975, 21(9) : 1322-1334.
- DEBETTE J., Z.P. PENG et R. BLONDEAU  
Recherches relatives à la prolifération de Pseudomonas maltophilia dans la zone racinaire de plantes.  
*Bull. Soc. Bot. N. France*, 1983, 36(1-2) : 37-45.
- DE BOER S.H. and M. SASSER  
Differentiation of Erwinia carotova spp. carotova and E. carotova spp. atroseptica on the basis of cellular fatty acid composition.  
*Can. J. Microbiol.*, 1986, 32 : 796-800.
- DE FREITAS J.R. and J.J. GERMIDA  
Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat.  
*Can. J. Microbiol.*, 1990, 36 : 265-272.
- DE LEY J., P. SEGERS and M. GILLIS  
Intra- and intergeneric similarities of Chromobacterium and Janthinobacterium ribosomal ribonucleic acid cistrons.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1978, 28 : 154-168.
- DE SMEDT J. and J. DE LEY  
Intra- and intergeneric similarities of Agrobacterium ribosomal ribonucleic acid cistrons.  
*Int. J. Systems Bact.*, 1977, 27 : 222-240.
- DE VOS P. and J. DE LEY  
Intra- and intergeneric similarities of Pseudomonas and Xanthomonas ribosomal ribonucleic acid cistrons.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983, 33(1) : 487-509.
- DE VOS P., M. GOOR, M. GILLIS and J. DE LEY  
Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic Pseudomonas species.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1985, 35(2) : 169-184.
- DOMMERGUES Y.  
Pourquoi et comment développer les recherches sur la rhizosphère ?  
*Bull. Soc. Bot. Fr., Coll. Rhizosphère*, 1975, 7-19.

- DOWSON W.J.  
On the systematic position and generic names of the Gram-negative bacterial plant pathogens.  
Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. 2, 1939, 100 : 177-193.
- DYE D.W. and R.A. LELLIOTT  
Genus II. Xanthomonas 1939, 187.  
In : Bergey's manual of determinative bacteriology. BUCHANAN R.E. and N.E. GIBBONS (Eds), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, 8th ed., 243-249.
- EHRET W., K. JACOB and G. RUCKDESCHEL  
Identification of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila by analysis of outer-membrane proteins, ubiquinones and fatty acids.  
Zbl. Bakt. Hyg., 1987, A266 : 261-275.
- EL-SHARKAWY T.A. and D. HUISINGH  
Electrophoretic analysis of esterases and other soluble proteins from representatives of phytopathogenic bacterial genera.  
J. Gen. Microbiol., 1971, 68 : 149-154.
- ENDOW S.A. and R.J. ROBERTS  
Two restriction-like enzymes from Xanthomonas malvacearum.  
J. Mol. Biol., 1977, 112 : 521-529.
- EYERS M., J. VANDERLEYDEN and A. VAN GOOL  
Attachment of Azospirillum to isolated plant cells.  
FEMS Microbiol. Lett., 1988, 49 : 435-439.
- FAGES J. and J.F. ARSAC  
Sunflower inoculation with Azospirillum and other plant growth promoting rhizobacteria.  
Plant and Soil, 1991, 137 : 87-90.
- FAGES J. and B. LUX  
Identification of bacteria isolated from roots of sunflower (Helianthus annuus) cultivated in a French soil.  
Can. J. Microbiol., 1991, 37 : 971-974.
- GARDNER J.M., A.W. FELDMAN and R.M. ZABLOTOWICZ  
Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees.  
Appl. Environ. Microbiol., 1982, 43 : 1335-1342.
- GASKINS M.H., S.L. ALBRECHT and D.H. HUBBELL  
Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity : a review.  
Agriculture, Ecosystems and Environment, 1985, 12 : 99-116.
- GEELS F.P. and B. SCHIPPERS  
Selection of antagonistic fluorescent Pseudomonas spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes.  
Phytopath. Z., 1983, 108 : 193-206.

- GILARDI G.L.  
Diagnostic criteria for differentiation of *Pseudomonads* pathogenic for man.  
*Appl. Microbiol.*, 1968, 16 : 1497-1502.
- GILARDI G.L.  
*Pseudomonas* species in clinical microbiology.  
*Mount Sinai J. Med.*, 1976, 43 : 710-726.
- GILLIS M. and J. DE LEY  
Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, 30 : 7-27.
- GOTTLIEB P. and R. RUDNER  
Restriction site polymorphism of ribosomal ribonucleic acid gene sets in members of the genus *Bacillus*.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1985, 35 : 244-252.
- GOULD W.D., C. HAGEDORN, T.R. BARDINELLY and R.M. ZABLOTOWICZ  
New selective media for enumeration and recovery of fluorescent *Pseudomonads* from various habitats.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 49(1) : 28-32.
- GOULLET P.  
Distinctive electrophoretic patterns of esterases from *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* and *E. gergoviae*.  
*J. Gen. Microbiol.*, 1980, 117 : 483-491.
- GOULLET P.  
Characterization of *Serratia odorifera*, *S. fonticola* and *S. ficaria* by the electrophoretic patterns of their esterases.  
*J. Gen. Microbiol.*, 1981, 127 : 161-167.
- GOULLET P. and B. PICARD  
Distinctive electrophoretic and isoelectric focusing patterns of esterases from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*.  
*J. Gen. Microbiol.*, 1984, 130 : 1471-1480.
- GOULLET P. and B. PICARD  
A two-dimensional electrophoretic profile for bacterial esterases.  
*Electrophoresis*, 1985, 6 : 132-135.
- GOULLET P. and B. PICARD  
Comparative esterase electrophoretic polymorphism of *Escherichia coli* isolates obtained from animal and human sources.  
*J. Gen. Microbiol.*, 1986, 132 : 1843-1851.
- GOULLET P. and B. PICARD  
*Pseudomonas aeruginosa* isolate typing by esterase electrophoresis.  
*FEMS Microbiol. Lett.*, 1991, 78 : 195-200.

- GREGORY G., R. LEWIS, R. SCHREIBER, N. ROBERTO, J. ICHIDA and J. THOMAS  
Abstract.  
**Phytopathology**, 1986, 76 : 652.
- GRIMONT F. and P.A.D. GRIMONT  
Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools.  
**Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, 1986, 137B : 165-175.
- HA D.M. and K. KOMAGATA  
Electrophoretic comparison of enzymes in the strains in biovars of Pseudomonas maltophilia.  
**J. Gen. Appl. Microbiol.**, 1984, 30 : 277-287.
- HACKENBERG H. and M. KLINGENBERG  
Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100.  
**Biochemistry**, 1980, 19 : 548-555.
- HAYWARD A.C.  
Occurrence of glycoside hydrolases in plant pathogenic and related bacteria.  
**J. Appl. Bacteriol.**, 1977, 43 : 407-411.
- HEARING V.J., W.G. KLINGER, T.M. EKEL and P.M. MONTAGUE  
Molecular weight estimation of Triton X-100 solubilized proteins by polyacrylamide gel electrophoresis.  
**Anal. Biochem.**, 1976, 72 : 113-122.
- HELENIUS A. and K. SIMONS  
Solubilization of membranes by detergents.  
**Biochim. Biophys. Acta**, 1975, 415 : 29-79.
- HELENTJARIS T., G. KING, M. SLOCUM, C. SIEDENSTANG and S. WEGMAN  
Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding.  
**Plant Mol. Biol.**, 1985, 5 : 109-118.
- HILTNER L.  
Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbacteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache.  
**Arb. Dtsch. Landw. Ber.**, 1904, 98 : 59-78.
- HOLDING A.J.  
The properties and classification of predominant Gram-negative bacteria in soil.  
**J. Appl. Bacteriol.**, 1960, 23 : 515-525.
- HOLDING A.J. and J.M. SHEWAN  
Genus Alcaligenes.  
In : Bergey's manual of determinative bacteriology. BUCHANAN R.E. and N.E. GIBBONS (Eds), The Williams and Wilkins Company, Baltimore, U.S.A., 8th ed., 1974, p. 273.

