

REBUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE ET AGRO-ECOLOGIE

Thèse de Doctorat

en vue de l'obtention de Diplôme de Docteur en Sciences Agronomiques

**EPIDEMIOLOGIE DES PRINCIPALES MALADIES
BACTERIENNES DE LA POMME DE TERRE, DETECTION
ET IDENTIFICATION.**

Présentée par

ALIM Djamila épouse MAROK

Devant le jury composé de :

Dr. ZOUAOUI A.	Université de Blida 1	Président
Pr. BOUREGHDA H.	E.N.S.A d'El Harrach	Examinatrice
Pr. MAHDI K.	Université de Bouira	Examinatrice
Pr. TAOUTAOU A.	E.N.S.A d'El Harrach	Examineur
Dr. AIT SAADI N.	Université de Blida 1	Examinatrice
Pr. KRIMI Z.	Université de Blida 1	Directrice de thèse

Année universitaire 2024-2025

Epidémiologie des principales maladies bactériennes de la pomme de terre, détection et identification.

RÉSUMÉ

Le présent travail de thèse a pour objectif d'identifier principalement l'agent causal responsable de la jambe noire et de la pourriture molle de la pomme de terre dans la wilaya d'Ain Defla, considérée comme l'une des régions les plus productrices de la pomme de terre. Les prospections ont eu lieu durant la période de 2016-2018, des prélèvements des échantillons de pomme de terre ont été effectués au niveau des parcelles et des points de stockage présentant des symptômes respectivement de jambe noire et de pourriture molle. L'isolement et la mise en croissance sur le milieu de culture Crystal Violet Pectate (CVP) a permis d'obtenir douze isolats Gram négatif. Le test d'hypersensibilité sur le tabac a confirmé leur pouvoir phytopathogène. La caractérisation biochimique a révélé que les souches isolées appartiennent à deux profils biochimiques distincts dont un correspond aux bactéries pectinolytiques. L'identification moléculaire par PCR en utilisant les amorces spécifiques ADE1/ADE2 de *Dickeya* spp. a confirmé l'affiliation des souches du profil 1 à savoir S441, B74, D14 et A13 au genre *Dickeya*. Par la suite, la réalisation des tests biochimiques supplémentaires ont permis de les classer comme étant *Dickeya* biovar 3 qui correspond à l'espèce *Dickeya solani*. L'inoculation des souches identifiées à divers plants de Solanacées, notamment de pomme de terre, de tomate et d'aubergine a confirmé leur fort pouvoir pathogène en induisant divers symptômes tels que le jaunissement des feuilles et le flétrissement des plants ce qui témoigne de leur virulence sur un large spectre de Solanacées.

Afin d'évaluer l'effet de certains éléments sur le développement des symptômes liés à la pourriture molle tels que la concentration initiale de l'inoculum et les facteurs environnementaux, des essais *in planta* ont été réalisés sur des disques de tubercules de pomme de terre. Les résultats ont révélé qu'une faible densité d'inoculum était suffisante pour initier la macération des tissus de pomme de terre. De même, la variation de la température et de l'humidité relative impacte aussi l'intensité des symptômes observés sur les disques de pomme de terre.

Cette étude est une première signalant la présence de *D. solani* causant la jambe noire et la pourriture molle sur la pomme de terre en Algérie. Elle souligne les risques potentiels associés à la présence de cette maladie dans les années à venir.

Mots-clés : *Solanum tuberosum*, *Pectobacteriaceae* SRP, pourriture molle, jambe noire, PCR

SUMMARY

The objective of this thesis work is to primarily identify the causal agent responsible for blackleg and soft rot of potato in the wilaya of Ain Defla, considered one of the most productive potato regions. The study was conducted during the period of 2016-2018, with potato samples collected from fields and storage points showing symptoms of blackleg and soft rot, respectively. Isolation and growth on Crystal Violet Pectate (CVP) culture medium yielded twelve Gram-negative isolates. The hypersensitivity test on tobacco confirmed their phytopathogenic ability. Biochemical characterization revealed that the isolated strains belong to two distinct biochemical profiles, one of which corresponds to pectinolytic bacteria. Molecular identification by PCR using specific primers ADE1/ADE2 for *Dickeya* spp. confirmed the affiliation of profile 1 strains, namely S441, B74, D14, and A13, to the *Dickeya* genus. Subsequently, additional biochemical tests allowed their classification as *Dickeya* biovar 3, which corresponds to the species *Dickeya solani*.

Inoculation of the identified strains to various Solanaceae plants, including potato, tomato, and eggplant, confirmed their strong pathogenic ability by inducing various symptoms such as leaf yellowing and plant wilting, demonstrating their virulence on a wide spectrum of *Solanaceae*.

To evaluate the effect of certain elements on the development of soft rot symptoms, such as initial inoculum concentration and environmental factors, *in planta* tests were performed on potato tuber discs. The results revealed that a low inoculum density was sufficient to initiate maceration of potato tissues. Similarly, variations in temperature and relative humidity also impacted the intensity of symptoms observed on potato discs.

This study is the first to report the presence of *D. solani* causing blackleg and soft rot on potato in Algeria. It highlights the potential risks associated with the presence of this disease in the coming years.

Keywords: *Solanum tuberosum*, SRP, soft rot, blackleg, PCR

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الأطروحة هو تحديد العامل المسبب المسؤول عن التعفن ذو الأرجل السوداء والناعمة في ولاية عين الدفلى، التي تعتبر واحدة من أكثر المناطق المنتجة للبطاطا. وأجريت دراسات استقصائية خلال الفترة 2016-2018، وأخذت عينات من البطاطا في قطع الأراضي ونقاط التخزين التي ظهرت عليها أعراض القدم السوداء والعفن اللينة على التوالي. العزل في وسط النموكريستال فيوليت بيكيت (CVP) أدى إلى ظهور اثني عشر سلالة غرام سلبية.

أكد اختبار فرط الحساسية على التبغ قوتها النباتية. كشف التوصيف الكيميائي الحيوي أن السلالات المعزولة تنتمي إلى اثنين من التشكيلات الكيميائية الحيوية المتميزة، واحدة منها يتوافق مع البكتيريا المحللة للبكتين. التحديد الجزيئي بواسطة PCR تفاعل البوليميراز المتسلسل باستخدام البادئة ADE1/ ADE2 المحددة *spp Dickeya*. أكد ارتباط السلالات إلى النمط الظاهري 1، وهي S441 و B74 و D14 و A13 إلى الجنس البكتيري *Dickeya solani*. في وقت لاحق، سمح الانتهاء من الاختبارات البيوكيميائية الإضافية بتصنيفها على أنها *biovar3 Dickeya* التي تتوافق مع الجنس البكتيري *Dickeya solani* وقد أكد تلقیح السلالات المحددة لمختلف نباتات الباذنجانيات، وخاصة البطاطس، الطماطم والباذنجان على إمراضها القوي عن طريق إحداث أعراض مختلفة مثل اصفرار الأوراق وذبول النباتات، مما يشهد على ضراوتها على مجموعة واسعة من نباتات الباذنجانيات.

من ناحية أخرى أجريت اختبارات على أقراص درنة البطاطس لتقييم تأثير بعض العوامل على تطور أعراض التعفن اللين مثل التركيز البكتيري الأولي والعوامل البيئية. وأظهرت النتائج أن كثافة منخفضة من التركيز البكتيري كانت كافية لبدء تعفن أنسجة البطاطا. وبالمثل، فإن التباين في درجة الحرارة والرطوبة النسبية يؤثر أيضا على شدة الأعراض التي لوحظت على أقراص البطاطس.

هذه الدراسة هي الأولى من نوعها التي تشير إلى وجود بكتيريا *Dickeya solani* يسبب تعفن الساق السوداء واللينة على البطاطا في الجزائر. وهي تسلط الضوء على المخاطر المحتملة المرتبطة بوجود هذا المرض في السنوات القادمة.

الكلمات المفتاحية : SRP ، *Pectobacteriaceae* ، *tuberosum Solanum* ، التعفن اللين ، الساق السوداء، PCR

REMERCIEMENT

Au terme de ce long et intense parcours doctoral, je tiens à exprimer ma gratitude la plus profonde au Professeur **Krimi Z.** Bien plus qu'une simple directrice de thèse, vous avez été un soutien indéfectible durant ces années. Votre expertise, vos conseils et votre patience ont façonné ma rigueur scientifique. Chaque discussion, chaque remarque m'a permis de grandir intellectuellement et personnellement. Au-delà des aspects scientifiques, vous m'avez transmis une forme d'excellence et de rigueur qui dépassera largement le cadre de cette recherche. Votre générosité intellectuelle et votre humanité resteront pour moi un modèle. Ce travail vous est profondément dédié, avec toute ma gratitude et mon immense respect.

Mes remerciements s'adressent à monsieur **ZOUAOUI A.** Maître de Conférences à l'Université de Blida 1. Vous m'avez porté honneur en acceptant de présider le jury de ce travail et d'y apporter l'éclairage du scientifique. Qu'il me soit permis de vous exprimer mon estime et ma sincère reconnaissance.

Je remercie également les membres du jury madame **BOUREGHDA H.** et monsieur **TAOUTAOU A.** professeurs à l'ENSA, El Harrach, pour avoir accepté de porter un regard attentif et d'évaluer ce travail de recherche, je tiens à vous exprimer ma plus profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également à madame **MAHDI K.** Professeur à l'Université de Bouira. je tiens à exprimer ma reconnaissance la plus sincère pour votre participation à cette soutenance. Votre déplacement souligne votre générosité intellectuelle et votre intérêt pour cette recherche. Avec un profond respect et ma gratitude la plus sincère.

Mes vifs remerciements s'adressent à madame **AIT SAADI N.** Maître de Conférences à l'Université de Blida 1. pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Votre rigueur scientifique a toujours été pour moi un modèle d'excellence académique.

Un remerciement très spécial s'adresse à Monsieur et Madame **DJAZOULI**, Votre duo académique a été bien plus qu'un encadrement : vous avez été mes mentors, mes modèles tout au long de mon parcours universitaire.

Chaque étape de ma formation porte l'empreinte de vos accompagnements et ce travail est en grande partie le fruit de votre soutien indéfectible, tant sur le plan scientifique que personnel. Avec toute ma gratitude et mon profond respect.

A **Lamia Tafifet**, Un immense merci pour ton soutien durant ma thèse. Ta disponibilité sans faille, tes informations précises et ton aide rapide ont été d'un secours inestimable. tu as toujours été là pour m'éclairer et m'accompagner. À travers ces lignes, je souhaite t'exprimer ma gratitude profonde et sincère.

A la fin, c'est avec beaucoup de reconnaissance et une émotion certaine que je rédige ces quelques lignes. Elles marquent le point final de ce travail de thèse, mais de découvertes et d'amitiés créées ou renforcées au sein du laboratoire. Je ne saurai citer toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont permis la réalisation de ce travail. Ces remerciements vous sont adressés à tous, et tout particulièrement à l'équipe du laboratoire **PVRA**.

Merci.

DEDICACE

À mes chers parents, Avec tout mon amour et ma gratitude

Papa, qui as attendu ce moment avec tant de patience et d'espoir. Chaque page de cette thèse porte l'empreinte de ton soutien indéfectible. Tu as cru en moi avant même que je ne sache où me mèneraient mes études. Cette réussite est aussi la tienne, la concrétisation de années d'attente et d'encouragements silencieux. Puisse cette thèse être à la hauteur de ta fierté.

Maman, femme de conviction au caractère d'acier, Dont la force inébranlable a guidé nos pas. Tes sacrifices et ta détermination sans faille ont pavé le chemin de ma réussite. Cette thèse est le fruit de ton courage, L'héritage de ta force qui coule dans mes veines. Avec toute mon admiration et ma reconnaissance, Je te dédie ce travail, maman.

A Mon mari Amine,

Pilier inébranlable de ma vie, sans ton soutien inconditionnel ce travail n'aurait jamais pu se réaliser, Il n'y a pas assez de place pour exprimer ce que je ressens pour toi.

Aux prunelles de mes yeux Lyna, Imad Eddine et Taline.

Cette thèse, je vous la dédie pour vous montrer que les rêves se réalisent avec du travail et de la persévérance. Puisse-t-elle vous inspirer à poursuivre les vôtres, aussi grands soient-ils. Vous êtes ma plus belle réussite.

A ma chère sœur Farah,

Tu as toujours été là, dans les moments de doute comme dans ceux de joie. Ton soutien constant et ta présence bienveillante ont illuminé ce long parcours.

À ta merveilleuse famille, Et particulièrement à mes adorables nièces, Sirine et Dania,

A mes frères: Djamel et Amine

En témoignage de mon profond amour : Je vous souhaite une belle vie.

Table des matières

RÉSUMÉ	2
SUMMARY	3
ملخص	4
REMERCIEMENT	5
DEDICACE	1
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I :	5
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES BACTERIES PECTINOLYTIQUES DE LA POMME DE TERRE.	5
1 Situation de la filière en Algérie	5
1 Les bactéries pectinolytiques, un problème alarmant de la pomme de terre.	6
2 Evolution de la taxinomie des bactéries SRP	6
3 Répartition géographique.....	9
4 Cycle de la maladie et les mécanismes de virulence impliqués dans l'interaction plantes-SRP.....	11
4.1 Enzymes dégradant les parois cellulaires des plantes (PWCDE)	13
4.1.1 Pectinases.....	13
4.1.2 Cellulases	14
4.1.3 Proteases	14
4.2 Motilité.....	14
4.3 Les sidérophores.....	15

4.4	Les Lipopolysaccharides	15
4.5	La régulation de la virulence par le quorum sensing (QS).....	16
4.6	Les systèmes de sécrétion et leurs rôles dans la virulence.....	17
5	<i>Dickeya solani</i> , un nouveau pathogène émergent.....	19
6	Symptomatologie de la pourriture molle sur la pomme de terre	21
6.1	Au champ	21
6.2	En conditions de stockage.....	22
6.3	Symptomatologie de la jambe noire.....	22
6.4	Symptômes observés sur d'autres cultures	24
7	Facteurs favorisant l'infection.....	25
7.1	Le tubercule mère.....	25
7.2	Température	26
7.3	Humidité.....	26
7.4	Influence du pH.....	26
7.5	Carence en oxygène et en azote	27
7.6	Le sol et la rhizosphère des plantes.....	27
7.7	Les pratiques agricoles comme facteurs de contamination.....	28
8	La lutte contre les bactéries pectinolytiques	28
8.1	La prophylaxie	29
8.2	La lutte chimique.....	29
8.3	Fertilisation des plantes et résistance à la maladie.....	29
8.4	Perturbation de la signalisation <i>quorum-sensing</i>	30
8.5	La lutte biologique	30
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES		32
1	Zone d'étude	32
2	Isolement et purification	33

3	Caractérisations biologiques	34
3.1	La réaction d'hypersensibilité	34
3.2	Mise en évidence de l'activité pectinolytique	35
4	Caractérisation biochimique des isolats SRP-like obtenus	35
4.1	Le test au KOH.....	36
4.2	La production de pigments fluorescents	36
4.3	Croissance sur milieu NGM.....	36
4.4	Le test de croissance à 37°C.....	36
4.5	Le test sucrose	36
4.6	Le test indole	37
4.7	Le test oxydation/fermentation	37
4.8	Le test catalase	37
4.9	Le test oxydase.....	37
4.10	Liquéfaction de la gélatine	38
4.11	Le test de tolérance à la salinité.....	38
5	Caractérisation des <i>Dickeya</i> spp. en biovars.....	38
5.1	Le test Arginine dihydrolase	38
5.2	Production d'acide à partir de certaines sources de carbone.....	39
6	Identification moléculaire des SRP par la Réaction de polymérisation en Chaîne PCR	39
6.1	Mélange réactionnel et programme du thermocycleur.....	40
6.2	Révélation des résultats de l'amplification	40
7	Le test du pouvoir pathogène.....	40
8	Recherche de la densité optique pour le calcul de la quantité d'inoculum.....	41
9	Etude des facteurs favorisant la maladie.....	41
9.1	Effet de la variation de la concentration de l'inoculum primaire sur le développement de la pourriture molle	43

9.2	Effet de la température	44
9.3	Effet de l'humidité relative	44
10	Analyse statistique des résultats	44
CHAPITRE III: RESULTATS ET INTERPRETATIONS		46
1	Description des échantillons symptomatiques collectés	46
2	Caractéristiques des isolats bactériens obtenus à partir des échantillons collectés.	48
8.6	La réaction d'hypersensibilité sur le tabac	49
8.7	L'activité pectinolytique sur la pomme de terre	50
8.8	Caractéristiques culturelles et biochimiques	51
2.1.1	Formation de cavité sur le milieu CVP	51
2.1.2	Caractéristiques culturelles sur milieu GN	52
2.1.3	Production de fluorescence sur le milieu King B	52
2.1.4	La croissance sur le milieu NGM	52
2.1.5	Résultats des tests biochimiques et physiologiques des isolats obtenus	53
3	Identification moléculaire des SRP par la Réaction de polymérisation en Chaîne(PCR)	56
4	Caractérisation des souches <i>Dickeya</i> spp. en biovars	57
2	Le test du pouvoir pathogène	59
5	Effet des facteurs étudiés sur le développement de pourriture molle	62
8.9	Effet de la variation de la concentration de l'inoculum primaire	62
8.10	Effet de la température	65
8.11	Effet de l'humidité	67
DISCUSSION		70
1	Identification des SRP isolées des échantillons de pomme de terre	71
2	Réaction hypersensible des bactéries isolées	72
3	Caractérisation biochimique des isolats	74

4	Différenciation de <i>Dickeya</i> spp. en biovars	77
5	Identification moléculaire par PCR conventionnelle.....	79
6	Pouvoir pathogène	79
7	Effet de la concentration d'inoculum.....	80
8	Etude de l'impact des facteurs environnementaux	81
	CONCLUSION.....	85
	REFERENCES	89
	ANNEXES.....	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: La production de pomme de terre en Algérie.....	5
Tableau 1.2: Evolution de la taxinomie des SRP	9
Tableau 1.3 : Répartition des espèces SRP dans le monde	11
Tableau 2.1 : Coordonnées des régions d'étude localisées dans la wilaya de Ain Defla .	32
Tableau 2.2 : Echantillons symptomatiques de pomme de terre prélevés en plein champ et dans les entrepôts de stockage dans la wilaya d'Ain Defla	33
Tableau 3.1 : Origine des souches bactériennes isolées	49
Tableau 3.2 : Réponse biologiques et physiologique des isolats étudiés	55
Tableau 3.3 : Caractérisation biochimique des souches bactériennes isolées	58
Tableau 3.4 : Modèle ANOVA appliqué aux souches de <i>D. solani</i> sur le poids des tissus pourris	63
Tableau 3.5 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de la température sur la hauteur pourriture molle	65
Tableau 3.6 : Effet de l'humidité sur le développement de la pourriture molle	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Cycle d'infection des bactéries SRP de la culture de pommes de terre	12
Figure 1.2: Les différents mécanismes impliqués dans la virulence de <i>D. solani</i>	20
Figure 1.3: Les symptômes de pourriture molle observés sur les tubercules de pomme de terre	21
Figure 1.4: Evolution des symptômes de la jambe noire sur la pomme de terre	23
Figure 1.5: Symptômes de pourriture molle	25
Figure 2.1 : Microplaques de culture cellulaire contenant les disques pomme de terre	42
Figure 2.2: Microplaques de culture cellulaire recouvertes avant incubation	43
Figure 3.1 : Infection observée au niveau des lenticelles	47
Figure 3.2 : Infection du tubercule de pomme de terre à partir du stolon	47
Figure 3.3 : Symptômes de la jambe noire sur des jeunes plants de pomme de terre collectés à partir de parcelles atteintes	48
Figure 3.4: Réaction d'hypersensibilité (HR) sur feuilles de tabac 72 h après l'inoculation	50
Figure 3.5 : Activité pectinolytique sur sections de pomme de terre var. Spunta	51
Figure 3.6 : Formation des cavités sur le milieu CVP	51
Figure 3.7 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes sur le milieu GN	52
Figure 3.8: Production de l'indigoidine sur le milieu NGM	53
Figure 3.9 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de l'amplification du gène <i>pelB</i> par PCR des souches isolées	57
Figure 3.10 : Résultat du test du pouvoir pathogène sur la pomme de terre	59

Figure 3.11 : Résultat du test du pouvoir pathogène sur la tomate	60
Figure 3.12 : Résultat du test du pouvoir pathogène sur la tomate	61
Figure 3.13 : Effet de la densité d'inoculum sur la pourriture molle	62
Figure 3.14 : Effet de la densité d'inoculum sur le poids des tissus pourris	64
Figure 3.15 : Effet de la température sur la hauteur des tissus de pomme de terre macérés	66
Figure 3.16 : Effet de l'humidité sur la hauteur des tissus macérés des disques de pomme de terre inoculés	68

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
al.	collaborateurs
AHL	N-acyl-homoserine lactone
Cel	Cellulases
Cfu	unité de colonie formée
D.O	Densité optique
EDS	Eau distillée stérile
hrp	hypersensitive response and pathogenicity genes
%	pourcentage
j	jours
Log	fonction logarithmique
Pel	Pectates lyases
Pnl	Pectines lyases
Peh	Polygalacturonases
Pme	Pectines methylesterases
pH	potentiel Hydrogène
SRP	Soft Rot <i>Pectobactereaceae</i>
SRE	Soft Rot <i>Enterobactereaceae</i>
QS	Quorum Sensing
TSS	Type Secretion System
LPS	Lipopolysaccharides
PCR	polymerase chain reaction.
Var.	variété
3-oxo-C8-HL	N-3-oxooctanoyl-L-homoserine lactone
3-oxo-C6-HL	N-3-oxohexanoyl-L-homoserine lactone

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Originaire des pays des Andes dans l'ouest de l'Amérique du Sud, la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) était déjà consommée il y a plus de 8 000 ans. À la fin du seizième siècle (vers 1570), la pomme de terre a été introduite en Europe par les explorateurs espagnols comme plante ornementale, puis pour la consommation [1].

C'est une plante herbacée annuelle qui produit des tubercules très riches en amidon. Après la saison de croissance, lorsque les parties aériennes de la plante meurent, les tubercules permettent à la plante de survivre au froid et de se reproduire la saison suivante grâce aux bourgeons présents sur le tubercule [2].

La pomme de terre n'exige pas de conditions de culture particulières. Elle se cultive en temps frais où les températures optimales se situent entre 18 et 20°C. Aussi, elle est également cultivée dans les climats tempérés, subtropicaux et tropicaux. Les plants de pommes de terre sont généralement cultivés à partir de semences de pomme de terre, de petits tubercules ou de fragments de tubercules, semés à une profondeur de 5 à 10 cm dans le sol [2].

De nos jours, la pomme de terre est cultivée dans plus de 150 pays à travers le monde, elle est le plus souvent produite et consommée dans les régions développées ; telles que l'Amérique du Nord et l'Europe et ce jusqu'en 2005, date à laquelle la Chine est devenue le plus grand producteur de pomme de terre. Actuellement, l'Asie représente la principale région productrice de pomme de terre dans le monde suivie par l'Europe couvrant environ 80% de la production mondiale [2]. Cette espèce est devenue la quatrième culture agricole la plus importante au monde après le maïs (*Zea mays*, L.), le blé (*Triticum aestivum*, L.) et le riz (*Oryza sativa*, L.) [3].

Les tubercules de pomme de terre sont composés de 80 % d'eau et de 20 % de matière sèche cette dernière étant constituée de 60 à 80 % d'amidon. Les tubercules sont pauvres en matières grasses mais leur teneur en protéines est assez élevée notamment en acides aminés comme la lysine souvent déficiente dans les céréales [4]. La pomme de terre est connue

pour sa richesse en vitamine C et constitue une bonne source de vitamines B1, B3 et B6, de minéraux et d'antioxydants [5]. Ces caractéristiques font de la pomme de terre le produit végétal le plus équilibré sur le plan nutritionnel parmi les produits alimentaires de base à travers le monde [4].

Actuellement, la pomme de terre est cultivée sur plus de 20 millions d'hectares de terres agricoles dans le monde, avec une production mondiale s'élevant à 378 millions de tonnes [6]. Cette hausse de production a fait que près de 1,3 milliard de personnes consomment la pomme de terre comme un aliment de base (plus de 50 kg/personne/an), notamment dans les régions de l'Inde et de la Chine [7]. L'augmentation de la consommation humaine de la pomme de terre a fait que cette denrée était promue au troisième rang des productions végétales mondiales, après le blé et le riz [8].

La production intensive de tubercules de pomme de terre de semence augmente les risques de propagation des maladies. Les plants et les tubercules de pomme de terre sont affectés par environ cent soixante maladies, dont cinquante sont causées par des champignons, quarante maladies sont causées par des virus et dix par des bactéries, et le reste sont d'origine inconnue [9, 10].

Ces maladies peuvent avoir une incidence sur la production de pomme de terre à toutes les étapes de la croissance et de l'entreposage, elles peuvent affecter le feuillage, les tubercules ou les deux en même temps. Ainsi, elles réduisent fortement le rendement et la qualité de la récolte [11, 12]. Des travaux antérieurs ont estimé que 22% des récoltes de pomme de terre sont perdues chaque année à cause de ces maladies, ce qui équivaut à une perte annuelle de plus de 65 millions de tonnes [11, 13].

En effet, sept maladies bactériennes affectent la pomme de terre dans le monde et causent de graves dommages, en particulier sur les tubercules [7]. Le flétrissement bactérien et la jambe noire causés respectivement par *Ralstonia solanacearum* et SRP (*Pectobacteriaceae*) sont considérés comme les maladies les plus graves du point de vue économique, les pertes occasionnées touchent la culture en plein champ et peuvent s'étendre et s'aggraver lors du stockage, tandis que la pourriture annulaire (*Clavibacter michiganensis* Subsp. *Sepedonicus*) et la gale commune (*Streptomyces scabiei*) sont de moindre importance [6].

Van der Wolf et ses collaborateurs [12] estiment que de tous les agents pathogènes qui infectent la production de pomme de terre, les bactéries sont considérées comme étant le problème le plus grave. En effet, elles sont capables d'infecter les plants et les tubercules de pomme de terre à partir des blessures et des ouvertures naturelles comme les stomates, les lenticelles et les ouvertures qui se produisent pendant la formation des racines secondaires. Les voies d'introduction se font notamment par le biais des semences de pomme de terre infectées qui se propagent facilement au sein d'un lot de semences par l'intermédiaire du sol, de l'eau ou/et de machines contaminées, en particulier lors de la récolte.

L'aspect le plus grave de la pathogénèse bactérienne affectant la pomme de terre demeure qu'il n'y a pratiquement aucune possibilité de la contrôler. Car souvent, les infections sont asymptomatiques et ne sont pas détectables lors des inspections sur le terrain [11]. Notons aussi que la résistance des cultivars commercialisés est pratiquement absente et aucun produit chimique n'est efficace pour traiter les maladies d'origine bactérienne durant la culture. En outre, les mesures prophylactiques utilisées restent insuffisantes pour prévenir l'infection bactérienne des semences [12].

En Algérie, les symptômes de la pourriture molle et de la jambe noire ont été décrits sur des plants de pommes de terre de plusieurs cultivars [14, 15]. En effet, une étude réalisée par Naas et ses collaborateurs [14], ont signalé la présence de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* et *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* comme agents responsables de la pourriture molle des tubercules chez plusieurs cultivars en Algérie.

L'apparition de *Dickeya solani* comme étant le nouveau Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP) émergent en raison de son caractère invasif et agressif très élevé ainsi que sa propagation rapide dans les champs et les lieux de stockage sous différents climats à travers le monde [16-20], nous a mené à étudier sa présence éventuelle en Algérie.

Pour y parvenir, le présent travail de thèse s'articule autour de quatre grands axes :

- Identification de l'agent causal bactérien responsable de la jambe noire et de la pourriture molle dans la région d'Ain Defla par l'utilisation des tests biologiques, biochimiques et moléculaires.
- Réalisation du test de pathogénicité des souches identifiées sur une gamme de plantes hôtes.

- Etude de l'effet de la concentration de l'inoculum primaire sur le développement de la pourriture molle sur les tubercules de pomme de terre.
- Enfin, évaluation de l'importance de la variation de la température et de l'humidité sur l'expression des symptômes liés aux bactéries pectinolytiques.

CHAPITRE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES BACTERIES

PECTINOLYTIQUES DE LA POMME DE TERRE.

1 Situation de la filière en Algérie

La pomme de terre est la première culture légumière en Algérie en termes de superficie et de production . De ce fait, elle est considérée comme étant une filière stratégique, car au fil des années, elle a acquis un poids économique important notamment dans l'alimentation. La consommation de pomme de terre a été évaluée à 21,7 kg durant l'année 1966-67. Depuis, elle a augmenté et a le seuil de 115 kg/ habitant/an en 2015 pour une superficie moyenne de 100.000 ha, faisant ainsi de ce produit agricole un élément structurant de la ration alimentaire nationale [21, 22].

Ces dernières années, la superficie moyenne consacrée à la culture de la pomme de terre est passée à environ 153 000 hectares, pour un volume de production total de 4,7 millions de tonnes par an. Les régions de production de pomme de terre les plus importantes sont concentrées dans les zones méditerranéennes du Nord (Mostaganem, Mascara, Ain Défla, Tipaza, Boumerdes, Bouira et Setif) ainsi que dans une région du sud-est de l'Algérie au climat aride, en l'occurrence à El-Oued [23]. La Spunta est considérée comme la variété de pomme de terre la plus produite puisqu'elle couvre environ deux tiers de la production totale [23].

Tableau 2.1: La production de pomme de terre en Algérie [23].

Année	Superficie récoltée(ha)	Production (tons)	Rendement (ton per ha)
2009	105,121	2,636,064	25.1
2010	121,996	3,300,414	27.1
2011	131,903	3,862,198	29.3
2012	138,666	4,219,507	30.4
2013	161,156	4,886,596	30.3
2014	156,176	4,673,516	29.9
2015	153,313	4,539,577	29.6
2016	156,308	4,759,677	30.5
2017	148,822	4,606,402	31.0
2018	149,665	4,653,322	31.1

1 Les bactéries pectinolytiques, un problème alarmant de la pomme de terre.

La pourriture molle d'origine bactérienne dévaste un large éventail de cultures, de légumes et de plantes ornementales dans le monde entier. Cette maladie est causée par des espèces à Gram-négatives et à Gram-positives appartenant à divers genres tels que: *Pseudomonas* [24, 25], *Bacillus* [26, 27], *Burkholderia* [28], *Pantoea* [29], *Enterobacter* [30], *Klebsiella* [31], *Leuconostoc* [32], et *Clostridium* [33]. En effet, plusieurs espèces des genres précédemment cités, peuvent se retrouver simultanément dans les tissus végétaux en décomposition [34].

