



**HAL**  
open science

# Une bactérie phytopathogène, *Pseudomonas syringae*, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance.

## Isolement, caractérisation, diversité

Frédérique Razan

### ► To cite this version:

Frédérique Razan. Une bactérie phytopathogène, *Pseudomonas syringae*, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance. Isolement, caractérisation, diversité. [Stage] Centre Universitaire de Formation et de Recherche Unimes, Nîmes, FRA. 2011, 39 p. hal-02810506

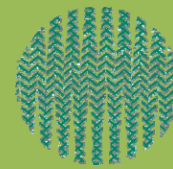
**HAL Id: hal-02810506**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02810506>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

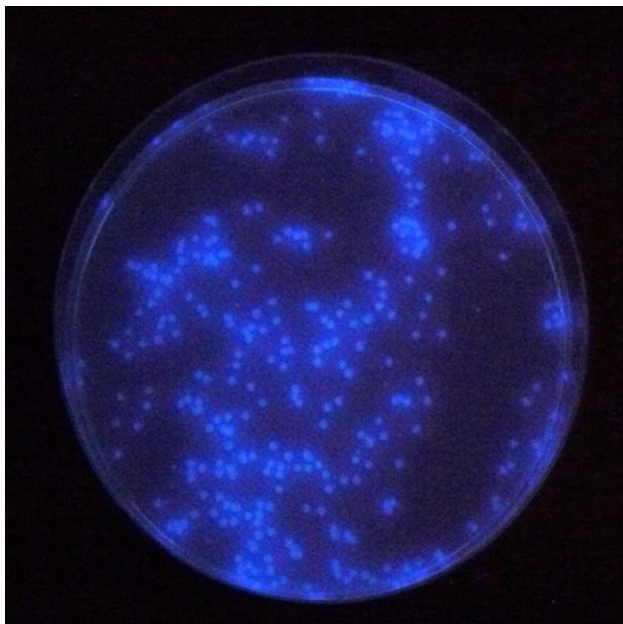


**INRA**

Institut National de recherche Agronomique

## Une bactérie phytopathogène, *Pseudomonas syringae*, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance Isolement, caractérisation, diversité

**RAPPORT DE STAGE**  
**Frédérique Razan**



**LICENCE PROFESSIONNELLE**  
**BIOTECHNOLOGIE**

Année 2010/2011



Une bactérie phytopathogène, *Pseudomonas syringae*, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance. Isolement, caractérisation, diversité de RAZAN Frédérique est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](#).

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>.....</b>
<b>I/ PRÉSENTATION DE L'INSTITUT DE RECHERCHE .....</b>	<b>1</b>
<b>II /CONTEXTE.....</b>	<b>2</b>
II-1/ Que sait-on de <i>P. syringae</i> ? .....	2
II-2/ Que sait-on des biofilms Épilithes? .....	4
II-3/ Quels sont les systèmes d'irrigation en basse Durance ? .....	5
<b>III/ OBJECTIF DU STAGE .....</b>	<b>8</b>
<b>IV/ MATÉRIEL ET MÉTHODE .....</b>	<b>10</b>
IV-1/ Stratégie d'échantillonnage .....	10
IV-2/ Prélèvements et traitement des échantillons d'eau .....	11
IV-3/ Prélèvements et traitement des biofilms épilithes.....	12
IV-4/ Dénombrement des bactéries totales cultivables sur TSA 10ème .....	12
IV-5/ Dénombrement et isolement de <i>P. syringae</i> .....	13
IV-6/ Tests biochimiques utilisés pour l'indentification de <i>P. syringae</i> .....	13
IV-7/ Typage des souches de <i>P. syringae</i> par BOX-PCR.....	15
IV-8/ Schéma de réalisation des tests en série .....	17
<b>VI/ RÉSULTATS .....</b>	<b>18</b>
V-1/ Isolement et abondance de <i>P. syringae</i> dans les réseaux d'irrigation de basse Durance .....	18
V-1-1/ Isolement de <i>P. syringae</i> dans les eaux de surface .....	18
V-1-2/ Isolement de <i>P. syringae</i> dans les eaux profondes.....	19
V-1-3/ Isolement de <i>P. syringae</i> dans les biofilms .....	19
V-1-4/ Fréquence de <i>P. syringae</i> dans la flore cultivable .....	20
V-2/ Caractérisation du pouvoir pathogène des souches de <i>P. syringae</i> .....	23
V-3/ Diversité des populations de <i>P. SYRINGAE</i> isolées de la nappe .....	23
<b>VI/ DISCUSSION .....</b>	<b>26</b>
<b>VII/ CONCLUSION.....</b>	<b>28</b>
<b>VIII/ BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>29</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>31</b>
Annexe I .....	31
Annexe II .....	32
Annexe III .....	34
Annexe IV.....	35

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier *Cindy MORRIS*, directrice de l'unité pathologie végétale, de l'accueil au sein de son unité.

Je souhaite remercier tout particulièrement *Odile Berge* pour le temps qu'elle a consacré à l'encadrement de ce travail. Ton investissement sans faille, le partage de ton expérience et tes conseils m'ont fait progresser. Nos diverses discussions professionnelles, mais aussi personnelles, ont été très enrichissantes à tout point de vue. Je te remercie très sincèrement pour tout le soutien que tu m'as accordé au cours de ces quatre mois de stage.

Je veux également te remercier pour ton aide pendant la période de rédaction : tes corrections, ta rapidité de réflexion et ta volonté de me voir réussir ont été essentielles à l'aboutissement de ce travail.

Merci à l'ensemble de l'unité, en particulier *Catherine Glaux, Caroline Guilbault, Caroline Monteil, Alain Buffière* et à tous ceux qui ont - de près ou de loin - contribué au bon déroulement de ce stage, à le rendre plus accessible au quotidien (3 h de trajet par jour ce fut un peu difficile !! Par moment !!).

# I/ PRÉSENTATION DE L'INSTITUT DE RECHERCHE

L'institut national de la recherche Agronomique (INRA) est un établissement Public à Caractère Scientifique et Technologique (EPST), placé sous la tutelle des Ministères chargés de l'agriculture et de la Recherche. C'est le second institut au rang mondial pour ses publications en agronomie. Largement implanté en région (près de 200 sites en France), l'INRA est un organisme de recherche finalisée dont les trois grands domaines d'applications sont : l'agriculture, l'alimentation et l'environnement.

L'Institut National de la Recherche Agronomique (Inra) s'est doté d'un centre unique de recherche en Provence-Alpes-Côte d'Azur : l'Inra PACA. La création de ce nouveau dispositif au 1er janvier 2010 résulte de la fusion des centres Inra d'Avignon et de Sophia-Antipolis. Il place le centre PACA au 4ème rang national parmi les 19 centres Inra avec un budget consolidé de 54 millions d'euros. Il rassemble 970 agents dont 710 titulaires, 170 non titulaires et 90 agents issus d'autres organismes travaillant à l'Inra répartis dans 17 unités de recherche. Il comprend 2 sites principaux : Avignon, Sophia-Antipolis et 7 autres sites : Aix-en-Provence, Gothenon, Grenoble, Le Cap d'Antibes, Les Vignères, Manduel, et Marseille.

Les recherches scientifiques du centre Inra PACA sont axées autour de trois pôles de compétences :

- Production Horticole Intégrée (PHI) à Avignon
- Adaptation au Changement Global (ACG) à Avignon
- Le pôle Santé des Plantes (SP) à Sophia Antipolis

Mon stage s'est déroulé au sein de l'Unité de Recherche de Pathologie Végétale (UR407) située sur le domaine de St-Maurice à Monfavet, un des deux domaines, de l'Inra d'Avignon. Les recherches de cette unité participent aux deux pôles de compétences PHI et ACG. Cette unité est dirigée par Cindy Morris directrice de recherche et se divise en trois équipes: la bactériologie, la mycologie et la virologie. La finalité des recherches de l'Unité de Pathologie Végétale est le développement de méthodes de lutte efficaces et raisonnées contre les agents phytopathogènes dans un contexte de production agronomique durable et de haute qualité. Ces recherches sont focalisées sur les maladies bactériennes, fongiques et virales des fruits et légumes du bassin méditerranéen. Des travaux sont également conduits sur la maladie du chancre coloré du platane et sur les viroses des plantes ornementales.

L'unité développe depuis plusieurs années ses compétences autour des points suivants :

- Le diagnostic rapide simple et fiable
- La gestion durable des résistances variétales
- L'utilisation d'agents de lutte biologique
- La prévision des maladies par la compréhension des mécanismes biologiques de l'écologie et de l'évolution des pathogènes.

Mon travail s'est déroulé autour de cette dernière thématique dans l'équipe bactériologie (animée par C. Morris) qui a comme modèle d'étude la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae*.

## II/ CONTEXTE

L'équipe Inra dans laquelle j'ai réalisé mon stage, a découvert que des populations de bactérie *P. syringae* sont présentes dans les cours d'eau et en particulier dans les biofilms qui en tapissent le fond (biofilms épilithes). L'objectif de l'équipe est de comprendre les implications de cette découverte sur l'évolution du pouvoir pathogène de cette espèce bactérienne et le déclenchement des épidémies. Très peu de choses sont connues sur ces populations de l'eau et des biofilms, leur abondance, leur fluctuation au cours des saisons, leur répartition, leur caractéristiques et leur implication dans le déclenchement d'épidémies. Une étude prospective de ces populations est en cours au laboratoire et mon travail de stage a contribué à cette étude.

### 11-1/ Que sait-on de *P. syringae* ?

#### **1 - C'est une bactérie phytopathogène**

*P. syringae* est un bacille à Gram négatif, mobile grâce à des flagelles, dépourvu de spores et de capsules, aérobic strict, qui ne possède pas d'activité oxydase et dont les colonies fluorescent sous UV en milieu carencé en fer.

*P. syringae* est avant tout une bactérie épiphyte capable de coloniser les feuilles en formant des biofilms sans infecter la plante. Ces biofilms contribuent à leur survie en réponse à divers stress environnementaux (Morris & Monier, 2003). Toutefois, elle peut pénétrer l'intérieur de la plante pour devenir pathogène soit par les stomates, ouvertures naturelles des feuilles permettant les échanges gazeux indispensables à la photosynthèse, soit par des plaies ou des fissures dans les écorces. C'est donc aussi une bactérie phytopathogène. Elle est très étudiée de par le monde car son impact économique est important. Elle provoque des maladies sur les cultures maraîchères, fruitières et les grandes cultures dans tous les pays sous climat tempéré lors des saisons fraîches et humides. En France par exemple entre 1997 et 2004 les régions centres, ouest et sud-ouest productrices de melon (40% de la production Française) ont été touchées par une épidémie due à *P. syringae* (Fig. 1), la Bactériose du Melon (Morris *et al.* 2000) qui a sévèrement compromis les récoltes. Cette maladie peut apparaître dans toutes les zones françaises de production de melon lorsque les conditions sont favorables (Mention *et al.* 2004). Actuellement une épidémie de *P. syringae* sur kiwi est en cours d'extension et commence à toucher significativement les vergers français.



Figure 1 : Symptômes sur melon infecté par *P. syringae*

L'espèce *P. syringae* est très diverse. Elle regroupe une cinquantaine de pathovars (groupe de souches attaquant la même plante) dont on ne connaît pas encore tous les déterminants génétiques. Toutefois le principal mécanisme de virulence commun à tous les *P. syringae*, est dû à une sécrétion du système de type III (SST3) (Cunnac *et al.* 2009). Ce système appelé « seringue moléculaire » permet l'injection par la bactérie de molécules appelés effecteurs dans la cellule de la plante. Ces molécules vont interagir avec les défenses de la plante et entraîner la maladie chez les plantes sensibles, une réaction localisée appelée « réaction hypersensible » ou « HR » pour certaines plantes résistantes et une résistance sans symptômes pour d'autres plantes résistantes. Les *P. syringae* possèdent d'autres propriétés qui interviennent dans le pouvoir pathogène. Une autre composante du pouvoir pathogène est la production de toxines comme la syringomycine, active contre les cellules végétales, bactériennes et fongiques ou la production de molécule chélatant le fer (sidérophores) pour lequel la compétition est forte.

## 2 – Ses niches écologiques sont variées

La diversité au sein d'une espèce bactérienne est liée à son écologie et dans le cas des bactéries phytopathogènes la connaissance de leur écologie est indispensable à l'élucidation des facteurs de déclenchement des épidémies. D'un point de vue écologique, jusqu'à récemment la plupart des études sur *P. syringae* portaient sur des populations isolées de plantes malades. L'approche originale de l'équipe de l'Inra où j'ai réalisé mon stage, est d'avoir cherché cette bactérie dans des zones non cultivées (en montagne) dépassant le schéma classique qui veut que les bactéries phytopathogènes soient inféodées à leur plante-hôte (sensible). Ceci a permis de mettre en évidence pour la première fois la présence ubiquiste de cette bactérie hors du contexte agricole dans des substrats variés, pluie, neige, plantes sauvages, eau des torrents et biofilms épilithes qui tapissent le fond de ces cours d'eau (Morris *et al.* 2007). Ces réservoirs très variés hébergent des souches de *P. syringae* virulentes pour diverses cultures (melon, laitue, blé, etc.). La présence de *P. syringae* virulentes dans les cours d'eau suggère qu'elle peut être dispersée vers les zones cultivées et provoquer des épidémies. Elle a en effet été retrouvée dans les lacs collinaires utilisés pour l'irrigation des cultures (Riffaud & Morris, 2002).

Par ailleurs, *P. syringae* a été détectées dans les nuages (Amato *et al.* 2007, Sands *et al.* 1982) d'où elles peuvent être lessivées de l'atmosphère par la pluie (Constantinidou *et al.* 1990). En effet certaines souches de *P. syringae* sont dotées d'une activité glaçogène, et sont capable de catalyser la prise en glace de l'eau à des températures où l'eau est liquide. *P. syringae* peut donc jouer un rôle dans les processus liés à la formation des précipitations (Morris *et al.* 2004), contribuant ainsi à son retour vers les écosystèmes terrestres. L'ensemble de ces données sur *P. syringae* suggère que cette bactérie a la capacité de survivre à la dissémination à grande distance et de s'adapter à diverses niches écologiques.

## 3 – Son cycle de vie suit le cycle de l'eau

Ces données ont fait émerger l'hypothèse d'un cycle de vie lié au cycle de l'eau douce (Fig. 2), les *P. syringae* circulant dans l'eau depuis le haut des bassins versant en zones non cultivées jusque dans les plaines cultivées où ces bactéries pourraient être à l'origine d'épidémies en particulier sur les cultures irriguées (Morris *et al.* 2008).