- HOLMES B., S.P. LAPAGE and B.G. EASTERLING  
Distribution in clinical material and identification of Pseudomonas maltophilia.  
J. Clinical Pathology, 1979, 32 : 66-72.
- HOLMES B., A.G. STEIGERWALT, R.E. WEAVER and D.J. BRENNER  
Chryseomonas luteola comb. nov. and Flavimonas oryzihabitans gen. nov., comb. nov., Pseudomonas like species from human clinical specimens and formerly known, respectively, as groups Ve-1 and Ve-2.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1987, 37(3) : 245-250.
- HOWE T.G.B. and J.M. WARD  
The utilization of Tween 80 as carbon source by Pseudomonas.  
J. Gen. Microbiol., 1976, 92 : 234-235.
- HUGH R. and E. RYSCHENKOW  
Pseudomonas maltophilia, an alcaligenes like species.  
J. Gen. Microbiol., 1961, 26 : 123-132.
- HUGH R. and E. LEIFSON  
A description of the type strain of Pseudomonas maltophilia.  
Int. Bull. Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, 1963, 13(3) : 133-138.
- IIZUKA H. and K. KOMAGATA  
Taxonomy of the genus Pseudomonas with special reference to their modes of metabolism of carbon compounds.  
J. Gen. Appl. Microbiol., 1963, 9 : 83-95.
- IIZUKA H. and K. KOMAGATA  
Microbiological studies on petroleum and natural gas. I - Determination of hydrocarbon utilizing bacteria.  
J. Gen. Appl. Microbiol., 1964, 10 : 207-221.
- IKEMOTO S., K. SUZUKI, T. KANEKO and K. KOMAGATA  
Cellular fatty acid composition in Pseudomonas species.  
J. Gen. Appl. Microbiol., 1978, 24 : 199-213.
- IKEMOTO S., K. SUZUKI, T. KANEKO and K. KOMAGATA  
Characterization of strains of Pseudomonas maltophilia which do not require methionine.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1980, 30(2) : 437-447.
- JANSE J.D.  
Infra- and intraspecific classification of Pseudomonas solanacearum strains, using whole cell fatty acid analysis.  
System. Appl. Microbiol., 1991, 14 : 335-345.
- JEANNES A.  
Applications of extracellular microbial polysaccharide poly-electrolytes: review of literature, including patents.  
J. of Polymer Science, Polymer Symposium, 1974, 45 : 209-227.

- JENKINS C.L. and M.P. STARR  
Formation of halogenated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments by the type and other yellow-pigmented strains of Xanthomonas maltophilia.  
Ann. Inst. Pasteur, Microbiol., 1985, 136B(n°3) : 257-264.
- JOHNSON J.L. and N.J. PALLERONI  
Deoxyribonucleic acid similarities among Pseudomonas species.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1989, 39(3) : 230-235.
- JUHNKE M.E. and E. DESJARDIN  
Selective medium for isolation of Xanthomonas maltophilia from soil and rhizosphere environments.  
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55(3) : 747-750.
- JUHNKE M.E., D.E. MATHRE and D.C. SANDS  
Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat.  
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53(12) : 2793-2799.
- KADO C.I. and M.G. HESKETT  
Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas.  
Phytopathology, 1970, 60 : 969-976.
- KANEDA T.  
Fatty acids in the genus Bacillus: an example of branched-chain preference.  
Bacteriol. Rev., 1977, 41 : 391-418.
- KANEKO T., R. NOZAKI and K. AIZAWA  
Deoxyribonucleic acid relatedness between Bacillus anthracis, B. cereus and B. thuringiensis.  
Microbiol. Immunol., 1978, 22 : 639-641.
- KATOH K. and T. SUZUKI  
Microflora of manured soils.  
Bull. Natl. Inst. Agric. Sci., 1979, Ser.B30 : 73-135.
- KATOH K. and K. ITOH  
New selective media for Pseudomonas strains producing fluorescent pigment.  
Soil Sci. Plant Nutr., 1983, 29 : 525-532.
- KENNEDY B.W. and T.H. KING  
Angular leaf spot of strawberry caused by Xanthomonas fragariae sp. nov.  
Phytopathology, 1962, 52 : 873-875.
- KERSTERS K. and J. DE LEY  
Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns.  
J. Gen. Microbiol., 1975, 87 : 333-342.

- KERSTERS K. and J. DE LEY  
Genus Alcaligenes.  
In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. KRIEG N.R. and J.G. HOLT (Eds), The Williams and Wilkins Compagny, Baltimore, USA, 1984, Vol. 1.
- KING E.O., M.K. WARD and D.E. RANEY  
Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein.  
J. Lab. Clin. Med., 1954, 44 : 301-307.
- KIPRIANOVA E.A., A.V. PANICHEV, O.I. BOIKO and A.D. GARA GULYA  
Numerical taxonomy of bacteria in the genus Pseudomonas.  
Microbiology, 1979, 48 : 834-842.
- KLEEBERGER A., H. CASTORPH and W. KLINGMÜLLER  
The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to Gram-negative bacteria.  
Arch. Microbiol., 1983, 136 : 306-311.
- KLOEPPER J.W. and M.N. SCHROTH  
Plant growth promoting rhizobacteria on radish.  
In : Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie, INRA, Angers (Ed.). Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria, 1978, Vol. 2, 879-882.
- KLOEPPER J.W. and C.J. BEAUCHAMP  
A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria.  
Can. J. Microbiol., 1992, 38 : 1219-1232.
- KLOEPPER J.W., R. LIFSHITZ and R.M. ZABLOTOWICZ  
Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity.  
Tibtech., 1989, 7 : 39-44.
- KLOEPPER J.W., W.F. MAHAFFEE, J.A. McINROY and P.A. BACKMAN  
Comparative analysis of five methods for recovering rhizobacteria from cotton roots.  
Can. J. Microbiol., 1991, 37 : 953-957.
- KOBAYASHI H., T. ISHIDORI, I. KUSAKABE, K. MURAKAMI and I. NAKAMURA  
Production of milk-coagulating enzyme of Pseudomonas maltophilia.  
J. Ferment. Technol., 1979, 57(4) : 375-378.
- KOBAYASHI T., A. OGASAWARA, S. ITO and M. SAITOH  
Purification and some properties of alkaline proteinase produced by Pseudomonas maltophilia.  
Agric. Biol. Chem., 1985, 49(3) : 693-698.
- KOMAGATA K. and H. OGAWA  
Microbiological studies on frozen foods. III - Determination of Gram-negative bacteria isolated from frozen foods.  
Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 1966, 7 : 239-247.