En outre et parmi les agents les plus nuisibles, les bactéries membres des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* causant les maladies de la jambe noire et la pourriture molle sur la pomme de terre sont les virulents. Ces deux genres connus sous le nom de Soft Rot *Pectobactereaceae* (SRP) [35], font partie des maladies les plus importantes de la pomme de terre, tant pour la production de semences que pour la production de pomme de terre de consommation. En raison de leur important impact économique, ces espèces ont été classées parmi les 10 agents bactériens phytopathogènes les plus néfastes [36]. En effet, les agents pathogènes SRP causent des maladies sur trois des quatre cultures les plus importantes au monde : le riz, le maïs et la pomme de terre, seul le blé étant épargné [37].

Les bactéries SRP peuvent causer des problèmes très tôt au cours de la production de semences. En effet, les semences de pomme de terre sont produites de manière clonale par multiplications végétatives successives. Ce mode de production favorise la propagation des pathogènes, en particulier pour les SRP qui peuvent passer inaperçus dans les semences lorsqu'ils infectent leurs hôtes de manière latente, sans manifester de symptômes de maladie [38].

2 Evolution de la taxinomie des bactéries SRP

Bacillus carotovorus a été décrite pour la première fois à partir des échantillons de carotte (*Daucus carota* L.) et d'autres plantes dont le symptôme était une pourriture molle en 1901 par L. R. Jones [39]. L'espèce *Bacillus atrosepticus* a été créé par la suite pour désigner les bactéries pathogènes responsables de la maladie de la jambe noire de la pomme de terre.

En 1917, le genre *Erwinia* a été classé pour la première fois comme étant un genre regroupant des espèces pathogènes pour les plantes, membre de la famille des *Enterobacteriaceae*, elle-même incluse dans le phylum des *Protéobacteria*. Ce genre comprend les espèces pectinolytiques comme *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi* ainsi que les espèces non pectinolytiques telle que *Erwinia amylovora* [40].

En 1953, Burkholder et ses collaborateurs ont classé *E. chrysanthemi* dans le genre *Erwinia* en tant qu'agent pathogène responsable de la maladie des tiges creuses sur le chrysanthème (*Chrysanthemum morifolium* L) [41]. Des études ultérieures ont montré qu'*E. chrysanthemi* provoquait des maladies sur une grande variété de plantes hôtes [42]. Quelques années plus tard, Lelliott et Dickey ont subdivisé l'espèce *E. chrysanthemi* en six pathovars sur la base de la spécificité de la plante hôte, à savoir (pv.): *chrysanthemi*, *dianthicola*, *dieffenbachia*, *paradisiaca*, *parthenii*, et *zoeae* [43].

Dès 1945, Waldee a proposé un remaniement dans la taxonomie en déplaçant les *Erwiniae* pectinolytiques vers un nouveau genre *Pectobacterium*, et ce sur la base de leur capacité à produire des enzymes pectinolytiques. Cette proposition n'a été adoptée qu'en 1998 avec le développement de l'outil moléculaire. En effet, l'analyse de l'ADNr 16S a conduit à une nouvelle reclassification et l'établissement de *Pectobacterium* et *Dickeya* comme de nouveaux genres comprenant des espèces bactériennes responsables de la pourriture molle [42, 44]. De plus, les travaux de Gardan, Gouy [45] ont abouti à la transformation de certaines sous-espèces de *Pectobacterium carotovorum* en espèces à part entière.

In fine, les *Erwinia* pectinolytiques étaient reclassifiés en deux genres, *Dickeya* et *Pectobacterium*, comprenant plusieurs espèces et sous-espèces : *Pectobacterium atrosepticum* (Pa) (anciennement *Erwinia carotovora* sous-espèce *atroseptica*), *Pectobacterium carotovorum* sous-espèce *carotovorum* (Pcc) (anciennement *Erwinia carotovora* sous-espèce *carotovora*) et *Dickeya chrysanthemi* (anciennement *Erwinia chrysanthemi*).

En 2004, une nouvelle sous-espèce de *Pectobacterium*, nommée *P. carotovorum* sous-espèce *brasiliensis*, a été identifiée comme agent pathogène associé à la pomme de terre au Brésil, puis en Afrique du sud et en Corée du sud [46]. Cette taxonomie a été largement adoptée durant plusieurs années.

Dickeya spp. et *Pectobacterium* spp. communément appelées SRE pour Soft Rot *Erwinia* et pour Soft Rot *Enterobacteriaceae* sont des Gammaproteobactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* [2]. Ce sont des bâtonnets Gram-négatif droits de 0,5-1 µm de diamètre une sur longueur variant entre 1 à 3 µm, mobiles avec flagelles péritriches, anaérobies facultatifs, nécrotrophes et non sporulantes, avec une forte activité pectinolytique [2, 42, 44].

La disponibilité des outils moléculaires et l'accessibilité des bases de données génomiques, a permis des comparaisons entières des génomes bactériens, ce qui a conduit à une réévaluation majeure de la taxonomie des bactéries pectinolytiques [37]. Adeolu, Alnajjar [35] ont reclassé la famille des *Enterobacteriaceae* en un ordre *Enterobacterales* qui comprend huit familles, dont, la famille des *Enterobacteriaceae* et la famille des *Pectobacteriaceae*, cette dernière renferme les genres *Pectobacterium* [44], *Dickeya* [42] ainsi que les genres *Lonsdalea* [47] et *Sodalis* [48] qui sont aussi des bactéries phytopathogènes.

Pectobacterium et *Dickeya* spp. anciennement dénommés "Soft Rot *Erwiniae*", puis "Soft Rot *Enterobacteriaceae*" (SRE), se dénommeraient dorénavant Soft Rot *Pectobacteriaceae* SRP [35]. Les analyses génomiques les plus récentes ont redéfini de multiples espèces appartenant au groupe des SRP, ce qui a conduit à la description actuelle de dix-neuf espèces de *Pectobacterium* : *P. actinidiae*, *P. aquaticum*, *P. aroidearum*, *P. atrosepticum*, *P. betavascularum*, *P. brasiliense*, *P. cacticidum*, *P. carotovorum*, *P. fontis*, *P. oderiferum*, *P. parmentieri*, *P. parvum*, *P. peruvienne*, *P. polaris*, *P. polonicum*, *P. punjabense*, *P. versatile*, *P. wasabiae* et *P. zantedeschiae*. Parmi ces 19 espèces, huit ont été isolées à partir de pomme de terre *Solanum tuberosum* [49]

Le genre *Dickeya* quant à lui comprend douze espèces: *D. chrysanthemi*, *D. dadantii* (subsp. *Dadantii* et subsp. *dieffenbachiae*), *D. dianthicola*, *D. zaeae*, *D. oryzae*, *D. paradisiaca*, *D. solani*, *D. fangzhongdai*, *D. aquatica*, *D. lacustris*, *D. undicola* et *D. poaceiphila* [49]. Parmi les espèces précédemment citées, six sont associées à la pourriture de la pomme de terre [42].

D. solani est considérée comme une nouvelle espèce émergente qui a été identifiée dans plusieurs pays européens [17]. D'une manière générale, les bactéries appartenant au genre *Dickeya* sont très diversifiées [50]. Divisés en plusieurs pathovars et biovars, les bactéries

apparentées à *Dickeya* provoquent des maladies sur les plantes sous les climats tempérés, tropicaux et subtropicaux [37, 51].

Tableau 1.2: Evolution de la taxinomie des SRP [46].

Ancienne nomenclature	Nomenclature proposée	Hôte	Référence
<i>Erwinia carotovora</i>			
subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Pomme de terre, tomate	Gardan <i>et al.</i> (2003)
subsp. <i>betavascularum</i>	<i>Pectobacterium betavascularum</i>	Betterave, tournesol, pomme de terre, artichaut	Gardan <i>et al.</i> (2003)
subsp. <i>brasiliensis</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	Pomme de terre	Duarte <i>et al.</i> (2004), Nabhan <i>et al.</i> (2012)
subsp. <i>carotovora</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Plusieurs hôtes	Hauben <i>et al.</i> (1998)
subsp. <i>odorifera</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	Chicorée, poireau, céleri	Hauben <i>et al.</i> (1998)
subsp. <i>wasabiae</i>	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	Raifort	Gardan <i>et al.</i> (2003)
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Pectobacterium chrysanthemum</i>		Hauben <i>et al.</i> (1998)
pv. <i>dieffenbachia</i> (2, 3)	<i>Dickeya Dieffenbachiae</i> , <i>Dickeya dadantii</i>	Plusieur hotes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>dianthicola</i> (1, 7, 9)	<i>Dickeya dianthicola</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>paradisiaca</i> (3)	<i>Dickeya paradisiaca</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>zeae</i> (3, 8)	<i>Dickeya zeae</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>chrysanthemi</i> (5, 6)	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>parthenii</i> (5, 6)	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
	<i>Dickeya solani</i> sp. nov.	Pomme de terre	Van der Wolf <i>et al.</i> (2014)

3 Répartition géographique

Les bactéries pathogènes apparentées aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sont trouvées dans différents environnements. Elles ont été isolées à partir de nombreuses plantes hôtes, sols, insectes ainsi que dans les eaux de surface et souterraines [52]. Cependant, selon les espèces, elles possèdent une faible capacité à survivre en dehors de l'association avec les tissus de la plante hôte [53].

La répartition géographique des bactéries SRP est conditionnée par leurs exigences thermiques de croissance [54]. En effet, l'espèce *P. atrosepticum*, est considérée comme l'agent principal responsable de la maladie de la jambe noire le plus répandu dans les régions tempérées en particulier en Europe et en Amérique du Nord avec un optimum de température de croissance compris entre 15 et 25°C [55]. Elle infecte quasi exclusivement la pomme de terre [45, 56] du fait que la plupart des souches de *Pa*, forment un groupe homogène et sont plus sensibles aux températures élevées que *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pcc*) et *Dickeya* spp. [57]. Toutefois, des auteurs ont pu isoler quelques souches de *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) à partir d'autres cultures telles que la tomate [45], le chou chinois et le poivron [54].

L'espèce *Pcc* est distribuée sur une aire géographique plus vaste aussi bien dans les zones tempérées que tropicales, la bactérie se développe à des températures plus élevées que *P. atrosepticum*, allant de 20 à 30 °C et peut également être isolée à partir de plantes cultivées à des températures plus élevées allant jusqu'à 40 °C. Sa gamme d'hôtes est très large regroupant la pomme de terre, le chou, le poivron, la carotte, le maïs et d'autres espèces cultivées. [55].

La propagation récente de *P. parmentieri*, et d'autres espèces telles que *P. brasiliense*, témoigne de l'expansion de la diversité et de la répartition des bactéries responsables de la pourriture molle en Europe, en Amérique du Nord, en Afrique et en Nouvelle-Zélande. Les souches de *P. parmentieri*, auparavant classées dans le groupe *Pcc* ou *P. wasabiae*, constituent aujourd'hui en moyenne 15% des espèces de *Pectobacterium* responsables de la pourriture molle et isolées à partir de pomme de terre en Europe et au Canada [10].

P. brasiliense a provoqué des pertes importantes au cours des dernières années [53]. L'agent pathogène a été découvert en premier lieu au Brésil sur la pomme de terre puis détecté sous d'autres climats chauds, y compris le Brésil, l'Afrique du Sud, le Zimbabwe, la Syrie et le Kenya [10]. Tout de même, il est également présent sous les climats tempérés [10, 19], y compris en Algérie [14]. *P. brasiliense* est considérée aujourd'hui comme l'une des SRP les plus fréquemment isolés sur la pomme de terre en Europe, où elle s'est rapidement répandue depuis sa première apparition et a largement remplacé *D. solani* dans de nombreuses régions du continent [58].

Le genre *Dickeya* quant à lui est principalement répandu dans les zones tropicales et subtropicales sur de nombreuses cultures d'intérêt agronomique telles que ; la pomme de terre, la banane, l'artichaut et le maïs, mais, aussi sur des plantes ornementales à l'exemple du chrysanthème, du saintpaulia ou de l'œillet [45, 52, 59]. Mais ces dernières années, le genre *Dickeya* a été retrouvé même dans les régions tempérées telles que ; l'Europe de l'Ouest et du Nord et notamment en Allemagne, France, Pays-Bas et Pologne [54]. Les espèces appartenant au genre *Dickeya* ont une gamme d'hôte très étendue [7]. Cependant, sur la culture de la pomme de terre, les dommages liés à la jambe noire et la pourriture molle sont principalement dus à *D. dianthicola* et *D. solani* [60]. Dans des conditions de température élevée, *D. solani* se montre plus virulente sur la pomme de terre comparée aux autres espèces de *Dickeya*.

Tableau 1.3: Répartition des espèces SRP dans le monde [10].

Pathoène	Continent
<i>D. aquatica</i> ; <i>D. lacustris</i>	Europe
<i>D. chrysanthemi</i> ; <i>D. dianthicola</i> ; <i>D. zea</i> ; <i>D. oryzae</i>	Mondiale (six continents)
<i>D. dadantii</i>	Afrique, Asie, Europe, Amérique Latine et l'Amérique du Nord
<i>D. fangzhongdai</i>	Asie, Europe
<i>D. oryzae</i>	Asie, Europe, Australie
<i>D. poaceiphila</i>	Australie
<i>D. paradisiaca</i>	Amérique Latine
<i>D. solani</i>	Asie, Europe, Amérique Latine
<i>D. undicola</i>	Asie, Europe
<i>P. actinidae</i> ; <i>P. fontis</i>	Asie
<i>P. aroidearum</i>	Afrique, Asie, Europe, Amérique Latine
<i>P. carotovorum</i> ; <i>P. brasiliense</i> ; <i>P. atrosepticum</i>	Mondiale (six continents)
<i>P. betavascularum</i>	Asie, Europe, Amérique du Nord
<i>P. odoriferum</i>	Afrique, Asie, Europe, Australie
<i>P. parmentieri</i>	Amérique du Nord
<i>P. parvum</i>	Europe, Asie
<i>P. peruvienne</i>	Europe, Amérique Latine
<i>P. polaris</i>	Europe, Afrique,
<i>P. aquaticum</i> ; <i>P. polonicum</i> ; <i>P. zantedeschia</i>	Europe
<i>P. punjabense</i>	Asie, Europe
<i>P. versatile</i>	Africa, Asie, Europe, Amérique du Nord

4 Cycle de la maladie et les mécanismes de virulence impliqués dans

l'interaction plantes-SRP

L'infection des plantes par les bactéries SRP se déroule en deux étapes: une première dite, primo-invasive ou étape passive qui comprend l'adhésion des bactéries à la surface de la plante et la pénétration dans les tissus de la plante, soit au niveau des sites de blessures, soit à travers les ouvertures naturelles telles que les stomates. La bactérie se multiplie sans macérer les tissus de la plante. Quant à la deuxième étape dite invasive, elle consiste à l'invasion des apoplastes par la synthèse d'un arsenal d'enzymes extracellulaires ce qui conduit à la dégradation des parois cellulaires végétales [43]. Ainsi que la production d'antibiotiques type carbapenem « carbapen-2-em-3-carboxylic acid » [61].

Il est à noter que les bactéries SRP peuvent résider dans les espaces intercellulaires, provoquant une infection latente sans aucun symptôme apparent [62]. Cependant, Si les bactéries rencontrent des conditions adéquates telles qu'une température favorable, des

niveaux d'humidité élevés et un faible taux d'oxygène, les symptômes de la maladie se développent [57, 59] (Figure1.2).

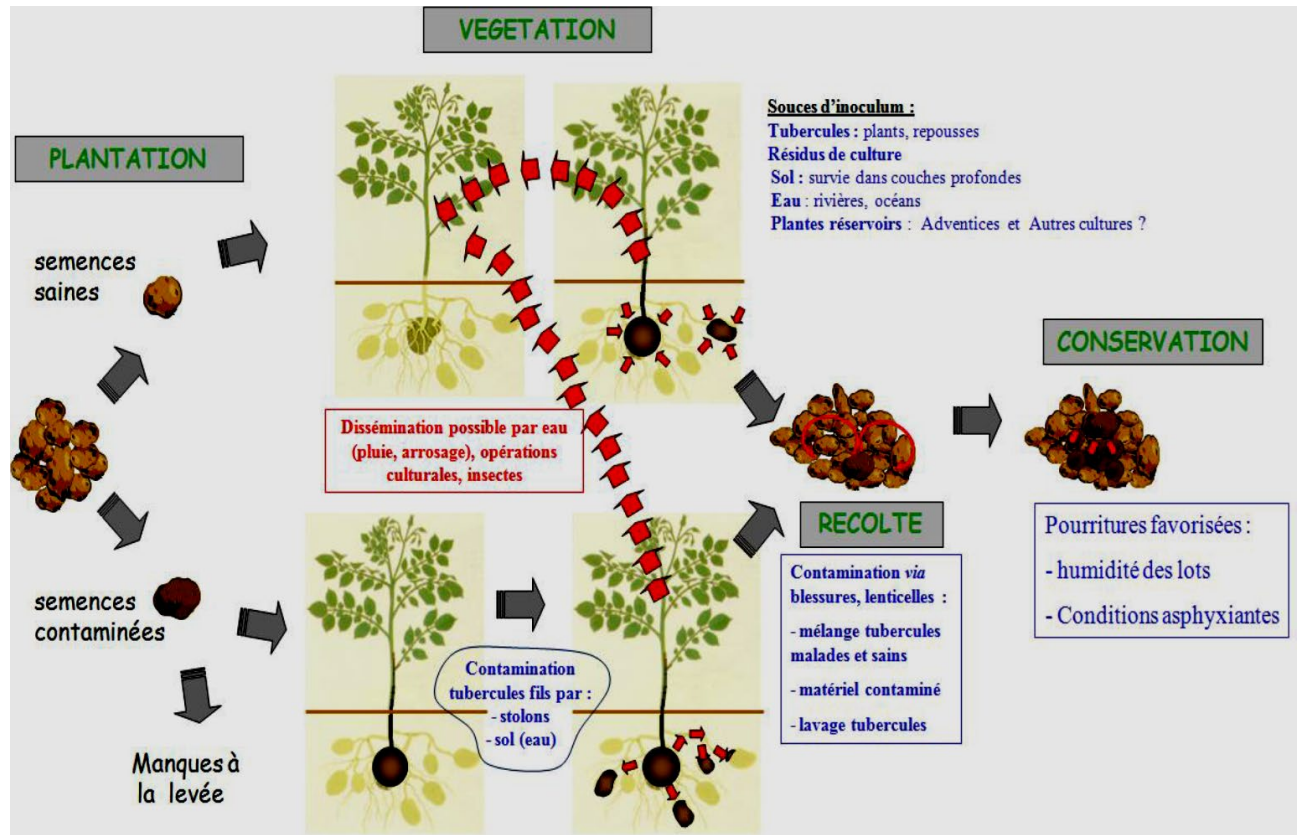


Figure 1.1: Cycle d'infection des bactéries SRP de la culture de pommes de terre [54].

Plusieurs espèces bactériennes appartenant à différents genres sont capables de causer la pourriture sur les tubercules de pomme de terre. Cependant, la pourriture molle et la jambe noire causées par *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. sont considérées comme les plus importantes [11]. Les SRP sont des agents pathogènes primaires, contrairement aux autres espèces de genres bactériens comme *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* et *Rhodococcus*. En effet, toutes ces bactéries possèdent la faculté de produire des enzymes dégradant les tissus de la plante mais qui ne sont capables de macérer les tissus qu'après que l'infection a été initiée par *Dickeya* et/ou *Pectobacterium* spp. [11].

4.1 Enzymes dégradant les parois cellulaires des plantes (PWCDE)

Pectobacterium et *Dickeya* produisent des enzymes pectiques extracellulaires variées capables de dégrader les parois cellulaires de la plante hôte, les '*Plant Cell Wall Degrading Enzymes*' (PCWDE) [54].

En effet, la principale caractéristique des bactéries SRP est leur capacité à macérer les tissus végétaux en désintégrant les parois cellulaires par un arsenal enzymatique très important, comprenant des pectinases, des cellulases, des protéases, des phospholipases et des xylanases [63]. Le résultat de cette hydrolyse multipliée entraîne une lyse cellulaire et la libération de leur contenu.

Les parois cellulaires des plantes sont composées d'un réseau de cellulose et d'hémicellulose intégré dans une matrice d'acides polysaccharidiques, appelée communément "pectine". Cette dernière est le principal polysaccharide de la paroi cellulaire primaire et de la lamelle moyenne, puisqu'elle représente environ 30 à 50 % des parois cellulaires des plantes dicotylédones [64]. Ces enzymes sont produites de façon rapide coordonnée et en grande quantité, le résultat est une macération considérable des tissus conduisant à la mort de la plante hôte.

4.1.1 Pectinases

Les pectinases regroupent les différentes enzymes qui clivent les liaisons glycosidiques des polymères pectiques pour libérer des produits insaturés importés aux cellules bactériennes, fournissant ainsi des sources d'énergie pour la croissance cellulaire, elles sont sécrétées par le système de sécrétion de Type II (T2SS) [2, 65].

Quatre types de pectinases sont connues, la pectate lyase (Pel) qui clivent les liaisons glycosidiques par β -élimination en produisant des produits insaturés; la pectine lyase (Pnl) et la pectine méthyl estérase (Pme), dont l'optimum de pH est de 8. Ces dernières agissent sur la chaîne latérale substituée de la pectine, et enfin la polygalacturonase (Peh) avec un optimum de pH faible avoisinant le 6 et qui clivent par hydrolyse en produisant des produits saturés [63]. Les Peh existent sous plusieurs formes d'isoenzymes, codées par des gènes indépendants [66].

Les pectate-lyases (Pels) sont les principales pectinases impliquées dans la pathogenèse pectinolytique. On distingue trois principaux types de PEL chez *P. atrosepticum* (PelA, B et C ou Pel-1, Pel-2, Pel-3), quatre types chez *Pcc* (PelA, B, C et D) et cinq types

chez *Dickeya* répartis en deux groupes (*PelA*, D, E et *PelB*, C) [43, 54]. Les pectates lyases clivent le polygalacturonate (PG) ou le PG partiellement méthylé, ils indiquent généralement une activité optimale à un pH basique (de 7,3 à 9,5) en présence d'un cation divalent souvent le Ca^{2+} . Toutefois, les propriétés enzymatiques peuvent différer considérablement entre les différents types de pectate lyases [43].

4.1.2 Cellulases

Les cellulases (CelZ) agissent sur la paroi cellulaire en dégradant la cellulose en glucose par l'action de trois enzymes, à savoir l'endo- β -1,4-glucanase, la cello-biohydrolase et la β -glucosidase. Secrétées selon la machinerie du système de sécrétion de Type II, son pH optimal est proche de 7, les cellulases présentent une activité de type endoglucanase (EG), qui hydrolyse la cellulose des parois cellulaires primaires et secondaires de la paroi végétale [43].

4.1.3 Proteases

De nombreuses bactéries phytopathogènes produisent des protéases (Prts). Les souches apparentées à *Dickeya* produisent des métalloprotéases types A, B, C et G [67]. Les protéases sont sécrétées dans le milieu externe *via* le système de sécrétion de type I (TSSI), dont deux, sont des précurseurs inactifs, réactivées par des cations divalents.

En dehors des SRP, de nombreuses bactéries phytopathogènes produisent des protéases. Certaines espèces de SRP produisent des métalloprotéases types A, B, C et G [67]. Les protéases sont sécrétées dans le milieu externe *via* le système de sécrétion de type I (TSSI), dont deux sont des précurseurs inactifs où elles sont activées par des cations divalents.

Les métalloprotéases peuvent jouer un rôle dans la virulence en dégradant les protéines de la paroi cellulaire végétale. Le résultat de cette dégradation permet de libérer des acides aminés pour la biosynthèse des protéines microbiennes, ou pour conduire à la dégradation des protéines de la plante hôte associées à la résistance (PR) [68].

4.2 Motilité

Les bactéries phytopathogènes sont mobiles par le biais de flagelles, les gènes codant pour les protéines flagellaires contribuent à la virulence et aux interactions hôte-pathogène,

y compris dans le cas de l'interaction entre les SRP et la pomme de terre [69]. Chez les SRP, la motilité est considérée comme le deuxième déterminant de la virulence après les enzymes extracellulaires [70], car elle apparaît nécessaire pour l'invasion et l'infection des plants de pomme de terre [59]. L'eau libre est essentielle pour le développement optimal de la maladie, elle permet aux cellules bactériennes de se déplacer plus facilement dans le tissu végétal. De plus, elle joue un rôle important dans la contamination des tissus des tubercules au niveau des lenticelles dans les sols humides [59].

Chez la souche *D. dadantii* 3937, l'analyse de la virulence des mutants a indiqué que la motilité et la chimiotaxie jouent un rôle important dans la pathogénicité envers plusieurs plantes hôtes, tels que ; la chicorée, le saintpaulia et la pomme de terre [71]. Antúñez-Lamas, Cabrera-Ordóñez [71] ont conclu que *D. dadantii* a une forte réponse chimiotactique à l'acide jasmonique, qui est produit par les tissus blessés et qui pourrait permettre aux cellules bactériennes de se déplacer vers les blessures de la plante et de faciliter l'invasion systémique.

4.3 Les sidérophores

Les sidérophores sont de petites molécules chélatrices de fer dont la taille peut atteindre environ 1200 daltons, produites par les micro-organismes ayant une très forte affinité pour l'ion ferrique et dont la fonction est de rendre le fer assimilable par l'organisme qui le produit. Le fer complexé au sidérophore est acheminé dans la cellule par un système de transport très spécifique qui le rend disponible pour les besoins cellulaires à la suite d'une étape de réduction du complexe [72].

En effet, l'absorption du fer est une étape cruciale liée à la pathogénicité des SRP. Ce dernier est un cofacteur essentiel aux enzymes impliquées dans d'importantes fonctions cellulaires [43]. Les bactéries du genre *Dickeya* régulent l'expression des gènes en réponse au manque au fer. Par exemple, une faible disponibilité en fer est un signal qui déclenche la transcription des gènes codant pour les principales enzymes pectinolytiques types pectate-lyases PelD et PelE, ainsi que des gènes qui sont impliqués dans le transport du fer. Cette régulation est assurée par le répresseur transcriptionnel Fur (Ferric Uptake Regulator) [73].

4.4 Les Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des complexes macromoléculaires présents de manière constitutive dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif. Les

LPS sont constitués d'un lipide A doté de propriétés toxiques et qui correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif et d'une partie polysaccharidique spécifique débordant la membrane externe et constituant l'antigène O (OPS), responsable de la spécificité antigénique O, qui permettent de décrire les sérovars au sein d'une même espèce bactérienne [74].

Les bactéries à Gram négatif élaborent des mécanismes qui modifient la structure des lipides A à différents environnements. Ces modifications peuvent promouvoir la résistance contre les peptides antimicrobiens [75]. Chez les SRP, les LPS fournissent une protection contre les substances antimicrobiennes de la pomme de terre [59].

4.5 La régulation de la virulence par le quorum sensing (QS)

Le *quorum sensing* (QS) est un mécanisme de régulation et de communication cellule-cellule dépendant de la densité cellulaire des populations contrôlant l'expression de certains gènes bactériens, notamment des gènes de virulences [70]. Ce système de communication bactérien reposant sur l'émission et la perception de signaux diffusibles, a été évoqué pour la première fois par *Fuqua, Winans* [76] pour décrire la luminescence chez la bactérie marine *Vibrio fischeri*. Il implique deux protéines essentielles, LuxR (le récepteur du signal) et LuxI (l'enzyme responsable de la synthèse du signal) pour la communication intercellulaire, ce qui permet l'expression des gènes de virulence lorsque le quorum bactérien est atteint.

Les bactéries utilisant le QS produisent et secrètent des signaux appelés auto-inducteurs comme la N-acyl-homoserine lactone (AHL), qui diffusent librement dans l'environnement. Lorsque la concentration de ces signaux atteint un seuil, ils sont perçus et fixés par des récepteurs spécifiques. Le complexe ainsi formé, active la transcription de certains gènes incluant ceux responsables de la synthèse des AHLs [77].

Le QS régule la production des enzymes extracellulaires PCWDE et la motilité qui sont les principaux facteurs déterminants de la virulence des bactéries SRP [70]. En effet, lorsque la multiplication bactérienne atteint un certain seuil (quorum), des molécules signales type N-AHL diffusent au travers de la membrane cellulaire dans le milieu et leur concentration devient suffisamment élevée pour être perçue par les bactéries comme un signal d'activation de la synthèse des PCWDE [50, 70].

Chez *Pectobacterium*, au moins deux systèmes QS existent et sont définis par la nature des signaux chimiques impliqués. Les N-AHL de type 1 (3-oxo-C6-HSL), synthétisés par des protéines homologues à LuxI et le signal Auto-Inducteur de type 2 (3-oxo-C8-HSL) qui est synthétisé par un homologue à LuxS (Barnard *et al.*, 2007 ; Galloway *et al.*, 2011). Ce système AHL-QS est au sommet d'une cascade de régulation contrôlant plus d'un quart des gènes des *Pectobacterium* spp., y compris les facteurs clés de virulence, tels que les enzymes PCWDE et la production de protéines effectrices HrpN, protéines sécrétées par le système de sécrétion de type III (T3SS) [78].

Des résultats de recherche ont conclu que chez *Pcc* la production des PCWDE est réduite après mutation dans la protéine homologue à LuxS. Par conséquent, la virulence des mutants *Pcc* sur tubercules de pomme de terre est diminuée [54]. En revanche, le système QS de *D. dadantii* 3937, basé sur l'AHL, ne joue pas un rôle essentiel dans le contrôle de la densité cellulaire de l'expression des gènes de virulence *in vitro* ou *in planta* [70].

Outre le système AHL-QS, un nouveau système de communication a été découvert chez *D. dadantii* 3937, appelé Virulence Factor Modulating (Vfm) ou modulation des facteurs de virulence [79]. Le groupe Vfm ne semble pas être répandu parmi d'autres espèces bactériennes, il est même absent chez certaines bactéries pectinolytiques telles que le genre *Pectobacterium* contrairement à *Dickeya* sp. où il est très conservé et contrôle la transcription des gènes liés à la production des enzymes PCWDE [43].