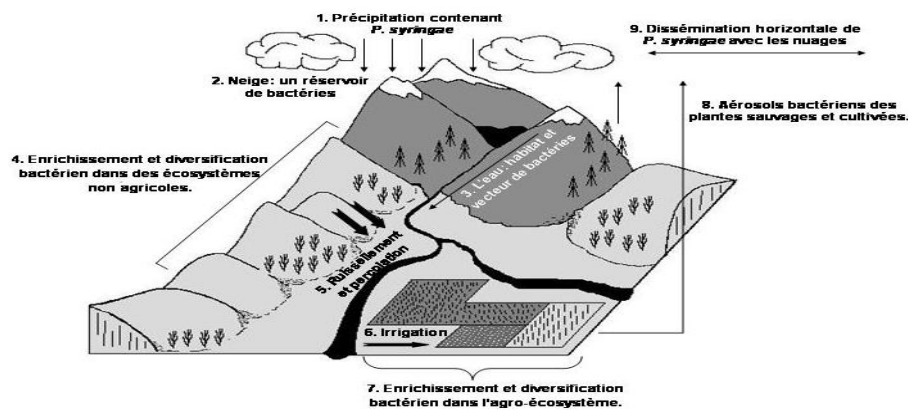


Figure 2 : Proposition d'un nouveau cycle de vie des populations de *P. syringae* dans les agro-écosystèmes. Schéma conceptuel des habitats et des flux possibles de *P. syringae* dans l'environnement, (d'après Morris *et al.* 2008)

Une meilleure connaissance de l'écologie des populations de *P. syringae* tout au long de ce cycle permettra de mieux prévoir et lutter contre ces épidémies, c'est pourquoi cette problématique est au cœur des activités de l'équipe de bactériologie de l'unité de Pathologie Végétale de l'Inra d'Avignon. Une des thématiques de recherches du laboratoire porte sur le rôle des biofilms de cours d'eau dans l'évolution et la dispersion des populations de *P. syringae*. Une des questions est de savoir si ces biofilms pourraient constituer un réservoir de souches phytopathogènes pour les cultures, en particulier pour celles qui sont irriguées. Ainsi c'est la problématique de la présence et de la caractérisation de populations de *P. syringae* dans les réseaux d'irrigation (eau, biofilms, rivières, canaux, réservoirs) qui a fait l'objet de mon travail au laboratoire.

## II-2/ Que sait-on des biofilms épilithes?

Un biofilm est défini comme un assemblage plus ou moins complexes d'organismes vivants se développant sur une surface solide, ces organismes étant empaquetés dans une matrice de polymères, le plus souvent constituée de polysaccharides. L'activité des organismes au sein d'un biofilm est très spécifique, et différente de celle des organismes isolés avec en particulier des échanges très importants entre cellules.

Les biofilms épilithes qui tapissent le fond des rivières, constituent des communautés très complexes et très hétérogènes. Ils sont composés d'algues (unicellulaires ou pluricellulaires), de bactéries, de champignons, de nématodes, de protozoaires, de petits invertébrés et de débris organiques ou inorganiques, le tout englobé dans une matrice de polysaccharides. La composition spécifique du biofilm épilithe dépend de plusieurs paramètres environnementaux tels que les conditions d'écoulement, l'éclairement, la nature du substrat, la température et la qualité de l'eau. En revanche, d'un point de vue structurel, les biofilms suivent toujours le même schéma évolutif au cours de leur développement (Fig. 3). Ainsi, le stade initial de formation d'un biofilm correspond à l'adhésion des premières cellules bactériennes. Sur ce film, de futurs ancrages et accumulations de cellules pourront s'effectuer. Durant cette phase, chaque nouvel organisme offre une nouvelle surface formant ainsi une base pour le développement d'autres groupes d'organismes. Ce film procure également aux communautés une certaine stabilité et résistance face à l'arrachage par le courant par exemple. Les bactéries sont généralement réparties dans toute l'épaisseur du biofilm, alors que les organismes phototrophes sont plutôt localisés en surface, ou moyennement enfouis dans la matrice suite à l'accumulation des cellules.

*Une bactérie phytopathogène, Pseudomonas syringae, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance*



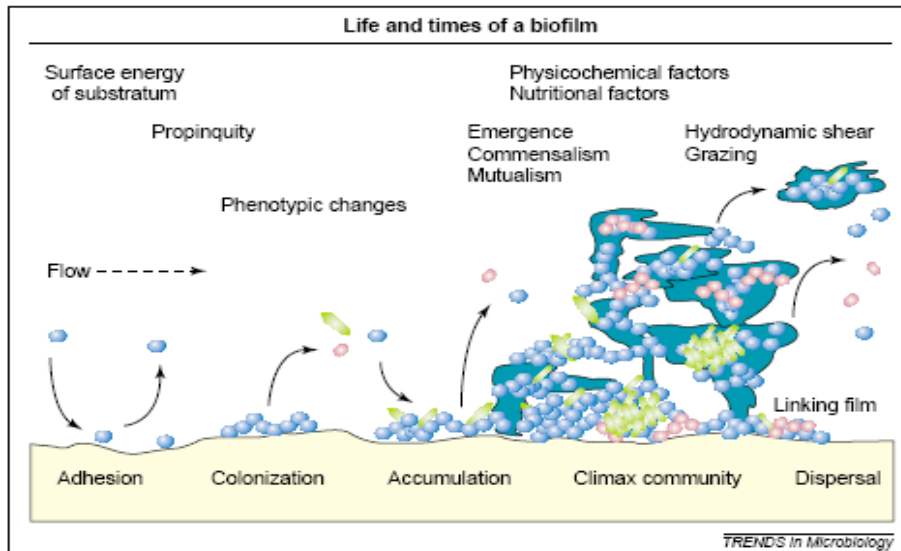


Figure 3 : Schéma décrivant les différentes étapes de formation d'un biofilm naturel (d'après Jenkinson & Lappin-Scott, 2001).

*P. syringae* est retrouvée dans plus de 50 % des biofilms de torrents de montagne, surtout dans des biofilms fins et peu épais (Morris *et al.* 2007). Les populations de *P. syringae* isolées des biofilms épilithes de torrents de montagne dans des études précédentes ont une capacité à produire des maladies sur les plantes qui est comparable aux populations isolées de l'eau de rivière. Par contre leur diversité génotypiques semble plus faible que celle des populations de l'eau et le nombre de souches produisant des toxines moins fréquent (Morris *et al.* 2007, 2010). Ces données laissent penser que tous les types de *P. syringae* ne sont pas aptes à coloniser les biofilms. Les déterminants de cette spécificité sont recherchés actuellement au laboratoire. Les exopolysaccharides produits par *P. syringae* jouent un rôle important dans la fixation des cellules bactériennes à la surface et/ou dans la construction et le maintien de la structure tridimensionnelle complexe des biofilms (Laue *et al.* 2006) et pourraient être un facteur important pour la sélection des *P. syringae* dans les biofilms épilithes.

### II-3/ Quels sont les systèmes d'irrigation en basse Durance ?

Lors de notre étude, nous nous sommes intéressés à la présence de *P. syringae* dans les eaux utilisées pour l'irrigation des cultures maraichères et fruitières de basse Durance. L'irrigation pallie au déficit pluviométrique pendant les périodes de croissance et de production végétale et dans la région du sud Vaucluse c'est une pratique traditionnelle très ancienne, le canal Saint-Julien à Cavailon date du XII<sup>ème</sup> siècle. Cette pratique a permis surtout depuis le XVIII<sup>ème</sup> siècle le développement d'autres cultures que la vigne et l'olivier avec l'eau de la Durance. L'irrigation a nécessité le développement de réseaux très organisés de canaux (construction en dur) et de filioles (simples chenaux creusés dans la terre) permettant d'acheminer l'eau de la Durance jusque dans les parcelles de culture, même éloignées de la rivière. La Durance, d'une longueur totale de 324 kilomètres est la plus importante rivière provençale. Elle est alimentée par la fonte des neiges du massif des Alpes du sud où elle prend sa source et se jette dans le Rhône à quelques kilomètres au sud-ouest d'Avignon, entre le Vaucluse et les Bouches-du-Rhône dont elle fait office de frontière (Fig. 4). Son débit est régulé par une série de barrages hydroélectriques comme l'emblématique retenue de Serre-Ponçon d'une capacité de 1,272 milliard de mètres cubes. Son bassin versant en amont est à vocation agricole pastorale tandis que les plaines fertiles du bassin en aval sont largement cultivées (céréaliculture, arboriculture, maraichage) et irriguées. En Vaucluse, 40 000 hectares de terres agricoles sont

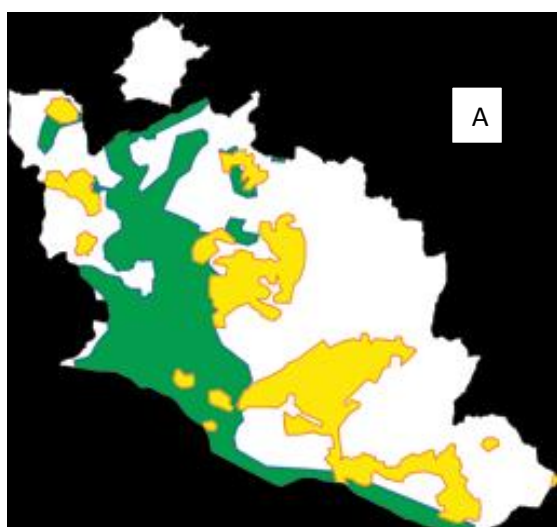
irrigables, grâce à 1 200 de km de canaux et filioles, ce qui représente 50 % de la consommation totale de l'eau du département, pour l'irrigation des prairies, des vignes, des arbres fruitiers.



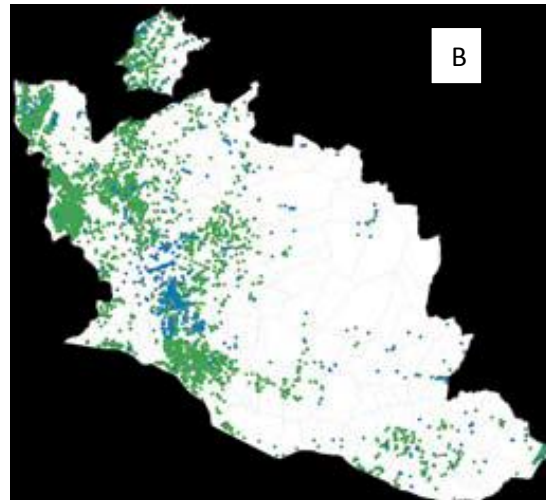
Figure 4 : Situation géographique et tracé de la Durance depuis sa source près de Briançon, jusqu'à son exutoire à Avignon et différents départements traversés.

Dans le Vaucluse, il existe différents modes d'irrigation

- ✓ L'irrigation gravitaire (37 % des surfaces irriguées du Vaucluse), (Fig. 5A) est une pratique traditionnelle qui consiste à « inonder la parcelle » à partir de filioles en surplomb. Dans cette pratique assez consommatrice en eau, les surplus d'eau sont lessivés verticalement et rejoignent les nappes phréatiques qui se trouvent entre 2 et 10 m plus bas, permettant ainsi un réapprovisionnement de ces dernières. Cette pratique est encore utilisée notamment à Montfavet par les producteurs de foin et certains maraichers qui alimentent ainsi la nappe alluviale d'Avignon qui se situe entre la Durance et le Rhône. Dans cette pratique l'eau d'irrigation provient principalement des systèmes superficiels (canaux).
- ✓ L'irrigation sous pression (63 % des surfaces irriguées du Vaucluse) (Fig. 5A) est une méthode plus moderne et plus économe en eau. Elle permet une irrigation localisée au goutte à goutte (27 %) ou par aspersion (36 %) et nécessite une eau sous pression. Pour cela, soit l'eau provenant des canaux et filioles est stockée dans un bassin de rétention d'où elle sera pompée et envoyée sous pression, soit les agriculteurs forent jusqu'à la nappe alluviale et pompent directement l'eau de nappe pour irriguer leurs cultures (Fig. 5B).



Une bactérie phytopathogène, *Pseudomonas syringae*, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance



**Figure 5 : Périmètres irrigables du Vaucluse, A : en vert, irrigation gravitaire, en jaune irrigation sous pression, B : prélèvements souterrains par forages et/ou puits**

Les réseaux de canaux d'irrigation nécessitent une gestion commune confiée le plus souvent à des syndicats d'exploitants qui rationalisent les pratiques. Ainsi le captage de surface de l'eau de Durance ne fonctionne que de février à octobre, les canaux et filioles du sud Vaucluse restants vides pendant les 3 mois (novembre à janvier). Cette période de chômage des eaux est un facteur important qui doit être pris en compte dans l'étude des biofilms qui se développent dans ces réseaux.

Dans ce contexte régional, sachant que des populations de *P. syringae* sont très présentes dans les cours d'eau (eau et biofilms) de la partie amont du bassin de la Durance, la mise en place d'une étude prospective sur la présence et la caractérisation de *P. syringae* en basse Durance s'est faite sur la prise en compte de l'ensemble des constituants des systèmes d'irrigation (rivière, canaux, filioles, bassins de rétention, nappes alluviales) et des substrats connus pour héberger des populations de *P. syringae*, (eaux et biofilms épilithes), ceci à différentes saisons.

### III/ OBJECTIF DU STAGE

L'objectif du stage est de rechercher la présence de populations de la bactérie *P. syringae* dans les réseaux d'irrigation de basse Durance dans le but d'identifier des réservoirs de cet agent phytopathogène qui pourraient représenter un risque pour les cultures irriguées. Ces études contribuent également à mieux connaître l'écologie de cette bactérie de l'environnement.

La présence de cette bactérie en amont de ce bassin versant est avérée puisque à l'Inra, des populations de *P. syringae* ont été isolées de l'eau (Thèse de C. Monteil en cours) et de biofilms épilithes (Morris *et al.* 2007, Berge *et al.* 2010) de plusieurs torrents à différentes saisons. La question est posée de la présence de ces populations dans les eaux et les biofilms de basse Durance. L'objectif du stage est de faire des sondages d'eaux et de biofilms dans divers équipements d'irrigation de basse Durance schématisés sur la figure 6, de tenter de dénombrer et d'isoler *P. syringae* de ces échantillons et de les caractériser pour leur pouvoir pathogène.

