

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

Thèse

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

**EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE DU FEU
BACTERIEN DES MALOÏDEES CAUSEE PAR
ERWINIA AMYLOVORA (BURILL).**

Présentée par : TAFIFET Lamia

Devant le jury composé:

| | | |
|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Pr. GUETARNI Djamel | Université de Blida 1 | Président |
| Pr. LAMARI Lynda | E.N.S Kouba | Examinatrice |
| Pr. MEKLAT Atika | Université de Blida 1 | Examinatrice |
| Pr. BOUREGHDA Houda | E.N.S.A. d'El Harrach | Examinatrice |
| Pr. BOUZNAD Zouaoui | E.N.S.A. d'El Harrach | Examineur |
| Pr. KRIMI Zoulikha | Université de Blida 1 | Directrice de thèse |

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019/2020

RESUME

L'objectif principal de cette thèse est de contribuer à faire progresser les connaissances sur le feu bactérien et son agent causal *Erwinia amylovora*. Des échantillons de poirier var. Santa Maria présentant des symptômes typiques du feu bactérien ont été collectés sur une période de trois années de la Mitidja, considérée comme la principale zone de production de poires du Nord de l'Algérie. Un total de 37 isolats *Erwinia-amylovora-like* a été identifié par une série de tests biochimiques, de pathogénicité et sérologiques. L'analyse moléculaire des souches confirme leur appartenance à l'espèce *E. amylovora*, la présence de régions géniques de pathogénicité à la fois sur le plasmide et sur le chromosome et la prévalence du plasmide pathogène pEA29, le plus abondant dans la nature.

L'analyse génomique de la diversité des souches algériennes d'*E. amylovora* isolées, a révélé 3 groupes avec des fragments identiques par BOX-PCR et 4 groupes par ERIC-PCR, montrant ainsi différents modèles génétiques entre les souches algériennes d'*E. amylovora*. Le typage moléculaire des souches algériennes en utilisant six VNTR et l'analyse MST révèlent la présence d'une diversité avec 4 haplotypes avec une variabilité allélique des 6 loci VNTR chez la population étudiée. L'analyse n'a pas créé de groupes distincts sur la base de l'année d'isolement. Un seul haplotype distinct a été trouvé à Attatba lorsque l'analyse est effectuée en tenant compte de l'origine géographique des souches.

Les résultats de l'étude épidémiologique des chancres ont montré une incidence et sévérité importantes du feu bactérien dans les vergers de 3 wilayas : Blida, Bouira et Boumerdés. Cette analyse fait état d'une situation phytosanitaire évoluant vers le dépérissement et un statut de vergers maitrisables par un entretien et surveillance réguliers des poiriers dans les vergers atteints.

L'efficacité de vingt antagonistes bactériens a été évaluée *in vitro* contre deux souches pathogènes d'*E. amylovora*. Quatre antagonistes (*Bacillus amyloliquefaciens* PF3, *Bacillus methylotrophicus* EHF5 et deux *Pseudomonas brassicacearum* CR2 et PS1), ont été sélectionnés pour effectuer le test de biocontrôle sur des poires immatures. Les résultats ont montré que les deux souches de *Pseudomonas* étaient les plus efficaces pour le traitement préventif, conduisant à une réduction de la nécrose allant jusqu'à 90%. Aucun effet curatif des quatre souches n'a été observé.

Ces antagonistes ont été étudiés pour des caractéristiques liées à l'activité de lutte biologique. Ils montrent une production de sidérophores et de biofilms et tolèrent différents paramètres de stress abiotiques de l'environnement avec des températures de croissance comprises entre 30 et 42°C, une halotolérance de 0,3M - 1M, une osmolarité de 20% - 40% et un pH compris entre 4 et 10.

Mots-clés: *Erwinia amylovora*, feu bactérien, épidémiologie, biocontrôle, VNTR.

ABSTRACT

The main objective of this thesis is to help advance knowledge about fire blight and its causative agent *Erwinia amylovora*. Samples from pear trees var. Santa Maria showing typical symptoms of fire blight were collected over a period of three years, from the Mitidja, the main pear production area in northern Algeria. A total of 37 *Erwinia amylovora*-like isolates were identified by biochemical, pathogenicity and serological tests. Molecular analysis of isolated and selected strains confirms their affiliation to the species *E. amylovora*, the presence of gene regions of pathogenicity both on plasmid and chromosome and the prevalence of the pathogenic and most abundant in nature, plasmid pEA29.

Genomic diversity analysis of *E. amylovora* Algerian isolated strains, revealed 3 groups with identical fragments using BOX-PCR and 4 groups by ERIC-PCR, showing different genetic models between the Algerian strains of *E. amylovora*. Molecular typing of Algerian strains using six VNTRs and MST analysis revealed the presence of 4 diverse haplotypes with allelic variability of 6 VNTR loci among studied population. The analysis did not create separate groups based on the year of isolation. A single distinct haplotype was found in Attatba when the analysis is carried out taking into account, the geographical origin of the strains.

Results of the epidemiological study of cankers showed a significant incidence and severity of fire blight in orchards located in three wilayas: Blida, Bouira and Boumerdes. This analysis shows a phytosanitary situation evolving towards dieback and the status of orchards that can be managed through regular maintenance and monitoring of affected pear trees.

In vitro efficacy of twenty bacterial antagonists was evaluated against two pathogenic strains of *E. amylovora*. Four antagonists (*Bacillus amyloliquefaciens* PF3, *Bacillus methylotrophicus* EHF5 and two *Pseudomonas brassicacearum* CR2 and PS1) were selected to perform the biocontrol test on immature pears. Results showed that strains of *P. brassicacearum* were the most effective for preventive treatment of the disease, leading to a reduction in necrosis severity of up to 90%. No curative effect of the four strains was observed.

These antagonists have been studied for characteristics related to biological control activity. They showed, production of siderophores and biofilms and tolerate various abiotic stress parameters of the environment with growth temperatures between 30 and 42 °C, halotolerance of 0.3M - 1M, osmolarity of 20% - 40% and a growth pH between 4 and 10.

Keywords: *Erwinia amylovora*, VNTR epidemiology, biocontrol, *Pseudomonas brassicacearum*, *Bacillus* spp.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الأطروحة هو المساعدة في تقدم المعرفة حول مرض النار البكتيرية والعامل المسبب له *Erwinia amylovora*. تم جمع عينات من شجرة الكمثرى صنف سانتا ماريا و التي تظهر عليها أعراضًا نموذجية لآفة النار البكتيرية على مدى ثلاث سنوات من المتيجة ، التي تعتبر المنطقة الرئيسية إنتاج الكمثرى في شمال الجزائر. تم التعرف على مجموعته مكونة من 37 عزلة شبيهة *Erwinia amylovora* من خلال سلسلة من الاختبارات البيوكيميائية ، الأمراض والاختبارات المصلية. يؤكد التحليل الجزيئي للسلاسل انتماؤها إلى النوع *E. amylovora* ، ووجود مناطق الجينات المسببة للأمراض على كل من البلازميد والكروموزوم وانتشار البلازميد الممرض pEA29 ، الأكثر وفرة في الطبيعة.

كشفت التحليل الجيني لتنوع السلاسل الجزائرية *Erwinia amylovora* المعزولة، عن وجود 3 مجموعات بها شظايا متطابقة بواسطة BOX-PCR و 4 مجموعات بواسطة ERIC-PCR ، وبالتالي تظهر نماذج وراثية مختلفة بين السلاسل الجزائرية لـ *Erwinia amylovora*. كشف التصنيف الجزيئي للسلاسل الجزائرية باستخدام ستة VNTRs و MST عن وجود تنوع مع 4 أنماط فردانية مع التباين الأليلي لـ 6 مواقع VNTR في العزلات المدروسة. لم ينشئ التحليل مجموعات منفصلة بناءً على سنة العزل. تم العثور على نمط فردي مميز واحد في حطاطية عند إجراء التحليل مع الأخذ بعين الاعتبار الأصل الجغرافي للسلاسل.

أظهرت نتائج الدراسة الوبائية لأعراض الكانكرز البكتيري تأثير المرض وخطورة المرض لآفة النار البكتيرية في البساتين في 3 ولايات: البليدة والبويرة وبومرداس. يوضح هذا التحليل تطور حالة الصحة النباتية نحو الوفاة وحالة البساتين التي يمكن العناية بها من خلال الحماية الدورية المنتظمة ومراقبة أشجار الكمثرى في البساتين المتضررة.

تم تقييم فعالية عشرين مضادًا بكتيريًا في المخبر ضد سلالتين ممرضتين من بكتريا *Erwinia amylovora*. تم اختيار أربعة مضادات (*Bacillus methylotrophicus* EHF5 ، *Bacillus amyloliquefaciens* PF3 ، *Pseudomonas brassicacearum* CR2 و PS1) لإجراء اختبار المكافحة الحيوية على ثمار الكمثرى غير الناضجة. أظهرت النتائج أن سلالتي *Pseudomonas* هما الأكثر فعالية في العلاج الوقائي، مما أدى إلى تقليل النخر البكتيري بنسبة تصل إلى 90%. لم يلاحظ أي فعالية في الاختبار العلاجي للسلاسل الأربعة.

تمت دراسة هذه المضادات للخصائص المتعلقة بنشاط المكافحة البيولوجية. إنها تُظهر إنتاج سيديروفور و الغشاء الحيوي وتقاوم معايير الإجهاد اللاحيوية المختلفة للبيئة مع درجات حرارة نمو تتراوح بين 30 و 42 درجة مئوية ، تتحمل الملوحة بين 0.3 م - 1 م و تتحمل أسمولية من 20% - 40% ودرجة حموضة بين 4 و 10.

الكلمات المفتاحية: *Erwinia amylovora* ، آفة النار البكتيرية ، علم الأوبئة ، المكافحة الحيوية ، VNTR

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail de recherche, j'aimerais exprimer ma reconnaissance et mes profonds remerciements et respects à ma directrice de thèse **Pr. KRIMI Zoulikha**, enseignante-chercheur à la faculté des sciences de Nature et vie à l'université de Blida1, responsable du Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agro-Biologiques, pour le grand honneur qu'elle me fait en acceptant de diriger cette présente thèse, pour sa rigueur, soutien scientifique et moral, sa disponibilité, sa grande compétence, ses nombreux encouragements ainsi que pour ses conseils précieux qui ont beaucoup enrichi ma recherche au sein du laboratoire et contribué au bon achèvement de cette thèse.

Mes vifs remerciements et ma gratitude s'adressent à **Pr. GUETARNI Djamel**, enseignant-chercheur à la faculté des sciences de Nature et vie à l'université de Blida1 d'avoir accepté de présider le jury. Mes sincères remerciements et ma gratitude vont également aux **Pr. BOUREGHDA Houda** et **Pr. BOUZNAD Zouaoui**, enseignants-chercheurs à l'ENSA El Harrach qui m'ont fait l'honneur d'accepter de lire cette présente thèse et de participer à ma soutenance en tant qu'examineurs. Mes sincères remerciements s'adressent également à **Pr. MEKLAT Atika** enseignante-chercheur à la faculté des sciences de Nature et vie à l'université de Blida1 et **Pr. LAMARI Lynda** enseignante-chercheur à l'ENS Kouba, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Pr. BENCHABANE Messaoud enseignant-chercheur à la faculté SNV à l'université de Blida1 pour son aide, soutien et précieux conseils, ainsi que tous mes enseignants et mes collègues en particulier Pr. DJAZOULI Z.E, Mme BENCHABANE D., Pr BELKAHALA H. Dr. M^{ed} MAHMOUD F., Dr. AIT SAADI N., Mme FADIL D. et l'ingénieur du Laboratoire de PVRAB Mme AMMAM S. pour sa présence, sa patience et sa disponibilité.

Je suis également très reconnaissante à Pr. OZACTAN Hatice (Ege University, Izmir), Dr. RAIO Aida (Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Italy), Dr. Cesbron Sophie (INRA-Angers) et Dr. HOLEVA Maria (Laboratory of Bacteriology, Greece) pour leur précieuse collaboration, contribution et excellents conseils.

Je remercie vivement mes proches formidables qui m'ont aidée à en arriver là : Mes Chers Parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes études par leur support continu, confiance, disponibilité et conseils pertinents, sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui, que Dieu vous garde et vous procure santé et longue vie; mes frères MOHAMED, IMAD et ma sœur SAMIRA qui ont eu énormément de patience, de disponibilité et d'aide pendant ces dernières années et qui ont été d'un grand support permanent; mon amie proche Mme LABDI H. pour son soutien moral, ses conseils et encouragements continus. Je remercie enfin tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités ici.

DEDICACES

Je dédie ce travail :

-A toute ma famille

-A toute l'équipe formidable du Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agro-Biologiques de l'Université de Bllida 1.

-A mes collègues de la faculté SNV, Département des Biotechnologies de l'Université de Bllida 1, en particulier Spécialité Biotechnologie Microbienne.

-A mes collègues de la faculté SNV-ST de l'Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira.

Lamia TAFIFET

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DÉDICACES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique sur le feu bactérien des maloidées, son agent causal *E.amylovora* et les méthodes de lutte 5

1. La culture des espèces de Maloidées en Algérie, facteurs de vulnérabilité 5

2. Le feu bactérien 7

2.1 Historique et répartition géographique 7

2.2 Symptomatologie du feu bactérien et gamme d'hôtes 8

2.3 Epidémiologie, transmission de la maladie et survie du pathogène 10

2.4. Impact économique du feu bactérien 13

3. L'agent causal *Erwinia amylovora*..... 14

3.1. Description taxonomique 14

3.2. Caractères culturels, biochimiques et physiologiques..... 15

3.3. Production d'enzymes extracellulaires et de métabolites secondaires 16

3.4. Propriétés sérologiques, génétiques et moléculaires 17

3.5. Facteurs du pouvoir pathogène et régulation de la virulence chez *E. amylovora* 18

3.5.1. Facteurs abiotiques favorisant l'infection..... 18

3.5.2 Facteurs de virulence bactériens et leurs déterminants génétiques 19

4. Méthodes de détection et d'analyse de la diversité génétique de la bactérie *E.amylovora* 23

4.1 Méthodes d'identification biochimiques, sérologiques et moléculaires 23

4.2 Application des marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité chez *E. amylovora* 24

5. Mesures de prévention et méthodes de lutte contre le feu bactérien 26

5.1 Statut réglementaire d'*Erwinia amylovora* et recommandations dans l'OEPP 26

5.2. Utilisation de variétés et portes-greffes résistants et sains, induction de la résistance chez les espèces sensibles et lutte culturale 27

5.3. Luttés chimiques et physiques..... 28

5.4. Lutte par utilisation des microorganismes agents de biocontrôle contre *E. amylovora* 29

5.5. Utilisation de méthodes innovantes dans la prédiction du feu bactérien 30

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES..... 31

1. Prospections et échantillonnages 31

1.1. Présentation de la zone d'étude 31

1.2. Diagnostic symptomatologique 32

2. Conditions de culture, isolement et purification 34

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 3. Caractérisation biochimique et physiologique des isolats..... | 34 |
| 4. Caractérisation du pouvoir pathogène des isolats..... | 37 |
| 4.1. Hypersensibilité sur le tabac..... | 37 |
| 4.2. Test de pathogénicité sur les poirettes | 37 |
| 5. Caractérisation sérologique par immunodosage à flux latéral..... | 38 |
| 6. Identification moléculaire par la PCR | 38 |
| 6.1. Amplification par le couple d'amorces (G1-F / G2-R)..... | 38 |
| 6.2. PCR duplex | 40 |
| 7. Evaluation de l'incidence du feu bactérien sur poirier au repos végétatif..... | 41 |
| 7.1. Description générale des vergers d'étude..... | 41 |
| 7.2. Evaluation du nombre de chancres | 42 |
| 7.3. Evaluation de la taille des chancres sur le tronc et les branches | 42 |
| 7.4. Incidence de la maladie | 43 |
| 7.5. Sévérité de la maladie | 44 |
| 8. Caractérisation de la diversité génétique des souches d'<i>E.amylovora</i> par les marqueurs BOX, ERIC et VNTR | 44 |
| 9. Essai de bioprotection contre les souches locales d'<i>E.amylovora</i> par des souches de <i>Bacillus</i> spp. et de <i>Pseudomonas</i> spp. | 48 |
| 9.1. Antagonisme <i>in vitro</i> | 48 |
| 9.2. Essai d'antagonisme <i>in planta</i> de bactéries endophytes <i>Bacillus</i> spp. et <i>Pseudomonas</i> spp. à l'égard des souches locales d' <i>E.amylovora</i> | 51 |
| 9.2.1. Matériel végétal..... | 52 |
| 9.2.2. Suspensions bactériennes et inoculation des fruits immatures du poirier | 52 |
| 9.2.3. Recherche d'un effet préventif | 53 |
| 9.2.4. Recherche d'un effet curatif | 53 |
| 9.2.5. Traitements et lecture des résultats | 54 |
| 10. Caractérisation des souches antagonistes pour leur potentiel d'utilisation en lutte biologique contre le feu bactérien..... | 55 |
| 10.1. Test de formation de biofilm | 55 |
| 10.2. Test de production de sidérophores | 55 |
| 10.3. Test de production de biosurfactants | 56 |
| 10.4. Test de motilité de types swimming et swarming | 57 |
| 10.5. Tolérance des bactéries antagonistes aux stress abiotiques | 58 |
| 11. Analyses statistiques des résultats..... | 59 |
| CHAPITRE III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS | 61 |
| 1. Ampleur de l'infection par le feu bactérien des vergers prospectés | 61 |
| 3. Résultats du pouvoir pathogène des isolats | 67 |
| 3.1. Réponse HR sur le tabac..... | 67 |
| 3.2. Résultats de la pathogénicité sur poires immatures..... | 68 |
| 4. Résultats de la caractérisation sérologique des isolats | 69 |
| 5. Identification moléculaire des souches bactériennes..... | 69 |
| 5.1 Résultats de l'amplification par le couple (G1-F / G2-R) | 69 |
| 5.2. Résultats de la PCR duplex..... | 70 |
| 6. Résultats de l'étude de l'ampleur des symptômes et de l'incidence du feu bactérien dans des vergers de poiriers durant le repos végétatif | 71 |
| 6.1. Evaluation des symptômes chancreux sur les troncs et les branches..... | 71 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 6.2. Evaluation de la taille des chancres sur les troncs et les branches..... | 73 |
| 6.3. Évaluation de l'incidence de la maladie | 74 |
| 6.4. Evaluation de la sévérité de la maladie..... | 75 |
| 7. Analyse de la diversité génétique des souches d'<i>E.amylovora</i> | 76 |
| 7.1 Typage génomique par BOX-PCR et ERIC-PCR..... | 76 |
| 7.2 Typage de la diversité génétique des souches d' <i>E. amylovora</i> par le marqueur VNTR | 80 |
| 8. Bioprotection par utilisation de bactéries endophytes vis-à-vis d'<i>E.amylovora</i>..... | 84 |
| 8.1. Antagonisme <i>in vitro</i> des bactéries endophytes à l'égard des deux souches d' <i>E.amylovora</i> E1 et E5..... | 84 |
| 8.2. Antagonisme <i>in planta</i> des souches endophytes à l'égard des deux souches d' <i>Erwinia amylovora</i> | 86 |
| 9. Résultats de la caractérisation de la performance des antagonistes en vue de leur application comme agents de biocontrôle..... | 90 |
| 9.1. Formation de biofilm | 90 |
| 9.2. Production de sidérophores..... | 92 |
| 9.3. Résultats du test de production de biosurfactants | 93 |
| 9.4. Motilité de types « swimming » et « swarming » | 94 |
| 10. Tolérance des bactéries antagonistes au stress abiotique | 95 |
| CHAPITRE IV : DISCUSSION..... | 99 |
| 1. Identification des souches d' <i>E. amylovora</i> isolées, responsables du feu bactérien en Algérie | 99 |
| 2. Suivi de l'incidence du feu bactérien au repos végétatif | 104 |
| 3. Diversité génétique des souches algériennes d' <i>E. amylovora</i> et épidémiologie du feu bactérien en Algérie..... | 106 |
| 4. Biocontrôle du feu bactérien par les bactéries endophytes, potentialités des souches sélectionnées..... | 110 |
| CONCLUSION..... | 118 |
| REFERENCES..... | 122 |
| ANNEXES..... | 140 |

LISTE DES ABREVIATIONS

OEPP : Organisation Européenne de la Protection des plantes

EPS : Exopolysaccharides

LPS : Lipopolysaccharide

ERIC : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

MLVA : Multiple Loci VNTR Analysis

PEG : Polyéthylène glycol

PCR : Réaction Polymérase en Chaîne

ams : Amylovoran synthesis

hrp : Hypersensitive response and pathogenicity

Kb : Kilo-base

var. : Variété

spp. : Espèces

UFC : Unité Formant Colonie

ha : Hectare

µl : Microlitre

M : Moles

mM : Milli-molaire

DO : Densité optique

EDS : Eau distillée stérile

LISTE DES FIGURES

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Les différents types de symptômes du feu bactérien sur le poirier | 9 |
| Figure 2 : Cycle de vie de la bactérie du feu bactérien <i>Erwinia amylovora</i> | 12 |
| Figure 3: Structure des gènes <i>hrp</i> d' <i>Erwinia amylovora</i> | 21 |
| Figure 4 : Localisation géographique des sites de prélèvements des échantillons symptomatiques du feu bactérien sur le poirier. | 33 |
| Figure 5 : Symptômes du feu bactérien observés sur le poirier..... | 62 |
| Figure 6 : Réponses aux tests biochimiques et physiologiques des souches isolées | 66 |
| Figure 7 : Réaction d'hypersensibilité : Développement de nécroses aux points d'inoculation sur le tabac..... | 67 |
| Figure 8 : Réponses des poirettes au test du pouvoir pathogène des isolats inoculés : Nécroses gagnant l'ensemble des fruits et exsudation d'oozes bactériens..... | 68 |
| Figure 9 : Réponses sérologiques au test Ea AgriStrip. | 69 |
| Figure 10 : Migration électrophorétique des produits d'amplification avec les amorces (G1-F / G2-R) d'un fragment d'ADN spécifique sur gel d'agarose à 1,5%..... | 70 |
| Figure 11 : Migration électrophorétique des amplifiats de la réaction PCR duplex par les amorces (AJ75, AJ76) et (AMSbL, AMSbR). | 70 |
| Figure 12 : Symptômes au repos végétatif de types chancre sur tronc et branches de poiriers préalablement infectés par le feu bactérien | 72 |
| Figure 13 : Evaluation du nombre de chancres des vergers atteints selon les classes du feu bactérien..... | 73 |
| Figure 14 : Nombre de chancres sur les troncs et les branches des poiriers infectés par le feu bactérien : selon la taille des chancres..... | 74 |
| Figure 15 : Taux d'infection par le feu bactérien dans les 11 vergers d'étude..... | 75 |
| Figure 16 : Sévérité du feu bactérien dans les vergers de poiriers selon l'indice de McKinney..... | 76 |
| Figure 17 : Electrophorèse des fragments issus des souches d' <i>E. amylovora</i> étudiées, obtenus par amplification avec l'amorce BOX (BOXA1R). | 78 |
| Figure 18 : Electrophorèse des fragments issus des souches d' <i>E. amylovora</i> étudiées, obtenus par amplification avec les amorces ERIC (ERIC1R, ERIC2). | 79 |
| Figure 19 : Minimal Spanning Tree (MST) des souches d' <i>E. amylovora</i> colorées selon l'année d'isolement. | 83 |
| Figure 20 : Minimal Spanning Tree (MST) des souches d' <i>E. amylovora</i> , colorées selon l'origine géographique. | 83 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 21 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'interaction de 20 souches antagonistes et <i>Erwinia amylovora</i> E1 et E5..... | 85 |
| Figure 22 : Antagonisme <i>in vitro</i> des bactéries endophytes des genres <i>Pseudomonas</i> spp. et <i>Bacillus</i> spp. sur les deux souches d' <i>Erwinia amylovora</i> E1 et E5 | 86 |
| Figure 23 : Indice du feu bactérien sur les poirettes dans le cas de la recherche d'un effet préventif..... | 87 |
| Figure 24 : Effet antagoniste préventif des souches de <i>P. brassicacearum</i> PS1 et <i>B. methylotrophicus</i> PF3 sur des poires immatures inoculées par <i>E. amylovora</i> (E1, E5) 7 jours après l'inoculation | 88 |
| Figure 25 : Poirettes inoculées par les souches d' <i>Erwinia amylovora</i> E1, E5 | 88 |
| Figure 26 : Traitement pour recherche d'un effet curatif de l'endophyte <i>B. methylotrophicus</i> PF3 contre la souche pathogène <i>E. amylovora</i> E1 sur les poires immatures..... | 89 |
| Figure 27 : Traitement pour recherche d'un effet curatif de l'endophyte <i>B. amyloliquefaciens</i> EHF5 contre la souche pathogène <i>E. amylovora</i> E5 sur les poires immatures..... | 90 |
| Figure 28 : Formation de biofilm par les souches endophytes <i>Bacillus</i> spp. EHF5, PF3 et <i>Pseudomonas</i> spp. CR2, PS1 20h après incubation..... | 91 |
| Figure 29 : Dosage spectrophotométrique (DO) de la production de biofilm par les quatre souches antagonistes à 3h, 5h et 20h après incubation..... | 91 |
| Figure 30 : Présentation graphique des résultats de la production de sidérophores des bactéries antagonistes sur le milieu King B. | 93 |
| Figure 31 : Présentation graphique des résultats de production de sidérophores des bactéries antagonistes sur le milieu succinate | 93 |
| Figure 32 : Capacité de production de biosurfactants des souches antagonistes après 36h. | 94 |
| Figure 33 : Motilité de type swimming (A) et swarming (B) des souches bactériennes antagonistes après 24 et 48h | 95 |
| Figure 34 : Activité de swimming (A) et swarming (B) des antagonistes après 24 et 48h d'incubation | 96 |
| Figure 35 : Effet du stress osmotique sur la croissance des bactéries antagonistes sélectionnées | 98 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Gamme des plantes hôtes du feu bactérien . | 10 |
| Tableau 2: Principales caractéristiques des plasmides décrits chez <i>Erwinia amylovora</i> . | 18 |
| Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel pour la réaction PCR avec les amorces G1-F/G2-R [187] | 39 |
| Tableau 4 : Vergers de poiriers étudiés pour l'analyse des symptômes de chancres induits sur les arbres, antérieurement atteints par le feu bactérien. | 42 |
| Tableau 5 : Evaluation du nombre de chancres des vergers étudiés | 43 |
| Tableau 6 : Evaluation de la taille des chancres des vergers atteints par le feu bactérien | 43 |
| Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel BOX-PCR | 45 |
| Tableau 8 : Composition du mélange réactionnel ERIC-PCR | 46 |
| Tableau 9 : Liste des amorces VNTR utilisées pour l'amplification des régions répétées et leurs caractéristiques de base | 47 |
| Tableau 10 : Souches bactériennes utilisées dans l'essai de lutte biologique <i>in vitro</i> | 50 |
| Tableau 11 : Protocole et traitements des différents tests d'antagonisme <i>in planta</i> | 54 |
| Tableau 12: Symptômes du feu bactérien observés sur les vergers prospectés | 63 |
| Tableau 13 : Réponses physiologiques et biochimiques des isolats d' <i>E. amylovora</i> des différentes localités prospectées | 65 |
| Tableau 14 : Analyse génomiques par BOX-PCR et ERIC-PCR | 77 |
| Tableau 15: Résultats de l'analyse MLVA effectuée sur vingt-cinq souches d' <i>E. amylovora</i> | 81 |
| Tableau 16: Coefficient catégoriel de 25 souches d' <i>E. amylovora</i> pour chaque VNTR | 82 |
| Tableau 17 : Croissance bactérienne des bactéries antagonistes testées à différentes températures | 96 |
| Tableau 18 : Croissance bactérienne à différents pH | 97 |
| Tableau 19 : Résultats de la croissance bactérienne des souches antagonistes sélectionnées à différentes concentrations de NaCl | 97 |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans le secteur agricole, l'arboriculture fruitière a été d'une grande importance ces dernières années, elle a pris un essor important par rapport aux superficies cultivées ainsi que la production en fruits, du fait de l'application du plan national de développement agricole (PNDA). La superficie des Rosacées en Algérie a pratiquement doublé en 10 ans, passant de 35 403 ha en 2001 à plus de 72 000 ha en 2011 [1]. Selon le Ministère de l'Agriculture, la production globale de l'arboriculture en termes de fruits a atteint 52,46 millions de quintaux en 2018 avec une disponibilité de 122,6 kg/habitant/an [2]. Toutefois, cette production subit chaque année des pertes de récolte assez élevées, provoquées par des ennemis de culture dont les dégâts s'évaluent en moyenne à 35% [3].

Comme toutes les cultures, les Rosacées à pépins dont, les Maloideae, sont confrontées à plusieurs problèmes d'ordre entomologique, viral, fongique et bactérien. Parmi les maladies bactériennes, la plus redoutable est le feu bactérien qui constitue un problème phytosanitaire menaçant [4].

Le feu bactérien est une maladie qui provoque des dommages sur les plantes hôtes sous forme de nécrose et de dessèchement des bouquets floraux et des rameaux entraînant un dépérissement progressif des arbres atteints et par conséquent des pertes considérables [5].

La bactérie *Erwinia amylovora*, l'agent responsable du feu bactérien de nombreuses plantes de Rosacées, est classée parmi les organismes pathogènes phytobactériens les plus destructeurs [6]. Ce pathogène de quarantaine, classé dans la liste A2 de l'Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP), appartient aux entérobactéries qui comprennent les bactéries aéro-anaérobies facultatives à Gram-négatives, mobiles et non sporulantes [7].

La bactérie *E. amylovora* pénètre la plante hôte principalement par les nectarthodes des fleurs et établit des infections systémiques [8]. Les symptômes comprennent le dépérissement et la brûlure des inflorescences des pousses, des feuilles, des fruits, du tronc ainsi que la production d'exsudats bactériens [9].

Des contaminations peuvent avoir lieu pendant toute la phase de végétation par temps chaud et humide, ces conditions environnementales favorables pour la croissance du pathogène, augmentent le risque de dissémination de la maladie.

C'est le cas des régions méditerranéennes dont ; la Grèce, la Turquie, le Liban et plusieurs pays d'Europe centrale, où le feu bactérien a causé des dommages importants [10]. A titre d'exemple, le feu bactérien a provoqué de graves épidémies au Liban et en Émilie-Romagne en Italie, où 500 000 arbres fruitiers ont été détruits [11; 12].

L'Algérie a été longtemps épargnée par le feu bactérien mais, au cours de cette dernière décennie, des symptômes similaires à cette maladie ont été détectés dans plusieurs vergers de poiriers, de néfliers et de pommiers. Suite à cet état de fait, le feu bactérien a été signalé et déclaré officiellement en 2011 dans différentes régions. Le premier foyer a été signalé dans des vergers de poiriers à Tipasa, puis à Blida, Médéa, Aïn Témouchent, Sidi Bel Abbes, Mascara, Boumerdès, Bouira et Béjaïa [13]. Ces nombreux foyers font état d'un total de 2014 vergers atteints par la maladie durant la période entre 2011 et 2015 et de 9 wilayas déclarées attaquées. De ce fait, l'éradication et l'incinération de 1330 ha des vergers attaqués a été appliquée par l'état où 360 agriculteurs ont été indemnisés pour un montant de plus de 46 millions de DA [14].

La lutte contre le feu bactérien comme toute lutte contre les organismes de quarantaine, se base essentiellement sur des méthodes préventives du fait de son caractère systémique. En Algérie, les mesures prophylactiques sont basées sur la surveillance des vergers des Rosacées et du matériel végétal en pépinière, les pratiques culturales au repos végétatif et en période de croissance, le contrôle de la transhumance des ruches ainsi que l'utilisation de fongicides comme l'Aliette Flash et le Funguron OH 50 WP [14].

En raison de ces limites, l'intérêt de la recherche pour trouver de nouvelles solutions pour le contrôle du feu bactérien a augmenté, y compris l'utilisation d'agents de lutte biologique microbiens. En effet, l'exploitation des potentialités des microorganismes vivant en interaction avec la plante comme moyens de lutte biologique, est une voie de plus en plus investie. Les microorganismes rhizosphériques ou endophytiques contribuant par la production de molécules actives, limitent les populations pathogènes agissant comme bioagresseurs [15].

Les microorganismes endophytes jouent un rôle important dans la protection de la plante contre les agressions biotiques et abiotiques. Ils vivent à l'intérieur des plantes hôtes sans causer de symptômes et peuvent exercer plusieurs interactions

avantageuses à la plante telles que ; la promotion de la croissance et l'induction de la résistance systémique [16].

Plusieurs formulations bactériennes biopesticides à l'égard du feu bactérien sont disponibles dans le commerce, tels que ; *Pseudomonas fluorescens* A506 [17], *Bacillus subtilis* QST 713 [18], *B. subtilis* BD170 [19] et *Lactobacillus plantarum* [20]. En Algérie, la lutte par utilisation de biostimulateurs de défense naturelle contre le feu bactérien est pratiquée, deux produits ; le Bion 50 WG et un régulateur de croissance Regalis sont utilisés [14]. Le principal mécanisme d'action de ces souches pour lutter contre le feu bactérien est basé sur la compétition par l'épuisement des nutriments et la colonisation des sites par les sidérophores [21]. Des recherches sont également menées dans le but d'améliorer l'efficacité de ces biopesticides ainsi que la sélection de nouvelles souches efficaces avec des mécanismes d'action variés [22].

En Algérie, très peu de recherches ont été consacrées à l'étude du feu bactérien et de sa bactérie *E. amylovora* [13]. Cette dernière étude a signalé la présence de symptômes caractéristiques du feu bactérien et a confirmé l'identité de la bactérie à l'origine de l'infection par nested-PCR [23].

L'analyse des séquences génomiques des isolats d'*E. amylovora* par utilisation de marqueurs moléculaires a été réalisée à l'aide de différents marqueurs Box, Eric, Rep et VNTR [24]. Ces derniers qui ont un pouvoir discriminant élevé permettent de distinguer différentes souches au sein d'une population génétiquement homogène [25].

L'analyse de répétition en tandem à nombres variables à plusieurs locus (MLVA) à l'aide de VNTR a déjà été utilisée avec succès pour effectuer le typage moléculaire d'*E. amylovora* [25] et de plusieurs autres espèces bactériennes telles que *Staphylococcus aureus* [26], *Acinetobacter baumannii* [27], *Mycobacterium tuberculosis* [28] et *Pseudomonas aeruginosa* [29]. Pour ces espèces, la technique VNTR s'est avérée très utile dans les études écologiques, épidémiologiques et évolutives.

La connaissance de la structure de la population d'*E. amylovora* contribue à notre compréhension de la façon dont le feu bactérien se propage sur une région géographique. D'une manière générale, la connaissance de la structure des populations d'agents pathogènes conditionne toute stratégie de prévision et de contrôle des maladies. L'analyse de la diversité génétique des populations

bactériennes d'*E. amylovora* n'a pas été investie dans le cas de l'Algérie, cet aspect de l'étude permet d'élucider la variabilité intraspécifique du pouvoir pathogène.

Le travail entrepris dans cette thèse a été réparti selon les volets suivants :

- Une synthèse bibliographique faisant le bilan des connaissances actuelles sur le pouvoir pathogène de la bactérie *Erwinia amylovora*, le feu bactérien des Maloidées et les méthodes de lutte. Ces données sont à l'origine des travaux mis en place et des techniques développées dans le cadre de cette thèse.
- L'étude expérimentale a débuté par une enquête symptomatologique au niveau de vergers de poiriers principalement dans les régions atteintes par le feu bactérien à savoir, celles de la Mitidja centrale. Des échantillonnages pour une période entre 2014 et 2017 ont été effectués au moment de l'apparition de la maladie avec les symptômes spécifiques dans le but d'isoler et d'identifier l'agent causal *E. amylovora*.
- Une caractérisation biochimique et biologique a été effectuée dans un premier temps afin d'identifier les isolats *Erwinia-amylovora-like*. Par la suite, nous avons recouru à l'analyse moléculaire par PCR et par duplex-PCR afin de confirmer l'identité des souches isolées.
- L'étude de l'incidence et de la sévérité du feu bactérien des vergers de poiriers au repos végétatif a été réalisée dans 3 wilayas, Blida, Bouira et Boumerdés pour caractériser leur état sanitaire.
- L'analyse de la diversité par BOX-PCR, ERIC-PCR et des répétitions en tandem à nombres variables à plusieurs locus (MLVA) à l'aide des VNTR, a été utilisée pour effectuer le typage moléculaire des souches algériennes d'*E. amylovora*.
- Enfin, pour apporter une solution au problème du feu bactérien, un essai de bioprotection *in vitro* et *in planta* contre *E. amylovora* a été mené par l'utilisation de souches antagonistes locales apparentées aux genres *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp.
- Dans le but de pouvoir utiliser ces bactéries ultérieurement comme des formulations de bioinoculants, nous avons étudié une série de tests utilisés couramment pour la validation des souches en tant qu'agents potentiels de biocontrôle.

CHAPITRE I:
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE FEU BACTÉRIEN DES MALOÏDEES, SON AGENT CAUSAL *ERWINIA AMYLOVORA* ET LES MÉTHODES DE LUTTE

1. La culture des espèces de Maloïdées en Algérie, facteurs de vulnérabilité

La famille des Rosacées regroupe les espèces à noyaux et à pépins. La sous-famille des Rosacées Maloideae, dont les fruits charnus portent des pépins, est écologiquement et économiquement un groupe important de plantes ligneuses particulièrement abondant dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord [30].

Les exemples familiers des genres de Maloideae incluent ; le pommier (*Malus*), le poirier (*Pyrus*), le cognassier (*Cydonia*), le cognassier japonais (*Chaenomeles*), le sorbier (*Sorbus*), le néflier (*Eriobotrya*), l'amélanchier (*Amelanchier*), le cotonéaster (*Cotoneaster*), l'aubépine (*Crataegus*) et l'épinette (*Pyracantha*) [30].

Dans la sous famille des Maloideae, le pommier, le poirier et le cognassier, sont les espèces les plus couramment cultivées en Algérie du fait que les conditions pédoclimatiques favorables pour le développement de ces espèces fruitières sont disponibles.

L'arboriculture fruitière prend une grande extension dans tout le bassin méditerranéen, comme elle fait partie intégrante de la vie économique et sociale de l'Algérie. En effet, le verger arboricole et viticole mené en irrigué couvre une superficie de plus en plus croissante. Cette superficie a connu une augmentation durant la période 2010-2017 de 47% par rapport à la décennie 2000-2009, avec une extension de la superficie consacrée uniquement pour les espèces à noyaux et à pépins de 56% [31].

Les Rosacées, principalement pommes et les poires, dépassent les 20% de la production nationale avec 36 % des vergers de la Mitidja. Il est à noter également que plus de 75% des pépinières algériennes de plants arboricoles et horticoles se trouvent dans la Mitidja [32]. La Mitidja est caractérisée par un climat méditerranéen subhumide à hiver doux à froid et pluvieux avec une précipitation moyenne de 600 mm et à été chaud et sec [33]. Ce sont des conditions optimales et favorables pour le développement de plusieurs maladies comme le feu bactérien. Les précipitations atteignent leur apogée en décembre, janvier et février, mois qui donnent environ 30 à

40 % des précipitations annuelles selon l'Agence Nationale de Développement de l'Investissement [34].

Le vent, la grêle, la gelée et le brouillard sont des accidents climatiques, qui peuvent participer dans l'apparition et la diffusion de la maladie, ceci dans le cas où le nombre de jours est élevé et qu'ils coïncident surtout avec la période de la floraison [9].

En Algérie, la culture du pommier et du poirier est en progression durant ces dernières décennies. Selon un rapport de l'INRA, les trois variétés de poirier les plus fréquentes en Algérie sont; Santa Maria, Williams Rouge et Dr Jules Guyot et les variétés de pommier sont ; Golden Delicious (80%), Starkrimson, Red Spur et Richard [35].

A partir de l'année 2011, la superficie des vergers a évolué de 70%, ce qui correspond à une augmentation annuelle de 13% avec une production de 40% [36]. Par conséquent, elle traduit l'importance de ces espèces et leur large éventail de débouchés de récoltes (fruits frais, confiture, jus de fruits et utilisation en pâtisserie).

Le même rapport du ministère de l'agriculture souligne qu'en 2018, la hausse de la valeur de la production fruitière nationale a atteint 197,8 milliards de dinars, contre 121,6 milliards en 2010, soit une augmentation de 63%. Le volume des exportations de l'Algérie en fruits à noyaux et à pépins en 2017, a été de près de 409 tonnes vers plusieurs marchés comme l'Espagne, le Viêtnam, la Thaïlande, la Russie et les Emirats [31].

Malgré la relative amélioration de la production due en partie à l'extension des surfaces et non à l'accroissement des rendements, le secteur de l'arboriculture fruitière reste confronté à certaines contraintes qui limitent son expansion et parmi lesquelles ; la non maîtrise des maladies et des ravageurs par les agriculteurs et la diminution des disponibilités en froid. Aussi, les changements des conditions climatiques comme la sécheresse, les attaques de ravageurs ou les flambées de maladies, exigent également des variétés mieux adaptées [31].

L'introduction de nouvelles espèces et variétés notamment celles à noyaux et à pépins n'a pas toujours fait l'objet de précautions d'usage nécessaires pour évaluer les risques et apprécier leur comportement en matière de maladies. Il faut signaler que dans le cadre du PNDA, on assiste à une augmentation des importations de plants, suite à la baisse des taxes douanières et au soutien du programme de plantations par l'état [37].

Comme beaucoup de plantes cultivées, le poirier et le pommier sont sujets à de nombreuses maladies (feu bactérien, tavelure, alternariose, oïdium, viroses) et ravageurs (acariens, cécidomyies, punaises) [38; 39].

Parmi ceux-ci, le feu bactérien une maladie sporadique d'importance dans les vergers, et l'une des maladies les plus dévastatrices dans le monde. Dans des conditions climatiques optimales, cette maladie peut détruire la totalité d'un verger en une seule saison de croissance, avec un impact économique qui génère des pertes financières non négligeables pour les producteurs [40].

2. Le feu bactérien

2.1 Historique et répartition géographique

Le feu bactérien a été observé pour la première fois en 1780 en Amérique du Nord. Au début des années 1900, il a été signalé au Canada, de l'Ontario à la Colombie-Britannique en 1911 et au Mexique en 1921. Depuis 1924, la maladie s'est propagée sur toutes les zones productrices du poirier et du pommier du Canada et du Mexique [41].

La propagation à longue distance déclarée du feu bactérien de l'Amérique était de Nouvelle-Zélande en 1919, au Royaume-Uni et l'Europe du Nord à la fin des années 1950 et dans la région méditerranéenne et l'Afrique du Nord dans les années 1960 [41].

En Europe, cette bactérie a été déclarée sur la plupart du territoire européen comme l'Allemagne, la Suisse, l'Espagne, la Hongrie, l'Italie, la Grèce et la Roumanie. En France, les premiers foyers ont été découverts en 1972 [42].

Sur le continent africain, la maladie s'est propagée à travers l'Égypte en 1962, constituant le premier pays d'Afrique contaminé par cette maladie [43]. En 2006, *Erwinia amylovora*, a été détectée au Maroc et s'est propagée rapidement dans les régions productrices de fruits à pépins [44]. Depuis sa découverte, le feu bactérien s'est propagé à plus de 50 pays [5]. Rhouma *et al.*, [45] ajoutent que la maladie s'est répandue en Tunisie en 2012.

L'Algérie, a été longtemps épargnée du feu bactérien, mais au cours de ces dernières années, des symptômes similaires à cette maladie ont été détectés dans plusieurs vergers de poirier et de néflier [13]. La présence d'*Erwinia amylovora* en Algérie a été confirmée officiellement en 2011 [46; 13].

En effet, la présence d'*Erwinia amylovora* a été confirmée en 2011 par la Direction de la Protection des Végétaux et des Contrôles Techniques (DPVCT), dans différentes régions du pays à l'exemple de ; Aïn Témouchent, Tlemcen, Oran, Mascara, Ain Defla, Blida, Boumerdès, Bouira, Béjaïa, Tizi Ouzou, Constantine, Mila, chlef, Médéa, Alger et Tipaza [47].