4.6 Les systèmes de sécrétion et leurs rôles dans la virulence

Les bactéries de la pourriture molle ont développé plusieurs stratégies pour coloniser l'apoplaste et surmonter la résistance de l'hôte. Parmi ces mécanismes, les systèmes de sécrétion jouent un rôle clé dans la virulence des bactéries SRP en particulier chez *Dickeya* spp. où ils sont très conservés. Ces systèmes permettent le ciblage efficace des facteurs de pathogénicité dans l'environnement extracellulaire. Les fonctions des protéines sécrétées sont variables, elles comprennent les protéases type sérines, les lipases, les cytotoxines, les invasines et les adhésines qui influencent simultanément sur la fitness bactérienne, l'agrégation, la formation de biofilm et la virulence [43].

Le système de sécrétion de type I (T1SS) ; sécrète des protéases du cytoplasme vers l'espace extracellulaire en une seule étape. Ce système a été étudié en détail chez *Dickeya*

spp., il est impliqué dans la sécrétion d'exoenzymes et d'autres facteurs de pathogénicité. Alors que le système de sécrétion de type II (T2SS) sécrète des protéines à travers la membrane externe en deux étapes. Ce système est impliqué dans la sécrétion de protéases, de lipases et d'autres facteurs de virulence.

Le système de sécrétion de type III (T3SS) et ses effecteurs jouent un rôle crucial dans l'interaction bactérie-plante. Le T3SS est essentiel pour la virulence et est responsable de la sécrétion et de la translocation des harpines dans la cellule végétale. Chez le genre *Dickeya*, ces protéines sont des facteurs d'agrégation qui contribuent à l'adhésion du pathogène à la plante hôte. Le T3SS est également impliqué dans la délivrance du DspE, le seul effecteur connu codé par *P. atrosepticum* qui est nécessaire pour une virulence complète sur la pomme de terre [2].

Le système de sécrétion de type IV (T4SS) est unique dans sa capacité à transporter des acides nucléiques en plus des protéines entre les cellules bactériennes et entre les bactéries et les cellules eucaryotes. Ce système est impliqué dans la sécrétion de facteurs de virulence et le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques [80]. Une étude menée par Golanowska et ses collègues [51] a révélé que T4SS est impliqué dans la sécrétion d'une protéine appelée VirE2, qui est importante pour le transfert d'ADN entre les cellules bactériennes chez *D. solani*. Cela suggère que T4SS joue un rôle important dans la virulence de *Dickeya* en facilitant le transfert de facteurs de virulence et d'autres matériaux génétiques. Chez *P. atrosepticum* SCRI1043, des travaux ont conclu qu'une mutation dans le T4SS réduisait sa virulence sur la pomme de terre [81].

Le Système de sécrétion de type V (T5SS) quant à lui a des structures relativement simples, il est divisé en deux types T5aSS-T5eSS sur la base de différences dans la structure et le mécanisme de sécrétion [82]. Les fonctions des protéines sécrétées par le T5SS sont variables, comprenant des protéases à sérine, des lipases, des cytotoxines, des invasines et des adhésines qui influencent sur la fitness bactérienne, l'agrégation, la formation de biofilms et la virulence [2, 82]. Les systèmes de sécrétion de type V (T5SSs) ont également été impliqués dans un phénomène appelé inhibition de la croissance par contact, où, au contact, des protéines toxiques sont ciblées sur une autre bactérie [2]. Chez *Dickeya dadantii*, une protéine ayant une homologie avec les adhésines a été montrée comme étant nécessaire pour l'adhérence bactérienne à la surface des feuilles, l'agrégation des bactéries et l'incitation à la

mort des cellules hôtes. Cela suggère que T5SS est impliqué dans sa virulence et sa pathogénicité [83].

Le Système de sécrétion de type VI (T6SS) est le plus récemment décrit parmi les bactéries Gram négatives [43]. Il a été démontré que ce système joue un rôle important dans la pathogénicité à l'égard des cellules hôtes eucaryotes notamment la sécrétion de toxines effectrices antimicrobiennes, des phospholipases et les hydrolases du peptidoglycane [84].

Des travaux ont démontré que chez *P. atrosepticum*, les gènes codant pour le T6SS sont induits en réponse aux extraits de pomme de terre, alors que la souche *P. wasabiae* SCC3193 possède deux T6SS et un grand nombre d'homologues [43, 85].

5 *Dickeya solani*, un nouveau pathogène émergent

Dickeya solani est considéré comme l'un des phytopathogènes bactériens les plus importants au monde, il produit un large spectre d'enzymes dégradant les cellules végétales (PCWDE), notamment des pectinases, des cellulases et des protéases, qui sont sécrétées par les systèmes de sécrétion de type I (T1SS) et de type II (T2SS). Comme chez les autres bactéries SRP, ces enzymes extracellulaires constituent des facteurs clé de virulence permettant la prolifération de la bactérie dans les tissus végétaux, libérant ainsi les nutriments des cellules mortes [2].

L'émergence rapide et la propagation écologique de *D. solani* dans les environnements naturels a été associée à son agressivité accrue dans un large éventail de températures, combiné aussi à sa capacité à produire des sidérophores, des antioxydants (indigoidine), des enzymes antioxydantes (catalases, superoxyde dismutases, peroxydases), des peptides antimicrobiens, de multiples métabolites secondaires bioactifs (oocydine A, zéamine, solanimycine). Ajouté à ces facteurs de virulence, des effecteurs toxiques sécrétés par le système de sécrétion de type VI (T6SS) permettant potentiellement à la bactérie d'inhiber ou de tuer ses concurrents [86] (Figure 1.3).

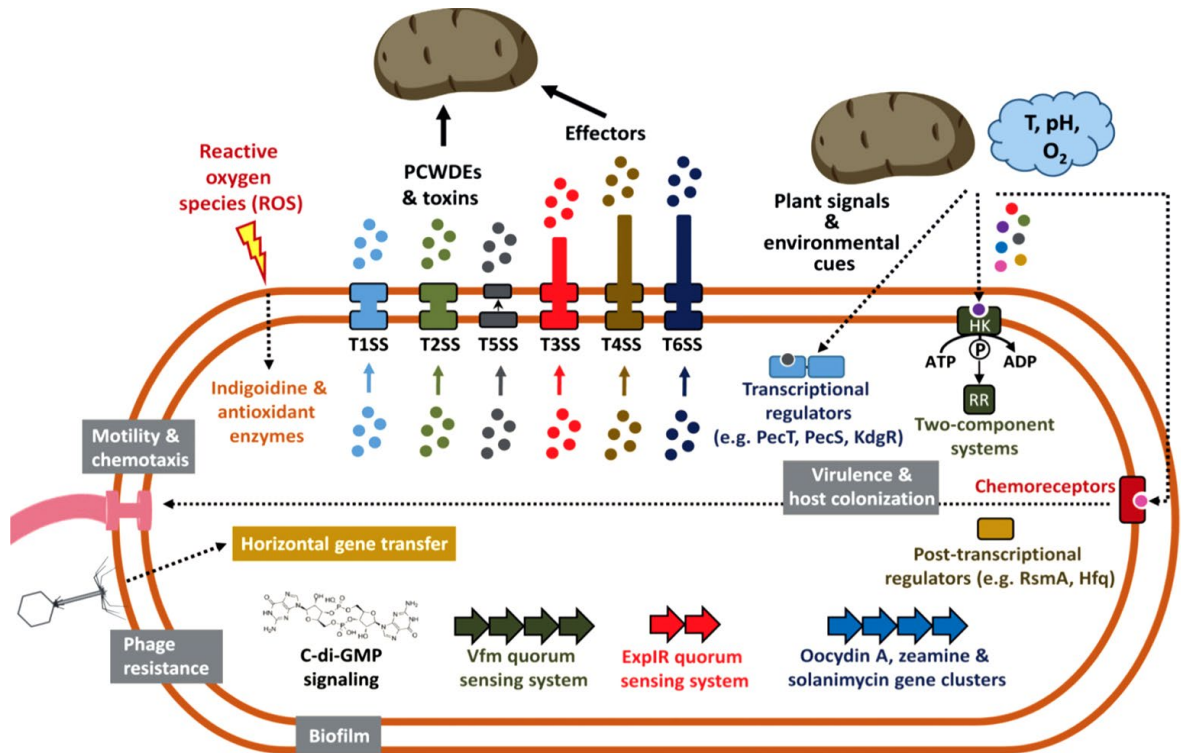


Figure 1.2: Les différents mécanismes impliqués dans la virulence de *D. solani* [86].

En effet, l'expression des déterminants de la virulence et des groupes biosynthétiques d'antibiotiques est modulée par divers régulateurs, dont deux systèmes différents de détection du quorum à savoir le système ExpIR et le système Vfm [86].

D. solani héberge une combinaison unique de groupes de gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires qui peuvent faciliter son établissement et sa prédominance chez la pomme de terre. En outre, le génome de *D. solani* contient un groupement de gènes responsable de la production d'une toxine similaire à la bactériocine, lui permettant ainsi d'inhiber la croissance des espèces de *Pectobacterium* précédemment dominantes [2]. La présence de ce nouveau groupe de gènes pourrait expliquer le caractère invasif de *D. solani* et renforcer sa capacité à coloniser et à dominer l'environnement de la pomme de terre.

Depuis sa découverte en Europe dans les années 2000 [2] dans les cultures de pommes de terre, où elle a émergé en remplaçant *Dickeya dianthicola*, jusqu'à devenir dominante. *D. solani* s'est propagée aux régions productrices de pommes de terre du monde entier, y compris en Amérique du Nord et du Sud, en Asie, en Afrique et en Australie [20, 87, 88].

Sa propagation mondiale a été facilitée par le commerce international de plants de pomme de terre. La bactérie est considérée comme très agressive et provoque des pertes de récolte plus importantes que certains autres agents pathogènes de la pourriture molle. En effet, les rendements peuvent être réduits de 50 à 80% dans les cultures de pommes de terre infectées [38].

6 Symptomatologie de la pourriture molle sur la pomme de terre

6.1 Au champ

Les infections bactériennes peuvent débuter au niveau des lenticelles, se produire suite à des blessures ou à la colonisation des tubercules *via* le talon. En conditions favorables d'humidité, la bactérie dégrade les tissus du tubercule provoquant une macération du parenchyme. La pourriture molle, d'aspect granuleux et de couleur claire, peut brunir jusqu'au noircissement. La production de poches gazeuses au sein des tissus pourris est à l'origine d'une odeur nauséabonde très prononcée [54].

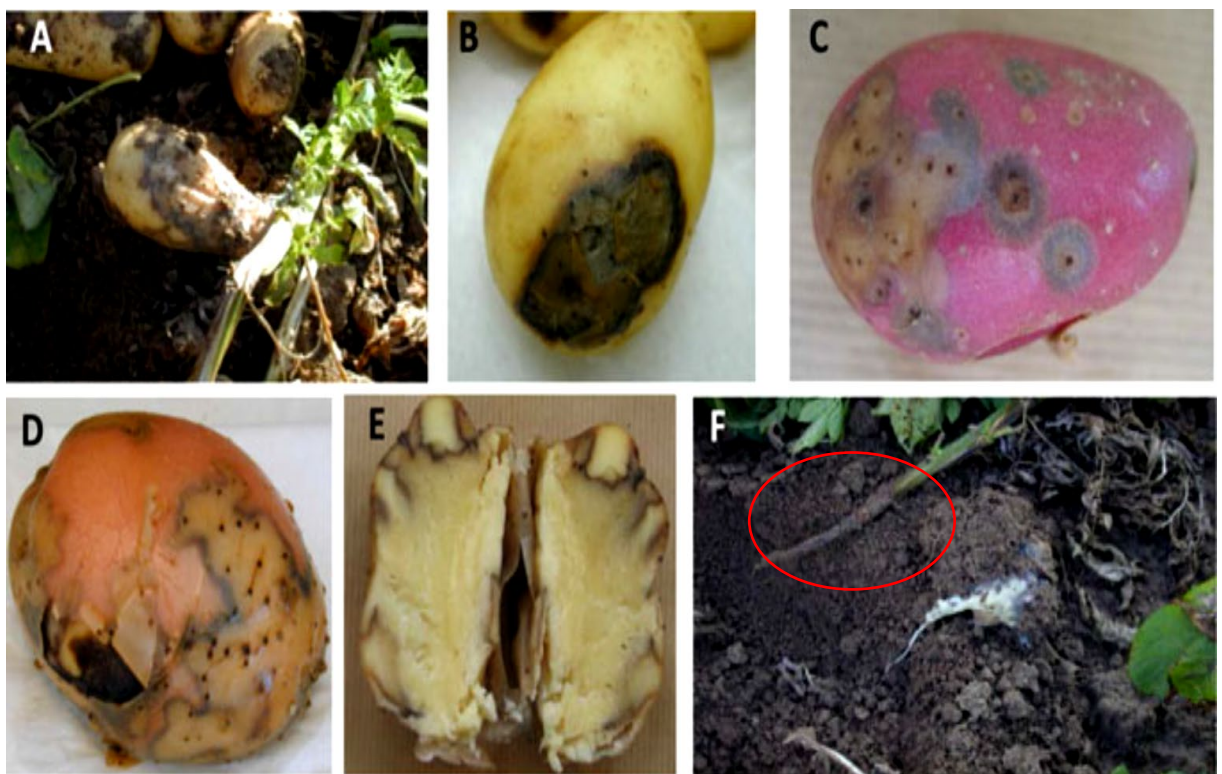


Figure 1.3: Les symptômes de pourriture molle observés sur les tubercules de pomme de terre [89].

- (A) et (B) pourriture de l'extrémité du stolon provenant du tubercule mère infecté;
(C) pourriture des lenticelles due à la propagation de bactéries dans les tubercules à partir du sol;
(D) and (E) état avancé de pourriture des tubercules fils au cours de la végétation ou en stockage.
(F) liquéfaction totale du tubercule mère en végétation.

6.2 En conditions de stockage

La pourriture molle demeure la plus importante maladie bactérienne de la pomme de terre à l'échelle mondiale et les pertes économiques qui lui sont reliées peuvent être particulièrement importantes [90]. Lors du stockage, *Pa*, *Pcc* et *Dickeya* peuvent être présents séparément ou simultanément au sein des symptômes de pourriture molle et humide sur tubercules de pomme de terre [54]. La maladie peut se propager en entrepôt à partir de quelques tubercules infectés au champ [3]. Lorsque les conditions sont humides, la pourriture peut s'étendre à tout le lot causant ainsi des dégâts très importants. Un seul tubercule pourri est capable de contaminer 100 kg de tubercules avoisinantes [54].

Cependant, des chercheurs ont indiqué la présence d'autres bactéries pectinolytiques telles que *Clostridium*, *Bacillus* et *Pseudomonas* et qui peuvent être associées à la pourriture des tubercules en conservation, particulièrement lorsque les températures sont élevées [91]. Un séchage adéquat des tubercules peut toutefois bloquer leur développement. Les symptômes sont alors qualifiés de pourritures lenticellaires [92].

6.3 Symptomatologie de la jambe noire

La jambe noire est la maladie provoquée par les bactéries SRP à savoir les espèces apparentées aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sur les plants de pomme de terre en cours de végétation [54]. Le symptôme le plus caractéristique de la jambe noire de la pomme de terre est une lésion de pourriture noire, humide et visqueuse, qui s'étend du tubercule mère pourri jusqu'aux tiges, surtout en conditions humides [11].

La sécrétion de facteurs de virulence, tels que les enzymes pectinolytiques, conduit à la dégradation de la paroi des cellules végétales provoquant la macération des tissus. Ces phénomènes provoquent alors l'interruption du transport de l'eau et des éléments minéraux, vers le sommet de la plante, conduisant à des symptômes de flétrissement et de jaunissement du feuillage [93].

Des études antérieures ont montré que les *Dickeya* sp. colonisent initialement le xylème pour se répandre dans l'ensemble de la plante [94]. En été, en cas de pluies

persistantes, une pourriture étendue des tiges commençant par le sommet et progressant vers la base, peut se développer et être même confondue avec celle de la jambe noire qui sont généralement causées par *Pcc* [95] (figure 1.5).

L'apparition et la nature des symptômes dépendent essentiellement des conditions environnementales (température, humidité). Les manques à la levée résultant de la pourriture précoce du tubercule de semence ou de l'attaque des germes avant ou lors de l'émergence, peuvent s'observer rapidement après la plantation [96].

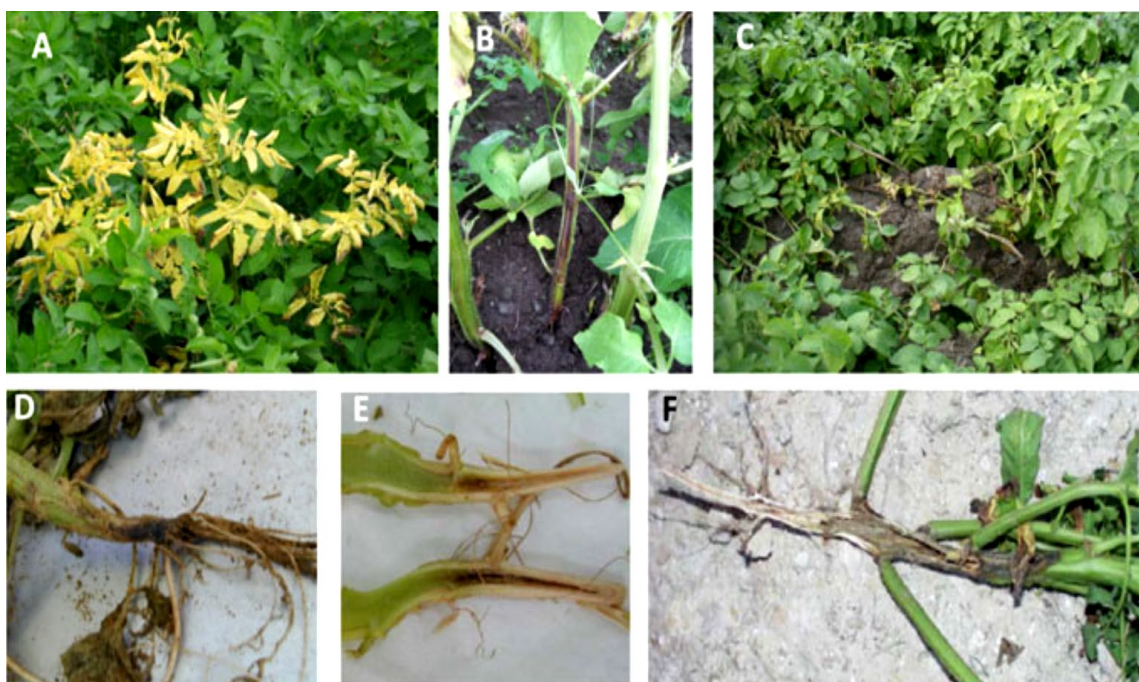


Figure 1.4: Evolution des symptômes de la jambe noire sur la pomme de terre [89].

- A. Le jaunissement constitue le premier symptôme de la jambe noire.
- B. Pourriture de la tige.
- C. Flétrissement des plants .
- D. Nécrose basale
- E. Brunissement des tissus vasculaires de la base de la tige.
- F. Tiges creuses, particulièrement sous climats chauds et en réponse à *Dickeya* spp.

L'infection provoque une pourriture molle de la tige de couleur allant du brun foncé au noir. Le symptôme de jambe noire associé au pourrissement du tubercule, se situe en

général à la base des tiges mais peut aussi atteindre des parties supérieures de la plante en causant des nécroses foliaires plus ou moins sèches.

Cependant, certains symptômes peuvent porter à confusion. En effet, les symptômes de flétrissement peuvent ressembler à ceux provoqués par *Ralstonia solanacearum*. Alors que d'autres symptômes de jambe noire avec aspects secs et limités à la partie souterraine de la tige, peuvent être confondus avec les nécroses causées par *Rhizoctonia solani*.

6.4 Symptômes observés sur d'autres cultures

Les bactéries SRP produisent un arsenal d'enzymes extracellulaires type PCWDE qui leur permettent de macérer et de pourrir les tissus parenchymateux d'une large gamme de plantes hôtes [89]. Elles peuvent infecter le matériel végétal directement ou après une attaque initiée par d'autres ravageurs et agents pathogènes [97]. Les cultures à reproduction végétative comme les pommes de terre ou les œillets *Dianthus caryophyllus* peuvent être systématiquement infectées dès le début du cycle de production. Dans les cultures où la reproduction est différente, les lésions de pourriture molle apparaissent d'abord sur les parties aériennes de la plante. Des symptômes similaires ont été observés sur les cultures récoltées, telles que les légumes charnus et à feuillus [55, 89].

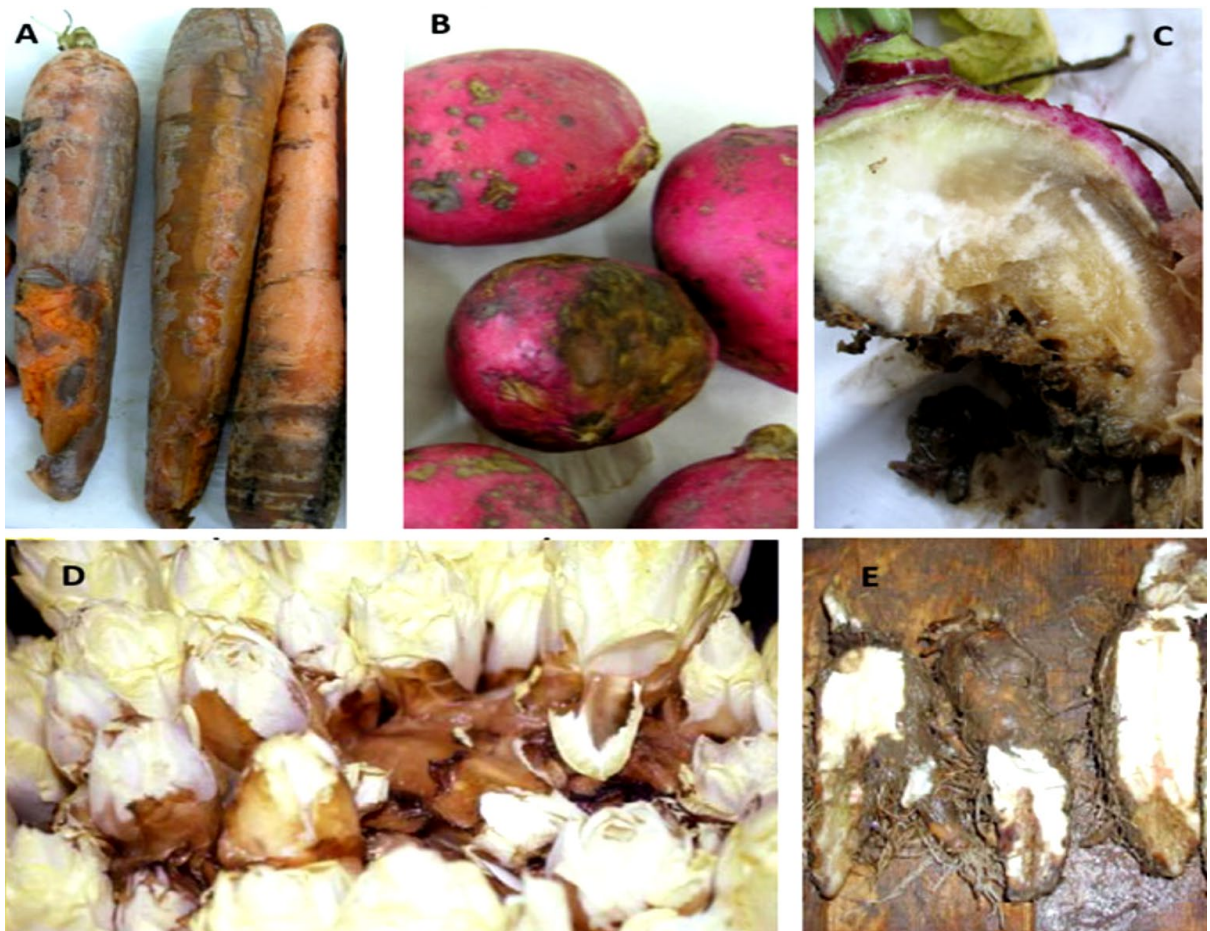


Figure 1.5: Symptômes de pourriture molle observés sur (a) carotte, (b) radis, et (d) feuilles ou (e) racine d'endive [89].

7 Facteurs favorisant l'infection

7.1 Le tubercule mère

Le tubercule mère est considéré comme le facteur le plus important jouant un rôle dans la conservation, la transmission et la dissémination des espèces des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* [54]. Au champ, un tubercule mère infecté peut suite à sa décomposition, contaminer les plantes voisines *via* le sol. La propagation des agents phytopathogènes peut également s'effectuer verticalement à partir des tubercules vers la tige, en provoquant le symptôme de jambe noire [59, 94]. La contamination des tubercules fils peut également se produire à partir du tubercule mère infecté *via* les stolons, à travers le système vasculaire [54].

7.2 Température

La progression de la pourriture molle est particulièrement rapide lorsque les températures sont élevées. La température optimale de croissance des bactéries SRP en moyenne est de 28°C, mais la croissance, bien que lente, peut se poursuivre à des températures aussi basses que 1 à 2°C [98]. De plus, les dommages causés en végétation par le froid peuvent prédisposer les cultures à la colonisation et à la pourriture bactérienne [91]. La température du sol semble avoir quant à elle un effet sur la survie des bactéries. Selon [91], *Pa* et *Pcc* meurent rapidement dans un sol dépassant les 25°C, alors qu'elles peuvent survivre plusieurs semaines, voire plusieurs mois, à des températures avoisinant 10 à 20°C.

7.3 Humidité

Le principal facteur contribuant à l'essor de la maladie est la présence d'humidité. En effet, les maladies causées par les SRP sont fortement influencées par la présence d'eau libre au site d'infection. Leur survie et reproduction sont favorisées par des surfaces mouillées nécessaires à la motilité et par voie de conséquence à la virulence et la population diminue rapidement lorsque la surface s'assèche [99].

Les conditions d'anaérobiose rencontrées en cours de culture ou de stockage affaiblissent la résistance de l'hôte, notamment en diminuant la synthèse de composés phénoliques et radicaux libres ou augmentant la perméabilité membranaire [59]. De même, l'eau libre entraîne le maintien des conditions d'anaérobiose aux alentours des tubercules [100]. Elle favorise également le déplacement des *Pectobacterium* et *Dickeya* vers les tissus de l'hôte notamment, les lenticelles qui peuvent s'ouvrir en conditions d'humidité saturante, ou de blessures [54].

7.4 Influence du pH

Quand les SRP infectent les plantes, elles colonisent dans un premier temps le fluide intercellulaire apoplastique dont le pH variant entre 5 et 6.5 [101]. Dans les étapes les plus avancées de la colonisation, les bactéries induisent la lyse des cellules végétales en provoquant une alcalinisation du milieu. Des chercheurs ont indiqué que lors de l'infection par *Dickeya chrysanthemi*, les feuilles de chicorée passent d'un pH acide à basique car la synthèse des *Pels* est affectée par le pH qui peut donc jouer un rôle important dans leurs production lors de l'infection [101].

Les gènes *PelA* et *PelD* sont plutôt exprimés en milieu acide alors que *PelE* est transcrit à pH alcalin. Ces résultats suggèrent que *PelA* et *PelD* seraient importants lors des étapes précoces de l'infection quand le pH environnant est acide et inversement, *PelE* serait nécessaire lors des étapes plus tardives de l'infection lorsque le pH devient basique [43]. Ainsi, le pH pourrait être responsable d'une production séquentielle des Pels au cours de l'infection. Cependant, le mécanisme de régulation de l'expression des gènes *Pel* en réponse au pH est inconnu [74].

7.5 Carence en oxygène et en azote

Bien que la synthèse des pectinases, plus spécialement les pectates lyases augmente en condition de semi-anaérobiose, chaque gène répond différemment à la limitation en oxygène [65].

Le taux d'oxygène influence fortement le développement de la maladie, il est à l'origine des conditions d'anaérobiose qui se forment à la surface du tubercule favorisant ainsi l'initiation du processus de macération par le pathogène [57]. Ainsi la maladie est plus sévère si la concentration en oxygène est faible [57]. De plus, un local de stockage peu aéré va favoriser le développement de la maladie [89].

Plusieurs travaux ont indiqué qu'une carence en azote inhibait l'expression de l'ensemble des gènes codant pour les pectates lyases [102]. Alors qu'une respiration anaérobiose en présence de nitrate, se trouvant en quantité suffisante dans les tissus végétaux, faciliterait la prolifération bactérienne. Ces résultats ont permis de conclure que les fertilisants azotés favoriseraient le développement de la pourriture molle, à l'inverse d'une carence en azote [65].

7.6 Le sol et la rhizosphère des plantes

Les propriétés physico-chimiques du sol peuvent influencer l'expression de la maladie et favoriser la contamination des tubercules ou des plantes mais aussi modifier les équilibres microbiologiques [54]. En effet, la texture du sol est étroitement liée à la capacité de rétention de l'eau, elle influence le taux d'humidité du sol [46].

Les sols ayant une forte capacité de rétention d'eau (argilo-humiques) favorisent les conditions humides nécessaires au développement bactérien. En présence d'atmosphère asphyxiante, les sols compacts favorisant l'humidité sont propices au développement des

bactéries pectinolytiques se trouvant à proximité des racines (rhizosphère) en accroissant ainsi les risques d'infection [103].

Plusieurs études ont rapporté que la présence des *Dickeya* et *Pectobacterium* dans le sol et la rhizosphère était liée à la disponibilité des nutriments provenant de la dégradation des débris végétaux et des exsudats racinaires des plantes hôtes. En effet, la viabilité de ces micro-organismes diminue fortement dès qu'ils se retrouvent dissociés des tissus de leurs plantes hôtes [46].

7.7 Les pratiques agricoles comme facteurs de contamination

Le passage de machines agricoles dans les parcelles en cours de culture constitue un facteur de dissémination des bactéries. La plantation, le défanage, la récolte puis le conditionnement mécanique des tubercules sont autant de facteurs de propagation des pathogènes sur la pomme de terre. Ils peuvent être le point initial de contamination au sein des stocks de plants qui serviront de semences l'année suivante [54].

L'effet des précédents culturaux peut avoir un rôle dans la contamination des cultures de pommes de terre. Les cultures de *Brassicaceae* (brocoli, colza, rutabaga, navet et chou) sont reconnues comme hébergeant souvent les *Pa* et *Pcc* et à des niveaux relativement élevés [96]. Elles ont également été isolées à partir de rhizosphères des plantes adventices [54]. En outre, le lavage des tubercules avant leur commercialisation peut favoriser la dissémination de la bactérie dans les lots de pomme de terre lorsque l'eau servant au lavage n'est pas renouvelée ou décontaminée [57].