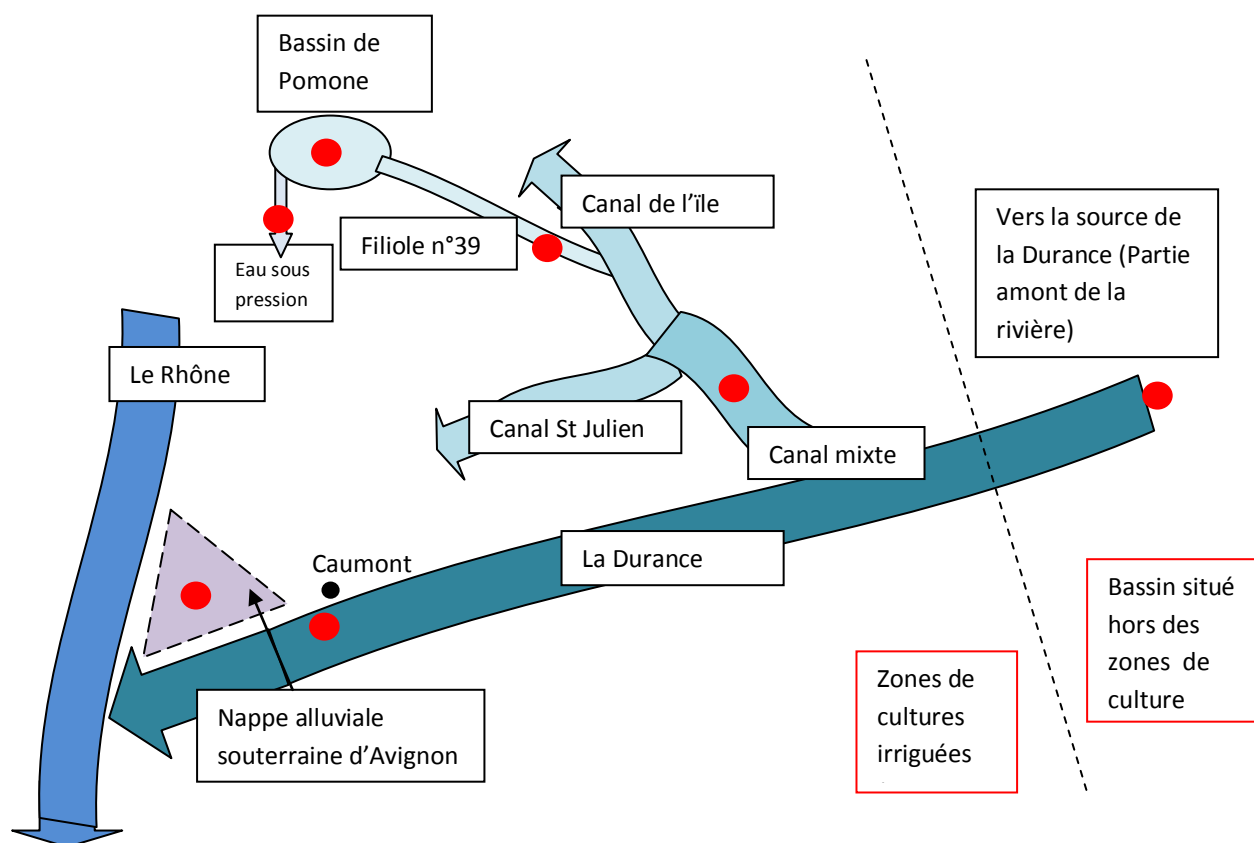


Figure 6 : Schéma simplifié des systèmes d'irrigation en Basse Durance pris en compte dans cette étude. La Durance arrive des Alpes (le trait en pointillés symbolise le passage entre le bassin amont pastoral et le bassin aval, cultivé), se jette dans le Rhône à Avignon en alimentant 1. Le canal mixte à 50 km en amont d'Avignon et 2 – la nappe alluviale souterraine d'Avignon. Le canal mixte est scindé en deux canaux qui desservent les terres agricoles par l'intermédiaire de filioles (canaux en terre) qui servent à l'irrigation gravitaire et par l'intermédiaire des bassins pour l'irrigation sous pression. En rouge, sites d'échantillonnage choisis pour la prospection de *P. syringae* dans l'eau et les biofilms (voir les différents points d'échantillonnage de la nappe sur la figure 7).

Les hypothèses de travail que nous proposons de tester dans cette étude sont les suivantes :

1 – Des souches pathogènes de *P. syringae* sont présentes dans les eaux de canaux, filioles et bassins de rétention de basse Durance quelle que soit la saison puisqu'on la trouve toujours dans l'eau des torrents en haute Durance, nous tenterons de confirmer sa présence lors de notre étude.

2 – Des souches pathogènes de *P. syringae* sont présentes dans les biofilms des canaux filioles et bassins de rétention de basse Durance quelle que soit la saison puisque la bactérie est présente dans plus de 50 % des biofilms épilithes des torrents de haute Durance. Nous testerons l'hypothèse de la persistance des populations de *P. syringae* dans les biofilms desséchés présents dans les canaux pendant la période de chômage.

3 - *P. syringae* est absente de la nappe alluviale d'Avignon car l'eau de cette nappe est filtrée à travers des matrices hétérogènes (sol, sable, graviers...) de 3 à 6 mètres d'épaisseur (Nofal *et al.* 2011) qui rendent peu probable le transfert de populations de *P. syringae*. Toutefois cette nappe est alimentée par l'eau de la Durance, la pluie et les retours d'eau gravitaire d'irrigation qui toutes trois sont susceptibles de contenir des *P. syringae* et nous avons trouvé intéressant de vérifier l'hypothèse de l'absence de *P. syringae* avec l'aide d'une équipe d'hydrogéologues d'Avignon (UMR 1114 Inra-Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse) qui s'intéressent aux processus de recharge et à l'évolutions des propriétés physico-chimiques des eaux de la nappe alluviale d'Avignon (Thèse de Sala Nofal en cours, encadrée par Anne-Laure Cognard-Plancq et Vincent Marc).

# IV/ MATÉRIEL ET MÉTHODES

## IV-1/ STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE

Le type de données recherchées est surtout de nature qualitative (présence/absence de *P. syringae*) et considérant la masse importante de travail nécessaire pour isoler et identifier ces bactéries, le choix de l'échantillonnage s'est porté sur une large gamme de sites plutôt qu'un grand nombre de répétitions. Sur la figure 6, sont représentés en rouge les points de prélèvements qui ont été réalisés au laboratoire. Les prélèvements dans les eaux et les biofilms épilithes de torrents de Haute Durance ont été réalisés précédemment par le laboratoire (Thèse C. Monteil, en cours, Berge 2011) montrant la présence de *P. syringae* dans ces échantillons. Mon stage a porté uniquement sur les sites de basse Durance, d'une part dans les systèmes de canaux de surface et d'autre part dans la nappe alluviale d'Avignon (Tableau 1).

Des prélèvements ont été effectués dans les eaux et les biofilms épilithes de surface en novembre à la fin de la période d'irrigation juste avant l'assèchement des canaux (chômage), en février il s'agissait de biofilms secs ou parfois humides sur les bords et au fond des canaux en période de chômage, en mars un mois après la mise en eaux des canaux et en mai à la période d'irrigation gravitaire (Tableau 1).. Des prélèvements d'eaux profondes dans la nappe alluviale d'Avignon ont été réalisés aux deux dernières dates en 6 points différents. J'ai participé aux prélèvements effectués pendant mon stage (mars et mai), et j'ai étudié les populations de *P. syringae* isolées de l'ensemble des prélèvements de basse Durance.

**Tableau 1 : Dates et sites d'échantillonnage d'eau et de biofilms épilithes dans les réseaux d'irrigation de basse Durance pour la prospection de *P. syringae* (voir le schéma des sites, figure 6).**

Mois de prélèvement	Canal Mixte	Filiole N°39	Bassin de Pomone	Eau sous pression	Durance à Caumont	Nappe alluviale
Nov. 2010	Non	Biofilms Eau	Biofilms Eau	Eau	Non	Non
Février 2011	Biofilms	Biofilms	Non	Non	Non	Non
Mars 2011	Biofilms Eau	Biofilms Eau	Biofilms Eau	Non	Biofilms Eau	Eau
Mai 2011	Biofilms Eau	Biofilms Eau	Biofilms Eau	Eau	Biofilms Eau	Eau

Pour les prélèvements dans la nappe, six points d'échantillonnage ont été choisis (Fig. 7) parmi une quarantaine de points possibles (piezomètres, forages ou puits) à l'aide des données hydrogéologiques dont on disposait. Les critères de choix ont été 1) le type d'usage des terres autour du point de prélèvement (zone urbaine vs agricole) car la présence de plantes portant *P. syringae* et la pratique de l'irrigation gravitaire pratiquées dans les zones agricoles pourraient avoir un effet sur la présence de *P. syringae* dans la nappe, 2) le niveau de conductivité de l'eau de la nappe qui peut varier du simple au double selon les points de prélèvement et traduit la présence d'ions qui peuvent influencer les populations bactériennes, 3) la proximité de la Durance qui alimente la nappe par infiltration souterraine et pourrait jouer un rôle sur la présence de *P. syringae*, et 4) la position amont ou aval de la nappe, celle-ci s'écoulant en gros de l'est vers l'ouest (Fig. 7).

*Une bactérie phytopathogène, Pseudomonas syringae, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance*



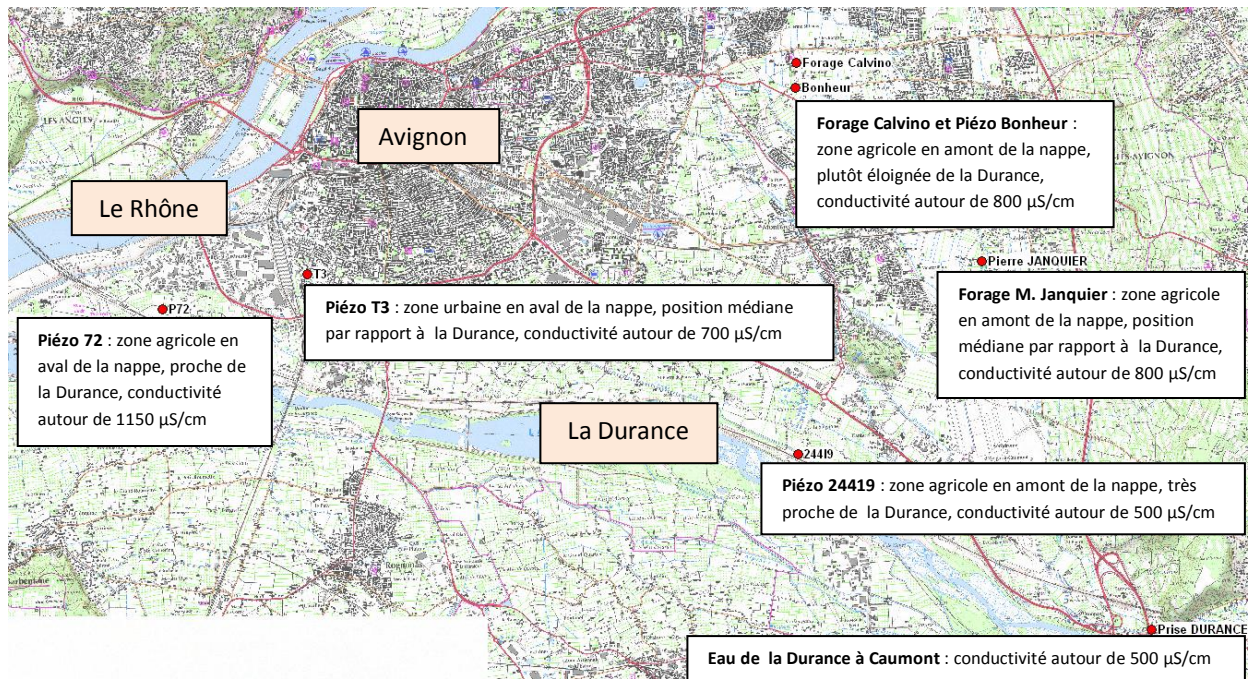


Figure 7 : Carte des points de prélèvements (en rouge) de la nappe alluviale d'Avignon et des caractéristiques qui les distinguent. Le point d'échantillonnage de la Durance à Caumont est représenté également.

#### IV-2/ PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS D'EAU

L'eau est prélevée dans des conditions aseptiques dans des sacs de congélation zippés stériles étanches (Fig. 8). Entre 2 et 5 L d'eau sont recueillis soit directement dans les sacs pour l'eau courante (Fig. 8 A), soit à l'aide d'un système de pompage à immersion, stérilisé, descendu dans les piézomètres ou les puits de prélèvement pour l'eau de la nappe (Fig. 8 B). Les échantillons sont immédiatement placés dans une glacière, le temps de les ramener au laboratoire (maximum 3 h) où ils sont conservés à 4 °C jusqu'à leur traitement au maximum dans les 48 h. Une certaine quantité d'eau (connue) sera ensuite filtrée afin de concentrer les bactéries grâce à un dispositif contenant un filtre stérile (Millipore, type GSWP, 0,22 µm).



Figure 8 : Photos des prélèvements d'eau et de biofilms épilithes. A, eau en surface, B, eau dans les nappes où une pompe stérilisée est immergée dans la nappe grâce au puits de forage et où l'eau est remontée par un tuyau stérile avant d'être stockée dans un sac zippé stérile étanche, C, biofilm épilithe gratté sur une pierre prélevée en bordure de canal.

Le filtre est ensuite placé dans un flacon stérile contenant un petit volume connu d'eau stérile (2,5 ml) pour remettre en suspension ce qui a été filtré (contenant les bactéries) par agitation magnétique délicate d'un barreau aimanté pendant 1 min. Cette suspension dont le facteur de concentration est connu, est utilisée pour dénombrer la flore totale cultivable et isoler les populations de *P. syringae* dans l'eau.

*Une bactérie phytopathogène, Pseudomonas syringae, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance*

### IV-3/ PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES BIOFILMS ÉPILITHES

Les biofilms sont grattés aseptiquement sur des surfaces rigides (cailloux, morceaux de béton, ...) à l'aide d'une brosse à dents et de l'eau stériles (Fig. 8C), au dessus d'un récipient stérilisé sous UV. Les biofilms suspendus dans l'eau sont ensuite récupérés dans un tube stérile puis réservés dans une glacière le temps du transport jusqu'au laboratoire où ils sont conservés à 4 °C pendant 48 h maximum avant traitement.

Le traitement de ces biofilms (détails, annexe II) débute par une centrifugation qui permet d'éliminer le liquide en surplus. Le culot qui constitue le biofilm frais est remis en suspension dans un volume connu puis broyé énergiquement dans un mortier. La suspension épaisse est répartie en 4 aliquotes. Une aliquote est utilisée immédiatement pour dénombrer et isoler les populations de *P. syringae*, une autre est conservée à 4 °C et servira à mesurer la biomasse de biofilm dans l'échantillon, une troisième est conservée à - 20°C pour des analyses moléculaires ultérieures sur l'ADN, et enfin la dernière aliquote est conservée à 4 °C dans l'alcool à 70 % pour une détermination ultérieure des microalgues de type diatomées des biofilms.

Pour pouvoir comparer les résultats de dénombrements bactériens d'un biofilm à l'autre il est nécessaire de les ramener à un nombre par unité de biomasse (g) de biofilm (en poids sec). Or, le biofilm frais tel qu'il est prélevé contient des minéraux qui proviennent du support sur lequel le biofilm a été gratté. Pour obtenir la biomasse, il faut s'affranchir de la masse de ces minéraux et donc la mesurer pour la soustraire de la masse totale. La masse totale de biofilm sec par unité de volume est déterminée par pesée d'un volume connu après séchage à 60 °C. La masse de la matière minérale est alors déterminée par pesées des cendres obtenues en brûlant l'échantillon à 500 °C pendant 10 h. Pour cela j'ai utilisé le four du laboratoire de l'Inra « Abeilles et Environnement » (UMR 406) sur le site Agroparc d'Avignon.

### IV-4/ DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES TOTALES CULTIVABLES SUR TSA 10 ème :

La majorité des bactéries de l'environnement est non cultivable sur la plupart des milieux. Les techniques microscopiques pour déterminer la population totale sont fastidieuses. Nous avons donc estimé la population totale de bactéries cultivables à partir de dénombrements sur milieu Tryptic Soy Agar (TSA) dilué au 10ème, milieu couramment utilisé pour le dénombrement total des bactéries.

Le TSA 10ème est un milieu riche non sélectif qui permet à de nombreux micro-organismes de l'environnement de se développer. Sa formule (annexe III) comprend une peptone riche en acide aminés libres et de l'extrait de levure. L'association de ces deux constituants fournit au milieu de nombreux facteurs de croissance.

A partir de la prise d'essai bien homogénéisée, on réalise une suspension dilution décimale jusqu'à 10<sup>3</sup>. Pour chaque dilution on dépose aseptiquement 10 µl (3 fois) dans une boîte de Petri contenant le TSA 10ème. L'inoculum est ensuite étalé légèrement à l'aide d'une oese stérile en effectuant un mouvement circulaire. Les boîtes sont incubées à température ambiante (23 - 25 °C) et les colonies sont dénombrées (par comptage manuel) au bout de 48 h.