- KOMAGATA K., E. YABUUCHI, Y. TAMAGAWA and A. OHYAMA  
Pseudomonas melanogena Iizuka and Komagata 1963, a later subjective synonym of Pseudomonas maltophilia Hugh and Ryschenkow 1960.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1974, 4(2) : 242-247.
- KREMER R.J.  
Identity and properties of bacteria inhabiting seeds of selected broadleaf weed species.  
Microbiol. Ecol., 1987, 14 : 29-37.
- KRIEG N.R. and J.G. HOLT  
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1st Ed.  
The Williams and Wilkins Co., Baltimore, London, 1984, Vol. 1.
- KWOK C., D. FAHY and H. HOITINK  
Abstract.  
Phytopathology, 1986, 76 : 1123.
- KWOK O.C.H., P.C. FAHY, H.A.J. HOITINK and G.A. KUTER  
Interactions between bacteria and Trichoderma hamatum in suppression of Rhizoctonia damping-off in bark compost media.  
Phytopathology, 1987, 77 : 1206-1212.
- LAMBERT B. and H. JOOS  
Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research.  
Tibtech., 1989, 7 : 215-219.
- LAMBERT B., F. LEYNS, L. VAN ROOYEN, F. GOSSELE, Y. PAPON and J. SWINGS  
Rhizobacteria of maize and their antifungal activities.  
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 1866-1871.
- LAMBERT B., P. MEIRE, H. JOOS, P. LENS and J. SWINGS  
Fast-growing, aerobic, heterotrophic bacteria from the rhizosphere of young sugar beet plants.  
Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56(11) : 3375-3381.
- LAPAGE S.P., A. EFSTRATIOU and L.R. HILL  
The ortho-nitrophenol (ONPG) test and acid from lactose in Gram-negative genera.  
J. Clin. Pathol., 1973, 26 : 821-825.
- LAPAGE S.P., P.H.A. SNEATH, E.F. LESSEL, V.B.D. SKERMAN, H.P.R. SEELIGER and W.A. CLARK  
International code of nomenclature of bacteria. 1975 Revision.  
Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C., 1975.
- LAWRENCE R.C., T.F. FRYER and B. REITER  
Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipase.  
Nature, 1960, 213(1) : 1264-1265.
- G. LAZO, R. ROFFEY and D.W. GABRIEL  
Pathovars of Xanthomonas campestris are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1987, 37(3) : 214-221.

- LECHEVALIER M.P. and H.A. LECHEVALIER  
Chemotaxonomic use of lipids.  
In : Microbial Lipids. RATLEDGE C. and S.G. WILKINSON (Eds),  
Academic Press, London, 1988, 869-902.
- LEGENDRE L. et P. LEGENDRE  
Ecologie numérique. Tome 2. La nature des données écologiques.  
Masson (Ed.), Paris et P.U.Q., Québec, 1984, 335 p.
- LEISINGER T. and R. MARGRAFF  
Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads.  
**Microbiol. Rev.**, 1979, 43 : 422-442.
- LEYNS F., M. DE CLEENE, J. SWINGS and J. DE LEY  
The host range of the genus Xanthomonas.  
**Bot. Rev.**, 1984, 50 : 308-356.
- LEYNS F., B. LAMBERT, H. JOOS and J. SWINGS  
Antifungal bacteria from different crops.  
Biological control of soil-borne plant pathogens. Edition HORNBY  
D., C.A.B. International, Wallingford, U.K., 1990.
- LINDSTRÖM K., P. LIPSANEN et S. KAIJALAINEN  
Stability of markers used for identification of two Rhizobium galegae inoculant strains after five years in the field.  
**Appl. Environ. Microbiol.**, 1990, 56 : 444-450.
- LOWE W.E. and W.M. INGLEDEW  
Lactose utilization by Pseudomonas maltophilia.  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1975, 25(1) : 7-11.
- LUND G.  
A comparison by the use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D streptococci.  
**J. Gen. Microbiol.**, 1965, 40 : 413-419.
- MAC ARTHUR J.V., D.A. KOVACIC and M.H. SMITH  
Gradient diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient.  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1988, 85 : 9621-9624.
- MAC DIARMID J.A. and D.H. BURRELL  
Characterization of Pseudomonas maltophilia isolates from fleece rot.  
**Appl. Environ. Microbiol.**, 1986, 51(2) : 346-348.
- MARTENS R.  
Apparatus to study the quantitative relationships between root exsudates and microbiol populations in the rhizosphere.  
**Soil Biol. Biochem.**, 1982, 14 : 315-317.
- MARTIN J.K.  
Influence of plant species and plant age on the rhizosphere microflora.  
**Aust. J. Biol. Sci.**, 1971, 24 : 1143-1150.

- MATSUMOTO H., K. OKADA and E. TAKAHASHI  
Excretion products of maize roots from seedlings to seed development stage.  
*Plant Soil*, 1979, 53 : 17-26.
- MEYER J.R. and R.G. LINDERMAN  
Selective influence of populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by micorrhizas formed by Glomus fasciculatum.  
*Soil Biol. Biochem.*, 1986, 18 : 191-196.
- MILLER L.K. and K.P. DAWES  
Physical map of the DNA genome of Autographica californica nuclear polyhedrosis virus.  
*J. Virol.*, 1979, 29 : 1044-1045.
- MILLER H.J., E. LILJEROTH, G. HENKEN and J. VAN VEEN  
Fluctuations in the fluorescent pseudomonad and actinomycete populations of rhizosphere and rhizoplane during the growth of spring wheat.  
*Can. J. Microbiol.*, 1990, 36 : 254-258.
- MISHUSTIN E.N. and A.N. NAUMOVA  
Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action.  
*Mikrobiologiya*, 1962, 31 : 543-555.
- MOORE W.E., E.P. CATO and L.V.H. MOORE  
Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 approved lists of bacterial names (1 January 1980 to 1 January 1985).  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1985, 35 : 382-407.
- MOSS D.W.  
Origins and structures of multiple forms of enzymes.  
*In* : Isoenzymes. Chapman and Hall Ltd (Eds), London, 1982, 9-38.
- MUNDT J.O. and N.F. HINCKLE  
Bacteria within ovules and seeds.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, 32 : 694-698.
- MURATA N. and M.P. STARR  
A concept of the genus Xanthomonas and its species in the light of segmental homology of deoxyribonucleic acids.  
*Phytopathol. Z.*, 1973, 77 : 285-323.
- NEAL J.L., T.G. ATKINSON and R.I. LARSON  
Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome.  
*Can. J. Microbiol.*, 1970, 16 : 153-158.
- NEAL J.L., R.I. LARSON and T.G. ATKINSON  
Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosome in spring wheat.  
*Plant Soil*, 1973, 39 : 209-212.