2.2 Symptomatologie du feu bactérien et gamme d'hôtes

Le nom «feu bactérien» est descriptif du symptôme le plus typique de la maladie, soit un noircissement (mélanisation) des brindilles, des fleurs et du feuillage [9].

Le premier symptôme de la maladie se manifeste sur les fleurs qui apparaissent en premier imbibées d'eau, puis flétrissent, brunissent et se dessèchent (figure 1A). Les fleurs infectées peuvent tomber ou rester attachées à l'arbre, étant un symptôme utile dans la détection des arbres malades à distance [48]. Les pousses deviennent brun foncé à noir chez le poirier et rouge au brun foncé chez le pommier. L'infection des pousses en croissance se traduit souvent par le symptôme de recourbement en crosse caractéristique, qui est accompagné par une décoloration gris-noir de la tige et des feuilles attachées. Les feuilles noircissent et restent également sur l'arbre (figure 1B) [49].

Les fruits peuvent être affectés depuis le début de leur formation jusqu'à maturité. Ils présentent un aspect humide et plus tard s'assombrissent et produisent une nécrose. A l'automne, les fruits se momifient sur l'arbre [50] (figures 1 C et D).

Un symptôme caractéristique particulier de cette maladie est la capacité de produire un exsudat bactérien (bacterial oozes) sur les organes touchés (fleurs, bourgeons, feuilles, fruits, branches et le tronc). L'exsudat bactérien contient principalement des polysaccharides bactériens et le sorbitol de la plante. Les exsudats se présentent sous forme de gouttelettes et / ou de filaments mucilagineux blanchâtres ou jaunâtres [51]. Ils constituent une importante source d'inoculum et facilitent amplement la dispersion des bactéries. Il est plus fréquent de voir ces exsudats lorsque l'humidité est élevée, tôt le matin ou après la pluie ou des orages [52].

Les chancres apparaissent comme un résultat de lésions nécrotiques dans le tronc d'arbre, et sont les sites où les bactéries passent l'hiver (figure 1E). Lorsque le cortex est soulevé dans la zone d'un chancre, des nécroses à aspect humide de couleur brun rougeâtre sont observées dans le parenchyme cortical [9].

Depuis sa première observation à New York en 1780 sur le pommier [53; 54], le feu bactérien a été décrit sur plus de 200 espèces de plantes de 40 genres appartenant à la famille des Rosacées [55]. Cependant, la plupart des espèces concernées appartiennent à la sous-famille des *Maloïdeae*. Les genres les plus souvent affectés sont ; *Pyrus* (poirier), *Malus* (pommier), *Cydonia* (cognassier) et *Eriobotrya* (néflier du Japon) (tableau 1).

Quant aux plantes spontanées servant de réservoir à la bactérie ; elles comprennent des plantes ornementales et forestières apparentées aux genres *Crataegus*, *Chaenomeles*, *Cotoneaster*, *Photinia*, *Pyracantha*, *Sorbus* et *Stranvaesia* [5; 56].

Des infections naturelles de *Rubus* spp. chez les *Rosoideae* [55] et diverses espèces de *Prunus* chez les *Prunoideae* ont permis de les signaler également comme espèces hôtes du feu bactérien [57; 58; 59].

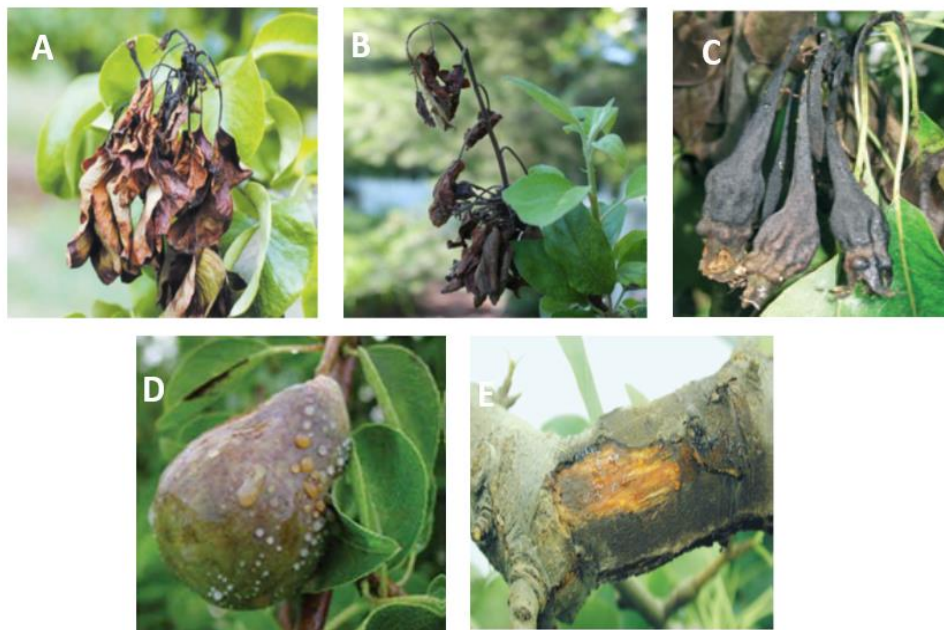


Figure 1 : Les différents types de symptômes du feu bactérien sur le poirier
(A) : Pousses infectées par le feu bactérien [60]. **(B)** : Feuilles et Fleurs infectées, finissent par se flétrir, pourrissent et brunissent [9]. **(C)** : Fruits immatures momifiés avec exsudats [7]. **(D)** : Noircissement des fruits de poirier (nécrose) et exsudats [60]. **(E)** : Chancre du feu bactérien montrant des nécroses sous l'écorce [61].

Tableau 1 : Gamme des plantes hôtes du feu bactérien [9].

| | Nom latin | Nom commun |
|---------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|
| Fruits à Pépins | <i>Malus domestica</i> | Pommier y compris pommier d'ornement |
| | <i>Pyrus communis</i> | Poirier y compris poirier d'ornement et nashi |
| | <i>Cydonia oblonga</i> | Cognassier |
| Arbustes d'ornement | <i>Chaenomeles japonica</i> | Cognassier du Japon |
| | <i>Cotoneaster horizontalis</i> | Cotoneaster |
| | <i>Pyracantha coccinea</i> | Pyracantha ou buisson ardent |
| | <i>Mespilus germanica</i> | Néflier d'Allemagne |
| | <i>Eriobotrya japonica</i> | Néflier du Japon |
| | <i>Photinia ou Stranvaesia</i> | Stranvaesia |
| Arbustes Sauvages | <i>Crataegus oxyacantha</i> | Aubépine |
| | <i>Sorbus spp.</i> | Alisier et sorbier |
| | <i>Amelanchier canadensis</i> | Amélanchier du Canada |

2.3 Epidémiologie, transmission de la maladie et survie du pathogène

La connaissance de l'épidémiologie d'une maladie est essentielle pour l'efficacité

de son contrôle. Ceci est particulièrement indispensable dans le cas du feu bactérien, une maladie sporadique qui provoque des dommages graves et produite par des bactéries qui se propagent facilement (figure 2).

La bactérie *E. amylovora* peut se conserver dans le verger sur les tissus vivants limitant les chancres au niveau des rameaux et du tronc sous forme d'exsudats [62].

Pendant le repos végétatif, les fruits momifiés restant attachés à l'arbre peuvent aussi constituer une source d'inoculum primaire. Les bourgeons infectés de l'année précédente constitueront une source potentielle d'inoculum dans les vergers où il n'y a pas de chancres [63].

Au printemps, l'exsudat bactérien produit à l'extrémité des chancres est disséminé sur les fleurs ouvertes et les feuilles terminales par le vent et la pluie ou au moyen d'insectes tels que les mouches et les fourmis qui transmettent la bactérie aux jeunes pousses et fleurs. Les abeilles au moment de la pollinisation disséminent *E. amylovora* d'une fleur à une autre au moment du prélèvement du nectar. Le matériel de travail comme le sécateur peut aussi constituer un moyen de dissémination de la bactérie d'un arbre à un autre et d'un verger à un autre [64].

Les conditions météorologiques chaudes, comme une température supérieure à 15 °C, permettent une activité plus intense des insectes pollinisateurs résultant de la diffusion bactérienne rapide à partir des fleurs colonisées à celles non-colonisées [9].

La bactérie pénètre dans les jeunes pousses et les jeunes feuilles par des voies multiples telles que les nectaires floraux, les stomates, les lenticelles, les hydathodes et les blessures [65]. A l'intérieur des tissus floraux, la bactérie pénètre à travers le stigmate, les pétales et envahit rapidement le nectaire [66].

La bactérie *E. amylovora* se multiplie d'une manière épiphyte sur la surface des stigmates au niveau des fleurs et sa population s'amplifie rapidement. Durant cette multiplication, le niveau de la population devient une source d'inoculum secondaire permettant la dissémination aux autres arbres. Le pathogène se déplace des surfaces stigmatiques aux nectaires, qui constituent la porte principale d'entrée aux tissus de la plante hôte [67].

Une fois la bactérie est à l'intérieur de la plante, elle se multiplie dans les espaces intercellulaires et se déplace rapidement à travers le parenchyme cortical mais elle peut aussi atteindre les vaisseaux du xylème où elle se déplace contre le flux ascendant de la sève [68]. L'infection progresse dans les tissus lignifiés et produit des chancres permettant l'hivernation de la bactérie [67].

Afin de poursuivre le cycle de la maladie, *E. amylovora* doit survivre en hiver sur les plantes hôtes en dormance où elle survit exclusivement dans les tissus de l'écorce vivant le long des marges des chancres sur les hôtes qui ont été infectés au cours des saisons de croissance précédentes [69].

La survie de l'agent pathogène dans les chancres s'arrête ou est réduite au cours de la période après la chute des feuilles et quand la température est basse. Souvent, une couche liégeuse est formée sur les chancres qui arrêtent la propagation de l'agent pathogène dans les tissus sains. Traversa et Mazzucchi [70], ont constaté qu'*E. amylovora* peut survivre pendant une année dans des greffons asymptomatiques plantés, ce qui suggère qu'elle peut subir une phase endophytique prolongée et asymptomatique. Dans ce même sens, Sobiczewski *et al.*, [71], ont confirmé la présence d'ADN bactérien dans les pousses latérales asymptomatiques en utilisant des méthodes basées sur la PCR.

La survie d'*E. amylovora* a été démontrée jusqu'à deux ans dans les bourgeons sains et tissus adjacents des chancres dans une expérience en serre contrôlée. Les bactéries isolées étaient virulentes sur les pousses de poiriers. Plusieurs auteurs ont

indiqué que les chancres des arbres plus âgés et plus grands constituent des sources potentielles d'inoculum. Au printemps, les bactéries se multiplient aux marges et dans les tissus adjacents de l'écorce des chancres indéterminés actifs et les exsudats contenant des bactéries viables forment une source d'inoculum primaire pour démarrer le cycle de la maladie à la floraison [8].

La survie d'*E. amylovora* en tant qu'épiphyte et endophyte est liée à un mode de nutrition biotrophique possible ou dans certains cas, une période de dormance. Santander *et al.*, [69] ont étudié les réponses cellulaires, physiologiques et moléculaires de souches d'*E. amylovora* sous privation de nutriments et ont établi qu'après plus de 40 jours, les cellules bactériennes 'affamées', issues de souches isolées de *Crataegus* spp. et de *Malus domestica*, ont maintenu leur virulence et leur pathogénicité au même niveau que les cellules non stressées. Ces données indiquent qu'en passant à l'oligotrophie, l'agent pathogène est capable de s'adapter à des conditions environnementales défavorables [68].

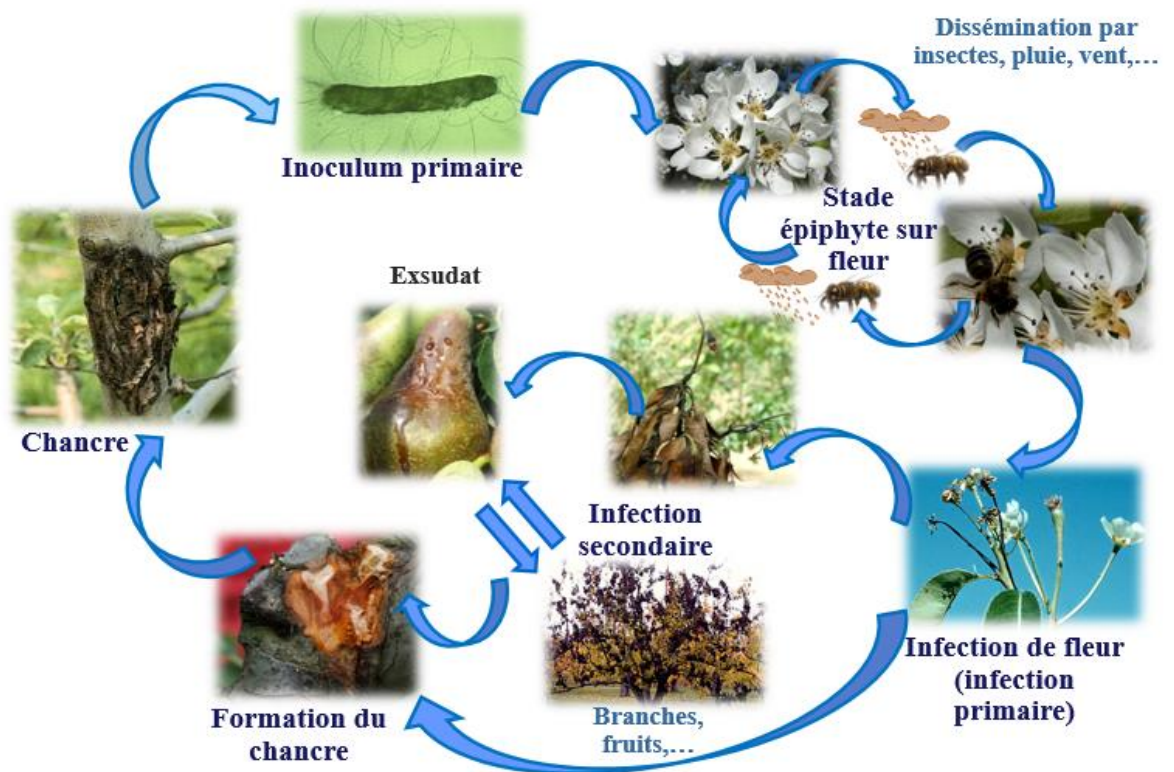


Figure 2 : Cycle de vie de la bactérie du feu bactérien *Erwinia amylovora* [72].

2.4. Impact économique du feu bactérien

Le feu bactérien est la maladie la plus destructrice sur les Rosacées à pépins. Elle provoque des dommages considérables sur les plantes hôtes en induisant la perte de la production en une saison [12]. De même, la présence de la maladie dans un pays est une contrainte importante pour les exportations.

Ce pathogène a provoqué de graves dégâts dans les pays méditerranéens où il est présent. Une grande partie des cultivars de poiriers sensibles telles que ; Passe Crassane, Général Leclerc, Santa Maria et Williams, ont subi des pertes considérables et sont en voie de disparition [73].

En 1978, au Sud-Ouest de la France, le feu bactérien a conduit à l'élimination dans le cadre de mesures d'éradication de la plupart des vergers de la variété de poire Passe-Crassane avec des conséquences sociologiques et économiques sérieuses [74]. Au début de 1996, le feu bactérien a été identifié pour la première fois en Hongrie et à la fin de cette même année, 47 000 arbres de pommiers, 8700 cognassiers, 8 200 poiriers, 1 000 néfliers (*Mespilus germanica*) et 600 arbustes de différentes plantes ornementales ont été éradiqués à un coût de 1,1 million \$ [75; 76].

Depuis 1994, plus de 10 000 poiriers et pommiers ont dû être détruits en Suisse allemande à cause du feu bactérien [77]. En Italie durant l'année 1997, 500.000 arbres fruitiers ont été détruits en raison du feu bactérien [78]. En 1998, les pertes ont été estimées à plus de (68 millions \$) à l'Etat de Washington et le nord d'Oregon [5]. En Égypte, en 1988, le feu bactérien a détruit 80% de toutes les superficies de poiriers, ce qui a entraîné l'éradication de 50% des arbres [79]. Au Maroc, les pertes ont été estimées à environ 360.000 € [80].

En 2014, une épidémie en Nouvelle-Écosse au Canada, a touché 90% des vergers de pommiers. Elle a été propagée par l'ouragan Arthur et a causé des dommages estimés à 20 millions de dollars, du fait de la suppression de 45 à 90 000 arbres [81].

Aux États-Unis seulement, les pertes liées au feu bactérien et les coûts de gestion sont estimés à plus de 100 millions de dollars par an. En 2016, dans le nord de l'état de New York, le feu bactérien a causé entre 10 et 14 millions de dollars de pertes dues à la mort des arbres, à la perte de récoltes, aux coûts de main-d'œuvre nécessaire à la taille des parties de la plante brûlée et aux traitements estivaux [81].

3. L'agent causal *Erwinia amylovora*

3.1. Description taxonomique

Le genre *Erwinia* qui doit son nom à la mémoire du pathologiste Erwin F. Smith, a été initialement créé pour regrouper les entérobactéries associées aux plantes [54 in 82]. Par conséquent, les membres de ce genre comprenaient aussi des entérobactéries saprophytes écologiquement associées aux plantes et pathogènes des humains et des animaux [83].

Grâce aux progrès des techniques moléculaires, le genre *Erwinia* a été classé en quatre groupes phylogénétiques sur la base de la comparaison des séquences de l'ADN ribosomal 16S [84].

Le **Groupe I (genre *Erwinia*)** représente la vraie *Erwinia* et comprend plusieurs espèces qui produisent une nécrose ou flétrissement des plantes ou épiphytes. Ce groupe comprend des espèces pathogènes comme *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. mallotivora*, *E. papayae*, *E. psidii*, *E. rhapontici*, ou épiphytes comme *E. billingiae*, *E. toletana*, *E. trachaephila*, *E. aphidicola*, *E. persicina*, et *E. tasmaniensis* [85].

Le **groupe II (genres *Pectobacterium* et *Dickeya*)** regroupent des espèces qui causent la pourriture molle chez une large gamme d'hôtes en raison de leur activité pectinolytique élevée.

Le **groupe III (genre *Brenneria* et espèce *Dickeya Paradise*)** comprend plusieurs espèces qui affectent les plantes ligneuses produisant généralement les chancres et les exsudats.

Le **groupe IV (genre *Pantoea*)** comporte des espèces qui sont saprophytes ou plus ou moins fréquemment pathogènes aux plantes, animaux et humains [85].

La taxonomie de cet agent pathogène telle que rapportée dans le Bergey Manual of Systematic Bacteriology se présente comme suit [86] :

Domaine : *Bacteria*, Phylum: *Proteobacteria*, Classe: *Gammaproteobacteria*,
Ordre: *Enterobacteriales*, Famille: *Enterobacteriaceae*, Genre: *Erwinia*, Espèce:
Erwinia amylovora.

3.2. Caractères culturels, biochimiques et physiologiques

La bactérie *E. amylovora* présente une grande uniformité phénotypique, toutes les souches montrent certaines caractéristiques de base, à la fois culturelles et physiologiques, qui peuvent être différenciées des autres *Erwinias* [87; 82]. Selon le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8e édition [86], *Erwinia amylovora* est un bacille à Gram-négatif aux extrémités arrondies, anaérobie facultative et de taille de 0,3 x 1-3 um. Cette bactérie est munie de 2-7 flagelles péritriches et peut être entourée par une capsule exopolysaccharide [5].

La cellule bactérienne *E. amylovora* se déplace en utilisant ses flagelles et la motilité semble importante au cours du processus d'infection. En fait, Bayot et Ries, [88], démontrent que les fleurs du pommier inoculées par une suspension cellulaire d'*E. amylovora* mobiles développe une incidence plus élevée que les fleurs inoculées avec des cellules non-mobiles.

La morphologie des colonies d'*E. amylovora* dépend fortement des milieux et des conditions de croissance. Les colonies typiques sont de couleur : rouge à orange sur le milieu MS ; blanches, petites, circulaires et mucoïdes, non fluorescentes sur le milieu King B; bombées, muqueuses, blanchâtres et lisses sur le milieu levane [89; 7].

La bactérie *E. amylovora* présente une capacité de transformation du sucrose en substances réductrices; la production d'acide à partir des composés organiques (le ribose, le tréhalose, le glucose). Elle utilise le citrate, le formiate et le lactate comme sources de carbone et d'énergie, mais pas le tartrate ou le galacturonate malonate. La plupart des souches poussent sur le mélibiose et le sorbitol comme source de carbone. Les sources d'azote utilisées par les souches d'*E. amylovora* sont ; l'isoleucine, la méthionine et la thréonine [84]. *E. amylovora* peut également utiliser l'aspartate comme source d'azote, cet acide aminé représente 58% des acides aminés totaux dans les pousses de pommier [90; 91].

L'analyse du métabolisme de l'azote révèle qu'*E. amylovora* diffère des autres genres de la famille des *Enterobacteriaceae*, vu qu'elle ne réduit pas le nitrate en nitrite.

La température de 18 °C est considérée comme significative dans l'épidémiologie de la maladie. *E. amylovora* possède une gamme large de températures de croissance (de 4 °C à 37 °C), la température optimale étant de 28 °C [5].

Chez *E. amylovora*, la cellule bactérienne est entourée d'une couche de polysaccharides constituée de galactose, de glucose, de mannose, d'acide uronique

et organisée en capsule, formant l'exopolysaccharide constitué principalement de deux types de polysaccharides l'amylovorane et le levane [11]. L'amylovorane est composé de galactose, du glucose, du mannose et de l'acide uronique, tandis que le levane est un polyfructose. Ces deux polysaccharides sont impliqués dans la pathogénicité [82].

Les EPS (exopolysaccharides) jouent des rôles multiples et complexes dans l'interaction entre les bactéries et leurs environnements [92]. Les fonctions comprennent un rôle clé dans la pathogénèse et la virulence bactérienne [93]. L'adhérence à la surface, en tant que constituant majeur du biofilm de type glycocalyx et en tant que composant qui rend la cellule sensible ou résistante aux attaques des bacteriophages, est assurée par la structure polysaccharidique [92].

L'EPS empêche la dessiccation cellulaire en mettant les nutriments et l'eau à proximité immédiate de la cellule bactérienne. L'ensemble amylovorane et levane sont nécessaires pour la formation de biofilm [92]. Des cellules *in vitro* dépourvues d'amylovorane ont été incapables de se fixer à un substrat de croissance pour initier la formation de biofilm et des mutants déficients en levane ont donné lieu à la formation d'un biofilm réduit [94].

3.3. Production d'enzymes extracellulaires et de métabolites secondaires

Plusieurs enzymes impliquées dans l'interaction plante-pathogène ont été spécifiquement étudiées chez *E. amylovora*.

La β -glucosidase est une enzyme particulièrement intéressante car elle est rapportée pour conduire à la formation de glucose à partir de l'arbutine et de l'hydroquinone, un composé en commun chez le pommier. Il a été montré qu'*E. amylovora* présente une faible activité glucosidase qui dépend fortement du milieu de croissance. Néanmoins, l'hydroquinone a été démontrée comme étant toxique pour *E. amylovora* [95].

Comme cela a été montré par Seemüller et Beer [96], aucune activité pectolytique, xylolytique ou cellulolytique n'a été détectée au cours du développement de la maladie. A l'inverse, des protéases neutres ont été produites par les bactéries dont, une a été isolée à partir de l'exsudat de plantes malades et l'autre à partir de tissu végétal infecté [11].

Dans la recherche de molécules toxiques produites par *E. amylovora* qui pourraient être responsables de la pathogénicité, la DHP (2,5- dihydrophenylalanine),

considérée comme une necrotoxine, est produite par les deux formes virulentes et non virulentes de cette bactérie [97].

3.4. Propriétés sérologiques, génétiques et moléculaires

Il a été rapporté qu'*E. amylovora* comporte plusieurs déterminants antigéniques comprenant le lipopolysaccharide (LPS) avec ou sans chaîne latérale; l'antigène GAI, polysaccharide commun à tous les membres du groupe "amylovora"; l'antigène TV appartenant à des exopolysaccharides capsulaires et présent seulement dans les souches pathogènes et des antigènes GAJ détectés dans le matériel muqueux extracellulaire en culture pure [98]. Cependant, selon Gorris *et al.*, [99], aucune relation n'a pas été trouvée entre les caractéristiques sérologiques et la pathogénicité d'*E. amylovora*.

Dans le protocole de diagnostic, l'agglutination avec un antisérum d'*E. amylovora* est la méthode la plus rapide et précise de détermination de l'espèce du fait que cette dernière est sérologiquement homogène et présente quelques agglutinogènes en commun avec les espèces apparentées ou avec les saprophytes trouvés dans le matériel malade [66].

Le génome d'*E. amylovora* est constitué d'un chromosome circulaire de (3,8 Mb) et de deux plasmides: AMYP1 (29 Kb), appelé PEA29 qui semble jouer un rôle dans la pathogénicité quantitative, au moins chez certaines souches et le plus grand plasmide AMYP2 (72 Kb), nommé pEA72 [100],

Plusieurs travaux ont montré l'existence de plusieurs plasmides chez différentes souches d'*E. amylovora* [101; 102]. Le tableau 2 présente la diversité plasmidique et leurs tailles correspondantes de plusieurs souches d'*E. amylovora* isolées de plusieurs plantes hôtes.

Le génome d'*E. amylovora* est de petite taille (3,8 Mb) en comparaison avec la plupart des entérobactéries y compris les agents pathogènes des plantes, avec une taille de 4,5-5,5 Mb [103].

La séquence du génome d'*E. amylovora* a révélé des signes clairs de pathoadaptation à l'environnement des Rosacées. Par exemple, les protéines liées au système de sécrétion de type 3 (SST3) sont plus proches des protéines d'autres agents pathogènes des plantes que pour les protéines étroitement apparentées aux autres bactéries pathogènes des animaux [104].

En comparaison avec d'autres agents pathogènes des plantes, *E. amylovora* présente relativement une faible diversité génétique avec une recombinaison

génétique limitée. Cette propriété a été associée au fait que la bactérie est exposée à des pressions de sélection limitées en raison de la reproduction stratégique des fruits à pépins favorisant seules les variétés de grande valeur, qui sont souvent très sensibles au feu bactérien [105; 106].

Tableau 2: Principales caractéristiques des plasmides décrits chez *Erwinia amylovora*.

| Plasmide | Souche d'origine | Taille (pb) | Hôte | Pays | Numéro d'accès | Références |
|----------|------------------|-------------|--------------------------------------|-------------------|----------------|-------------|
| pEA72 | Ea273 | 71,487 | <i>Malus sp.</i> | USA | FN666577 | [104] |
| pEI70 | IVIA1614-2a | 65,840 | <i>Crataegus sp.</i> | 11 pays européens | CP002951 | [107 ; 108] |
| pEL60 | LebB66 | 60,145 | <i>Malus sp.</i> <i>Pyrus sp.</i> | Liban | NC_005246 | [102] |
| pCPP60 | Ea322 | 56 Kb | <i>Crataegus sp.</i> | France | – | [109] |
| pEA34 | CA11 | 34 Kb | <i>Pyrus sp.</i> <i>Malus sp.</i> | USA | – | [110; 111] |
| pEU30 | UTRJ2 | 30,314 | <i>Pyrus sp.</i> <i>Malus sp.</i> | USA | NC_005247 | [102] |
| pEA29 | Ea88 | 28,314 | <i>Pyrus sp.</i> | USA | AF264948 | [104 ;112] |
| | Ea273 | 28,243 | <i>Malus sp.</i> | USA | FN666576 | |
| | CFBP1430 | 28,259 | <i>crataegus</i> | France | FN43411 | |
| pEA8.7 | CAR3 | 9Kb | <i>Pyrus sp.</i> | USA | – | [113] |
| pEAR4.3 | ATCCBAA2158 | 4,369 | <i>Rubus sp.</i> | USA | FR719210 | [4] |
| pEA2.8 | IL-5 | 2,825 | <i>Rubus sp.</i> | USA | AY123047 | [114] |

3.5. Facteurs du pouvoir pathogène et régulation de la virulence chez *E. amylovora*

3.5.1. Facteurs abiotiques favorisant l'infection

L'importance d'un hôte sensible, l'état physiologique du végétal, la concentration de l'inoculum, les agents de dissémination et les conditions climatiques jouent un rôle capital pour le développement du feu bactérien [63]. *E. amylovora* se multiplie sous un climat chaud et humide, la sévérité de la maladie et la rapidité de la progression de la nécrose sont maximales lorsque les tissus intracellulaires sont turgescents.

Au printemps, pendant la floraison, la température est le facteur limitant ; des températures maximales journalières supérieures à 24°C et des températures

minimales journalières supérieures à 12°C, favorisent le développement de la maladie. Des températures chaudes dans les premiers jours suivant l'ouverture de la fleur sont favorables au développement d'une population élevée à la surface du stigmate au sommet du pistil [67].

La bactérie peut alors se multiplier sur le pistil encore de couleur verte, une fine humectation naturelle (rosée, pluie légère) permet le transport des bactéries jusqu'aux ouvertures des glandes à nectar au fond de la corolle [115].

L'infection est d'autant plus à risque si les variétés cultivées sont sensibles au feu bactérien, s'il y a présence de bactéries ayant passé l'hiver sur d'autres espèces de plantes réservoir ainsi que la dissémination accentuée par les abeilles et la présence d'exsudats. Néanmoins, plus la fleur est âgée, plus les risques d'infection diminuent [56].

3.5.2 Facteurs de virulence bactériens et leurs déterminants génétiques

De nombreux déterminants de la virulence d'*E. amylovora* ont été caractérisés, incluant le système d'acquisition du fer, l'exopolysaccharide (EPS), le système de sécrétion de type III (SST3), la formation de biofilm, la mobilité et les lipopolysaccharides [103].

3.5.2.1. Système d'acquisition du fer

Pendant le processus d'invasion des tissus végétaux, un faible niveau de fer peut être disponible pour la plante et l'agent pathogène, donc la plante hôte et l'agent pathogène rentrent en compétition pour le fer.

Les sidérophores permettent à l'agent pathogène de surmonter des conditions de limitation de fer rencontrées dans les tissus de l'hôte et peut également agir comme agents de protection contre la toxicité du fer [11]. La bactérie *E. amylovora* possède un système d'acquisition du fer codé par le gène *dfo* composé de sidérophores de type hydroxamates et d'un récepteur FoxR important pour la survie de la bactérie en milieu carencé en fer comme l'apoplaste [116].

Le sidérophore majoritairement produit par *E. amylovora* est cyclique (DFO E), mais, de petites quantités d'autres sidérophores du même type, cycliques (DFO D, X) ou linéaires (DFO G), sont synthétisés [103]. Le sidérophore se lie au Fe³⁺ pour former la ferrioxamine et l'ensemble est réinternalisé grâce à FoxR [103].

Des travaux récents utilisant des mutants d'*E. amylovora* déficients en sidérophores, ont montré que ces derniers sont impliqués dans la pathogénicité d'*E.*

amylovora par deux voies: la réduction de la disponibilité en fer et en protégeant les bactéries d'espèces réactives de l'oxygène produites par l'éclatement oxydatif au début de l'infection [117].

3.5.2.2. Exopolysaccharides

La cellule bactérienne d'*E. amylovora* est entourée d'une couche de polysaccharides organisée en capsule, elle semble jouer un rôle important dans la virulence.

La bactérie *E. amylovora* produit trois types d'exopolysaccharides: l'amylovorane, le levane et le glucane. L'amylovorane est un polymère d'un motif répétitif penta-saccharide qui est généralement constitué de quatre résidus de galactose et un résidu d'acide gluconique. La quantité d'amylovorane produite par les souches d'*E. amylovora* individuelles étant corrélée avec le degré de virulence [103]. Les gènes codant pour ce complexe de polysaccharides de faible poids moléculaire sont situés dans le chromosome *ams*-region constitué de 13 gènes (de *amsA* à *amsM*) [118]. L'opéron *ams* qui code pour la synthèse de l'exopolysaccharide, l'amylovorane, possède une structure unique pour *E. amylovora* par rapport à d'autres capsules bactériennes [119]. La spécificité des glycosyl transférases pour la biosynthèse de l'amylovorane suggère que cette région est hautement conservée pour *E. amylovora* et ne peut pas se produire dans d'autres bactéries [120].

Les mutants avec capacité réduite de formation de biofilm semblent incapables d'établir avec succès de grandes populations dans le xylème. La colonisation du xylème est critique pour le mouvement systémique de l'agent pathogène à l'intérieur des tissus de la plante [103]. La biosynthèse de l'exopolysaccharide bactérien requiert un grand nombre de gènes dont la plupart sont localisés dans une région du chromosome d'environ 17 kb appelée *ams* (amylovoran synthesis) [116].

Le rôle de ces EPS dans le mécanisme de l'infection a été élucidé depuis longtemps. Il participe au premier contact entre la bactérie et son hôte. Il joue un rôle dans le contournement du système de défense des plantes par la perturbation et l'obstruction du système vasculaire et la protection de la bactérie contre les réactions de défense de la plante et les pertes de nutriments [121].

3.5.2.3. Facteurs protéiques codés par la région du gène *hrp-dsp* (40 ko)

La région *hrp* (pour réaction d'hypersensibilité et la pathogénicité) contrôle la capacité des bactéries à causer des maladies sur les plantes hôtes et une réaction d'hypersensibilité (HR) sur les plantes résistantes et non hôtes [117].

Le cluster de gènes *hrp* (figure 3) a été identifié dans le chromosome d'*E. amylovora* et code pour trois produits de gènes classés sur la base de leurs fonctions:

- Protéines régulatrices qui contrôlent l'expression d'autres gènes *hrp*.
- Protéines sécrétrices qui sont des composants de l'appareil de sécrétion Hrp (voie de sécrétion de type III, voie Hrp ou voie SST3), communes à plusieurs genres bactériens nécrogènes des plantes (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*) et des pathogènes d'animaux et de l'homme (*Yersinia* et *Shigella*).
- Protéines sécrétées appelées effecteurs, telles que les harpines et les protéines de potentiel effecteur [122].

Le système de sécrétion de type III (T3SS) est l'un des facteurs importants de virulence utilisés par *E. amylovora* afin d'infecter avec succès l'hôte. Comme avec d'autres bactéries phytopathogènes à Gram négatif, *E. amylovora* utilise ce système de sécrétion évolutivement conservé pour exporter des protéines effectrices dans le cytoplasme des cellules de la plante hôte par l'intermédiaire d'une structure analogue à des pili appelée injectisome, qui constitue le noyau central [103].

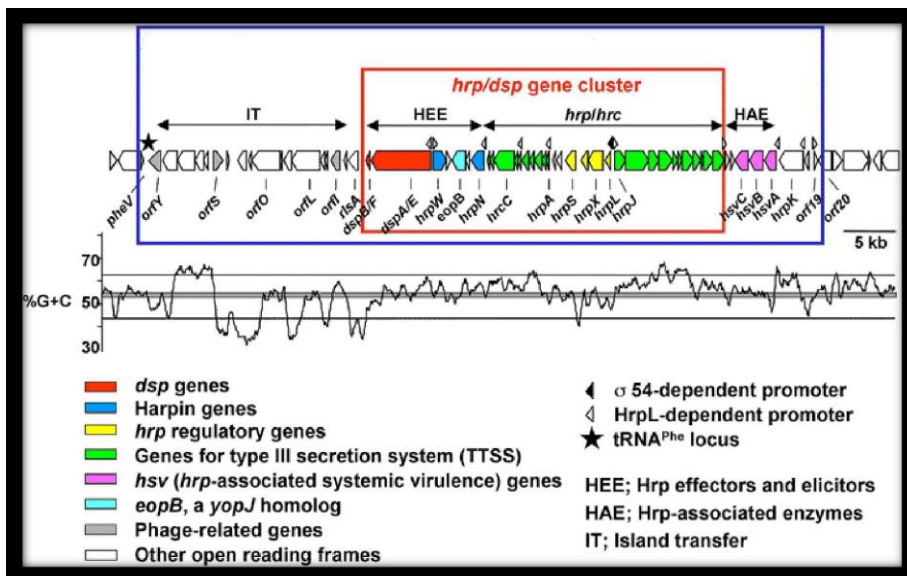


Figure 3: Structure des gènes *hrp* d'*Erwinia amylovora* [123].

3.5.2.4. Effecteurs de type III d'*Erwinia amylovora*

La pathogénicité d'*E. amylovora* dépend d'un système de sécrétion fonctionnel Hrp de type III (T3SS), impliqué dans la sécrétion de protéines de pathogénicité.

L'analyse du sécrétome d'*E. amylovora* a permis l'identification de plusieurs protéines impliquées dans le T3SS [124] :

- Les harpines HrpN et HrpW constituent un groupe de protéines effectrices chez les phytopathogènes, elles sont riches en glycine et stables à la chaleur. Les mutants HrpN sont affectés dans leur capacité à induire la nécrose sur plante hôte et non hôte [125]. Le HrpN induit un burst oxydatif et une hypersensibilité sur le tabac [126].

- DspA/E : Protéines qui jouent un rôle essentiel dans le pouvoir pathogène.

- HrpJ : Cette protéine est nécessaire à l'accumulation extracellulaire de HrpN et HrpW [124].

- HrpA : une protéine constituant la sous-unité structurale du pilus Hrp.

- Il existe aussi de nombreuses autres protéines comme : la EopB [123], la HrpK, les Eop2, Eop3, Eop4, TraF et FlgL et la HopPtoCEa [127 ; 124].

3.5.2.5. Mobilité

La bactérie *E. amylovora* porte des flagelles péritriches nécessaires à la motilité comme la plupart des entérobactéries [5]. Elle montre un chimiotactisme qui permet de percevoir des composés chimiques du milieu, de se déplacer vers les produits attractifs ou de fuir les produits répulsifs.

Chez *E. amylovora*, le chimiotactisme dépend de la température et du pH avec un optimum situé entre 20 et 28°C et un pH de 6 à 8 [128]. En effet, les mécanismes de la motilité se sont révélés être pertinents pour la survie des bactéries hors de l'hôte et également pour la fixation à la surface des cellules de l'hôte, ainsi que d'autres facteurs de virulence [129].

Comme expliqué plus haut, la mobilité de la bactérie dans les parties supérieures de la fleur jusqu'aux parties ligneuses est assurée par sa mobilité, malgré le mouvement ascendant du fluide vasculaire [130; 65].

3.5.2.6. Lipopolysaccharides

Le lipopolysaccharide est le composé de surface majoritaire des bactéries à Gram négatif. C'est une macromolécule tripartite composée d'un lipide (appelé A) ancré dans la membrane externe d'un oligosaccharide (ou core) et d'un polysaccharide appelé antigène - O (chaîne O) [131]. Il constitue une interface entre la cellule et le milieu extérieur.

Les LPS sont impliqués dans la virulence d'*E. amylovora*, ils jouent le rôle d'une protection physique des cellules bactériennes, contribuent à réduire la perméabilité membranaire et permettent la croissance bactérienne dans un environnement défavorable [132].

Les LPS étant sensibles aux antibiotiques, au niveau génétique, l'analyse génomique comparative a révélé des différences dans le groupe de gènes de biosynthèse des LPS entre la souche *E. amylovora* ATCC BAA-2158 infectant le *Rubus* et la souche CFBP 1430 infectant les Spiraeoideae. Ces différences ont été limitées à la région de base qui pourraient être impliqués dans un processus d'adaptation spécifique à la plante hôte [132].

4. Méthodes de détection et d'analyse de la diversité génétique de la bactérie

Erwinia amylovora

4.1 Méthodes d'identification biochimiques, sérologiques et moléculaires

Les approches actuelles pour la détection et l'identification d'*Erwinia amylovora* comprennent des méthodes culturales, sérologiques et moléculaires.

L'identification d'*E. amylovora* peut être obtenue biochimiquement par la galerie API 20E se basant sur une série de tests ; d'oxydase, d'uréase, de tryptophane désaminase, de la production d'indole, qui devraient être négatives, tandis que l'oxydation du saccharose et l'utilisation de citrate doivent être positives [89; 7].

Il existe plusieurs techniques basées sur la sérologie d'*E. amylovora* qui sont utilisées à des fins différentes pour la détection, la surveillance de la population bactérienne à la surface des plantes ou des études histologiques du processus d'infection. La plupart de ces techniques sont axées sur la détection d'*E. amylovora* dans les tissus symptomatiques et asymptomatiques. Le test d'enrichissement-DAS-ELISA, l'immunofluorescence et l'immunodosage à flux latéral permettent une détection spécifique et sensible d'*E. amylovora* [4; 7].

L'immunodosage à flux latéral (Ea AgriStrip), méthode simple, rapide et fiable, a permis d'identifier les souches d'*E. amylovora* utilisant des anticorps polyclonaux produits chez le lapin contre des cellules entières tuées par la chaleur de la souche C6 d'*E. amylovora* et un mélange de souches (*E. amylovora* 01SFR-BO d'Italie, ACW56400 de Suisse, Ea153 des USA, Ea4 / 82 de l'Egypte, CFBP1430 de France) [133].

Les techniques moléculaires comme la PCR sont couramment et préférentiellement utilisées pour la détection d'*Erwinia amylovora*, comparées aux diagnostics sérologiques et culturels, compte tenu de leur efficacité et rapidité [4].

D'autre part, la technique de PCR duplex, en une étape qui identifierait deux cibles génétiques spécifiques simultanément (région *ams* et une région du plasmide pEA29) a été largement utilisée [134].

Récemment, l'amplification isotherme médiée par boucle (LAMP) a été développée avec succès et utilisée comme méthode de détection rapide [135; 7].

4.2 Application des marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité chez *E. amylovora*

Chez les eubactéries, plusieurs familles d'éléments répétitifs courts intercalés (short interspersed repetitive elements) ont été décrits. Il s'agit des séquences extragéniques palindromiques répétées REP (Repetitive Extragenic Palindromic), les séquences consensus intergéniques répétées d'entérobactéries ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) et l'élément BOX (éléments répétés extragéniques) [136].

Les éléments REP, ERIC et BOX permettent après analyse phylogénétique des espèces d'*E. amylovora* et la différenciation des souches bactériennes [24].

De nombreuses études ont montré que le séquençage BOX est un moyen utile d'étudier la relation génétique dans le domaine des études épidémiologiques chez de nombreux types de bactéries à Gram positif et négatif [137]. L'amplification de régions d'ADN situées entre les répétitions BOX, ERIC et REP était une des premières techniques appliquées à l'estimation de la diversité génétique d'*E. amylovora* [24].

L'hétérogénéité de l'espèce *E. amylovora* a été révélée également par l'application des techniques moléculaires aux collections de souches. Cette diversité, mais pas élevée, a été observée par macro restriction suivie de l'électrophorèse sur gel de champ pulsé PFGE, par polymorphisme de longueur des fragment amplifiés

(AFLP), par analyse des répétitions de séquences courtes (SSR) et des fragments d'ADN polymorphes amplifiés aléatoirement (RAPD) [49; 80; 138]. Ces méthodes sont intensivement utilisées pour la détection du feu bactérien et pour les enquêtes moléculaires sur la variabilité génétique entre les souches.

Outre les méthodes de diagnostic moléculaire, de nouveaux marqueurs discriminants pour subdiviser *E. amylovora* ont été développés avec succès. L'analyse du nombre variable de répétitions en tandem (Multiple Loci VNTR Analysis (MLVA) à emplacements multiples et l'analyse répétée du palindrome court régulièrement espacé (CRISPR) constituent le meilleur exemple de ces marqueurs discriminatoires [25].

Récemment, ce nouveau type de marqueurs d'ADN a prouvé son utilité pour la détection des polymorphismes des espèces bactériennes. La disponibilité des séquences génomiques bactériennes a permis l'évaluation de ces polymorphismes de répétition en tandem [139].

Cette méthode d'application des VNTR basée sur le typage de plusieurs locus pour élucider la structure de la population (MLVA) a été utilisée avec succès pour analyser le génotype des souches d'*E. amylovora* [25].