#### **IV-5/ DÉNOMBREMENT, ISOLEMENT ET MISE EN COLLECTION DE *P. SYRINGAE* :**

Le milieu King B (KB composition en annexe I) est un milieu riche carencé en fer, très utilisé pour la culture du genre *Pseudomonas*. Certaines bactéries de ce genre dont *P. syringae* produisent sur ce milieu un pigment fluorescent (sidérophore) leur permettant de « capter » le fer. Ce milieu est utilisé pour tester la fluorescence des isolats.

Pour l'isolement, ce même milieu est additionné d'un antibiotique, d'un antifongique et d'acide borique (KBC composition en annexe I) qui inhiberont la croissance de la plupart des bactéries et de nombreux champignons et le rendent assez sélectif pour *P. syringae*.

Lors de l'isolement, la même série de suspensions-dilutions que celles utilisées pour TSA 10ème à partir des échantillons, sont étalées sur ce milieu KBC à raison de 100 µl/boîte (3 répétitions /dilutions de 10<sup>0</sup> à 10<sup>-2</sup>).

Les colonies de *P. syringae* apparaîtront fluorescentes sur ce milieu au bout d'au moins 48 h d'incubation à température ambiante (23 – 25 °C). Les colonies fluorescentes seront purifiées sur milieu gélosé KB afin de poursuivre les tests biochimiques permettant l'identification des souches. Grâce à cette technique, nous pourrions estimer le nombre de *P. syringae* dans l'échantillon et purifier un certain nombre de souches de *P. syringae* pour les mettre en collection au laboratoire.

Nous utilisons deux méthodes de conservation des souches :

- ✓ A partir d'une colonie provenant d'une culture fraîche (48 h sur TSA 10<sup>ème</sup>) on réalise une suspension dans un tampon phosphate (TP1, composition en annexe III) pour une conservation de 6 mois à un an à 4 °C
- ✓ à partir d'une culture fraîche sur milieu liquide (TSB 10<sup>ème</sup>, 24 h), on réalise une suspension de cellules dans le glycérol à 20 % pour une conservation sur plusieurs années à – 20 ou – 80 °C.

#### **IV-6/ TESTS BIOCHIMIQUES UTILISÉS POUR L'IDENTIFICATION DES *P. SYRINGAE* :**

Des tests simples et rapides au laboratoire (Vezina et Lacroix 2009) permettent d'identifier les *P. syringae*. Une confirmation peut être obtenue par séquençage et analyse phylogénétique de certains gènes de ménage, ce qui n'a pas été nécessaire dans mon travail.

#### **LA FLUORESCENCE SUR KB :**

Les colonies de *P. syringae* sur le milieu riche King B sont de coloration blanchâtre à crème ou translucides et produisent un pigment fluorescent en général bleuté, la pyoverdine. Ce pigment est observé sous UV à une longueur d'onde de 254 nm.

Après 48 heures d'incubation, le diamètre des colonies se situe entre 1 et 3 mm. Elles sont généralement abondantes, alors qu'après 24 h d'incubation elles sont à peine visibles. Les colonies non fluorescentes lors de l'isolement sur KBC sont éliminées, celles qui sont douteuses sont testées pour la fluorescence sur milieu KB.

#### **LE TEST DE RECHERCHE D'UNE OXYDASE :**

Le test « oxydase » est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire dont on révèle l'activité par la mise en présence d'un substrat incolore, transformé en produit bleu-violet au contact de cette enzyme. Les *P. syringae* ne possèdent pas cette enzyme.

Sur un papier filtre stérile, on dépose une goutte de réactif d'oxydase (bioMérieux) composé de phénylènediamine et d'acide ascorbique (agent réducteur). À l'aide d'un cure-dent stérile on prélève les colonies fluorescentes sur KB et on la met en contact sur le papier-filtre humecté du réactif. La lecture de la réaction se fait dans les 30 secondes qui suivent.



Une réaction positive, OX + (couleur bleu-violet) indique qu'il y a eu oxydation du réactif pour former un composé coloré, l'indophénol (Fig. 9).

Les colonies OX + sont éliminées. Une réaction tardive et une absence de couleur indiquent une réaction négative, OX-, ces colonies seront conservées. Une souche de *P. fluorescens* est utilisée comme témoin positif dans ce test.



Figure 9 : résultat du test d'oxydase

### LE TEST DE L'ARGININE DIHYDROLASE :

Le test arginine dihydrolase sert à déterminer si la bactérie transforme l'acide aminé arginine grâce à une l'enzyme : l'arginine dihydrolase. *P. syringae* ne possède pas cette enzyme. Pour cela, on inocule le milieu de culture semi-liquide Arginine (composition en annexe III) aliquoté en micro tubes de 1,5 ml. Ensuite, on ajoute environ 1 cm d'huile minérale stérile pour permettre à la réaction de se faire en condition anaérobie, sachant que *P. syringae* est une bactérie aérobic stricte. L'incubation se fait à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 24 h.

On lira la réaction obtenue : si le milieu vire au rose fuchsia la réaction est positive (ARG +) il y a eu transformation de l'arginine par l'enzyme arginine dihydrolase : on élimine la souche, si le milieu reste inchangé ou devient jaune orangé la réaction est négative (ARG -), on garde la souche (Fig. 10). Une souche de *P. fluorescens* est utilisée comme témoin positif dans ce test.



Figure 10 : Résultat du test pour détecter chez les bactéries l'activité arginine dihydrolase. L'apparition de la couleur rose fuchsia indique un test positif.

### LA RÉACTION D'HYPERSENSIBILITÉ SUR TABAC

Les bactéries phytopathogènes comme *P. syringae* sont pour la plupart capables d'induire des maladies sur les plantes sensibles, toutefois certaines souches de *P. syringae* sont non pathogènes (Mohr *et al.* 2008). Une façon simple de tester leur pouvoir pathogène est de les inoculer sur des feuilles de tabac, plante sélectionnée par les laboratoires car elle réagit avec de nombreux agents phytopathogènes et notamment avec *P. syringae* en produisant une réaction rapide qui limite la progression du pathogène et qu'on appelle la réaction hypersensible (HR). Le test d'hypersensibilité du tabac met en évidence le pouvoir pathogène de cette bactérie grâce à l'apparition rapide d'une nécrose des zones d'inoculation sur les feuilles. On effectue une suspension bactérienne ayant une concentration de  $10^8$  bactéries/ml (vérifiée par des mesures de DO comprises entre 0,6 et 0,12 à 580

*Une bactérie phytopathogène, Pseudomonas syringae, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance*

nm) dans un tube contenant 1 ml de d'eau stérile. À l'aide d'une seringue stérile de 1 ml, on injecte la suspension bactérienne dans l'espace intercellulaire le long de la nervure centrale ou secondaire. L'inoculation de la suspension bactérienne se fait sur la surface inférieure de la feuille

Le plant de tabac est laissé à la température de la pièce pendant 24 à 48 heures, la lecture se fera au niveau du point d'inoculation. Si la zone foliaire inoculée avec la bactérie devient légèrement translucide et a un aspect humide et que par la suite, les tissus s'assèchent et prennent une coloration brun-claire à foncée : la réaction est alors positive (HR+) ce qui met en évidence le pouvoir pathogène de la bactérie (Fig. 11). Si aucun changement dans la couleur et l'aspect du tissu n'est observé : la réaction est alors négative (HR-).

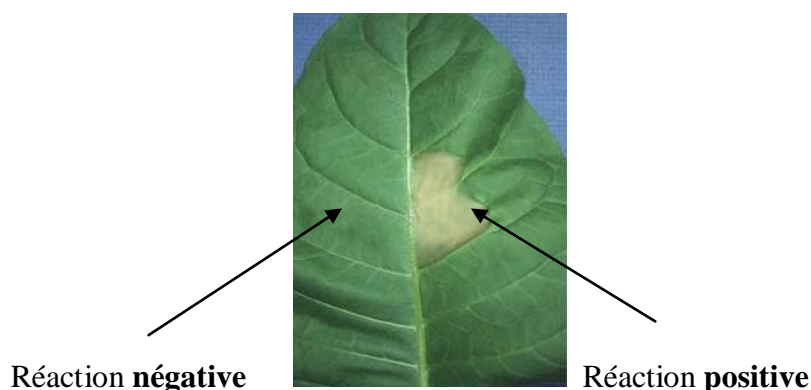


Figure 11 : Résultat du test d'hypersensibilité sur tabac (HR) pour détecter le pouvoir pathogène des souches de *P. syringae*.

#### IV-7/ TYPAGE DES SOUCHES DE *P. SYRINGAE* PAR BOX-PCR

La rep-PCR (pour PCR de séquences répétées) est un outil de diagnostic rapide, simple permettant d'établir des groupes de ressemblance entre les différentes souches de *P.syringae* (Lows *et al.* 1994). Le principe des rep-PCR repose sur l'existence dans les génomes de petites séquences d'ADN inversées et répétées et réparties de façon non homogène entre différentes souches. Ainsi en utilisant ces zones répétées comme amorces dans une réaction d'amplification génique de type PCR, on synthétise un produit PCR qui contient un mélange de fragments de différentes tailles qui sont les zones de l'ADN comprises entre deux séquences répétées. Ce mélange est typique de la souche et par migration sur gel d'agarose donne un profil d'ADN (les fragments migrent d'autant plus vite qu'ils sont plus petits) appelé « empreinte génétique » (Fig. 12).

La BOX-PCR est une des techniques de rep-PCR utilisant l'amorce BOX-AIR de séquence 3'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-5' pour typer le génotype des souches à étudier. D'autres techniques similaires comme la REP-PCR ou l'ERIC-PCR peuvent être utilisées également. Dans l'espèce *P. syringae* la BOX-PCR est très utilisée car elle donne des classifications proches de celles obtenues par regroupement phylogénétiques en sous-espèces (Marques *et al.* 2008).

Toutefois, la BOX-PCR a des limites et il faut rester prudent dans l'interprétation des types rep-PCR, en particulier pour la mise en relation avec les propriétés phylogénétiques ou biochimiques des souches. On utilise donc cette technique pour constituer des groupes homogènes de souches et étudier la diversité génotypique des souches isolées.

Seules les souches isolées de la nappe alluviale d'Avignon ont pu être étudiées dans le temps du stage, permettant ainsi de répondre à la question de la diversité de ces populations « infiltrées ».

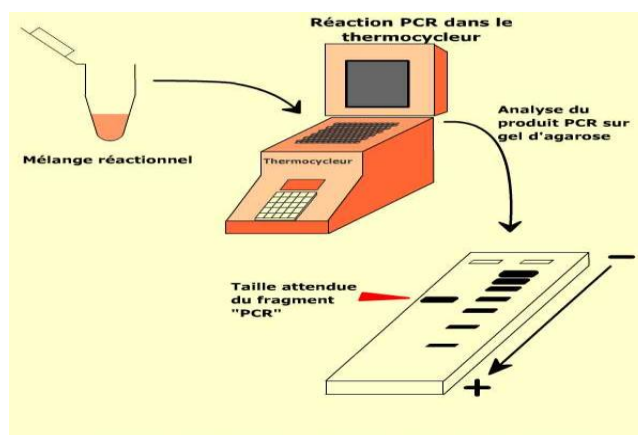


Figure 12 : schéma de réalisation de rep-PCR suivi d'une migration sur gel d'agarose

La réaction PCR est réalisée avec des suspensions cellulaires (environ  $10^7$  cellules/ml) réalisées à partir des souches pures de *P. syringae* mises en collection lors de l'isolement. Elle est préparée extemporanément suivant la formule suivante :

### Mélange réactionnel pour BOX-PCR

EAU ultra pure	17,87 $\mu$ l
TAMPON 10X	2,5 $\mu$ l
Amorce BOX-AIR (100 pMol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 $\mu$ l
dNTPs (25mM)	0,5 $\mu$ l
Enzyme Taq hotstart	0,13 $\mu$ l
Suspension cellulaire de la souche de <i>P. syringae</i> à tester	2,0 $\mu$ l

Les tubes préparés pour la BOX-PCR sont placés dans un thermocycleur afin de réaliser l'amplification génique dans les conditions suivantes :

### Programme PCR :

- 1 – 96 °C : 15 min : Lyse bactérienne, libération d'ADN bactérien dans le milieu, activation de la polymérase
- 2 – 94 °C : 1 min : Dénaturation initiale des deux brins d'ADN
- 3 – 53 °C : 1 min : Hybridation de l'amorce BOX sur les séquences répétées homologues du génome
- 4 – 65 °C : 8 min: Élongation des séquences inter-BOX par synthèse de l'ADN par la polymérase
- 5 – Répétition des étapes 2 à 4, 29 fois, ce qui fait 30 cycles en tout
- 6 – 65 °C : 10 min : Élongation finale
- 7 - 10 °C : Conservation du produit PCR à 10 °C en attendant l'arrêt de la machine

La taille des produits PCR est visualisée par migration sur gel d'agarose suivant le protocole ci-dessous :

- 1 - Ajouter 5  $\mu$ l de tampon de charge dans chaque tube ce qui permet de suivre visuellement la vitesse de migration dans le gel d'agarose
- 2 - Déposer sur gel d'agarose (1,5 %) contenant 0,1 % de Bromure d'Éthidium (BET : produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques et qui permet la visualisation de l'ADN)
- 3 - Faire migrer à 100 Volts pendant 1 h 30, observer sous UV.

*Une bactérie phytopathogène, Pseudomonas syringae, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance*



Les profils sont comparés visuellement pour le nombre, la taille et l'intensité des bandes  
**IV-8/ SCHÉMA DE RÉALISATION DES TESTS EN SÉRIE**

L'isolement, l'identification, la détermination du pouvoir pathogène et de l'empreinte génétique de nombreuses souches est un travail long et fastidieux qui demande beaucoup de rigueur. La procédure utilisée au laboratoire et que j'ai mise en œuvre pendant le stage, est représentée sur la figure 13.