- NISHIMURA Y., H. KANZAKI and H. IIZUKA  
Taxonomic studies of Acinetobacter species based on the electrophoretic analysis of enzymes.  
J. Basic. Microbiol., 1988, 28(6) : 363-370.
- NORD C.E., L. SJÖBERG, T. WADSTRÖM and B. WRETLIND  
Characterization of three Aeromonas and nine Pseudomonas species by extracellular enzymes and haemolysins.  
Med. Microbiol. Immunol., 1975, 161 : 79-87.
- NORRIS J.R.  
Electrophoretic analysis of bacterial systems an aid to taxonomy.  
J. Gen. Microbiol., 1962, 28 : VII.
- NORRIS J.R.  
The classification of Bacillus thuringiensis.  
J. Appl. Bacteriol., 1964, 27 : 439-447.
- O'BRIEN M. and G.H.G. DAVIS  
Enzymatic profile of Pseudomonas maltophilia.  
J. Clin. Microbiol., 1982, 16 : 417-421.
- O'FARRELL P.H.  
High resolution two dimensional electrophoresis of proteins.  
J. Biol. Chem., 1975, 250 : 4007-4021.
- OHKAWA I., S. SHIGA and M. KAGEYAMA  
An esterase on the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa for the hydrolysis of long chain acyl ester.  
J. Biochem., 1979, 86 : 643-656.
- OWENS J.D. and R.M. KEDDIE  
The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria.  
J. Appl. Bacteriol., 1969, 32 : 338-347.
- PAAU A.  
Improvement of Rhizobium inoculants.  
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55 : 862-865.
- PALLERONI N.J.  
Introduction to the family Pseudomonadaceae.  
In : The Prokaryotes : a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. STARR M.P., H. STOLP, H.G. TRÜPER, A. BALOWS and H.G. SCHLELGEL (Eds), Springer Verlag, Berlin, 1981, 655-665.
- PALLERONI N.J.  
Pseudomonadaceae.  
In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. KRIEG N.R. and J.G. HOLT (Eds); Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, 141-199.
- PALLERONI N.J. and J.F. BRADBURY  
Stenotrophomonas, a new bacterial genus for Xanthomonas maltophilia (Hugh 1980) SWINGS et al. 1983.  
Int. J. Syst. Bact., 1993, 43(3) : 606-609.

- PALLERONI N.J., R.W. BALLARD, E. RALSTON and M. DOUDOROFF  
Deoxyribonucleic acid homologies among some Pseudomonas species.  
J. Bacteriol., 1972, 110 : 1-11.
- PALLERONI N.J., R. KUNISAWA, R. CONTOPOULOU and M. DOUDOROFF  
Nucleic-acid homologies in genus Pseudomonas.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1973, 23 : 333-339.
- PARKE J.L., C.M. LIDDELL and M.K. CLAYTON  
Relationship between soil mass adhering to pea taproots and  
recovery of Pseudomonas fluorescens from the rhizosphere.  
Soil Biol. Biochem., 1990, 22 : 495-499.
- PENG Z.R., J. DEBETTE and R. BLONDEAU  
Studies on nutritional factors affecting growth and competition  
of Pseudomonas maltophilia in the presence of Pseudomonas  
fluorescens.  
System. Appl. Microbiol., 1987, 9 : 307-311.
- PETERSON G.  
A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which  
is more generally applicable.  
Analyt. Biochem., 1977, 83 : 346-356.
- PICARD B. and P. GOULLET  
Esterase electrophoresis : a new epidemiological screening test for  
Aeromonas hydrophila hospital infection.  
J. Hosp. Infect., 1984, 5 : 335-337.
- PICARD B. and P. GOULLET  
Epidemiological complexity of hospital Aeromonas infections revealed  
by electrophoresis typing of esterases.  
Epidemiol. Infect., 1987, 98 : 5-14.
- PICARD B. and P. GOULLET  
Epidemiological typing of Acinetobacter strains by esterase  
electrophoresis.  
FEMS Microbiol. Lett., 1990, 72 : 229-234.
- PICARD B., B. BRUNEAU and P. GOULLET  
Demonstration of an outbreak of Serratia marcescens infections in  
a medical intensive care unit by esterase electrophoretic typing.  
J. Hosp. Infect., 1988, 11 : 194-195.
- PICARD B., P. GOULLET, E. DENAMUR and G. SUERMONDT  
Esterase electrophoresis : a molecular tool for studying the  
epidemiology of Branhamella catarrhalis nosocomial infection.  
Epidemiol. Infect., 1989, 103 : 547-554.
- QUADLING C.  
Preservation of Xanthomonas by freezing in glycerol broth.  
Can. J. Microbiol., 1960, 6 : 475-478.

- RICHARD C.  
Identification des Pseudomonas et bactéries apparentées rencontrés en milieu hospitalier.  
Ass. Anc. Et. Pasteur, 1983, 95 : 13-21.
- RIDE M.  
Sur l'étiologie du chancre suintant du Peuplier.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 1958, 246 : 2795-2798.
- RIDE M. et S. RIDE  
Xanthomonas populi (Ride) comb. nov. (syn. Aplanobacter populi Ride) spécificité, variabilité et absence de relation avec Erwinia cancerogena.  
Eur. J. For. Pathol., 1978, 8 310-333.
- RIDE M. et S. RIDE  
Xanthomonas populi (ex Ridé 1958) sp. nov., nom. rev.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1992, 42(4) : 652-653.
- RIVIERE J.  
Etude de la rhizosphère du Blé.  
Ann. Agron., 1960, 11 : 397-440.
- ROVIRA A.D.  
Interactions between plant roots and soil microorganisms.  
Ann. Rev. Microbiol., 1965, 19 : 241-266.
- ROVIRA A.D., R.C. FOSTER and J.K. MARTIN  
Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere.  
In : The Soil-Root Interface. HARLEY J.L. and R. SCOTT-RUSSEL (Eds), Acad. Press Inc., London - New-York - San Francisco, 1979, 1-4.
- SANDS D.C. and A.D. ROVIRA  
Isolation of fluorescent pseudomonads with a selective medium.  
Appl. Microbiol., 1970, 20 : 513-514.
- SCHAAD N.W.  
Immunological comparison and characterization of ribosomes of X. vesicatoria.  
Phytopathology, 1976, 66 : 770-776.
- SCHABLE B., D. RHODEN, R. HUGH, R.E. WEAVER, N. KHARDORI, P.B. SMITH, G.P. BODEY and R.L. ANDERSON  
Serological classification of Xanthomonas maltophilia (Pseudomonas maltophilia) based on heat-stable O antigens.  
J. Clin. Microbiol., 1989, 27 : 1011-1014.
- SCHER F.M., J.S. ZIEGLE and J.W. KLOEPFER  
A method for assessing the root-colonising capacity of bacteria on maize.  
Can. J. Microbiol., 1984, 30 : 151-157.