La diversité génétique par analyse des VNTR a été utilisée dans le cas d'*E. amylovora* au Maroc, en Tunisie et en Iran [139; 140; 141].

Ce système de typage moléculaire très utile en raison de sa facilité d'utilisation, la vitesse et la puissance discriminatoire élevée a été utilisé avec succès également, sur plusieurs espèces bactériennes pathogènes à l'homme et aux animaux telles que *Yersinia pestis*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Pseudomonas aeruginosa* [29]. Pour ces espèces, la technique VNTR s'est avérée très utile dans les études écologiques, épidémiologiques et évolutives.

Pour résumer, l'utilisation de ces marqueurs est nécessaire pour tester si les déclenchements ont une source commune, de suivre l'épidémie et la propagation pandémique de souches particulières afin de reconstituer l'histoire de la maladie [142].

5. Mesures de prévention et méthodes de lutte contre le feu bactérien

5.1 Statut réglementaire d'*Erwinia amylovora* et recommandations dans l'Organisation Euro-méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP)

Le feu bactérien est l'une des maladies les plus destructrices des Rosacées à pépins, elle provoque des dommages considérables sur les plantes hôtes [85]. *Erwinia amylovora* est un organisme de quarantaine de la liste A2 de l'OEPP et son introduction est interdite dans pratiquement tous les pays [7].

Le contrôle du feu bactérien est difficile, car il n'y a pas actuellement de composés synthétiques disponibles avec des propriétés systémiques qui affectent directement l'agent pathogène et qui pourraient améliorer les programmes de protection contre le feu bactérien [143]. Par conséquent, la lutte contre cette maladie doit rentrer dans un programme de lutte intégrée, de respect des mesures phytosanitaires, de lutte préventive, culturale, biologique, génétique et chimique.

Le contrôle efficace comprend non seulement des mesures visant à réduire l'inoculum initial, mais aussi pour prévenir la mise en place de l'agent pathogène dans l'hôte ainsi que la diminution de la susceptibilité à l'infection [60].

En Algérie après apparition de la maladie, la lutte contre le feu bactérien a été rendue obligatoire, des mesures ont été prises par les services phytosanitaires à travers un plan d'action qui couvre aussi bien les zones touchées (Blida, Tipaza, Alger, Boumerdès et Mascara) que celles non atteintes par la maladie [144]. Le MADR a imposé la loi N°87-17 du 1er août 1987 relative à la protection phytosanitaire, l'arrêté du 14 juin 2011 fixant les mesures de surveillance et de lutte obligatoire contre le feu bactérien. Des mesures d'éradication par les services phytosanitaires ont été prises dans plusieurs wilayas pour enrayer les foyers et restreindre la propagation de la maladie.

L'application rationnelle d'une combinaison des mesures citées plus haut et préconisées par l'OEPP, était nécessaire pour maintenir la présence d'*E. amylovora* en dessous d'un seuil à partir duquel apparaissent des dommages ou une perte économiquement inacceptable [145].

Plusieurs stratégies de lutte basées sur des mesures préventives prophylactiques, culturales, chimiques et biologiques intégrant une lutte raisonnée ont été déployées.

5.2. Utilisation de variétés et portes-greffes résistants et sains, induction de la résistance chez les espèces sensibles et lutte culturale

L'utilisation de matériel végétal sain ne portant pas la bactérie *E. amylovora* et la plantation d'espèces hôtes et de variétés résistantes est un moyen permettant d'échapper au feu bactérien.

En effet, l'association d'un cultivar avec un porte-greffe résistants afin de réduire au maximum les risques de feu bactérien a été rapportée par Phillion, [56].

Le passeport phytosanitaire est un moyen très efficace pour réduire le risque d'introduction du feu bactérien. Par conséquent, le transport et les importations de plantes effectués devraient être accompagnés par le passeport phytosanitaire pour la zone protégée [146].

Certaines variétés de pommier et de poirier présentent une résistance quasi-totale à *Erwinia amylovora*. Cependant, il a été rapporté qu'il n'y a aucun cultivar de poirier, de pommier ou de porte-greffe totalement résistant au feu bactérien. Ce fait est dû à l'absence d'un seul gène impliqué dans la résistance et à la succession complexe (complex inheritance) [147].

Dans le cas de foyers atteints, des mesures culturales doivent être pratiquées par des mesures d'éradication et d'incinération pour la suppression des sources primaires d'inoculum. La taille des branches et rameaux atteints au moment du repos végétatif à 70 cm des symptômes chancreux et une désinfection des outils de taille permet d'éliminer une importante quantité d'inoculum primaire [148; 56].

L'acibenzolar-S-méthyl est un analogue fonctionnel de l'acide salicylique, inducteur de la SAR (systemic acquired resistance) [149]. En application préventive, il assure un niveau de protection contre le feu bactérien d'environ 50% [150]. Ce produit et une large gamme d'autres produits sur le commerce sont autorisés pour la lutte contre le feu bactérien.

L'application d'un régulateur de croissance tel que le prohexadione-calcium (ProCa) peut réduire la sensibilité au feu bactérien chez le poirier [151]. Ce produit est un analogue structural et inhibiteur spécifique de mono oxygénases impliquées dans la synthèse de gibbérélines et dans le métabolisme des flavonoïdes [152]. Il induit une modification du métabolisme des flavonoïdes et en particulier une accumulation de lutéoliflavan ainsi qu'une synthèse accrue de son précurseur le lutéoforol. Ce précurseur présente un effet biocide à large spectre, qui pourrait expliquer une partie de son efficacité vis-à-vis du feu bactérien [153].

5.3. Lutttes chimiques et physiques

Les produits utilisables en traitement phytosanitaire contre les bactérioses sont les produits cupriques comme par exemple la bouillie bordelaise et les antibiotiques. Les produits cupriques n'ont d'efficacité que s'ils sont appliqués en préventif du fait que l'action du cuivre est bactériostatique [154]. L'utilisation des antibiotiques est interdite en agriculture, ces produits sont devenus une menace critique pour la santé humaine permettant l'acquisition de la résistance [155].

Le cuivre a été largement utilisé dans la lutte contre le feu bactérien. Les produits du cuivre peuvent être très efficaces, mais, leur utilisation est actuellement limitée à des applications en début de saison en raison du risque de phytotoxicité aux fruits en développement. L'hydroxyde de cuivre le composé cuivré le plus utilisé, a prouvé son efficacité contre le feu bactérien à 88%. En raison de son accumulation dans les eaux et les sols, son utilisation pourrait avoir un impact négatif sur la biodiversité et la fertilité des sols [156].

Dans le contrôle du feu bactérien, il est possible d'utiliser des méthodes physiques pour éviter la propagation de la maladie et de réduire la quantité d'inoculum [157]. L'efficacité des méthodes de thermothérapie est basée sur le fait que le matériel végétal dormant peut supporter des températures élevées au cours desquelles l'agent pathogène ne survit pas. La résistance des bactéries *E. amylovora* à la haute température a été étudiée dans le but de proposer une technique pour obtenir du matériel végétal exempt de contaminants internes par traitement thermique [127].

Il a été constaté que des températures de 45 °C pendant 70 min ou 50 °C pour 50 min ont suffi pour détruire la culture pure de la bactérie avec quelques variations entre les souches testées [158].

Dans une expérimentation menée en verger, chez des arbres solarisés par couverture d'un film plastique noir pour le contrôle du feu bactérien, l'expansion des chancres a été arrêtée et aucune bactérie viable n'a été isolée à partir des chancres, tandis que les chancres des arbres non traités ont poursuivi leur développement [63].

5.4. Lutte par utilisation des microorganismes agents de biocontrôle contre *Erwinia amylovora*

La lutte biologique consiste en l'utilisation d'organismes vivants dans le but de limiter la pullulation et/ou la nocivité des divers ennemis des cultures [159].

Dans le cas du feu bactérien, la production des antibiotiques et la compétition pour l'espace et les nutriments sont considérés comme les principaux mécanismes employés par les antagonistes bactériens pour lutter contre *Erwinia amylovora*.

Les organes les plus sensibles à l'infection par *E. amylovora* étant les fleurs, décrites comme un habitat favorable pour de nombreux microorganismes en raison des taux élevés de substances nutritives, avec des concentrations de sucres allant de 10 à 30% [160]. Le contrôle biologique du feu bactérien cherche à établir préventivement des bactéries antagonistes au niveau de ces organes avant l'arrivée du pathogène [85].

Plusieurs agents de lutte biologique sont disponibles dans le commerce pour la suppression du feu bactérien, tels que ; *Pseudomonas fluorescens* A506, *Pantoea agglomerans* C9-1, *P. agglomerans* D325, *P. agglomerans* Pc10, *Bacillus subtilis* QST713 (1) et *B. subtilis* BD170 [21].

Des levures comme *Aureobasidium pullulans*, *Candida sake* et *Metschnikowia pulcherrima* ont également prouvé leur efficacité à l'égard du feu bactérien [161]. Ces agents de lutte biologique contre le feu bactérien réduisent ou suppriment *E. amylovora* sur les surfaces florales, en particulier les stigmates, par compétition pour les ressources limitant la croissance ou l'antibiose ou en excluant l'agent pathogène des sites d'infection [162].

La concurrence sur les tissus végétaux implique probablement des sucres utilisés par les deux bactéries, comme le glucose et le fructose, qui sont les principaux composants des tissus et surfaces des végétaux (fruits, fleurs, feuilles, nectar, phloème et sève) [163].

Chez le genre *Pseudomonas*, de multiples souches de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* ont été testées comme agents de lutte biologique contre le feu bactérien. Les *Pseudomonas* fluorescents agissent en général en déclenchant une résistance systémique induite chez les plante hôte, ce qui rend l'hôte beaucoup plus résistant à l'agression future par des agents pathogènes [164].

La production de sidérophores comme les pyoverdines (hydroxamate) et pyochelines (catecholate), molécules chélatant le Fe³⁺, connues chez les

Pseudomonas fluorescens est à l'origine du déclenchement de l'induction de la résistance [165, 166].

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* connues pour leur pouvoir métabolique important, agissent par utilisation d'un biofilm où différentes activités biologiques sont assurées à l'échelle communautaire parmi lesquelles ; la stimulation de la croissance, l'induction de l'ISR, l'acquisition du fer et la production de sidérophores intervenant à la compétition, la production d'antibiotiques, la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques et la compétition avec d'autres microorganismes [167 ;168].

Plusieurs agents de lutte biologique disponibles sur le marché pour lutter contre le feu bactérien tels que, *Bacillus subtilis* QST 713 et *B. subtilis* BD170 qui ont pour rôle de réduire ou supprimer *E. amylovora* sur les surfaces florales, en particulier les stigmates, ont montré une efficacité [162].

5.5. Utilisation de méthodes innovantes dans la prédiction du feu bactérien

De nombreux efforts en matière de prévention des maladies ont récemment été déployés dans le cadre du 'smart farming'. Beaucoup d'infections bactériennes se produisent lorsque les conditions météorologiques favorables (température adéquate et humidité) sont réunies pendant la période de la floraison. Des applications en temps opportun d'agents de lutte biologique pendant cette période peuvent réduire considérablement la gravité de la maladie.

De plus, une modélisation capable de prédire l'occurrence de la maladie grâce à la collecte en temps réel de données météorologiques à l'aide de drones, ainsi que l'analyse de données enregistrées à long terme ont prouvé leur efficacité [169]. Par conséquent, un certain nombre de systèmes de prévision ont été développés pour aider à prévoir les flambées de maladies en fonction de ces critères. Il existe différents modèles de prévision du feu bactérien : MaryblytTM, Cougarblight et Rimpro-*Erwinia*. Ces trois applications mobiles utilisent les données météo et la phénologie du pommier ou du poirier pour alerter les prévisions d'infection [170].

Par conséquent, perfectionner ces modèles de prévisions semble essentiel pour offrir aux producteurs d'améliorer la gestion des risques afin de permettre une surveillance régulière et systématique du verger, surtout pendant les périodes critiques.

CHAPITRE II:
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Cette étude est une contribution à la connaissance du feu bactérien en Algérie. Les tâches entreprises dans cette thèse ont été réparties sur plusieurs volets.

Une étude préliminaire et indispensable pour les étapes ultérieures a cerné la caractérisation biochimique, biologique, sérologique et moléculaire d'isolats d'*Erwinia amylovora* collectés à partir d'échantillons symptomatiques de divers vergers de la région de la Mitidja.

Une étude de la structure génétique des souches isolées a été réalisée à l'étranger grâce aux marqueurs moléculaires BOX, ERIC (Benaki Phytopathological Institute, Kifissia, Greece) et VNTR (INRA-Angers, France).

Parallèlement, nous avons saisi des données d'une étude symptomatologique des chancres induits par le feu bactérien sur des arbres atteints, dans le but d'étudier l'incidence de la maladie sur des vergers de poiriers durant le repos végétatif.

Enfin, dans une partie consacrée à trouver des solutions locales au feu bactérien, nous avons entrepris une évaluation de l'efficacité de souches affiliées aux *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. isolées et identifiées, comme agents potentiels de biocontrôle.

1. Prospections et échantillonnages

1.1. Présentation de la zone d'étude

La plaine de la Mitidja a fait l'objet de plusieurs études du fait de la superficie qu'elle occupe, à la fertilité de son sol, son climat favorable avec une précipitation moyenne de 600 mm, la diversité des cultures appliquées et sa situation stratégique [33].

La Mitidja a une latitude Nord moyenne de 36 à 48 degrés et une altitude moyenne de 20 à 50 m. Elle s'étend sur une longueur de 100 km et une largeur de 5 à 20 km, sa superficie est de 140 000 ha [171]. Elle est limitée au Nord par le sahel, au Nord-Ouest par djebel Chenoua (905 m) et la retombée de la chaîne de Ben Meradeavec le djebel Zaccar formant ainsi la plaine. Au Sud, par l'atlas blidéen, avec une altitude de 160 m au pic de Mouzaïa et 1692 m au djebel Guerroumen. A l'Est, ce sont les hauteurs et les collines de basse Kabylie qui forment la plaine. La plaine ne s'ouvre directement sur la mer que sur une trentaine de kilomètres séparant l'oued Réghaïa et l'oued Boudouaou [172].

Les échantillonnages et l'étude de l'incidence du feu bactérien ont été réalisés également dans des vergers situés à environ 75 Km de Boumerdès. Ces sites sont affiliés administrativement à la wilaya de Bouira. Cette dernière s'étend sur une superficie de 4456,26km², délimitée au nord par la wilaya de Tizi Ouzou, à l'est par la willaya de Bordj Bouariredj, au sud par la willaya de M'sila et à l'ouest par la willaya de Médéa [34].

La surface agricole utile des quatre wilayas de la Mitidja est de l'ordre de 220 000 ha, soit 2,6% seulement de la surface agricole utile des 48 wilayas que compte l'Algérie [32]. Les sols variés, aérés et égouttés sur les piémonts du Sahel d'Alger au nord et des monts telliens de Blida au sud, lourds au cœur de la plaine, irriguée par de nombreux cours d'eau pérennes, la Mitidja a très tôt constitué un bassin de production agricole spécialisé à l'échelle nationale [173].

1.2. Diagnostic symptomatologique

Cette étape a été réalisé entre 2011 et 2018 dans 73 sites de production de poires, de pommes et de coings situés dans 07 wilayas ; Blida, Alger, Médéa, Tipaza, Tizi Ouzou, Boumerdès et Bouira. En effet, il s'agit d'observer et de déceler les arbres présentant les symptômes caractéristiques du feu bactérien, par comparaison avec des photos publiées dans la bibliographie. Ces symptômes typiques concernent la nécrose des bouquets floraux et du feuillage, la sécrétion des exsudats, la mélanisation et le recourbement des jeunes pousses en crosse et la présence de chancres sur les branches et le tronc [77; 51].

Des relevés pour analyses au laboratoire ont été effectués entre 2014 et 2017 dans les vergers malades de *Pyrus communis* cv. Santa Maria, l'hôte le plus sensible du feu bactérien d'après les services phytosanitaires de l'INPV.

Le matériel végétal symptomatique a été collecté à partir de vergers de poiriers à travers sept communes situées à Blida, Alger et Tipaza, à savoir, Oued El Alleug, L'Arbaa, Birtouta, Bensalah, Tessala El Merdja, Sidi yahia et Attatba (figure 4).

Les vergers de poiriers concernés par l'échantillonnage sont âgés de 15 à 20 ans et de superficies allant de 1ha à 4 ha, ils présentent les symptômes typiques du feu bactérien. Nous avons réalisé nos prospections et échantillonnages dans des vergers officiellement déclarés par les services phytosanitaires de l'INPV en 2011, comme atteints par le feu bactérien.

Les échantillonnages au printemps coïncident avec le début du débourrement et la floraison et en été de la nouaison à la maturité des fruits.

Au cours des nombreuses prospections sur le terrain, des échantillons de plantes présentant des exsudats sous forme de gouttelettes bactériennes à la base des pétioles floraux, des pédoncules foliaires, des bouquets floraux ou sur les pousses provenant de 14 sites préalablement prospectés pour l'étude symptomatologique ont été prélevés au hasard.

Les échantillons sont coupés à l'aide d'un sécateur désinfecté à l'eau de javel après chaque prélèvement, placés dans des sachets en plastique stériles, sur lesquels sont mentionnées toutes les coordonnées du prélèvement (date, site, commune). Les sacs étiquetés sont transportés au laboratoire pour être stockés à 4 °C pour l'isolement dans la semaine qui suit leur prélèvement.

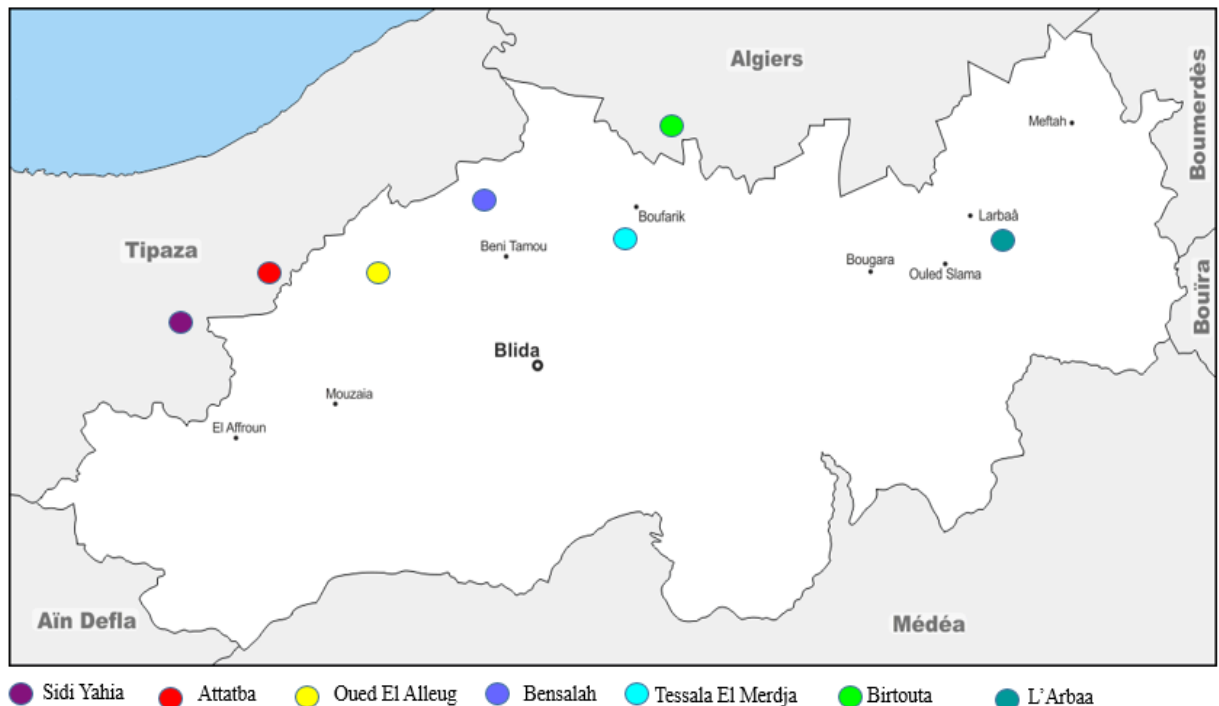


Figure 4 : Localisation géographique des sites de prélèvements des échantillons symptomatiques du feu bactérien sur le poirier.

2. Conditions de culture, isolement et purification

L'isolement est la première étape du diagnostic au laboratoire, elle consiste à libérer la bactérie des tissus végétaux présentant les symptômes du feu bactérien.

Nous avons prélevé à l'aide d'une anse à ensemencer flambée des ooses bactériens (exsudats), qui sont mis par la suite dans des tubes à essai contenant 2 ml d'eau distillée stérile (EDS). Nous avons préféré isoler directement à partir des exsudats à la base des feuilles et des bouquets floraux du fait que les ooses constituent le symptôme typique du feu bactérien et permettent d'obtenir la bactérie pure très rapidement par rapport à l'isolement à partir des chancres ou des nécroses. En effet, lors de l'extraction à partir de ces derniers symptômes, le contenu du végétal au moment de la macération peut inhiber les bactéries.

Après agitation à l'aide d'un vortex, une goutte de la suspension bactérienne diluée est ensemencée en boîtes de Pétri par la technique d'étalement en nappe à l'aide de billes en verre stériles. Parallèlement, nous avons également ensemencé des boîtes de Pétri par la méthode d'épuisement sectoriel sur deux milieux de culture King B et Levane [174; 89]. Les boîtes ainsi ensemencées, sont mises en incubation à l'étuve à 27°C pendant 72h. Cette opération a été répétée trois fois pour chaque échantillon.

Pour l'isolement et la purification, le milieu Levane solide a été utilisé ; ce milieu est conseillé lorsque les échantillons ne sont pas dans les conditions optimales, comme la suspicion de faibles concentrations de la bactérie cible et la présence importante de saprophytes [175]. En effet, sur le milieu Levane, les colonies apparaissent blanchâtres, lisses, bombées et muqueuses [7].

Après incubation, nous avons purifié les colonies les plus proches des caractéristiques culturelles d'*Erwinia amylovora* jusqu'à obtention de clones d'isolats purs pour les tests d'identification biochimiques et biologiques [48].

3. Caractérisation biochimique et physiologique des isolats

Les tests biochimiques et physiologiques sont réalisés selon les étapes du protocole de diagnostic d'*Erwinia amylovora* tracé par l'OEPP [7]. D'autre part, pour chaque test, deux témoins sont utilisés ; un témoin négatif qui représente le milieu de chaque test sans bactéries et le témoin positif représentant la souche de référence (*E. amylovora* BPIC889), gracieusement fournie par le laboratoire de Grèce (Laboratory of Bacteriology, Department of Phytopathology, Benaki Phytopathological

Institute, Kifissia, Greece). Pour l'ensemble des tests, les cultures utilisées sont âgées de 24 à 48h.

Les tests biochimiques et physiologiques réalisés, sont les suivants ; la coloration de Gram et KOH, le test de fluorescence sur King B, l'activité levane sucrase, l'activité cytochrome oxydase, l'activité catalase, la fermentation du glucose (oxydation / fermentation), la transformation du sucrose, la production d'indole, la liquéfaction de la gélatine, l'utilisation du citrate et la croissance à 39°C [89 ; 7].

La coloration de Gram met en évidence des différences de structure, de composition chimique des parois bactériennes et leur réactivité vis-à-vis des colorants de Gram [176]. Pour confirmer, nous avons également testé la méthode KOH, simple et rapide en utilisant une solution à 3% d'hydroxyde de potassium pour la distinction entre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif [177]. Une goutte de KOH à 3% est déposée sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, la culture bactérienne est récupérée ; la bactérie est considérée comme Gram négatif s'il y a formation d'un filet visqueux [178].

Pour le test de fluorescence sur le milieu King B, une colonie âgée de 24 à 48 h a été ensemencée en stries dans une boîte de Pétri contenant le milieu King B [174], ensuite incubée pendant environ 48 h à 27°C, permettant de révéler l'éventuelle fluorescence en éclairant la boîte avec la lampe à ultra-violet (UV) dans une pièce noire. Le test est positif s'il y a apparition de fluorescence allant du vert au bleu et il est négatif en absence de fluorescence [89].

Le test levane sert à déterminer la polymérisation du fructose en polyfructose. Une culture bactérienne âgée de 24 h est ensemencée en stries sur le milieu Levane à l'aide d'une anse stérile. Une réaction négative indique la présence de stries prostrées, une réaction positive manifeste des stries bombées et brillantes à la surface des boîtes de Pétri [176].

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase. Cette enzyme oxydoréductase est située dans la membrane plasmique de nombreuses bactéries. Nous avons utilisé une goutte de réactif de N,N-diméthyl-paraphénylène diamine sur un papier buvard stérile et imbibé pour réaliser une émulsion immédiate à l'aide d'une pipette Pasteur. L'apparition d'une coloration rose violacée atteste de l'activité de cytochrome c oxydase. Le test est considéré positif si une couleur rose violacée apparaît et négatif en absence de coloration [179].

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'oxygène (H_2O_2). Sur une lame en verre stérile, une goutte de peroxyde d'hydrogène (10V) est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les isolats bactériens âgés de 24 h sont déposés dans la solution de peroxyde d'hydrogène. Après 2 mn, la présence de bulles révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive [180].

Pour le test d'oxydation /fermentation du glucose, une culture bactérienne âgée de 24 h estensemencée sur le milieu Hugh et Leifson [181]. Ce milieu semi solide est utilisé pour différencier entre la voie fermentative et la voie oxydative des bactéries. Pour le test fermentation une couche d'environ 1 cm d'huile de vaseline stérile est ajoutée à la surface du tube à l'aide d'une seringue et un filtre stérile pour éviter tout contact avec l'air. Pour le test oxydation, les tubesensemencés sont légèrement desserrés afin de maintenir les bactéries en aérobie. Les tubes sont mis en incubation pendant 48 à 72 h à 27°C. La présence d'une coloration jaunâtre indique la fermentation du glucose par la bactérie et pour une réaction négative le milieu reste bleu [89].

Le test de transformation du sucrose sert à déterminer si la bactérie transforme le sucrose en une substance réductrice. Pour chaque isolat, une culture bactérienne âgée de 24 h est déposée à l'aide d'une anse stérile sur le bouillon RS [89]. Les tubes sont incubés pendant 24 à 72 h à 27°C, à la suite de l'incubation, un volume de 2,5 ml du réactif de Bénédict est ajouté. Les tubes sont mis au bain Marie sur une plaque chauffante. Le changement de couleur du milieu en jaune indique une réaction positive, si le milieu reste bleu-vert, la réaction est négative [89].

Le test de production d'indole sert à déterminer si la bactérie produit de l'indole à partir de tryptophane. Il est mis en évidence grâce à la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du milieu urée-indole, caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs. Pour chaque isolat une culture bactérienne âgée de 24 à 48 h est déposée à l'aide d'une anse àensemencer sur le milieu Indole liquide. A la suite de l'incubation, trois gouttes du réactif de Kovac's sont ajoutées. La lecture est immédiate, la présence d'un anneau rouge en surface indique la production d'indole par la bactérie et une réaction négative montre un anneau jaune à la surface [89].

Pour le test de liquéfaction de la gélatine, les cultures des isolats bactériens 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 mn. Un résultat positif est indiqué par

l'hydrolyse de la gélatine et le milieu devient liquide, le milieu reste solide si la réaction est négative [182].

Le test du citrate est utilisé pour déterminer la capacité des bactéries à utiliser le citrate comme seule source de carbone [7]. Une colonie de chaque isolat âgé de 24 à 48 h est prélevée à l'aide d'une anse flambée, puisensemencée en stries sur le milieu gélosé incliné de citrate de Simmons. Les tubes sont incubés à l'étuve à la température optimale de croissance de la bactérie (27°C). Les bactéries citrate-réductases alcalinisent le milieu par virage du vert au bleu [89].

Le test de croissance à 39°C est réalisé à partir de cultures bactériennes âgées de 24 à 48 h et ensemencées dans le milieu liquide 523 et incubées à 39°C. Le test est positif si un développement de la bactérie est observé par apparition d'un trouble [89].

4. Caractérisation du pouvoir pathogène des isolats

4.1. Hypersensibilité sur le tabac

Le test d'hypersensibilité sur le tabac (*Nicotiana tabacum*) est une réaction rapide de défense de la plante qui permet de mettre en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement sous forme d'une nécrose, des zones du limbe foliaire inoculées [89]. Ce test se réalise par infiltration sous épidermique des suspensions bactériennes de cultures jeunes de 24 à 48 h, sur le limbe foliaire du tabac.

Le témoin négatif consiste à injecter l'EDS au niveau du limbe foliaire. Le test est considéré positif s'il apparaît au bout de 24 h une plage nécrotique correspondant à la zone infiltrée [89]. Des plants de tabac var. Xanthi ont été cultivés en pots pour cet effet.

4.2. Test de pathogénicité sur les poirettes

Le test de pathogénicité sur les fruits immatures de *Pyrus communis* permet de mettre en évidence le pouvoir pathogène de la bactérie sur les zones d'inoculation [183; 184].

Les poirettes asymptomatiques ont été récoltées au stade immature au mois d'avril à partir d'un verger de poirier var. Santa Maria situé à Bensalah (Blida). Ce test se réalise par inoculation de cultures bactériennes des isolats *E. amylovora*-like sélectionnées et âgées de 24 à 48 h au niveau d'incisions, à raison de quatre par fruit,

réalisées à l'aide d'un scalpel stérile, après une désinfection superficielle avec l'alcool 70% [127]. Les fruits immatures inoculés sont déposés dans des boîtes de Pétri sur un papier filtre stérile imbibé d'EDS, ensuite, disposés dans des boîtes hermétiques à la température ambiante [185]. Le témoin négatif correspond aux fruits incisés et inoculés avec l'EDS et le témoin positif est inoculé par la souche de référence *E. amylovora* BPIC889. Chaque fruit a été inoculé au niveau de 4 incisions et le test répété 4 fois (4 fruits) pour chaque souche.

Le test est considéré positif s'il apparaît après 3 à 7 jours après, des nécroses suivies de mélanisation au niveau des zones inoculées et il est négatif si aucune réaction n'est observée.

5. Caractérisation sérologique par immunodosage à flux latéral

Le test rapide Ea AgriStrip (BIOREBA) basé sur une réaction immunologique permet la détection de la bactérie pathogène en quelques minutes. Les suspensions bactériennes d'environ 10^7 UFC / ml des isolats ont été placées dans des tubes eppendorf de 1,5 ml. Une bandelette d'E.a AgriStrip pour chaque souche a été insérée verticalement en immergeant la languette (maximum 0,5 cm de la bande) et les résultats ont été enregistrés après 15 mn [133; 7]. Les bandelettes Ea Agristrip nous ont été fournies par le laboratoire (Benaki Phytopathological Institute).

Lorsque la bandelette est mise en contact avec la suspension bactérienne, celle-ci migre vers le haut en déclenchant ainsi la réaction antigène-anticorps qui se manifeste par la formation de lignes colorées. Les deux lignes « contrôle » et « test » seront colorées dans le cas d'une réaction positive, tandis que seule la ligne « contrôle » sera visible dans le cas d'une réaction négative ne contenant pas l'agent pathogène spécifique recherché. Les lignes se colorent au bout de 1 à 2 mn et ont une intensité maximale au bout de 10 à 15 mn. Une fois séchées, les bandelettes peuvent être conservées et la coloration n'évoluera plus.

6. Identification moléculaire par la réaction de polymérisation en chaîne PCR

6.1. Amplification par le couple d'amorces (G1-F / G2-R)

Les cellules bactériennes âgées de 24 h ont été mises en suspension dans l'EDS (environ 10^7 UFC/ ml), bouillies pendant 10 mn pour dénaturer les constituants cellulaires et utilisées pour la PCR [186].

La PCR a été réalisée en Turquie (EGE University Agriculture Faculty, Department of Plant Protection, Izmir), selon le protocole développé par Taylor *et al.*, [187] en utilisant des amorces suivantes: G1-F:5'-CCTGCATAAATCACCGCTGACAGCTCAATG-3' et G2-R: 5'-GCTACCACTGATCGCTCGAATCAAATCGGC-3' qui amplifient une séquence chromosomique de 187 pb (tableau 3). Les volumes de la réaction PCR contiennent un mélange de : tampon 10x, MgCl₂ (50 mM), dNTP 10 mM, les amorces G1-F et G2-R 10 µM chacune et 5 U /µl de Taq DNA polymérase. Le mélange final est réparti dans des tubes eppendorfs de 25 µl, placés sur un thermocycleur (Mastercycler Personal).

Les paramètres d'amplification ont été adaptés selon le protocole décrit par Taylor *et al.*, [187]: 95 °C pendant 3 mn suivis de 40 cycles de 94 °C pendant 30 s pour l'étape de dénaturation, 60 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 1 mn pour l'hybridation des amorces, avec une étape d'extension finale à 72 °C pendant 5 mn. L'EDS et l'extrait d'ADN d'une souche de référence d'*E. amylovora* BPIC889 ont été utilisés respectivement comme témoins négatifs et positifs de la réaction.

Les amplifias ont été chargés sur un gel d'agarose à 1,5 % pour être colorés au bromure d'éthidium et séparés par électrophorèse.

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel pour la réaction PCR avec les amorces G1-F/G2-R [187]

| Produits de PCR | Concentration initiale | Concentration finale | Quantité requise pour 1 échantillon (µl) |
|-------------------|------------------------|----------------------|------------------------------------------|
| Taq Buffer | 10 X | 1 X | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 1,5 Mm | 1,2 |
| dNTP | 2,5 mM | 0,1 Mm | 1 |
| Primer:G1-F | 10 mM | 0,4 mM | 1 |
| Primer:G2-R | 10 mM | 0,4 Mm | 1 |
| Taq Polymerase | 5 U | 1 U | 0,2 |
| EDS | - | - | 13,1 |
| Extrait ADN | Bactéries dénaturées | | 5 |
| Volume total | - | - | 25 |

6.2. PCR duplex

Pour ce test réalisé en Grèce (Benaki Phytopathological Institute), deux paires d'amorces (AJ75 / AJ76) et (AMSbL/ AMSbR) pour l'identification par PCR duplex d'*E. amylovora* ont été utilisées. Les souches bactériennes caractérisées par voie biochimique et biologique ont été testées par PCR duplex selon le protocole décrit par Hannou *et al.*, [139]. Des colonies bactériennes de 48h ont été prélevées à partir du milieu Levane gélosé, transférées dans du bouillon Levane et incubées à 27 °C pendant une nuit sur un agitateur rotatif.

Les cultures bactériennes ont été centrifugées pendant 10 mn à 14 000 tr/mn et les cellules bactériennes en culot ont été remises en suspension dans l'EDS. Les suspensions de cellules dans l'EDS ont été lysées par la chaleur pendant 15 mn à 95 °C, ensuite rapidement refroidies sur de la glace et centrifugées pendant 5 mn à 7 000 tr/mn. Les surnageants obtenus ont été utilisés pour effectuer une amplification par PCR duplex.

Le protocole de la PCR duplex a été réalisé en utilisant deux paires d'amorces :

a) AJ75 (5-CGTATTCACGGCTTCGCAGAT) et AJ76 (5-ACCCGCCAGGATAGTCGCATA) ; une paire basée sur des séquences du plasmide pEA29 d'*E. amylovora* qui amplifie un fragment de 844- pb [188] et **b)** AMSbL (5-GCTACCAGCAGGGTGAG-3) et AMSbR (5-TCATCACGATGGTGTAG-3), une paire qui amplifie un fragment de 1,6 Kb situé dans la région *ams* chromosomique d'*E. amylovora* [119].

L'eau stérile et l'ADN génomique extraits de la souche de référence *E. amylovora* BPIC889 a été utilisé comme témoins d'amplification négatifs et positifs respectivement. L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant 1 µl de chaque surnageant contenant l'ADN, 1x Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, USA), 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de chaque dNTP et 10 pmoles des amorces et 1 unité d'ADN polymérase GoTaq (Promega, USA) dans un volume final de 20 µl.

Le programme du cycle consiste en une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 mn, suivie de 35 cycles de 45 s à 94 °C pour la dénaturation, 45 s à 52 °C pour l'hybridation et 1 mn et 45 s à 72 °C pour l'extension, avec une extension finale à 72 °C pendant 10 mn [139].

Les fragments amplifiés ont été chargés sur un gel d'agarose à 1% pour être séparés par électrophorèse.

7. Evaluation de l'incidence du feu bactérien sur poirier au repos végétatif

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'incidence du feu bactérien durant le repos végétatif de l'hôte en se basant sur l'estimation du nombre et de la taille des chancres sur le tronc et les branches représentant le symptôme typique de l'hiver. Ceci permet de déterminer l'état de la maladie sur les arbres atteints et d'estimer une longueur moyenne des branches atteintes à couper pour pouvoir pratiquer la taille dans le cadre d'une lutte préventive avant la poussée de sève afin de réduire le taux d'inoculum pour la saison suivante.

7.1. Description générale des vergers d'étude

Un total de onze vergers de poirier var. Santa Maria ont été étudiés. Trois vergers situés à Blida (L'Arbaa), cinq vergers situés dans la wilaya de Bouira (El-Hachimia, Ain bessam, Ait l'Aziz) et trois vergers dans la wilaya de Boumerdés (Tidjelabine, Boudouaou) (tableau 4). Ce sont des vergers déjà déclarés atteints par le feu bactérien. Les arbres atteints manifestent des chancres typiques de la maladie avec présence de nécroses sous l'écorce, sur les troncs et les branches.

Ces vergers s'étendent sur des superficies qui varient entre deux et quatre ha, ce qui correspond à un nombre d'arbres entre 1 000 et 3 600 arbres. Nos sorties sur le terrain se sont déroulées pendant la période allant du mois de décembre 2016 jusqu'à mars 2017, s'étalant de la période de dormance jusqu'au début de floraison. Des études comparatives entre les vergers de poirier ont été effectuées. Des mesures sur les chancres de 40 arbres atteints par le feu bactérien, choisis aléatoirement en repérant les sujets malades qui présentent des chancres ont été effectuées. Nous avons calculé le nombre et la taille des chancres sur les troncs et les branches pour chaque arbre atteint, ainsi que la mesure de la longueur et la largeur des chancres sur ces derniers. Ces mesures nous ont servi ultérieurement pour calculer l'incidence ainsi que la sévérité de la maladie par l'indice de McKinney [189].

Nous avons établi une relation entre le nombre de chancres provoqués par la bactérie et l'état de l'arbre. L'échelle d'évaluation des symptômes par le nombre et la taille des chancres du feu bactérien permet d'apprécier la dépendance entre les caractères suivants: le nombre de chancres sur les troncs et les branches dans les vergers situés dans les trois wilayas et l'état de l'arbre et la taille (largeur et longueur) des chancres sur le tronc et les branches.

Tableau 4 : Vergers de poiriers étudiés pour l'analyse des symptômes de chancres induits sur les arbres, antérieurement atteints par le feu bactérien.

| Vergers | Région | Commune | Coordonnées GPS | Superficie (ha) |
|---------|-----------|-------------|-------------------------------|-----------------|
| V1 | Blida | L'Arbaa | 36°35'45.88" N/ 3°10'53.59" E | 3 |
| V2 | Blida | L'Arbaa | 36°35'48.55" N/ 3°10'13.93" E | 1,20 |
| V3 | Blida | L'Arbaa | 36°38'1.47" N/ 3° 9'2.67" E | 4 |
| V4 | Bouira | Ait l'Aziz | 36°25'28.86"N/ 3°53'57.81"E | 1 |
| V5 | Bouira | EL-Hachimia | 36°14'50.68"N/ 3°50'46.51"E | 4 |
| V6 | Bouira | EL-Hachimia | 36°14'15.73"N/ 3°50'41.71"E | 2 |
| V7 | Bouira | EL-Hachimia | 36°15'05.49"N/ 3°50'10.22"E | 2 |
| V8 | Bouira | Ain bessam | 36°11'57.48"N/ 3°45'12.18"E | 4 |
| V9 | Boumerdès | Boudouaou | 36°44'32.51"N/ 3°24'42.76"E | 2 |
| V10 | Boumerdès | Tidjelabine | 36°44'09.04"N/ 3°27'17.38"E | 2 |
| V11 | Boumerdès | Tidjelabine | 36°44'32.51"N/ 3°24'42.76"E | 2 |

7.2. Evaluation du nombre de chancres

Le nombre de chancres dans les vergers des 3 wilayas a été classé selon une échelle en cinq classes d'un ordre croissant de 0 (absence de chancres) à 4 (nombre de chancres de 11-12 sur les troncs et de 11-15 sur les branches) (tableau 5).

7.3. Evaluation de la taille des chancres sur le tronc et les branches

Des mesures de la longueur et de la largeur des chancres sur les troncs et les branches ont été réalisées sur les arbres atteints par le feu bactérien pour chaque verger. La taille des chancres sur les troncs et les branches est répartie en 4 classes (tableau 6). Le comptage du nombre de chancres selon leurs tailles a été réalisé pour chaque classe.

Tableau 5 : Evaluation du nombre de chancres des vergers étudiés

| Classe | Chancres/tronc et branches | Description de l'état de l'arbre et symptômes |
|--------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 | 0 | Pas de chancres. Arbre sain. |
| 1 | 1-3 | Le nombre de chancres de 1-3 sur les troncs et sur les branches 1-3 est moins élevé. Arbre peu atteint par le chancre attaqué par le feu bactérien dans la classe 1. |
| 2 | 4-6 | Le nombre de chancres de 4-6 sur les troncs et sur les branches 4-6 est plus élevé. Arbre atteint par le chancre attaqué par le feu bactérien dans la classe 2. |
| 3 | 7-9 | Le nombre de chancres de 7-9 sur les troncs et sur les branches 7-10 est élevé. Arbre plus atteint par le chancre attaqué par le feu bactérien dans la classe 3. |
| 4 | 11-12 | Le nombre de chancres de 11-12 sur les troncs et sur les branches 11-15 est très élevé. Arbre sévèrement atteint par le chancre attaqué par le feu bactérien dans la classe 4. |

Tableau 6 : Evaluation de la taille des chancres (longueur et largeur) des vergers atteints par le feu bactérien.

| Classe | Troncs | | Branches | |
|--------|----------|------------|-------------|------------|
| | Longueur | Largeur | Longueur | Largeur |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 1-25cm | 0,5-12,5cm | 0,5 -12,5cm | 0,5 -3,5cm |
| 2 | 25-50cm | 12,5 -25cm | 12,5 -25cm | 3,5 -7cm |
| 3 | 50-75cm | 25-37,5cm | 25-37,5cm | 7-10,5cm |
| 4 | 75-100cm | 37,5-50cm | 37,5-50cm | 10,5-14cm |

7.4. Incidence de la maladie

C'est l'expression du pourcentage des arbres présentant un chancre, en connaissant le nombre total des arbres malades (classe 0, 1, 2, 3 et 4). L'incidence du feu bactérien est calculée par la formule suivante : $D (\%) = \frac{\sum ni}{N} \times 100$ [190].

i : classe d'infection (1 à 4), ni : Nombre d'arbre malades, N : Nombre total des arbres du verger.

7.5. Sévérité de la maladie

La sévérité du feu bactérien a été calculée par l'indice de McKinney, il permet d'évaluer l'altération globale du potentiel de la production du verger de poiriers ; il est calculé selon la formule suivante : $S (\%) = \frac{\sum(n_i \cdot i)}{N \cdot v} \times 100$ [189].

i : classe d'infection (1 à 4), n_i : Nombre d'arbres malades par chaque classe, N : Nombre total d'arbres du verger, v : La valeur la plus élevée de l'échelle d'évaluation (4).

8. Caractérisation de la diversité génétique des souches d'*E. amylovora* par les marqueurs BOX, ERIC et VNTR

L'analyse des profils génomiques des souches bactériennes étudiées a été réalisée par BOX- (éléments Box) PCR et ERIC- (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) PCR pour détecter la présence de courtes séquences répétitives dans leur génome à des fins de comparaisons. Les amorces utilisées sont: BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') pour BOX-PCR, et ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') et ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') pour ERIC-PCR comme décrit dans les normes EPPO [191].