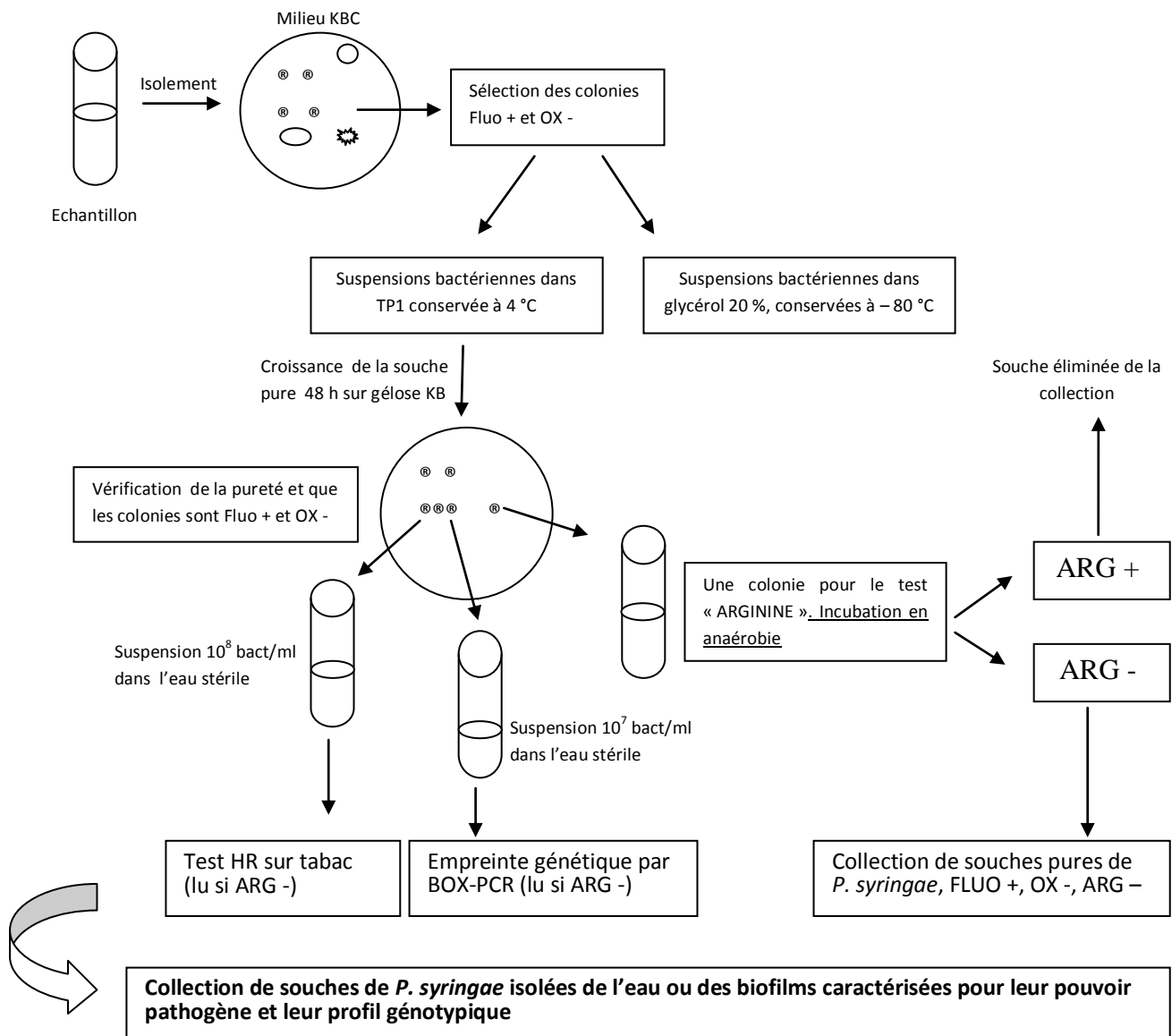


Figure 13 : Schéma de réalisation de l'isolement, l'identification, la conservation et la caractérisation des populations de *P. syringae* isolées de l'eau et des biofilms.

## V/ RESULTATS

### V-1/ ISOLEMENT ET ABONDANCE DE *P. SYRINGAE* DANS LES RÉSEAUX D'IRRIGATION DE BASSE DURANCE :

#### V-1-1-Isolement de *P. syringae* dans les eaux de surface

Dans tous les prélèvements d'eaux de surface, Durance, canal, filiole, bassin de rétention et à toutes les dates (novembre, mars, mai), *P. syringae* a pu être isolée (Fig. 14). Nous avons testé également la présence de la bactérie dans l'eau venant du bassin et envoyée sous pression chez l'agriculteur et *P. syringae* n'a été détectée qu'en novembre. En mars, l'eau sous pression n'était pas encore branchée et en mai, *P. syringae* n'était pas détectée. À cette date l'eau sous pression contenait un grand nombre de *P. fluorescens*, espèce non phytopathogène, proche de *P. syringae* qui se développe sur le milieu semi-sélectif et a pu gêner l'isolement de cette dernière très peu abondante. L'abondance de *P. syringae* dans ces échantillons de surface varie de  $1,1 \cdot 10^2$  (eau sous pression en novembre) à  $7,8 \cdot 10^3$  (Filiole en mai). C'est l'eau des filioles qui contient le plus de *P. syringae* probablement issues des plantes et du sol en bordure de celles-ci, le canal en béton étant moins sous ces influences. Les variations saisonnières ne vont pas toutes dans le même sens et ne peuvent pas être interprétées avec ces données.

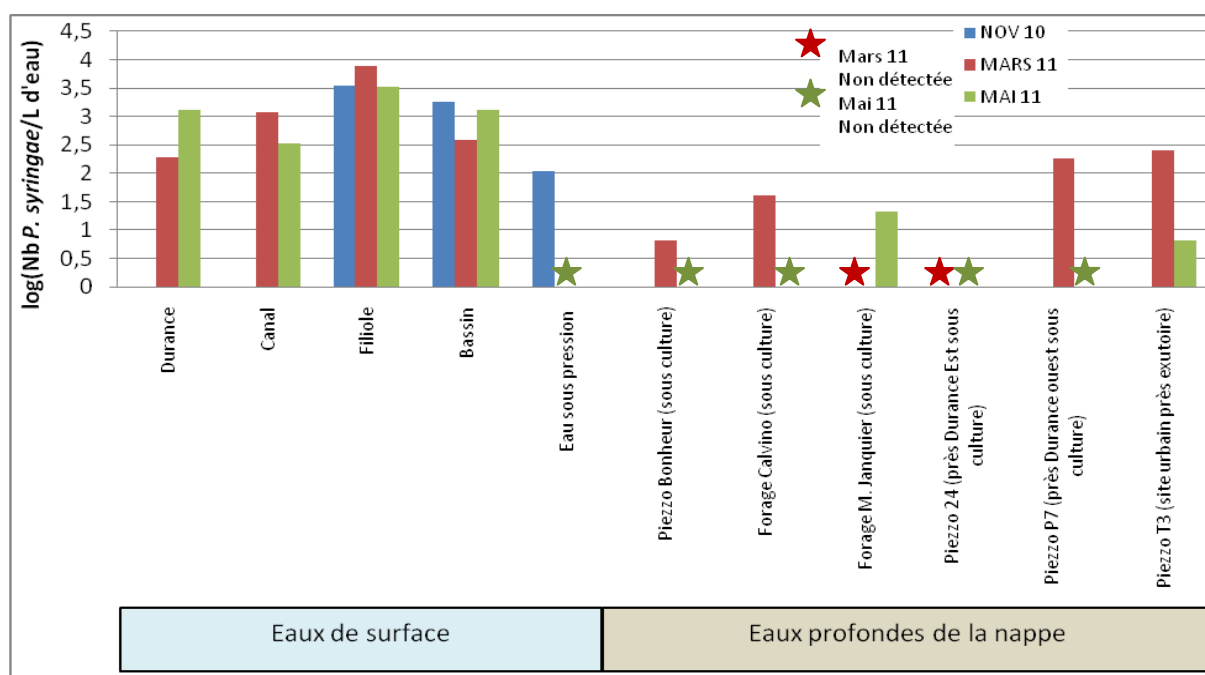


Figure 14 : Abondance de *P. syringae* dans les eaux de surface et les eaux profondes des systèmes d'irrigation de basse Durance. Les abondances sont exprimées en logarithme décimal et le seuil de détection est de 2 cellules de *P. syringae* par litre d'eau. En novembre, trois sites seulement ont été échantillonnés. Les eaux profondes ont été échantillonnées en mars et mai seulement.

### V-1-2-Isolement de *P. syringae* dans les eaux profondes

Contrairement à ce que nous attendions, parmi les 6 sites de la nappe alluviale d'Avignon, 5 hébergent des *P. syringae* au moins à une date. Seul le site du piezo 24 n'a pas permis d'isoler cette bactérie (Fig. 14) et c'est seulement dans le piezo T3 que *P. syringae* a été isolée aux deux dates de prélèvement. Les abondances sont assez faibles, en moyenne 35 *P. syringae* par L d'eau de nappe, ce qui montre la puissance de la méthode d'isolement et pourrait expliquer la difficulté à isoler dans certains échantillons. Toutefois, ces abondances peuvent être comparables à celles des eaux de surface, en mars par exemple, on dénombre  $2,3 \cdot 10^2$  *P. syringae*/L dans la nappe (piezzo T3 et P7) au même niveau que dans la Durance. Le type de couverture du sol (végétaux, zone urbanisée), la conductivité et la situation par rapport à la Durance ou à l'exutoire ne semblent pas influencer ces abondances.

Un travail de caractérisation physicochimique des eaux de nappe est effectué par le labo d'hydrogéologie d'Avignon (Salah Nofal) que nous avons rejoint pour cette étude. L'ensemble des mesures faites sur les échantillons de nappes prélevés sont rassemblés en annexe IV.

Les données de température montrent qu'elles se situent entre 10 et 16 °C et que les variations sont surtout entre points de prélèvement et pas entre les deux dates ni dépendantes de la profondeur. L'isolement et les abondances de *P. syringae* ne semblent pas corrélés avec ces variables.

Le pH de l'eau est le plus souvent proche de 6,9, sauf pour les sites de la Durance à Caumont et au piézo 24419, où les valeurs de pH sont légèrement plus élevées, (> 7,5). Entre mars et mai, le pH des eaux des nappes n'évolue pas. L'isolement et l'abondance de *P. syringae* dans ces eaux ne semblent pas être affectés par ces variations de pH.

De façon générale, on n'a pas trouvé de corrélations entre l'abondance de *P. syringae* et les mesures comme la conductivité ou les concentrations en différents ions. La très faible abondance de *P. syringae* peut expliquer la difficulté à mettre en évidence ces relations

### V-1-3-Isolement de *P. syringae* dans les biofilms (en surface)

Les biofilms des réseaux d'irrigation de basse Durance peuvent héberger des *P. syringae* (Fig. 15). Toutefois en février pendant la période de chômage des canaux, ils ne sont pas détectés dans les biofilms desséchés ou humides (dans des flaques résiduelles). En mars, un mois après la remise en eaux, alors qu'ils sont présents dans tous les échantillons d'eau (Fig. 14), ils ne sont pas détectés sauf dans le bassin qui n'a pas de période de chômage. Il faut attendre mai pour retrouver des *P. syringae* dans les biofilms, en novembre avant le chômage, ils sont toujours présents. En Durance, les biofilms prélevés n'hébergent pas de *P. syringae*, même en mai (Fig. 15). Les abondances sont variables et contrairement à l'eau c'est dans le bassin qu'elles sont en plus grand nombre et non dans les filioles. Les abondances de *P. syringae* dans les biofilms sont probablement gouvernées par d'autres facteurs que l'abondance de *P. syringae* dans l'eau au moment du prélèvement.

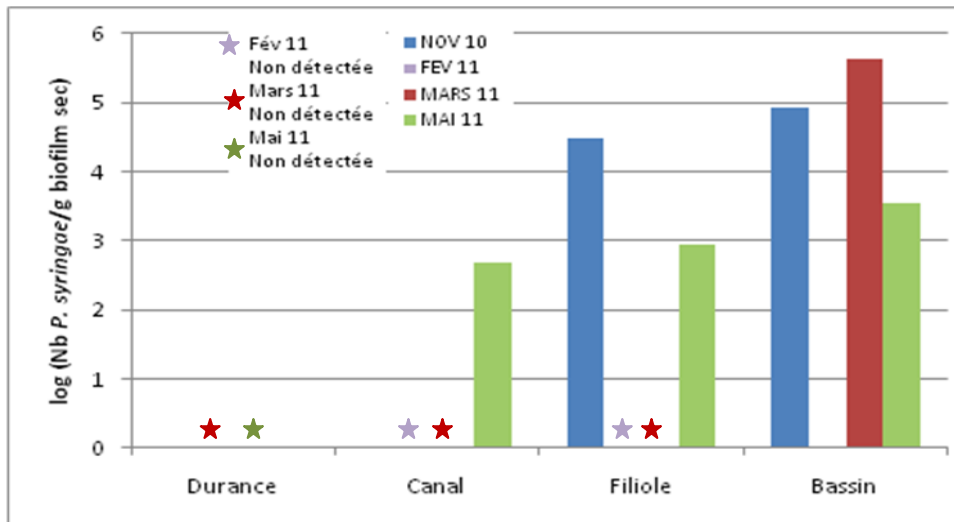


Figure 15 : Abondance de *P. syringae* dans les biofilms épilithes des systèmes d'irrigation de surface de basse Durance. Les abondances sont exprimées en logarithme décimal et le seuil de détection est de  $5 \cdot 10^2$  cellules de *P. syringae* par g de matière sèche de biofilm. En novembre le canal et la Durance et en février, le bassin et la Durance n'ont pas été échantillonnés.

A l'issue de ce travail nous avons isolé et mis en collection 80 souches provenant des eaux de surfaces, 73 souches des eaux profondes et 12 souches des biofilms isolées lors des campagnes de mars et de mai.

#### V-1-4-Fréquence de *P. syringae* dans la flore cultivable

La flore bactérienne totale cultivable sur TSA  $10^{\text{ème}}$  est une estimation de la taille de la flore totale, sachant qu'environ 99 % des bactéries de l'environnement sont non cultivables sur ce milieu pourtant généraliste. En faisant l'hypothèse que la proportion de bactéries cultivables sur TSA 10ème est comparable d'un échantillon à l'autre, le dénombrement sur TSA 10ème renseigne sur l'abondance relative des bactéries dans les échantillons et sur la capacité de ce milieu à supporter une croissance microbienne (relative à la ressource). Dans les eaux de surface on dénombre en moyenne  $5 \cdot 10^6$  bactéries totales/L avec un minimum de  $7 \cdot 10^5$  dans l'eau sous pression (Fig. 16). Il n'y a pas de relation entre le nombre de bactéries totales et le nombre de *P. syringae*.

Dans les eaux profondes on dénombre en moyenne  $6,4 \cdot 10^4$  bactéries totales/L (Fig. 16). Cette valeur presque 100 fois plus faible que dans les eaux de surface traduit l'effet combiné des plus faibles ressources trophiques de ces eaux et l'effet de filtration des microorganismes en provenance du sol. Les variations sont beaucoup plus importantes puisque les valeurs obtenues vont de  $10^3$  à  $2 \cdot 10^6$  ce qui représente un facteur 1000 d'écart. Il semble qu'il y ait une relation entre le faible nombre de bactéries totales et la non détection de *P. syringae*, présente en trop faible nombre pour être isolée. Toutefois, dans certains échantillons comme P7 en mai, *P. syringae* n'est pas isolée malgré une abondance de bactéries totales supérieure à  $10^6$ /L (Fig. 16). Les piézomètres P7 et T3 sont les plus près de l'exutoire de la nappe et également dans la zone la plus urbanisée (Fig. 7) et on remarque qu'ils hébergent des populations totales parmi les plus élevées (Fig. 16). Il existe peut-être des sources d'apports bactériens liés à l'environnement urbain et non contrôlés.