8 La lutte contre les bactéries pectinolytiques

La lutte actuelle se base essentiellement sur l'utilisation de mesures prophylactiques visant à diminuer la quantité et la dissémination du pathogène *via* les semences et les machines agricoles, afin de limiter les dégâts enregistrés [60, 104]. Bien qu'il n'existe pas de variétés de pomme de terre totalement résistantes au SRP, certaines semblent être moins sensibles au SRP que d'autres [105]. L'attention se porte donc de plus en plus sur les facteurs biologiques qui influencent la résistance à la maladie [105].

8.1 La prophylaxie

La maîtrise de la maladie nécessite l'utilisation de semences saines, issues d'un schéma rigoureux de certification couplée à la mise en place d'itinéraires de culture pour diminuer l'incidence de la maladie [59]. Le choix d'un sol bien drainé ou ayant fait l'objet d'un travail du sol permettant leur assèchement est une mesure bénéfique pour réduire l'humidité excessive autour des tubercules plantés [54].

Le nettoyage et la désinfection des machines utilisées lors de la plantation, la pulvérisation, le défanage, la récolte et le calibrage, sont autant de pratiques qui contribuent à réduire les risques d'introduction de bactéries au sein des cultures et en stockage [59].

Les conditions de stockage sont également un paramètre important pour prévenir la pourriture des tubercules, mais aussi pour éviter le risque d'accroître la charge bactérienne potentielle autour des tubercules qui présenterait ainsi un risque accru de développement ultérieur de maladies. Il est donc essentiel de sécher les tubercules après la récolte [54].

8.2 La lutte chimique

Les stratégies de lutte chimique utilisées contre les maladies bactériennes sont plutôt curatives que préventives. Par conséquent, elles reposent principalement sur l'éradication de l'agent pathogène. Une fois que la maladie soit déclarée, sa maîtrise est limitée voire impossible en raison de la multiplication rapide des bactéries et l'incapacité des produits chimiques à pénétrer au sein des tissus internes [46].

Une large gamme de composés chimiques a été testée pour réduire/éradiquer l'infection superficielle des tubercules par *Pectobacterium* et *Dickeya*. Les composés organiques tels que l'hydroxyquinoleine et le 5-nitro-8-hydroxyquinoleine se sont avérés efficaces pour le contrôle de la pourriture molle dans les tubercules de pomme de terre blessés, de même que des composés à base de chlore [46].

Des essais *in planta*, ont montré que plusieurs composés chimiques tels que l'acetate d'aluminium et le benzoate de sodium ont une efficacité significative contre le développement de la pourriture molle sur les tubercules de pomme de terre au moment du stockage [106].

8.3 Fertilisation des plantes et résistance à la maladie

Le Calcium (Ca) joue un rôle important dans la résistance des plantes contre les agents pathogènes bactériens, car une teneur élevée en calcium dans les tissus végétaux est souvent

positivement liée à une résistance contre les maladies bactériennes, y compris la jambe noire de la pomme de terre [54]. En effet, les ions calcium améliorent la structure et l'intégrité des composants de la paroi cellulaire de la plante contre les PEL des *Pectobacterium* et *Dickeya* [52, 97].

D'autre part, le niveau d'azote (N) semble être un autre facteur qui peut affecter la sensibilité à des agents pathogènes, dont ceux initiateurs de la pourriture molle. Des niveaux élevés d'azote réduiraient de façon significative la bactériose causée par *Dickeya* [54].

8.4 Perturbation de la signalisation *quorum-sensing*

Tous les phénomènes visant à perturber la communication QS sont appelés *Quorum-Quenching* (QQ). L'implication du système QS dans la modulation de l'expression des facteurs de virulences chez *Petobacterium* et *Dickeya* spp. est à la base du développement de plusieurs stratégies de lutte biologique. Ces méthodes de lutte ciblent ce mécanisme de communication bactérien afin d'affaiblir la virulence de ces pathogènes. Chez l'espèce non-pathogène *Rhodococcus erythropolis*, la stimulation de la croissance grâce à l'apport de gamma caprolactone a permis une dégradation accrue des NAHL impliqués dans la régulation des facteurs de virulence et une diminution des symptômes de jambe noire et de pourriture molle [46]. Les bactéries du genre *Bacillus* possèdent un gène codant pour l'enzyme AiiA, une NAHL lactonase, qui bloque l'expression du pouvoir pathogène *via* la dégradation enzymatique des molécules signal[107].

8.5 La lutte biologique

L'absence de moyens de luttés physico-chimique efficaces et agréées contre la pourriture molle et la jambe noire conduit à renforcer et étudier de nouvelles méthodes de lutte efficaces et écologique, pour réduire les niveaux d'inoculum et ralentir la multiplication et la transmission de la maladie [104]. Les stratégies de lutte biologique contre les agents de la pourriture molle et la jambe noire reposent sur le principe de les maintenir sous un seuil jugé acceptable sans chercher à l'éradiquer. Elles comprennent l'utilisation d'antagonistes qui affectent les populations de pathogènes *via* l'antibiose, [46].

Dans le cas de l'antibiose, l'agent antagoniste produit des substances antibactériennes capables de limiter le développement du pathogène. Les *Pseudomonas* spp. constituent un groupe d'un grand intérêt en lutte biologique en raison de leur capacité de développement dans la rhizosphère et à leur production d'une large variété de métabolites tels que des

antibiotiques et des sidérophores. Les bactéries productrices de sidérophores entrent ainsi en compétition avec les phytopathogènes présents dans la rhizosphère [46]. En effet, des souches de *Pseudomonas* fluorescents appliquées à des tubercules ont été capables de réduire l'incidence de la pourriture molle et de la jambe noire [108]. Le pouvoir protecteur de ces souches est lié à la production du 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), un métabolite antimicrobien, et de sidérophores [46].

Les bactéries lactiques représentent aussi un groupe potentiel utilisé en lutte biologique capables de produire plusieurs composés tels que des acides organiques, les sidérophores ou le peroxyde d'hydrogène qui permettent d'inhiber la croissance des *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. [104]. Des souches de *Bacillus* spp. testées sur *Pectobacterium* spp. ont réduit significativement les symptômes de pourriture molle sur les disques de pomme de terre [109]. De même, la souche *B. subtilis* BS107 a été testé *in vitro* et a montré une activité antagoniste vis à vis de plusieurs phytopathogènes y compris *Pectobacterium* et *Dickeya* [46].

A l'heure actuelle, Le nombre des travaux présentant de nouvelles souches potentielles de biocontrôle contre le SRP est en accroissement continu. Cependant, très peu d'études ont été menées au champ pour prouver la capacité des antagonistes à réduire l'incidence de la maladie. Par conséquent, leurs formulation et application en tant que produits commerciaux efficaces contre les maladies causées par les SRP demeure limités sur le terrain [46]. Jusqu'à présent, un seul produit biopesticide est commercialisé basé sur une souche non pathogène de *P. carotovorum*. Développé au Japon, il est homologué sous le nom de BIOKEEPER® pour la protection des plantes cultivées [13].

CHAPITRE II :

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Ce travail est réalisé dans le but de mettre en lumière la présence de certaines bactéries phytopathogènes sur la pomme de terre en plein champ et en conditions de stockage.

1 Zone d'étude

Durant la période de 2016 à 2018, des tubercules et des tiges aériennes de pomme de terre *Solanum tuberosum* provenant de trois cultivars différents, à savoir Spunta, Desirée et Ultra, présentant des symptômes de pourriture molle et/ou de jambe noire, ont été prélevés aléatoirement en plein champ et dans des entrepôts destinés au stockage de la pomme de terre dans différentes localités de la wilaya d'Ain Defla (36° 15' 50.58" Nord, 1° 58' 4.44" Est) à savoir : Djelida , Djendel et El Abadia (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Coordonnées des régions d'étude localisées dans la wilaya de Ain Defla.

Région	Position GPS
Djendel	36.2216368252345, 2.4140282977832968
Djelida	36.20753062611366, 2.0768871387870402
Al Abadia	36.27613798229185, 1.6913138153473752

Une collecte des échantillons a été effectuée dans deux parcelles de pomme de terre, la première située à Djendel et la seconde à Djelida. Les parcelles sont d'abord inspectées visuellement pour identifier les plants présentant les symptômes liés à la présence des SRP à savoir, flétrissement, jaunissement des feuilles et brunissement du collet.

Afin d'obtenir des échantillons symptomatiques représentatifs, un total de 10 échantillons de plants de pomme de terre par parcelle a été prélevé. Ces derniers, sont par la suite emballés individuellement dans des sachets en plastique. Chaque sachet est étiqueté en mentionnant la date du prélèvement, le lieu, ainsi que la variété de pomme de terre. Les échantillons sont ensuite conservés au frais à 4°C de manière à pouvoir effectuer un isolement dans les prochaines 48h .

En ce qui concerne les points de stockage, trois entrepôts stockant des pommes de terre dans des palox ont fait l'objet d'une inspection, respectivement situés dans les villes d'Al Abadia, Djendel et Djelida (Tableau 2.2). Dans chaque entrepôt, dix tubercules présentant des symptômes de pourriture molle avec tissus mous à consistance granuleuse, couleur variant du crème au brunâtre, et la présence d'odeur nauséabonde caractéristique ont été collectés à des fins d'analyse. Chaque échantillon de tubercule douteux a été placé individuellement dans un sac plastique étiqueté avec le nom de l'entrepôt, la date et le lieu

Tableau 2.2 : Echantillons symptomatiques de pomme de terre prélevés en plein champ et dans les entrepôts de stockage dans la wilaya d'Ain Defla.

Régions	El Abadia		Djendel		Djelida	
Symptômes	Pourriture molle sur tubercule (entrepôt)		Pourriture molle sur tubercule (entrepôt)	Jambe noire sur tige (parcelle)	Pourriture molle sur tubercule (entrepôt)	Jambe noire sur tige (parcelle)
cultivars	Spunta	Désirée	Spunta	Ultra	Spunta	Désirée
Année de prélèvement	2017	2017	2017	2018	2018	2016

2 Isolement et purification

L'isolement bactérien a été réalisé à partir d'échantillons de plants et de tubercules de pomme de terre collectés puis conservés.

A partir des plants de pomme de terre présentant des symptômes de jambe noire, de nécroses noirâtres humides observées à la base des tiges, de petits segments ont été obtenus en excisant les marges entre les tissus infectés et sains au niveau des tiges symptomatiques.

Concernant les tubercules de pomme de terre à pourriture molle issus des entrepôts, ils ont été d'abord lavés à l'eau courante du robinet, désinfectés en surface par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant deux minutes, puis rincés à deux reprises dans l'eau distillée stérilisée (EDS). De petites sections ont été prélevées à partir des tissus mous infectés au niveau de la marge des lésions.

Les segments obtenus (tiges et tubercules) ont été placés séparément dans de l'eau distillée stérile, puis écrasés à l'aide d'un pilon afin de libérer les cellules bactériennes des tissus végétaux dans la solution d'isolement. Les tissus écrasés sont laissés à macérer en solution pendant 10 -20 minutes. A l'aide d'une anse stérile, des gouttelettes de suspensions obtenues sont déposées sur des boîtes pétri contenant le milieu de culture Cristal Violet Pectate (CVP) [110] et incubées à 27°C pendant 48-72 h.

La sélection des colonies repose sur l'observation de la formation des cavités sur le milieu CVP, ce qui est considérées comme un signe de la présence d'une activité pectinolytique. les colonies sont par la suite transférées dans des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) pour incubation à 27°C pendant 48h, une série de repiquage successif est effectuée afin de s'assurer de la pureté des isolats bactériens étudiées pour purification [111]. Ces derniers étant purs sont conservés dans des tubes inclinés contenant le milieu GN et maintenus à 4°C pour des études ultérieures.

3 Caractérisations biologiques

3.1 La réaction d'hypersensibilité

Les isolats bactériens formant des cavités profondes sur le milieu CVP considérés comme des SRP_like, sont sélectionnés pour le test d'hypersensibilité (HR). Ce dernier a été effectué sur le tabac *Nicotiana tabacum* cv. White Burley. Pour chaque isolat, trois feuilles du tabac sont injectées par infiltration sous épidermique avec 50 µl de suspension bactérienne de concentration 10^8 cfu.ml⁻¹. Les plants inoculés sont transférés en serre à température ambiante [112]. Le témoin négatif consiste à infiltrer de l'eau distillée stérile au niveau du limbe foliaire.

Les plants ont été examinés de 24 à 48 heures après l'inoculation. Un résultat positif consiste en la présence d'une zone nécrotique indiquant le pouvoir pathogène des isolats bactériens testés. Trois répétitions ont été réalisés.

3.2 Mise en évidence de l'activité pectinolytique

La pectine est un glucide complexe contenu dans la paroi cellulaire du tubercule de pomme de terre. Les SRP sont connus pour produire des pectinases ; Le test est réalisé sur des tubercules de pomme de terre *Solanum tuberosum* sains de la variété Spunta. Les tubercules sont rincés à l'eau courante puis désinfectés avec une solution d'hypochlorite de calcium à 4 % pendant une heure, suivie de trois rinçages dans l'eau distillée stérile. Après rinçage, ces tubercules sont pulvérisés avec de l'alcool éthylique à 70 % et laissés sécher sous la hotte à flux laminaire.

Les tubercules ainsi désinfectés sont découpés en tranches de 15 mm d'épaisseur à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Pour chaque tranche de pomme de terre, un creux de 5 mm² est percé au centre avec un scalpel stérile, 50 µl de la suspension bactérienne (10⁸ cfu.ml⁻¹) est versé dans le puits ainsi formé. Les tranches de pomme de terre ainsi inoculées, sont placées dans des boîtes de Pétri contenant un papier filtre stérile préalablement humidifié avec de l'EDS [59].

Trois tranches de pommes de terre sont inoculées par isolat, constituant ainsi trois répétitions. L'eau distillée stérile a été appliquée sur la surface de trois tranches de pomme de terre percées de la même manière en guise de témoin négatif. Les tranches inoculées ainsi que les témoins négatifs sont incubées à 28 °C pour une durée de 2 à 3 jours. L'essai a été répété trois fois [112].

4 Caractérisation biochimique des isolats SRP-like obtenus

Les tests biochimiques sont effectués selon le protocole décrit par [59]. L'identification biochimique des isolats regroupe les tests suivants : la solubilité au KOH, la croissance sur gélose nutritive à 37 °C, l'absence de production de pigment fluorescent sur le milieu King B, la croissance sur milieu NGM, la tolérance à la salinité à 5% de NaCl, la production de substances réductrices à partir du saccharose, la production d'indole, la liquéfaction de la gélatine et l'activité oxydase et catalase. Pour l'ensemble des tests, les colonies sont âgées de 24 à 48h. le témoin négatif consiste en l'utilisation de l'EDS.

4.1 Le test au KOH

Ce test se base sur les propriétés de la paroi des bactéries à Gram négatif. Cette dernière est lysée par l'hydroxyde de potassium contrairement à la paroi des bactéries à Gram positif qui n'est pas détruite. Le test se réalise de manière rapide, avec une pipette Pasteur, une colonie bactérienne est prélevée puis placée au contact d'une goutte de la solution de KOH à 3% [113]. Après avoir homogénéisé la culture dans le KOH, la bactérie est considérée Gram négatif, s'il y a formation d'un filament visqueux. Ce dernier n'est pas observé chez une bactérie à Gram positif [114].

4.2 La production de pigments fluorescents

Ce test est réalisé par ensemencement en stries, des colonies sur le milieu King B puis incubés à 27°C pendant 48h. La production de pigments fluorescents est révélée par la présence d'une couleur verdâtre diffusible sur le milieu gélosé de King B dans une pièce noire sous lampe à lumière UV [111].

4.3 Croissance sur milieu NGM

Le milieu NGM (Nutritive Glycérol Manganèse) est utilisé comme un milieu de croissance spécifique pour différencier le genre *Dickeya* du genre *Pectobacterium*. En effet, les *Dickeya* sont identifiés sur la base de leurs capacités à produire l'indigoidine, un pigment bleu insoluble dans l'eau [115]. Les colonies sont ensemencées en stries dans des boîtes pétri contenant le milieu NGM puis incubées à 28°C pendant 2 à 3 jours, la présence du genre *Dickeya* est indiquée par la formation de stries de couleur brunâtre à bleuâtre, tandis que les autres SRP gardent l'aspect clair crémeux.

4.4 Le test de croissance à 37°C

Ce test est réalisé par ensemencement de cultures bactériennes sur le milieu GN. Le résultat est observé 2 à 7 jours après incubation. Ce dernier est considéré comme étant positif s'il y a apparition de colonies bactériennes sur le milieu [59].

4.5 Le test sucrose

Cette réaction sert à déterminer si la bactérie transforme le sucrose en une substance réductrice. Pour y parvenir, une culture bactérienne de chaque isolat est déposée à l'aide d'une anse stérile sur le bouillon RS [111]. Après 24 h d'incubation, 2.5ml de réactif de Bénédict est

ajouté dans chaque tube. Ces derniers sont amenés sur une plaque chauffante pour observation. Un changement de la couleur indique que la réaction est positive [111].

4.6 Le test indole

Ce test est utilisé pour indiquer la capacité de la bactérie à produire de l'indole à partir de l'acide aminé tryptophane. Une culture bactérienne âgée de 24h est déposée sur le bouillon d'indole à l'aide d'une anse stérile. A la suite de l'incubation, trois gouttes de réactif de Kovac's sont ajoutées, la formation d'un anneau rouge en surface indique la production d'indole à partir du tryptophane par la bactérie [116].

Les isolats bactériens sont ensemencés sur un milieu à base de gélatine par pique centrale et mise à incubation à 27 °C pendant 7 jours. Les tubes sont placés par la suite au froid à 4°C pendant 30 minutes. Un résultat positif se traduit par une liquéfaction du milieu contrairement au résultat négatif où le milieu reste solide [111].

4.7 Le test oxydation/fermentation

La réaction oxydation/fermentation est utilisée pour différencier entre la voie fermentative et la voie oxydative des bactéries. Une culture bactérienne âgée de 24h est ensemencée sur le milieu semi solide de Hugh & Leifson [117]. Les tubes sont incubés à 27°C pendant 72h, la présence de couleur jaune indique la fermentation du glucose par la bactérie [111].

4.8 Le test catalase

Il permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) en eau et en oxygène [118]. Sur une lame sèche et stérile, une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les colonies bactériennes âgées de 24 h sont déposées dans la goutte de peroxyde d'hydrogène. Après 2 minutes, la présence de bulles d'air révèle le dégagement d'oxygène indiquant une réaction positive de la catalase [119].

4.9 Le test oxydase

Ce test permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome C oxydase dans la membrane plasmique. Les bactéries qui possèdent une telle enzyme peuvent oxyder des

composés chimiques comme le dihydro-chlorure de tetraméthyl-p-phénylènediamine [118]. Sur un papier filtre stérile imprégné d'une solution aqueuse de N,N diméthyl-paraphénylène diamine, une culture bactérienne âgée de 24h est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Le développement instantané d'une couleur violacée indique la présence de l'enzyme oxydase tandis que l'aspect incolore révèle que la réponse est négative [120].

4.10 Liquéfaction de la gélatine

Les souches bactériennes sontensemencées sur un milieu à base de gélatine. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les tubes sont placés à 4°C pendant 30 minutes. Un résultat positif est indiqué par l'hydrolyse de la gélatine [111].

4.11 Le test de tolérance à la salinité

Ce test est effectué pour connaître le niveau de tolérance de la bactérie à la salinité. Pour chaque isolat, une colonie bactérienne estensemencée en stries dans le milieu de culture Luria Bertani contenant 5% de NaCl [111]. La présence d'une croissance bactérienne indique une tolérance aux sels, alors qu'une sensibilité aux sels est indiquée par une absence de croissance bactérienne [121].

5 Caractérisation des *Dickeya* spp. en biovars

La détermination des isolats bactériens en biovars est réalisée en utilisant la caractérisation biochimique décrite par Palacio-Bielsa, Cambra [122] et Sławiak, van Beckhoven [123]. Les isolats ont été testés pour leur capacité de croissance à des températures de 39°C et 41°C sur bouillon nutritif [124], l'hydrolyse anaérobique de l'arginine et enfin la production d'acide à partir des certains matières organiques comme source de carbone.

5.1 Le test Arginine dihydrolase

Ce test sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine par l'enzyme arginine dihydrolase. La recherche de cette enzyme est effectuée sur le milieu Moeller [125] additionné de 10g d'arginine [126].

Dans un tube contenant 2 ml de milieu, un volume de 15 µl de suspension bactérienne est déposé à l'aide d'une micropipette stérile puis recouverte par une couche de glycérol stérile (100 µl par tube) afin d'obtenir les conditions d'anaérobie. Les tubes sont mis à incubation à

25°C pendant 10 jours. Le milieu devient jaune orangé s'il y a eu une transformation de l'arginine par l'enzyme [111, 118].

5.2 Production d'acide à partir de certaines sources de carbone

La production d'acide est testée en utilisant le milieu de culture Ayers, Rupp and Johnson (ARJ) [127] et en ajoutant une source de carbone à raison de 5%. Si la bactérie est capable de métaboliser la source de carbone, elle produira de l'acide qui acidifiera le milieu de culture. La production d'acide peut être détectée en utilisant un indicateur colorimétrique de pH tel que le rouge de phénol. Si le milieu de culture devient jaune, cela indique une acidification due à la production d'acide [123]. Les sources de carbone utilisées sont le sucrose, l'arabinose, le glucose, le mélibiose, le raffinose, le gentibiose, le tartrate et le mannitol.

Le milieu de base ci-dessus décrit en présence de la source de carbone estensemencé par l'ajout de 15µl de suspension bactérienne de concentration 10^8 cfu.ml⁻¹ et incubé à 25°C pendant 3 à 5 jours. Une réponse positive se traduit par un virage de couleur du rouge au jaune. Les tests ont été répétés deux fois [122].

6 Identification moléculaire des SRP par la Réaction de polymérisation en Chaîne

PCR

L'identification moléculaire des souches bactériennes pectinolytiques s'est effectuée selon le protocole établi par Czajkowski, Perombelon [128]. Les cellules de la colonie suspecte ont été prélevées à partir des boîtes contenant le milieu CVP puis mises en suspension dans 50 µl de NaOH à 5 mM. Les suspensions sont bouillies pendant 5 minutes à 95 °C afin de dénaturer les protéines, puis placées immédiatement dans la glace pendant 1 à 2 minutes.

L'identification moléculaire a été réalisée en Pologne (Department of Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk).

La détection par PCR des *Dickeya* spp. a été réalisée en utilisant les amorces ADE1/ADE2 **ADE1:** 5'GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT3' et **ADE2:** 5'CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC3' [129]. Ces amorces ont été utilisées pour amplifier une région spécifique du gène pectate lyase (pelB) de *Dickeya* spp. La taille du fragment encadrée par ces deux amorces est de 420pb.

Dans notre cas, quatre souches SRP préalablement identifiées par voie biologique et biochimique ont été utilisées pour être amplifiées avec ce couple d'amorces. Pour les besoins du test, la souche *D. solani* IPO2222 a été utilisé comme témoin positif dans les procédures d'amplification par PCR [123, 130]. Le témoin négatif consiste en un tube Eppendorf contenant le milieu réactionnel et de l'eau ultrapure à la place de l'ADN bactérien.

6.1 Mélange réactionnel et programme du thermocycleur

La procédure de PCR utilisée dans cette étude a été réalisée en utilisant un thermocycleur Bio-Rad modèle T100. Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume total de 50 µl, contenant : 1 µl de cellules lysées, 37,7 µl d'eau Milli Q, 5 µl de tampon 10x avec MgCl₂, 5 µl de dNTP à 2 mM, 0,5 µl de chaque amorce et 0,3 µl de Taq polymérase (2U/µl). L'eau distillée stérile (EDS) a été utilisée comme témoin négatif (NC) à la place de la suspension bactérienne.

Le mélange résultant est soumis au programme PCR qui consistait en une étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles, dont chacun avec 60 secondes à 94 °C pour la dénaturation, 2 minutes à 72 °C pour l'hybridation des amorces et 10 minutes à 72 °C pour l'extension. Les amplifias ont ensuite été incubés à 4 °C.

6.2 Révélation des résultats de l'amplification

Les amplifias ont été détectés par électrophorèse, ils sont transférés sur un gel d'agarose à 1,5 % pour être colorés avec 5 mg. ml⁻¹ de bromure d'éthidium et visualisés sous lumière UV [11]. Le 100 pb est utilisé comme échelle pour apprécier la taille des fragments amplifiés.

7 Le test du pouvoir pathogène

Le test de pathogénicité est réalisé pour évaluer la capacité des souches bactériennes pectinolytiques à reproduire les symptômes décrits sur les échantillons sur les plantes hôtes choisies. Les souches bactériennes identifiées par PCR ont été testées sur différentes plantes solanacées, à savoir : la pomme de terre (*Solanum tuberosum* cv. Spunta), l'aubergine (*Solanum melongena* cv. Galine F1) et la tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Saint Pierre).

Le choix des espèces végétales est établi sur le fait qu'elles constituent les principales plantes hôtes affectées par la maladie, de plus, ce sont des cultures couramment cultivées en Algérie. Pour chaque souche testée, une suspension bactérienne est préparée à 10⁸ cfu.ml⁻¹ issue de cultures jeunes de 24 h.

Les plantes âgées de cinq semaines sont inoculées au niveau de la tige par injection de 20 µl de suspension bactérienne à l'aide d'une seringue stérile au niveau de la tige. Les sites d'injection sont recouverts de vaseline pour éviter la dessiccation de l'inoculum. Pour chaque espèce végétale, trois répétitions sont faites, soit, trois plantes par souche ont été inoculées. Les plantes hôtes considérées comme témoins négatifs sont inoculées avec de l'eau distillée stérile (EDS). Les plantes sont inspectées visuellement et comparées aux témoins correspondants, chaque semaine, afin de détecter l'apparition de symptômes typiques sur la partie aérienne.

8 Recherche de la densité optique pour le calcul de la quantité d'inoculum

La densité cellulaire de l'inoculum bactérien a été déterminée par spectrophotométrie en comparant la densité optique (DO) des suspensions à la courbe de référence. Les courbes de référence ont été établies par des séries de dilutions et des comptages sur plaques et la correspondance entre la DO à 600 nm et la densité d'Unités Formant une Colonie (UFC) cfu.ml⁻¹ (Krimi, et al, 2016 ; Pérombelon M.C.M., 2002).

9 Etude des facteurs favorisant la maladie

De nombreux facteurs influent sur le développement et la sévérité des symptômes liés à la présence de *D. solani*, l'un des agents responsables du flétrissement bactérien. Toutefois, la concentration de l'inoculum initial reste la clé déterminante de la gravité de la maladie induite par ces souches bactériennes. Il est donc essentiel d'évaluer l'impact de ce paramètre. D'autre part, les facteurs environnementaux comme la température et l'humidité sont des paramètres primordiaux influençant le développement et la sévérité des symptômes de flétrissement bactérien provoqués par *D. solani*.

L'ensemble des tests réalisés ont été effectués *in vitro* sur des tubercules de pomme de terre sains de la variété Spunta. Les tubercules sont soigneusement rincés à l'eau courante puis désinfectés avec une solution d'hypochlorite de calcium à 4% pendant 1 heure. Les tubercules sont ensuite rincés trois fois avec de l'eau distillée stérilisée pour éliminer l'excès du désinfectant.

L'expérimentation est réalisée dans des microplaques de cultures cellulaire contenant douze puits organisés en quatre colonnes et trois lignes (Costar, boîte de culture cellulaire) Pour chaque microplaque, douze disques de 25 mm de diamètre et de 15 mm de hauteur de pomme de terre sont aseptiquement découpés à l'aide d'un emporte-pièce stérile et placés dans la microplaque [109, 131].

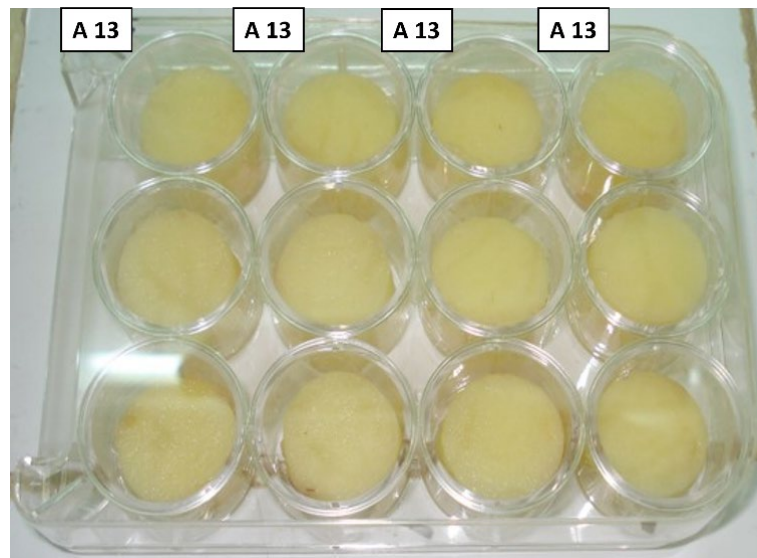


Figure 2.1 : Microplaques de culture cellulaire contenant les disques pomme de terre.

Les souches bactériennes utilisées pour ces tests à savoir, la concentration d'inoculum, l'effet de la température et l'effet de l'humidité, sont celles qui ont été identifiées par PCR soit un total de quatre souches. Une souche a été inoculée par microplaque ; les lignes sont considérées comme des répétition soit trois répétitions ce qu'il fait un nombre total de douze traitements par souche. Le témoin négatif consiste à inoculer les disques de pomme de terre avec de l'EDS. Chaque microplaque testée y compris le témoin, est recouverte de parafilm puis incubée à 28 °C pendant 72 heures (Figure 2.2).



Figure 2.2: Microplaques de culture cellulaire recouvertes avant incubation.

9.1 Effet de la variation de la concentration de l'inoculum primaire sur le développement de la pourriture molle

L'effet de la densité de l'inoculum a été réalisé pour évaluer l'impact de la concentration bactérienne comme source d'inoculum primaire sur le développement de la pourriture molle causée par les souches pectinolytiques identifiées. Deux densités d'inoculum sont choisies pour effectuer ce test, une concentration à 10^2 cfu.ml⁻¹ comme faible densité et une seconde à densité 10^6 cfu.ml⁻¹ comme moyenne densité [56].

Pour chaque concentration, une microplaque par souche bactérienne est utilisée. A l'aide d'une micropipette, les disques de pomme de terre sont inoculés avec 20 µl de suspension bactérienne préparée à partir de culture jeune de 24-48h.