La matrice d'ADN utilisée dans les tests BOX-PCR et ERIC-PCR a été préparée selon le protocole suivant : Pour chaque souche bactérienne, une suspension cellulaire (environ 10⁹ UFC / ml) a été préparée dans l'EDS puis les cellules ont été lysées par chauffage pendant 15 mn à 95 °C avec refroidissement rapide sur la glace. Après centrifugation pendant 5 mn à 7 000 tr/mn pour précipiter les débris cellulaires, le surnageant obtenu a été utilisé comme matrice d'ADN.

Le mélange réactionnel BOX-PCR est composé de 2,5 µl de 10X tampon de réaction PCR (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 0,5 µl 10 mM de chaque dNTP (Promega, USA), 2,5 µl 20 µM de l'amorce BOX A1R, 0,2 µl de 5 unités / µl d'ADN polymérase Platinum Taq (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 2 µl de la matrice d'ADN et d'eau ultra pure stérile pour atteindre un volume final de réaction de 25µl (tableau 7).

Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel BOX-PCR [191]

| Produits de PCR | Concentration initiale | Concentration finale | Quantité requise pour 1 échantillon (µl) |
|-------------------|------------------------|----------------------|------------------------------------------|
| Buffer | 10 x | 1 x | 2,5 |
| MgCl ₂ | 50 mM | 1,5 mM | 0,75 |
| dNTPmix | 10 mM | 0,2 mM | 0,5 |
| BOX A1R | 20 µM | 2 µM | 2,5 |
| PlatinumTaq | 5 U/µl | 1 U | 0,2 |
| Extrait ADN | N/A | | 2 |
| Total | | | 25 |

Le mélange réactionnel ERIC-PCR est constitué de 2,5 µl de tampon de réaction PCR 10x (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 0,5 µl de chacun des dNTPs 10 mM (Promega, USA), 2,5 µl 20 µM de chaque amorce (ERIC1R et ERIC2), 0,2 µl de 5 unités / µl d'ADN polymérase Platinum Taq (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), 2 µl de matrice d'ADN et l'eau ultra pure stérile pour atteindre un volume final de réaction de 25µl (tableau 8).

Les tests PCR ont été réalisés dans un thermocycleur Veriti (Applied Biosystems, USA). Les conditions de BOX-PCR et ERIC-PCR incluent: une dénaturation initiale à 95°C pendant 7 mn suivie de 35 cycles (94°C pendant 1 mn, 53°C pendant 1 mn, une hybridation à 65°C pendant 8 mn et une étape finale à 65°C pendant 16 mn avant un refroidissement à 4°C.

Un témoin négatif pour détecter toute contamination due aux réactifs a été inclut dans chaque protocole PCR, contenant tous les composants à l'exception de la matrice d'ADN, qui a été remplacée par 1 µl d'eau ultra pure stérile.

Après électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et coloration sur gel avec du bromure d'éthidium, les profils de fragments d'ADN obtenus de différentes tailles ont été visualisés et comparés. Les souches ont été séparées par leurs profils génétiques sur la base de l'amplification des parties uniques entre les segments répétitifs de leur génome.

Tableau 8 : Composition du mélange réactionnel ERIC-PCR [191]

| Produits de PCR | Concentration initiale | Concentration finale | Quantité requise pour 1 échantillon (µl) |
|-------------------|------------------------|----------------------|------------------------------------------|
| Buffer | 10 x | 1 x | 2,5 |
| MgCl ₂ | 50 mM | 1,5 mM | 0,75 |
| dNTP mix | 10 mM | 0,2 mM | 0,5 |
| ERIC1R | 20 µM | 2 µM | 2,5 |
| ERIC2 | 20 µM | 2 µM | 2,5 |
| PlatinumTaq | 5 U /µl | 1 U | 0,2 |
| Extrait ADN | N/A | | 2 |
| Total | 25 | | 25 |

La connaissance de la structure génétique des populations d'*Erwinia amylovora* responsables du feu bactérien sur les Maloidées constitue un apport scientifique du fait de l'importance économique de ces espèces cultivées et pour une meilleure traçabilité de l'identification de l'origine de l'introduction de cette maladie en Algérie.

Pour une meilleure discrimination de la diversité génétique des isolats d'*E. amylovora*, vingt-cinq souches isolées dans cette étude et identifiées, ont été analysées à l'aide de six amorces VNTR décrites par Bühlmann *et al.*, [25] en appliquant une analyse VNTR à multiples locus (MLVA).

Les matrices d'ADN bactériens ont été obtenues en utilisant une méthode de lyse directe des cultures bactériennes jeunes cultivées sur milieu King B à 27 °C comme décrit par Bühlmann *et al.*, [25]. Le mélange réactionnel VNTR est constitué de 4 µl de tampon GoTaq Flexi 5X (Promega, Fitchburg, WI, USA), 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de dNTP 10 mM, 0,25 µl de chaque amorce 10 µM, 0,05 µl (0,25 µM) d'ADN polymérase GoTaq Flexi (Promega), 1 µl de matrice d'ADN et 12,8 µl d'eau ultrapure dans un volume final de 20,05 µl.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) en suivant le protocole suivant: 95 °C pendant 5 mn, une dénaturation à 32 cycles à 95 °C pendant 30 s, une hybridation pendant 30 s à une température dépendant de l'amorce VNTR, une élongation à 72 °C pendant 30 s et une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 10 mn.

Les amorces VNTR décrites par Bühlmann *et al.*, [25] ont été utilisées aux températures d'hybridation suivantes: 60 °C pour VNTR A, B et H, 50 °C pour VNTR C, 52 °C pour VNTR D et 56 °C pour VNTR F. Les amorces VNTR ont été marquées avec l'un des colorants fluorescents suivants : Atto550 pour VNTR A, HEX pour VNTR

B et D, FAM pour VNTR C et H et Atto565 pour VNTR F (Eurofins Genomics, France) à l'extrémité 5' (tableau 9). Quatre produits PCR des différentes souches ont été dilués à 1/30 puis mélangés pour préparer les échantillons d'ADN. Ensuite, des aliquotes de 2,4 µl des échantillons d'ADN ont été mélangés avec 9,35 µl de formamide HiDi (SigmaAldrich, Saint Quentin, France) et 0,15 µl de l'étalon de taille GeneScan 500 Liz (Applied Biosystems) et dénaturés à 95 °C pendant 5 mn avant analyse par électrophorèse capillaire par l'analyseur génétique ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

Tableau 9 : Liste des amorces VNTR utilisées pour l'amplification des régions répétées et leurs caractéristiques de base [25].

| Locus | Locus Tag | Région cible | Motif répété | Motif (pb) | Amorces PCR |
|-------|---------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------------|
| A | Intergenic | repeat region on pEA29 ^d | ATTACAGA | 8 | ATTO550- TATCCCTAAAAACCTCAGTGC GCAACCTTGTGCCCTTTA |
| B | Intergenic | repeat region on pEA29 | TCAGCCTC TCAGYCTC | 8 | HEX- AGCTGTGGATGTTGTCACGTAAGC GGGTCCGACTTGACGGCAGACCAC |
| C | Eamy_03 89 | hypothetical protein | TAACAA | 6 | 6FAM- GTGAGCTATTAGCTTTCCGAGCAG TTCATACTATCACTAAGTATCGGA |
| D | Eamy_11 86 | hypothetical protein | TGCCAA | 6 | HEX- CTGCCTCAAAGCAAGGGTTTGTCT CGTGCTTAAGATTACATTATCAAC |
| F | Eamy_25 80 | <i>yfgA</i> | GGCAGCG TTAGTGCT AGT RGCAGCG TARGYGY MGT | 18 | ATTO565- AAGCTCATTACCAGGCTATTGGCA TCAGCGGCAGAGAACGGCATCGTG |
| H | Eamy_34 23 | hypothetical protein | ATATCACG C | 9 | 6FAM- TCACCGACGGTCTGGGTGGTATCG ATGTTAATCATCCGCCATTGGCTC |

Les données de pic ont été analysées à l'aide du logiciel PeakscannerTM V1.0 (Life Technologies) pour calculer le nombre de répétitions pour chaque locus VNTR sur la base de la longueur du fragment et du marqueur fluorescent [25]. Les 6 VNTRs des souches ont été transformés en nombre de répétitions. Pour analyser les résultats obtenus, l'indice de diversité de Simpson [192] a été calculé à l'aide du logiciel Bionumerics V7.6.3 (Applied Maths). Les arbres couvrant un minimum ou Minimum Spanning Tree (MST) ont été générés à l'aide du logiciel Bionumerics V7.6.3 en utilisant

le coefficient catégoriel standard et le nombre maximal de variantes à locus unique comme règle de priorité.

Le coefficient catégoriel fait la distinction entre les différents nombres de répétitions, mais il ne quantifie pas la différence. Un poids égal a été attribué à chacun des loci VNTR retenu.

L'indice de diversité de Simpson mesure le nombre et la taille relative des différentes catégories présentes dans une expérience de type de personnage. L'indice de diversité de Simpson (S) est calculé pour chaque type de caractère sélectionné à l'aide de la formule suivante: $S = 1 - \sum_{i=1}^K \frac{ni}{N} \frac{ni-1}{N-1}$ où N est le nombre de entrées sélectionnées, K le nombre de catégories et ni le nombre d'entrées de la catégorie i. Dans la version de Bionumerics (V7.6.3) utilisée pour calcul de la diversité, les valeurs sont comprises entre 0 et 1.

9. Essai de bioprotection contre les souches locales d'*Erwinia amylovora* par des souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas* spp., bactéries initialement endophytes

L'expérimentation relative à l'étude du pouvoir antagoniste des souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas* spp. a été réalisée d'abord *in vitro* afin de sélectionner les souches les plus performantes et *in planta* pour confirmer leur efficacité.

9.1. Antagonisme *in vitro*: bactéries endophytes / *Erwinia amylovora* - test de confrontation

9.1.1. Bactéries antagonistes étudiées

Pour les besoins de notre expérimentation, vingt souches de bactéries antagonistes ont été étudiées pour tester leur activité antagoniste *in vitro* vis-à-vis de deux souches d'*Erwinia amylovora*. Les souches bactériennes antagonistes appartiennent à la collection du laboratoire de phytobactériologie de l'Université de Blida 1 (tableau 10). Ce sont des bactéries endophytes isolées de diverses plantes spontanées *Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus*, connues pour leur activité à promouvoir la croissance des plantes et leur antagonisme envers diverses bactéries phytopathogènes [193]. Ces bactéries ont été isolées selon la technique décrite par Long *et al.*, [194] et identifiées par séquençage de l'unité ADNr 16S.

Deux souches phytopathogènes d'*Erwinia amylovora* (E1 et E5) de la présente étude, identifiées par voie moléculaire et choisies au hasard sont utilisées pour ce test. Les souches d'*Erwinia amylovora* ont été repiquées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Levane et les bactéries antagonistes sur le milieu LPGA ensuite incubées à 27°C pendant 24h jusqu'à l'obtention de clones purs [89]. Toutes les manipulations microbiologiques sont réalisées dans des conditions d'asepsie sous la hotte, avec l'appoint de deux becs Bunsën.

Les interactions des agents antagonistes avec les 2 souches d'*E. amylovora* ont été étudiées *in vitro* dans le but de sélectionner les antagonistes les plus performants.

La sélection des bactéries antagonistes a été réalisée en adoptant la technique de confrontation directe en boîtes de Pétri. Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats antagonistes contre les souches d'*Erwinia amylovora*, nous avons considéré le ratio de 10 : 1 c'est-à-dire, pour l'antagoniste une concentration de 10^8 UFC/ml, 10 fois supérieure à celle de la souche pathogène 10^7 UFC/ml [21]. La concentration cellulaire a été déterminée par spectrophotométrie.

Le test d'antagonisme *in vitro* a été pratiqué suivant la méthode décrite par Stonier [195], et modifiée par Moore *et al.*, [196]. La méthode est constituée des étapes successives suivantes :

A. Détermination des concentrations cellulaires des suspensions bactériennes par spectrophotométrie

Pour la réalisation du test d'antagonisme, il est indispensable de travailler avec une concentration cellulaire bactérienne connue. Les suspensions des souches bactériennes à pulvériser ont été préparées à partir de cultures pures. Cette méthode vise à appliquer par 'spray' à l'aide d'un pulvérisateur, une suspension de la souche pathogène sur la surface des boîtes de Pétri contenant les spots des antagonistes préalablement incubés.

Sous la hotte, et dans des conditions aseptiques, nous avons préparé la solution mère en raclant à l'aide d'une anse stérile, la culture bactérienne d'une souche âgée de 24h à 48h cultivée sur le milieu LPGA. La souche bactérienne à tester a été par la suite mise en suspension dans un tube à essai contenant l'EDS. Après agitation, nous avons réalisé une série de dilutions (suspensions-dilutions), par prélèvement d'un millilitre

pour chaque dilution à l'aide d'une micropipette stérile. Le volume prélevé (1 ml) est mis dans un tube contenant 9 ml d'EDS [197].

Tableau 10 : Souches bactériennes utilisées dans l'essai de lutte biologique *in vitro* [193].

| Souche | Plante hôte | Réaction Gram | Espèces |
|--------|------------------------------|---------------|----------------------------------------|
| CR1 | <i>Calendula arvensis</i> | + | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| CR2 | <i>C. arvensis</i> | - | <i>Pseudomonas brassicacearum</i> |
| EHR1 | <i>Euphorbia helioscopia</i> | + | <i>Bacillus cereus</i> |
| EHF3 | <i>E. helioscopia</i> | + | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> |
| EHF5 | <i>E. helioscopia</i> | + | <i>B. amyloliquefaciens</i> |
| EPR3 | <i>E. peplus</i> | - | <i>P.brassicacearum</i> |
| OR1 | <i>Urtica dioica</i> | + | <i>B. toyonensis /B. thuringiensis</i> |
| OR2 | <i>U. dioica</i> | + | <i>B. amyloliquefaciens</i> |
| OS1 | <i>U. dioica</i> | + | <i>B.cereus</i> |
| OS2 | <i>U. dioica</i> | + | <i>B. pumilus</i> |
| OS4 | <i>U. dioica</i> | + | <i>B. methylotrophicus</i> |
| PF1 | <i>Plantago lanceolata</i> | + | <i>Bacillus sp.</i> |
| PF3 | <i>P. lanceolata</i> | + | <i>B. methylotrophicus</i> |
| PS1 | <i>P. lanceolata</i> | - | <i>P. brassicacearum</i> |
| EPS1 | <i>P. lanceolata</i> | - | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| EPF1 | <i>P. lanceolata</i> | - | Non identifiée |
| EPS3 | <i>P. lanceolata</i> | - | Non identifiée |
| OS3 | <i>U. dioica</i> | + | <i>Bacillus sp.</i> |
| CS1 | <i>C. arvensis</i> | - | Non identifiée |
| OPR3 | <i>U. dioica</i> | + | Non identifiée |

A l'aide du spectrophotomètre (Prolabo, Paris), nous avons effectué la lecture de la densité optique de chaque dilution des suspensions bactériennes préparées à la longueur d'onde de 600 nm. Afin de réaliser le comptage des colonies bactériennes, nous avons prélevé avec une micropipette un volume de 0,1 ml de chaque dilution. Ce volume est étalé en boîtes de Pétri contenant le milieu LPGA. L'étalement a été réalisé en utilisant des billes en verre préalablement stérilisées. Enfin, nous avons réalisé une étape d'incubation à 27°C pendant 48h. Après incubation, le comptage des colonies est réalisé sous la loupe binoculaire où apparaissent 30 à 300 colonies suivant la souche bactérienne [197]. Le nombre de colonies dans les boîtes de Pétri est dénombré et est rapporté à la dilution choisie pour permettre d'estimer la densité bactérienne exprimée en UFC /ml à une DO donnée.

B. Dépôts des spots des isolats endophytes et incubation à 27°C.

Après préparation des suspensions bactériennes des antagonistes à la concentration cellulaire de 10^8 UFC /ml et homogénéisation, un volume de 100µl de chaque suspension bactérienne des antagonistes est déposé au centre d'une la boîte de Pétri du milieu LPGA suivi d'une étape d'incubation à 27°C pendant 48h. Pour chaque bactérie endophyte, deux boîtes de Pétri pour l'antagonisme des deux souches d'*Erwinia amylovora* ont été préparées.

C. Préparation des suspensions bactériennes phytopathogènes pour le spray

Pour la préparation des suspensions bactériennes des deux souches d'*Erwinia amylovora*, nous avons récupéré deux cultures bactériennes âgées de 24h. À l'aide d'une anse stérile, une colonie bactérienne est raclée, puis transférée dans un tube contenant l'EDS ajustée à une concentration bactérienne proche de 10^7 UFC/ml. Après 24h, des colonies typiques de *Pseudomonas* spp. et de *Bacillus* spp. qui sont sous forme de spots, se développent en boîte de Pétri. Pour la confrontation directe, les suspensions bactériennes des deux souches d'*Erwinia amylovora* (E1 et E5) sont pulvérisées à l'aide d'un atomiseur stérile sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu LPGA, qui contient le spot central de chaque bactérie antagoniste. Cette opération répétée 3 fois, est suivie par une étape d'incubation à 27°C pendant 24h.

Les témoins négatifs sont représentés par des boites de Pétri contenant un volume de 100µl d'EDS sur le milieu LPGA déposé 24h avant la pulvérisation des deux souches d'*Erwinia amylovora*. Les boites de Pétri sont par la suite scellées avec du parafilm pour éviter les contaminations. La lecture des résultats de l'antagonisme *in vitro* a été déterminée après 24h, l'évaluation d'une activité positive antibactérienne des antagonistes se traduit par une zone d'inhibition claire qui correspond à un arrêt de la croissance d'*Erwinia amylovora* tout autour de la colonie bactérienne testée. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des spots en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse.

9.2. Essai d'antagonisme *in planta* de bactéries endophytes *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. à l'égard des souches locales d'*Erwinia amylovora*

Quatre bactéries endophytes dont, *Bacillus methylotrophicus* PF3, *B. amyloliquefaciens* EHF5 et deux souches de *P. brassicacearum* (CR2 et PS1) isolées

et identifiées par Krimi *et al.*, [193], précédemment étudiées dans les tests d'antagonisme *in vitro*, ont été sélectionnées pour tester leur capacité à contrôler le feu bactérien. L'antagonisme *in planta* a été évalué sur les fruits immatures afin de déterminer leurs effets préventifs et/ou curatifs de bio-contrôle *in planta* contre les deux souches d'*Erwinia amylovora* (E1 et E5).

9.2.1. Matériel végétal

Les tests *in planta* nécessitent des organes végétaux (fleurs, fruits, feuilles, jeunes pousses) ou des plantules appartenant à une variété sensible. Dans notre cas, nous avons utilisé les fruits de la variété de poirier Santa Maria.

Les poirettes ont été prélevées à partir d'un verger de poiriers var. Santa Maria, situé dans la région d'Oued El Alleug. Les fruits immatures d'apparence saine et de tailles sensiblement identiques, sont prélevés et conservés dans des sachets hermétiques au réfrigérateur à 4°C. Avant de procéder à l'inoculation, les fruits sont lavés à l'eau du robinet, désinfectés à l'alcool 75°, ensuite rincés abondamment à l'EDS et séchés sur du papier absorbant préalablement stérilisé [21].

9.2.2. Suspensions bactériennes et inoculation des fruits immatures du poirier

Les suspensions bactériennes des souches (PF3, EHF5, CR2, PS1) sont préparées à partir de cultures âgées de 24h à 48h repiquées sur le milieu LPGA. À l'aide d'une anse stérile, deux colonies bactériennes sont raclées, puis transférées dans un tube contenant 5ml d'EDS. Après agitation, les suspensions bactériennes sont ajustées à la concentration cellulaire de 10^8 UFC/ml par lecture de la DO correspondante pour chaque souche à une longueur d'onde de 600 nm [21].

Les suspensions des bactéries pathogènes d'*Erwinia amylovora* sont préparées puis ajustées à la concentration cellulaire de 10^7 UFC/ml par mesure de la DO au spectrophotomètre. Ces concentrations correspondent à un ratio de 1 :10 ; où la concentration des antagonistes est dix fois supérieure à celle du pathogène [21].

Une lésion de 0,5 à 1 cm de longueur et 0,3 cm de profondeur a été effectuée à l'aide d'une aiguille de seringue stérile. Pour chaque traitement, 10 fruits ont été inoculés. Cinq lésions superficielles incisées sur chaque fruit sont pratiquées, ce qui correspond à cinq répétitions.

Les suspensions de bactéries antagonistes sont préparées pour une inoculation avant et après l'apport du pathogène afin de déterminer si elles peuvent contrôler la maladie préventivement et/ou curativement *in planta* à l'égard des souches d'*Erwinia amylovora* (E1 et E5).

9.2.3. Recherche d'un effet préventif

Une suspension bactérienne de chacune des souches antagonistes à un volume de 50 µl a été délicatement déposée pour être inoculée dans chaque lésion. Les fruits ainsi inoculés au niveau des cinq lésions sont déposés dans une boîte hermétique contenant un fond de papier humidifié pour permettre une humidité et l'expression des symptômes.

Après 24h, lors d'une seconde étape, un volume de 50 µl de chacune des souches d'*Erwinia amylovora* (E1 et E5), est introduit dans les mêmes sites des lésions précédemment inoculées par les bactéries antagonistes.

9.2.4. Recherche d'un effet curatif

Une suspension bactérienne de chacune des souches d'*Erwinia amylovora* (E1 et E5) d'un volume de 50 µl a été inoculée à l'aide d'une micropipette dans chacune des cinq lésions pour chaque fruit. Après 24h, un volume de 50 µl de chacune des souches antagonistes est inoculé dans les mêmes sites de lésions précédemment inoculées par les souches d'*Erwinia amylovora* (E1 et E5).

Pour le témoin négatif, dix fruits ont été inoculés par un volume de 50 µl EDS sur chaque incision et pour chaque fruit et cinq répétitions ont été réalisées. Les témoins positifs correspondent aux souches (E1 et E5) d'*Erwinia amylovora* inoculées sur les poirettes.

Les poirettes inoculées pour les deux tests d'antagonisme *in planta* (préventif et curatif) ont été placées dans des boîtes hermétiques sur la paille à la température ambiante du laboratoire. Ce test a été réalisé durant le mois de juin et juillet correspondant aux températures optimales de croissance de la bactérie et par conséquent, favorables à l'infection des poirettes et l'expression des symptômes.

Le même protocole d'inoculation et de lecture des résultats a été utilisé que celui du traitement préventif pour l'évaluation de l'antagonisme *in planta* des 4 souches

antagonistes sur les fruits immatures. La présence ou l'absence de lésions nécrotiques et la production d'exsudats ont été enregistrées.

9.2.5. Traitements et lecture des résultats

Les traitements réalisés (4 souches antagonistes x 2 souches pathogènes) sont présentés dans le tableau 11. Une semaine après l'inoculation, la présence ou l'absence de lésions nécrotiques et de production d'exsudats bactériens sur les fruits immatures inoculés ont été enregistrés.

La sévérité de la maladie a été évaluée en considérant la taille de la nécrose des fruits et la production des exsudats selon l'indice de maladie, suivant l'échelle décrite par Ohike *et al.*, [198]:

- **0**: absence de nécroses.
- **1**: formation de nécroses autour de la lésion sans production des exsudats.
- **2**: nécroses de moins de 50% de la surface du fruit avec production des exsudats.
- **3**: nécroses de 50 à 80% de surface des fruits avec production des exsudats.
- **4**: 100% de nécroses sur fruits et production des exsudats.

Tableau 11 : Protocole et traitements des différents tests d'antagonisme *in planta*

| Traitement | Nombre de répétitions | Nombre de fruits | Souche pathogène | Souche antagoniste |
|----------------------|-----------------------|------------------|------------------|--------------------------------------------|
| Témoin négatif (EDS) | 5 lésions | 10 poirettes | / | / |
| Témoin positif | 5 lésions | 10 poirettes | E1 E5 | / |
| Traitement préventif | 5 lésions | 10 poirettes | E1 E5 | PF3, EHF5, PS1, CR2 PF3, EHF5, PS1, CR2 |
| Traitement curatif | 5 lésions | 10 poirettes | E1 E5 | PF3, EHF5, PS1, CR2 PF3, EHF5, PS1, CR2 |

10. Caractérisation des souches antagonistes pour leur potentiel d'utilisation en lutte biologique contre le feu bactérien

La caractérisation des souches antagonistes a été basée sur la réalisation d'une série de tests à savoir ; le test de formation de biofilm, la production de sidérophores, la production de biosurfactants, la motilité de types swimming et swarming et les tests de tolérance aux stress environnementaux (températures extrêmes, pH, salinité et osmolarité). Les tests choisis caractérisent en général les performances requises chez les agents de lutte biologique bactériens [199].

10.1. Test de formation de biofilm

Le biofilm permet aux bactéries la colonisation des surfaces et des espaces intercellulaires en augmentant le maintien de la source d'eau. Les agents antimicrobiens et la communauté microbienne des biofilms combattent pour la dominance où la diffusion des molécules. Le biofilm a la capacité de développer une barrière des EPS contre les molécules de diffusion des agents antimicrobiens [200]. Dans ce contexte, ce test a été réalisé dans le but d'évaluer la capacité de production du biofilm des bactéries antagonistes.

Ce test a été réalisé sur eppendorfs transparents de 1,5ml. Un volume de 10 μ l de la suspension bactérienne antagoniste est ensemencé successivement dans 0,5 ml d'un milieu LB liquide (3 répétitions pour chaque souche).

L'incubation se fait à une température de 27°C durant 3h, 5h et 20h [201]. Après un temps de réaction de 3h, 5h et 20h, un volume de 1 ml de solution de violet de crystal (0,4%) est ajouté aux tubes après avoir jeté le milieu initial. Le violet de crystal est éliminé après 15mn et les eppendorfs sont rincés 3 fois à l'EDS.

Le test est positif s'il y'a une visualisation d'un anneau sur la paroi de l'eppendorf. Un volume d'1ml d'éthanol est ajouté pour la solubilisation du biofilm et enfin, la lecture de l'absorbance à une longueur d'onde de 620 nm est faite, pour quantifier le biofilm obtenu [201]. Un témoin est préparé avec de l'éthanol en ajoutant l'EDS et utilisé ainsi comme standard lors de la lecture au spectrophotomètre.

10.2. Test de production de sidérophores

La majorité des espèces de *Pseudomonas* spp. et de *Bacillus* spp. produisent des sidérophores bactériens [202]. Ces espèces bactériennes produisent un pigment fluorescent sur milieu King B et sur milieu succinate [203].

Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir d'une culture bactérienne jeune âgée de 24h à une densité optique équivalente à la concentration cellulaire de 10^8 UFC/ml. Un volume de 200 μ l de la suspension bactérienne de chaque souche est ensemencé dans 50 ml de chaque bouillon succinate et King B, préparés en flacons. Comme témoin négatif, le même volume (200 μ l) d'EDS est mis dans 50 ml de chaque bouillon.

Les flacons ont été disposés sur un agitateur horizontal réglé à une vitesse moyenne à la température ambiante du laboratoire durant 72h. Après 72h d'incubation, la centrifugation des solutions a été faite pendant 10mn à une vitesse de 24 000 tr/mn. Le surnageant de chaque tube a été récupéré et filtré en utilisant des filtres millipores stériles d'un diamètre de 0,22 μ m.

Afin de quantifier les sidérophores présents dans le surnageant, l'absorbance est déterminée à une longueur d'onde de 400 nm [204].

Pour connaître le type de sidérophores, la préparation de la solution de chlorure ferrique FeCl₃ à 2 % a été réalisée. Un volume de 1ml du filtrat est mis dans 5 ml de FeCl₃ à 2%, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 420 nm pour indiquer la présence de sidérophores de type hydroxamates [205] et à 490nm pour indiquer la présence de sidérophores de type catecholates [206].

Le test est considéré positif si un anneau rouge sur la surface du mélange apparaît. La croissance bactérienne et la production de sidérophores dans le milieu King B ont été comparées à celles dans le milieu succinate contenant le sulfate d'ammonium [207].

L'expérience a été effectuée deux fois. Les milieux sans bactéries ont été utilisés comme témoin pour quantifier la différence entre l'absorbance sur milieu King B et sur milieu succinate.

10.3. Test de production de biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils contiennent à la fois des groupes hydrophobes et des groupes hydrophiles qui peuvent réduire les tensions superficielles et interfaciales dans les solutions aqueuses. Ils sont produits soit d'une manière extracellulaire, soit attachés à une membrane cellulaire [208]. Les biosurfactants possèdent plusieurs propriétés, parmi lesquelles la protection contre les agents pathogènes. Ces composés produits par des micro-organismes peuvent être considérés comme agent prometteurs de lutte biologique [209].

La technique de production de composés biosurfactants décrite par Bunster *et al.*, [210], a été utilisée avec quelques modifications, réalisée en Italie (Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR). Les souches ont été cultivées dans du bouillon King B avec 1% d'extrait de levure pendant 48 h à 27 °C sur un agitateur rotatif. Les cultures bactériennes ont été ensuite centrifugées et le surnageant filtré stérilement sur membrane millipore (0,22 µm).

Un volume de 10 µl de chaque surnageant a été placé sur une bandelette de parafilm et mélangé avec 1 µl d'une solution à 1% de bleu de bromophénol. La souche *Pseudomonas chlororaphis* M71 et le bouillon King B stérile ont été utilisés comme témoins positifs et négatifs respectivement. La bandelette est couverte avec une boîte de Pétri et conservée dans des conditions stériles et humides. Pour chaque souche et test, trois répétitions ont été réalisées et le diamètre, la taille et la forme des gouttes sont observés et mesurés après 24 et 36 h. Les gouttes plates d'un diamètre plus large que le témoin négatif, indique une production de biosurfactants chez les souches testées.

10.4. Test de motilité de types swimming et swarming

La motilité aide les bactéries à atteindre l'environnement le plus favorable pour concurrencer avec succès d'autres micro-organismes et peut alors représenter un avantage concurrentiel remarquable pour le biocontrôle efficace des agents pathogènes [211].

Les tests de motilité de types swimming et swarming des quatre souches antagonistes sélectionnées (CR2, EHF5, PF3 et PS1) ont été réalisés en Italie (Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR) selon le protocole de Déziel *et al.*, [212].

Un volume de 2 µl de chaque suspension bactérienne (10^8 UFC/ml) est déposé au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu tryptone pour le swimming et la gélose nutritive pour le swarming [212]. Pour chaque souche et test, trois répétitions ont été réalisées. Après 24 et 48 h d'incubation à 27 °C, deux mesures de rayon (demi-diamètre) par colonie ont été faites. Les souches *Pseudomonas chlororaphis* M71 et *E. coli* DH5α mutant ont été utilisées comme témoins positifs et négatifs, respectivement.

10.5. Tolérance des bactéries antagonistes aux stress abiotiques

10.5.1. Test de tolérance à la température

Le test de tolérance à une gamme de températures a été entrepris dans le but de déterminer les types de bactéries thermophiles ou psychrophiles. Dans ce cas, chaque souche estensemencée sur milieu Luria Bertani en boîtes, l'incubation se fait à des températures croissantes, 4°C, 30°C, 35°C, 42°C et 45°C pendant 48 h [213]. Après incubation, la lecture est notée à l'œil nu.

10.5.2. Test de tolérance à une gamme de pH

La croissance des souches bactériennes est testée à différents pH (4, 6, 7, 8 et 10). Chaque souche bactérienne estensemencée dans le milieu Luria Bertani préparé aux pH correspondants. Après incubation à 27°C pendant 48 h. La lecture de la croissance bactérienne est notée à l'œil nu [214]. Deux répétitions ont été réalisées pour ce test.

10.5.3. Test de tolérance à la salinité

Le test de tolérance à la salinité chez les souches étudiées est réalisé à différentes concentrations de NaCl pour la détection des bactéries les plus tolérantes à la salinité. Une colonie bactérienne âgée de 24 à 48 h pour chaque souche estensemencée en stries dans différents milieux Luria Bertani contenant les concentrations croissantes de sel (NaCl) : 0,3 M (17,58 g/l) - 0,5 M (29,3 g/l) - 0,8 M (46,88g/l) et 1 M (58,6 g/l) [215; 216]. Des témoins sans NaCl sont préparés à chaque fois, ce test a été réalisé en 3 répétitions.

10.5.4. Test d'osmolarité : Tolérance au stress hydrique

La plupart des bactéries sont insensibles à la pression osmotique du fait des protections que leur procure leur paroi. Toutefois, les bactéries halophiles et les bactéries osmophiles ne peuvent survivre dans des milieux hypotoniques. Pour confirmer cette dernière propriété, le test d'osmolarité à été réalisé pour la totalité des souches antagonistes et pathogènes testées.

Un bouillon nutritif additionné de différentes concentrations de polyéthylène glycol (PEG) 0%, 20%, 40% et 60% a été utilisé pour étudier l'effet du stress osmotique sur les souches sélectionnées [217]. Un volume de 100µl des suspensions bactériennes des souches antagonistes et pathogènes estensemencé en tubes à

essai contenant 5 ml de bouillon nutritif à des concentrations de PEG utilisées, ce test est réalisé en trois répétitions.

Le témoin négatif correspond à l'ensemencement de 100µl d'EDS avec un bouillon nutritif à 0% de PEG. Les tubes sont disposés sur un secoueur horizontal réglé à une vitesse moyenne à la température ambiante du laboratoire durant 72h. Après incubation, la croissance des souches sur différentes concentrations de PEG a été déterminée en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 600nm en utilisant un spectrophotomètre [217]. Le milieu sans bactéries a été utilisé comme témoin.

11. Analyses statistiques des résultats

Les données de pointe obtenues après réalisation de l'électrophorèse capillaire des différents VNTRs ont été analysées à l'aide du logiciel de mesure de la taille d'ADN Peakscanner™ V1.0 (Life Technologies) pour calculer la répétition du nombre pour chaque locus VNTR sur la base du fragment longueur et étiquette fluorescente [25]. Ce logiciel permet d'effectuer une analyse des fragments d'ADN, séparer un mélange de fragments d'ADN en fonction de leur taille, fournir un profil de la séparation et calculer précisément la taille des fragments. Le logiciel permet d'afficher, de modifier, d'analyser, d'imprimer et d'exporter des données d'analyse de fragments générées à l'aide de l'analyseur génétique.

Par la suite, l'indice de diversité de Simpson [192] a été calculé à l'aide du logiciel Bionumerics V7.6.3 (Applied Maths). Les arbres couvrant un minimum ou Minimal Spanning Tree (MST) ont été générés à l'aide du logiciel Bionumerics V7.6.3 en utilisant le coefficient catégoriel standard et le nombre maximal de variantes à locus unique comme règle de priorité.

La signification des résultats de l'étude des chancres sur poirier au repos végétatif des 3 wilayas (Blida, Bouira et Boumerdès) concernant l'incidence et la sévérité de la maladie a été calculée par le test de Tukey ($p \leq 0,05$) (One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference version 2016)).

De même, les résultats de l'indice de maladie (nécroses sur les poirettes) du traitement préventif d'antagonisme *in planta* des souches bactériennes vis-à-vis d'*Erwinia amylovora* ont été analysés par le test de Tukey ($p \leq 0,05$) (One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference version 2016)).

Les différences significatives ($p \leq 0,05$) par le test de Tukey (One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference version 2016), ont été déterminées sur les données des tests de caractérisation des bactéries antagonistes à savoir, les quantifications de : la production de biofilm, production de sidérophores, production de biosurfactants, motilité de type swimming et swarming et l'effet du stress osmotique sur la croissance des bactéries antagonistes.

CHAPITRE III :
RESULTATS ET INTERPRETATIONS

CHAPITRE III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1. Ampleur de l'infection par le feu bactérien des vergers prospectés

L'étude symptomatologique sur le terrain dans 73 sites de culture du poirier, du pommier et du cognassier situés dans 7 wilayas, à savoir, Blida, Alger, Médéa, Tipaza, Tizi Ouzou, Bouira et Boumerdès a montré que la plante hôte la plus affectée est le poirier var. Santa Maria. Le poirier porteur de symptômes caractéristiques du feu bactérien est représenté dans 65 sites prospectés et constitue l'espèce dominante de nos prospections, présentant ainsi le taux d'infection le plus important (60 à 75%) comparés aux autres *Maloideae* hôtes (35 à 40%). Ces estimations en pourcentages ont été obtenues après une enquête avec les agriculteurs propriétaires des vergers prospectés et nos questionnaires avec les services de la protection de végétaux (INPV), en particulier durant les années de la collecte des échantillons.

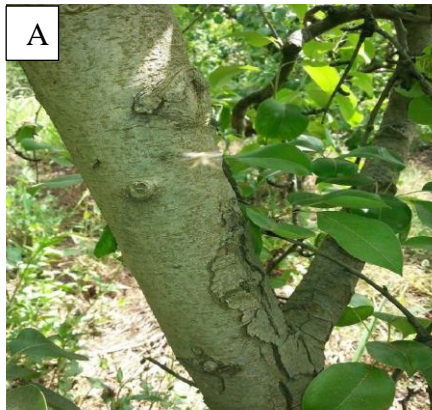
Les observations effectuées ont été classées selon les différentes périodes du cycle phénologique du poirier et du pommier (dormance, floraison, nouaison et grossissement des fruits) (tableau 12). Les arbres infectés montrent les symptômes caractéristiques du feu bactérien avec des chancres sur les branches et troncs, des nécroses sur les feuilles, les fleurs, les inflorescences et les fruits atteints présentent une mélanisation et un brunissement (figure 5). Les gouttelettes de mucus bactérien à la base des pétioles foliaires, des pédoncules de fleurs et de fruits sont souvent observées en période d'humidité élevée.

Durant la période de dormance s'étalant de novembre à février, des chancres sur les troncs et branches, des nécroses sous l'écorce et des mélanisations ont été observés sur les troncs et les branches de l'année précédente avec des dimensions qui varient d'un arbre à un autre, ainsi que des fruits momifiés restant attachés à l'arbre (figures 5A, B).

En période de végétation ou poussée de sève, des nécroses sur les extrémités des feuilles et les jeunes pousses, se prolongeant vers le bas avec apparition des exsudats sur les nouvelles brindilles ont été observées. A la fin de l'attaque, il se produit un recourbement des brindilles et branches en crosse (figures 5 C, D).

Durant la période de floraison et dans le cas d'une attaque précoce, nous avons observé des nécroses florales qui se prolongent vers le pédoncule floral avec apparition des exsudats sur ce dernier, puis une brûlure totale des bouquets floraux (figures 5 E, F). En période de nouaison et en cas d'attaque tardive, les fruits,

brunissent et se dessèchent. Dans certains vergers, les plants de poirier étaient totalement brûlés.



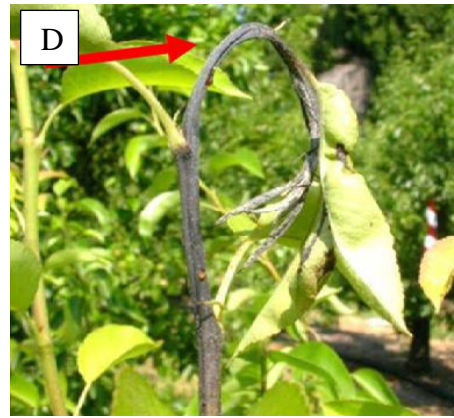
A
Chancres sur le tronc et les branches



B
Paires momifiées attachées sur l'arbre au cours du repos végétatif



C
Brunissement des feuilles



D
Courbure en croc des pousses



E
Exsudats bactériens à la base des pédoncules et sur les branches



F
Mélanisation et brûlures des bouquets floraux

Figure 5 : Symptômes du feu bactérien observés sur le poirier (Photos personnelles).

Tableau 12: Symptômes du feu bactérien observés sur les vergers prospectés

| Stade phénologique du poirier | Symptômes du feu bactérien sur poiriers, pommiers et cognassiers |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dormance | Chancres sur les troncs et les rameaux, nécroses des rameaux et des brindilles de l'année précédente. |
| Floraison | Mélanisation et nécrose des fleurs se prolongeant vers le pédoncule floral, apparition des exsudats, puis une brûlure totale des bouquets floraux. |
| Période de la végétation | Nécroses sur les extrémités des feuilles et les jeunes pousses, qui se prolongent vers le bas avec apparition des exsudats sur les nouvelles brindilles, recourbement en crosse des pousses en particulier sur le poirier. |
| Nouaison et grossissement des fruits | Brunissement sur les fruits et même ceux de la seconde floraison. |

2. Caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des isolats bactériens

Après prélèvement des échantillons symptomatiques à partir de 14 vergers prospectés de poiriers, nous avons pu isoler sur le milieu de culture levane, un total de 56 isolats bactériens purs obtenus à partir des exsudats à la base des bouquets floraux, des branches et des feuilles.

D'après les observations macroscopiques des colonies bactériennes des 56 isolats obtenus sur les boîtes de Pétri, 37 isolats bactériens purs ressemblant macroscopiquement aux caractères d'*Erwinia amylovora* ont été sélectionnés par comparaison à la souche de référence *E. amylovora* BPIC889.

Les colonies retenues pour la suite des tests présentent les caractères les plus apparents et fréquents sur le milieu Levane ; colonies de couleur blanchâtre, circulaires, bombées, lisses, muqueuses, brillantes de diamètre variant de 3 à 8 mm. Ces mêmes caractères morphologiques sont similaires à la souche de référence et ceux décrits sur la fiche phytosanitaire de l'OEPP [7]. Sur le milieu KB, les colonies obtenues sont blanches, petites de 1 mm de diamètre, circulaires et lisses (figure 6). Ces caractères sont similaires à ceux décrits par Miller, [218].

D'autres colonies (19) de couleur crème, plates, circulaires, luisantes obtenues sur le milieu d'isolement Levane, ne répondent pas aux descriptions, ont été éliminées de la collection.

Les résultats de la coloration de Gram montrent que tous les isolats (37 isolats) ainsi que la souche de référence se sont montrés à Gram négatif et apparaissent de couleur rose en forme de bâtonnet sous microscope optique au grossissement 1000 X. La confirmation a été obtenue avec apparition de filaments visqueux sur l'anse à partir de la lame pour le test de KOH.

Le test de production de cytochrome oxydase est négatif pour toute la collection des isolats bactériens, donc les bactéries ne synthétisent pas l'enzyme cytochrome C oxydase. Les résultats obtenus montrent que les isolats (37) présentent une réaction négative comme le montre la souche de référence de l'espèce *E. amylovora*.

Pour le test de la production de l'enzyme catalase, l'ensemble des souches bactériennes et la souche de référence ont montré une réaction positive se traduisant par une effervescence. La bactérie *E. amylovora* est catalase positive, pouvant dissocier le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau.

L'exposition des boîtes des isolats cultivés sur King B à la lumière UV, révèle un résultat négatif du test de fluorescence sur King B pour toute la collection bactérienne et la souche de référence.

Le résultat du test d'oxydation/fermentation est positif pour l'ensemble des isolats étudiés et la souche de référence, se traduisant par la modification de la couleur du milieu du bleu au jaune. Les souches bactériennes d'*Erwinia amylovora* utilisent le glucose en présence et en absence de l'air.

Les résultats obtenus des tests de transformation du sucrose sont des réactions positives pour l'ensemble des souches isolées et la souche de référence, ce qui montre la transformation du sucrose en une substance réductrice à l'exception du témoin négatif montrant une réaction négative.

Le résultat du test de production d'indole est négatif pour l'ensemble des souches isolées et la souche de référence, les bactéries isolées n'ont pas synthétisé l'enzyme tryptophanase qui dégrade l'acide aminé tryptophane.

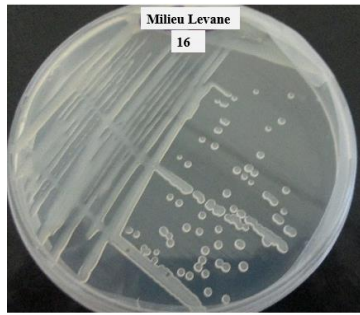
Les résultats obtenus des tests de la liquéfaction de la gélatine sont des réactions positives pour l'ensemble des souches isolées et la souche de référence montrant l'hydrolyse totale de la gélatine en un milieu liquide.