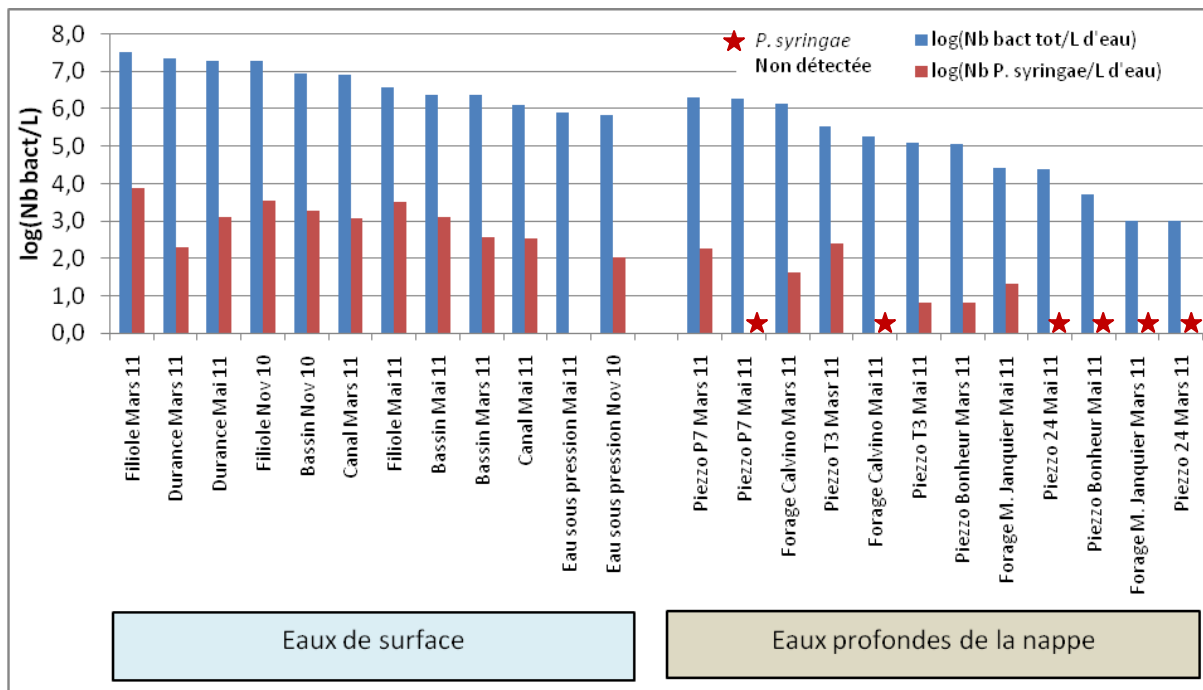


Figure 16 : Abondance de *P. syringae* et des bactéries totales cultivables sur milieu TSA/10<sup>ème</sup> (Bact tot) dans les eaux de surface et les eaux profondes des systèmes d'irrigation de basse Durance. Les abondances sont exprimées en logarithme décimal et le seuil de détection est de 2 cellules de *P. syringae* par L d'eau.

Dans les biofilms, on dénombre en moyenne 1 10<sup>9</sup> bactéries totales par g de biofilm sec avec des écarts de 1 à 1000 également (Fig. 17). Ni le site ni la date ne semble expliquer ces variations.

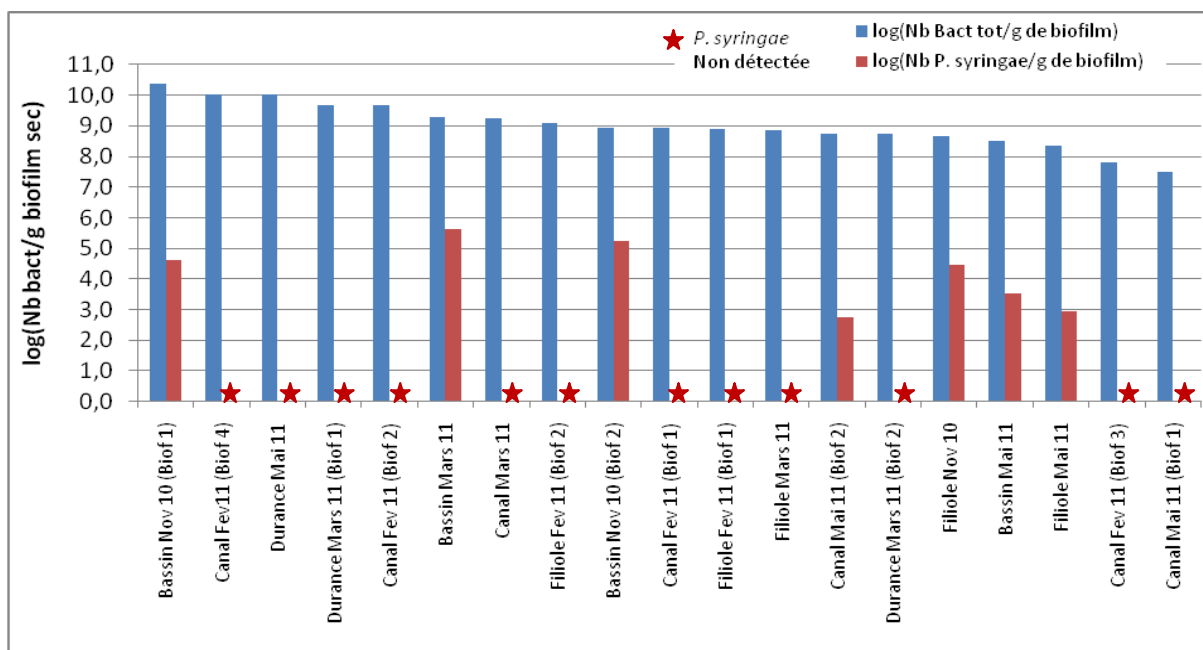


Figure 17 : Abondance de *P. syringae* et des bactéries totales cultivables sur milieu TSA/10<sup>ème</sup> (Bact tot) dans les biofilms épilithes des systèmes d'irrigation de surface de basse Durance. Les abondances sont exprimées en logarithme décimal et le seuil de détection est de 5 10<sup>2</sup> cellules de *P. syringae* par g de matière sèche de biofilm. Pour certains prélèvements plusieurs biofilms ont été prélevés et sont présentés ici séparément.

Dans le but de comparer les abondances de *P. syringae* dans les biofilms et dans l'eau, nous avons utilisé le rapport du nombre de *P. syringae* sur le nombre total de bactéries cultivables. *P. syringae* est peu abondant (au mieux 1/1000) ce qui nous amène à utiliser le logarithme décimal de ce rapport. Sur la figure 18, plus les cônes sont longs vers le bas et plus *P. syringae* est rare. Dans l'eau, *P. syringae* représente le plus souvent entre 1/1 000 et 1/10 000 bactéries alors que dans les biofilms la fréquence des *P. syringae* est plus variable de 1/10 000 à 1/1 000 000 et plutôt plus faible. Ceci traduit la très forte compétition dans les biofilms et peut-être une moins bonne adaptation à cet environnement pour les populations de *P. syringae*. Toutefois on note que les biofilms isolés du bassin de rétention hébergent une fréquence de *P. syringae* du même ordre de grandeur que celui de l'eau et c'est dans ce site qu'on isole des *P. syringae* des biofilms à toutes les dates. La nature et la dynamique des biofilms dans une eau stagnante ou peu courante est probablement différente de celles des canaux, et filioles où l'eau est courante et où il ya une période de chômage. Dans le bassin un équilibre entre les populations de l'eau et des biofilms pourrait s'instaurer plus facilement.

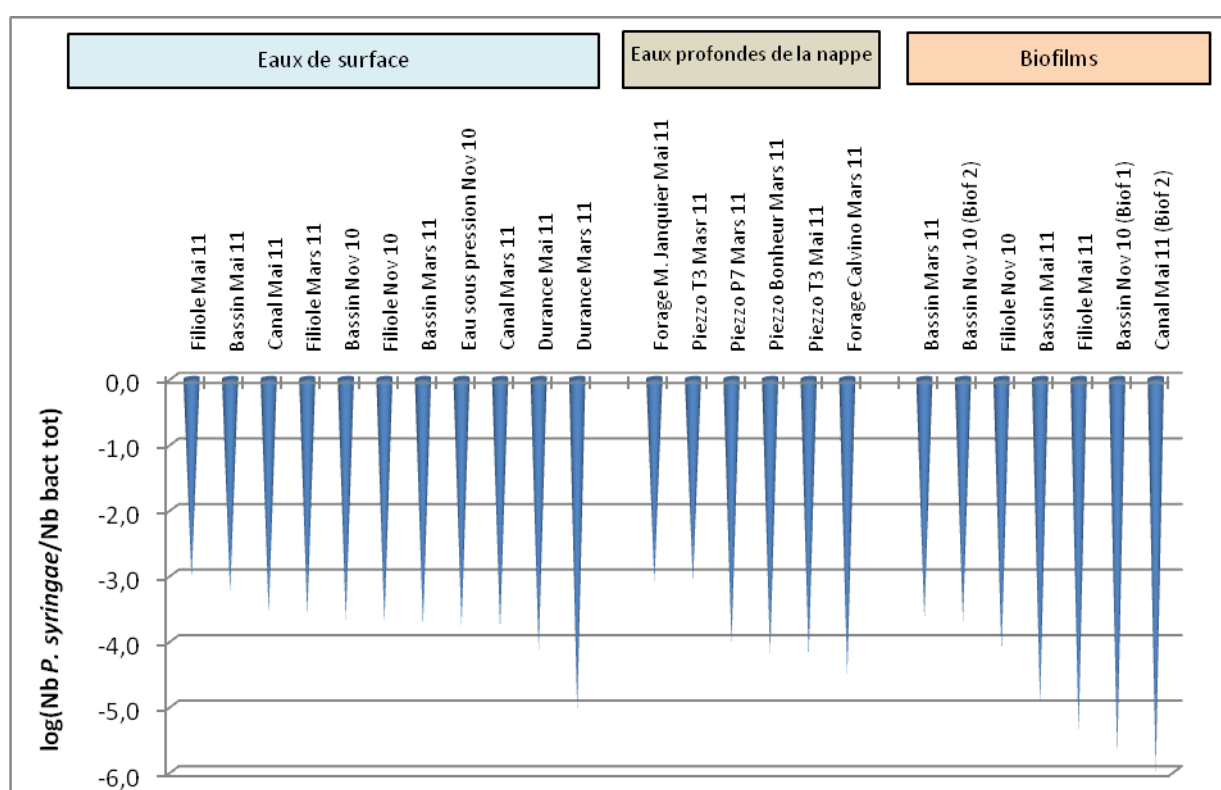


Figure 18 : Fréquence de *P. syringae* au sein des bactéries totales cultivables sur milieu TSA/10ème (Bact tot) dans les eaux et les biofilms épilithes des systèmes d'irrigation de basse Durance. Le rapport des abondances est exprimé en logarithme décimal.



## V-2/ CARACTÉRISATION DU POUVOIR PATHOGÈNE DES SOUCHES DE *P. SYRINGAE*

Les souches isolées dans les prélèvements ont majoritairement déclenché une réaction HR chez le tabac : 89 % des souches des eaux de nappes, 84 % des souches des eaux de surface et 76 % des souches de biofilms sont donc pathogènes. Les fréquences de souches HR+ dans chaque échantillon semblent ne pas dépendre du substrat, du site ou de la date. Elles sont toutes sauf une, supérieures à 60 % (Figure 19). Dans les populations isolées des nappes les pourcentages sont assez élevés.

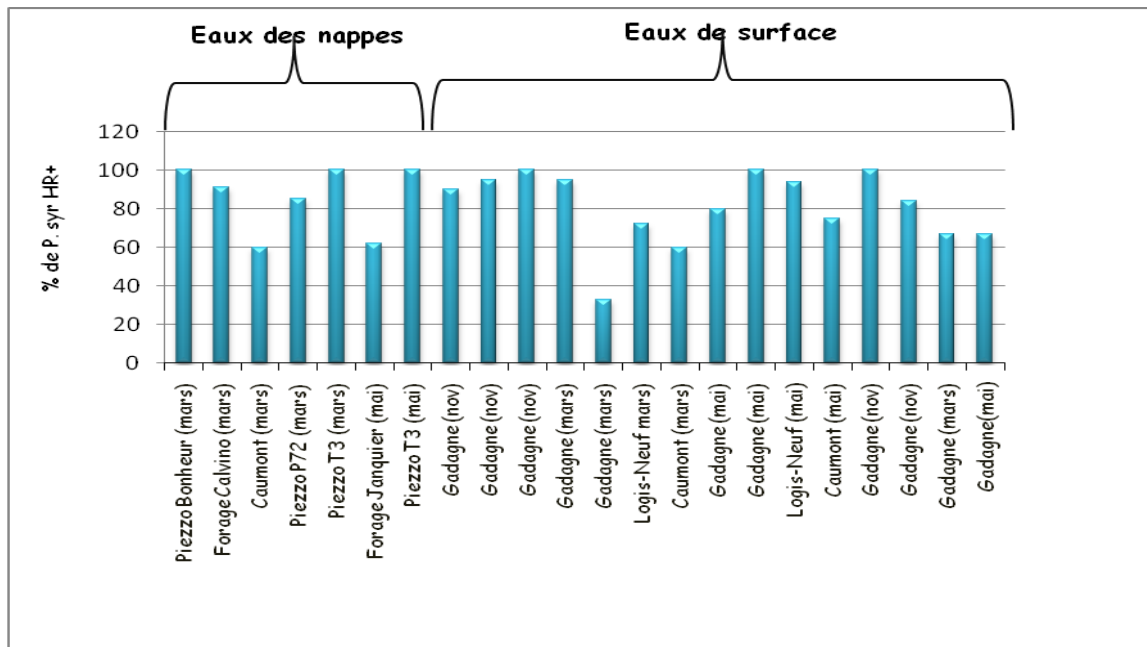
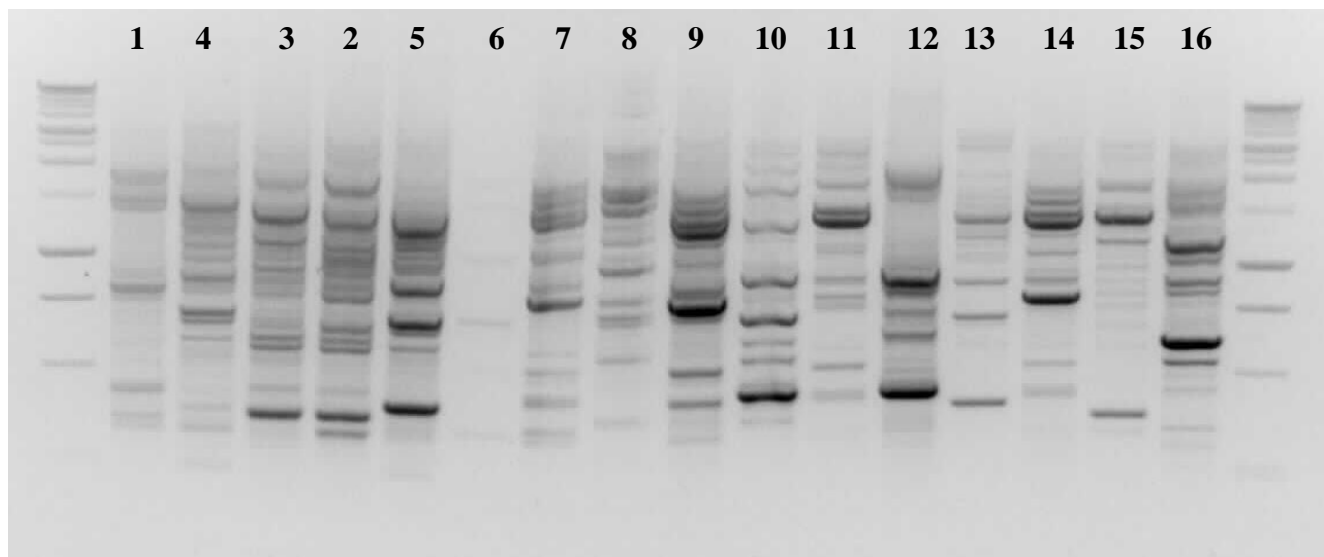


Figure 19 - : Pourcentage de souches de *P.syringae* qui déclenchent une réaction hypersensible sur feuilles de tabac après infiltration. Ces souches (HR+) sont phytopathogènes et peuvent entraîner le déclenchement de maladies sur une autre plante (hôte compatible).