- SCHER F.M., J.W. KLOPPER and C.A. SINGLETON  
Chemotaxis of fluorescent Pseudomonas spp. to soybean seed exudates  
in vitro and in soil.  
Can. J. Microbiol., 1985, 31(6) : 570-574.
- SCHERER P. and H. KNEIFEL  
Distribution of polyamines in methanogenic bacteria.  
J. Bacteriol., 1983, 153 : 1315-1322.
- SCHROTH M.N. and J.G. HANCOCK  
Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria.  
Science, 1982, 216 : 1376-1381.
- SCOTT F.M., K.C. HAMNER, E. BAKER and E. BOWLER  
Electron microscope studies of the epidermis of Allium cepa.  
L. Am. J. Bot., 1958, 45 : 449-461.
- SELANDER R.K., D.A. CAUGANT, H. OCHMAN, J.M. MUSSER, M.N. GILMOUR  
and T.S. WHITTAM  
Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial popu-  
lation genetics and systematics.  
Appl. Environ. Microbiol., 1986, 51(5) : 873-884.
- SEQUERIA L. and P.H. WILLIAMS  
Synthesis of indole acetic acid by Pseudomonas solanacearum.  
Phytopathology, 1964, 54 : 1240.
- SHIGA N.  
Food-bacteriological investigation of Flavobacterium.  
Chiba Igakkai Zasshi, 1957, 33 : 28-41.
- SHIGETA S. and N. ISHIDA  
Studies of Pseudomonas aeruginosa infections among hospitalized  
patients. I - Isolation and identification of non-fermentative  
Gram-negative rods.  
Jpn. J. Microbiol., 1974, 18 : 9-14.
- SIERRA G.  
A simple method for detection of lipolytic activity of microor-  
ganisms and some observations on the influence of the contact  
between cells and fatty substrates.  
Ant. von Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., 1957, 23 : 15-22.
- SIMON A., A.D. ROVIRA and D.C. SANDS  
An improved selective medium for isolating fluorescent pseudomonads.  
J. Appl. Bacteriol., 1973, 36 : 141-145.
- SINGER E. and J. DEBETTE  
Nutritional factors controlling exocellular proteinase production  
in a soil-isolated Xanthomonas maltophilia strain.  
J. Basic Microbiol., 1993, 33 : 113-121.
- SNEATH P.H.A.  
Analysis and interpretation of sequence data for bacterial  
systematics : the view of a numerical taxonomist.  
Syst. Appl. Microbiol., 1989, 12 : 15-31.

- SOKAL R.R. and C.D. MICHENER  
A statistical method for evaluating systematic relationships.  
**Univ. Kansas Sci. Bull.**, 1958, 38 : 1409-1438.
- SOUMARE S. et R. BLONDEAU  
Caractéristiques microbiologiques des sols de la région du Nord de la France : importance des "Arthrobacter".  
**Ann. Inst. Pasteur**, 1972, 123 : 239-249.
- STACKEBRANDT E., R.G.E. MURRAY and H.G. TRÜPER  
Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives".  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1988, 38 : 321-325.
- STANIER R.Y., N.J. PALLERONI and M. DOUDOROFF  
The aerobic pseudomonads : a taxonomy study.  
**J. Gen. Microbiol.**, 1966, 43 : 159-271.
- STARR M.P.  
The genus Xanthomonas.  
In : The Prokaryotes : a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. STARR M.P., H. STOLP, H.G. TRÜPER, A. BARLOWS and H.G. SCHLEGEL (Eds), Springer Verlag, Berlin, 1981, 742-763.
- STARR M.P. and O.C. GARCES  
El agente causante de la gomosis bacterial del pasto imperial en Colombia.  
**Revista Facultad Nacional de Agronomia del Medellin**, 1950, 12 : 73-83.
- STARR M.P. and W.L. STEPHENS  
Pigmentation and taxonomy of the genus Xanthomonas.  
**J. Bacteriol**, 1964, 87 : 293-302.
- STARR M.P., C.L. JENKINS, L.B. BUSSEY and A.G. ANDREWES  
Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus Xanthomonas.  
**Arch. Mikrobiol.**, 1977, 113 : 1-9.
- SWANSON B.T., H.F. WILKINS and B.W. KENNEDY  
Factors affecting ethylene production by some plant pathogenic bacteria.  
**Plant and Soil**, 1979, 51 : 19.
- SWINGS J. and E.L. CIVEROLO  
Xanthomonas.  
Chapman and Hall (Eds), London, 1993.
- SWINGS J., K. KERSTERS and J. DE LEY  
Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of Zymomonas strains.  
**J. Gen. Microbiol.**, 1976, 93 : 266-271.
- SWINGS J., M. GILLIS, K. KERSTERS, P. DE VOS, F. GOSSELE and J. DE LEY  
Frateuria, a new genus for "Acetobacter aurantius".  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1980, 30 : 547-556

- SWINGS J., P. DE VOS, M. VAN DEN MOOTER and J. DE LEY  
Transfert of Pseudomonas maltophilia Hugh 1981 to the genus Xanthomonas as Xanthomonas maltophilia (Hugh 1981) comb. nov.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1983, 33(2) : 409-413.
- SWINGS J., M. VAN DEN MOOTER, L. VAUTERIN, B. HOSTE, M. GILLIS, T.W. MEW and K. KERSTERS  
Reclassification of the causal agents of bacterial blight (X. campestris pv oryzae) and bacterial leaf streak (X. campestris pv oryzicola) of rice as pathovars of Xanthomonas oryzae (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom rev.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1990, 40 : 309-311.
- TABOR C.W. and H. TABOR  
Polyamines in microorganisms.  
Microbiol. Rev., 1985, 49 : 81-99.
- TANAKA S., T. SUTO, Y. ISHIYAMA, R. AZUMA and H. HATAKEYAMA  
Chemo-taxonomical studies on fatty acids of "Brucella" species.  
Ann. Sclavo., 1977, 19 : 67-82.
- TANFORD C. and J.A. REYNOLDS  
Characterization of membrane proteins in detergent solutions.  
Bioch. Biophys. Acta, 1976, 457 : 133-170.
- THAVEECHAI N. and N.W. SCHAAD  
Serological and electrophoretic analysis of a membrane protein extract of Xanthomonas campestris pv campestris from Thailand.  
Phytopathology, 1986, 76(2) : 139-147.
- TZAGOLOFF A. and H.S. PENEFSKY  
Extraction and purification of lipoprotein complexes from membranes.  
Methods Enzymol., 1971, 22 : 219-230.
- UNDERBERG H. and J.W.L. VAN VUURDE  
In situ detection of Erwinia chrysanthemi on potato roots using immunofluorescence and immunogold staining.  
In : Plant Pathogenic Bacteria. Part B. Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Z. Klement. Akademiai Kiado (Ed.), Budapest, 1990, 937-944.
- URIEL J.  
Caractérisation des cholinestérases et d'autres estérases carboxyliques après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose (application à l'étude des estérases du sérum humain normal).  
Ann. Inst. Pasteur Paris, 1961, 101 : 104-119.
- VANCURA V.  
Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates.  
Folia Microbiol., 1980, 25 : 168-173.
- VAN DEN MOOTER M. and J. SWINGS  
Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 Xanthomonas strains and related strains and an improved taxonomy of the genus.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 1990, 40(4) : 348-369.