Après incubation, des mesures de l'activité de la macération ont été appliquées suivant le model établi par [100]. L'estimation des tissus de pomme de terre pourris (Qtp) a été calculé selon la formule suivante :

$$Q_{tp} = P1 - P2 \text{ où,}$$

P1 : le poids (en grammes) du disque de pdt inoculé avant incubation

P2 : le poids du même disque de pdt inoculé après incubation après avoir retiré les tissus macérés.

La quantité d'eau perdue (Q_{ep}) est également calculée par la formule suivante :

$$(Q_{ep}) = E1 - E2,$$

E1 : le poids (en grammes) du disque de pdt non inoculé avant incubation.

E2 : le poids (en grammes) du disque de pdt non inoculé après incubation.

Enfin, les deux formules sont utilisées pour calculer le poids net du tissu de pdt pourri (P_{ntp}) = $Q_{tp} - Q_{ep}$.

9.2 Effet de la température

L'effet de la température est effectué en mesurant la capacité des souches bactériennes testées à macérer les disques de pomme de terre à différentes températures. Pour chaque souche bactérienne, Les disques de pomme de terre sont inoculés avec 20 μ l de suspension bactérienne à 10^8 cfu.ml⁻¹, puis incubés à différentes températures (10°C, 20°C et 35°C) pendant 72 heures. La hauteur de la macération tissulaire a été mesurée en mm après incubation pour estimer l'effet de la température sur la capacité de la bactérie à ramollir les tissus de pomme de terre.

9.3 Effet de l'humidité relative

L'effet de l'humidité relative a pour objectif d'évaluer l'aptitude des souches isolées à développer la pourriture molle sur les disques de pomme de terre à différents taux d'humidité relative. Pour chaque souche, les disques de pomme de terre sont inoculés avec 20 μ l de suspension bactérienne à 10^8 cfu.ml⁻¹. Les microplaques sont déposées dans des dessiccateurs à température ambiante contenant des solutions saturées en sels pour maintenir les différents niveaux d'humidité relative à tester (50%, 86% et 100%). Après 72 heures, la hauteur des tissus macérés est mesurée pour noter l'effet de l'humidité relative.

10 Analyse statistique des résultats

Les résultats des différents tests de macération (effet de la densité d'inoculum, effet de la température et effet de l'humidité) ont été soumis séparément à une analyse de la variance à un facteur (One- way ANOVA) avec ($P = 0,05$). La comparaison et le classement des moyennes des différents facteurs analysés a été effectué par le test de Student-Newman-Keuls (SNK).

Le test de **Newman-Keuls** est réalisé pour la constitution des groupes homogènes basée sur la plus petite amplitude significative. Chaque moyenne est affectée d'une lettre, les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes.

Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel statistique R [132] en utilisant les packages Agricolae [133], ggplot2 [134].

CHAPITRE III :

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

CHAPITRE III: RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1 Description des échantillons symptomatiques collectés

Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés dans trois zones distinctes : El Abadia, Djendel et Djelida. Dans tous les entrepôts visités, des tubercules de pomme de terre atteints de pourriture molle ont été observés. Quant aux inspections sur le terrain, elles ont permis de recueillir des échantillons présentant des symptômes de maladie, probablement attribuables à la jambe noire.

L'ensemble des tubercules examinés montrent des signes de détérioration ce qui les rend non commercialisables, les symptômes varient en intensité d'un tubercule à l'autre, certains étant plus sévèrement atteints que d'autres. Cela suggère différents stades de progression de la maladie. Les tubercules présentent des lésions superficielles qui sont visibles, certaines apparaissant humides, ce qui est caractéristique de la pourriture molle bactérienne avec une texture molle et flasque, typique de la décomposition des tissus. Certains semblent avoir perdu leur forme originale, indiquant une dégradation avancée des tissus internes. Des zones de décoloration allant du brun clair au brun foncé sont observées. Ces zones de décoloration sont irrégulières et s'étendent sur une grande partie de la surface des tubercules.

Il est à noter qu'aucun signe de sporulation fongique n'a été observé, ce qui est cohérent avec une pourriture molle d'origine bactérienne plutôt que fongique. Ces symptômes sont très caractéristiques de la pourriture molle causée par des bactéries pectinolytiques, entraînant une dégradation rapide et extensive des tissus des tubercules de pomme de terre (figure 3.1).



Figure 3.1 : Infection observée au niveau des lenticelles.

En sectionnant le tubercule de pomme de terre, une texture visqueuse et aqueuse, typique de la décomposition des tissus causée par la pourriture molle est notée. Les zones affectées ont une couleur allant du jaune pâle au brun clair, contrastant avec les zones encore saines qui sont d'un jaune plus vif. Cette démarcation nette entre les tissus sains et les tissus affectés est caractéristique de la progression de l'infection bactérienne. De plus, nous pouvons remarquer que la peau extérieure est également affectée, montrant des signes de brunissement et de décomposition. L'état avancé de la décomposition et la présence d'exsudat bactérien indiquent une infection sévère et active (figure 3.2).



Figure 3.2 : Infection du tubercule de pomme de terre à partir du stolon.

Concernant les plants de pomme de terre collectés en plein champ, la base de la tige présente une décoloration sombre, passant du vert à un brun-noir avec des lésions nécrotiques le long de la tige, qui s'étendent vers le haut. Ces symptômes commencent de la base et remontent le long de la tige, ce qui est typique de la progression de la jambe noire.

Au niveau de la partie foliaire, nous remarquons que plusieurs feuilles et tiges montrent un noircissement marqué, les feuilles semblent flétries et desséchées, perdant leur aspect vert et sain. Pour résumer, l'aspect de la tige est particulièrement important car c'est souvent le point de départ de l'infection et le principal vecteur de propagation dans la plante. La maladie semble affecter à la fois les feuilles et les tiges, montrant sa capacité à se propager dans les différentes parties de la plante (figure 3.3).



Figure 3.3 : Symptômes de la jambe noire sur des jeunes plants de pomme de terre collectés à partir de parcelles atteintes.

2 Caractéristiques des isolats bactériens obtenus à partir des échantillons collectés.

L'identification des bactéries phytopathogènes s'appuie encore sur les analyses biologiques et biochimiques, une méthode traditionnelle mais toujours pertinente. Dans notre étude, l'examen des profils biochimiques des souches obtenues a facilité la différenciation au sein des groupes de bactéries pectinolytiques. L'analyse des différents échantillons symptomatiques collectés nous a permis de recenser des isolats pour la suite des tests d'identification classique (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Origine des souches bactériennes isolées à partir d'échantillons symptomatiques collectés sur les différentes parcelles prospectées.

Isolats bactériens	Année d'isolement	Origine	Région	Symptôme observé
SP24	2016	<i>Solanum tuberosum</i> var Desirée	Djelida Parcelle	Jambe noire
A13	2017	<i>Solanum tuberosum</i> var Spunta	El Abadia Entrepôt	Pourriture molle
A56	2017	<i>Solanum tuberosum</i> var Spunta	El Abadia Entrepôt	Pourriture molle
AD10	2017	<i>Solanum tuberosum</i> var Desirée	El Abadia Entrepôt	Pourriture molle
AS6	2017	<i>Solanum tuberosum</i> var Spunta	El Abadia Entrepôt	Pourriture molle
D14	2017	<i>Solanum tuberosum</i> var Spunta	Djendel Entrepôt	Pourriture molle
B74	2018	<i>Solanum tuberosum</i> var Ultra	Djendel Parcelle	Jambe noire
CH4	2018	<i>Solanum tuberosum</i> var Ultra	Djendel Parcelle	Jambe noire
S12	2018	<i>Solanum tuberosum</i> var Spunta	Djelida Parcelle	Pourriture molle
S441	2018	<i>Solanum tuberosum</i> var Spunta	Djelida Entrepôt	Pourriture molle
SA22	2018	<i>Solanum tuberosum</i> var Spunta	Djelida Entrepôt	Pourriture molle
SA62	2018	<i>Solanum tuberosum</i> var Spunta	Djelida Parcelle	Pourriture molle

8.6 La réaction d'hypersensibilité sur le tabac

La recherche de bactéries pectinolytiques a révélé qu'après 72 h d'incubation, sur quarante isolats testés douze isolats bactériens ont formé des cavités sur le milieu CVP, l'ensemble de ces isolats a été inoculé sur le tabac *Nicotiana tabacum* cv. White Burley. La réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac s'est manifestée par la formation d'une zone nécrotique locale autour de la partie infiltrée après 48h d'inoculation. L'apparition des nécroses confirme le caractère phytopathogène des isolats bactériens. Le témoin négatif quant à lui n'a pas présenté de symptôme nécrotique (Figure 3.4).



Figure 3.4: Réaction d'hypersensibilité (HR) sur feuilles de tabac 72 h après l'inoculation.

+ : réaction positive au test d'hypersensibilité sur tabac (nécrose).

- : réaction négative au test HR.

8.7 L'activité pectinolytique sur la pomme de terre

Le test de pathogénicité sur les tubercules de pomme de terre est une étape cruciale dans le diagnostic des agents phytopathogènes responsables de maladies. Sur une quarantaine d'isolats bactériens testés, douze isolats ont exprimé des réponses positives. D'une façon générale, l'activité pectinolytique sur les pommes de terre sectionnées, se manifeste par la dégradation des tissus qui deviennent spongieux, de couleur crème à brun foncé, dégageant aussi une forte odeur nauséabonde. Ces résultats confirment le caractère phytopathogène des isolats bactériens (Figure 3.5).

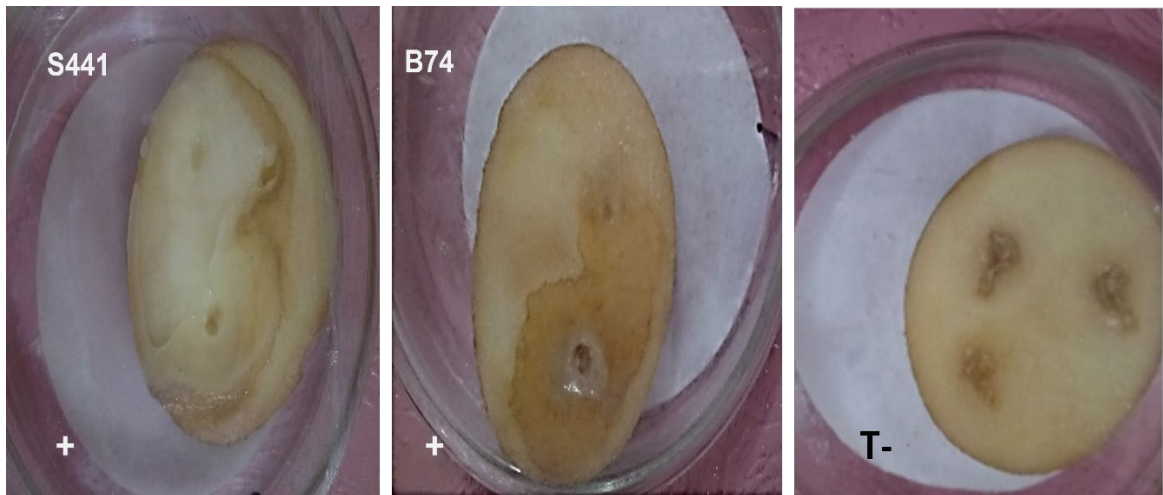


Figure 3.5 : Activité pectinolytique sur sections de pomme de terre var. Spunta.

+: réponse positive traduite par la macération des tissus de pomme de terre.

T- : Témoin négatif inoculé avec EDS.

8.8 Caractéristiques culturales et biochimiques

2.1.1 Formation de cavité sur le milieu CVP

Le milieu CVP est un milieu sélectif qui par la présence du Crystal violet dans ces composants inhibe la croissance des bactéries à Gram positif. A cet effet, douze isolats bactériens ont répondu positivement se traduisant par la formation de cavités profondes de formes régulières sur le milieu CVP (Figure 3.6).



Figure 3.6 : Formation des cavités sur le milieu CVP.

2.1.2 Caractéristiques culturelles sur milieu GN

La culture des bactéries obtenues sur le milieu GN, a permis d'obtenir des colonies bactériennes pures bien isolées. Certaines sont larges, lisses, plates, fréquemment circulaires, avec des bords irréguliers, de couleur crème ou blanche. Tandis que d'autres apparaissent transparentes, circulaires, surélevées, brillantes et de couleur blanche crèmeuse (Figure 3.7). Ces dernières présentent des caractères macroscopiques similaires à ceux décrits par Perombelon and van der Wolf [59].



Figure 3.7 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes sur le milieu GN.

2.1.3 Production de fluorescence sur le milieu King B

La production de pigments fluorescents sur le milieu King B est un test discriminant, qui permet de distinguer les bactéries pectinolytiques appartenant au groupe des SRP des autres bactéries telles que les *Pseudomonas*. Après 48h incubation, l'exposition des boîtes à la lumière UV a révélé que sur les douze isolats testés, huit sont positifs, révélant la présence d'une pigmentation verdâtre diffusible, tandis que quatre souches se sont révélées négatives.

2.1.4 La croissance sur le milieu NGM

Ce test a permis de constater la production de l'indigoidine chez certains isolats bactériens. En effet, quatre isolats bactériens se sont révélés positifs. Cette réaction se traduit par l'apparition d'une couleur brunâtre des colonies bactériennes, tandis que huit souches

ont gardé leurs aspects clairs crémeux, ce qui signifie que la réaction est négative (Figure 3.8).

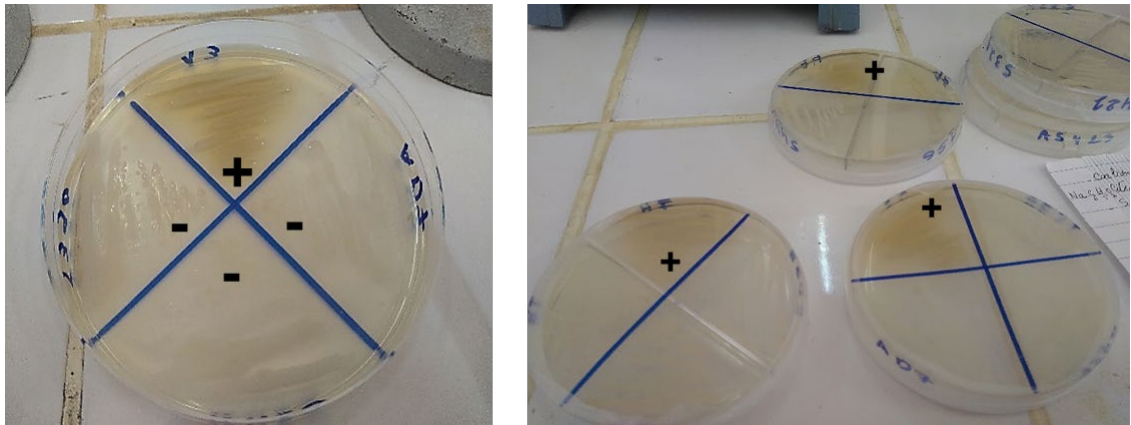


Figure 3.8: Production de l'indigoidine sur le milieu NGM.

+ : réponse positive traduite par brunissement des colonies sur le milieu.

- : réponse négative avec un aspect clair des colonies.

2.1.5 Résultats des tests biochimiques et physiologiques des isolats obtenus

Les douze isolats sélectionnés ont fait l'objet d'une série de tests biochimiques afin d'affiner leur classement en profils biochimiques. Le test KOH a permis de confirmer les propriétés de la paroi à Gram négative, puisque l'ensemble de ces isolats testés présente un aspect filamenteux et visqueux sur la lame.

Le test de croissance à 37°C sur le milieu GN, a révélé l'activité de quatre colonies bactériennes, tandis qu'aucune croissance n'a été observée pour les huit souches restantes.

Les résultats du test de la réduction du sucrose ont révélé que huit souches bactériennes sont positives. Cette réponse se traduit par le changement de la couleur du milieu initialement rouge et qui devient jaune après réduction, ce qui indique leurs capacités à transformer le sucrose en substance réductrice. En revanche, quatre souches bactériennes ont répondu négativement.

Le test de la production d'indole a permis de constater la formation d'un anneau rouge en surface chez quatre isolats bactériens. Ceci indique que ces isolats disposent de l'enzyme

tryptophanase responsable de la production d'indole par dégradation de l'acide aminé tryptophane. Les huit isolats restants se sont révélés négatifs.

Les résultats du test oxydation/fermentation et catalase se sont révélés positifs pour l'ensemble des isolats testés, contrairement au test de l'oxydase où l'ensemble des douze isolats ont répondu négativement.

Les résultats de l'hydrolyse de la gélatine ont indiqué que seulement quatre isolats bactériens ont répondu positivement au test en liquéfiant la gélatine, contrairement aux huit souches restantes qui se sont révélées négatives.

Le test de la croissance sur milieu LB avec 5% de NaCl a indiqué que huit isolats ont répondu positivement ce qui démontre leur tolérance à la salinité. Cependant, les quatre souches restantes ont manifesté une très faible croissance sur le milieu.

L'ensemble des résultats obtenus a permis de répartir les isolats bactériens en deux groupes distincts selon leurs caractéristiques biologiques et biochimiques communs (tableau 6). Le profil 1 comprend quatre souches, à savoir : S441, B74, D14 et A13. Tandis que le profil 2 regroupe huit souches bactériennes : AS6, SP24, A56, SA62, SA22, S12, CH4 et AD10.

Pour la suite de l'étude, nous nous sommes concentrés uniquement sur les isolats du profil biochimique 1. Cette sélection s'appuie sur plusieurs observations caractéristiques : l'absence de fluorescence sur milieu King B, le brunissement des colonies sur milieu NGM et la réaction positive au test d'indole. Ces résultats suggèrent fortement la présence de bactéries responsables de pourriture molle (SRP), plus précisément celles appartenant au genre *Dickeya*. Quant au profil 2, son exclusion repose sur leurs caractéristiques biochimiques qui ne correspondent pas aux critères d'identification attendus. En effet, Les résultats obtenus démontrent que ces souches n'appartiennent pas au genre *Pseudomonas* ces derniers sont oxydase positives, ce qui n'est pas le cas ici.

Tableau 3.2 : Réponses biologiques et physiologiques des isolats étudiés

Test	Profil 1				Profil 2							
	S4	B7	D1	A1	AS	SP	A5	SA	SA	S1	CH	AD
	41	4	4	3	6	24	6	62	22	2	4	10
Activité pectinolytique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HR sur tabac	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formation de cavité sur milieu CVP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescence sur milieu King B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de pigment sur milieu NGM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Solubilité KOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Réduction sucrose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'indole	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liquéfaction de la gélatine	+	+	+	+	N D	ND	N D	ND	ND	N D	N D	ND
Fermentation/Oxydation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 37°C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolérance à la salinité (5% NaCl)	ND	N D	N D	N D	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : réponse positive - : réponse négative ND : indique une faible réponse

3 Identification moléculaire des SRP par la Réaction de polymérisation en Chaîne(PCR)

L'identification moléculaire offre une précision supérieure que les méthodes biochimiques traditionnelles pour la caractérisation bactérienne. Pour cette étude, l'analyse PCR a servi à valider les résultats des tests biochimiques effectués sur les souches bactériennes isolées. Ces dernières, désignées par les codes S441, B74, D14 et A13, ont été isolées de plants de pomme de terre des cultivars Spunta et Ultra.

L'identification des isolats appartenant au genre *Dickeya* a été réalisée par amplification PCR ciblant le gène *pelB* à l'aide des amorces spécifiques ADE1/ADE2. Cette analyse a révélé la présence d'un fragment d'ADN caractéristique de 420 pb chez les quatre isolats sélectionnés. L'absence de bandes multiples ou de traînées indique une bonne spécificité de la PCR. Leur identification en tant que souches apparentées au genre *Dickeya* spp., confirme leur implication dans le développement de la jambe noire et de la pourriture molle chez la pomme de terre cultivée dans les champs prospectés et échantillonnés (Figure 3.9).

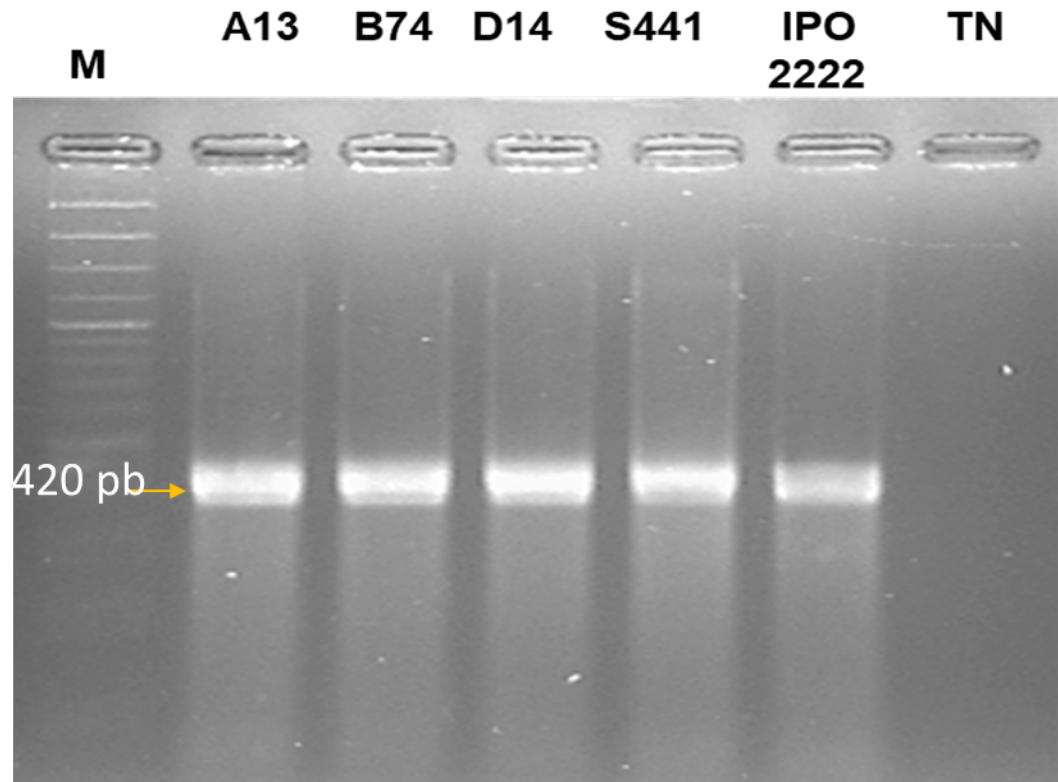


Figure 3.9 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de l'amplification du gène *pelB* par PCR des souches isolées.

IPO2222: Souche de référence *D. solani*, IPO2222.

TN: témoin négatif

Marqueur (M) -100 bp DNA Ladder ,

4 Caractérisation des souches *Dickeya* spp. en biovars

Les souches de *Dickeya* spp. isolées dans les parcelles sur les plants de pomme de terre symptomatiques ont été caractérisées à l'aide d'une série de tests biochimiques supplémentaires, ces tests nous ont permis d'identifier de manière plus raffinée ces souches bactériennes.

Toutes les souches appartenant au profil 1 ont démontré une capacité de croissance à 39°C sur le milieu GN. En ce qui concerne la croissance à 41°C, un comportement différentiel a été observé : B74, D14 et A13, ont montré un faible développement sur le milieu GN. La souche S441 n'a pas réussi à se développer à cette température. L'ensemble des quatre isolats à savoir S441, B74, D14 et A13, ont donné un résultat négatif au test

Arginine dihydrolase. En effet, aucun changement de couleur n'a été observé pour l'ensemble des souches bactériennes testées.

Le test de l'utilisation des hydrates de carbone a indiqué que les quatre souches S441, B74, D14 et A13 ont répondu positivement, cette réponse se traduit par le changement de couleur passant du vert au jaune. Elles sont donc capables de produire de l'acide à partir du sucrose, d'arabinose, de glucose, de mélibiose, de raffinose, de gentibiose, et de mannitol. Pour le test de l'utilisation de tartrate, aucun changement n'a été observé pour l'ensemble des souches, le test est donc négatif (tableau 3.3).

La caractérisation biochimique a permis une classification plus précise des souches bactériennes isolées et a contribué à confirmer leur affiliation à l'espèce *Dickeya solani*. Il serait pertinent de noter que cette étude a confirmé pour la première fois la présence de *D. solani* en plein champ de cultures de pomme de terre en Algérie, plus précisément dans la région d'Ain Defla.

Tableau 3.3 : Caractérisation biochimique des souches bactériennes isolées.

Test	Souche bactérienne			
	A 13	B74	D14	S441
Croissance à 39°C	+	+	+	+
Croissance à 41°C	+/-	+/-	+/-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
D(-) arabinose	+	+	+	+
5-Ketoglucanate	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+
Tartrate	-	-	-	-
Gentibiose	+/-	+/-	+/-	+/-

+ : réponse positive

- : réponse négative

+/- : une réponse faible

2 Le test du pouvoir pathogène

Les plants de pomme de terre, d'aubergine et de tomate ont été inspectés visuellement afin de détecter la présence d'éventuels symptômes avant la réalisation des essais. L'expérimentation a été réalisée avec les souches bactériennes identifiées en tant que *D. solani*

Les plants de pomme de terre inoculés avec les souches S441, B74, D14 et A13 ont exprimé des symptômes à partir du septième jour, avec un jaunissement des feuilles basales, suivi d'une nécrose marginale puis un flétrissement total de toutes les plantes inoculées (Figure 3.10).



Figure 3.10 : Résultat du test du pouvoir pathogène sur la pomme de terre.

A : jaunissement du plant inoculé par la souche testée.

B : Nécroses marginales observées sur les feuilles basales.

T- : Témoin négatif inoculé avec EDS.

Sur la tomate, les symptômes apparaissaient au dixième jour après inoculation, ils débutent par un enroulement des feuilles, une nécrose marginale et enfin le flétrissement de la plante (Figure 3.11).



Figure 3.11 : Résultat du test du pouvoir pathogène sur la tomate.

B1 : Flétrissement du plant de tomate après inoculation.

B2 : Chlorose observée sur les feuilles.

T- : Témoin négatif inoculé avec EDS.

Sur les plants d'aubergine, les symptômes sont apparus sous forme de taches foliaires, qui évoluent à un flétrissement pour aboutir à la fin à la chute des feuilles affectées (Figure 3.12).

Le test a révélé des réactions semblables chez les plants inoculés. Le processus pathologique s'est manifesté initialement par un noircissement au point d'inoculation, évoluant ensuite vers une pourriture molle caractérisée par une coloration brun-verdâtre.

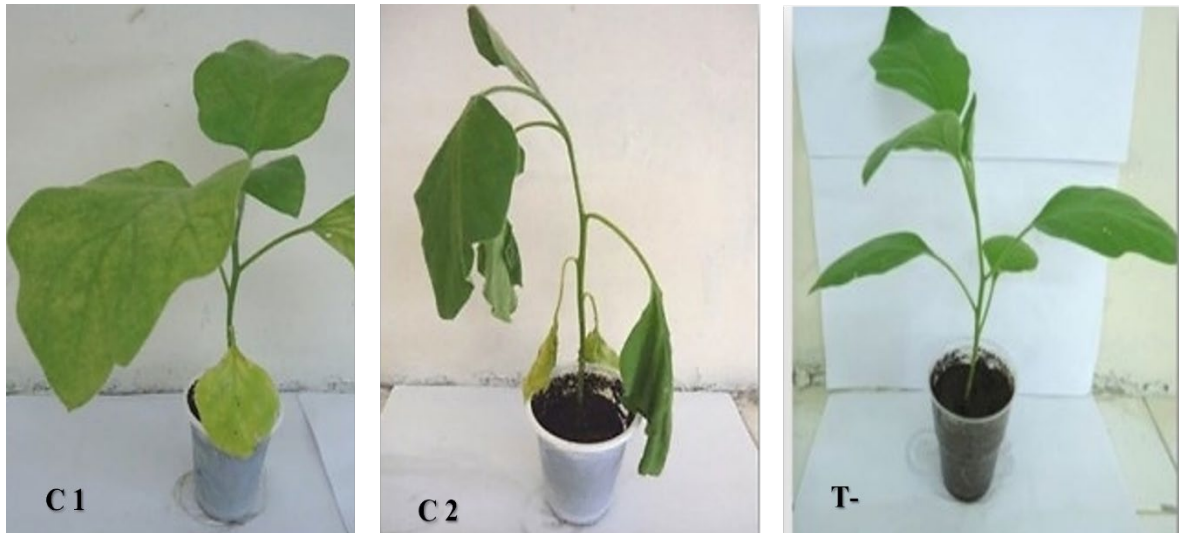


Figure 3.12 : Résultat du test du pouvoir pathogène sur la tomate.

C1 : Chlorose observée sur les feuilles.

C2 : Flétrissement du plant après inoculation.

T- : Témoin négatif inoculé avec EDS.

Cette séquence d'apparition de symptômes et leur aggravation dans le temps est également observée sur le terrain lors des prospections. Cette constatation et les résultats du test d'inoculation sur diverses plantes hôtes nous ont permis de vérifier le postulat de Koch et par la même de confirmer l'origine de l'infection et des symptômes sur les échantillons collectés.

L'examen des plants témoins n'a révélé aucune lésion tissulaire ni pourriture des tiges. Cette observation confirme l'état sanitaire initial des plantes utilisées et écarte toute possibilité d'infections spontanées survenues au cours de l'expérimentation.

D'une façon globale, l'inoculation des souches S441, B74, D14 et A13 aux différentes plantes testées, a produit des réactions pathologiques similaires sur les différents plants. Le processus infectieux s'est manifesté initialement par un noircissement au site d'inoculation, évoluant ensuite vers une pourriture molle de couleur brun-verdâtre. Cependant, des variations ont été observées dans la cinétique d'apparition des symptômes initiaux. Ces différences temporelles peuvent s'expliquer par la susceptibilité variable des plants hôtes ou le niveau de virulence spécifique à chaque isolat de *Dickeya solani* utilisé.

5 Effet des facteurs étudiés sur le développement de pourriture molle

8.9 Effet de la variation de la concentration de l'inoculum primaire

La concentration bactérienne joue un rôle crucial dans le développement et la progression des de la maladie. Le test a été réalisé sur des disques de pomme de terre la variété Spunta inoculées séparément avec les quatre souches bactériennes de *D. solani* identifiées à deux concentrations différentes.

L'inoculation à faible concentration à 10^2 cfu.ml⁻¹ a révélé l'apparition des symptômes en notant le changement d'aspect des disques de pomme de terre qui deviennent bruns et mous. Quant à l'augmentation de la concentration bactérienne à 10^6 cfu.ml⁻¹, l'inoculation a intensifié les symptômes, les disques de p. de terre deviennent totalement foncés avec une consistance molle avancée et humides dégageant une forte odeur nauséabonde (figure 3.13).