## V-3/ DIVERSITÉ DES POPULATIONS DE *P. SYRINGAE* ISOLÉES DE LA NAPPE ALLUVIALE

Les empreintes génétiques des souches de *P. syringae* isolées de la nappe alluviale ont été réalisées avec la technique des rep-PCR (amorce BOX). Ce typage permet de caractériser des groupes de souches assez homogènes qui définissent des sous groupes dans l'espèce de *P. syringae* (Marques *et al.* 2008) Nous avons voulu savoir si le filtrage des eaux par les substrats qu'elles traversent pour rejoindre la nappe sélectionnait un petit nombre de types bactériens, plus aptes à être transférés.

Sur 73 souches isolées des eaux de la nappe, nous avons identifié 16 profils box différents (Figure 20) ce qui montre qu'un certain nombre de types de *P. syringae* peuvent filtrer à travers les substrats vers la nappe et qu'il n'y a peut-être pas de sélection forte à ce niveau. L'étude de la diversité des *P. syringae* isolées des canaux et filioles permettra de savoir si la diversité dans la nappe est du même ordre de grandeur ou bien si il y a un effet de « filtration ».



**Figure 20:** Gel d'électrophorèse montrant tous les profils BOX obtenus à partir des populations de *P. syringae* isolées de la nappe alluviale d'Avignon. Les profils 1 à 4 sont le plus fréquemment rencontrés. Le profil 2 représente celui du groupe 2 des *P. syringae* connu pour contenir des souches virulentes.

La plupart des profils obtenus sont représentés par une ou deux souches mais quatre groupes sont les plus fréquents (1 à 4) et un groupe dominant a été mis en évidence dans les divers prélèvements (Groupe 2, figure 20), y compris dans l'eau de la Durance qui est une des sources d'alimentation de la nappe. Ce profil BOX est identique à celui de *P. syringae* CC94, souche qui représente un groupe génotypique connu pour contenir des souches très agressives et couramment appelé Groupe 2. Ceci montre que les populations de *P. syringae* isolées de la nappe sont susceptibles d'être à l'origine de déclenchement d'épidémies sur les plantes cultivées en basse Durance et irriguées avec ces eaux.

Seuls les profils trouvés dans plusieurs sites ont été représentés sur les graphes de la figure 21. Ces résultats ont permis de mettre en évidence la présence du groupe 2 de *P. syringae* dans tous les sites de prélèvement. Ce groupe semble dominer dans la plupart des cas sauf en Durance et dans l'échantillon du Piezo P72 où le groupe 4 domine clairement.

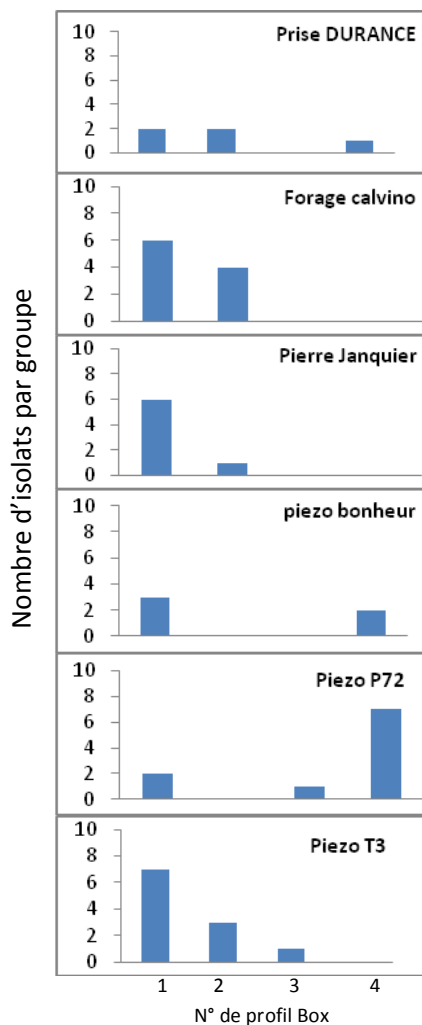


Figure 21 : Distribution des quatre profils box majoritaires dans les populations de *P. syringae* isolées dans différents piezomètres de la nappe alluviale d'Avignon en mars et mai 2011. Les N° de profils correspondent à ceux de la figure 10.

En consultant la répartition des points de prélèvements (voir Fig. 7), on remarque que malgré la proximité des deux prélèvements piézo Bonheur et Forage Calvino, ils semblent héberger une diversité différente. De la même façon, P72 et T3 ne se ressemblent pas. Toutefois il faudrait plus de souches (au moins 30 par échantillon) pour pouvoir conclure avec certitude.

## VI/ DISCUSSION

Dans ce travail nous voulions évaluer de façon qualitative si la bactérie *P. syringae* était présente dans les réseaux d'irrigation de basse Durance. Nous avons effectué une prospection des populations dans le but d'identifier des réservoirs de cet agent phytopathogène. Des études préliminaires avaient permis de mettre en évidence la présence de *P. syringae* dans l'eau de pluie, dans l'eau des rivières alpines, à l'état sauvage sur les plantes et dans les paquets neigeux. Elle utilise ces modes de dissémination, mais également la fonte des neiges qui est la principale source d'alimentation des eaux des rivières au cours des saisons de culture. Les données obtenues nous ont permis de confirmer que les eaux issues de la Durance sont aussi vecteurs des *P. syringae* phytopathogènes dans le bas de son bassin versant. Une étude de diversité pourra permettre d'affiner cette étude et de comparer les populations trouvées en amont et en aval.

Comme décrit précédemment, les biofilms épilithes constituent des communautés très complexes et très hétérogènes. Les *P. syringae* rentrent alors en compétitions avec les autres microorganismes constituant ces biofilms et peuvent plus ou moins survivre en nombre à cette sélection naturelle. Les résultats obtenus lors des isollements sur un milieu semi sélectif révèlent que la bactérie phytopathogène *P. syringae* est bien présente dans les eaux d'irrigation mais également dans les biofilms associés. Certes leur présence est en proportion inégale selon le type de matrice (eaux ou biofilms épilithes) et le lieu.

Un des buts que nous nous étions fixé était de prospecter et d'éventuellement d'isoler *P. syringae* dans les eaux, dans les biofilms et dans les divers équipements d'irrigation de basse Durance, également de tenter de les dénombrer et de les caractériser pour leur pouvoir pathogène. L'isolement et la mise en collection des populations de *P. syringae* représente un travail très important car il se heurte au fait que cette bactérie est peu abondante par rapport aux autres bactéries dans les substrats que l'on étudie. *P. syringae* représente fréquemment seulement une bactérie sur 1000 ou 10 000 cultivables, d'où la nécessité du milieu sélectif et de la concentration des échantillons d'eau par filtration. On peut souligner la puissance de cette technique d'isolement et la performance que cela représente en bactériologie. La mise en collection présente l'intérêt de pouvoir ensuite les caractériser en particulier pour le pouvoir pathogène : virulence, gamme d'hôte, agressivité, et pour leur diversité. Le laboratoire de l'Inra a ainsi la plus grande collection de souche de *P. syringae* dans le monde et celle-ci recouvrant la plus grande diversité de substrats d'isolement et de diversité. Les nombreuses souches isolées lors de cette étude ont été purifiées et ont rejoint cette collection.

Cette bactérie étant phytopathogène, même à faible abondance elle peut représenter un certain risque d'épidémie, car ses populations peuvent être amplifiées de façon exponentielle en présence d'une niche adaptée à sa croissance comme celle des plantes cultivées. Pourtant *P. syringae* n'induit pas systématiquement une maladie sur les végétaux avec lesquels elle entre en contact. La bactérie ne peut agir que si elle possède le système de sécrétion de type III (TTSS) spécifique à la plante hôte (Cunnac *et al.* 2004). Lorsque *P. syringae* infeste la plante hôte il provoque soit une réaction d'hypersensibilité (HR) soit la maladie pouvant aller de la nécrose jusqu'à la mort complète du végétal.

Afin d'avoir une vue complète de la présence de *P. syringae* dans les systèmes d'irrigation, nous avons étendu notre étude à la nappe alluviale d'Avignon qui sert à l'irrigation des cultures. Les résultats d'analyses des eaux de nappe ont permis de mettre en évidence la présence de *P. syringae* contre toute attente, car les eaux sont filtrées par les différentes matrices (sols, sables....) et ne devraient pas en principe en contenir. De surcroit nous l'avons retrouvé au mois de mai, période chaude (au niveau des températures) donc moins favorables au développement de cette espèce. La présence de cette bactérie peut s'expliquer par le fait qu'elle est capable de suivre l'eau dans ses

transferts souterrains lors de l'irrigation, ce qui n'était pas connu jusqu'à présent. Une étude est en cours à l'Inra afin de déterminer les modalités de ce transport à travers des matrices sable ou sol.

Nous avons pu mettre en évidence la présence de *P. syringae* appartenant à un groupe de souches très virulentes du type CC94 dans toutes les eaux des nappes alluviales utilisées pour l'irrigation, donc potentiellement disséminatrices de bactéries phytopathogènes qui pourraient provoquer des épidémies sur les diverses cultures irriguées.

Des prélèvements plus tard dans la saison de végétation pourraient permettre de voir si on observe des augmentations de *P. syringae* liés à la présence des plantes arrosées par irrigation gravitaire et après le temps nécessaire au transfert de l'eau de la surface vers les nappes. En effet les études de mode de recharge de la nappe d'Avignon montrent que l'alimentation principale se fait par les entrées en provenance de la Durance (au sud-est) et surtout par la réalimentation par l'irrigation gravitaire, la pluie jouant un rôle secondaire (Nofal et al. 2011). Ainsi la nappe est en hautes eaux en été (juin, juillet, août) et on pourrait s'attendre à voir une augmentation des populations de *P. syringae* issues des plantes cultivées, lessivées par les eaux d'arrosage, ou bien au contraire une dilution de ces populations dans le volume d'eau entraîné vers les nappes.

L'hypothèse selon laquelle les souches pathogènes de *P. syringae* sont présentes dans les biofilms des canaux filiales et bassins de rétention de basse Durance quelle que soit la saison y compris pendant la période de chômage n'a pas pu être confirmée avec les données obtenues. *P. syringae* ne semblent pas survivre dans les biofilms durant les périodes de chômage des canaux. C'est donc une pratique intéressante pour les agriculteurs. Même en mars dans les canaux remis en eau depuis un mois, on ne retrouve pas de *P. syringae* dans les biofilms. Tout se passe comme si les biofilms se chargeaient en *P. syringae* au cours du temps dans la saison d'irrigation et donc ils ne constituent pas de réservoir mais plutôt une mémoire de ce qu'il se passe dans la saison, mémoire éphémère puisque le chômage les fait disparaître. Toutefois, dans le bassin de rétention, les biofilms hébergent des *P. syringae* même en hiver et pourraient constituer un réservoir.

## VII/ CONCLUSION

En conclusion, nos données montrent que l'eau utilisée pour l'irrigation que ce soit l'eau gravitaire ou l'eau des nappes contient des populations de *P. syringae*. Ces populations peuvent représenter un risque pour les cultures surtout en cas de conditions météo favorables au déclenchement des épidémies à *P. syringae* (froid et humidité). Toutefois les abondances sont faibles aussi bien dans l'eau sous pression venant du bassin que dans l'eau des nappes où parfois on ne la détecte pas, ce qui diminue le risque. Il serait intéressant de faire un suivi des populations de *P. syringae* au cours de la saison d'irrigation dans l'eau qui arrive sur les végétaux chez l'agriculteur, en particulier dans les vergers, ou les cultures maraichères comme la salade où les végétaux sont irrigués par aspersion sur le feuillage rendant plus probable le risque de contamination.

Il semble par ailleurs que les biofilms épilithes de basse Durance ne représentent pas un risque particulier de constituer un réservoir important de *P. syringae* phytopathogènes par rapport à l'eau. Toutefois, ces biofilms hébergent des souches phytopathogènes et l'étude de l'agressivité de ces souches reste à faire pour savoir si elles sont plus agressives que celles véhiculées par l'eau.

Le chômage des canaux paraît être une pratique qui élimine les foyers potentiels de *P. syringae* dans les biofilms épilithes présents. A l'opposé, les bassins de rétention pourraient constituer un réservoir puisqu'ils hébergent des *P. syringae* toute l'année à l'image de l'eau des rivières. Pour savoir si ces bassins représentent un risque supplémentaire par rapport aux cours d'eau il serait intéressant de caractériser les souches de *P. syringae* des bassins pour leur agressivité et de les comparer avec celles des cours d'eau.

L'organisation des prélèvements et les traitements des échantillons ont été une expérience nouvelle pour moi, en particulier sur certains aspects. Les techniques de détermination et de discrimination bactériennes utilisées ont permis de renforcer mes acquis. Le traitement des résultats obtenus sont un complément précieux aux compétences que j'ai déjà en ma possession. Je souhaiterais mettre à profit l'ensemble de ce travail de bactériologie de l'environnement au sein de mon unité, et plus particulièrement le travail d'isolement et de caractérisation de souches bactériennes, de plus en plus indispensable dans les programmes de recherches à venir.



## VIII/ BIBLIOGRAPHIE

- Amato P, Parazols M, Sancelme M, Paolo L, Mailhot G, & Delort AM. 2007. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiol Ecol* 59, 242-254.
- Berge O, Monteil C, Glaux C, Guilbaud C, Leyronas C, Moudjahidou D D, Rimet F & Morris C E. 2010. Évolution du pouvoir pathogène d'une bactérie phytopathogène en dehors des zones agricoles. Impact des biofilms aquatiques sur la structure des populations de *Pseudomonas syringae* « Écologie 2010 » Colloque national d'Écologie scientifique, Montpellier 2-4 sept 2010. (Affiche).
- Berge O, Monteil C, Glaux C, Guilbaud C & Morris C E. 2011. Biodiversité microbienne dans les cours d'eau du bassin de la Durance : conséquences de la présence de bactéries phytopathogènes dans les biofilms. Colloque International, « Usages écologiques, économiques et sociaux de l'eau agricole en Méditerranée ». Univ de Provence, Marseille, 20-21 janv. (Affiche)
- Constantinidou H A, Hirano S S, Baker L S & Upper CD, 1990. Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria : the role of rain. *Phytopathology* 80, 934-937.
- Cunnac S, Lindeberg M & Collmer A. 2009. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 53-60.
- Jenkinson H F & Lappin-Scott H M. 2001. Biofilms adhere to stay. *Trends microbial* 9 (1), 9-10.
- Laue H, Schenk A, Li H, Lambertsen<sup>1</sup>L, Neu T R, Molin S & Ullrich M S. 2006. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* vol. 152, 2909-2918.
- Louws F J, Fulbright D W, Stephens C T, & de Bruijn F J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR- Applied and Environmental Microbiology. 60, 7, 2286-2295.
- Marques A S A, Marchaison A, Gardan L & Samson R. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* – *P. viridiflava* group. *Genetics and Molecular Biology*. 31, 1, 106-115
- Mention P, Lavigne D, Leix-Henry F, Bochu S, Morris C, Prior P, Pitrat M, Mercy L & Dours O. 2004. Bacteriosis of melon: experience and perspectives. *PHM Revue Horticole*, 459, 22-26.
- Mohr T J, Liu H, Yan S, Morris C E, Castillo J A, Jelenska J & Vinatzer B A. 2008. Naturally occurring non-pathogenic isolates of the plant pathogen species *Pseudomonas syringae* lack a Type III Secretion System and effector gene orthologues. *J Bacteriol* 190, 2858-2870.
- Morris C E, Glaux C, Latour X, Gardan L, Samson R & Pitrat M. 2000. The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France. *Phytopathology*, 90, 6, 636-646.
- Morris C E & Monier J M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41, 429-453.
- Morris C E, Georgakapolous D & Sands D C. 2004. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J Phys IV France* 121, 87-103.
- Morris C E, Kinkel L L, Xiao K, Prior P & Sands D C. 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infect Genet Evol* 7, 84-92.