- VAN DEN MOOTER M., H. MARAITE, L. MEIRESONNE, J. SWINGS, M. GILLIS, K. KERSTERS and J. DE LEY  
Comparison between X. campestris pv manihotis (ISPP List 1980) and X. campestris pv cassavae (ISPP List 1980) by means of phenotypic, protein electrophoretic, DNA hybridization and phytopathological techniques.  
**J. Gen. Microbiol.**, 1987, 133 : 57-71.
- VAN OUTRYVE M.F., F. GOSSELE, K. KERSTERS and J. SWINGS  
The composition of the rhizosphere of Chicory (Cichorium intybus L. var. foliosum Hegi).  
**Can. J. Microbiol.**, 1988, 34 : 1203-1208.
- VAN OUTRYVE M.F., V. GOSSELE, F. GOSSELE and J. SWINGS  
Composition of the microflora of Witloof Chicory seeds.  
**Microbiol. Ecol.**, 1988, 16 : 339-348.
- VAN OUTRYVE M.F., F. GOSSELE, H. JOOS and J. SWINGS  
Fluorescent Pseudomonas isolates pathogenic on Witloof Chicory leaves.  
**J. Phytopath.**, 1989, 125 : 247-256.
- VAN ZYL E. and P.L. STEYN  
Differentiation of phytopathogenic Pseudomonas and Xanthomonas species and pathovars by numerical taxonomy and protein gel electrophoregrams.  
**System. Appl. Microbiol.**, 1990, 13 : 60-71.
- VAN ZYL E. and P.L. STEYN  
Reinterpretation of the taxonomic position of Xanthomonas malto-  
philia and taxonomic criteria in this genus.  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1992, 42(1) : 193-198.
- VAUTERIN L., J. SWINGS, K. KERSTERS, M. GILLIS, T.W. MEW, M.N. SCHROTH, N.J. PALLERONI, D.C. HILDEBRAND, D.E. STEAD, E.L. CIVEROLO, A.C. HAYWARD, H. MARAITE, R.E. STALL, A.K. VIDAVER and J.F. BRADBURY  
Towards an improved taxonomy of Xanthomonas.  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1990, 40(3) : 312-316.
- VAUTERIN L., P. YANG, B. HOSTE, M. VANCANNEYT, E.L. CIVEROLO, J. SWINGS and K. KERSTERS  
Differentiation of Xanthomonas campestris pv citri strains by sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, fatty acid analysis, and DNA-DNA hybridization.  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1991, 41(4) : 535-542.
- VERA CRUZ C.M., F. GOSSELE, K. KERSTERS, P. SEGERS, M. VAN DEN MOOTER, J. SWINGS and J. DE LEY  
Differentiation between Xanthomonas campestris pv oryzae, Xanthomonas campestris pv oryzicola and the bacterial brown blotch pathogen on rice by numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams.  
**J. Gen. Microbiol.**, 1984, 130 : 2983-2999.
- VERONA O.  
La spermosphère.  
**Ann. Inst. Pasteur**, 1959, 95 : 795-798.

- VON GRAEVENITZ A.  
Clinical microbiology of unusual Pseudomonas species.  
**Prog. Clin. Pathol.**, 1973, 5 : 185-218.
- WAKKER J.H.  
Vorläufige Mitteilungen über Hyacinthenkrankheiten.  
**Bot. Zentralbl.**, 1883, 14 : 315-317.
- WAYNE L.G., D.J. BRENNER, R.R. COLWELL, P.A.D. GRIMONT, O. KANDTER, M.I. KRICHEVSKY, L.H. MOORE, W.E.C. MOORE, R.G.E. MURRAY, E. STACKEBRANDT, M.P. STARR and H.G. TRUPER  
Report of the Ad Hoc Committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematics.  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1987, 37 : 463-464.
- WELLER D.M. and R.J. COOK  
Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads.  
**Phytopathology**, 1983, 73 : 463-469.
- WILKINSON S.G.  
Gram-negative bacteria.  
In : Microbial Lipids. RATLEDGE C. and S.G. WILKINSON (Eds), Academic Press Inc., New-York, 1988, Vol. 1, 299-488.
- WILLEMS A., M. GILLIS, K. KERSTERS, L. VAN DEN BROECKE and J. DE LEY  
Transfer of Xanthomonas ampelina Panagopoulos 1969 to a new genus Xylophilus gen. nov., as Xylophilus ampelinus (Panagopoulos 1969) comb. nov.  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1987, 37 : 422-430.
- WOESE C.R., E. STACKEBRANDT, T.J. MACKE and G.E. FOX  
A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa.  
**System. Appl. Microbiol.**, 1985, 6 : 143-151.
- YANG P., P. DE VOS, J. SWINGS and K. KERSTERS  
Polyamine patterns as chemotaxonomic markers for the genus Xanthomonas.  
Non publié.
- YOUNG J.M., D.W. DYE, J.F. BRADBURY, C.G. PANAGOPOULOS and C.F. ROBBS  
A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria.  
**N. Z. J. Agric. Res.**, 1978, 21 : 153-177.
- J.M. YOUNG, J.F. BRADBURY, L. GARDAN, R.I. GVOZDYAK, D.E. STEAD, Y. TAKIKAWA and A.K. VIDAVER  
Comment on the reinstatement of Xanthomonas citri (ex Hasse 1915) Gabriel et al. 1989 and X. phaseoli (ex Smith 1897) Gabriel et al. 1989 : indication of the need for minimal standards for the genus Xanthomonas.  
**Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1991, 41(1) : 172-177.
- YOSHIDA H., Y. TANAKA and K. NAKAYAMA  
Production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) by Pseudomonas melanogenum.  
**Agric. Biol. Chem.**, 1974, 38 : 455-462.

A N N E X E N° 1COMPOSITION DE MILIEUXMilieu de SIERRA (1957)

- Bacto-peptone (Difco) .....	10	g
- NaCl .....	5	g
- CaCl <sub>2</sub> .....	0,1	g
- Agar .....	15	g
- H <sub>2</sub> O .....	1	l

- Ajuster le pH à 7,4.
- Autoclavage 20 min à 120°C.
- Autoclaver du Tween 80 séparément.
- Incorporer le Tween après autoclavage de façon à avoir une concentration finale de 1 %.

Milieu gélatine

- Peptone .....	5	g
- Extrait de levure .....	5	g
- Glucose .....	5	g
- Gélatine .....	40	g
- H <sub>2</sub> O .....	1	l

- Ajuster le pH entre 7 et 7,2.
- Répartir en tubes (7 ml/tube).
- Autoclavage 30 min à 110°C.
- Stockage des tubes au réfrigérateur.

Milieu esculine (BUTTIAUX et coll., 1966)

- Bacto-peptone (Difco) .....	10	g
- Citrate de fer ammoniacal .....	1	g
- Esculine .....	1	g
- Bacto-agar (Difco) .....	15	g
- H <sub>2</sub> O .....	1	l

- Ajuster le pH à 7,3-7,4.
- Autoclaver 30 min à 115°C.
- Filtrer à chaud et répartir en tubes (4 ml/tube).
- Autoclaver 30 min à 110°C.
- Ensemencer par pique centrale. Un virage au noir après incubation de plus de 24 h à 37°C indique une hydrolyse de l'esculine.

Milieu GYCA (VERA CRUZ et coll., 1984)

- Glucose .....	10	g
- Extrait de levure .....	5	g
- CaCO <sub>3</sub> .....	30	g
- Agar .....	15	g
- Eau du robinet .....	1	l

- Bien agiter (le CaCO<sub>3</sub> est insoluble).
- Autoclaver 30 min à 105°C.