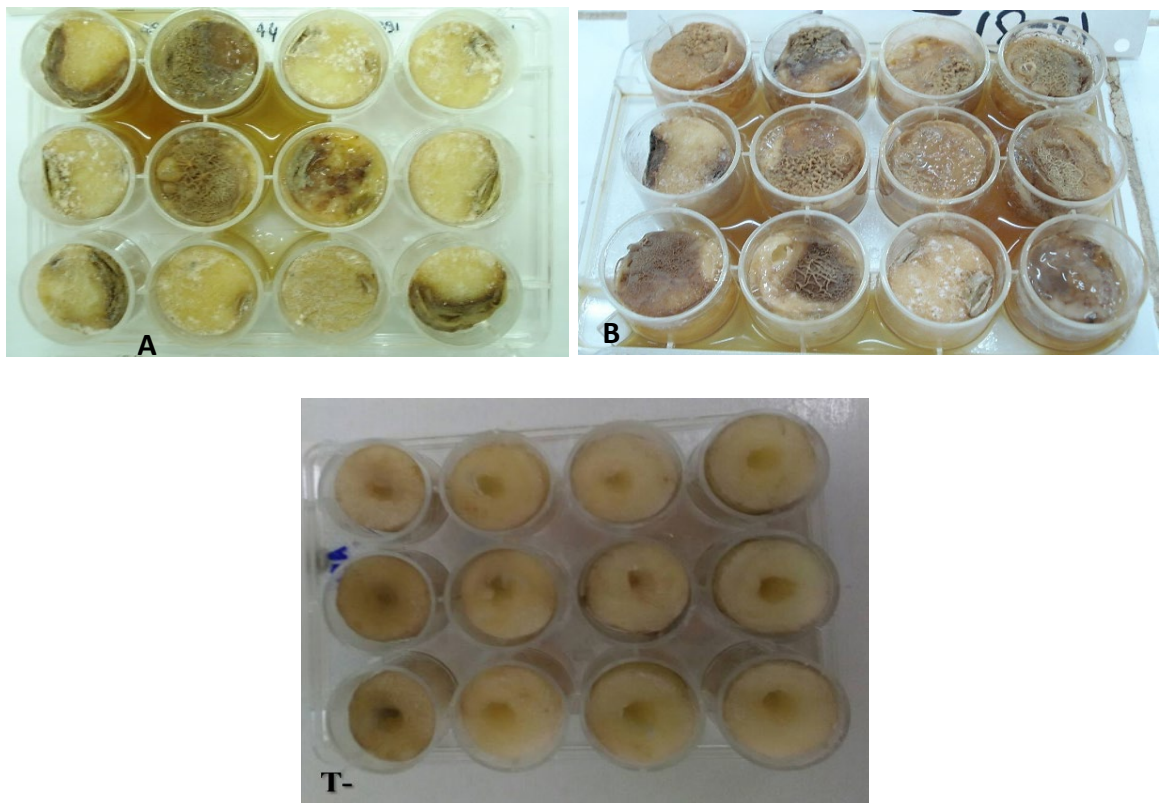


Figure 3.13 : Effet de la densité d'inoculum sur la pourriture molle.

A : Symptôme observé à une concentration d'inoculum 10^2 cfu.ml⁻¹

B : Symptôme observé à une concentration d'inoculum 10^6 cfu.ml⁻¹

T- : Témoin négatif inoculé avec EDS.

L'utilisation du test de Shapiro et Wilk, a permis de confirmer que l'ensemble des traitements effectués respectent la loi normale. Par la suite, une analyse de la variance à l'aide du logiciel statistique « R » est utilisée pour effectuer un traitement global des résultats.

Les résultats de cette analyse indiquent que la variation du poids des tissus pourris dépend étroitement de la concentration d'inoculum utilisée (figure 3.14). De plus, L'application du modèle ANOVA (Tableau 3.4), a permis de constater que l'effet de la concentration bactérienne est hautement significatif pour les souches A13, D14 et B74 et significatif pour la souche S441.

Tableau 3.4 : Modèle ANOVA appliqué aux souches de *D. solani* sur le poids des tissus pourris

	Somme des Carrés	d.d.l	Carrés moyens	F-ratio	p
Bactérie	3	0.69013	0.23004	18.0524	1.454 ^e -07 ***
Concentration	1	2.96127	2.96127	232.3827	<2.2 ^e -16 ***
Bactérie*concentration	3	0.32956	0.10985	8.6205	0.0001555 ***
Résidus	40	0.50972	0.01274		

À une concentration bactérienne faible (10^2 cfu/ml), les symptômes causés par les différentes souches sur les tissus de pomme de terre étaient limités. La plupart des souches (B74, D14 et A13) n'ont provoqué qu'une décomposition moyenne de 0,5 g de tissu, tandis que la souche S441 était plus virulente et a causé un peu plus de dommages, avec plus de 0,6 g de tissu décomposé.

En revanche, lorsque la concentration bactérienne a augmentée (10^6 cfu/ml), nous avons constaté que les effets étaient beaucoup plus prononcés. Les disques de pomme de terre ont subi une macération plus importante, caractérisée par un ramollissement des tissus devenant brunâtres, une dislocation et parfois même un suintement. Bien que l'intensité des symptômes variaient selon les souches bactériennes, la plupart d'entre elles ont provoqué

une macération complète de tous les disques de pomme de terre, indiquant un niveau maximal de dégradation.

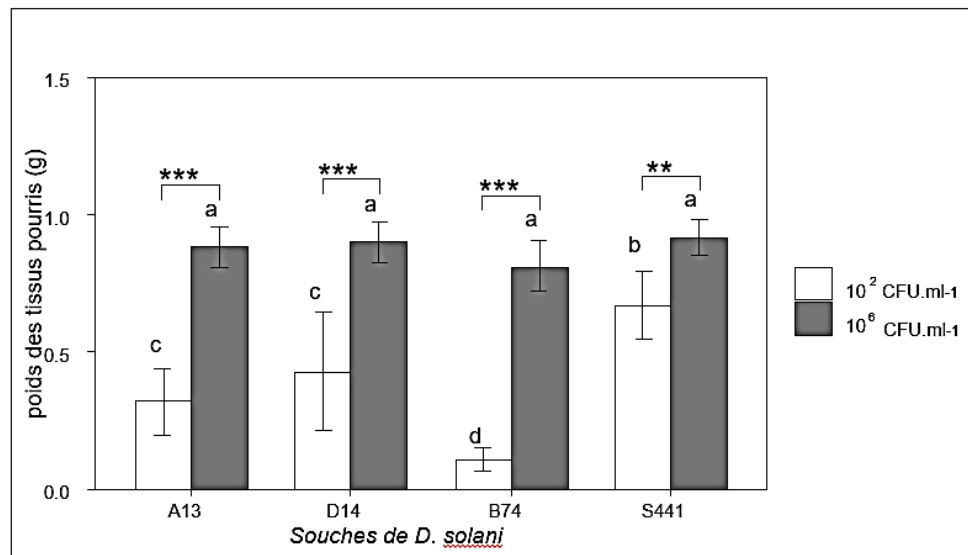


Figure 3.14 : Effet de la densité d'inoculum sur le poids des tissus pourris.

La figure 3.14 démontre l'effet de la concentration de l'inoculum primaire sur le développement de la pourriture molle chez différentes souches de *Dickeya solani*. Les barres d'erreur montrent une variabilité des résultats, qui semble plus importante à faible concentration.

A faible concentration, les réponses des souches sont variables, créant ainsi des groupes hétérogènes. La souche S441 produit le plus de pourriture marquée par la lettre b, les souches A13 et D14 produisent des niveaux intermédiaires de pourriture marquées c. la souche B74 produit le moins de pourriture (marquée 'd'). Ces différents groupes indiquent que statistiquement ces souches sont différentes.

A forte concentration, toutes les souches produisent significativement plus de pourriture qu'à faible concentration 10² cfu/ml. De plus, l'ensemble des barres grises (10⁶ cfu/ml) sont marquées par la lettre 'a', indiquant qu'elles ne sont pas statistiquement différentes entre elles et forment un groupe homogène. A travers ces résultats, nous pouvons remarquer que l'interaction entre la concentration d'inoculum et le développement de la pourriture molle est hautement significative pour chaque souche testée.

En conclusion, cette figure démontre clairement que la concentration de l'inoculum a un impact majeur sur le développement de la pourriture molle. À haute concentration, toutes les souches sont également virulentes, tandis qu'à faible concentration, il y a des différences notables entre les souches, S441 étant la plus agressive et B74 la moins agressive dans ces conditions. Même à faible concentration d'inoculum, les souches de *D. solani* sont capables de macérer les disques de pomme de terre.

Globalement, nos résultats indiquent une relation exponentielle entre le développement des symptômes de pourriture molle et l'augmentation de la densité d'inoculum pour toutes les souches bactériennes testées *in vitro*.

8.10 Effet de la température

L'étude de l'effet de la température sur le développement de la pourriture molle a permis de constater que pour la plupart des souches de *D. solani*, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la macération des disques de pomme de terre.

L'analyse de la variance par le model ANOVA confirme l'effet hautement significatif de l'interaction entre le changement de la température et les souches de *D. solani* inoculées (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Modèle ANOVA appliqué aux effets de la température sur la hauteur de la pourriture molle des disques de p. de terre inoculés.

	Somme des Carrés	d.d.l	Carrés moyens	F-ratio	P
Bactérie	3	51.32	17.11	6.5215	0.0006836 ***
Température	2	1561.24	780.62	297.5839	<2.2 ^e -16 ***
Bactérie*température	6	77.39	12.9	4.9168	0.0003784***
Résidus	60	157.39	2.62		

La souche A13 montre une augmentation significative de la macération avec chaque augmentation de température, la macération est maximale à 35°C. Pour la souche D14, nous remarquons que la macération augmente significativement entre 10°C et 20°C. Cependant,

cette différence est non significative entre 20°C et 35°C. Quant à la souche B74, sa réponse est similaire à la souche A13, avec une augmentation significative à chaque palier de température. De même, la souche S441 affiche une augmentation significative de la macération à chaque palier de température, mais avec une variabilité plus importante à 20°C (Figure 3.15).

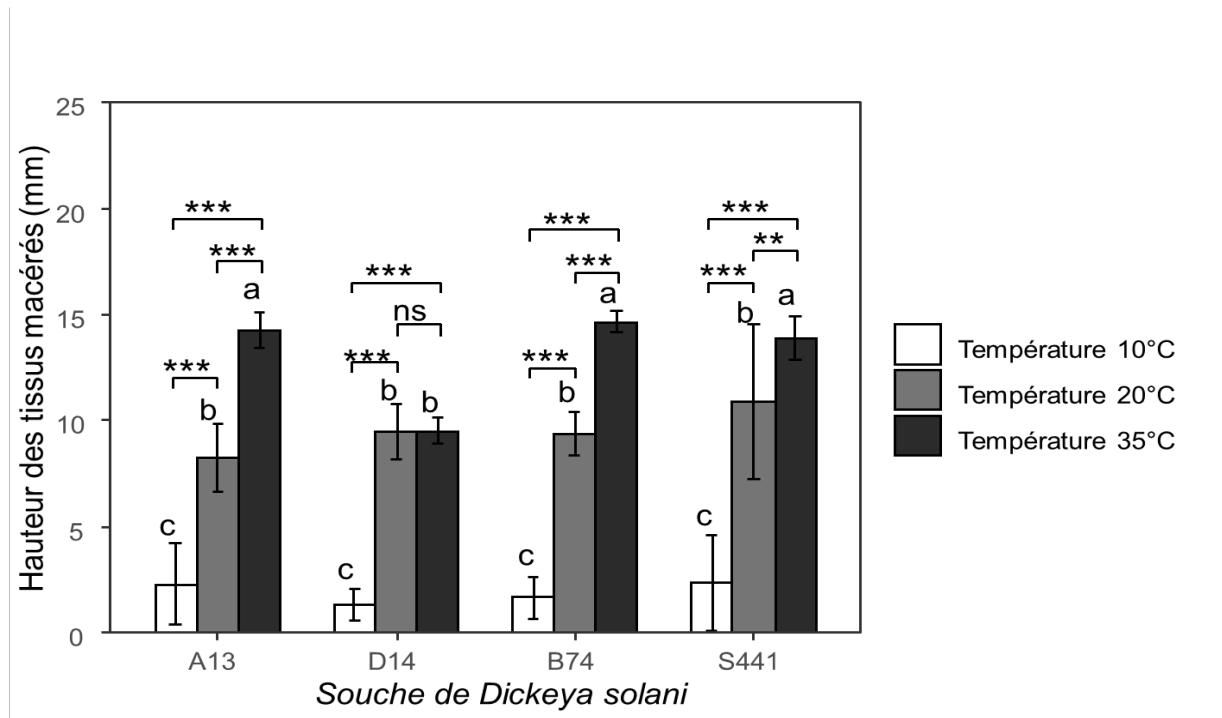


Figure 3.15 : Effet de la température sur la hauteur des tissus de pomme de terre macérés.

En général à 10°C, toutes les souches ont une faible activité de macération, ce qui implique que statistiquement il n'y a aucune différence significative entre les souches étudiées marquées par la lettre c. À la température 20°C et 35°C, les souches A13 et B74 montrent généralement la plus forte activité de macération formant un groupe homogène marqués par la lettre a, suivies de près par la souche S441. La souche D14 semble être la moins agressive à hautes températures, avec une macération significativement plus faible que les autres souches à 35°C. Ces résultats indiquent des différences statistiquement significatives entre les températures pour chaque souche. De plus, les lettres (a, b, c) indiquent des groupes statistiquement différents au sein de chaque température.

En conclusion, l'expérimentation démontre que la température a un impact majeur sur la capacité de macération des souches de *Dickeya solani*. La plupart des souches sont

plus agressives à des températures plus élevées, avec un optimum apparent à 35°C pour A13, B74 et S441. La souche D14 montre un comportement différent avec une activité de macération maximale à 20°C.

8.11 Effet de l'humidité

Cette étude examine l'effet de différents niveaux d'humidité (50%, 86%, 100%) sur la capacité de macération des tissus de pomme de terre par quatre souches de *D. solani* (A13, D14, B74, S441). L'augmentation de l'humidité accroît significativement la capacité de macération pour toutes les souches (Tableau 3.6). L'analyse statistique indique des différences significatives entre les niveaux d'humidité pour chaque souche.

Tableau 3.6 : Effet de l'humidité sur le développement de la pourriture molle.

	Somme des Carrés	d.d.l	Carrés moyens	F-ratio	P
Bactérie	3	6.42	2.14	0.6741	0.571271 ***
Humidité	2	783.62	391.81	123.3545	<2.2 ^e -16 ***
Bactérie*humidité	6	69.29	11.55	3.6360	0.003831 ***
Résidus	60	190.58	3.18		

À 50% d'humidité, on constate que la macération est la plus faible. La souche A13 montre une augmentation significative de la macération entre 50% et 86% d'humidité, tandis qu'elle n'est pas significative lorsque le taux d'humidité passe de 86% à 100% (indiqué par "ns"). Les souches D14, B74, S441 montrent une augmentation significative de la macération à chaque niveau d'humidité.

Les résultats indiquent qu'à 50% d'humidité, toutes les souches ont une faible activité de macération ne dépassant pas la hauteur de 5 mm de macération des disques de pomme de terre, formant un groupe homogène marqué par la lettre c. lorsque l'humidité passe à 86%, toutes les souches montrent une activité de macération intermédiaire marquées par la lettre b. Quand le taux d'humidité est maximal 100%, les souches D14, B74 et S441 montrent la

plus forte activité de macération marquée par la lettre a, tandis que la souche A13 reste à un niveau intermédiaire marquée par la lettre b (Figure 3.16).

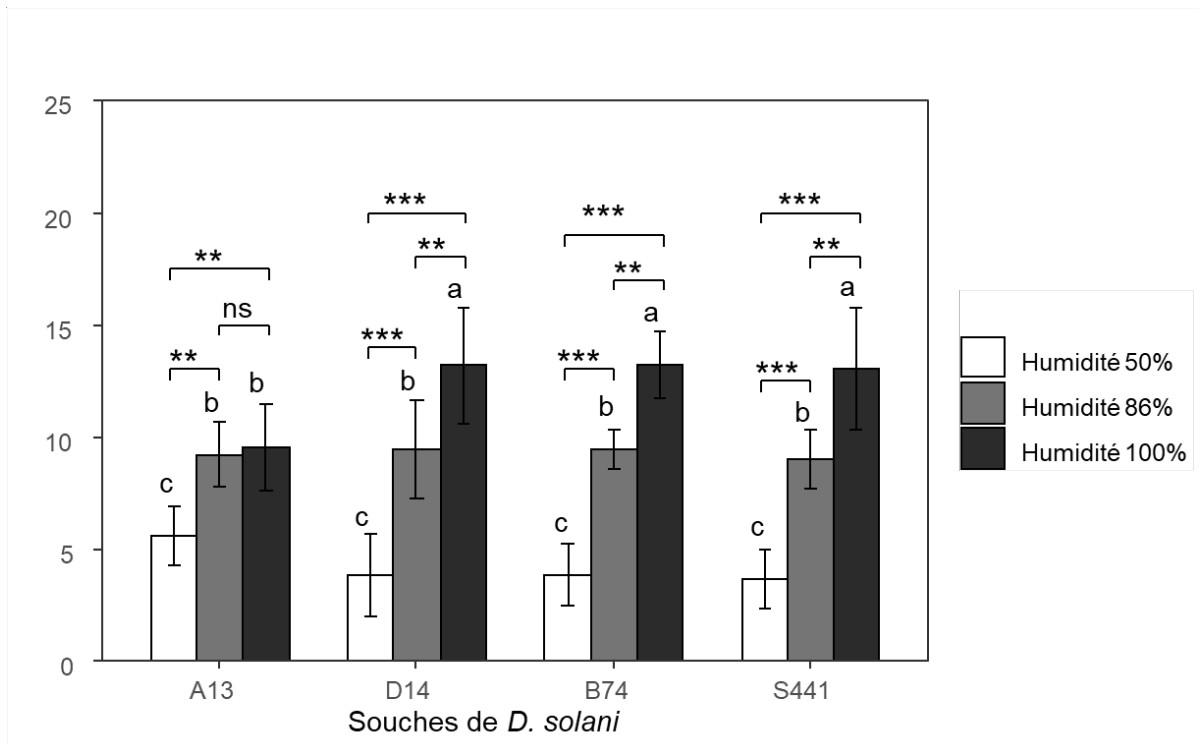


Figure 3.16 : Effet de l'humidité sur la hauteur des tissus macérés des disques de pomme de terre inoculés.

L'humidité a un impact majeur sur la capacité de macération des souches de *D. solani*. Toutes les souches sont plus agressives à des niveaux d'humidité plus élevés, avec un optimum apparent à 100% pour les souches D14, B74 et S441. La souche A13 montre un comportement légèrement différent, avec une activité de macération maximale à 86% d'humidité.

Globalement, À 50% d'humidité toutes les souches ont une faible activité, exception faite pour la souche A13 qui est légèrement supérieure. Passant à 86% d'humidité, toutes les souches ont une activité intermédiaire (b), sans différence significative entre elles. À 100% d'humidité les souches D14, B74 et S441 ont une activité élevée (a), significativement supérieure à celle de la souche A13 (b).

Ces résultats confirment que l'augmentation de l'humidité accroît significativement la capacité de macération pour toutes les souches, l'effet est plus prononcé entre 50% et 86%

qu'entre 86% et 100% d'humidité. La souche A13 montre une réponse différente à 100% d'humidité par rapport aux autres souches.

CHAPITRE IV :

DISCUSSION

DISCUSSION

Les infections bactériennes de la pomme de terre peuvent survenir par différentes voies: les lenticelles, les blessures, ou le talon du tubercule, ce dernier pouvant transmettre l'infection aux tubercules fils. Dans des conditions humides favorables, les bactéries dégradent les tissus du tubercule, en provoquant une décomposition du parenchyme. Cette pourriture molle se caractérise par une texture granuleuse et une couleur claire qui va s'assombrir jusqu'au noir. La formation de poches gazeuses dans les tissus en décomposition engendre une odeur nauséabonde très prononcée [54, 55]. Ces symptômes ont été observés dans les échantillons des tubercules de pomme de terre collectés qui présentent majoritairement des signes d'infection bactérienne. En effet, divers symptômes sont observés : les tubercules présentaient des zones de décoloration irrégulières, allant du brun clair au brun foncé et s'étendaient sur une grande partie de la surface des tubercules affectés. Les échantillons manifestent un aspect humide avec une texture molle et flasque indiquant une décomposition des tissus ce qui a conduit dans certains cas à la déformation du tubercule ; signe d'une dégradation interne avancée. L'ensemble de ces observations suggère une contamination bactérienne importante au niveau des lieux de stockage prospectés.

En culture, les agents pathogènes libèrent des facteurs de virulence, notamment des enzymes pectinolytiques, qui dégradent la paroi cellulaire des plantes et provoquent une macération des tissus. Ce qui perturbe le transport de l'eau et des nutriments vers le haut de la plante [54]. Les symptômes peuvent s'étendre à toutes les tiges de la plante de pomme de terre infectée. Au début de l'infection, les feuilles supérieures des tiges affectées deviennent vert clair à jaunes et commencent à s'enrouler vers le haut entraînant le flétrissement et le jaunissement des feuilles [93]. L'infection cause une pourriture molle de la tige, qui devient brun foncé à noire d'où le nom de maladie de la jambe noire [59]. Cette lésion caractéristique de la jambe noire , se manifestent plus fréquemment durant les temps chauds et à l'approche de la fin du cycle végétatif [89]. En Algérie, les conditions climatiques sont caractérisées par des températures élevées et une humidité importante durant certaines périodes de l'année. Ces dernières sont particulièrement favorables au développement de la jambe noire. Les symptômes observés sur nos échantillons collectés en plein champ confirment davantage le diagnostic de la jambe noire. La maladie commence généralement à la base de la plante et

progresses vers le haut, affectant d'abord les tiges avant de se propager aux feuilles. Les bactéries pectinolytiques (SRP) sont des agents pathogènes à large spectre d'hôtes. Elles sont capables de coloniser et d'infecter une grande variété d'espèces végétales, mais aussi de se développer dans toutes les zones climatiques où la végétation y est présente [89].

La méthode de conservation des pommes de terre constatée dans les entrepôts visités utilise des palox comme système de stockage. Ce dernier favorise le développement de bactéries phytopathogènes notamment les bactéries pectinolytiques (SRP). Selon Perombelon et van Der wolf [59], ce mode de stockage en grande quantité de la pomme de terre, crée un environnement confiné et humide, favorable à la prolifération bactérienne. En présence de tubercules contaminés, ils facilitent l'infection et la colonisation par les bactéries pectinolytiques, qui s'attaquent préférentiellement aux tissus endommagés et favorise le transfert et la propagation des agents pathogènes d'un tubercule à l'autre. En conditions d'humidité favorable, la pourriture peut s'étendre à tout le lot causant ainsi des dégâts très importants. Un seul tubercule pourri est ainsi capable de contaminer 100 kg de tubercules [54, 55].

1 Identification des SRP isolées des échantillons de pomme de terre

L'utilisation du milieu sélectif CVP a permis de confirmer la présence de bactéries SRP dans les échantillons collectés. Sur les 20 isolats bactériens initialement testés, 12 ont produit des cavités profondes caractéristiques, indiquant ainsi, la présence de bactéries pectinolytiques. Le milieu CVP (Crystal Violet Pectate) est largement utilisé pour l'isolement des bactéries SRP du groupe des *Pectobacteriaceae*, notamment *Pectobacterium* et *Dickeya*, qui sont responsables de la pourriture molle chez plusieurs espèces végétales.

Différents milieux gélosés ont été développés pour l'isolement des *Enterobacteriaceae* responsables de la pourriture molle, à ce jour, le milieu CVP reste le plus utilisé [128]. Ce milieu semi-sélectif est utilisé pour l'identification des bactéries pectinolytiques telles que *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium*. Sa nature semi-sélective permet de réduire considérablement la croissance des bactéries saprophytes présentes dans l'environnement [54]. De plus, la formation de cavités dans le milieu constitue une caractéristique visuelle distinctive qui facilite la détection des bactéries

pectinolytiques. Ces cavités résultent de la production abondante d'enzymes pectinolytiques par ces bactéries, ce qui constitue un moyen d'identification simple et efficace [59].

La détection des SRE sur le CVP dépend de la formation de cavités profondes caractéristiques par les colonies bactériennes. La sélectivité du milieu CVP repose sur l'utilisation de polypectate comme seule source de carbone et la présence de Crystal violet constitue un inhibiteur de la croissance des espèces bactériennes Gram-positives [135]. Cette dernière propriété explique l'absence des bactéries à Gram positives dans notre collection.

Ces caractéristiques font que le CVP demeure le milieu sélectif favori pour l'isolement des SRP lors du diagnostic [16] et les colonies qui forment des cavités sur ce milieu sont sélectionnées pour la suite des études plus approfondies [34]. Par ailleurs, des travaux ont rapporté qu'il arrive parfois que certains isolats de *Pectobacterium* et *Dickeya* peuvent ne pas croître sur le milieu CVP ou ne forment pas de cavités. Les raisons de ce phénomène ne sont pas encore expliquées [128].

Le test de l'activité pectinolytique effectué sur des tranches de pomme de terre a confirmé que douze isolats présentent une activité pectinolytique. La capacité des souches à macérer les tubercules est souvent utilisée comme indicateur de pathogénicité, elle constitue une méthode utile pour évaluer leur aptitude à provoquer la pourriture molle [136]. Néanmoins, elle n'est pas un indicateur précis de la présence de la maladie de la jambe noire [136].

2 Réaction hypersensible des bactéries isolées

Le test d'hypersensibilité sur tabac, appelé test HR (Hypersensitive Response), est utilisé pour évaluer la pathogénicité des bactéries phytopathogènes. Cette réponse est le résultat d'une réaction de défense rapide et localisée de la plante, qui se produit par un enchainement de mécanisme de défense permettant à la plante de limiter efficacement l'infection, empêchant ainsi le développement de la maladie. La présence de nécroses sur les feuilles de tabac est ainsi considérée comme un indicateur positif de la capacité d'une bactérie à provoquer une réaction hypersensible [137]. L'ensemble des douze isolats ont répondu positivement au test de croissance sur CVP induisant une réaction d'hypersensibilité positive sur le tabac qui se manifeste par la formation de zones nécrotiques. La présence de nécroses

sur les feuilles de tabac est considérée comme un indicateur de son pouvoir phytopathogène et de sa capacité à provoquer une réaction d'hypersensibilité [137].

La réaction hypersensibilité (HR) est un mécanisme de défense des plantes qui se déclenche en réponse à une infection par des agents pathogènes. Le mécanisme de défense de la plante s'enclenche par la détection de molécules particulières du pathogène. Ces molécules, nommées effecteurs de type DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), qui sont reconnues par des récepteurs spécifiques de la plante. Cette reconnaissance déclenche ensuite des cascades de signalisation liées à la défense, impliquant des hormones comme l'acide salicylique (SA), entraînant une cascade de réactions biochimiques. Cette réponse inclut une production rapide de molécules telles que ; les ROS (Reactive Oxygen Species), qui jouent un rôle clé dans la signalisation de défense et peuvent provoquer des dommages aux cellules infectées, contribuant ainsi à la mort cellulaire. De plus, les plantes peuvent renforcer leurs parois cellulaires en réponse à l'infection, ce qui peut également contribuer à la nécrose en rendant les cellules plus rigides [64].

Le système de sécrétion de type III (T3SS) est impliqué dans la réponse hypersensible (HR) chez les plantes. Ce système permet aux bactéries pathogènes, comme *Dickeya solani*, d'injecter des protéines effectrices dans les cellules végétales, ce qui peut déclencher des réponses immunitaires, y compris la réponse hypersensible. En perturbant les processus cellulaires de l'hôte, les effecteurs du T3SS peuvent également moduler la réponse immunitaire de la plante, favorisant ainsi la virulence de la bactérie [43].

Il est à noter qu'il est possible que certaines espèces de *Dickeya* puissent provoquer des réponses négatives de HR chez les plantes de tabac. Cette réponse peut être expliquée par le fait que l'infection est si brutale que la plante n'a pas le temps d'activer ses mécanismes de défense et de déclencher une résistance [74]. D'un autre côté, les gènes *hrp* codent pour le système de sécrétion de type III (T3SS) qui a la faculté d'injecter des protéines effectrices *avrE* (avirulence) à travers les cellules de la paroi végétale et de la membrane plasmique. Ces protéines (Avr)E connues aussi sous le nom de *DspE*, *DspA*, et *WtsE*, sont très répandues chez plusieurs bactéries telles que *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Dickeya*, *Pectobacterium*, et *Erwinia* spp., ont la capacité de dissimuler l'agent pathogène et contourner le système de défense de la plante, codé par les gènes R et ainsi cibler la réaction HR [138]. Tous ces mécanismes font que les protéines Avr jouent un rôle primordial dans le

processus infectieux chez la plante hôte (réaction compatible) lorsque le pathogène n'est pas détecté et la réaction HR n'est pas exprimée.

Certaines espèces appartenant aux SRP ne possèdent pas de système de sécrétion de type III (T3SS) ce qui leur rendent incapables de provoquer une nécrose sur les feuilles des plantes [139]. C'est le cas de *P. wasabiae* [46] et *P. parmentieri* [34]. *P. parmentieri* est considérée comme un agent pathogène secondaire ou opportuniste sur les tiges de pomme de terre. Cette bactérie est souvent isolée avec d'autres bactéries SRP, cependant elle devient vite dominante et participe majoritairement à la dégradation des tubercules pendant le stockage [34]. Discussion avec tes résultats

3 Caractérisation biochimique des isolats

La réalisation du test de fluorescence sur le milieu King B a permis de conclure que huit souches se sont révélées positives sur le milieu King B en émettant une pigmentation fluorescente observable sous lumière ultraviolette (UV). Tandis que quatre souches sont négatives. Le résultat négatif des bactéries sur le milieu indique l'absence de production de pigments fluorescents vert-jaune caractéristiques. Ce qui suggère que ces isolats ne produisent pas de pigments fluorescents et n'appartiennent pas au groupe des *Pseudomonas* fluorescents. Le test de fluorescence a permis de diviser les douze souches en deux groupes (phénotypes) distincts, le premier groupe rassemblant les quatre souches dont la réponse est négative et un deuxième groupe avec les huit souches fluorescentes.