Les résultats sont positifs pour l'ensemble des isolats après la réalisation du test de citrate de Simmons montrant un changement de couleur du milieu, du vert au bleu dans les tubes ensemencés (Tableau 13, figure 6).

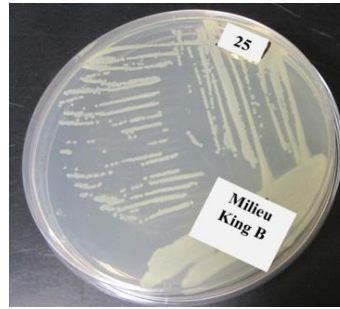
Tableau 13 : Réponses physiologiques et biochimiques des isolats d'*E. amylovora* des différentes localités prospectées

(+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative

| Code | Année d'isolement | Wilaya (Origine) | Région | Gram | Oxydation/ Fermentation de glucose | Production d'oxydase | production de catalase | liquéfaction de gélatine | utilisation de Citrate | Production d'indole | Réduction de sucrose | Croissance à 39°C | Fluorescence sur KB |
|---------------------------------|----------------------------|------------------|--------------|------|------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|
| BPIC889 | souche de référence | | Grèce | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 1 | 2014 | Blida | OEA1 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 2 | 2014 | Blida | OEA2 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 3 | 2014 | Blida | OEA3 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 4,5,6 | 2014 | Blida | Bensalah1 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 7,8,9 | 2014 | Blida | Bensalah2 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 10,11 | 2014 | Blida | Sidi Yahia1 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 12 | 2014 | Blida | Sidi Yahia2 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 15 | 2014 | Blida | Sidi Yahia3 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 16,18,19b | 2014 | Alger | Birtouta1 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 21,22,23,24 | 2014 | Alger | Birtouta2 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 25,26,27 | 2014 | Alger | Tessala 1 | - | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 29, 30,32,33 | 2015 | Tipaza | Attatba1 | | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 37,40a,40b, 44,45,46 | 2015 | Tipaza | Attatba2 | | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 48, 49, 50, 53 | 2017 | Blida | L'Arbaa | | +/+ | - | + | + | + | - | + | - | - |



Morphologie des colonies sur milieu Levane



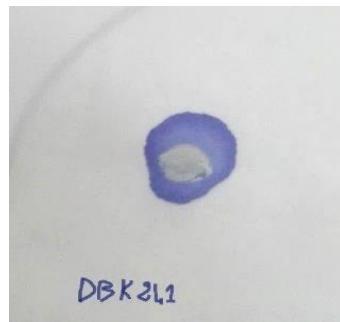
Morphologie des colonies sur milieu KB



Coloration de Gram : Gram – coloration violette



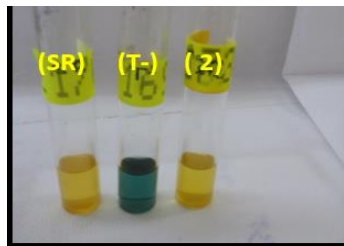
Test catalase (réaction positive)



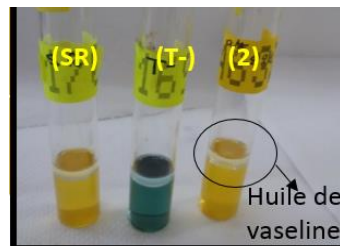
Test Oxydase (réaction négative)



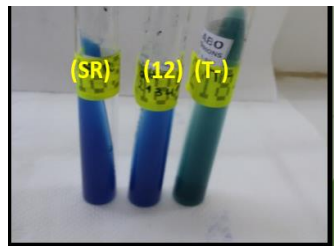
Fluorescence négative sous UV



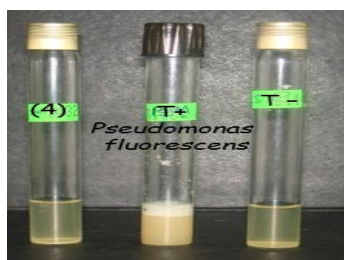
Résultats d'oxydation du glucose



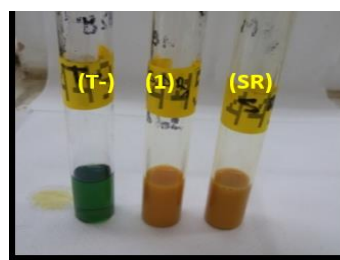
Résultats de fermentation du glucose



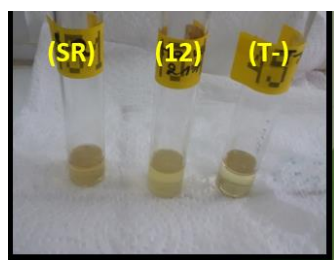
Production de la citrate reductase sur milieu citrate de Simmons



Test de croissance à 39°C



Test de transformation du sucrose



Test de production d'indole

Figure 6 : Réponses aux tests biochimiques et physiologiques des souches isolées.

(T-) : Témoin négatif, (T+) : Témoin positif, (SR) : Souche de référence *Erwinia amylovora* BPIC889.

Concernant la croissance des isolats à 39°C, nous avons obtenu des résultats négatifs pour toute la collection.

L'ensemble des résultats des tests physiologiques et biochimiques montre que les souches isolées des vergers des différentes localités, présentent un même profil de réponse, identique à celui de la souche de référence *E. amylovora* BPIC889 et à celui préconisé par l'OEPP [7].

3. Résultats du pouvoir pathogène des isolats

3.1. Réponse HR sur le tabac

Le test d'hypersensibilité sur le tabac (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) révèle que l'ensemble des isolats ainsi que la souche de référence, montrent 24 h après inoculation un dessèchement des tissus inoculés et 72 h après, des nécroses locales sont évidentes au point d'infiltration des zones foliaires (figure 7).

Les résultats du test d'hypersensibilité sur le tabac confirment que les souches isolées sont pathogènes, tel que décrit dans le protocole *Erwinia amylovora* de l'OEPP [7]. La souche de référence et l'ensemble des isolats inoculés sur le limbe foliaire montrent un résultat très rapide sur les feuilles de tabac (souches virulentes), comparés au témoin inoculé par l'EDS pour lequel le limbe foliaire est resté intact. En effet, la réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac donne une indication de la présence des gènes de pathogénicité *hrp* [7].



| | | |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Limbe foliaire de tabac infiltré par un isolat montrant une nécrose locale | Limbe foliaire de tabac infiltré par la souche <i>E. amylovora</i> BPIC889 montrant une nécrose locale | Limbe foliaire de tabac infiltré par l'EDS montrant une réaction négative |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|

Figure 7 : Réaction d'hypersensibilité : Développement de nécroses aux points d'inoculation sur le tabac (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi), 72 h après inoculation (Photos personnelles).

3.2. Résultats de la pathogénicité sur poires immatures

Le test de pathogénicité sur la plante hôte est un test de diagnostic principal pour caractériser la pathogénicité des isolats d'*E. amylovora*.

La réaction de pathogénicité sur les fruits de la plante hôte var. Santa Maria donne une indication à la présence des gènes de virulence. Les résultats sont apparus après 3–5 jours après inoculation, ils révèlent que les bactéries inoculées sont phytopathogènes [89]. Ce test réalisé sur les 37 souches a permis de montrer 72 h après inoculation, des nécroses avec mélanisation des tissus et des gouttelettes d'exsudats blancs laiteux à la surface des blessures infectées. Ces derniers symptômes sont similaires à ceux observés sur le terrain sur les fruits de poiriers atteints par le feu bactérien (figure 8). Tous les isolats ont montré une réaction positive identique à celle du témoin positif (souche de référence *E. amylovora* BPIC889), tandis que le témoin négatif n'a pas développé de symptômes.

Les résultats de ce test nous ont permis de confirmer la pathogénicité des souches et de reproduire les symptômes rencontrés sur les poiriers prospectés. A partir des mêmes symptômes, les colonies d'*E. amylovora* ont été ré-isolées et réinoculées sur des fruits immatures afin répondre aux étapes du postulat de Koch.

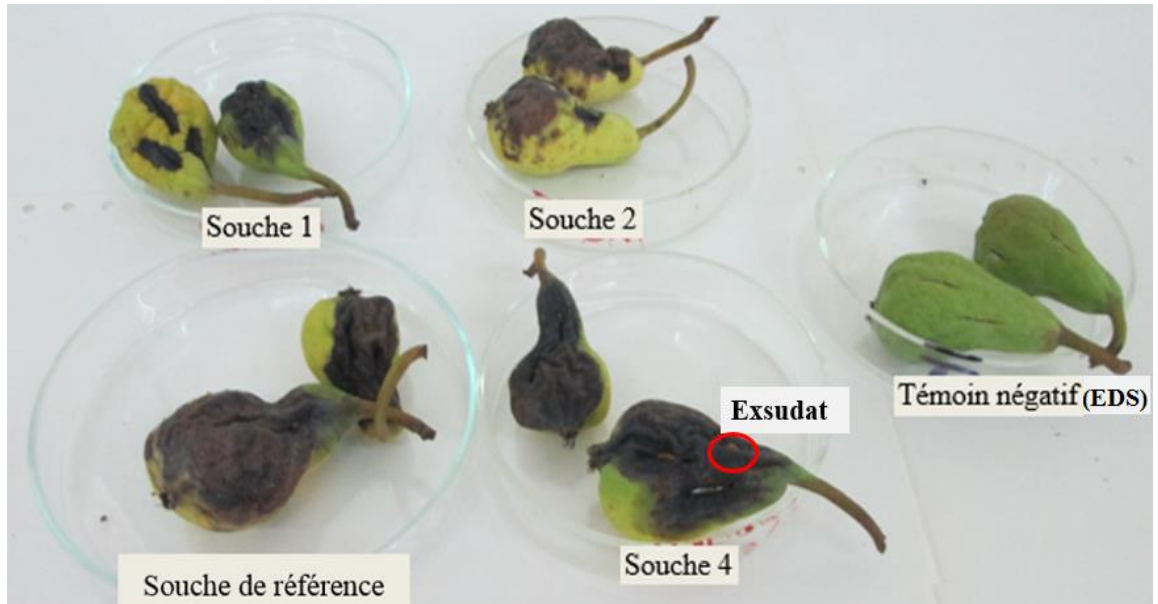


Figure 8 : Réponses des poirettes au test du pouvoir pathogène des isolats inoculés : Nécroses gagnant l'ensemble des fruits et exsudation d'oozes bactériens (Photos personnelles).

4. Résultats de la caractérisation sérologique des isolats

Au total, 37 souches ont été testées par l'immunodosage à flux latéral Ea AgriStrip (figure 9). Cette technique a permis de déceler les bactéries vivantes (non dénaturées) par les anticorps qui forment la base de l'immunodosage à flux latéral en détectant les épitopes sur les membranes externes des cellules bactériennes (nitrocelluloses) qui ont un certain degré de stabilité [219].

Le test sérologique est positif pour l'ensemble des 37 isolats testés. Les lignes «test» et «contrôle» présentent des colorations nettes et identiques sur les bandelettes. Cela signifie qu'après immersion de la base de la bandelette immunologique dans la suspension bactérienne, les lignes de test et de contrôle deviennent visibles et de couleur rouge en présence de la cible d'antigène d'*Erwinia amylovora*. Dans le cas du témoin négatif (EDS) et en absence de cible d'antigène, seule la ligne de contrôle devient visible.

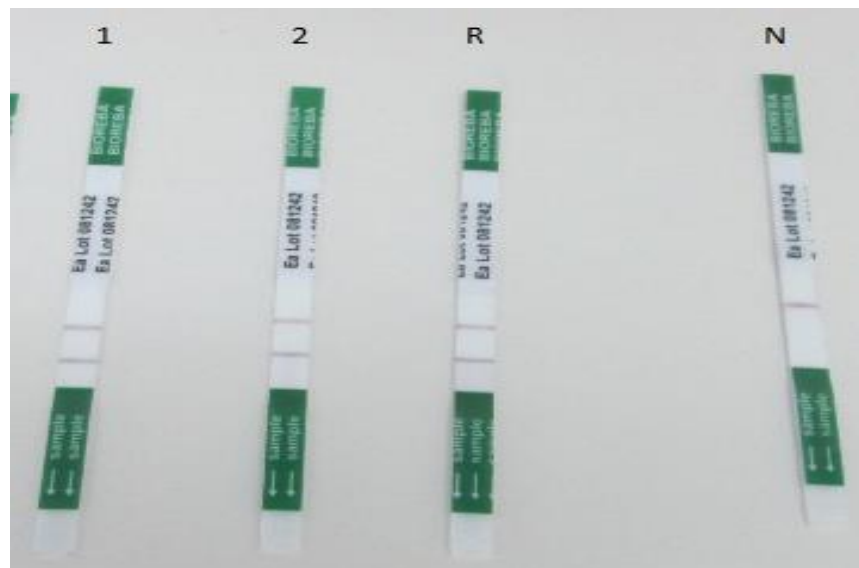


Figure 9 : Réponses sérologiques au test Ea AgriStrip.

R: Souche de référence *E. amylovora* BPIC889. 1, 2 : isolats. N: Témoin négatif

5. Identification moléculaire des souches bactériennes

5.1 Résultats de l'amplification par le couple (G1-F / G2-R)

Tous les isolats d'*E. amylovora*- like testés se sont révélés positifs à l'amplification avec les amorces (G1-F / G2-R). Les fragments amplifiés de d'ADN chromosomique révélés, ont une taille de de 187 pb, similaires à la souche de référence *E. amylovora* BPIC889 et tels que décrits par Taylor *et al.*, [187] (figure 10).

5.2. Résultats de la PCR duplex avec les deux couples (AJ75, AJ76) et (AMSbL, AMSbR)

L'amplification d'un fragment de 844 pb par des amorces AJ75 et AJ76 a mis en évidence la présence de la région du plasmide pEA29 (taille 29 Kb) chez les trente-sept souches ainsi que la souche de référence *E. amylovora* BPIC889 [188]. Un fragment d'ADN spécifique de 1,6 kb provenant de la région chromosomique *ams* [119] a également été amplifié par les amorces AMSbL et AMSbR chez toutes les souches ainsi que la souche de référence *E. amylovora* BPIC889 (figure 11).

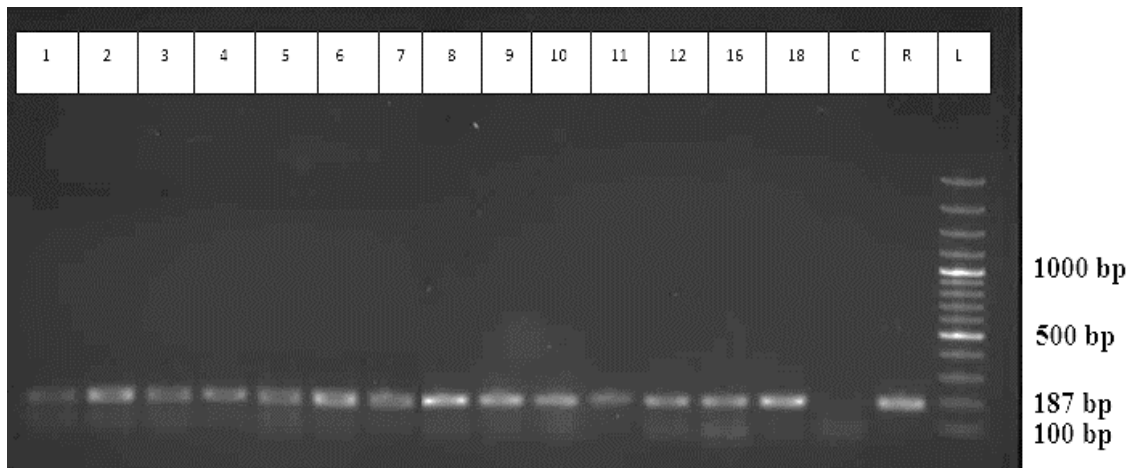


Figure 10 : Migration électrophorétique des produits d'amplification avec les amorces (G1-F / G2-R) d'un fragment d'ADN spécifique sur gel d'agarose à 1,5%.

Souches de 1 à 18, C - Témoin négatif, R: souche de référence *E. amylovora* BPIC889, L – marqueur 1 kb (Promega)

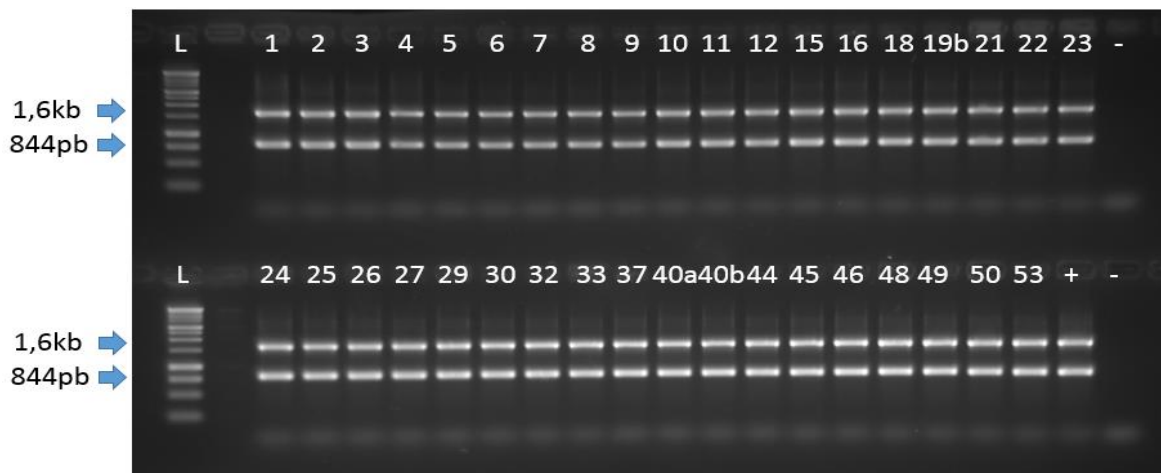


Figure 11 : Migration électrophorétique des amplifiats de la réaction PCR duplex par les amorces (AJ75, AJ76) et (AMSbL, AMSbR).

Lignes 1 à 53 : souches d'*E. amylovora* étudiées, (+) : Témoin positif (souche de référence *E. amylovora* BPIC889), (-) : Témoin négatif (EDS), L : Marqueur 1 kb (Promega).

6. Résultats de l'étude de l'ampleur des symptômes et de l'incidence du feu bactérien dans des vergers de poiriers durant le repos végétatif

Durant la période de dormance, nous avons observé des chancres avec mélanisation des tissus ligneux sur les troncs et les branches (figure 12-A et B). Parallèlement, des nécroses de couleur rouge violacée apparaissent sous ces chancres qui constituent le lieu de conservation de la bactérie *E. amylovora* (figure 16-C). Nous avons remarqué aussi des fruits de l'année précédente complètement brûlés par l'infection bactérienne et restant attachés sur les arbres atteints.

Cette étude réalisée pendant le repos végétatif dans les trois wilayas Blida, Bouira et Boumerdés a montré que l'incidence du feu bactérien sur le poirier var. Santa Maria est plus importante, comparée aux autres *Maloideae* comme le pommier, confirmant ainsi ce qui a été déclaré par les services phytosanitaires des wilayas concernées.

6.1. Evaluation des symptômes chancreux sur les troncs et les branches

Le nombre de chancres sur les arbres atteints dans les onze vergers a été classé en cinq classes d'après l'échelle de Manikandan *et al.*, [190] utilisée. Les résultats indiquent qu'en absence de symptômes de la maladie, aucun chancre n'a été détecté. Dans les cas d'observation des symptômes, la présence de chancres a été détectée dans les 11 vergers, mais l'état de l'arbre dépend de la gravité des chancres par arbre.

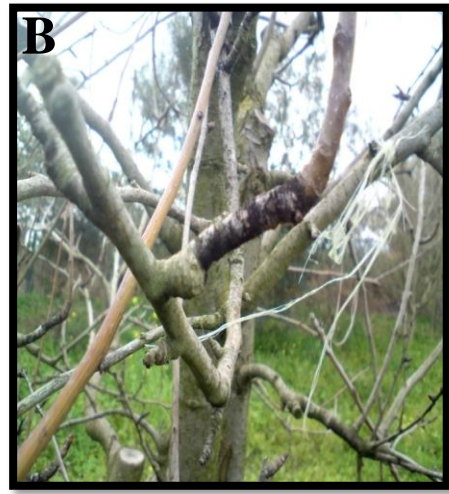
Les vergers de Blida manifestent un grand nombre de chancres en particulier dans les classes 2 et 3 lorsque les arbres sont fortement atteints. Cela se traduit par une forte incidence de la maladie sur les vergers. L'analyse statistique des résultats par le test Tukey montre un effet très significatif ($P < 0,05$) en fonction des régions étudiées.

L'étude symptomatologique réalisée dans les 11 vergers de poiriers pendant le repos végétatif de la wilaya de Blida (L'Arbaa), Bouira (Ait el Aziz, EL Hachimia, Ain bessem) et la wilaya de Boumerdés (Tidjelabine, Boudouaou) a révélé la présence de chancres au niveau des branches et les troncs avec des dimensions qui varient d'un arbre à un autre. Ces symptômes typiques du feu bactérien, constituent la caractéristique la plus répandue d'*Erwinia amylovora*, qui hiverne et se conserve à la

base de l'arbre au niveau des troncs et branches pendant la saison difficile et lorsque les conditions climatiques deviennent défavorables.



A : Chancre sur le tronc



B : Chancre sur les branches



C : Nécroses sous les chancres du tronc

Figure 12 : Symptômes au repos végétatif de types chancres sur tronc et branches de poiriers préalablement infectés par le feu bactérien (Photos personnelles).

En général, les classes 1 et 2 présentent un nombre très élevé de chancres sur les arbres atteints. Dans ce cas, l'état de l'arbre est sévèrement attaqué par le feu bactérien en particulier dans les deux régions de Bouira et Blida (figure 13).

Nous avons noté une importante progression pour les vergers de poiriers de Blida (V1, V2 et V3), pour un nombre des chancres de 184 pour la classe 1. Les classes 2 et 3 présentent le nombre de chancres le plus important sur les branches avec, 1102 et 661 respectivement.

A partir des tableaux d'évaluation du nombre de chancres, nous avons enregistré 245 chancres pour la classe 1, qui représente un nombre très élevé de chancres des vergers de poirier de Bouira. Dans ce cas, l'état de l'arbre est sévèrement attaqué par le feu bactérien suivi par la classe 2 avec un nombre de chancres de 129. Toutefois, l'évaluation du nombre de chancres de feu bactérien dans les vergers de Boumerdés, nous a permis de noter un grand nombre de symptômes de ce type pour le niveau 2 avec 127 chancres. Cependant, la classe 4 totalise un faible nombre de chancres pour tous les vergers étudiés, soit, 128 chancres dans les vergers de Blida et 5 chancres dans ceux de Bouira.

Ces résultats ont montré que la situation de la maladie est prononcée dans la région de Blida. Cela se traduit par une forte incidence de la maladie sur ces vergers.

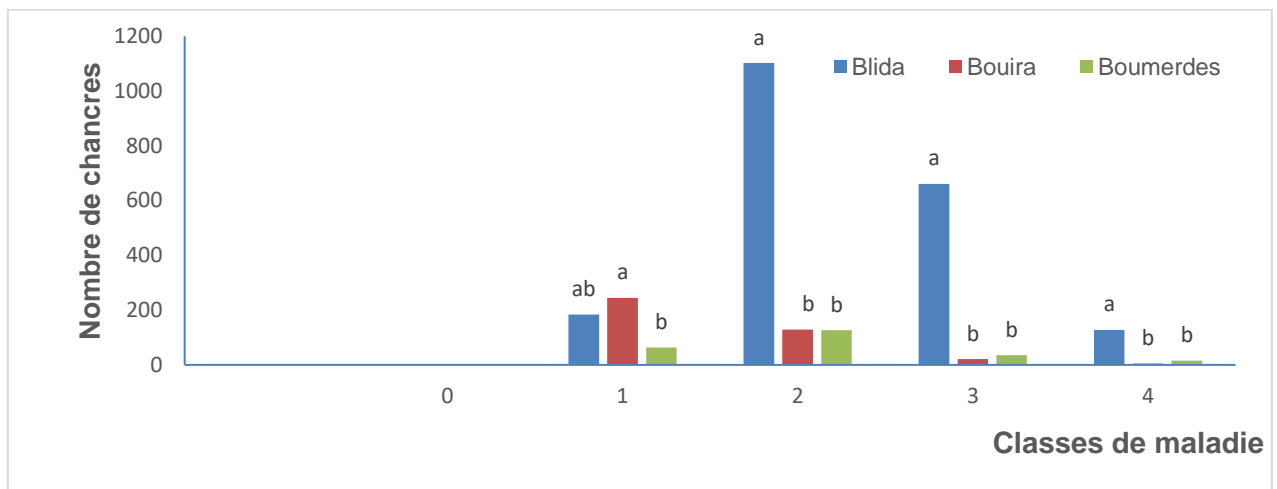


Figure 13 : Evaluation du nombre de chancres des vergers atteints selon les classes du feu bactérien ($P < 0,05$)

6.2. Evaluation de la taille des chancres sur les troncs et les branches

Dans les 11 vergers, des mesures de la longueur et la largeur des chancres des troncs et des branches ont été réalisées sur les arbres atteints par le feu bactérien de chaque verger.

A partir des résultats de la taille (longueur et largeur) des chancres dans les vergers étudiés, nous avons remarqué que la région de Blida présente le nombre le plus élevé de chancres dans les classes 1 et 2. En effet, ces classes sont représentées par une taille (longueur/largeur) de 1-50cm/0,5-25cm sur les troncs et 0,5-25cm/ 0,5-7cm sur les branches.

De plus, la taille des chancres présente des diamètres importants qui peuvent atteindre jusqu'à 120 cm de longueur et 5 cm de largeur. Cette dernière observation a été retenue pour les vergers de Blida. Il ressort que les vergers de poirier de Blida sont les plus infectés avec un nombre de chancres selon la longueur et la largeur de la classe 1 de 1627 à 1659 chancres.

Les vergers de Bouira montrent des valeurs plus faibles par rapport à Blida 788 à 1006 chancres de la classe 1. Pour les vergers de Boumerdès, 809 à 922 chancres sur troncs et 92 à 106 chancres sur les branches de la même classe (figure 14).

Les classes 3 et 4 présentent entre 14 et 131 chancres dans tous les vergers étudiés, avec un nombre élevé à Blida et Bouira. En effet, ces classes sont représentées par une taille de 50-100cm/25-50cm sur les troncs et 25-50cm/ 7-14cm sur les branches.

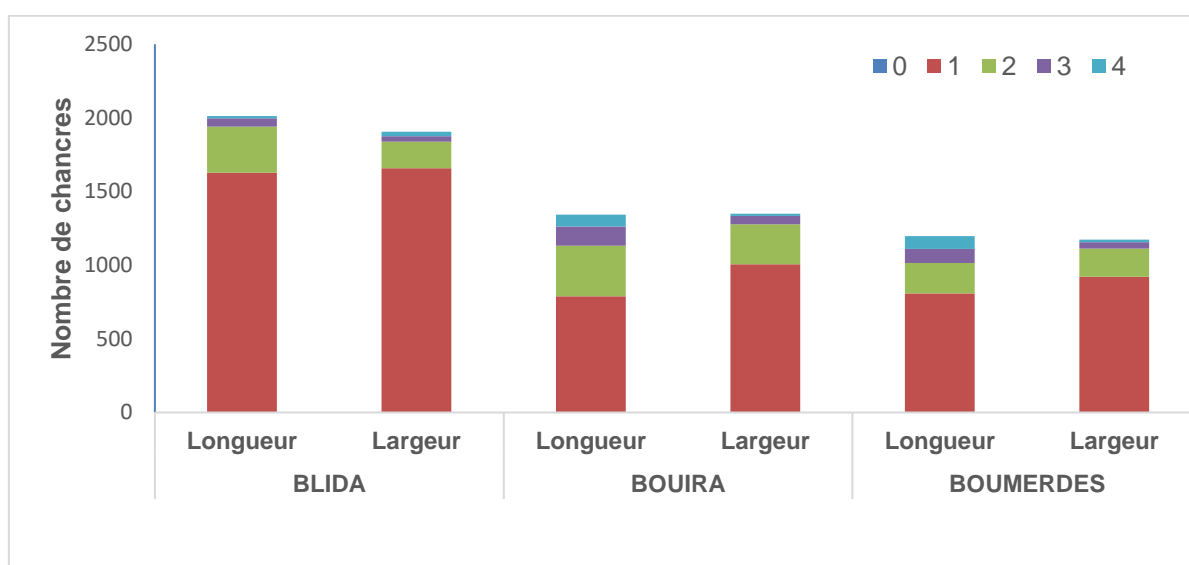


Figure 14 : Nombre de chancres sur les troncs et les branches des poiriers infectés par le feu bactérien : selon la taille des chancres (L : Longueur, l : Largeur).

6.3. Évaluation de l'incidence de la maladie

L'incidence du feu bactérien présente des valeurs différentes pour les 11 vergers étudiés. En effet, les valeurs les plus élevées ont été enregistrées dans les vergers de poiriers de L'Arbaa à la wilaya de Blida (V2) et de Tidjelabine à Boumerdès (V10), en montrant une incidence de 90 et 92% respectivement, ce qui explique la forte attaque par cette maladie. L'analyse statistique des résultats obtenus par le test Tukey révèle un effet significatif de l'incidence de la maladie ($P=0,05$) en rapport avec les régions étudiées (figure 15).

D'autre part, les 2 vergers de Boudouaou et Tidjelabine à Boumerdès (V9 et V11) présentent une valeur très élevée du taux d'infection (73%). Une incidence de la maladie D= 68% a été enregistrée à Bouira (V8). Les autres vergers étudiés ont montré des valeurs qui varient entre D=35 et 50%.

Nous pouvons conclure que l'incidence du feu bactérien dans les vergers de poiriers des wilayas de Blida et Boumerdès est plus importante par rapport à ceux de Bouira.

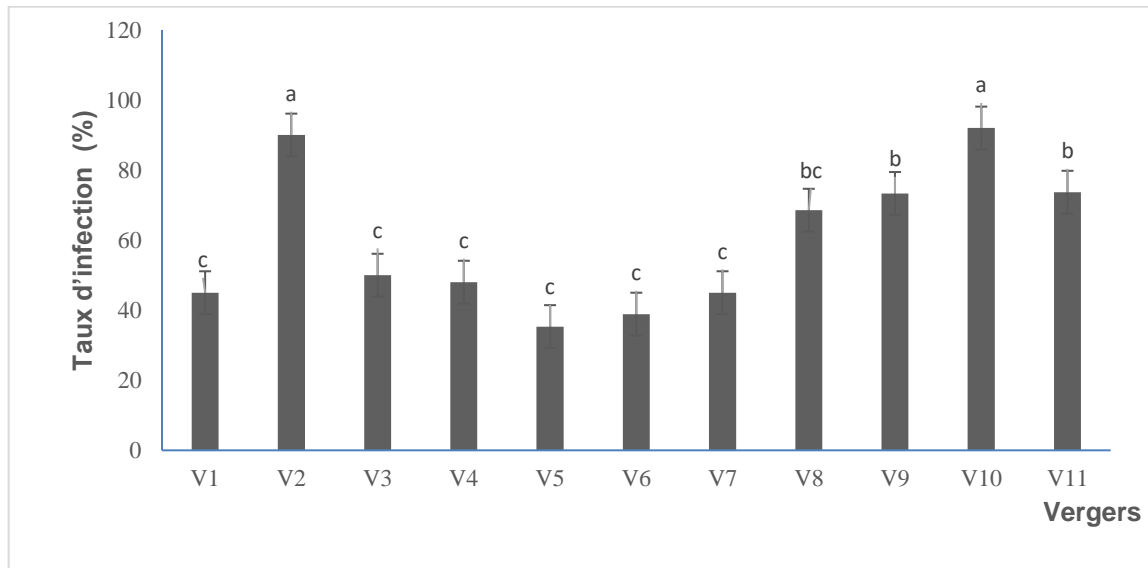


Figure 15 : Taux d'infection par le feu bactérien dans les 11 vergers d'étude (P=0,05)

6.4. Evaluation de la sévérité de la maladie

Les résultats évalués selon l'indice de McKinney montrent que la sévérité la plus élevée du feu bactérien sur les poiriers, a été obtenue dans le verger V2 situé à L'Arbaa avec une sévérité de maladie S= 55%, suivi des vergers de Boudouaou et Tidjelabine (V10, V9 et V11) avec S=49,16 % et 42,63% respectivement.

Ces résultats montrent que ces deux régions révèlent une sévérité du feu bactérien très remarquable et significative (P=0,05), avec des valeurs proches ou dépassant 50% (figure 16). De même, les résultats indiquent que la sévérité de la maladie de la wilaya de Bouira est moyennement élevée en particulier pour les vergers d'El-Hachimia V7 (S= 24,12%) et d'Ain Bessam V8 (S=33,75%). Le reste des vergers présente des pourcentages de sévérité assez faibles qui varient entre S= 16% et 27,7%.

Tous les résultats obtenus dans cette partie, montrent l'existence et la propagation du feu bactérien dans les vergers étudiés qui est très évoluée dans les wilayas de Blida et Boumerdés par rapport aux vergers de Bouira.

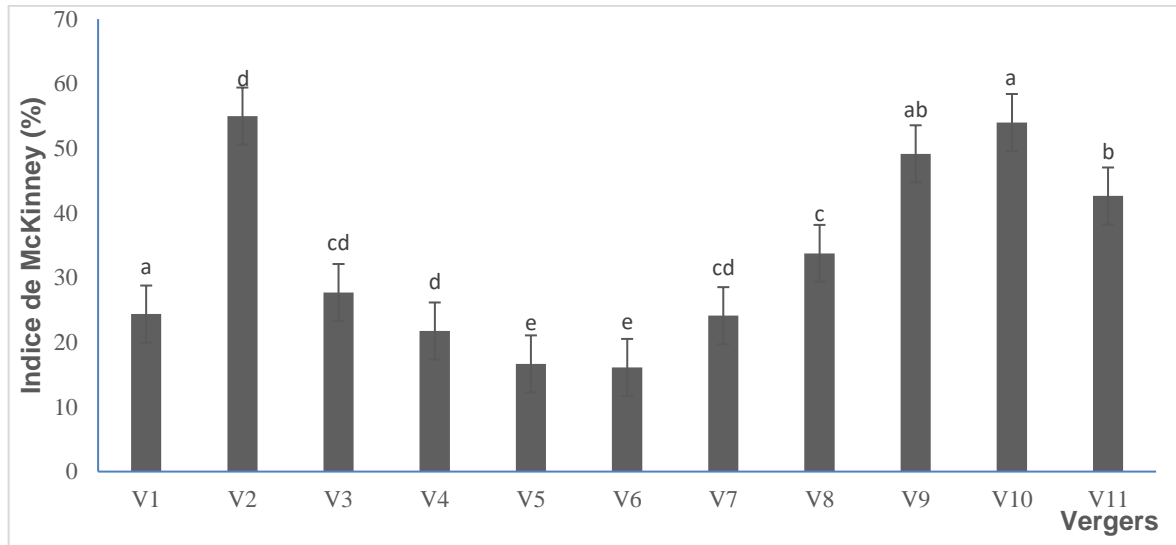


Figure 16 : Sévérité du feu bactérien dans les vergers de poiriers selon l'indice de McKinney (P=0,05)

7. Analyse de la diversité génétique des souches d'*Erwinia amylovora*

7.1 Typage génomique par BOX-PCR et ERIC-PCR

Sur la base de l'analyse des profils génomiques par BOX-PCR et ERIC-PCR, les souches d'*Erwinia amylovora* algériennes isolées dans la présente étude ont été regroupées en fonction de leur profil génétique obtenu et comparées aux souches de référence (tableau 14).

Les résultats de BOX-PCR ont permis de révéler trois groupes de souches (figure 17). Le premier groupe inclut cinq souches (souche n° 2, 15, 17, 22, 26), qui forment un profil génétique avec neuf fragments identiques d'une taille comprise entre 200 à 2000 pb. Le deuxième groupe comprend 15 souches (souche n°: 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 16, 19, 20, 23, 25, 27), qui constituent un profil génétique avec 14 fragments identiques de 300 à 1500 pb. Enfin, le troisième groupe inclut six souches (souche n°: 4, 8, 9, 13, 21, 24) ainsi que les souches de référence d'Italie et de Grèce, qui forment un profil génétique avec 19 fragments identiques de 200 à 4000 pb. Le profil de la souche 18, faiblement illustré sur la figure 12, était similaire à celui du premier groupe.

Concernant les résultats de l'analyse génomique par ERIC-PCR, quatre groupes de souches ont été discriminés. Le premier groupe comprend sept souches (souche n° 1, 3, 19, 20, 21, 22, 27) formant un profil génétique avec sept fragments identiques d'une taille allant de 100 à 1000 pb. Le deuxième groupe comprenait sept autres souches (souche n°: 2, 4, 8, 9, 10, 13, 24) ainsi que les souches de référence, qui forment un profil génétique avec 19 fragments identiques de 100 à 4000 pb.

Le troisième groupe inclut dix souches (souche n°: 5, 6, 7, 11, 12, 14, 16, 23, 25, 26) qui forment un profil génétique de neuf fragments identiques de 100 à 2000 pb. Enfin, les souches n° 15, 17 et 18 ont donné un profil génétique faible mais similaire (figure 18).

Tableau 14 : Analyse génomiques par BOX-PCR et ERIC-PCR

| | Groupe | Nombre | Souches | Profils génétiques |
|----------|--------|--------|-------------------------------------------------------|------------------------------|
| BOX-PCR | 1 | 5 | 2, 15, 17, 22, 26 | 9 fragments :200 à 2000 pb |
| | 2 | 15 | 1, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 16, 19, 20, 23, 25, 27 | 14 fragments :300 à 1500 pb |
| | 3 | 6 | 4, 8, 9, 13, 21, 24 | 19 fragments : 200 à 4000 pb |
| ERIC-PCR | 1 | 7 | 1, 3, 19, 20, 21, 22, 27 | 7 fragments: 100 à 1000 pb |
| | 2 | 7 | 2, 4, 8, 9, 10, 13, 24 | 19 fragments :100 à 4000 pb |
| | 3 | 10 | 5, 6, 7, 11, 12, 14, 16, 23, 25, 26 | 9 fragments : 100 à 2000 pb |
| | 4 | 3 | 15, 17 et 18 | Faible |

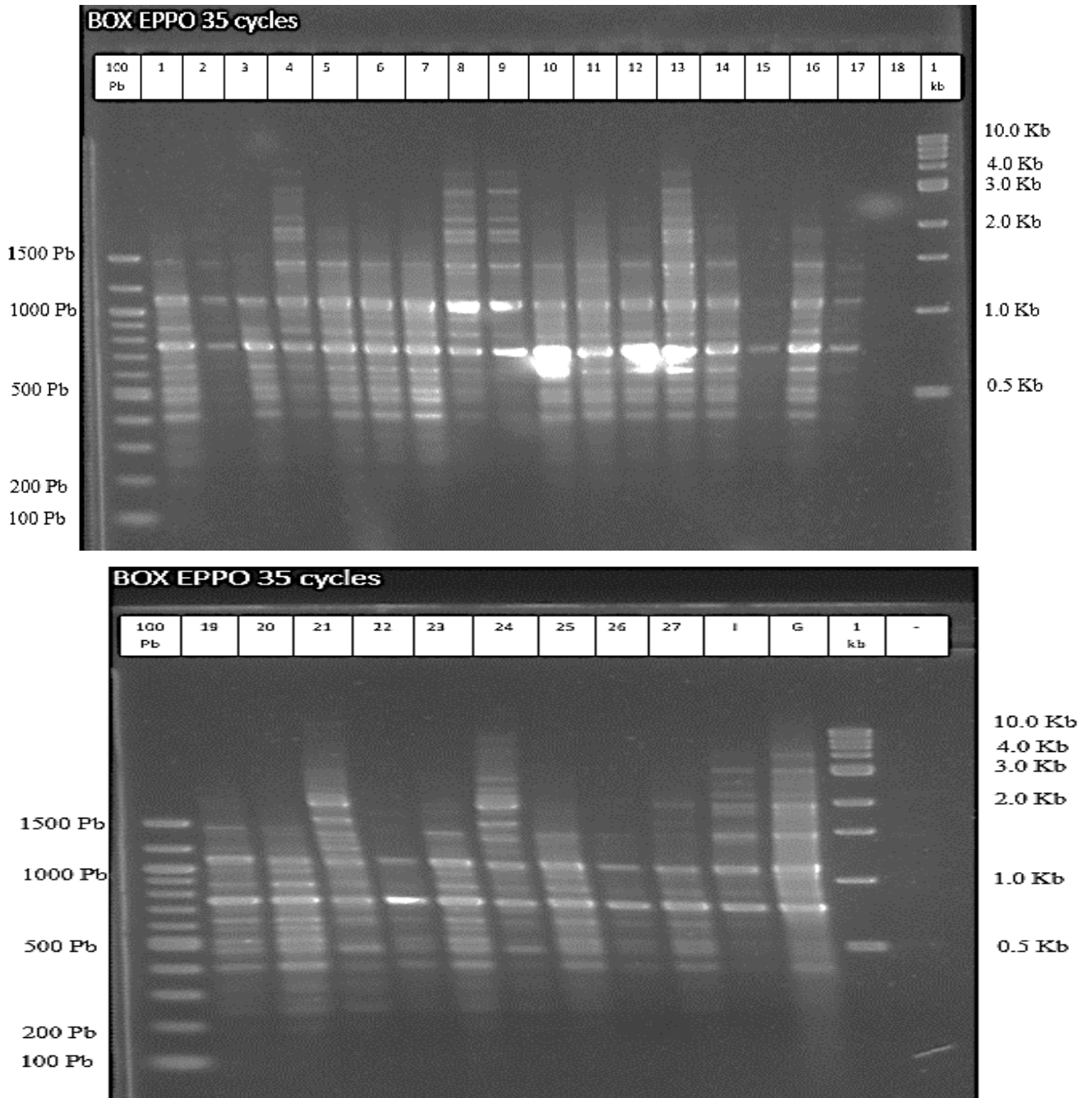


Figure 17 : Electrophorèse des fragments issus des souches d'*E. amylovora* étudiées, obtenus par amplification avec l'amorce BOX (BOXA1R).

Marqueur d'ADN de 100 pb (Promega), Lignes (1 à 27): souches d'*E. amylovora* ; I: souche de référence d'Italie; (G): souche de référence *E. amylovora* BPIC889; (-): Témoin négatif, Marqueur d'ADN de 1 kb (Promega).