Milieu de OWENS et KEDDIE (1969) modifié (PENG et coll., 1987)

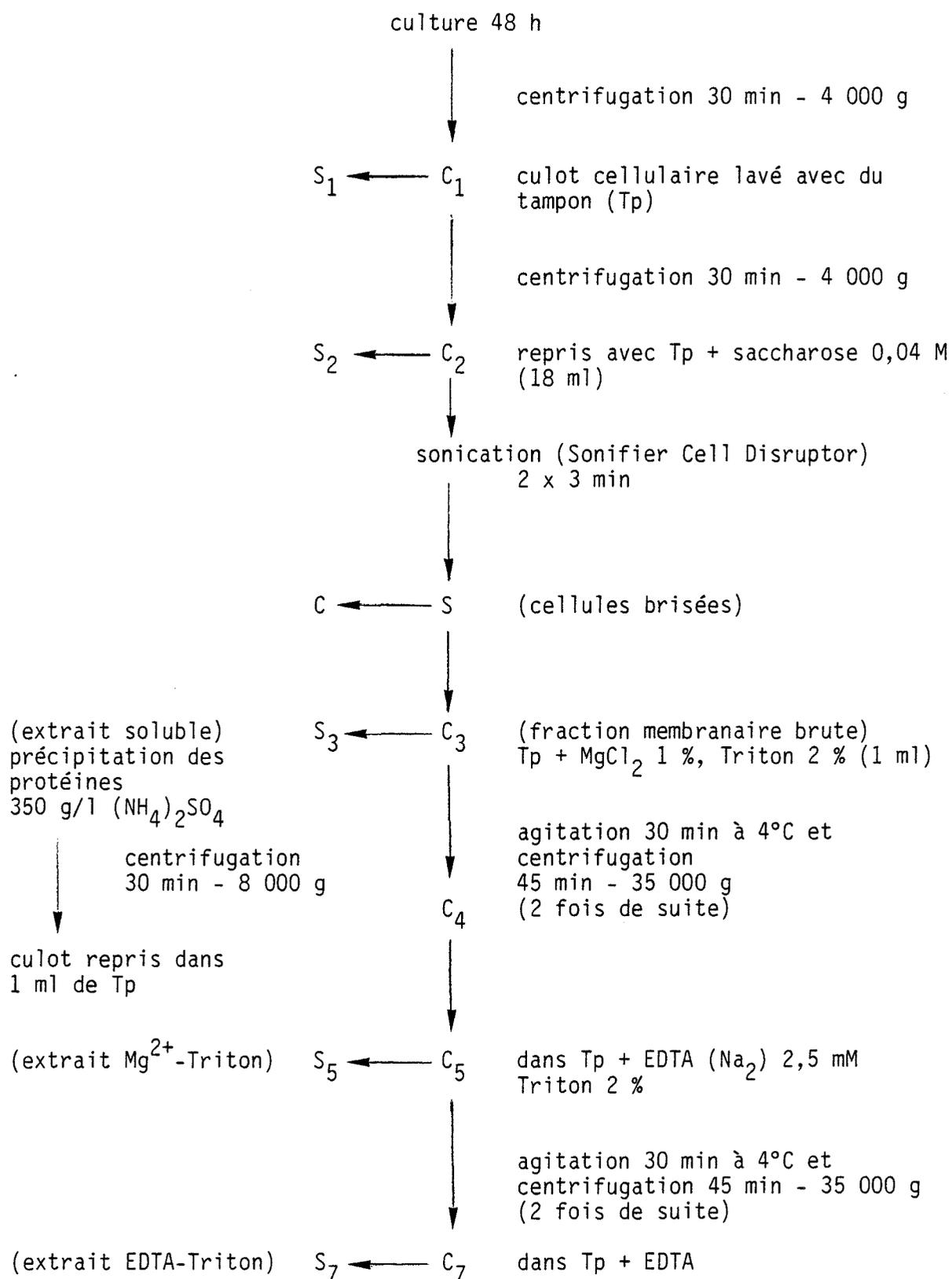
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O .....	2,58	g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5	g
- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,5	g
- CaCl <sub>2</sub> .....	0,025	g
- MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,2	g
- NaCl .....	0,1	g
- H <sub>2</sub> O .....	1	l

+ 3 ml d'une solution de métaux composée de :

- EDTA .....	5	g
- ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	2,2	g
- MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,57	g
- FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,5	g
- CaCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O .....	0,161	g
- CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O .....	0,157	g
- Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O .....	0,151	g
- H <sub>2</sub> O .....	1	l

- pH = 6,8.

- Autoclaver 30 min à 110°C.

A N N E X E N ° 2

Tp = Tampon Tris-HCl  
0,05 M (pH 8)

A N N E X E N ° 3Dosage in vitro de l'activité enzymatique (BREUIL et KUSHNER, 1975)

Le  $\beta$ -naphthyl acétate (Sigma) est le substrat utilisé. Il est dissous dans de l'acétone à une concentration de 9,25 % (pds/vol), puis cette solution est homogénéisée dans du tampon véronal 0,1 M - pH 7,4 dans des proportions de 5 ml/45 ml.

L'échantillon enzymatique, préalablement dilué au 1/100 dans du tampon Tris-HCl 0,05 M - pH 8, est incorporé au substrat en suspension dans un rapport de 0,5 ml pour 2,5 ml. L'ensemble est placé au bain-marie à 37°C pendant 30 min.

Le  $\beta$ -naphthol libéré par hydrolyse est transformé en un pigment pourpre par addition de 0,5 ml d'une solution aqueuse d'ortho-dianisidine azotée (Fast-Blue, Sigma) à 0,4 %, préparée extemporanément.

Après 2 min, les protéines sont précipitées par 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 40 %. Le pigment est extrait par 5 ml d'acétate d'éthyle.

Les phases sont séparées par une centrifugation de 10 min à 2 000 rpm (centrifugeuse JOUAN). La densité optique de la phase supérieure est déterminée à 540 nm au spectrophotomètre (Coulter Asa Jr).

Les témoins sont réalisés par ajout simultané à l'échantillon enzymatique de Fast-Blue et de TCA.

Une unité enzymatique équivaut à la formation de 0,1  $\mu$ mole de  $\beta$ -naphthol par min et par ml de solution enzymatique.

A N N E X E N° 4Dosage des protéines (PETERSON, 1977)

## Solutions utilisées

1) CTC (Cuivre - Tartrate - Carbonate)

Du carbonate de sodium à 20 % est ajouté lentement à une solution de sulfate de cuivre et de tartrate de potassium de manière à avoir les concentrations finales suivantes :

- sulfate de cuivre : 0,1 %
- tartrate de potassium : 0,2 %
- carbonate de sodium : 10 %

2) SDS 10 %3) NaOH 0,8 %4) Désoxycholate de sodium (DOC) 0,15 %5) TCA 72 %6) Réactif de Folin dilué au 1/5e

## Préparation des réactifs

Le réactif A est obtenu en mélangeant à volumes égaux les solutions : CTC, NaOH, SDS et eau.

Le réactif de Folin dilué au 1/5e constitue le réactif B.

## Mode opératoire

### Précipitation des protéines solubles et membranaires présentes dans l'échantillon enzymatique

A 1 ml d'échantillon enzymatique dilué au 1/200 dans de l'eau, sont ajoutés 0,1 ml de DOC (0,15 %). Le mélange est laissé 10 min à température ambiante puis additionné de 0,1 ml de TCA (72 %). Une centrifugation (3 000 g - 15 min) permet de récupérer les protéines précipitées par l'acide.

### Dosage effectif

Le culot protéique obtenu est repris avec 1 ml d'eau et mélangé à la même quantité du réactif A. L'utilisation du SDS en présence de la soude entraîne une solubilisation immédiate du précipité protéique sans qu'il y ait interférence de détergents nonioniques ou cationiques. Le SDS permet également la dénaturation des protéines membranaires. Après 10 min à température ambiante, 0,5 ml du réactif B sont incorporés au mélange précédent. L'absorbance est lue à 750 nm après 30 min.

Un témoin est réalisé avec de l'eau.

Une gamme-étalon, obtenue par le même protocole à partir de BSA à des concentrations allant de 5 à 100 µg/ml, permet de convertir l'absorbance en taux de protéines.