Les bactéries fluorescentes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Flavobacterium* peuvent se développer et former des cavités sur le milieu CVP. Par exemple, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* ont été isolés à partir de pommes de terre pourries [94] en même temps avec des espèces de *Flavobacterium*, qui forment des colonies de couleur jaune vif [52]. Le milieu King B permet donc une différenciation spécifique entre ces espèces bactériennes et les agents pathogènes responsables de la pourriture molle (SRP) [52]. Dans notre étude, huit souches appartenant toutes au phénotype 2 ont produit une fluorescence sur ce milieu, tandis que les quatre souches du phénotype 1 n'ont émis aucune pigmentation.

Plusieurs espèces bactériennes sont capables de provoquer la pourriture sur les tubercules de pomme de terre telles que : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Aerobacter*,

Flavobacterium et *Rhodococcus*. Toutes ces bactéries possèdent la capacité de produire des enzymes pectinolytiques et peuvent contribuer à la détérioration des tubercules stockés, en particulier lorsque les températures sont élevées. Cette diversité des espèces bactériennes impliquées dans ce processus de détérioration explique la présence des bactéries fluorescentes classées dans le phénotype 2 parmi les isolats obtenus. Cependant, elles ne sont généralement capables que d'accentuer la dégradation des tissus après que la pourriture a été initiée par les espèces de *Dickeya* et/ou *Pectobacterium* [95]. Les espèces SRP sont considérées comme les plus importantes car ce sont des agents pathogènes primaires responsables de la pourriture molle et de la jambe noire [11]. Cette observation justifie notre choix d'étudier exclusivement le phénotype 1 pour les tests ultérieurs.

La croissance des isolats de *Dickeya* spp. sur le milieu NGM (Nutrient Glycerol Manganese) est un aspect crucial pour leur identification et leur caractérisation. L'utilisation du milieu NGM (Nutrient Glycerol Manganese) a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des isolats bactériens étudiés. En effet, ce milieu est conçu pour favoriser la croissance des bactéries du genre *Dickeya*, il permet de détecter la capacité des isolats de *Dickeya* à produire un pigment spécifique révélé par la formation d'une couleur brunâtre à bleue, ce qui constitue un signe positif de leur présence [115]. Le milieu NGM est composé de gélose nutritive supplémentée avec 1% de glycérol et 2 mM de $MnCl_2$. Sur ce milieu, les souches de *Dickeya* spp. produisent un pigment bleu-brun caractéristique (indigoïdine) qui s'avère être une propriété très stable permettant ainsi de la différencier facilement des autres espèces SRP [2, 115].

L'utilisation de ce milieu permet donc une identification plus rapide et moins coûteuse de *Dickeya* spp. par rapport aux tests biochimiques classiques. Pour notre étude, huit des isolats testés n'ont pas présenté de changement de coloration, conservant leur aspect clair caractéristique ce qui constitue une réponse négative. Cette absence de pigmentation indique que ces huit isolats ne correspondent probablement pas au genre bactérien ciblé par le test NGM.

Toutefois, quatre isolats ont développé une coloration brunâtre caractéristique sur le milieu de culture utilisé. Cette réaction positive suggère fortement l'appartenance de ces isolats au genre *Dickeya*. L'observation de cette pigmentation brunâtre constitue une indication biochimique spécifique qui nous a permis de différencier les bactéries du genre

Dickeya des autres genres bactériens apparentés. Cette méthode constitue une étape préliminaire importante dans l'identification des espèces appartenant au genre *Dickeya*.

L'analyse des réponses biochimiques de nos souches a mis en lumière des caractéristiques particulièrement similaires au genre *Dickeya*. Ces observations suggèrent une forte correspondance avec ce genre bactérien, comme en témoignent plusieurs traits distinctifs : leur capacité à métaboliser le tryptophane en indole, leur incapacité à réduire le sucrose, leur faculté à se développer à 37°C, ainsi que leur aptitude caractéristique à produire une pigmentation brunâtre sur le milieu NGM. Cette multitude de propriétés biochimiques et physiologiques oriente significativement notre réflexion vers une appartenance au genre *Dickeya*.

L'aspect des colonies obtenues sur le milieu gélosé après 48 h d'incubation à 28°C indique que les colonies sont moyennes, lisses, , bombées, brillantes, circulaires, avec des bords réguliers, de couleur blanc à crème. Cependant, Certaines en l'occurrence le phénotype 1 sont catalase-positives, oxydase négative, Gram négative, ne réduisent pas le sucrose, produit de l'indole, hydrolyse la gélatine, toléraient faiblement 5% de NaCl, utilise α -Methyl-glucoside et se développe sur le milieu GN à 37°C. Les souches appartenant au phénotype 1, possèdent toutes les caractères cultureux décrits par [140] et [59].

D'une manière générale, les espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* possèdent une activité catalase positive mais oxydase négative, elles sont capables d'utiliser les glucides à la fois par voie fermentative et oxydative [128]. Toutefois, Les résultats positifs aux tests d'indole et de sucrose obtenus pour les isolats du phénotype 1 écartent la possibilité de présence du genre *Pectobacterium*. En effet, les espèces de ce genre sont caractérisées par leur incapacité à produire de l'indole. Ce qui concorde avec leurs réponses sur le milieu NGM.

Les souches du phénotype 2 quant à elles sont Gram négative, catalase-positive, oxydase négative, réduisent le sucrose, mais ne produisent pas de l'indole, hydrolysent faiblement la gélatine, présentent une activité fermentative, tolèrent la croissance à 5% de NaCl, n'utilisent pas le α -Methyl-glucoside et ne se développent pas sur le milieu GN à 37°C.

4 Différenciation de *Dickeya* spp. en biovars

Les tests biochimiques étaient utilisés pour différencier les espèces *Pectobacterium* et *Dickeya* des autres bactéries. Actuellement, l'approche biochimique est principalement utilisée pour confirmer les résultats obtenus avec d'autres méthodes telle l'analyse moléculaire. La classification des espèces de *Dickeya* est basée sur des tests physiologiques et biochimiques qui permet de diviser *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*) en biovars. Les tests utilisés sont ceux décrits par Palacio-Bielsa et ses collaborateurs [122].

Les SRP sont catalase positives et oxydase négatives, elles fermentent le glucose, réduisent les nitrates, produisent la β -galactosidase et le sulfure d'hydrogène (H₂S). de plus, elles utilisent certaines sources de carbone telles que le L-arabinose, le D-galactose, le D-glucose, le glycérol, le D-mannose, le D-ribose et le saccharose mais ne produisent pas d'uréase [121].

Ces réponses métaboliques ont permis à Palacio-Bielsa et ses collaborateurs [122] à développer un système de microplaques biochimique pour différencier les biovars de *Dickeya*. Cette méthode a été adaptée par plusieurs chercheurs [123]. La capacité à se développer dans un vaste éventail de températures, pouvant atteindre 41°C, est considérée comme une caractéristique distinctive entre les espèces SRP [136]. Cette caractéristique s'ajoute à une série d'autres tests d'identification, notamment: l'hydrolyse anaérobie de l'arginine, l'utilisation du polysaccharide inuline et enfin la production d'acide à partir de huit sources de carbone [123, 136]. Ces tests complémentaires permettent une différenciation plus précise entre les biovars de *Dickeya* spp.

Les résultats des tests biochimiques effectués pour la détermination des biovars ont révélé que les souches isolées présentaient des réponses similaires à celles du groupe biovar 3. Ces réponses sont différentes de celles des autres biovars 1 et 7 correspondants à l'espèce *D. dianthicola* qui ne pouvaient pas croître à une température de 39°C. De plus, *D. dianthicola* possédaient une activité arginine dihydrolase positive, produit de l'acide à partir du D (-) tartrate mais ne peut le faire à partir du D(-) arabinose [122, 123].

La caractérisation biochimique a permis de confirmer la forte homologie des souches S441, B74, D14 et A13 avec le biovar 3. De plus, ces souches se développent à des températures optimales plus élevées que celles observées chez l'espèce *D. dianthicola*. Cette

différence significative dans les conditions de croissance exclut la possibilité que nos souches appartiennent à cette espèce. Plusieurs recherches ont appuyé ce constat et ont confirmé que le biovar 3 correspondait à l'espèce *D. solani* [17].

D. solani est catalase positif, oxydase négatif, capable de fermenter le glucose et de réduire les nitrates, ce qui est typique des bactéries du groupe des *Pectobacteriaceae*. Elle utilise divers sucres comme source de carbone, tels que le D-galactose, le D-glucose, le D-mannose et le D-ribose, mais ne produit pas d'acide à partir de l'adonitol [136]. Ces caractéristiques peuvent être testées sur des milieux de culture spécifiques. De même, *D. solani* possède la capacité à produire des pigments, comme l'indigoidine, une propriété partagée avec la plupart des espèces de *Dickeya* spp. L'ensemble de ces caractéristiques concorde avec le profil biochimique obtenu. Ces résultats corroborent ainsi l'identification de nos souches étudiées comme appartenant aux biovars 3 de *Dickeya* spp., plus précisément à l'espèce *D. solani*.

L'utilisation de cette méthode a révélé l'appartenance de nos souches *Dickeya* spp. à l'espèce *D. solani* ; l'identification de cette espèce constitue une première dans la détection et l'identification de *Dickeya solani* en Algérie [141], représentant ainsi une découverte significative pour la phytopathologie nationale. Cette espèce revêt une importance particulière dans le domaine de la culture de la pomme de terre en raison de son caractère agressif et sa virulence exceptionnelle.

Jusqu'à la fin du siècle dernier, *Dickeya dianthicola* était considérée comme étant la seule espèce du genre *Dickeya* ayant causé des symptômes de maladie sur les plants de pomme de terre particulièrement en Europe [43]. Cependant, depuis le début du 21^e siècle, des bactéries présentant des caractéristiques atypiques de *D. dianthicola* ont été isolées de la pomme de terre, des observations ont révélé l'existence d'un nouveau groupe bactérien, menant à son identification en tant que l'espèce *D. solani* [17].

Les SRP constituent un groupe de bactéries capable de coloniser simultanément une plante hôte. Cependant, dans notre étude, seule l'espèce *Dickeya solani* a été isolée et identifiée. L'absence du genre *Pectobacterium* parmi nos isolats s'explique par le fait que l'espèce *D. solani* inhibe sa croissance. En effet, *D. solani* inhibe la croissance de *Pectobacterium* par la production de composés antibactériens similaires aux toxines

précisément des bactériocines. Ces composés toxiques permettent à *D. solani* de concurrencer les souches de *Pectobacterium* au moment de la colonisation des plantes hôtes [2].

Dans un milieu de culture et en présence de souches de *Pectobacterium*, des études ont montré que *D. solani* créait un halo d'inhibition autour de ses colonies, ce phénomène révèle la capacité de *D. solani* à produire des molécules qui inhibent la croissance de ces bactéries. Les souches de *D. solani* possèdent particulièrement un cluster de gènes complet pour la production de bactériocines capable de dominer les souches de *Pectobacterium* lors de co-infections sur tubercules de pommes de terre. Ce qui lui confère un avantage compétitif dans l'environnement de la pomme de terre [2].

5 Identification moléculaire par PCR conventionnelle

L'évolution des outils moléculaires, notamment ceux reposant sur l'amplification de l'ADN par PCR qualitative ou quantitative, a conduit à la conception de nombreuses amorces spécifiques ciblant des gènes uniques. Cette avancée a considérablement amélioré la capacité de caractérisation des agents pathogènes en utilisant des amorces qui soient genre-spécifique ou espèce-spécifique [16, 52].

Dans notre étude, afin de confirmer l'appartenance de nos souches aux SRP plus précisément au genre *Dickeya* spp, les quatre souches du phénotype 1 ont été soumis à une analyse moléculaire par PCR, en utilisant les amorces ADE1/ADE2. Ces amorces, qui ciblent le gène de la pectate lyase (*pel*), sont spécifiquement employées pour l'identification des *Dickeya* spp. [129]. L'amplification d'un fragment de 420 paires de bases pour les quatre souches testées confirme leur appartenance au genre *Dickeya* spp., cette technique a ainsi corroboré les résultats biochimiques obtenus.

6 Pouvoir pathogène

Le test du pouvoir pathogène effectué avec les quatre souches de *D. solani* S441, B74, D14 et A13 inoculées aux plants de pomme de terre, tomate et aubergine nous a permis d'observer des symptômes de jaunissement, flétrissement et la mort des plantes. Dans les climats tempérés, l'infection causée par *D. solani* est reconnue par la présence d'un flétrissement lent considéré comme un symptôme typique de la bactérie, qui commence par

les feuilles supérieures et se propage aux feuilles inférieures, et est généralement suivi par le dessèchement total de la plante, souvent sans symptômes visibles de la jambe noire. Au niveau vasculaire, une décoloration brune est observée à la base de la tige [89].

Les SRP sont des pathogènes à large gamme d'hôtes capables de coloniser et parfois d'infecter une grande variété d'espèces végétales, y compris d'autres cultures économiquement importantes comme le maïs, le riz, le palmier dattier et la banane [34]. Les plantes ornementales, les mauvaises herbes sont notamment touchées par les SRP. Elles sont même présentes dans les débris végétaux, ainsi que dans les eaux d'irrigation et de surface, les aérosols, les insectes et sur des outils et équipements contaminés [50, 89]. La pomme de terre est la culture la plus affectée en raison de son importance en tant que culture vivrière dans de nombreux pays. Sa production mondiale est estimée à 368 millions de tonnes provenant de 17,5 millions d'hectares [142].

Bien qu'il soit largement reconnu que les pommes de terre sont la culture de solanacée la plus économiquement importante affectée par les SRP, ces bactéries affectent également d'autres plantes solanacées, telles que la tomate (*Solanum lycopersicum*) et l'aubergine (*Solanum melongena*). Ces données confirment l'observation des symptômes de flétrissement et jaunissement sur les plants inoculés. Les SRP ont également été isolés à partir de plantes spontanées *Solanum dulcamara* généralement associés à la production de pomme de terre [143]. *S. dulcamara* pourrait donc agir comme une plante réservoir pour la contamination de la pomme de terre par les *Dickeya* spp et *P. carotovorum* [89].

7 Effet de la concentration d'inoculum

Les symptômes de la maladie causée par *D. solani* sont souvent indiscernables de ceux de la jambe noire. Comparé à *D. dianthicola* et aux espèces de *Pectobacterium*, *D. solani* se manifeste plus agressive en induisant des symptômes même avec une faible concentration d'inoculum [88].

L'inoculation des disques de pomme de terre avec deux densités d'inoculum différentes a permis d'étudier leurs effets sur le développement de la pomme de terre. En effet, le calcul du poids des tissus macérés a révélé que ce dernier était plus important lorsque la concentration d'inoculum était de 10^6 cfu.ml⁻¹ qu'à 10^2 cfu.ml⁻¹ correspondant à un faible

niveau d'inoculum. Ces résultats indiquent qu'une augmentation de la densité cellulaire entraîne une augmentation de l'activité pectinolytiques des souches *D. solani* S441, B74, D14 et A13. Ce constat évoque une relation proportionnelle entre la densité cellulaire initiale et le degré de macération des tissus.

En culture, l'intensité des symptômes de la jambe noire varient en fonction de plusieurs paramètres dont la concentration initiale bactériennes dans les tubercules de semence, la sensibilité du cultivar de pomme de terre et les conditions environnementales, en particulier la température et l'humidité du sol [59].

Des travaux menés sur des semences pommes de terre ont constaté qu'une concentration de 10^3 cfu.ml⁻¹ de *Pba* était suffisante pour causer les symptômes de la jambe noire sur les tiges [103]. De même pour les espèces de *Dickeya* spp, *Pba* et *Pcc* qui causent la pourriture molle des tubercules de pomme de terre pendant le stockage [12].

Les travaux de recherche ont conclu que *D. solani* nécessite des températures optimales basses pour le développement de la maladie ainsi que des niveaux d'inoculum plus faibles pour atteindre le seuil d'infection [60, 144]. Toutefois, *D. solani* est particulièrement virulente en arrivant même à causer une infection avec seulement 10 cellules bactériennes par tubercule. De plus, elle se distingue par des propriétés qui lui permettent une colonisation plus efficace dans le système vasculaire des plantes, surpassant *D. dianthicola* et d'autres espèces de *pectobacterium* [94, 130].

8 Etude de l'impact des facteurs environnementaux

La température joue un rôle crucial dans l'évolution de la pourriture molle. Les recherches montrent une corrélation directe entre l'augmentation de la température et l'intensité des dégâts occasionnés. Des études ont confirmé que la quantité de tissus de pomme de terre affectés par la pourriture augmente avec la hausse de température, indépendamment de l'agressivité des souches bactériennes [59, 145]. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Toth et ses collègues [60] qui rappellent que la température est un facteur déterminant dans l'apparition des symptômes. Sous différents niveaux de températures, plusieurs bactéries phytopathogènes s'adaptent et modulent leurs virulences grâce à un processus appelé thermorégulation qui active l'expression spécifique des facteurs de virulence [146].

Les espèces appartenant au genre *Dickeya* provoquent des symptômes qui varient selon les conditions climatiques, les températures basses favorisent le développement des pourritures sur les tubercules qui conduisent à la formation de la jambe noire, tandis que les symptômes de flétrissements sont observés lorsque la température est élevée [60].

Lors de la présente étude les quatre souches de *D. solani* ont été inoculées aux disques de pomme de terre à trois valeurs de température : 10 °C, 20 °C et 35 °C. L'objectif était de déterminer l'effet de la température sur leurs croissance optimale. Le calcul de la hauteur des pourritures molle a révélé un très faible niveau de macération ne dépassant pas les 2.5 mm pour l'ensemble des souches. Passée à 20°C, la hauteur de la pourriture a augmenté considérablement. A 35°C, la hauteur des tissus macérés atteint son maximum. Les disques de pomme de terre sont complètement mous, pourris et dégageant de forte hauteur nauséabonde. Ces résultats obtenus concordent avec plusieurs travaux cités antérieurement.

D. solani est particulièrement agressive envers la pomme de terre. Elle se développe à des températures plus élevées que les autres SRP, entre 25 et 39°C, ce qui accroît le risque de propagation de la maladie [60, 94, 130]. Czajkowski et ses collaborateurs [98] ont constaté que les facteurs de virulence chez *D. solani* sont thermorégulés et ont suggéré que, bien que *D. solani* pouvait provoquer des symptômes de maladie dans une large gamme de température, d'autres facteurs de virulence s'exprimaient d'avantage à des températures plus élevées qu'à des températures basses.

D'une façon générale, *Dickeya* spp. est un agent pathogène des régions tempérées, ce qui signifie que sa présence est favorisée lorsque la température est élevée. Ce paramètre joue un rôle majeur dans l'épidémiologie de la jambe noire dans les régions tropicales et subtropicales. En Europe, au cours des 10 dernières années, l'incidence des infections de la pomme de terre de semence par les bactéries du genre *Dickeya* a relativement augmenté, comparée à celles du genre *Pectobacterium* [16, 130]. Concernant nos conditions de culture de plein champ et d'entreposage de la pomme de terre et avec le réchauffement climatique et les hausses de température ces dernières années et celles à venir, des risques d'infection par *D. solani* sont à redouter.

À l'instar de la température, l'humidité est un élément important du développement des SRP en leur créant les conditions d'anaérobiose favorable pour l'expression des facteurs de

virulence. Ces derniers sont favorisés par la présence d'un film d'eau à la surface des tubercules de pomme de terre [91]. En culture, l'apport d'eau apporté par les précipitations ou par l'irrigation augmente le risque de développement des symptômes de la jambe noire en raison de leur effet direct sur l'humidité relative du sol et sur la partie aérienne de la plante, ce qui favorise l'apparition et l'intensification des symptômes de la maladie [59, 60].

Lorsque l'humidité relative du sol et la température sont élevées, l'incidence de la maladie se manifeste par un manque de levée parfois associé à l'apparition de la jambe noir sur les jeunes plants. Cependant, si une forte humidité est accompagnée avec de basses températures à la levée, ces conditions accélèrent l'expression de la maladie de la jambe noir qui conduit au dessèchement des plantes infectées [100].

Les résultats de notre expérimentation, par application de trois différents niveaux d'humidité relative confirment la corrélation positive entre le taux d'humidité et le niveau des tissus de pomme de terre macérés. Nos résultats concordent avec les conclusions apportées par la bibliographie précédemment citée, qui confirment que la température et le taux d'humidité relative sont des éléments déterminants qui contrôlent l'expression et l'agressivité de nos quatre souches étudiées. Ces facteurs environnementaux jouent donc un rôle clé dans l'augmentation du risque de dissémination de la maladie.

Les résultats obtenus confirment ainsi les conclusions apportées par la bibliographie susmentionnées, qui signalent que la température et l'humidité relative sont des facteurs clés qui contrôlent l'expression de nos souches testées. Moh [100] a rapporté des constats similaires lors d'une étude sur *Pectobacterium atrosepticum* et *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Toutes ces informations relèvent le caractère agressif de la bactérie et sa faculté de s'acclimater aux environnements, ce qui soulève une crainte sur sa propagation dans le pays.

Les dégâts occasionnés par les bactéries SRP responsables de la pourriture molle de la pomme de terre sont multifactorielles, ce qui engendre une contamination rapide des tubercules voisins. En conditions de stockage, plusieurs bactéries pectinolytiques (*Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.) peuvent être impliquées dans l'apparition des pourritures molles sur les tubercules, en particulier lorsque la température

est élevée [33, 55]. Cependant, les SRP demeurent les agents les plus fréquents et les plus nuisibles impactant directement l'économie de la pomme de terre de multiples façons.

CONCLUSION

CONCLUSION

Ces dernières années, le réchauffement climatique a contribué à l'émergence de nouvelles maladies phytopathogènes, dont l'expansion est facilitée par l'intensification des échanges commerciaux internationaux. La jambe noire et la pourriture molle de la pomme de terre causées par les genres *Dickeya* et *Pectobacterium*, se distinguent par leur impact économique considérable à l'échelle mondiale. Pendant des décennies, *P. atrosepticum* a été le pathogène bactérien classique des plants de pomme de terre dans les climats tempérés, causant la maladie de la jambe noire. Depuis, de nouvelles espèces sont apparues récemment comme des agents pathogènes virulents telles que *P. carotovorum subsp. brasiliense*, *Dickeya dadantii*, *Dickeya dianthicola* [14]

L'émergence de nouveaux agents pathogènes nécessite donc une surveillance et une étude continue. Dans ce contexte, des échantillons ont été soigneusement collectés puis sélectionnés en fonction de leur état, avec une attention particulière portée aux tubercules montrant des signes de pourriture, tels que la texture molle. En culture, l'échantillonnage s'est basé sur les plants présentant des symptômes tels que le jaunissement et le flétrissement.

Une fois les tubercules et plants de pomme de terre collectés, des échantillons de tissus ont été prélevés à partir des zones affectées puis cultivés sur le milieu de culture CVP. Ce milieu semi-sélectif est utilisé pour l'identification des bactéries pectinolytiques, y compris *Pectobacterium* et *Dickeya*. Grace à sa composition qui permet de réduire la croissance des bactéries saprophytes et des Gram positif tout en favorisant la détection des bactéries pectinolytiques. La formation de cavités dans le milieu a révélé la présence de douze isolats bactériens. Ces derniers ont été transférés par la suite sur le milieu de culture King B qui est utilisé quant à lui pour la détection de pigments fluorescents, ce qui est une caractéristique distinctive de certaines espèces du genre *Pseudomonas*.

Dans le cas de notre étude, le test de fluorescence sur le milieu King B a révélé que huit souches émettaient une pigmentation fluorescente observable sous lumière ultraviolette (UV), tandis que quatre souches se sont révélées négatives, indiquant l'absence de production de pigments fluorescents vert-jaune caractéristiques. Ces résultats suggèrent que les isolats négatifs n'appartiennent pas au groupe des *Pseudomonas*. Le milieu King B a permis donc

d'affiner l'identification des isolats en contribuant ainsi à une meilleure compréhension de la diversité microbienne présente dans les échantillons de pommes de terre. Le milieu NGM a également été utilisé pour différencier les bactéries du profil 1 appartenant au genre *Pectobacterium* à celle de *Dickeya*. En effet, les propriétés de ce milieu reposent sur la capacité des isolats à produire l'indigoidine, un pigment caractéristique au genre *Dickeya*, qui est révélé par l'apparition d'une coloration brunâtre à bleue sur le milieu. Sur les douze isolats initialement isolés, quatre se sont révélés positifs, ce qui suggère leurs fortes appartenances au genre *Dickeya*. L'utilisation de ces milieux de culture a été donc déterminante, en facilitant l'identification et la différenciation des SRP.

La caractérisation biochimique a mis en évidence deux profils. Il est à noter que seul le profil 1 a été soumis à des tests supplémentaires car ce profil correspondait le mieux aux caractéristiques des bactéries SRP. La classification biochimique spécifique des quatre souches du groupe 1 a révélé des caractéristiques biochimiques et physiologiques qui confirment leur appartenance au genre *Dickeya* biovar 3, spécifiquement à l'espèce *D. solani*. Cette identification est confirmée par la réalisation des tests moléculaire en l'occurrence la PCR.

L'utilisation des amorces ADE1 et ADE2 ont permis d'amplifier le gène *pelB*, qui est associé à la virulence des bactéries pectinolytique du genre *Dickeya* spp. Ce gène est spécifique à la production de pectate-lyase, une enzyme impliquée dans la dégradation de la pectine ce qui contribue à la virulence de ces bactéries.

Les résultats de cette identification sont significatifs, car *D. solani* est reconnue pour son fort pouvoir phytopathogène et sa virulence élevée spécialement dans l'installation de la pourriture molle dans les tubercules de pomme de terre. En effet, les études de pathogénicité réalisées ont permis de mettre en évidence les risques liés à la présence de cette bactérie, révélée par l'apparition de symptômes caractéristiques chez les plantes infectées, notamment le jaunissement et le dépérissement des tissus, qui témoignent de la virulence des souches testées. Le test de pathogénicité a confirmé que les souches de *D. solani* inoculées présentent une virulence significative sur les plantes hôtes, notamment la pomme de terre, l'aubergine et la tomate. Les résultats ont montré que l'inoculation de ces plantes avec des concentrations optimales de ces souches entraîne des symptômes de chlorose, de jaunissement, de nécrose, et de flétrissement. Ce qui confirme la capacité de *D. solani* à causer des dommages importants aux cultures.

La pourriture molle de la pomme de terre causée par *D. solani* est une maladie d'importance mondiale, entraînant des pertes économiques considérables pendant le stockage. En effet, certains facteurs jouent un rôle essentiel dans le déclenchement et la progression de cette maladie tels que : la concentration initiale de l'inoculum, la température et l'humidité relative. Ces trois facteurs ont fait l'objet d'une étude réalisée sur des disques de pomme de terre, afin d'évaluer leurs impacts sur le développement des symptômes liés à cette maladie. Les résultats ont confirmé qu'une très faible concentration bactérienne initiale était suffisante pour l'expression de cette bactérie pectinolytique. Le même constat a été observé lors des essais sur l'impact de la variation de la température et de l'humidité relatives. Il en résulte qu'un risque potentiel d'infections par des souches de *D. solani* est possible dans diverses conditions environnementales.

Le caractère agressif et la propagation rapide de cette bactérie par les semences, même à faible niveau d'inoculum sous différents climats, constitue une menace réelle pour la dissémination et le développement de cette bactérie dans d'autres régions. Il est donc essentiel de prendre en considération le risque potentiel que peut causer *D. solani* qui souligne la nécessité d'une surveillance accrue et de stratégies de gestion intégrées pour prévenir la propagation de cette maladie dans le pays.

Au final, ce travail de recherche constitue la première étude rapportant l'émergence de *D. solani* en Algérie. Il met en garde sur la présence de *D. solani* dans le pays et plus précisément dans la région d'Ain Defla, qui figure parmi les régions les plus productrices de pomme de terre dans le pays.

Les souches bactériennes isolées en Algérie ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Dickeya solani*. Bien que ces isolats aient montré des variations dans leurs réponses de virulence lors des tests *in planta* effectués sur les disques de pomme de terre, leurs profils biochimiques sont largement similaires. Cette homogénéité biochimique a été confirmée par les résultats de l'identification moléculaire, confirmant ainsi leur appartenance à la même espèce.

Étant donné l'absence de produits chimiques de contrôle et de variétés résistantes, le contrôle des maladies causées par les SRP (bactéries pectinolytiques) s'est appuyé essentiellement sur la certification, un bon stockage et l'hygiène. En l'absence d'un traitement chimique efficaces et de cultivars résistants, la maîtrise de ces maladies pectinolytiques s'est principalement basée sur trois volets : une certification rigoureuse, un stockage plus contrôlé et

enfin une manipulation délicate des tubercules avec un respect strict des normes d'hygiène. Récemment, le progrès de la biologie moléculaire et des technologies génomiques a participé au développement de nouvelles stratégies de contrôle telles que l'utilisation des bactéries antagonistes, des bactériophages et des Rhizobactéries PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) : favorisant la croissance des plantes. Les résultats obtenus à l'échelle expérimentale sont prometteurs, ce qui nécessite davantage de recherche pour finaliser et formuler des produits efficaces capables de limiter le développement des SRP, tout en tenant compte de leurs diversités génétiques et physiologiques rencontrées dans différents environnements agricoles [147].

Les perspectives de ce travail de recherche devraient s'orienter vers une cartographie exhaustive de la distribution géographique de cet agent phytopathogène à l'échelle nationale. Cette approche permettrait de dresser un tableau précis de sa propagation à travers les différentes régions du pays, offrant ainsi une vue d'ensemble de la progression et de l'étendue de l'infestation. Une telle étude épidémiologique approfondie fournirait des données cruciales pour anticiper la dissémination du pathogène et élaborer des stratégies de contrôle ciblées et efficaces.

L'espèce *D. solani* est un pathogène très virulent, il est impératif d'approfondir nos connaissances sur l'écologie, les mécanismes pathogènes et la structure génomique de ce nouvel organisme. Cette compréhension accrue est essentielle pour élaborer des méthodes de détection innovantes et concevoir des stratégies inédites de gestion de la maladie.

D'un autre part, une surveillance continue et une gestion intégrée des cultures de pomme de terre demeure un moyen sûr pour lutter contre les infections causées par *D. solani*. La compréhension des mécanismes de pathogénicité et des facteurs environnementaux associés à ces agents pathogènes est cruciale pour les maîtriser et protéger les cultures de pomme de terre afin d'assurer la sécurité alimentaire.