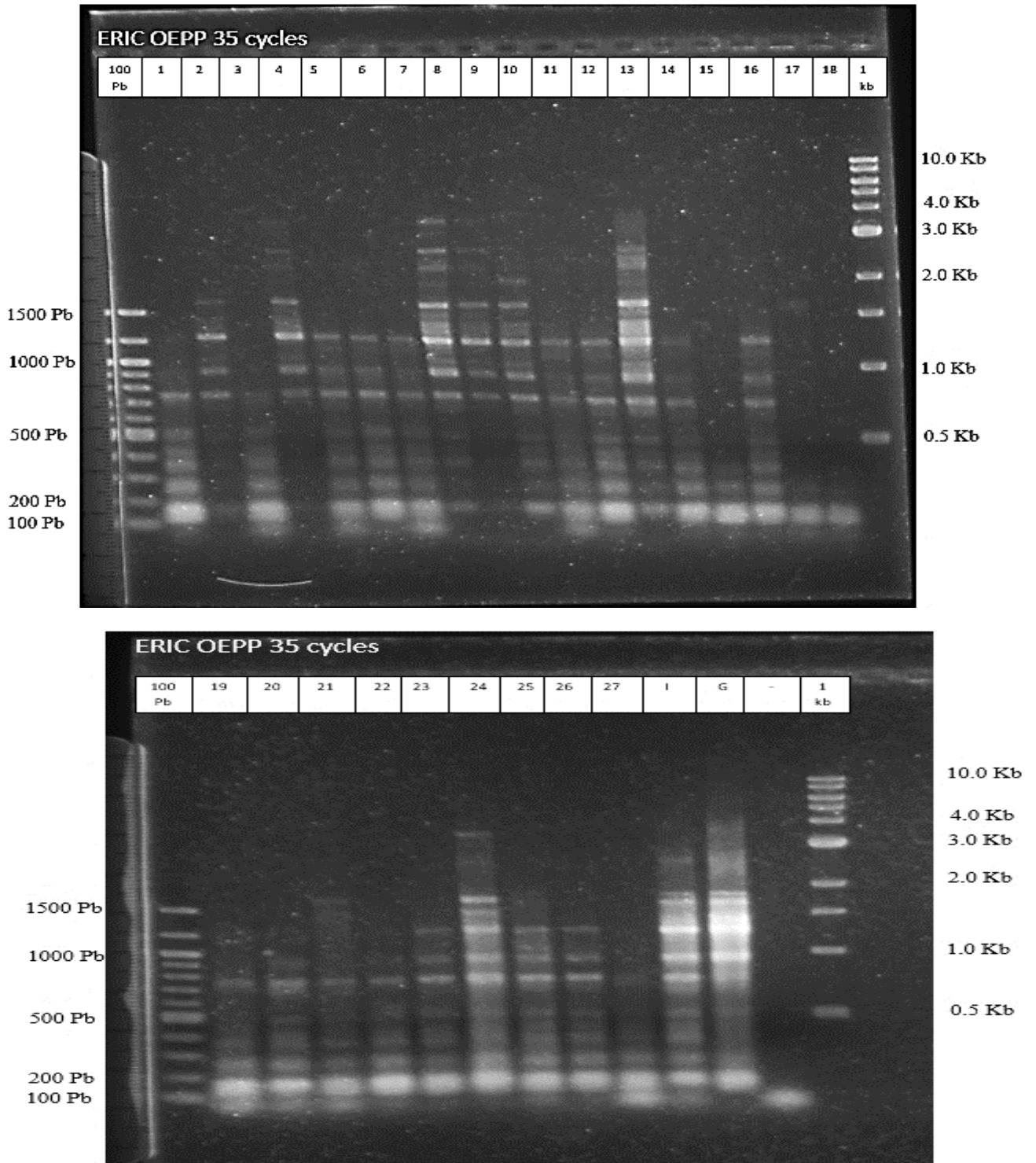


Figure 18 : Electrophorèse des fragments issus des souches d'*E. amylovora* étudiées, obtenus par amplification avec les amorces ERIC (ERIC1R, ERIC2).

Marqueur d'ADN de 100 pb (Promega); Lignes (1 à 27): souches d'*E. amylovora*; (I): souche de référence d'Italie; (G): souche de référence *E. amylovora* BPIC889 (-): Témoin négatif. Marqueur d'ADN de 1 kb (Promega).

7.2 Typage de la diversité génétique des souches d'*E. amylovora* par le marqueur VNTR

Le génotypage a été utilisé par l'analyse de 6 loci de VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) ou Multi Locus VNTR Analysis (MLVA) de la collection locale des souches d'*E. amylovora* suivie d'une révélation par électrophorèse capillaire. Le polymorphisme de ces VNTRs a été utilisé avec succès chez 25 souches représentatives dans le but d'évaluer l'intérêt de son utilisation comme marqueur épidémiologique et d'apprécier son rôle dans la dynamique évolutive de l'espèce. Dans le logiciel bionumerics, il y a un algorithme qui calcule l'indice de diversité et le nombre de catégories.

Le pouvoir discriminant des 6 loci VNTR a été évalué par l'indice de diversité de Simpson [220]. L'analyse de la variabilité allélique des 6 loci VNTR sur les 25 souches d'*E. amylovora* ont révélé le plus grand nombre d'allèles différents au locus A (3), suivi par le locus F (2), tandis que les autres loci ont montré 1 allèle. La valeur de l'indice diversité de Simpson est comprise entre 0 et 1, et plus la valeur de l'indice dans un locus donné est élevée, plus le pouvoir discriminant de ce locus est élevé (tableau 15). Les locus VNTR A et F avaient le pouvoir discriminatoire le plus élevé sur l'ensemble des souches étudiées, avec des indices de diversité de 0,44 et 0,85 respectivement ; les quatre locus (B, C, D et H) présentent le pouvoir discriminant le plus bas (0).

Deux arbres en MST ont été élaborés, l'un avec des couleurs en fonction de l'année d'isolement (2014, 2015 et 2017) et l'autre avec des couleurs en fonction de la localité d'origine (Oued El Alleug, L'Arbaa, Bensalah, Birtouta, Tessala El Merdja, Sidi yahia et Attatba).

L'analyse minimale de l'arbre couvrant (MST) a montré que quatre haplotypes étaient présents chez les 25 souches testées qui différaient pour un nombre de répétitions VNTR.

Chaque cercle représente un type MLVA (haplotype) avec une taille correspondant au nombre de souches qui partagent un profil type MLVA identique en fonction de l'année d'isolement et aussi de l'origine géographique des souches (figure 19). L'analyse n'a pas créé de groupes distincts sur la base de l'année d'isolement.

Durant les trois années d'isolement, la diversité des souches n'est pas différente d'une année à l'autre.

Tableau 15: Résultats de l'analyse MLVA effectuée sur vingt-cinq souches d'*E. amylovora*.

| Loci | Nombre des allèles différents | Nombre de répétitions min | Nombre de répétitions max | Indice de Diversité (Simpson) |
|------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| A | 3 | 5 | 7 | 0,4432 |
| B | 1 | 3 | 3 | 0 |
| C | 1 | 7 | 7 | 0 |
| D | 1 | 9 | 9 | 0 |
| F | 2 | 6 | 7 | 0,8528 |
| H | 1 | 8 | 8 | 0 |

La présence d'une diversité avec 4 haplotypes avec une variabilité allélique des 6 loci VNTR chez les 25 souches résumée dans le tableau 16, révèle 2 VNTRs avec des formes alléliques différentes sur la collection. En effet, seuls deux loci (A et F) étaient polymorphes avec des répétitions par locus allant de cinq à sept pour le locus A et de six à sept pour le locus F.

Un haplotype distinct est révélé dans un verger d'Attatba 2 (souches 40b, 44, 45, 46), lorsque l'analyse a été réalisée en tenant compte de l'origine géographique des souches (figure 20).

Par ailleurs, comme quatre haplotypes sont présents dont 4 VNTRs sur 6 sont identiques pour toutes les souches, cette analyse montre une diversité de la population algérienne d'*E. amylovora* même si les villes d'origine ne sont pas très éloignées les unes des autres au niveau géographique.

Tableau 16: Coefficient catégoriel de 25 souches d'*E. amylovora* pour chaque VNTR

| N° | Année d'isolement | Région | Commune | A | B | C | D | F | H | Haplotype |
|-----|-------------------|--------|----------------|---|---|---|---|---|---|-----------|
| 1 | 2014 | Blida | Oued El Alleug | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 2 | 2014 | Blida | Oued El Alleug | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 3 | 2014 | Blida | Oued El Alleug | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 4 | 2014 | Blida | Bensalah | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 7 | 2014 | Blida | Bensalah | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 8 | 2014 | Blida | Bensalah | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 11 | 2014 | Blida | Sidi Yahia | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 12 | 2014 | Blida | Sidi Yahia | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 16 | 2014 | Alger | Birtouta | 6 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 2 |
| 18 | 2014 | Alger | Birtouta | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 21 | 2014 | Alger | Birtouta | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 22 | 2014 | Alger | Birtouta | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 23 | 2014 | Alger | Birtouta | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 25 | 2014 | Alger | Tessala | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 26 | 2014 | Alger | Tessala | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 27 | 2014 | Alger | Tessala | 6 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 2 |
| 29 | 2015 | Tipaza | Hattatba1 | 6 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 2 |
| 30 | 2015 | Tipaza | Hattatba1 | 6 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 2 |
| 40b | 2015 | Tipaza | Hattatba2 | 7 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 3 |
| 44 | 2015 | Tipaza | Hattatba2 | 7 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 3 |
| 45 | 2015 | Tipaza | Hattatba2 | 7 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 3 |
| 46 | 2015 | Tipaza | Hattatba2 | 7 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 3 |
| 49 | 2017 | Blida | L'Arbaa | 6 | 3 | 7 | 9 | 4 | 8 | 2 |
| 50 | 2017 | Blida | L'Arbaa | 5 | 3 | 7 | 9 | 7 | 8 | 1 |
| 53 | 2017 | Blida | L'Arbaa | 6 | 3 | 7 | 9 | 4 | 8 | 4 |

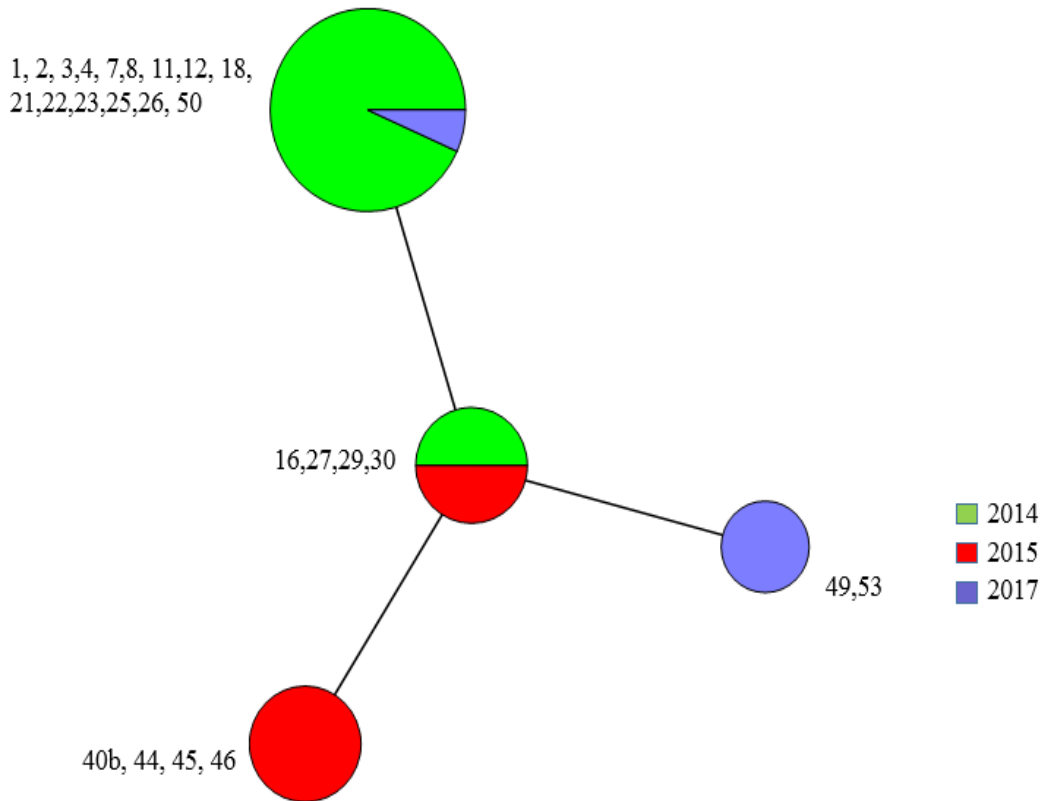


Figure 19 : Minimal Spanning Tree (MST) des souches d'*E. amylovora* colorées selon l'année d'isolement.

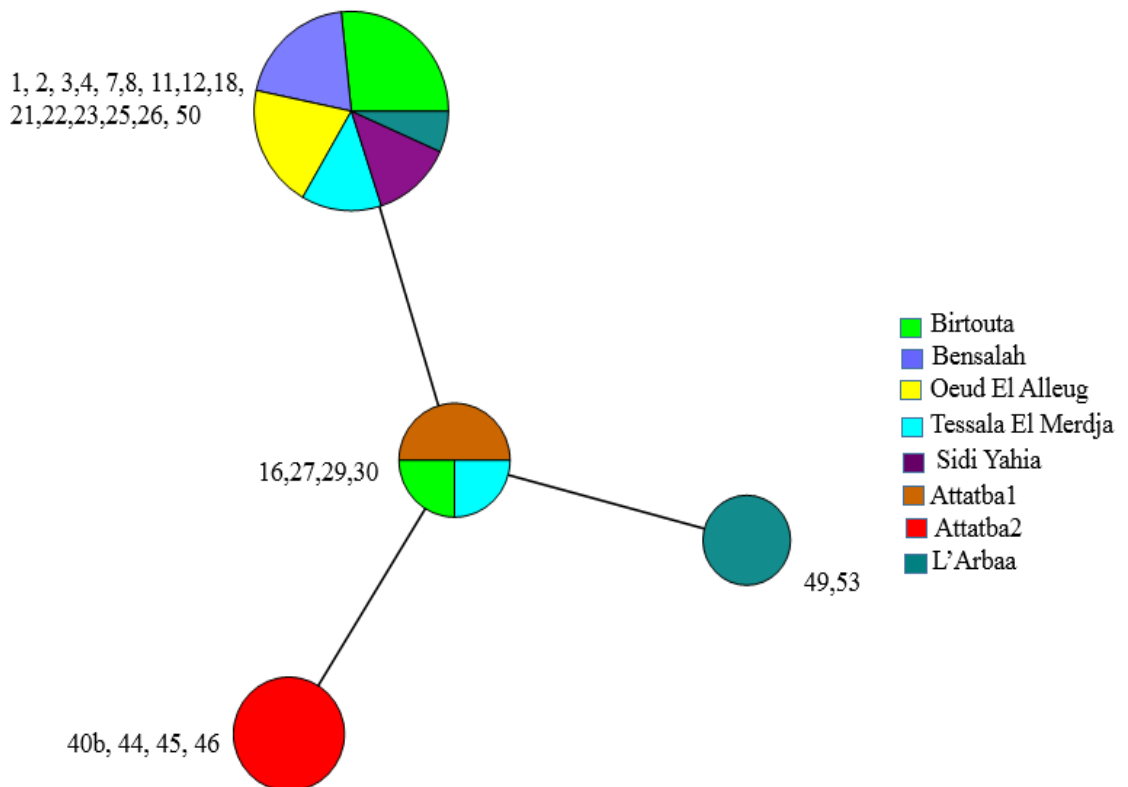


Figure 20 : Minimal Spanning Tree (MST) des souches d'*E. amylovora*, colorées selon l'origine géographique.

8. Bioprotection par utilisation de bactéries endophytes vis-à-vis d'*Erwinia amylovora*

8.1. Antagonisme *in vitro* des bactéries endophytes à l'égard des deux souches d'*Erwinia amylovora* E1 et E5

La confrontation directe de 20 souches endophytes avec *E. amylovora*, nous a permis de sélectionner celles produisant des zones d'inhibition claires (figure 21). Le but de ce test était de sélectionner les souches antagonistes les plus performantes.

L'évaluation d'une activité positive antibactérienne des antagonistes s'est traduite par une zone d'inhibition claire qui correspond à un arrêt de la croissance d'*Erwinia amylovora* tout autour de la colonie bactérienne testée.

La comparaison des zones d'inhibition enregistrées, montre une variabilité dans l'action d'antagonisme *in vitro* en fonction des bactéries antagonistes et des souches du pathogène. Toutes les souches antagonistes testées pour leur effet d'antagonisme sur *Erwinia amylovora* ont montré une activité d'antagonisme qui diffère d'une souche à une autre. La taille des zones d'inhibition enregistrée, se situe entre 18 mm pour *Bacillus amyloliquefaciens* CR1 et 53 mm de diamètre pour *B. methylotrophicus* PF3 (figure 22).

La confrontation des souches pathogènes avec les souches *Bacillus* spp. OR2, PF1 et PF3 manifestent une taille importante de la zone d'inhibition de 50 mm de diamètre.

En second lieu, l'interaction des souches pathogènes avec les deux souches *Bacillus subtilis* EHF5 et *Bacillus amyloliquefaciens* OS4, exhibe une taille de la zone d'inhibition de 45 mm. Les autres souches antagonistes ont une zone d'inhibition variant entre 20 et 30 mm.

La confrontation des souches pathogènes d'*E. amylovora* avec les deux souches *Pseudomonas* spp. PS1 et *Pseudomonas* spp. EPR3 révèle un diamètre de la zone d'inhibition de 20 mm. Ces dernières souches sont faiblement inhibitrices comparées aux souches du genre de *Bacillus* comme OR2, qui montrent un pouvoir d'antagonisme *in vitro* important.

Parmi cette collection de souches antagonistes et sur la base des résultats d'antagonisme *in vitro*, quatre ont été sélectionnées pour l'étude *in planta*, à savoir : a) deux *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens* EHF5 et *B. methylotrophicus* PF3) et b) deux souches de *Pseudomonas* (*P. brassicacearum* CR2 et PS1). Les quatre souches retenues ont produit des zones d'inhibition importantes *in vitro*.

D'autres critères tels que la croissance, la colonisation rapide et l'adaptation aux stress environnementaux ont été retenus pour la sélection de ces souches (partie détaillée dans le paragraphe 7.2). Ces caractères sont souvent décrits et utilisés pour le choix de souches pour une évaluation du potentiel de biocontrôle. Par ailleurs, ces mêmes souches se sont révélées également dans des travaux antérieurs comme bénéfiques et intéressantes avec un potentiel de lutte biologique et une activité de promotion de la croissance des plantes [193].

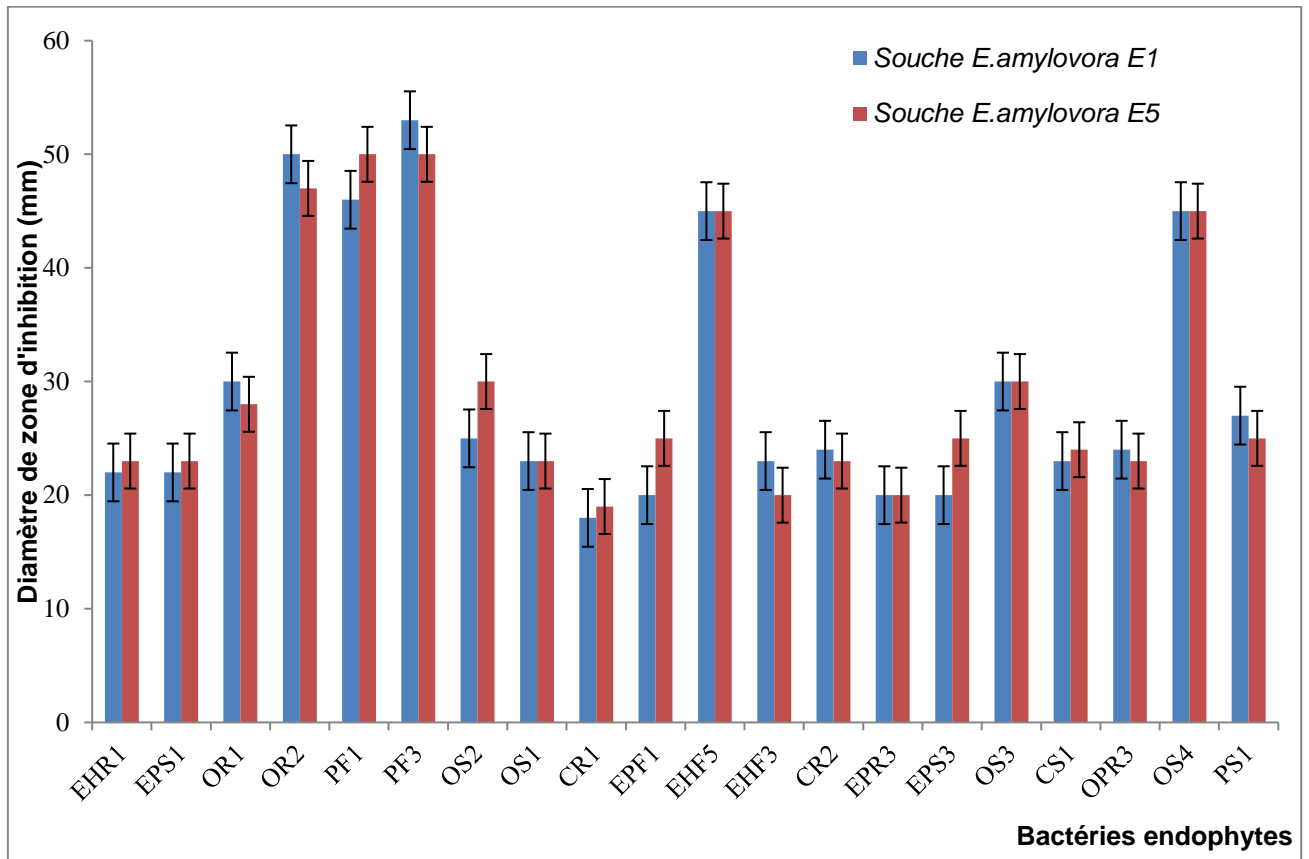


Figure 21 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'interaction de 20 souches antagonistes et *Erwinia amylovora* E1 et E5.

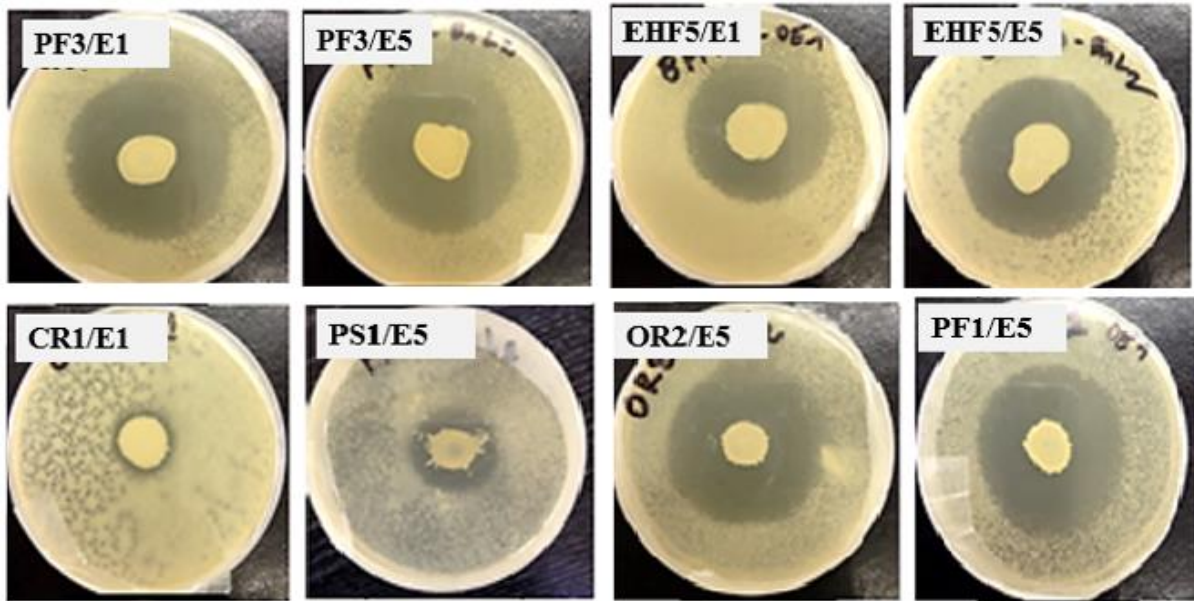


Figure 22 : Antagonisme *in vitro* des bactéries endophytes des genres *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. sur les deux souches d'*Erwinia amylovora* E1 et E5. *Bacillus* spp. (PF3, EHF5, PF1, OR2), *Pseudomonas* spp. (PS1, CR2)

8.2. Antagonisme *in planta* des souches endophytes à l'égard des deux souches d'*Erwinia amylovora*

8.2.1. Comportement des deux souches pathogènes d'*E. amylovora* à l'égard des bactéries endophytes sur les fruits immatures : Recherche de l'effet préventif

Pour le test d'antagonisme *in planta*, nous avons sélectionné les souches *B. amyloliquefaciens* EHF5, *B. methylotrophicus* PF3 et *P. brassicacearum* CR2, PS1. La comparaison des taux de nécroses enregistrés sur les fruits immatures inoculés tardivement (24h) après l'apport des souches antagonistes, montre une efficacité du traitement. L'action des bactéries antagonistes sur la suppression des symptômes était très apparente sur les poirettes. Les souches testées pour leur effet d'antagonisme *in planta* sur les 2 souches d'*Erwinia amylovora* ont montré une forte activité d'antagonisme avec réduction ou absence de nécrose.

Une réduction significative des symptômes de la maladie ($P \leq 0,05$) a été enregistrée lorsque les souches d'*E. amylovora* E1 et E5 sont inoculées sur des poirettes après la protection des incisions des fruits par les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* étudiées.

Les souches de *Pseudomonas* CR2 et PS1 se sont révélées les plus efficaces contre les deux souches d'*E. amylovora*, avec des symptômes sur les poirettes réduits à une zone nécrotique de quelques millimètres entourant les plaies et sans exsudats bactériens, classées dans l'indice 1 de la maladie (figure 23).

Les souches de *Bacillus* EHF5, PF3 ont également provoqué une réduction significative des symptômes de la maladie, mais leur efficacité était inférieure à celle des *Pseudomonas* classées dans l'indice 2 de la maladie.

Le témoin négatif dont les fruits immatures ont été inoculés avec l'EDS ne présente aucune nécrose, ni exsudats, ni mélanisation des incisions sur les tissus des fruits, ce qui signifie que l'absence de la bactérie pathogène a conduit à une absence totale des symptômes du feu bactérien et l'absence de nécroses sur le témoin négatif confirme que les fruits testés ont été sains et indemnes de la maladie.

Les fruits immatures du poirier inoculés avec les deux souches d'*Erwinia amylovora* (témoins positifs) présentent des symptômes typiques du feu bactérien. Des exsudats bactériens très visibles de couleur jaunâtre, des nécroses de taille variables et une mélanisation des tissus inoculés avec envahissement de tous les fruits inoculés ont été observés (figures 24, 25).

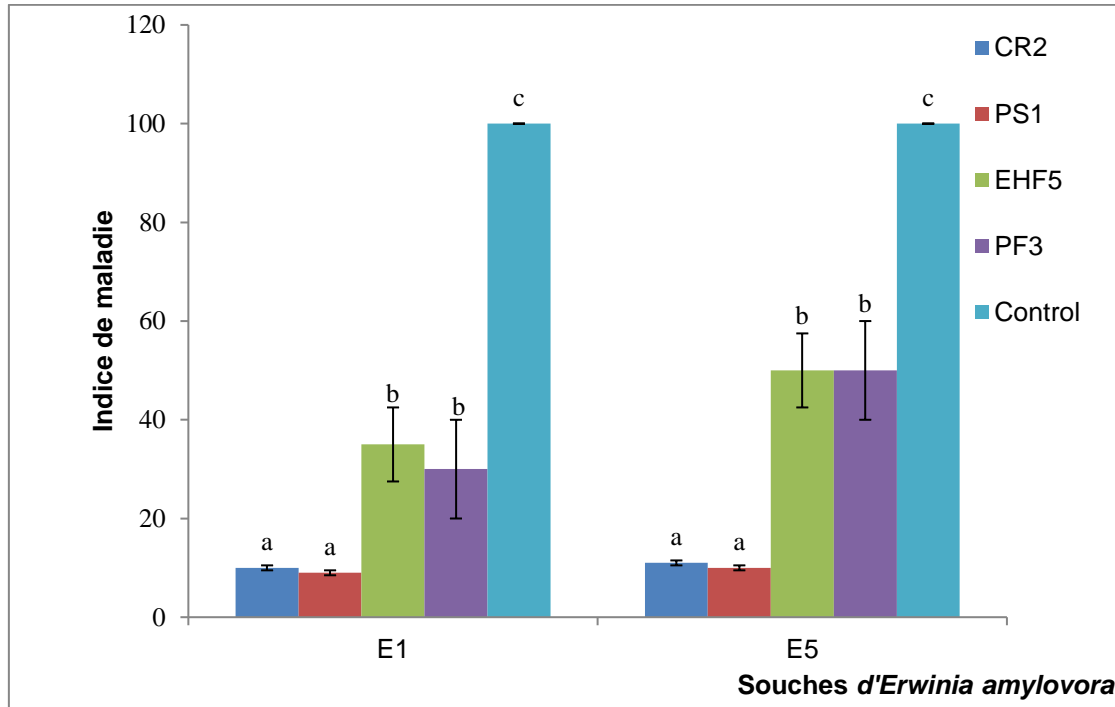


Figure 23 : Indice du feu bactérien sur les poirettes dans le cas de la recherche d'un effet préventif (test de Tukey, $p \leq 0,05$).

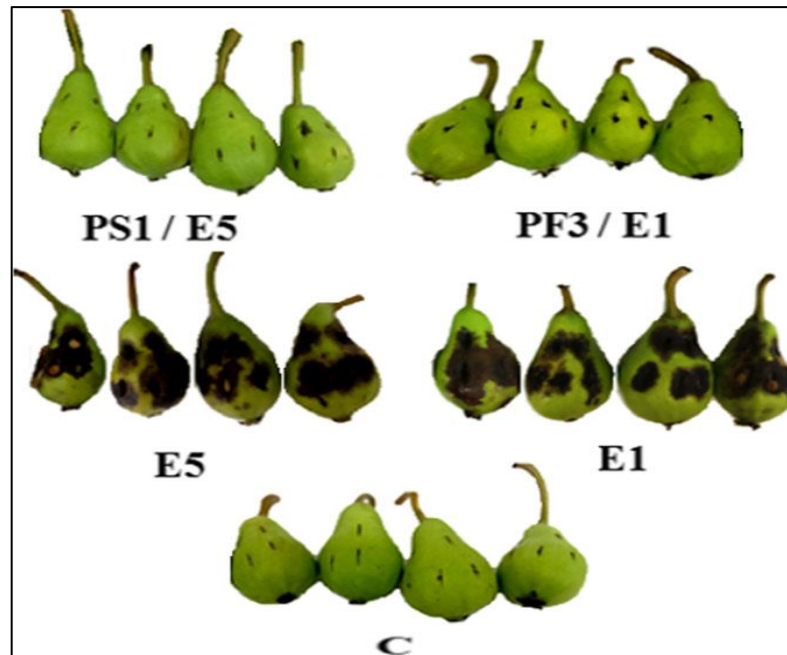


Figure 24 : Effet antagoniste préventif des souches de *P. brassicacearum* PS1 et *B. methylotrophicus* PF3 sur des poires immatures inoculées par *E. amylovora* (E1, E5) 7 jours après l'inoculation. C: témoin négatif (EDS)

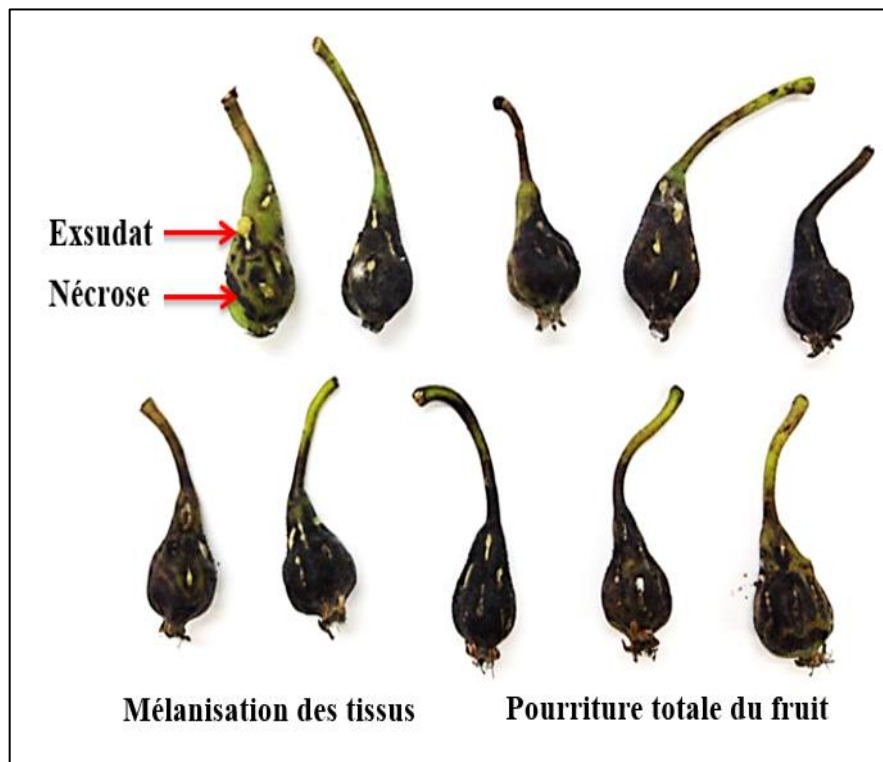


Figure 25 : Poirettes inoculées par les souches d'*Erwinia amylovora* E1, E5

8.2.2. Comportement des deux souches pathogènes à l'égard des bactéries endophytes *in planta* sur les fruits immatures : Recherche de l'effet curatif

Les bactéries antagonistes endophytes CR2, PS1, EHF5 et PF3 des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* n'ont pas permis la réduction de la nécrose et la suppression des exsudats.

Les souches d'*E. amylovora* (E1 et E5) ont été inoculées sur les fruits immatures 24h avant les souches antagonistes testées (figures 26, 27).

Par conséquent, les quatre souches antagonistes se sont révélées non efficaces ($P=0,30$; $P>5\%$) dans le cas d'application curative contre les deux souches pathogènes d'*Erwinia amylovora*, manifestant un taux de nécrose de 100%.

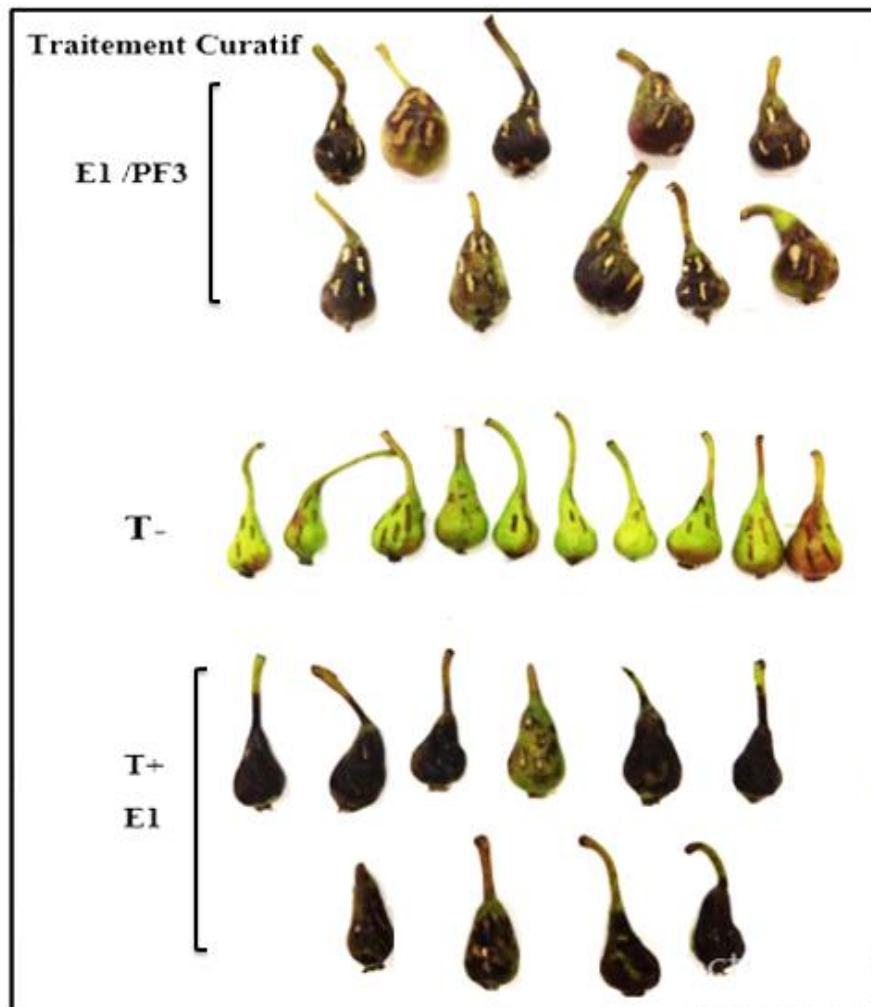


Figure 26 : Traitement pour recherche d'un effet curatif de l'endophyte *B. methylotrophicus* PF3 contre la souche pathogène *E. amylovora* E1 sur les poires immatures.

Mélanisation et exsudats, suivis de la pourriture totale des fruits. Témoin positif E1.

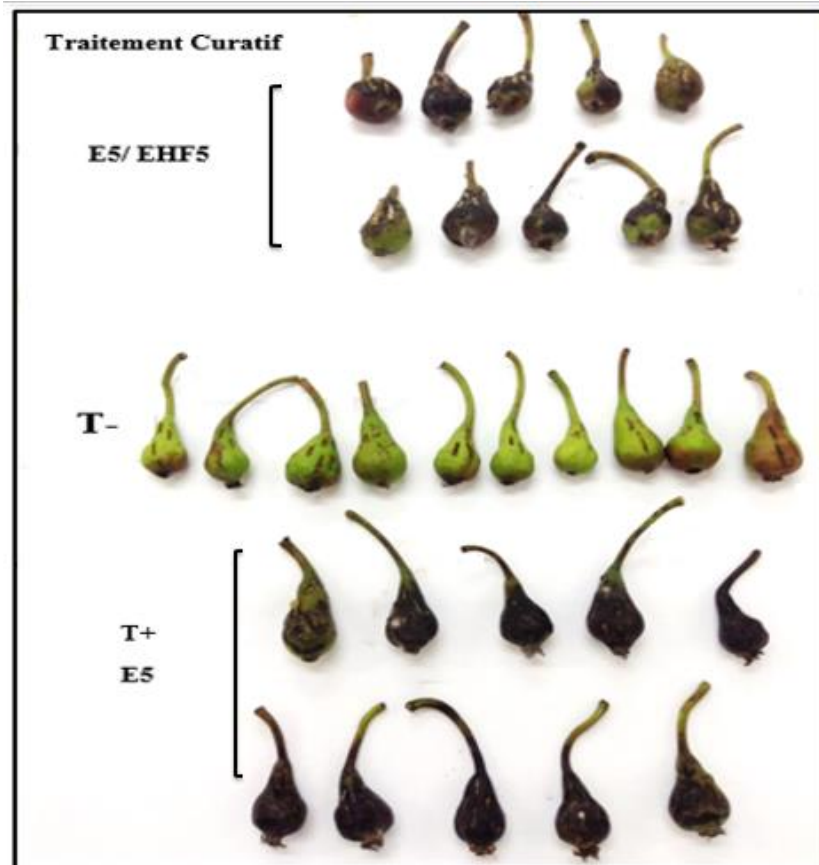


Figure 27 : Traitement pour recherche d'un effet curatif de l'endophyte *B. amyloliquefaciens* EHF5 contre la souche pathogène *E. amylovora* E5 sur les poires immatures. Mélanisation et exsudats suivis de la pourriture totale des fruits du traitement E5 / EHF5 et du témoin positif E5.

9. Résultats de la caractérisation de la performance des antagonistes en vue de leur application comme agents de biocontrôle.

9.1. Formation de biofilm

La formation de biofilm chez les endophytes *P. Brassicacearum* PS1 et CR2, *B. amyloliquefaciens* PF3 et *B.methylotrophicus* EHF5 dans la suspension aqueuse colorée au violet cristal a été nettement visible pour une période d'incubation de 20h.

Les quatre souches antagonistes ont produit le biofilm *in vitro*. Aucune différence significative n'a été observée entre les souches après 3 et 5h d'incubation (figures 28, 29).

La souche EHF5 était la plus active après 5 h d'incubation et ne diffère pas de la souche PS1 après 20 h d'incubation. Cependant, après ce même temps

d'incubation, c'est la souche de *Pseudomonas* CR2 qui a montré une production de biofilm meilleure et significative, affichant une densité optique de 1,427, suivie de la souche PS1 à une DO de 0,971 ($P=0,000$, $p \leq 0,05$). Inversement, la souche de *Bacillus* PF3 a montré une faible capacité de production de biofilm à la densité optique de 0,407.

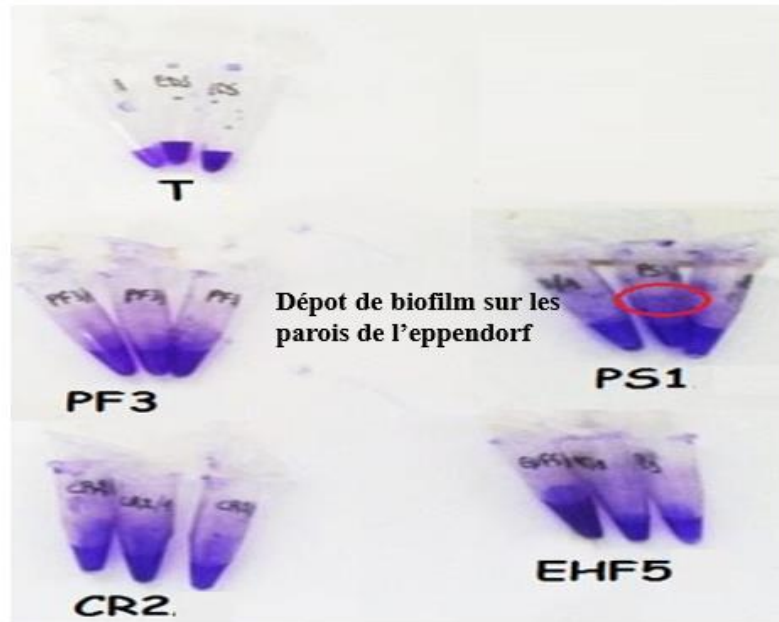


Figure 28 : Formation de biofilm par les souches endophytes *Bacillus* spp. EHF5, PF3 et *Pseudomonas* spp. CR2, PS1 20h après incubation. T : témoin négatif (EDS)

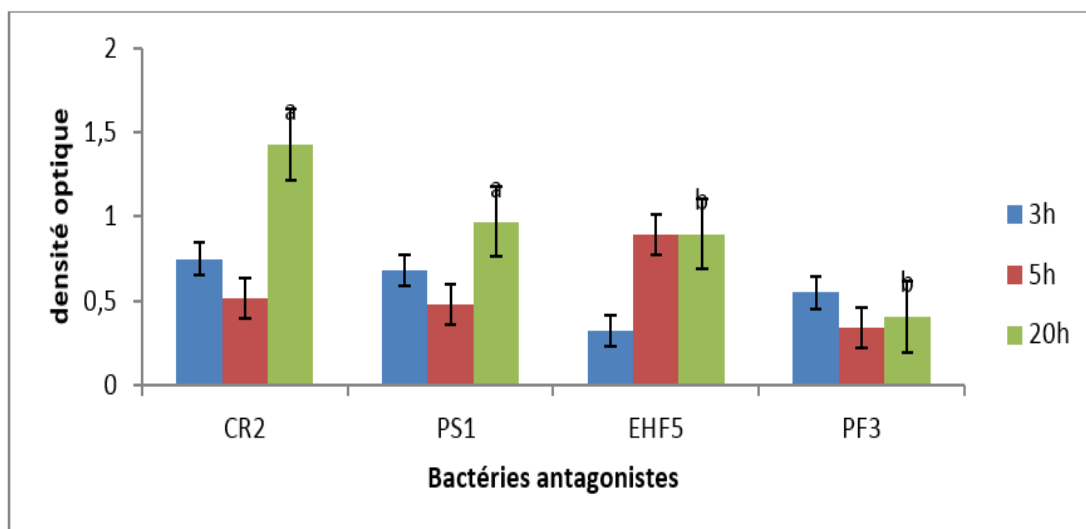


Figure 29 : Dosage spectrophotométrique (DO) de la production de biofilm par les quatre souches antagonistes à 3h, 5h et 20h après incubation.