A N N E X E N° 5MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ESTERASIQUES DANS LES GELS

Des activités estérasiques sont révélées dans les gels en utilisant divers substrats selon les procédés de LAWRENCE et coll. (1960), URIEL (1961), EL-SHARKAWY et HUISINGH (1971) et GOULLET (1980).

**Pour l'hydrolyse des esters du  $\beta$ -naphthol** (acétate et butyrate, Sigma), les gels sont immergés dans le mélange suivant, préparé extemporanément : à 30 mg de substrat dissous dans 3 ml d'acétone sont ajoutés 150 ml de tampon phosphate 0,15 M (pH 7,2), puis sous agitation constante 60 mg de "Fast Blue". Après une incubation de 30 à 60 min à température ambiante, les endroits du gel possédant une activité  $\beta$ -estérasique apparaissent colorés en rouge-violet par formation d'un colorant azoïque. La réaction est stoppée après un lavage à l'eau par immersion des gels dans une solution d'acide acétique à 2 %.

**Pour l'hydrolyse des esters de l' $\alpha$ -naphthol** (acétate et butyrate, Sigma), les gels sont immergés dans la préparation suivante : à 60 mg de substrat dissous dans 4 ml d'un mélange acétone/eau (v/v) sont ajoutés 150 ml de tampon Tris-maléate 0,1 M (pH 6,4), puis sous agitation 100 mg de "Fast-Blue". Après une incubation de 60 min à température ambiante, les zones d'activité  $\alpha$ -estérasique se colorent en brun-noir. La réaction est stoppée de la même manière que précédemment.

**Lors de l'hydrolyse d'un ester d'indoxyle**, le radical indoxyle libéré est rapidement oxydé, en présence d'oxygène atmosphérique, en un colorant insoluble : le bleu indigo. Le milieu d'incubation se prépare ainsi : à 30 mg d'acétate d'indoxyle dissous dans 3 ml d'acétone, sont ajoutés 132 ml de tampon véronal sodique 0,05 M (pH 8,2) et 15 ml d'acétate de cuivre  $10^{-3}$  M. Les gels y sont incubés pendant 2 à 3 h, des taches de couleur bleue permettant de localiser une activité enzymatique. On procède ensuite à un lavage à l'eau courante.

A N N E X E N° 6Milieu FPSM ou S1 (GOULD et coll., 1985)

- Agar .....	18	g
- Saccharose .....	10	g
- Glycérol .....	10	ml
- Casaamino acides .....	5	g
- NaHCO <sub>3</sub> .....	1	g
- MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	1	g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,3	g
- Sodium Lauroyl Sarcosine .....	1,2	g
- H <sub>2</sub> O .....	1	l
- Trimethoprime .....	20	mg

- pH 7,4 à 7,6.

- Autoclavage 30 min à 105°C.

- Le trimethoprime est autoclavé séparément et incorporé au milieu après cet autoclavage.

## ANNEXE A

## Les 53 tests phénotypiques de l'analyse numérique et leur symbole

Caractères phénotypiques	Symboles	Caractères phénotypiques	Symboles
- Dégradation du Tween 80	TWB	- Aspect sur le milieu sélectif XSM	XM
- Hydrolyse de la gélatine	GEL	- Aspect sur le milieu sélectif XML (avec extrait de levure)	XML
- Assimilation du mannose	MAN	- Aspect sur le milieu sélectif XMM (avec méthionine)	XMM
- Assimilation du malate	MAL	- Assimilation de l'arabinose	ARA
- Assimilation du citrate	CIT	- Assimilation du mannitol	MAT
- Assimilation du glucose	GLA	- Présence d'une cytochrome oxydase	OXY
- Réduction des nitrates en nitrites	RED	- Formation d'indole	TRP
- Présence d'une $\alpha$ -galactosidase	PNB	- Fermentation du glucose	FGL
- Présence d'une lipase (C14)	LIP	- Présence d'une arginine dihydrolase	ADH
- Présence d'une valine arylamidase	VAL	- Présence d'une uréase	URE
- Présence de trypsine	TRI	- Hydrolyse de l'esculine	ESC
- Présence d'une $\alpha$ -chymotrypsine	CHY	- Assimilation de N-acétyl-glucosamine	NAG
- Présence d'une $\beta$ -galactosidase	GAL	- Assimilation du maltose	MAO
- Présence d'une $\alpha$ -glucosidase	AGL	- Assimilation de l'adipate	ADI
- Présence d'une $\beta$ -glucosidase	BGL	- Assimilation du phényl-acétate	PAC
- Présence d'une N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase	NAB	- Assimilation du gluconate	GNT
- Présence d'une $\alpha$ -mannosidase	AMA	- Assimilation du caprate	CAP
- Présence d'une catalase	CAT	- Présence d'une phosphatase alcaline	PAL
- Présence d'une élastase	ELA	- Présence d'une phosphatase acide	PNC
- Hydrolyse de la tributyrine	TRB	- Présence d'une estérase (C4)	EC4
- Hydrolyse de l'albumine	ALB	- Présence d'une estérase (C8)	EC8
- Exigence en méthionine en présence de maltose	EMA	- Présence d'une leucine arylamidase	LAR
- Exigence en méthionine en présence de glucose	GLU	- Présence d'une cystine arylamidase	CYA
- Exigence en méthionine en présence d'acétate de sodium	ACN	- Présence d'une naphтол-AS-BI-phosphohydrolase	NBP
- Exigence en méthionine en présence de succinate de sodium	SUN	- Présence d'une $\alpha$ -galactosidase	AGA
- Hydrolyse de l'arbutine	ARB	- Présence d'une $\beta$ -glucuronidase	BGR
		- Présence d'une $\alpha$ -fucosidase	AFU

## A B S T R A C T

The first part of this work is a contribution to a large taxonomic study among Xanthomonas maltophilia. The electrophoretic characteristics (isoelectrofocusing point and mobility) of membrane esterases hydrolysing  $\beta$ -naphthol esters, were compared in 52 strains of collection, most of them belonging to X. maltophilia and others being of doubtful affiliation. Furthermore 53 phenotypic features were tested. Among them 29 discriminative characters were submitted to a numerical analysis, allowing to elaborate a dendrogram by an ascendant hierarchical classification. These two taxonomic approaches were complementary and permitted to closely relate P. hibiscicola, P. betle and four strains of the genus Alcaligenes with Xanthomonas maltophilia. On the other hand, P. boreopolis, P. pictorum and four strains which belong to the X. maltophilia biovar II defined by IKEMOTO et coll. (1980) as non-requiring methionine, remained clearly apart.

Similar studies were realized in 70 wild strains of rhizospheric or medical origin. Their esterase characteristics showed a good homogeneity among environmental strains, opposed to a certain heterogeneity among pathogens ones. Consecutively, isoelectrofocusing point values of membrane esterases seem to fit exclusively into a zone of pH from 5 to 6 for this species.

The second part studies the positive rhizospheric effect on the development of X. maltophilia following a seed bacterization of some plants. Several numerations on a selective medium showed that root surface would be its preferential habitat. More precisely, immunofluorescence-colony-staining (IFC) detected the target organism along the root cortical cell walls. Its ability to colonize the near rhizosphere seem nevertheless to be variable according to the considered plants. Particularly, the structural organization of Cruciferous seeds could be an obstacle. Finally, the effects of this rhizobacterium on host plants are still to clarify.