- Morris C E, Sands D C, Vinatzer B A, Glaux C, Guilbaud C, Buffière A, Yan S, Dominguez H & Thompson B M. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. The ISME J 2, 321-334.
- Morris C E, Sands D C, Vanneste J L, Montarry J, Oakley B, Guilbaud C, & Glaux C. 2010. Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. mBio™ 1(3) e00107-00110.
- Nofal S, Cognard-Plancq A L, Marc V, Tison F, Daniel M & Travi Y. 2011, La recharge des nappes par les eaux d'irrigation en Basse Provence : exemple de la plaine d'Avignon. Colloque International, « Usages écologiques, économiques et sociaux de l'eau agricole en Méditerranée ». Univ de Provence, Marseille, 20-21 janv. Com. Orale, Atelier N° 3 Etat écologique, biodiversité et paysages de l'eau.
- Riffaud C M H & Morris C E. 2002. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in irrigation water retention basins by immunofluorescence colony staining. Eur J Plant Pathol 108, 539-545.
- Sands D C, Langhans V E, Scharen A L & de Smet G. 1982. The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications. J Hungarian Meteorol Serv 86, 148-152
- Vezina L & Lacroix M, 2009. Tests biochimiques classiques pour l'identification des *Pseudomonas* fluorescents. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, [www.agrireseau.qc.ca/lab/documents/test](http://www.agrireseau.qc.ca/lab/documents/test)

# ANNEXES

## Annexe I

### Milieu KBC

#### **1- Composition du milieu gélosé**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Protéose peptone	15 g
Glycérol	10 ml
Agar	16 g
H <sub>2</sub> O	compléter à 900 ml

Après autoclavage 20 minutes à 121°C ajouter les ingrédients suivants :

Acide borique, solution aqueuse à 1,5% <u>autoclavé séparément</u>	100 ml
Céphalexine (diluée dans l'eau)	80 mg
Cycloheximide (diluée dans l'éthanol)	200 mg

### Milieu KB

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Protéose peptone	15 g
Glycérol	10 ml
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	compléter à 1000 ml

Autoclavage de 20 minutes à 121°C

## Annexe II

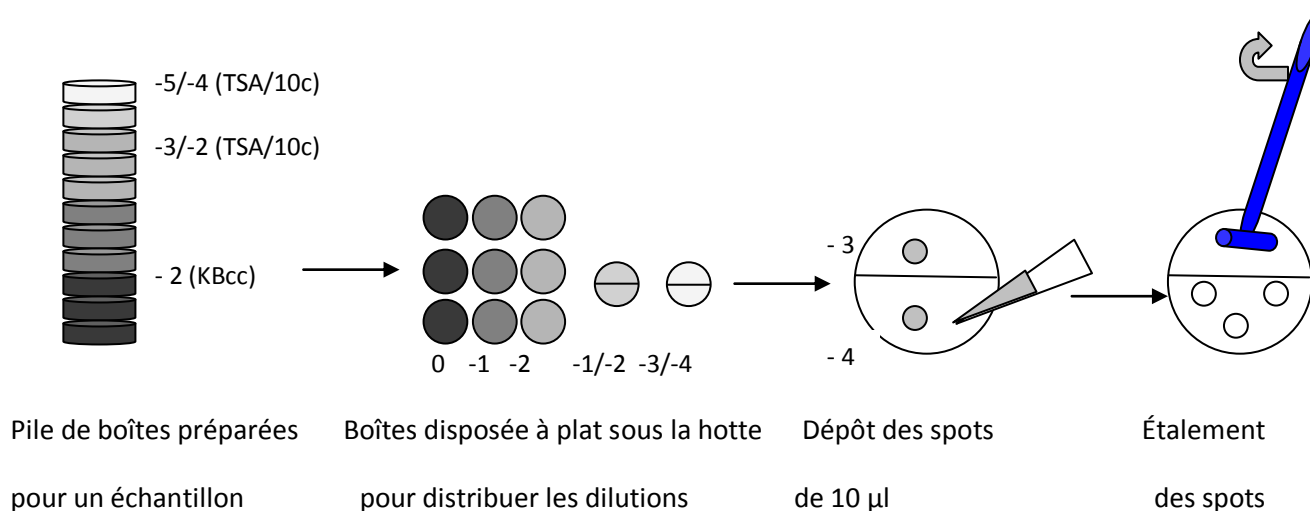
### PROTOCOLE DE TRAITEMENT DES BIOFILMS FRAIS

#### Préparation

Préparer le matériel et le mettre sous la hotte ou à portée de main

Eau stérile (20 ml)  
Pipettes 1 ml, 100 et 10 µl  
Cônes bleus et jaunes stériles non coupés, cônes bleus stériles coupés  
Alcool à 97 % dans un tube de 50 ml ou un pilulier  
2 Tubes vides stériles de contenance 2 ml et 1 DE 5 ml  
4 tubes de contenance 1,5 ml, contenant 900 µl d'eau stérile marqués - 1 à - 5  
2 boîtes de TSA/10c avec un trait sur le diamètre, marquées -5/-4 et -3/-2 (fig1)  
9 boîtes de KBC, 3 par dilutions : - 2; - 1; 0;  
Les 11 boîtes de milieu d'un échantillon sont rangées en piles individualisées  
1 mortier+pilon stérilisés par flambage à l'alcool et refroidit quelques min sous hotte

**ATTENTION : alcool et flamme sous la hotte, risque de brûlure et d'incendie**



#### Schéma d'aide aux étapes 14 à 17

##### Aliquotage de l'échantillon

- 1 - Noter la description visuelle de l'échantillon en quelques mots *couleur, densité, floccs, agrégats, particules minérales, .... Photo éventuellement*  
-1ml +2.5 ml alcool 97°C → tube 5ml (Stocker le tube à 4 °C (pour envoi à Frédéric Rimet))  
-1 ml → mortier pour le zéro  
-1.5 ml → tube de 2ml → +4°C → ADN (Stocker le tube pour ADN à - 20 °C)  
-le reste (6ml environ) → +4°C → Biomasse sèche

##### Suspensions-dilutions

- 7 - Broyer l'échantillon dans le mortier pendant environ 30 s en faisant des cercles  
*Le mélange doit être le plus homogène possible*
- 8 - Prélever le broyat avec 1 cône bleu coupé, le mettre dans le tube de 1.5 ml marqué « 0 »  
*Laisser en attente sous la hotte le temps de faire l'étape 10*

*Une bactérie phytopathogène, Pseudomonas syringae, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance*

- 9 - Laver le mortier et le pilon au robinet, l'essuyer. Sous la hotte **le flamber**, laisser refroidir
- 10 - Reprendre le tube « 0 » vortexer et prélever 100 µl pour ajouter dans le tube « -1 »  
*Si trop peu de broyat diluer 50 µl dans 450 µl*
- 11 - Continuer de la même façon, les suspensions dilutions jusqu'à -5  
*Laisser en attente sous la hotte (ou à 4 °C) le temps de faire l'étape 14*
- 12 - Reprendre l'étape 1 pour l'échantillon suivant, jusqu'au dernier échantillon
- Étalement des dilutions sur milieux en boîtes de Petri et incubation**
- 14 - Prendre la pile de boîtes du 1<sup>er</sup> éch et les disposer ss hotte comme indiqué Fig. 1.
- 15 - Spoter 3 x 10 µl des dilutions - 5 à -2 avec le même cône sur 1 boîte de TSA/10
- 16 – Déposer 3 x 100 µl des dilutions -2 à 0 avec le même cône dans 3 boîtes KBcc
- 17 - Avec le même râteau, étaler dans l'ordre les dépôts de - 2 à 0.  
*Utiliser le bord du râteau pour les spots. Veiller à prendre le râteau du bon côté.*
- 18 - Laisser sécher les boîtes à l'endroit, puis les stocker à l'envers (à l'étuve) à 20 °C.
- 19 – Stocker les dilutions de 0 à - 5 à 4 °C

### Annexe III

#### TAMPON PHOSPHATE (TP1)

##### Composition en g/l :

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,75
EAU distillée	1L

#### MILIEU ARGININE

##### Composition en g :

PEPTONE	0,25
NaCl	1,25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,08
PHENOL RED solution	0,025 ml
L-ARGININE-HCl	2,50
AGAR	1,50
EAU distillée	250ml

autoclaver 10min à 120°C

#### MILIEU TRYPTIC SOY AGAR 10 eme

##### Composition en g/l :

TRYPTIC SOY BROTH (TSB)	3
AGAR	15
EAU distillée	1L

#### MILIEU TRYPTIC SOY BROTH (TSB)

##### Composition en g/l :

CASEIN PEPTONE	17,0
SOYA PEPTONE	3,0
SODIUM CHLORIDE	5,0
DIPOTASSIUM PHOSPHATE	2,5
DEXTROSE	2,5
pH final : 7,3 ± 0,2	



## Annexe IV

### RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO CHIMIQUES DES EAUX DES NAPPES :

Mesures du terrain (15_03_2011)									
	Prof nappe	Prof totale	Prof prélèvement	T°	PH	Conductivité	O dissous		
N° Point	m	m	m	degré		µS/cm	%		
244I9	5,17	10,00	7,00	10,30	7,68	519,00	85,00		
Prise DURANCE	-	-	-	10,60	8,34	537,00	-		
T3	2,54	6,00	5,00	15,30	7,23	702,00	10,00		
Pierre JANQUIER	6,48	9,00	pompe	16,60	6,97	864,00	26,00		
Forage Calvino	5,33	15,50	8,50	16,10	6,96	810,00	73,00		
Piézo Bonheur	5,30	19,00	8,50	14,80	6,99	793,00	76,00		
P72	3,29	8,10	6,00	14,00	7,11	1187,00	4,00		
Mesures du labo (en mg/l)									
Nom échantillons	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>
244I9	305,00	0,07	18,68	3,01	89,51	12,42	1,27	12,37	73,06
Prise DURANCE	206,18	0,06	23,89	3,31	79,16	15,68	1,49	11,52	76,09
T3	273,28	0,08	25,14	6,27	109,53	17,68	3,12	17,22	101,86
Pierre JANQUIER	366,00	0,18	28,86	19,27	110,71	18,09	3,65	22,84	129,31
Forage Calvino	341,60	0,13	27,43	11,44	112,37	18,19	2,46	15,97	128,65
Piézo Bonheur	341,60	0,16	25,65	10,55	108,60	17,44	4,66	16,02	124,39
P72	348,92	0,06	63,84	0,02	307,12	29,00	2,09	44,13	157,41
Mesures du terrain (10_05_2011)									
	Prof nappe	Prof totale	Prof prélèvement	T°	PH	Conductivité	O dissous		
N° Point	m	m	m	degré		µS/cm	%		
244I9	5,12	10,00	7,00	10,80	7,56	544,00	59,00		
Prise DURANCE	-	-	-	18,70	8,17	553,00	-		
T3	2,66	6,00	5,00	15,20	7,25	702,00	10,00		
Pierre JANQUIER	4,88	9,00	pompe	16,20	7,01	816,00	23,00		
Forage Calvino	4,55	15,50	8,50	15,90	6,97	806,00	13,00		
Piézo Bonheur	4,46	19,00	8,50	14,50	6,97	751,00	85,00		
P72	3,34	8,10	6,00	14,20	7,14	1143,00	8,00		
Mesures du labo (en mg/l)									
Nom échantillons	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>
244I9	218,38	0,08	22,88	3,65	78,96	14,87	1,50	14,36	73,51
Prise DURANCE	212,28	0,04	24,46	2,82	78,08	16,38	1,80	14,45	72,10
T3	280,60	0,04	23,98	6,47	106,22	17,15	3,05	18,76	96,38
Pierre JANQUIER	378,20	0,18	26,39	15,03	101,20	17,20	3,55	24,41	116,07
Forage Calvino	339,16	0,20	26,60	11,55	110,47	18,06	2,43	17,74	117,05
Piézo Bonheur	336,72	0,17	26,68	7,30	95,41	16,80	4,51	15,82	100,37
P72	351,36	0,06	58,28	n.a	286,64	28,79	2,11	41,93	135,36

*Une bactérie phytopathogène, Pseudomonas syringae, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance*

## **RESUME stage de licence à l'INRA d'Avignon**

### **Une bactérie phytopathogène, *Pseudomonas syringae*, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance Isolement, caractérisation, diversité**

Les populations de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* sont présentes non seulement sur les plantes cultivées qu'elles attaquent mais aussi dans des zones non cultivées comme le haut du bassin versant de la Durance, en particulier dans les cours d'eau. En suivant le cycle de l'eau douce ces populations pourraient représenter un risque pour les productions maraichères et fruitières irriguées de basse Durance.

Grâce au milieu semi sélectif KBC nous avons dénombré, isolé, caractérisé et mis en collection les *P. syringae* présents dans l'eau et les biofilms épilithes des réseaux d'irrigation de la région d'Avignon bien que cette bactérie représente, au plus une bactérie/1000 bactéries cultivables.

Comme attendu *P. syringae* est présente dans tous les prélèvements d'eau de surface (Durance, canal, filiole, bassin de rétention) à toutes les dates à une densité entre  $10^2$  et  $10^4$  cellules/L. Elle est même détectée dans l'eau délivrée sous pression chez l'agriculteur, mais seulement à la fin de la saison d'irrigation (novembre) et en faible concentration ( $10^2$  bact/L).

Dans les biofilms épilithes prélevés dans les mêmes sites, elle est détectée plus rarement que dans l'eau, à des densités de  $5 \cdot 10^2$  à  $5 \cdot 10^5$  cellules/g biofilm sec. Pendant la période de chômage des canaux (novembre à février) *P. syringae* n'est pas isolée des biofilms desséchés ou humides et il faut attendre 3 mois après la mise en eau des canaux pour la détecter dans ces biofilms. Seuls les biofilms épilithes du bassin (toujours plein) hébergent des *P. syringae* toute l'année et pourraient constituer un réservoir de bactéries phytopathogènes. La majorité (> 80 %) de ces souches entraîne une réaction hypersensible sur feuille de tabac (réaction HR +) ce qui montre un certain potentiel de nuisance pour les cultures irriguées.

Pour compléter cette étude nous avons testé l'eau de la nappe alluviale d'Avignon qui sert aussi à l'irrigation et contrairement à nos prédictions, nous avons pu mettre en évidence pour la 1<sup>ère</sup> fois que c'est une source potentielle de *P. syringae*, bien que les densités soient plus faibles qu'en surface ( $< 10^3$  cellules/L). La diversité génotypique des populations (BOX-PCR) de la nappe montre une assez grande diversité avec toutefois quatre groupes dominants dont un présent dans tous les sites et connu pour être le plus agressif sur les plantes. Cette découverte va conduire à une nouvelle vision de la dispersion des populations de *P. syringae* par les réseaux hydrologiques de Durance qui prendra en compte une composante souterraine dont le rôle dans le déclenchement éventuel d'épidémies reste à préciser.

**Frédérique Razan**

Licence professionnelle biotechnologie  
Année 2010-2011