9.2. Production de sidérophores

Les résultats sont positifs visiblement chez toutes les souches antagonistes étudiées *P. Brassicacearum* (PS1, CR2), *B. amyloliquefaciens* PF3 et *B.methylotrophicus* EHF5 sur le milieu succinate mais également plus visibles sur le milieu King B, se traduisant par l'apparition d'un anneau rouge indiquant la présence de sidérophores après l'ajout de FeCl₃. Cette couleur disparaît quelques minutes après réaction. En effet, l'analyse statistique des résultats a montré une différence significative en fonction des souches et du milieu de culture ($p \leq 0,05$)

L'estimation quantitative de la production de sidérophores par les souches étudiées est significativement variable selon la longueur d'onde mesurée. A la longueur d'onde 420 nm pour indiquer la présence de sidérophores de type hydroxamate et à 490nm pour indiquer la présence de sidérophore de type catécholate.

Les quatre souches ont montré une capacité différente à produire les sidérophores sur les deux milieux gélosés KB et succinate. Les souches bactériennes antagonistes produisent les 2 types de sidérophores dans le milieu King B à des quantités élevées. La souche de *B. amyloliquefaciens* EHF5 était le producteur de sidérophores le plus actif sur le milieu KB sans chlorure ferrique à la DO 1,97, tandis que les souches de *P. brassicacearum* CR2 et PS1 produisent les sidérophores de type catécholate (DO: 1,13) et hydroxamate (DO : 1,29) sur milieu KB respectivement en présence de FeCl₃ (figure 30).

Sur le milieu succinate avec l'ajout de FeCl₃, toutes les souches produisent moins de sidérophores que sur le succinate.

A la lecture de la longueur d'ondes de 400nm, la souche antagoniste *P. brassicacearum* PS1 affiche la valeur la plus élevée avec une DO de 1,9 alors que pour la souche *P. brassicacearum* EHF5, la concentration en sidérophores est la plus faible (0,27) (figure 31).

La mesure des densités optiques des souches antagonistes apparentées aux *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. mesurées aux longueurs d'ondes de 430nm et de 490nm en présence de FeCl₃, montre des quantités faibles de catécholates et d'hydroxamates entre 0,02 et 0,13 respectivement.

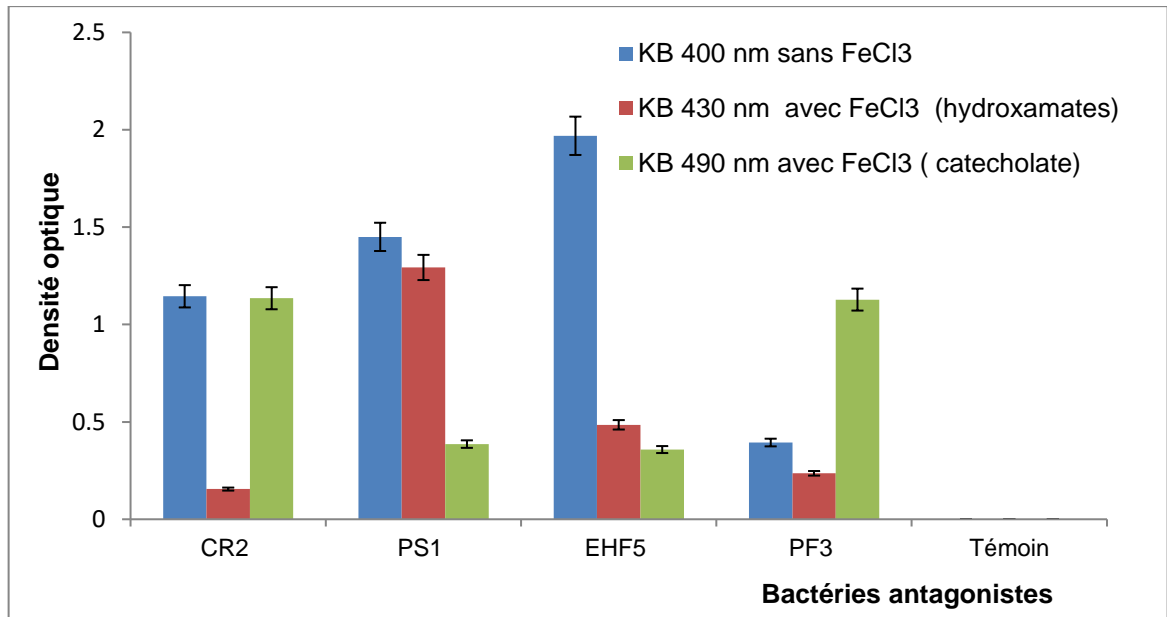


Figure 30 : Présentation graphique des résultats de la production de sidérophores des bactéries antagonistes sur le milieu King B ($p \leq 0,05$).

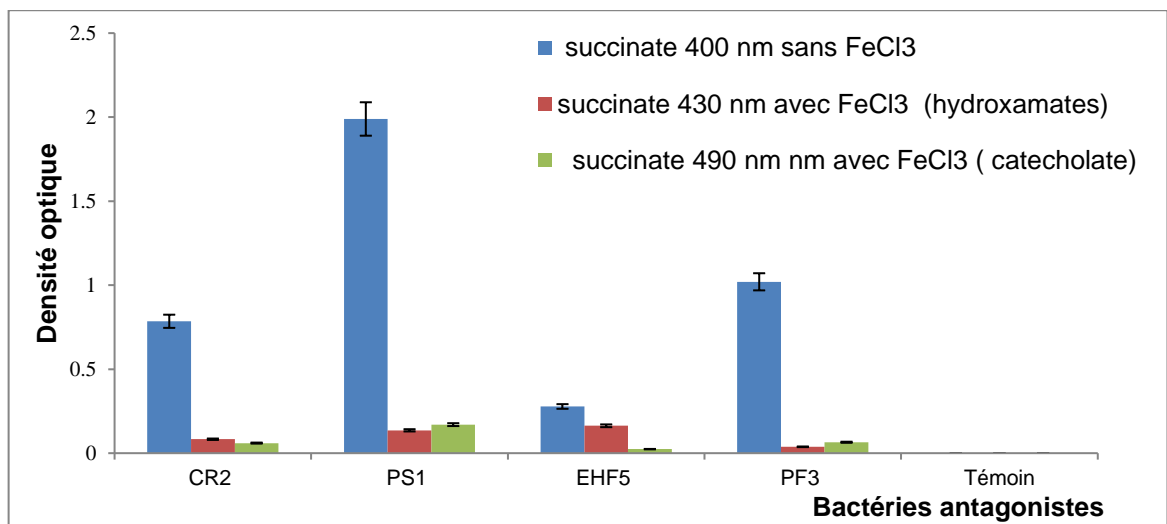


Figure 31 : Présentation graphique des résultats de production de sidérophores des bactéries antagonistes sur le milieu succinate ($p \leq 0,05$).

9.3. Résultats du test de production de biosurfactants

Les résultats du test montrent que seules les deux souches de *Bacillus* spp. (EHF5 et PF3) étaient capables de produire des composés biosurfactants déterminant la propagation de la suspension bactérienne sur la surface solide.

Les émulsions obtenues pour ces deux souches sont apparues plus importantes et de formes plates avec un diamètre de 7-8 mm, contre celles du témoin de 4-5 mm. Inversement, les deux souches de *Pseudomonas* spp. (CR2 et PS1) n'ont

pas produit de composés biosurfactants dans ce test, le diamètre et la forme de leurs gouttes sont similaires à ceux du témoin négatif (figure 32).

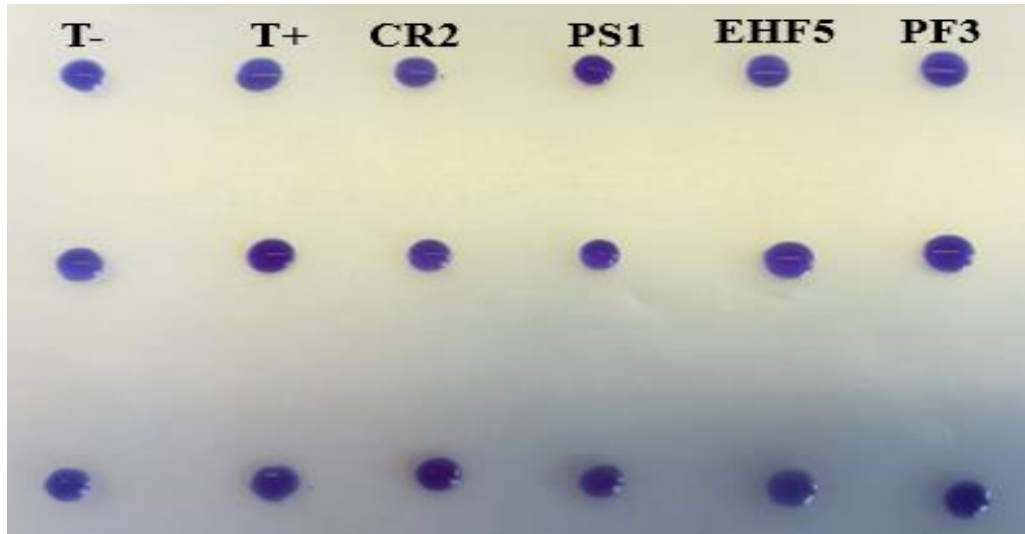


Figure 32 : Capacité de production de biosurfactants des souches antagonistes après 36h. T-: Témoin négatif (bouillon KB stérile), T+: Témoin positif (*Pseudomonas chlororaphis* M71).

9.4. Motilité de types « swimming » et « swarming »

La capacité de motilité de type swimming des souches EHF5, PF3 et CR2 à 24 h était comparable à celle du témoin négatif (*E. coli*), tandis que PS1 a montré une activité significativement supérieure au témoin négatif mais inférieure au témoin positif (*P. chlororaphis*) ($p \leq 0,01$).

La taille du halo est plus petite, indiquant une motilité moindre. L'application de l'analyse Tukey sur le diamètre de motilité des souches bactériennes montre une différence significative entre les souches ($P \leq 5\%$). Deux demi-diamètres pour chaque colonie ont été mesurés sur trois répétitions.

Après 48 h d'incubation, les quatre souches ont présenté un swimming positif signifiant qu'elles sont capables de se mouvoir dans un milieu liquide à l'aide de leurs flagelles. Cependant, d'après les résultats, les souches de *Pseudomonas* étaient plus lentes que celles de *Bacillus* et la souche de référence *P. chlororaphis* (figure 33A).

Les souches CR2 et PS1 présentent une taille de demi-diamètre de 1,6 et 1,9 cm respectivement, par contre, les *Bacillus* spp. PF3 et EHF5 montrent une taille de 2,5 et 2,7 cm respectivement (figure 34A).

Les résultats de motilité de type swarming sur le milieu semi-solide après 24 h d'incubation n'ont pas révélé de différence significative parmi les quatre souches

antagonistes. Cependant, après 48 h d'incubation, les colonies de *Bacillus* montrent un swarming positif et ont recouvert toute la surface de gélose avec une taille de 4,5 cm pour les deux souches et 5cm pour le témoin positif ; alors que les colonies de *Pseudomonas* ne montraient aucune capacité de motilité de type swarming potentiellement associée à une absence de production de biosurfactants (figures 33B, 34B).

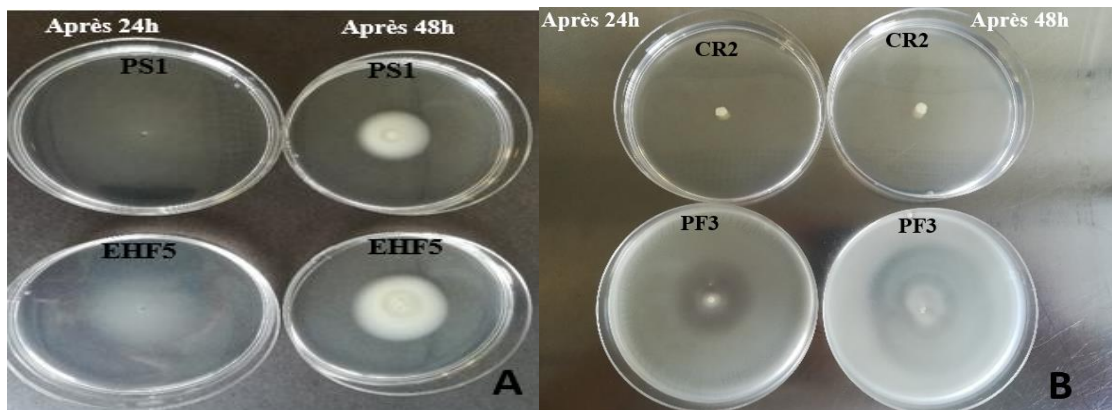


Figure 33 : Motilité de type swimming (A) et swarming (B) des souches bactériennes antagonistes après 24 et 48 h d'incubation

10. Tolérance des bactéries antagonistes au stress abiotique

10.1. Tolérance aux températures extrêmes

Ce test est visualisé par la croissance des antagonistes incubés à différentes températures après l'ensemencement des souches sur le milieu LB. A une température de 4°C, la croissance bactérienne est négative chez toutes les souches étudiées, un même profil de réponse a été enregistré (tableau 17). Entre 30°et 42°C, une bonne croissance bactérienne de toutes les souches a été observée. Contrairement, à 45°C aucune croissance bactérienne n'a été enregistrée chez toutes les souches testées. La totalité des souches étudiées se présente par conséquent, comme des bactéries mésophiles.

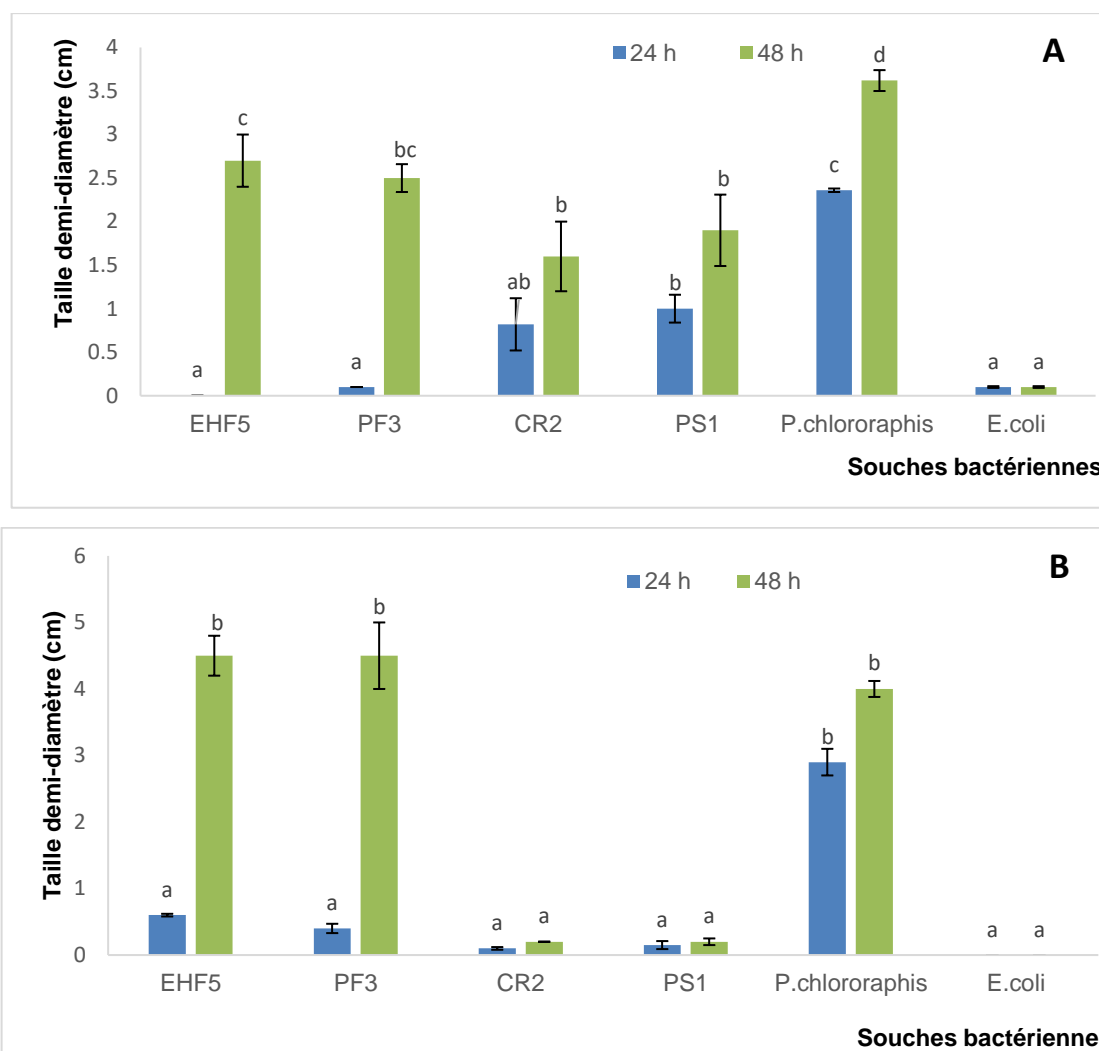


Figure 34 : Activité de swimming (A) et swarming (B) des antagonistes après 24 et 48 h d'incubation par mesure de la moyenne du demi-diamètre des colonies bactériennes.

Tableau 17 : Croissance bactérienne des bactéries antagonistes testées à différentes températures

| Souche | 4°C | 30 °C | 35°C | 42°C | 45°C |
|--------|-----|-------|------|------|------|
| PS1 | - | + | + | + | - |
| CR2 | - | + | + | + | - |
| PF3 | - | + | + | + | - |
| EHF5 | - | + | + | + | - |

10.2. Tolérance au pH

Ce test est évalué par la visualisation de la croissance des souches antagonistes sur le milieu LB à différents pH ; 4, 6, 7, 8 et 10. Toutes les souches antagonistes se sont développées à des valeurs de pH comprises entre 4 et 8, à l'exception de la souche CR2 de *P. brassicacearum* qui ne s'est pas développée à pH 4.

Aucune croissance n'a été observée à pH 10 pour l'ensemble des souches qui peuvent être classées dans le groupe des neutrophiles (tableau 18).

Tableau 18 : Croissance bactérienne à différents pH

| Souche | pH 4 | pH 6 | pH 7 | pH 8 | pH 10 |
|--------|------|------|------|------|-------|
| PS1 | - | + | + | + | - |
| CR2 | - | + | + | + | - |
| PF3 | + | + | + | + | - |
| EHF5 | + | + | + | + | - |

10.3. Tolérance à la salinité

Les essais d'halotolérance sur les souches antagonistes sélectionnées ont montré que la majorité des souches affichent un seuil d'halotolérance de 0,8 M NaCl. A une concentration de NaCl entre 0,3 M et 1 M, une bonne croissance a été enregistrée chez les deux souches de *Pseudomonas* spp. (PS1, CR2). Cependant, les deux souches de *Bacillus* (*B. methylotrophicus* PF3 et *B. amyloliquefaciens* EHF5) ne se sont pas développées à la concentration 1 M de NaCl, montrant ainsi un seuil d'halotolérance à 0,8 M de NaCl par rapport au témoin qui contient 0,17 M de NaCl (tableau 19).

Tableau 19 : Résultats de la croissance bactérienne des souches antagonistes sélectionnées à différentes concentrations de NaCl.

| Souche | 0,3 M (17,58 g/l) de NaCl | 0,5M (29,3 g /l) de NaCl | 0,8 M (46,88g/l) NaCl | 1 M (58,6g /l) de NaCl |
|--------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| PS1 | + | + | + | + |
| CR2 | + | + | + | + |
| PF3 | + | + | + | - |
| EHF5 | + | + | + | - |

10.4. Résistance au stress osmotique

Les résultats montrent que la tolérance des souches au stress osmotique a diminué avec les concentrations croissantes de PEG.

En présence de 20% de PEG, la croissance des deux souches de *Pseudomonas* a été réduite à plus de 80% (DO = 0,27 pour CR2). La croissance de *Bacillus* spp. est d'environ 70% (DO = 0,35 pour EHF5), ce qui indique que toutes les souches sont très sensibles au stress osmotique. Le témoin sans PEG (0%) présente des valeurs de densité optique très élevées (jusqu'à 1,923 pour PS1), montrant une bonne croissance bactérienne des antagonistes par rapport aux milieux additionnés de PEG.

À une concentration de 40% de PEG, la croissance bactérienne a été réduite et à une concentration de 60% de PEG, les valeurs de densité optique des suspensions bactériennes étaient proches du zéro et du témoin négatif sans suspension bactérienne. D'une manière générale, les bactéries antagonistes sélectionnées se sont montrées assez tolérantes aux concentrations ioniques et aucune différence significative n'a été obtenue par l'analyse statistique de Tukey ($P > 0,01$) (figure 35).

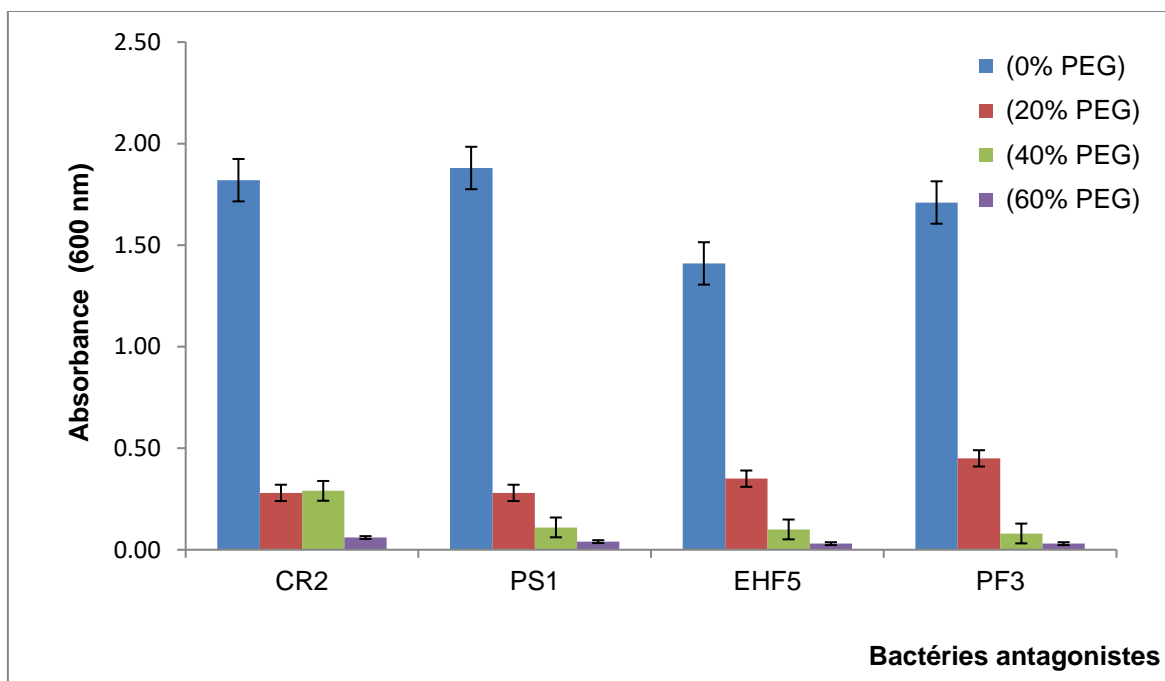


Figure 35 : Effet du stress osmotique sur la croissance des bactéries antagonistes sélectionnées (Test de Tukey, $P > 0,01$).

CHAPITRE IV: DISCUSSION

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Les études réalisées dans la présente thèse avaient pour objectif initial dans une première partie, de confirmer que la bactérie *E. amylovora* était à l'origine des symptômes rencontrés dans les vergers des espèces de Maloidées prospectées, d'identifier par voie biochimique et moléculaire l'agent pathogène, de caractériser son pouvoir pathogène et l'incidence de la maladie en période de repos végétatif. Après avoir collecté, identifié les isolats, nous avons recherché une éventuelle variabilité génétique des souches algériennes.

Dans un autre volet de cette thèse, nous avons entrepris une recherche pour apporter une solution à la maladie en sélectionnant des agents bactériens de lutte biologique isolés localement sur la base de leurs performances. Pour cet effet, des essais *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés. Les résultats obtenus ont permis d'apporter la réponse aux questions posées sur cette bactérie pathogène et la maladie induite en Algérie.

Les différents travaux de recherche mis en place au cours de cette thèse ont été élaborés sur la base des connaissances générales des mécanismes de pathogénie chez les bactéries phytopathogènes, mais aussi des connaissances spécifiques et des outils génétiques et moléculaires disponibles à ce jour chez *E. amylovora*. Les résultats obtenus, qui ont été interprétés à l'issue de chacune des études réalisées (chapitres 2, 3 et 4 de ce manuscrit), ont permis de confirmer certains éléments déjà connus de la pathogénie chez *E. amylovora*, mais aussi d'apporter de nouvelles connaissances sur la variabilité des souches et bases génétiques de sa pathogénie ainsi que la réflexion sur la stratégie du biocontrôle de la maladie induite.

1. Identification des souches d'*E. amylovora* isolées, responsables du feu bactérien en Algérie

Le feu bactérien a été détecté depuis 2010 dans les communes de Tipaza et à Oued El Alleug dans la wilaya de Blida sur poiriers, pommiers et cognassiers. Le premier signalement a été fait officiellement sur le poirier var. Santa Maria à Tipaza (Koléa) en 2011 par l'INPV [46]. La maladie s'est rapidement propagée à d'autres régions fruitières du nord de l'Algérie telles que Blida et Alger, de sorte qu'au bout

d'une année seulement (2010-2011), les zones infectées de la commune de Blida avaient atteint 400 ha [13]. Cette bactérie a contaminé dans la wilaya de Tipaza 1000 ha de poiriers, 900 ha de pommiers et 500 ha de néfliers [14].

Dans la présente étude, le diagnostic visuel des vergers de poiriers, de pommiers et de cognassiers visités, montre que des symptômes caractéristiques du feu bactérien, à savoir ; des brûlures des bouquets floraux, la formation d'exsudats bactériens sur les parties aériennes, la courbure en crosse des terminaisons des rameaux et la présence de chancres sur les parties ligneuses pendant le repos végétatif ainsi que des fruits momifiés restant attachés aux arbres étaient révélateurs. Ces symptômes correspondent exactement à ceux du feu bactérien décrits dans la bibliographie [9; 7]. La bactérie responsable du feu bactérien *Erwinia amylovora* se conserve durant l'hiver dans les chancres de l'année précédente et reprend son activité lors de la poussée de sève [221]. Quand le stade de débourrement des poiriers intervient, la population résidente sur les chancres augmente graduellement, et ce jusqu'à la floraison, période avant laquelle il y a peu de risque d'infection des arbres. Cette bactérie peut alors être disséminée dans le même verger, voire dans les vergers alentours [63]. Elle se propage à l'arbre et les symptômes les plus typiques sont alors visibles sur les jeunes rameaux en pleine croissance, qui une fois atteints, flétrissent et se courbent en forme de crosse caractéristique à leur extrémité [222]. Ces symptômes typiques de la maladie ont été observés sur tous les vergers étudiés et les mêmes événements décrits ont été rencontrés sur les arbres atteints par la maladie.

L'évolution du feu bactérien dépend de la quantité et de la virulence de cet agent pathogène, des conditions environnementales favorables et du degré de sensibilité de l'hôte à la maladie [9]. La sensibilité des plantes hôtes envers le feu bactérien, dépend de la variété et l'âge de la plante. En effet, parmi les plantes hôtes du feu bactérien, le poirier, plus précisément la variété Santa Maria s'avère la plus sensible d'après les services phytosanitaires (INPV). Pour le stade physiologique, généralement les plantes âgées de plus de 15 ans, sont plus sensibles à cette maladie, comme pour les autres attaques, d'origine phytopathogène [223].

Le climat de la Mitidja est favorable pour le développement de cette maladie en particulier durant la période de floraison, surtout pendant le mois d'avril et mai. En effet, une température inférieure ou égale à 18°C et une humidité inférieure à 50%

sont les conditions optimales pour la croissance de la bactérie *Erwinia amylovora* et la manifestation des symptômes bien visibles sur les organes des plantes [63].

Les souches pathogènes n'ont pas été détectées dans toutes les parcelles atteintes par la maladie. En effet, les symptômes observés se situaient pour la plupart en dehors de la zone d'échantillonnage, placée à hauteur de bras. Les symptômes étaient généralement observés en haut, ou plus dans le centre des arbres.

Après le diagnostic sur le terrain, il était nécessaire de passer au laboratoire pour la manipulation du matériel végétal symptomatique, notamment les exsudats sur les bouquets floraux, les rameaux et les feuilles pour isoler et identifier l'organisme à l'origine des symptômes induits, pour le faire, nous avons suivi le protocole de l'OEPP [7]. Dans notre cas, l'agent pathogène était plus facilement isolé des exsudats à la base des pétioles foliaires et des pédoncules des fruits infectés. Comme décrit par Oh et Beer, [123], les exsudats bactériens à la base des organes atteints contiennent une forte proportion de bactéries dans les liquides vasculaires de la plante. L'isolement à partir des échantillons collectés des vergers de poiriers prospectés durant les années 2014-2017 dans 7 communes ; Oued El Alleug, L'Arbaa, Birtouta, Bensalah, Tessala El Merdja, Sidi Yahia et Attatba a permis l'obtention de la collection des isolats bactériens.

La caractérisation des isolats au laboratoire a été élaborée par la réalisation de plusieurs tests biochimiques (test de Gram, fluorescence sur milieu King B, catalase, activité cytochrome oxydase, oxydation /fermentation, production d'indole, croissance à 39°C), et par la réaction d'hypersensibilité par infiltration du tabac ainsi que l'inoculation des fruits immatures de poiriers [7 ;224]. Un total de 37 isolats présentant les caractéristiques culturales des souches de référence a été retenu. Les colonies sont de forme circulaire, lisses, bombées et brillantes [89; 7]. La totalité des isolats sélectionnés, répondent d'une manière homogène au profil physiologique et biochimique d'identification de cette espèce. Les résultats du test d'hypersensibilité sur le tabac et celui de la pathogénicité sur les poires immatures indiqué dans le protocole de l'OEPP, ont été similaires [7].

Tous les isolats ont induit une réponse hypersensible (HR) sur les feuilles de tabac qui se manifeste sous forme d'une nécrose après infiltration des suspensions bactériennes dans le limbe foliaire. Parallèlement, pour le test du pouvoir pathogène sur les poires immatures, toutes les souches retenues ont provoqué des nécroses

avec des exsudats bactériens, 3 à 5 jours après inoculation. La mélanisation totale a atteint l'ensemble des fruits inoculés et a été observée 10 jours après l'inoculation. Cette dernière étape a permis de reproduire les symptômes rencontrés lors des prospections, de confirmer que la bactérie isolée est bien le bioagresseur responsable de l'affection sur le poirier. Avec cette pratique, nous avons vérifié et confirmé le postulat de Koch [74].

Les tests biochimiques et ceux du pouvoir pathogène à eux seuls confirment l'identité des isolats à l'espèce *E. amylovora* mais ils demeurent insuffisants. Nos résultats sur la caractérisation biochimique et pathogénique concordent avec ceux rapportés par Radunović, *et al.*, [225] au Montenegro, Végh *et al.*, [226] en Hongrie, par Shoeib *et al.*, [227] en Egypte, par Ait Bahadou *et al.*, [10] au Maroc et les travaux de Shemshura *et al.*, [224] au Kazakhstan qui ont utilisé les mêmes techniques classiques pour l'identification des souches d'*E. amylovora*.

Les essais de flux latéral immunochromatographique utilisés en général dans les domaines de santé humaine, de sécurité alimentaire et récemment dans la protection des plantes [228], ont facilité et accéléré le diagnostic. Dans notre cas, l'utilisation de l'immunodosage à flux latéral (Ea AgriStrip), une méthode immunologique spécifiquement conçue pour identifier les souches d'*E. amylovora* et préconisée par l'OEPP a été suivie et nous a permis de confirmer par voie sérologique l'appartenance des souches isolées à l'espèce *E. amylovora*. Les kits Ea AgriStrip (Bioreba) ont permis d'analyser et d'identifier rapidement les suspensions bactériennes des 37 souches à l'espèce *E. amylovora*. Nos résultats sérologiques sont en concordance avec ceux de Braun-Kiewnick *et al.*, [133], qui ont découvert et développé cette méthode sur des souches de référence d'*E. amylovora* provenant de différentes origines géographiques (Suisse, USA, France, Espagne, Allemagne, Italie), montrant un résultat positif et très rapide et une sensibilité comparable à la nested PCR.

La confirmation de l'identité des isolats et de leur pouvoir pathogène a été élaborée par l'amplification de régions géniques sur le plasmide et le chromosome de l'espèce *E. amylovora*. Les résultats révèlent que les 37 souches isolées de poiriers malades dans les vergers situés dans différentes régions du nord de l'Algérie, ont été identifiées comme espèces d'*E. amylovora* par les deux protocoles PCR suivis [119; 187]. La méthode de Taylor *et al.*, [187] est une méthode d'identification universelle pour toutes les souches *E. amylovora* connues à ce jour.

Suite à l'amplification de la région chromosomique des 37 souches, ainsi que la souche de référence *E. amylovora* BPIC889 par les amorces G1-F et G2-R, la taille de l'amplicon produite de 187 pb a été obtenue comme préconisé [187; 7]. Ce protocole a été validé dans une étude de performance en 2010 [7]. Les résultats ont permis de révéler la présence des séquences chromosomiques ciblées chez l'ensemble des souches utilisées. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Ameur *et al.*, [229] qui ont identifié la présence de l'amplicon sur une collection de 402 souches d'*E. amylovora* isolées de différentes régions de pommiers au Maroc (2006-2011), en utilisant les mêmes amorces que celles de la présente étude. Des résultats similaires ont également été rapportés par Amein *et al.*, [230] en Iraq, qui ont identifié 4 souches d'*E. amylovora* en 2016 en suivant le même protocole.

D'autre part, pour une analyse plus fine, la PCR duplex, nous a permis d'utiliser deux couples d'amorces (AJ75 / AJ76) et (AMSbL/ AMSbR) selon McManus et Jones, [188] et Bereswill *et al.*, [119]. A la suite de l'amplification, les deux fragments ciblés ont été retrouvés chez l'ensemble des souches étudiées.

Parallèlement, l'omniprésence du plasmide pEA29 dans les souches algériennes testées a été confirmée dans cette présente étude. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Kabadjova-Hristova *et al.*, [231] qui ont permis en une étape, l'identification rapide et simultanée des deux gènes *ams* et ceux du plasmide pEA29 de 7 souches d'*E. amylovora* isolées en Bulgarie (2002-2004) à partir d'Aronia et de fraisiers atteints du feu bactérien. Les résultats obtenus dans la présente étude sur la PCR duplex utilisant des amorces spécifiques du plasmide pEA29 et la cible chromosomique, l'amylovorane ont fourni un outil rapide et sensible pour la détection de l'agent pathogène du feu bactérien chez les souches algériennes isolées, puisque les souches exemptes de pEA29 sont rares dans la nature car leur potentiel de pathogénicité est faible [232]. Il ressort que plusieurs plasmides (pEA29, pEI70, pEA34, pEA8.7, pCPP60, pEA72, pEL60, pEA2.8, pEU30) ont été identifiés chez des souches d'*E. amylovora* [102]. Cependant, pEA29 est le plasmide qui semble jouer un rôle quantitativement significatif dans la pathogénicité [233]. Pour cette dernière raison, les séquences de ce plasmide sont largement utilisées pour la différenciation génétique des souches d'*E. amylovora* [104].

2. Suivi de l'incidence du feu bactérien au repos végétatif

L'objectif de cette partie de l'étude était d'évaluer l'incidence des symptômes de type chancres sur les arbres au repos végétatif afin déterminer ceux qui seront destinés à une taille avec élimination des chancres et ceux nécessitant un arrachage. L'étude de l'incidence et de la sévérité des maladies et des dégâts sur le terrain, est une méthode d'évaluation des symptômes dus aux agents bioagresseurs [234]. Il ressort des résultats obtenus, que les vergers de L'Arbaa situés à Blida, présentent une incidence très significative par rapport aux deux autres wilayas étudiées (Bouira et Boumerdès), montrant jusqu'à 1102 chancres, avec une incidence de $D=90\%$. La sévérité de la maladie obtenue par le calcul de l'indice de McKinney $S=55\%$, constitue la valeur la plus élevée des vergers de L'Arbaa comparée à celles obtenues dans les autres vergers. Pour Bouira, 245 chancres ont été enregistrés sur les vergers avec la plus grande incidence $D=68\%$, la sévérité a atteint de maladie $33,75\%$. Concernant les vergers de poiriers de Boumerdès, 127 chancres ont été notés, une incidence $D=73\%$, une sévérité entre $42,63$ et 55% . Nous remarquons que les valeurs maximales obtenues par les calculs de l'incidence et la sévérité de la maladie, correspondent aux vergers de poiriers très fortement atteints par cette bactériose à Blida, qui manifestent le plus grand nombre de chancres sur les troncs et les branches.

D'autre part, nous avons constaté que les chancres étudiés étaient de type actifs indéterminés, ils présentent des marges lisses, ce qui laisse supposer que dans les vergers étudiés, ils ont constitué une source d'infection l'année suivante (résultats non communiqués). Cette hypothèse vient du fait que les visites effectuées dans ces mêmes vergers au printemps suivant, nous ont permis de constater l'apparition des symptômes de la maladie sur les arbres atteints, confirmant ainsi que l'inoculum hivernant en hiver dans les chancres indéterminés s'est propagé. D'autre part, la taille et le nombre de chancres élevés sur les arbres atteints, ont accentué également la forte infection par la bactérie.

Il est connu que l'étude de l'incidence et la sévérité des maladies et dégâts sur le terrain est une méthode d'évaluation des symptômes dus aux agents bioagresseurs [234]. Plusieurs travaux ont montré une similarité d'évaluation à notre étude, par comparaison des résultats obtenus avec ceux rapportés par plusieurs auteurs, concernant différentes maladies bactériennes, fongiques et des dégâts dus aux insectes ravageurs sur le terrain et en se basant sur l'étude de l'incidence et la

sévérité de la maladie par le calcul de l'indice de McKinney. L'exemple choisi est celui d'une étude similaire à la nôtre, où, Getachew *et al.*, [235] ont évalué l'incidence et la sévérité de la maladie fongique du mil par *Pyricularia grisea* en plein champ en Ethiopie. L'étude était basée sur les symptômes foliaires dans plusieurs régions et aboutissant ainsi à une estimation concluante sur l'épidémiologie de la maladie montrant le maximum d'incidence et de sévérité de la maladie de $D=63,03$ et $S=34,60\%$ respectivement, ce qui a permis de conclure que ces champs étaient très fortement atteints par cette maladie fongique. Tandis que les plus faibles valeurs de l'incidence et de la sévérité de maladie sont de $D=46,7$ et $S=15,7\%$, respectivement et donc de moindre attaque. Les présents résultats obtenus sur les chancres du feu bactérien sont comparables à la précédente étude concernant les valeurs enregistrées (D et S).

Il n'existe pas de traitements efficaces contre le feu bactérien; il est toutefois possible de limiter la propagation de la bactérie en appliquant de bonnes stratégies phytosanitaires dans le cadre d'un programme de lutte intégrée. Parmi les méthodes de lutte culturales contre le feu bactérien, il est préconisé notamment une taille hivernale pour éliminer les chancres, les momies de fleurs et de fruits, l'élimination immédiate des branches malades et l'arrachage d'arbres très atteints ou / et très sensibles. Les chancres étant des sites d'hivernation de la bactérie, il est préconisé par conséquent, le retrait et l'incinération de ces sources d'inoculum afin de réduire considérablement les infections secondaires. La pratique de tailler à moins de 30 cm en dessous du tissu visiblement infecté, préférablement dans le bois de 2e ou de 3e année, doit être pratiquée dans la gestion de la maladie, si le verger est jeune et le taux d'incidence est faible.

Dans ce type de scénario, la solution revient à l'agriculteur. D'après les résultats obtenus, l'arrachage des arbres était la solution ultime si le verger est âgé. Les vergers les plus affectés de Blida et Boumerdès doivent être arrachés et remplacés par des cultures différentes non hôtes à la bactérie *E. amylovora* telles que les agrumes, les Rosacées à noyaux ou la vigne. Ceux de moindre incidence, comme ceux situés à Bouira doivent être taillés et surveillés les années qui suivent pour contrôler s'il y a eu une réduction de la propagation de la maladie sur un même arbre mais aussi d'un arbre à un autre sur un même verger. Cette pratique a été suivie dans plusieurs vergers en Espagne et a permis de limiter les dégâts du feu bactérien, de préserver des variétés sensibles et d'éviter des pertes suite à

l'arrachage des vergers (Lopez M., communication personnelle). Dans le cas d'un jeune verger, un enlèvement des chancres du feu bactérien pendant la dormance, réduira le nombre et la distribution des sources d'inoculum primaire à l'origine des flambées subséquentes. La meilleure façon de procéder consiste à enlever et à brûler les parties infectées (chancres) lors de la taille régulière pratiquée pendant la dormance.

3. Diversité génétique des souches algériennes d'*E. amylovora* et épidémiologie du feu bactérien en Algérie

Dans la présente étude, l'analyse génomique par BOX-PCR a identifié 3 groupes avec des fragments identiques à nos souches testées. Le premier groupe présente 5 souches avec 9 fragments (200 à 2000 pb) ; le deuxième est constitué de 15 souches avec 14 fragments (300 à 1500 pb) et le troisième de 6 souches et les souches de référence avec 19 fragments (200 à 4000 pb). Dans le cas de l'analyse par ERIC-PCR, 4 groupes sont révélés, le premier comprend 7 souches avec 7 fragments identiques (100 à 1000 pb), le second composé de 7 souches et les souches de référence avec 19 fragments identiques (100 à 4000 pb), le troisième présente 10 souches de 9 fragments identiques (100 à 2000 pb) et le quatrième incluant 3 souches qui forment un profil génétique faible mais identique. Les résultats annoncent par conséquent, que les amorces BOX et ERIC ont détecté différents modèles génétiques entre les souches d'*E. amylovora* isolées. Par conséquent, cette approche basée sur la PCR convient à la différenciation des profils génétiques dans la population étudiée d'*E. amylovora*.

Par rapport à d'autres méthodes basées sur la PCR telles que le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP), la Rep-PCR est plus simple et plus rapide pour l'analyse d'un grand nombre de souches pour détecter les polymorphismes, bien qu'elle soit moins discriminante [236]. Dans une étude, il a été rapporté que, les profils Rep-PCR des souches d'*E. amylovora* se sont révélées très peu utiles pour établir des généalogies ou des relations phylogénétiques, mais peuvent être utilisés efficacement dans les études épidémiologiques avec ce pathogène [55; 237]. D'autre part, en utilisant Rep-PCR, Barionovi *et al.*, [238] ont montré que la majorité (89 parmi 93 souches) des souches d'*E. amylovora* des Maloideae et Rosoideae, de différentes régions, possèdent le même profil d'ADN, tandis que la diversité établie pour la souche isolée d'amelanchier sp. (Maloideae)

cultivée au Canada et des souches de *Rubus* sp. indiquent une faible discrimination du marqueur Rep-PCR.

Les deux techniques moléculaires appliquées BOX et ERIC ont permis d'identifier rapidement la bactérie et de détecter les différences des profils génétiques des souches d'*E. amylovora*. Le polymorphisme détecté dans les souches est probablement la conséquence de l'adaptation à l'hôte, c'est-à-dire des changements survenus dans le génome et provoqué la formation de nouveaux points auxquels l'amorce a été attachée [239].

De nombreuses données de la littérature indiquent que le pathogène *E. amylovora* est une espèce homogène [82; 240; 24]. Cependant, certaines techniques moléculaires ont permis, non seulement une identification beaucoup plus rapide de la bactérie par rapport aux techniques conventionnelles, mais aussi la détection de différences entre souches provenant de différents hôtes et zones géographiques [241; 242 ; 243]. Un tel polymorphisme n'est pas toujours présent dans la population d'*E. amylovora* étudiée dans divers environnements. Par exemple, Radunovic *et al.*, [244] ont montré que toutes les souches d'*E. amylovora* étudiées provenant de différentes localités et hôtes (cognassier, pommier et aubépine) au Monténégro avaient des profils identiques par l'analyse des profils Rep-PCR.

Les connaissances sur la diversité génétique des souches pathogènes sont particulièrement importantes pour les études épidémiologiques et la détermination de la direction de propagation de la bactérie, la virulence et la résistance aux pesticides et aux antibiotiques [245; 82; 246].