REFERENCES

REFERENCES

1. Hawkes, J.G. and J. Francisco-Ortega, *The early history of the potato in Europe*. Euphytica, 1993. **70**: p. 1-7.
2. Garland, L., *Ecology and genomics of Dickeya solani, a new soft rot bacterium infecting potatoes*. 2015.
3. Stevenson, W., et al., *Compendium of Potato Diseases; American Phytopathological Society (APS) Press: St. Paul, MN, USA*, 2001: p. 72-77.
4. Es, A.v. and K. Hartmans, *Structure and chemical composition of the potato. Storage of potatoes. Post-harvest behaviour, store design, storage, practice, handling.*, 1987(Ed. 2): p. 15-78.
5. Gumul, D., et al., *Characterisation of five potato cultivars according to their nutritional and pro-health components*. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2011. **10**(1): p. 77-81.
6. Charkowski, A., et al., *Bacterial diseases of potato*. The potato crop: its agricultural, nutritional and social contribution to humankind, 2020: p. 351-388.
7. Campos, H. and O. Ortiz, *The potato crop: its agricultural, nutritional and social contribution to humankind*. 2020: Springer Nature.
8. FAOSTAT. 2014; Available from: <http://faostat3.fao.org/>.
9. Arora, R. and S.P. Khurana, *Major fungal and bacterial diseases of potato and their management*, in *Fruit and vegetable diseases*. 2004, Springer. p. 189-231.
10. van der Wolf, J.M., et al., *Diseases Caused by Pectobacterium and Dickeya Species Around the World*. 2021: p. 215-261.
11. Czajkowski, R., *Ecology and control of Dickeya spp. in potato*. 2011: Leiden University.
12. van der Wolf, J.M. and S.H. De Boer, *Bacterial pathogens of potato*, in *Potato biology and biotechnology*. 2007, Elsevier. p. 595-617.
13. van der Wolf, J.M., et al., *Management of Diseases Caused by Pectobacterium and Dickeya Species*. 2021: p. 175-214.
14. Naas, H., et al., *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense and Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum as causal agents of potato soft rot in Algeria*. European Journal of Plant Pathology, 2018. **151**(4): p. 1027-1034.
15. Yahiaoui-Zaidi, R., B. Jouan, and D. Andrivon, *Biochemical and molecular diversity among Erwinia isolates from potato in Algeria*. Plant pathology, 2003. **52**(1): p. 28-40.
16. Laurila, J., et al., *Characterization of Dickeya strains isolated from potato and river water samples in Finland*. European Journal of Plant Pathology, 2008. **122**(2): p. 213-225.
17. van der Wolf, J.M., et al., *Dickeya solani sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (Solanum tuberosum)*. Int J Syst Evol Microbiol, 2014. **64**(Pt 3): p. 768-774.
18. Ignatov, A., A. Karlov, and F. Dzhililov, *Spreading of the blackleg of potatoes in Russia caused by bacteria of Dickeya genus*. Zashita Karantin Rastenij, 2014. **11**: p. 41-43.
19. Ozturk, M. and H. Aksoy, *First report of Dickeya solani associated with potato blackleg and soft rot in Turkey*. Journal of Plant Pathology, 2017. **99**(1): p. 298.
20. Cardoza, Y., V. Duarte, and C. Lopes, *First report of blackleg of potato caused by Dickeya solani in Brazil*. Plant Disease, 2017. **101**(1): p. 243-243.

21. Lefki, K., *Diagnostic du système de régulation de la pomme de terre en Algérie: système d'information*. 2018, CIHEAM-IAMM.
22. Tria, M. and F. Chehat, *Typologie des producteurs de pomme de terre dans la région d'ain defla*. Les cahiers du CREAD, 2013. **103**: p. 107-136.
23. Ben J.M. Meijer, A. Aissat, and K. Benchaalal, *Potato storage and processing in Algeria*, in *Study on potato processing and post-harvest chain in Algeria*. 2019. p. 47.
24. Godfrey, S. and J. Marshall, *Identification of cold-tolerant Pseudomonas viridiflava and P. marginalis causing severe carrot postharvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand*. Plant pathology, 2002. **51**(2): p. 155-162.
25. Zhang, C., et al., *First report of the melon stem rot disease in protected cultivation caused by Pseudomonas fluorescens*. Journal of Plant Diseases and Protection, 2016. **123**: p. 247-255.
26. Zhong, L., et al., *First report of black rot of Sagittaria sagittifolia caused by Bacillus amyloliquefaciens in China*. Plant Disease, 2015. **99**(9): p. 1270-1270.
27. Elbanna, K., S. Elnaggar, and A. Bakeer, *Characterization of B acillus altitudinis as a New Causative Agent of Bacterial Soft Rot*. Journal of Phytopathology, 2014. **162**(11-12): p. 712-722.
28. Lu, S.-E., R. Henn, and D. Nagel, *First report of ear soft rot of corn (Zea mays) caused by Burkholderia gladioli in the United States*. Plant Disease, 2007. **91**(11): p. 1514-1514.
29. Liao, L., et al., *First report of soft rot disease of peach caused by Pantoea ananatis in China*. Plant Disease, 2016. **100**(2): p. 516-516.
30. Masyahit, M., et al., *First report on bacterial soft rot disease on dragon fruit (Hylocereus spp.) caused by Enterobacter cloacae in peninsular Malaysia*. Int. J. Agric. Biol, 2009. **11**: p. 659-666.
31. Fan, H., et al., *First report of banana soft rot caused by Klebsiella variicola in China*. Plant Disease, 2016. **100**(2): p. 517-517.
32. Lampert, Y., et al., *Emergence of Leuconostoc mesenteroides as a causative agent of oozing in carrots stored under non-ventilated conditions*. Microbial Biotechnology, 2017. **10**(6): p. 1677-1689.
33. Bergey, H. and H. Breed, *Relationship of pectolytic clostridia and Erwinia carotovora strains to decay of potato tubers in storage*. Plant Disease, 1982: p. 543.
34. Charkowski, A.O., *The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases*. Annu Rev Phytopathol, 2018. **56**: p. 269-288.
35. Adeolu, M., et al., *Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov.* International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2016. **66**(12): p. 5575-5599.
36. Mansfield, J., et al., *Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology*. Molecular plant pathology, 2012. **13**(6): p. 614-629.
37. Van Gijsegem, F., I.K. Toth, and J.M. van der Wolf, *Soft Rot Pectobacteriaceae: A Brief Overview*. 2021: p. 1-11.
38. Dupuis, B., P. Nkuriyingoma, and F. Van Gijsegem, *Economic Impact of Pectobacterium and Dickeya Species on Potato Crops: A Review and Case Study*. 2021: p. 263-282.

39. Jones, L.R., *Potato scab and its prevention*. 1901: Vermont Agricultural Experiment Station.
40. Winslow, C.-E., et al., *The families and genera of the bacteria preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types*. Journal of bacteriology, 1917. **2**(5): p. 505-566.
41. Burkholder, W., L.A. McFadden, and E. Dimock, *A bacterial blight of Chrysanthemums*. Phytopathology, 1953. **43**(9).
42. Samson, R., et al., *Transfer of Pectobacterium chrysanthemi (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and Brenneria paradisiaca to the genus Dickeya gen. nov. as Dickeya chrysanthemi comb. nov. and Dickeya paradisiaca comb. nov. and delineation of four novel species, Dickeya dadantii sp. nov., Dickeya dianthicola sp. nov., Dickeya dieffenbachiae sp. nov. and Dickeya zeae sp. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005. **55**: p. 1415-1427.
43. Golanowska, M. and E. Łojkowska, *A review on Dickeya solani, a new pathogenic bacterium causing loss in potato yield in Europe*. BioTechnologia, 2016. **2**: p. 109-127.
44. Hauben, L., et al., *Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae*. Systematic and applied microbiology, 1998. **21**(3): p. 384-397.
45. Gardan, L., et al., *Elevation of three subspecies of Pectobacterium carotovorum to species level: Pectobacterium atrosepticum sp. nov., Pectobacterium betavascularum sp. nov. and Pectobacterium wasabiae sp. nov.* International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2003. **53**(2): p. 381-391.
46. Khayi, S., *Génomique comparative des bactéries Dickeya solani et Pectobacterium wasabiae, pathogènes émergents chez Solanum tuberosum*. 2015, Université Paris Saclay (COMUE); Université Moulay Ismaïl (Meknès, Maroc).
47. Brady, C.L., et al., *Proposal to reclassify Brenneria quercina (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a new genus, Lonsdalea gen. nov., as Lonsdalea quercina comb. nov., descriptions of Lonsdalea quercina subsp. quercina comb. nov., Lonsdalea quercina subsp. iberica subsp. nov. and Lonsdalea quercina subsp. britannica subsp. nov., emendation of the description of the genus Brenneria, reclassification of Dickeya dieffenbachiae as Dickeya dadantii subsp. dieffenbachiae comb. nov., and emendation of the description of Dickeya dadantii*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2012. **62**(Pt_7): p. 1592-1602.
48. Dale, C. and I. Maudlin, *Sodalis gen. nov. and Sodalis glossinidius sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly Glossina morsitans morsitans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1999. **49**(1): p. 267-275.
49. Toth, I.K., et al., *Pectobacterium and Dickeya: Taxonomy and Evolution*. 2021: p. 13-37.
50. Charkowski, A.O., *The soft rot Erwinia*, in *Plant-associated bacteria*. 2006, Springer. p. 423-505.
51. Golanowska, M., et al., *Draft Genome Sequence of a Highly Virulent Strain of the Plant Pathogen Dickeya solani, IFB0099*. Genome Announc, 2015. **3**(2).
52. Charkowski, A.O., *The soft rot Erwinia*, in *Plant-associated bacteria*. 2007, Springer. p. 423-505.
53. Duarte, V., et al., *Characterization of atypical Erwinia carotovora strains causing blackleg of potato in Brazil*. Journal of applied microbiology, 2004. **96**(3): p. 535-545.

54. Raoul des Essarts, Y., *Pathogénie de Dickeya dianthicola et Dickeya solani chez Solanum tuberosum, développement et évaluation de stratégies de lutte biologique*. 2015, Paris 11.
55. Pérombelon, M. and A. Kelman, *Blackleg and other potato diseases caused by soft rot Erwinias: proposal for revision of terminology*. Plant Disease, 1987. **71**(3): p. 283-285.
56. Toth, I., et al., *Relationship between potato seed tuber contamination by Erwinia carotovora ssp. atroseptica, blackleg disease development and progeny tuber contamination*. Plant Pathology, 2003. **52**(2): p. 119-126.
57. Perombelon, M.C. and A. Kelman, *Ecology of the soft rot erwinias*. Annual review of phytopathology, 1980. **18**(1): p. 361-387.
58. Waleron, M., K. Waleron, and E. Lojkowska, *First report of Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense causing soft rot on potato and other vegetables in Poland*. Plant Disease, 2015. **99**(9): p. 1271-1271.
59. Perombelon, M. and J. van der Wolf, *Methods for the detection and quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica (Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum) on potatoes: a laboratory manual*. Scottish crop research institute annual report, 2002. **10**.
60. Toth, I., et al., *Dickeya species: an emerging problem for potato production in Europe*. Plant pathology, 2011. **60**(3): p. 385-399.
61. Byers, J.T., et al., *Nonenzymatic turnover of an Erwinia carotovora quorum-sensing signaling molecule*. 2002, Am Soc Microbiol.
62. Reverchon, S. and W. Nasser, *Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme*. Environmental microbiology reports, 2013. **5**(5): p. 622-636.
63. Barras, F., F. van Gijsegem, and A.K. Chatterjee, *Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot Erwinia*. Annual review of phytopathology, 1994. **32**(1): p. 201-234.
64. Van Gijsegem, F., et al., *Molecular Interactions of Pectobacterium and Dickeya with Plants*. 2021: p. 85-147.
65. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., *Metabolism and virulence strategies in Dickeya–host interactions*. Progress in molecular biology and translational science, 2016. **142**: p. 93-129.
66. McMillan, G., A. Barrett, and M. Perombelon, *An isoelectric focusing study of the effect of methyl-esterified pectic substances on the production of extracellular pectin isoenzymes by soft rot Erwinia spp.* Journal of Applied Microbiology, 1994. **77**(2): p. 175-184.
67. Delepelaire, P. and C. Wandersman, *Protein secretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from Erwinia chrysanthemi contains a C-terminal secretion signal analogous to that of Escherichia coli alpha-hemolysin*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(28): p. 17118-17125.
68. Heilbronn, J. and G. Lyon, *The ineffectuality of potato protease inhibitor on the extracellular protease from Erwinia carotovora subsp. carotovora*. Journal of Applied Microbiology, 1990. **69**(1): p. 25-29.
69. Van Vaerenbergh, J., et al., *Sequence Diversity in the Dickeya fliC Gene: Phylogeny of the Dickeya Genus and TaqManH PCR*. 2012.
70. Liu, F., et al., *Dickeya manipulates multiple quorum sensing systems to control virulence and collective behaviors*. Frontiers in Plant Science, 2022. **13**: p. 838125.

71. Antúñez-Lamas, M., et al., *Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of Dickeya dadantii 3937 (ex Erwinia chrysanthemi 3937)*. Microbiology, 2009. **155**(2): p. 434-442.
72. Expert, D., L. Rauscher, and T. Franza, *Erwinia, a Plant pathogen In Iron Transport in Bacteria*, eds. J.-H. Crosa, AR Mey & SM Payne. 2004, ASM Press. Washinton DC.
73. Franza, T., B. Mahé, and D. Expert, *Erwinia chrysanthemi requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection*. Molecular microbiology, 2005. **55**(1): p. 261-275.
74. Lautier, T. and W. Nasser, *The DNA nucleoid-associated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi*. Molecular microbiology, 2007. **66**(6): p. 1474-1490.
75. Miller, S.I., R.K. Ernst, and M.W. Bader, *LPS, TLR4 and infectious disease diversity*. Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(1): p. 36-46.
76. Fuqua, W.C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg, *Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators*. Journal of bacteriology, 1994. **176**(2): p. 269-275.
77. Adonizio, A., K.-F. Kong, and K. Mathee, *Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in Pseudomonas aeruginosa by South Florida plant extracts*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2008. **52**(1): p. 198-203.
78. Charkowski, A., et al., *The role of secretion systems and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity*. Annual review of phytopathology, 2012. **50**: p. 425-449.
79. Nasser, W., et al., *Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of Dickeya dadantii*. Environmental microbiology, 2013. **15**(3): p. 865-880.
80. Christie, P.J. and E. Cascales, *Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems*. Molecular membrane biology, 2005. **22**(1-2): p. 51-61.
81. Bell, K., et al., *Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen Erwinia carotovora subsp. atroseptica and characterization of virulence factors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(30): p. 11105-11110.
82. Grijpstra, J., et al., *Autotransporter secretion: varying on a theme*. Research in microbiology, 2013. **164**(6): p. 562-582.
83. Rojas, C.M., et al., *HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of Erwinia chrysanthemi EC16 on Nicotiana clevelandii seedlings*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(20): p. 13142-13147.
84. Russell, A.B., et al., *A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach*. Cell host & microbe, 2012. **11**(5): p. 538-549.
85. Nykyri, J., et al., *Revised phylogeny and novel horizontally acquired virulence determinants of the model soft rot phytopathogen Pectobacterium wasabiae SCC3193*. PLoS Pathogens, 2012. **8**(11): p. e1003013.
86. Matilla, M.A., R.E. Monson, and G.P. Salmond, *Dickeya solani*. Trends in Microbiology, 2023.
87. Chen, X., H. Zhang, and J. Chen, *First report of Dickeya solani causing soft rot in imported bulbs of Hyacinthus orientalis in China*. Plant disease, 2015. **99**(1): p. 155-155.
88. Kelly, R., et al. *Development of a real-time PCR assay for the detection of "Dickeya solani."*. in *Proceedings Crop Protection in Northern Britain*. 2012.

89. Toth, I.K., et al., *Pectobacterium and Dickeya: Environment to Disease Development*. 2021: p. 39-84.
90. Yaganza, E.-S., *Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre: base physico-chimique*. 2005, Citeseer.
91. Pérombelon, M., et al., *Factors affecting potato blackleg development*, in *Vascular wilt diseases of plants*. 1989, Springer. p. 421-431.
92. De Boer, S., *Prospects for control of potato diseases caused by pectolytic erwinias*. *Advances in potato pest biology and management*, 1994: p. 136-148.
93. Laurila, J., et al., *Symptoms and yield reduction caused by Dickeya spp. strains isolated from potato and river water in Finland*. *European Journal of Plant Pathology*, 2010. **126**: p. 249-262.
94. Czajkowski, R., et al., *Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of Dickeya sp. biovar 3*. *Phytopathology*, 2010. **100**(2): p. 134-42.
95. Pérombelon, M. and R. Lowe, *Studies on the initiation of bacterial soft rot in potato tubers*. *Potato Research*, 1975. **18**(1): p. 64-82.
96. Pérombelon, M., et al., *Effects of contamination by Erwinia carotovora subsp. carotovora and E. carotovora subsp. atroseptica of potato seed tubers and of cultivar resistance on blanking or nonemergence and blackleg development in Valencia, Spain*. *Potato Research*, 1988. **31**: p. 591-599.
97. Pérombelon, M. and G. Salmond, *Bacterial soft rots. in pathogenesis and host specificity in plant diseases, Vol. 1. Prokaryotes (Singh, US, Singh, RP and Kohmoto, K., eds)*. 1995, Oxford, UK: pergamon.
98. Czajkowski, R., et al., *Temperature-responsive genetic loci in pectinolytic plant pathogenic Dickeya solani*. *Plant Pathology*, 2017. **66**(4): p. 584-594.
99. Ludy, R., M. Powelson, and D. Hemphill Jr, *Effect of sprinkler irrigation on bacterial soft rot and yield of broccoli*. *Plant disease*, 1997. **81**(6): p. 614-618.
100. Moh, A.A., *Etude des facteurs écologiques influençant la croissance et le développement des Pectobacterium spp. infectant les tubercules de pomme de terre*. 2012, Université de Liège, Gembloux, Belgique.
101. Nachin, L. and F. Barras, *External pH: an environmental signal that helps to rationalize pel gene duplication in Erwinia chrysanthemi*. *Molecular plant-microbe interactions*, 2000. **13**(8): p. 882-886.
102. Pissavin, C., J. Robert-Baudouy, and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, *Regulation of pelZ, a gene of the pelB-pelC cluster encoding a new pectate lyase of Erwinia chrysanthemi 3937*. *Journal of bacteriology*, 1996. **178**(24): p. 7187-7196.
103. Bain, R., et al., *Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of Erwinia carotovora subsp. atroseptica on seed potatoes*. *Plant Pathology*, 1990. **39**(1): p. 125-133.
104. Czajkowski, R., et al., *Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by Pectobacterium and Dickeya species: a review*. *Plant pathology*, 2011. **60**(6): p. 999-1013.
105. Kurm, V., et al., *Potato tuber origin and microbial composition determines resistance against soft rot Pectobacteriaceae*. *European Journal of Plant Pathology*, 2023.
106. Mills, A. and R. Hurta, *Sensitivity of Erwinia spp. to salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage*. *Postharvest Biology and Technology*, 2006. **41**(2): p. 208-214.

107. Dong, Y.-H., et al., *Insecticidal Bacillus thuringiensis silences Erwinia carotovora virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference*. Applied and environmental microbiology, 2004. **70**(2): p. 954-960.
108. Xu, G. and D. Gross, *Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to Erwinia carotovora and suppressive of potato seed piece decay*. Phytopathology, 1986. **76**(4): p. 414-422.
109. Krimi, Z., Alim, D., Djellout, H., Tafifet, L., Mohamed-Mahmoud, F., & Raio, A., *Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of Agrobacterium spp., Pectobacterium spp., and promote growth of tomato plants*. Phytopathologia Mediterranea, 2016. **55**: p. 184–196.
110. Hélias, V., et al., *Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of Pectobacterium and Dickeya*. Plant pathology, 2012. **61**(2): p. 339-345.
111. Schaad, *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition*. N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chun (eds). 22 × 28 cm, 373 pp. St Paul, USA: American Phytopathological Society Press [<http://www.scisoc.org>], 2001. US\$55. ISBN 089054 263 5 (paperback). Plant Pathology, 2001. **50**(6): p. 812-814.
112. Golkhandan, E., et al., *Characterization of Malaysian Pectobacterium spp. from vegetables using biochemical, molecular and phylogenetic methods*. European Journal of Plant Pathology, 2013. **137**(3): p. 431-443.
113. Suslow, T., M. Schroth, and M. Isaka, *Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining*. Phytopathology, 1982. **72**(7): p. 917-918.
114. Bourgault, A.-M. and F. Lamothe, *Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology*. Journal of clinical microbiology, 1988. **26**(10): p. 2144-2146.
115. Lee, Y.A. and C.P. Yu, *A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, Erwinia chrysanthemi*. J Microbiol Methods, 2006. **64**(2): p. 200-6.
116. Lelliott, R., *Genus Erwinia*. Bergey's Manual of Systematic bacteriology Co., 1984. **1**: p. 469-476.
117. Hugh, R. and E. Leifson, *The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria*. Journal of bacteriology, 1953. **66**(1): p. 24-26.
118. Singleton, P., *Bactériologie pour la médecine. La biologie et la Biotechnologie [Biology and Biotechnology]*. Dunod. Paris, 2005: p. 541.
119. Dickey, R.S. and C.H. Zumoff, *Emended description of Enterobacter cancerogenus comb. nov.(formerly Erwinia cancerogena)*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1988. **38**(4): p. 371-374.
120. Klement, Z., K. Rudolph, and D. Sands, *Methods in phytobacteriology*. (No Title), 1990.
121. De Boer, S. and A. Kelman, *Erwinia soft rot group*. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2001. **3**: p. 56-72.
122. Palacio-Bielsa, A., M.A. Cambra, and M.M. Lopez, *Characterisation of potato isolates of Dickeya chrysanthemi in Spain by a microtitre system for biovar determination*. Annals of Applied Biology, 2006. **148**(2): p. 157-164.
123. Sławiak, M., et al., *Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 Dickeya spp. strains isolated from potato in Europe*. European Journal of Plant Pathology, 2009. **125**(2): p. 245-261.
124. Dye, D., *A taxonomic study of the genus Erwinia. I. The 'amylovora' group*. New Zealand journal of science, 1968. **11**(4): p. 590-607.

125. Moeller, V., *Manuel des Techniques Bacteriologiques*. R. Buttiaux, H. Beerens, & H. Tacquet (Eds.), 1955: p. 302.
126. Abolmaaty, A., et al., *Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction*. Microbios, 2000. **101**(400): p. 181-189.
127. Ayers, S., P. Rupp, and W. Johnson, *A study of the alkali-forming bacteria in milk* U.S. Dept. Agric. Bull, 1919. **782**.
128. Czajkowski, R., et al., *Detection, identification and differentiation of Pectobacterium and Dickeya species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review*. Ann Appl Biol, 2015. **166**(1): p. 18-38.
129. Nassar, A., et al., *Characterization of Erwinia chrysanthemi by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes*. Applied and environmental microbiology, 1996. **62**(7): p. 2228-2235.
130. Potrykus, M., et al., *Regulators involved in Dickeya solani virulence, genetic conservation, and functional variability*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014. **27**(7): p. 700-711.
131. Alim, D., *ANALYSE DU POUVOIR PATHOGENE DE SOUCHES D'ERWINIA CAROTOVORA ISOLEES DE SEMENCES DE POMME DE TERRE*, in *Faculté des sciences agro-vétérinaires, département des sciences agronomiques*. 2009, Saad Dahlab Blida.
132. Team, R.C., *R: A Language and environment for statistical computing*. R Foundation for statistical computing, 2021.
133. Mendiburu, F.d., *Package 'agricolae'*. R Package, Version, 2021: p. 1-2.
134. Wickham, H., W. Chang, and M.H. Wickham, *Package 'ggplot2'*. Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. Version, 2016. **2**(1): p. 1-189.
135. Hélias V., H.P., Huchet E., van der Wolf J.M., Andrivon D., *Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of Pectobacterium and Dickeya*. Plant Pathology, 2011. **61**: p. 339-345.
136. van der Wolf, J.M., et al., *Isolation, Detection and Characterization of Pectobacterium and Dickeya Species*. 2021: p. 149-173.
137. Nicholson, R.L. and R. Hammerschmidt, *Phenolic compounds and their role in disease resistance*. Annual review of phytopathology, 1992. **30**(1): p. 369-389.
138. Kim, H.-S., et al., *Pectobacterium carotovorum elicits plant cell death with DspE/F but the P. carotovorum DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011. **24**(7): p. 773-786.
139. Kim, H.-S., et al., *Phylogeny and virulence of naturally occurring type III secretion system-deficient Pectobacterium strains*. Applied and environmental microbiology, 2009. **75**(13): p. 4539-4549.
140. Hyman L.J., T.I.K., Pérombelon M.C.M. , *Isolation and identification. In Methods for the Detection and Quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica on Potato*. Laboratory Manual, Scottish Crop Research Institute, 1998. **Annual Report, Dundee, Scotland, The United Kingdom**,
: p. 64-71.
141. Marok-Alim, D., M.A. Marok, and Z. Krimi, *First Detection, Identification and Characterisation of Dickeya solani-Caused Potato Soft Rot in Algeria*. Potato Research, 2023. **67**(2): p. 495-514.

142. FAOSTAT. 2020 04.11.2020]; Available from:
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
143. Olsson, K. *Detection of Erwinia spp. in some Swedish streams.* in *Report of the international conference on potato blackleg disease*. 1985. Oxford University Press Oxford, United Kingdom.
144. Czajkowski, R., et al., *Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to Dickeya sp. biovar 3 in vitro and in planta.* Plant Pathology, 2012. **61**(1): p. 169-182.
145. Toth, I.K., et al., *Soft rot erwiniae: from genes to genomes.* Molecular plant pathology, 2003. **4**(1): p. 17-30.
146. Smirnova, A., et al., *Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria.* Archives of microbiology, 2001. **176**(6): p. 393-399.
147. Van Gijsegem, F., I.K. Toth, and J.M. van der Wolf, *Outlook—Challenges and Perspectives for Management of Diseases Caused by Pectobacterium and Dickeya Species.* 2021: p. 283-289.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Composition du Milieu Gélose nutritive [111]:

Extrait de viande 2g

Peptone 15g

NaCl5g

Agar15 g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7,2 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 2 : Composition du bouillon nutritif [111]:

Extrait de viande 2g

Peptone 15g

NaCl5g

Eau distillée 1000 ml

pH = 7,2 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe3 : Composition du Milieu Cristal Violet Pectate (CVP) [110]**Mix A**

Tryptone1 g

Tri-sodium citrate5g

CaCl₂.2H₂O (10%)2 g

Cristal violet (1%)100 ml

Agar6g

Eau distillée500 ml

Mix B

NaOH (5M/l) 2 ml

Pectine18 g

Eau distillée500 ml

pH =7,2, avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 4 : Composition du milieu King B [111]

Peptone..... 20g
 Glycérol 15g
 K_2HPO_4 1,5g
 $MgSO_4$ 1,5g
 Agar 15g
 Eau distillée1000 ml
 pH = 7,2 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 5 : Composition du milieu NGM (Nutritive Glycérol Manganèse) [115]

Gélose nutritive deshydraté.....23 g
 Glycerol (1% v/v)10ml
 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (2mM)0.4 g
 Eau distillée1000 ml
 pH = 6.5 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 6 : Composition du bouillon Réduction Sucrose [111]

Sucrose40g
 Peptone10g
 Extrait de bœuf5g
 Eau distillée1000 ml
 pH =7,2, avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 7 : Composition de milieu indole [116]

Peptone20g
 NaCl5g
 Eau distillée1000ml
 pH =7,2, avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 8 : Composition de milieu Hugh & Leifson H&L [117]

Bacto tryptone.....2g/l
 Nacl5g/l

PO₄K₂H0,3g/l
 Bleu de Bromothymol0,03g/l
 H₂O distillée1000 ml
 pH =7,2, avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 9 : Composition du milieu gélatine [111]

Extrait de levure3g
 Bactopeptone5g
 Gelatine12g
 pH =7,2, avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 10: Composition du milieu Arginine [126]

Arginine mono HCl10g
 Bactopeptone1g
 NaCl5g
 K₂HPO₄0,3g
 Rouge de phénol0,01g
 Agar3g
 Eau distillée1000ml
 pH =7,2, avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 11 : Composition du milieu ARJ (Ayers, Rupp et Joeston) [127]

Peptone 1g
 NaCl 5g
 Agar 3g
 K₂HPO₄ 0, 3g

Eau distillée 1000ml

pH = 7 avec autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 12 : Composition du milieu Leuria Bertani [111]

Extrait de levure5g

Tryptone10g

Glucose10 g

NaCl5 g

Agar20g

Eau distillée1000 ml

Annexe 13 : Résultat de l'effet de la variation de la densité d'inoculum sur le poids net des tissus pourris Pntp (g)

Souche [Inoculum]	D14	A13	B74	S441
10² cfu.ml⁻¹	0,396	0,344	0,595	0,110
	0,079	0,418	0,495	0,157
	0,295	0,486	0,625	0,080
	0,568	0,205	0,812	0,049
	0,648	0,168	0,802	0,117
	0,591	0,294	0,691	0,142
10⁶ cfu.ml⁻¹	0,866	0,892	0,839	0,895
	0,850	0,837	0,737	0,918
	0,987	0,918	0,912	0,802
	0,947	0,764	0,912	0,987
	0,957	0,957	0,791	0,947
	0,802	0,930	0,685	0,957

Annexe 14 : Résultat de l'effet de la variation de la température sur la hauteur des tissus pourris (mm)

Souche Température	D14	A13	B74	S441
10°C	0,5	0	3	5
	1	5	2,5	5
	1	1	1	2
	1	3,2	2	0
	2	3,5	1	2
	2,5	1	0,5	0
20°C	7,6	10	10	10
	8	10	8	9
	10	8	10	14
	10,2	8,5	10	15
	10	6,5	10	12
	11	6,5	8	5
35°C	10	15	15	15
	8,5	15	15	14
	10	14	14	14
	10	13,5	14	15
	9	13	15	12,6
	9,5	15	15	12,8

Annexe 15 : Résultat de l'effet de la variation du taux d'humidité relative sur la hauteur des tissus pourris (mm)

Souche Taux d'humidité	D14	A13	B74	S441
50°C	2,5	3,8	3,7	2,5
	2	4,6	5	2
	5	7,2	5,8	5
	6	5,5	4,1	6,7
	5,4	5,8	2,5	5
	2	6,7	2,2	2
86%	8,5	10	10	10
	10	10,4	8,5	9
	10,2	8	10	10
	10	8,2	10	8,2
	10,5	10	10	10
	11	10	8,2	6,8
100%	15	9,5	12	15
	11,8	8,6	11	8,7
	12,7	6,6	14,5	10,5
	15	12,5	13,5	15
	14,3	10	13,5	14
	15	9,8	14,9	15