Ces modèles génétiques ne sont pas en corrélation avec la provenance des souches testées, il était donc intéressant de compléter l'étude avec le marqueur VNTR. Dans ce sens, un nombre variable de tests de séquences répétées en tandem (VNTR) a été utilisé avec succès pour géotyper 25 souches d'*E. amylovora*. Deux loci (A et F) étaient polymorphes avec des répétitions par locus allant de cinq à sept pour le locus A et de six à sept pour le locus F. Une analyse minimale de l'arbre couvrant (MST), a montré que quatre haplotypes étaient présents chez les 25 isolats testés qui différaient pour un nombre de répétitions VNTR. Cependant, l'analyse n'a pas créé de groupes distincts sur la base de l'année d'isolement (2014, 2015 et 2017). Un haplotype distinct a été trouvé à partir du verger d'Attatba, lorsque l'analyse a été effectuée en tenant compte de l'origine géographique des souches (Oued El Alleug, Bensalah, Sidi yahia, Attatba, L'Arbaa, Birtouta, Tessala El Merdja).

Similairement à nos résultats, Alnaasan [247], Alnaasan *et al.*, [248] rapportent qu'aucune différence apparente d'année en année n'a été trouvée chez 46 souches de référence d'*E. amylovora* isolées à partir de pommiers et de poiriers (1959-2013) dans différentes régions principalement méditerranéennes. Ceci suggère que les mêmes souches réinfectent les vergers et provoquent la maladie chaque année.

Nos résultats VNTR décrivent une diversité génétique plus élevée de la population algérienne d'*E. amylovora*, résultant en quatre haplotypes, par rapport à celle précédemment rapportée par Alnaasan *et al.*, [248] en utilisant neuf VNTR (dont six sont communs à notre étude). Ces observations concordent avec d'autres résultats obtenus en Afrique du Nord: cinq génotypes différents existent au sein de la collection tunisienne d'*E. amylovora* [140] et seulement deux modèles distincts ont été identifiés sur la collection marocaine d'*E. amylovora* [139]. Cette approche est utile pour identifier plus de diversité qu'avec l'approche MLST par exemple.

Cette technique a été utilisée avec succès sur plusieurs espèces bactériennes pathogènes à l'homme, telles que, *Yersinia pestis* [249], *Staphylococcus aureus* [26], *Acinetobacter baumannii* [27], *Mycobacterium tuberculosis* [28] et *Pseudomonas aeruginosa* [29]. Pour ces espèces, la technique VNTR s'est avérée très utile dans les études écologiques, épidémiologiques et évolutives.

L'étude VNTR fournit un outil moléculaire capable de caractériser la diversité génétique d'*E. amylovora*, les marqueurs utilisés lors de cette étude, ont permis de différencier les souches isolées. Cette technique de typage est hautement résolutive et essentielle pour déterminer la structuration génétique d'un pathogène à l'échelle spatiotemporelle. En conséquence, la présente étude sur la population d'*E. amylovora* prévalant dans les vergers étudiés contribue à une meilleure compréhension de la diversité génétique de ce pathogène affectant le poirier dans cette région du monde, qui est une condition préalable pour développer et appliquer une stratégie de contrôle efficace contre cet agent phytopathogène désastreux.

La diversité génétique d'*E. amylovora* est généralement faible compte tenu de sa récente propagation mondiale. En effet, au niveau du génome, 99,4% d'identité ont été trouvés chez les souches infectant le genre *Rubus* et 99,98% chez des souches infectant la sous famille des Spiaeoideae [106]. L'analyse VNTR fait partie des techniques développées sur la base du génome d'*E. amylovora* est très fiable pour étudier la diversité des populations de cette espèce [24; 25].

Bühlmann *et al.*, [25] ont montré la présence de 227 haplotypes en étudiant un total de 833 souches d'*E. amylovora* d'origines différentes dans un travail basé sur l'analyse MLVA. Par rapport aux données publiées par Bühlmann *et al.*, [25], les souches 40b, 44, 45, 46 de la présente étude partagent le même haplotype avec la souche NIBZ-1058 isolée de *Pyrus* en 2007 en Slovénie. D'autres souches algériennes abritent de nouveaux haplotypes par rapport aux données de Bühlmann.

Des données supplémentaires sont nécessaires pour déchiffrer l'origine de l'introduction en Algérie même si une relation étroite entre trois souches d'Algérie isolées en 2010 et des souches d'Italie a déjà été décrite [248]. L'une de ces souches originaires de Slovénie partageait le même haplotype que quatre isolats algériens de la présente étude. Selon Alnaasan *et al.*, [248], les isolats italiens d'*E. amylovora* ont montré une grande diversité qui laisse supposer de multiples événements d'introduction de la bactérie de plusieurs pays. Deux de ces isolats, étaient étroitement liés à des souches d'Algérie et d'Égypte. Alnaasan *et al.*, [248] rapporte aussi que la comparaison entre l'isolat italien OMPBO1077,7 / 94 (Italie, 1994), isolé en 1990, et les souches algériennes isolées en 2012 ont montré une relation étroite [13]. Cela suggère qu'*E. amylovora* aurait pu être introduite en Italie et en Algérie au cours de la même période, même si aucun rapport officiel de l'Algérie n'est disponible. Nous suggérons par conséquent que la bactérie a été introduite en Algérie avec des arbres infectés par certaines populations qui ont subi des mutations après son introduction. Il est possible que le volume élevé de plantes commercialisées et la difficulté inhérente d'intercepter des plantes infectées de manière latente aient contribué à l'introduction et à la propagation de la bactérie *E. amylovora* dans ces pays méditerranéens.

Aucune base de données n'est publiquement disponible sur *Erwinia amylovora* pour MLVA. De nouvelles comparaisons avec des isolats d'autres pays d'Afrique du Nord sont nécessaires pour conclure sur les voies et le nombre d'introductions en Algérie. Le feu bactérien est difficile à contrôler, car il peut se propager rapidement dans la plante et les méthodes de contrôle efficaces font encore défaut. Ce qui appelle à une vigilance accrue pour les mouvements d'échange commercial de matériel végétal avec l'Algérie afin d'assurer la gestion de cette maladie.

4. Biocontrôle du feu bactérien par les bactéries endophytes, potentialités des souches sélectionnées

Dans le but de sélectionner des agents de lutte biologique efficaces contre le feu bactérien, des souches algériennes locales isolées en tant qu'endophytes de différentes plantes spontanées ont été testées *in vitro* pour leur efficacité contre *E. amylovora* [193]. À partir de ce criblage préliminaire, quatre souches qui inhibaient fortement *E. amylovora* ont été sélectionnées et caractérisées en fonction des résultats de l'évaluation *in vitro* de leur activité antagoniste, de leurs performances liées au biocontrôle et de leur résistance aux facteurs abiotiques.

Les souches de *P. brassicacearum*, *B. amyloliquefaciens* et *B. methyloptrophicus* sélectionnées dans cette étude sur la base de leur activité antagoniste *in vitro* et d'autres caractéristiques connues, ont montré une capacité de lutte biologique différente contre *E. amylovora* inoculée artificiellement sur des poires immatures. Il est important de rappeler que le test de pathogénicité d'*E. amylovora* que nous avons utilisé sur les poirettes est un outil très fiable à la fois pour les études de contrôle biologique et de virulence [250]. Les poires immatures constituent un matériel végétal sensible à l'infection par *E. amylovora* et ont été utilisés auparavant, pour des études de lutte biologique et d'agressivité d'agents pathogènes [250; 251].

Différents types de mesures sont envisageables pour lutter contre le feu bactérien en vergers. Il n'existe pas de traitement curatif et peu de produits préventifs sous forme de stimulateurs de défense naturelle sont disponibles actuellement sur le marché. Une lutte efficace contre le feu bactérien commence d'abord par une bonne conduite annuelle de la culture. Si les méthodes employées ne suffisent pas, il est encore possible d'utiliser des méthodes de traitement biologique.

La recherche d'agents de lutte biologique contre cette maladie destructrice, a été menée au cours des dernières décennies dans plusieurs pays. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet inhibiteur de différents antagonistes bactériens contre *E. amylovora*, notamment, la production de métabolites secondaires toxiques et la compétition pour les nutriments et l'espace [21].

Les deux souches de *P. brassicacearum* étudiées ont été très efficaces (plus que les souches de *Bacillus*), pour réduire le développement des symptômes développant des nécroses de petite taille avec absence de production d'exsudats

bactériens sur les poirettes inoculées. Il est à rappeler que pour le test de confrontation *in vitro* en milieu gélosé, les souches de *Bacillus* utilisées dans cette étude ont montré la meilleure activité inhibitrice de la croissance vis-à-vis du pathogène mais à faible efficacité *in planta*. Plusieurs études ont montré que les souches les plus performantes *in vitro* pour évaluer l'effet antagoniste, ne sont pas toujours les agents les plus efficaces de lutte biologique *in vivo* [252; 253]. Nos résultats sont similaires à ceux décrits par Shemshura *et al.*, [224], qui ont démontré que la croissance d'*E. amylovora* a été significativement inhibée uniquement *in vitro* par le surnageant du bouillon de la culture *B. amyloliquefaciens* MB40. Le diamètre d'inhibition de la croissance d'*E. amylovora* en milieu gélosé était en moyenne de 47mm, contrairement à l'incidence de la maladie après traitement de *B. amyloliquefaciens in planta* sur fleurs détachées qui était de $8,8 \pm 1,5\%$ [224].

L'activité antimicrobienne des espèces endophytes apparentées aux *Bacillus* contre divers agents pathogènes bactériens et fongiques a été signalée par de nombreux travaux, elles ont la capacité de produire du 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACC désaminase) [254]. Chen *et al.*, [255] ont rapporté que l'activité de *B. amyloliquefaciens* FZB42 contre le feu bactérien repose sur les polykétides antibactériens (difficidine et bacilysine). De plus, Yuan *et al.*, [256] et Zhang *et al.*, [257] ont montré l'efficacité de l'activité antifongique des lipopeptides produits par *B. amyloliquefaciens*, comprenant les composants de fengycine, surfactine et bacillomycine. La synthèse de tels composants antagonistes comme l'acide salicylique, l'acide jasmonique et le chitosane isolés de *B. amyloliquefaciens* a également été rapportée [258; 259].

Parallèlement, les souches de cette étude affiliées aux *Pseudomonas* sont efficaces sur les poires immatures mais à efficacité moindre *in vitro*. Ce résultat est en concordance avec Gerami *et al.*, [260], qui suggèrent qu'il peut être attribué à d'autres mécanismes de lutte biologique plutôt qu'à la production d'antibiotiques, tels que les métabolites inhibiteurs non volatils ou la compétition [261].

Pour la première sélection d'antagonistes d'*E. amylovora*, de nombreux chercheurs ont utilisé le test sur des milieux de culture solides et le critère de sélection était la taille de la zone d'inhibition de la croissance des agents pathogènes [5]. En effet, les *Pseudomonas* spp. utilisés n'ont pas montré une potentialité *in vitro* importante par rapport au test *in planta* sur poirettes, où la croissance d'*E. amylovora* a été fortement inhibée. Nos résultats sont similaires à ceux annoncés par

Mikiciński *et al.*, [262], qui ont montré que lors du test *in vitro*, les souches (*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aureofaciens* 3 M), (*Pseudomonas congelans* 35 M) et (*Pseudomonas protegens* 59 M) n'ont pas inhibé la croissance du pathogène sur gélose, mais semblent efficaces pour protéger les fleurs de pommier et les pousses terminales du poirier atteints par le feu bactérien. Dans un travail similaire, Gerami *et al.*, [260], ont également montré que les antagonistes bactériens *Pseudomonas putida* et *Serratia marcescens* étaient efficaces *in planta* mais ne l'étaient pas *in vitro* [261].

De plus, nos résultats montrent une forte activité d'antagonisme *in planta* à effet préventif de *Pseudomonas* spp. sur les poires immatures et sans efficacité curative. Des recherches similaires ont été réalisées, notamment par Galasso *et al.*, [263], qui rapportent des capacités de protection estimées, de deux souches appartenant au genre *Pseudomonas* sur la croissance des feuilles des pousses de pommiers en serre. L'expérience a été réalisée de telle sorte que les pousses ont d'abord été inoculées par des suspensions de bactéries testées, et après 24h, les feuilles supérieures ont été blessées et inoculées avec une suspension d'*E. amylovora*. L'efficacité de la bactérie a été caractérisée par une grande variabilité de réponse positive allant de 40 à 87%. Des expériences similaires ont également été menées par des chercheurs espagnols qui, dans des conditions contrôlées, ont blessé les nervures principales des feuilles de pommier, de manière protectrice traités avec des bactéries, puis inoculées par *E. amylovora* [20; 262].

La capacité des souches bactériennes antagonistes à inhiber la croissance d'*E. amylovora* *in vitro* dans des conditions contrôlées, devrait confirmer également leur efficacité à contrôler le feu bactérien de poiriers. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet inhibiteur de différents antagonistes bactériens sur *E. amylovora*, notamment la production de métabolites secondaires toxiques et la compétition pour les nutriments et l'espace [21]. La capacité de coloniser et de survivre dans différents organes végétaux et la capacité de croître dans la même niche écologique que l'agent pathogène sont des aspects critiques de la lutte contre la maladie, car ces propriétés sont essentielles à la compétition avec l'agent pathogène pour les sites et les nutriments, comme démontré pour *P. fluorescens* et *P. agglomerans* [264; 265].

Nous n'avons pas trouvé une corrélation entre l'antibiose *in vitro* et l'efficacité des souches *in vivo*. Ainsi, des mécanismes autres que l'antibiose auraient pu être

impliqués. Pour documenter cet aspect, les bactéries ont été testées pour la production de sidérophores, deux groupes ont été retrouvés chez les deux souches de *P. brassicacearum* à savoir, les hydroxamates et catecholates. Le rôle des sidérophores produits par *Pseudomonas* dans le contrôle de certaines maladies des plantes a été décrit [266]. Dans certains rapports, il a été démontré que les sidérophores suppriment plusieurs maladies induites par des agents pathogènes en conférant un avantage compétitif à l'agent de lutte biologique par rapport aux agents pathogènes dans des conditions offrant les habitats naturels avec un approvisionnement limité en oligo-éléments essentiels [267].

Nos résultats concordent avec les rapports d'étude selon lesquels la souche A506 a réduit de 50 à 80% l'incidence du feu bactérien dans de nombreux essais en Californie [268]. Les essais ainsi effectués de la souche A506 de *Pseudomonas fluorescens*, agent de lutte biologique en Californie, ont été réalisés sur des fleurs de poiriers inoculées. La compétition est le mécanisme le plus efficace rapporté contre *E. amylovora* et signalé par Wilson et Lindow [269] à la fois pour *P. fluorescens* A506 (ainsi que pour *P. fluorescens* EPS62e [21]. Similairement, Ulke et Çınar [252] et Mikiciński *et al.*, [16] ont démontré que sur les pousses de poirier, six souches de *P. agglomerans* (*E. herbicola*) et la souche *Pseudomonas graminis* 49M, ont montré une efficacité plus élevée (jusqu'à 80%) dans la lutte contre le feu bactérien lorsqu'un intervalle de 24 h entre l'application des antagonistes et l'inoculation de pathogènes a été utilisé (lutte préventive) ce qui a été obtenu également dans la présente étude. Lorsque la souche *Pseudomonas graminis* 49 M a été inoculée sur pommiers en fleurs dans les vergers, elle les a effectivement colonisés pendant toute la période de floraison. Au cours de cette période, les conditions météorologiques étaient variables, y compris des précipitations montrant une valeur égale ou d'efficacité encore plus élevée dans la protection des pommiers et des pousses terminales [16]. *P. fluorescens* et *P. agglomerans* ont démontré un grand potentiel en tant qu'agents de lutte biologique contre le feu bactérien grâce à un mécanisme basé sur la production d'antibiotiques [270].

Les bactéries endophytes du genre *Pseudomonas* ont des caractéristiques spécifiques qui en font des agents de lutte biologique efficaces, par leur capacité de produire une grande variété de composés bioactifs précieux pour les applications agricoles [271]. Les métabolites ayant une activité antimicrobienne et les composés impliqués dans l'induction des réponses de défense des plantes et la stimulation de

la croissance [272; 273]. La production de ces composés contribue à contrôler les agents phytopathogènes, mais semble également contribuer à l'établissement et à la persistance de l'antagoniste dans la plante [274; 275 ; 256]. Ceci explique la capacité de nos souches à inhiber la croissance du pathogène par la présence des métabolites antimicrobiens induits lors de l'interaction avec la plante comme a été prouvé par les travaux de Djellout *et al.*, [276], qui a confirmé l'action de biocontrôle par l'induction de la résistance systémique (ISR) de ces mêmes espèces bactériennes. Les souches de *Pseudomonas* spp. et les souches de *Bacillus* spp. étudiées, ont permis de protéger des plants de tomate contre *Agrobacterium tumefaciens* en induisant la plante à produire des enzymes antioxydantes ; la peroxydase et la polyphénol oxydase et l'accumulation d'acide salicylique et de polyphénols [276].

Au vu des résultats obtenus lors de cette étude, il est possible d'affirmer que le pathogène *E. amylovora* est répandu en Algérie et que *P. brassicacearum* pourrait être considéré comme un agent de lutte biologique potentiel à exploiter. Cette espèce a déjà été signalée comme un agent de lutte biologique efficace contre *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae* et également *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* [277; 278].

Les résultats de l'étude consacrée à l'antagonisme *in vitro* et *in vivo*, nous ont permis de sélectionner les espèces de bactéries endophytes pouvant réduire le feu bactérien. Pour enchaîner sur d'autres potentialités, dans cette partie du document, nous avons considéré d'autres paramètres intrinsèques aux bactéries étudiées. Les critères testés peuvent être appliqués pour aider à la sélection d'agents de lutte biologique plus efficaces, pouvant surmonter les obstacles lors de leur préparation et à leur formulation. Parmi les paramètres retenus, nous avons testé leurs capacités de production de biofilms, de sidérophores, de biosurfactants, leur mobilité ainsi que leur tolérance à des facteurs environnementaux comme la température, la salinité, l'osmolarité et le pH.

La capacité des deux *Pseudomonas* pour former le biofilm est significativement plus élevée par rapport aux *Bacillus* spp. Le biofilm est composé principalement d'exopolysaccharides (EPS), de protéines, de lipides et d'acides nucléiques et protège les bactéries contre les conditions environnementales défavorables [279]. La capacité de production de biofilm chez les bactéries

sélectionnées est une caractéristique importante leur permettant de réussir la colonisation des surfaces végétales et des espaces intercellulaires et d'augmenter leur survie et le maintien de la source d'eau.

Tous les isolats de notre collection produisent des sidérophores de types catécholates et hydroxamate avec des potentialités différentes. La bibliographie révèle que la majorité des espèces de *Pseudomonas* spp. et de *Bacillus* produisent des sidérophores bactériens [202]. La nature de la source de carbone influence la croissance cellulaire et la production de sidérophores, c'est la raison du choix des deux milieux utilisés pour cribler la source optimale de carbone pour la production de sidérophore dans cette étude. Les souches les plus productrices dans le milieu succinate sont les *Pseudomonas* spp. La souche de *B. amyloliquefaciens* EHF5 était le producteur de sidérophores le plus actif sur le milieu KB. La production plus élevée de sidérophores a été obtenue avec le glucose et le glycérol comme sources de carbone du milieu KB induisant une forte production de sidérophores, que celui du saccharose (succinate). Dans ce contexte et en concordance avec nos résultats, il a été rapporté que l'assimilation rapide du glucose bactérien favorise la croissance et donc une augmentation de la production de sidérophores [280; 281]. Cette propriété de production de sidérophores rencontrée chez nos souches est un atout supplémentaire du fait qu'elle permet une meilleure compétition qui participe efficacement à l'antagonisme contre les agents phytopathogènes en réduisant leurs effectifs. Concernant les souches apparentées au genre *Pseudomonas*, la production élevée de sidérophores en milieu succinate peut être liée à la production de pyoverdine dans laquelle, les trois groupements amine du chromophore sont remplacés par divers groupes acyldérivés du succinate, du malate, de l' α -céto-glutarate [282; 283]. Ce type de sidérophores peut également agir comme antibiotique tel que rapporté par Kraus et Loper, [284].

Les *Bacillus* spp. utilisés dans la présente étude montrent une motilité de type swimming et swarming supérieure aux *Pseudomonas* et une production de biosurfactants. Les résultats de Raaijmakers *et al.*, [285] et Sarwar *et al.*, [286] démontrent le potentiel des biosurfactants produits par les *Bacillus* spp. Les biosurfactants ont été absents chez les souches de *Pseudomonas* spp. par le test utilisé et qui pourraient être détectés par d'autres méthodes telles que le test d'huile atomisée ayant une sensibilité plus élevée [287]. En effet, les bactéries peuvent produire des surfactants non détectables ou hydrophobes (faible solubilité dans

l'eau), comme démontré par les travaux de Burch *et al.*, [287]. Les biosurfactants ont un rôle en lutte biologique ils conduisent à la colonisation microbienne des interfaces et peuvent altérer les propriétés physicochimiques de l'habitat et permettent par conséquent, d'affecter la structure de la communauté microbienne pathogène en développement [288].

Les quatre souches ont présenté un swimming positif signifiant qu'elles sont capables de se mouvoir dans un milieu liquide à l'aide de leurs flagelles. Kearns et Losick [289] rapportent que le 'swimming et swarming' sont entraînés par les flagelles. Les genres bactériens chez lesquels le swarming a été étudié et confirmé sur le milieu agar semi solide à 0,5-0,7 % chez *Bacillus* spp. comme décrit par Kearns et Losick, [289] et *Pseudomonas* spp. [290]. Le swarming est considéré comme une réponse comportementale à la surface, ce qui fournit aux bactéries flagellées la capacité d'agir comme une population multicellulaire colonisant rapidement les substrats solides riches en nutriments [211]. La motilité de type swarming est impliquée dans le processus de colonisation de la surface bactérienne qui constitue une potentialité chez les bactéries utilisées en lutte biologique. Ceci explique également la corrélation entre la production de biosurfactants et le swarming positif des souches de *Bacillus*.

Les résultats de cette étude révèlent que les conditions extrêmes de température (4°C à 42 °C), pH (4 et 8), salinité (0,3 M et 1,0 M) et d'osmolarité (PEG entre 20%, 40%) sont tolérées par les souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* étudiées, montrant leur capacité à faire face à des conditions environnementales stressantes. Ces résultats sont en corrélation avec ceux de la production de biofilm, du fait qu'il est possible que cette structure polysaccharidique ait servi de mécanisme de survie pour ces bactéries pour résister aux conditions environnementales adverses [291].

Les espèces du genre *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante qui leur permet de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles et psychrophiles et sont capables de croître à une large gamme de pH, températures et concentrations de sels [292].

Les souches de *Bacillus* étudiées dans notre travail étaient modérément halotolérantes, tolérant jusqu'à 0,8 M de NaCl. Cependant, les souches de *Pseudomonas* manifestent une halotolérance plus élevée en se développant à une concentration de 1 M de NaCl.

L'approche développée pour atténuer le stress salin chez les plantes consiste au traitement des semences et des plantes par des PGPR. Les plantes en milieu salin ou lors d'un déséquilibre ionique deviennent plus vulnérables aux maladies causées par des organismes phytopathogènes. L'utilisation d'antagonistes microbiens spécifiques, stimule davantage la croissance des plantes dans les écosystèmes dégradés [293]. Le développement d'une souche microbienne tolérante au stress, associée aux racines des cultures, peut conduire également à l'amélioration de la fertilité des sols salins [294].

Enfin, les *Pseudomonas brassicacearum* se sont révélés comme agents antagonistes efficaces vis-à-vis du pathogène de quarantaine *E. amylovora in planta*, ayant ainsi une capacité de production de biofilm, de sidérophores, une motilité positive et une tolérance aux différents stress abiotiques (températures extrêmes, salinité, osmolarité). Ces antagonistes constituent des candidats potentiels, ils peuvent être utilisés dans le biocontrôle du feu bactérien pour la protection des Maloidées contre cette maladie.

Au vu des résultats obtenus et en comparaison à d'autres rapportés dans d'autres études, d'autres expérimentations sont nécessaires pour évaluer d'autres mécanismes impliqués dans leur interaction avec l'agent pathogène et pour évaluer leur efficacité sur le terrain dans différentes conditions environnementales.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le travail entrepris dans cette thèse englobe des tâches entreprises sur le terrain, au laboratoire et en serre. Les principaux objectifs étaient de réaliser une étude symptomatologique au niveau de vergers de poiriers dans la Mitidja centrale, suivis de l'isolement des souches d'*E. amylovora* et de leur identification biochimique, sérologique et moléculaire par PCR. Le typage moléculaire et la diversité génétique des souches algériennes d'*E. amylovora* isolées, ont été réalisés par BOX-PCR, ERIC-PCR et VNTR. De même, l'étude de l'incidence et de la sévérité de la maladie en hiver a été réalisée sur poiriers dans des vergers situés dans 3 wilayas ; Blida, Bouira et Boumerdés. Dans le but de sélectionner des agents de biocontrôle efficaces contre le feu bactérien, des souches algériennes locales isolées comme endophytes de différentes plantes spontanées ont été testées *in vitro* ainsi qu'*in vivo* sur poirettes, pour évaluer leur efficacité contre *E. amylovora*. Enfin, une série de tests ont été utilisés à savoir la production de biofilm, de sidérophores et de biosurfactants, ainsi que la tolérance aux stress abiotiques (pH, extrêmes températures, osmolarité et salinité), pour la validation des souches en tant qu'agents potentiels de bioprotection.

Dans l'ensemble des vergers déclarés atteints et prospectés, l'étude symptomatologique aux différentes périodes du cycle phénologique du poirier (dormance, floraison, nouaison et grossissement des fruits) a montré les symptômes typiques du feu bactérien avec des chancres sur les branches et troncs en période de dormance des plantes, des nécroses sur les feuilles, les fleurs et les fruits atteints en période de végétation avec l'apparition des exsudats sur les organes malades observés lorsque l'humidité est élevée. Durant la période de dormance s'étalant de novembre à février, des chancres sur les troncs et branches, des nécroses sous l'écorce et des mélanisations ont été observés sur les troncs et les branches de l'année précédente avec des dimensions qui varient d'un arbre à un autre, ainsi que des fruits momifiés restant attachés à l'arbre.

La caractérisation et l'identification du feu bactérien sont essentielles pour assurer une protection efficace et durable de nos vergers. Lors de cette étude, les échantillons ont été récoltés à partir de 14 vergers de poiriers var. Santa Maria symptomatiques durant les années 2014 et 2017, répartis sur 3 wilayas ; Blida, Alger et Tipaza. Au total, 37 souches d'*Erwinia amylovora*-like ont été obtenues.

Ces souches ont été identifiées par une série de tests biochimiques, physiologiques, biologiques par le test d'hypersensibilité sur le tabac et le test de pathogénicité sur les poires immatures et sérologiques par l'utilisation de l'immunodosage à flux latéral (Ea AgriStrip). La confirmation de l'appartenance des isolats à l'espèce *Erwinia amylovora* par voie moléculaire a été faite en utilisant les amorces G1-F et G2-R, indiquant la présence de la bande d'ADN de 187 pb et les amorces (AJ75 / AJ76) et (AMSbL/ AMSbR), révélant la présence du fragment de 844 pb des amorces plasmidiques pEA29 et la séquence d'ADN spécifique de 1,6 kb provenant de la région chromosomique *ams*.

Au vu des résultats obtenus au cours de cette étude, il est rapporté que l'espèce *E. amylovora* est répandue dans les vergers du Nord de l'Algérie. L'analyse génomique par BOX-PCR a révélé 3 groupes avec des fragments identiques. Le premier groupe a montré 5 souches avec 9 fragments; le deuxième présente 15 souches avec 14 fragments et le troisième de 6 souches et les souches de référence avec 19 fragments. Dans le cas de l'analyse ERIC-PCR, 4 groupes sont identifiés, le premier est constitué de 7 souches avec 7 fragments identiques, le second présente 7 souches et les souches de référence avec 19 fragments identiques, le troisième montre 10 souches de 9 fragments identiques et le quatrième incluant 3 souches qui forment un profil génétique faible mais identique. Par conséquent, les amorces BOX (BOX A1R) et ERIC (ERIC1R/ ERIC2) révèlent différents modèles génétiques entre les souches algériennes d'*E. amylovora*.

L'analyse VNTR a révélé deux loci (A et F) polymorphes parmi les 6 VNTRs étudiés en fonction de l'année d'isolement des souches (2014, 2015 et 2017) et leurs origines géographiques. Quatre haplotypes ont été identifiés au sein des souches d'*E. amylovora* isolées. Cette importante diversité génétique est explorée pour la première fois sur les souches algériennes, un haplotype singulier isolé du verger d'Attatba différent des autres souches a été trouvé sur la base de l'origine géographique des souches. Cependant, l'analyse MST n'a pas révélé de diversité en fonction des années.

Les résultats de l'étude épidémiologique des chancre au repos végétatif des vergers de poiriers a montré une importante incidence et sévérité du feu bactérien dans les vergers de L'Arbaa situés à Blida présentant 1102 chancre, une incidence de D=90% et une sévérité S=55%, suivis des vergers de Boumerdès puis ceux de Bouira respectivement. Les vergers de Blida et Boumerdès présentant une forte

incidence de la maladie doivent être arrachés, incinérés et remplacés par d'autres cultures non hôtes à la bactérie. Des mesures d'entretien et la surveillance des poiriers de Bouira de moindre incidence doivent être appliquées au repos végétatif et en période de croissance les années suivantes, afin de réduire la sévérité de la maladie.

Les souches de *Pseudomonas brassicacearum* CR2 et PS1 se sont révélées les plus efficaces pour le contrôle du feu bactérien sur les poires immatures en réduisant fortement le taux de nécroses. Le traitement préventif sur les fruits immatures par cette espèce a montré une efficacité de plus de 90%. L'espèce *P. brassicacearum* est citée ici pour la première fois dans le contrôle biologique du feu bactérien.

Ces souches produisent des quantités importantes de sidérophores de type hydroxamates et catécholates, leurs biofilms sont plus actifs que les souches de *Bacillus* et présentent une forte motilité de type swimming mais faible swarming sur des milieux solides. De même, ces mêmes souches de *Pseudomonas brassicacearum* ont des propriétés de tolérance vis-à-vis de différents paramètres de stress abiotique ; des températures de croissance comprises entre 30 et 42°C, une salinité de 0,3M et 1M, une osmolarité de 20% à 40% et un pH compris entre 4 et 10. Ces caractéristiques de performances font de ces souches de bons candidats pour la lutte contre le feu bactérien en Algérie.

Recommandations et perspectives

Les résultats de cette étude encouragent le passage vers une bio-agriculture saine et bénéfique à la santé humaine et à l'économie nationale. L'exploitation de bactéries endophytes antagonistes comme agents de bio-fertilisation et de bio-contrôle s'impose comme une alternative aux produits chimiques se basant sur les fertilisants ou pesticides chimiques ; tant nuisibles pour l'environnement que pour la santé publique.

De même, l'amélioration de l'aptitude écologique des *P. brassicacearum* PS1 et CR2 pourrait être étudiée et d'autres expérimentations en tenant compte de différents paramètres agricoles et climatiques sont nécessaires pour confirmer leurs performances sur le terrain pour le biocontrôle des Maloidées contre le feu bactérien.

La mauvaise gestion des techniques culturales, le non-respect des mesures phytosanitaires, les conditions climatiques favorables à la maladie, l'absence de

traitements chimiques et des méthodes de lutte efficaces, rendent la lutte contre le feu bactérien très difficile et conduisent à l'augmentation des pertes économiques.

La recherche de nouvelles méthodes de lutte pour gérer cette maladie s'avère nécessaire.

Nous suggérons par conséquent pour les travaux ultérieurs de recommander ce qui suit :

- Une analyse plus fine par séquençage et typage moléculaire par VNTR des souches algériennes d'*E. amylovora* avec d'autres souches appartenant à des collections internationales (travail en cours de réflexion avec le laboratoire d'Angers).
- Une détermination de l'effet de bioprotection (*in planta*) en plein champ des bactéries endophytes sélectionnées sur les fleurs, car elles constituent la voie de pénétration d'*Erwinia amylovora*.
- Une caractérisation des biomolécules qui sont à l'origine de l'inhibition bactérienne *in planta*. La détermination des conditions optimales de production et la purification de ces métabolites antibactériennes semble également très intéressante.
- Une optimisation de la formulation pour une activité et une survie maximale des cellules bactériennes et l'évaluation du stade végétatif et du taux d'application. À cette fin, la surveillance des cellules viables *in planta* pourrait aider à la conception d'un schéma d'application approprié.
- Une utilisation à grande échelle de ces antagonistes dans le cadre d'une stratégie de lutte biologique contre le feu bactérien. L'application commerciale de ces deux bactéries *Pseudomonas brassicacearum* CR2 et PS1, dépend du développement de formulations applicables dans lesquelles les bactéries peuvent survivre pendant une longue période dans l'environnement après colonisation des stigmates, des poires et des feuilles.

REFERENCES

REFERENCES

1. **FAO**, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.faostat.fao.org>, (2013).
2. **MADR**, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. ECOCOSTAT-ALGERIA. Economie et Statistiques Algérie. Production arboricole. ecostat-algeria.com. http://ecostat-algeria.com/a-la-une/agricultureactualites/production_arboricole-52-millions-de-quintaux-en-2018/, (2019).
3. **Amara, H.**, Stratégie de lutte contre le Feu Bactérien et intérêt de la défoliation des AF, profert, 2/03/2017, (2017), 7p.
4. **Powney, R., Smits, T.H.M., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J.E., Plummer, K.M., Beer, S.V., Lick, J., Duffy, B., Rodoni, B.**, Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to *Rubus* plants. *J Bacteriol*, 193, (2011), 785–786.
5. **Van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N., Zeller, W.**, Fire blight: history, biology, and management. APS Press, St Paul, MN, (2012), 420 p.
6. **Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, MA., et al.**, Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol*, 13, (2012), 614–629.
7. **EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization)**, PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*, 43 (1), (2013), 21–45.
8. **Norelli, J.L., Jones, A.L., Aldwinckle, H.S.**, Fire blight management in the twenty-first century: Using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Dis*, 87, (2003), 756–765.
9. **Palacio-Bielsa A., Cambra, M.A.**, El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, eds. Madrid, (2009), Availableonline:http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/ERWINIA_BAJA_tc_m7-1284.
10. **Ait Bahadou, S., Oujija, A., Tahiri, A., Lahlali, R.**, Fire blight (*Erwinia amylovora*) disease in Morocco: Current status and action for its management. *Mor. J. Agri. Sci.* 1(2), (2020), 95-100.
11. **Vanneste, J.L.**, Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. Pp 73-83 in: Vanneste J.L. (ed) Fire blight the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford, (2000), 370p. ISBN 0 85 199 2943.
12. **Zhao, Y.Q., Tian, Y.L., Wang, L., Geng, G., Zhao, W.J, Hu, B.S, Zhao, Y-F.**, Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(4), (2019), 815–820.
13. **Laala, S., Manceau, C., Valentini, F., Kerkoud, M., Kheddami, M.**, Fire blight survey and first characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Algeria. *J. Plant Pathol*, 94, (2012), 693–6.
14. **MADR**, Gestion du feu bactérien *Erwinia amylovora* en Algérie. MADR-DPVCT, (2015a), 17p.
15. **Vinayarani, G., Prakash, H.S.**, Growth Promoting Rhizospheric and Endophytic Bacteria from *Curcuma longa* L. as Biocontrol Agents against Rhizome Rot and Leaf Blight Diseases. *J. Plant Pathol*, 34(3), (2018), 218-235.

16. Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Puławska, J., Malusa, E., Antagonistic potential of *Pseudomonas graminis* 49M against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Arch Microbiol.* 198, (2016), 531–539.
17. Wilson, M., Lindow, S.E., Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 and *Erwinia amylovora* in pear flowers. *Phytopathol* 83, (1993), 117-123.
18. Aldwinckle, H.S., Bhaskara Reddy, M.V., Norelli, J.L., Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Horticulturae*, 590, (2002), 325–331.
19. Broggin-Schärer, G.A.L., Duffy, B., Holliger, E., Scharer, H.J., Gessler, C., Patocchi, A., Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. *Eur J. Plant Pathol*, 111, (2005), 93–100.
20. Roselló, G., Bonaterra, A., Francés, J., Montesinos, L., Badosa, E., Montesinos, E., Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. *Eur J. Plant Pathol*, 137, (2013), 621–633.
21. Cabrefiga, J., Bonaterra, A., Montesinos, E., Mechanism of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Int Microbiol*, 10, (2007), 123–132.
22. Pusey, P.L., Wend, C., Potential of osmoadaptation for improving *Pantoea agglomerans* E325 as biocontrol agent for fire blight of apple and pear. *Biological Control*, 62, (2012), 29–37.
23. Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., Lopez, M.M., Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, (2000), 2071–2078.
24. Puławska, J., Sobiczewski, P., Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia amylovora*: the causal agent of fire blight. *Trees*, 26, (2012), 3-12.
25. Bühlmann, A., Dreo, T., Rezzonico, F., Pothier, J.F., Smits, T.H., Ravnkar, M., Duffy, B., Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environ microbiol*, 16 (7), (2014), 2112-2125.
26. Schouls, L.M., Spalburg, E.C, van Luit, M, Huijsdens, X.W, Pluister, G.N, et al., Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Staphylococcus Aureus*: Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and spa-Typing. *PLoS ONE* 4(4), (2009), e5082.
27. Pourcel, C., Minandri, F., Hauck, Y., D'Arezzo, S., Imperi, F., Vergnaud, G., Visca, P., Identification of Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) Sequences in *Acinetobacter baumannii* and Interlaboratory Validation of an Optimized Multiple-Locus VNTR Analysis Typing Scheme; Vol. 49, No. 2, (2011), 539-548.
28. Aandahl, R.Z., Reyes, J.F., Sisson, S.A., Tanaka, M.M., A Model-Based Bayesian Estimation of the Rate of Evolution of VNTR Loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Computational Biology*, 8(6), (2012), e1002573.
29. Lashgarian, H.E., Marzban, A., Estaji, M., Gholami, M., Masoumi Asl, H., Raheb, J., Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for Typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Urine Samples of Different Patients. *J Babol Univ Med Sci.* 20(2), (2018), 56-63.
30. Phipps, J. B., Robertsokn, R., Sm, P. G., Rohrerj, R., A checklist of the subfamily Maloideae (*Rosaceae*). *CAW. J. BOT. VOL.* 68, (2014), 2209-2223.
31. MADR, (en ligne) : <http://madrp.gov.dz/agriculture/statistiques-agricoles/>, (2018).

32. Hartani, T, Kuper, M, Imache, A, Bouarfa, S., La Mitidja vingt ans après: Réalités agricoles aux portes d'Alger. Ed Quae, (2011), 290 p.
33. Namane, L., Suivi des irrigations dans une exploitation agricole de la Mitidja Ouest commune de Mouzaïa ENSA- *Ing. Hydraulique*, (2009), 03 p.
34. ANDI, Agence nationale de développement de l'investissement. Wilaya de Blida, (2015b), 20p. <http://www.andi.dz/index.php/fr/>.
35. FAO, Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, (2006), 92p.
36. MADR, Production arboricole. ECOCOSTAT-ALGERIA. Economie et Statistiques Algérie. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. <http://ecostat-algeria.com/a-la-une/agriculture-actualites/production-arboricole-52-millions-de-quintaux-en-2018/>, (2020).
37. Adamou, S., Bourenane, N., Haddadi, F., Hamidouche, S., Sadoud, S., Quel rôle pour les fermes pilotes dans la préservation des ressources phytogénétiques en Algérie ? Série de documents de travail N°126. Alger, (2005), 81 p.
38. Agrios, G.N., Plant Pathology. 4th ed. Academic Press. California. USA, (1997), 635 p.
39. Capinera, J.L., Handbook of vegetable pests. Academic Press, San Diego, California, (2001).
40. Gianessi, L.P., Silver, C.S., Sankula, S., Carpenter, J.E., Plant biotechnology: current and potential impact for improving pest management in U.S. Agriculture an analysis of 40 case studies: Bacterial resistant apple. *National Centre for Food and Agricultural Policy*, Washington, D.C, (2002).
41. Van der Zwet, T., Present world-wide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae*, 590, (2002), 33-34.
42. Lamant, T., Lévêque, L., Pommier et poiriers sauvages : comment les reconnaître ? RDV techniques n° 8 - printemps 2005 – ONF. Ed, (2005), 68 p.
43. El-Helaly, A.F., M.K. Abo El-Dahab, M.A., El-Goorani., The occurrence of the fire blight disease of pear in Egypt. *Phytopath. Medit*, 3, (1964), 156-163.
44. Bami, R., Le Feu bactérien s'attaque aux Rosacées à pépins dans plusieurs régions du pays. *Journal Le Matin* du 29 Septembre 2010, (2010).
45. Rhouma, A., Helali, F., Chettaoui, M., Hajlaoui, M.R., First report of fire blight caused by *Erwinia amylovora* on pear in Tunisia. *Plant Disease*, 98, (2014), 158.
46. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), Premier signalement d'*Erwinia amylovora* en Algérie. 01 Juin 2011, No 6 Paris, (2011), 2p.
47. Ziad, A., Algérie: Le feu bactérien a affecté des centaines d'hectares. *Journal La Tribune*, (29 Août, 2011).
48. EPPO /OEPP Global Data base, *Erwinia amylovora* (ERWIAM) distribution for *Erwinia amylovora*, (2012).
49. Donat, V., Bosca, E.G. Penalver, J., Lopez, M.M., Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *J Appl Microbiol*, 103, (2007), 1639-1649.
50. Gottsberger, R.A., Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology*, 51, (2010), 285–292.
51. Olsen, K., Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9- *PLoS One*, 6(7), (2011), e22247.
52. Giraud, M., Baudry, O., Orts, R., Gendrier, J., Protection intégrée pommier-poirier. Paris: Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, (2006), 200p.

53. **Burril, T.J.**, New species of micrococcuc. *American Naturalist*, 17, (1883), 319-320.
54. **Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Bu chanan, R.E., Krumwiede, C.J.R., Rogers, L.A., Smith, G.H.**, The families and genera of the bacteria; *Erwineae*. *Journal of Bacteriology*, 5, (1920), 191-229.
55. **Momol, M.T., Aldwinckle, H. S.**, Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora* Wallingford, UK: *CABI Publishing*, (2000), 55-72.
56. **Phillon, V.**, Le feu bactérien, Fiches 104 - 106. In : Guide de référence en production fruitière intégrée pour les producteurs de pommes du Québec. Ed. CFP, Pageau C. F. ; IRDA, Poulin D, Québec, (2014), 403-422.
57. **Berger, F., Cronfeld, P., Lex, S., Vermeulen, M.**, Fire blight on plum (*Prunus domestica*) and roses (*Rosa rugosa*). *Erwerbsobstbau . cabdirect.org*, Vol.42 No.6 , (2000), 207-210.
58. **Mohan, S. K., Bijman, V. P., Fallahi, E.**, Field evaluation of *Prunus* species for susceptibility to *Erwinia amylovora* by artificial inoculation. The 9th Int.Workshop on Fire Blight, Abstract Vol , (2001), 53 P.
59. **Vanneste, J. L., Lex S., Vermeulen, M., Berger, F.**, Isolation of *Erwinia amylovora*-like organisms from blighted plums (*Prunus domestica*) and potato roses (*Rosa rugosa*). The 9th Int. Workshop on Fire Blight, Abstract Vol, (2001), P-7.
60. **EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization)**, *Erwinia amylovora*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation, (2020), (En ligne) :<https://gd.eppo.int>.
61. **Celetti, M.**, Fire blight canker removal in early spring, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Hort matter. Ontario, (2015), [En ligne] <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/hortmatt/2015/02hrt15a1.htm> CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Mol. Plant Microbe Interact*.
62. **Blachinsky, D, Shtienberg, D, Zamski, E, Weinthal, D, Manulis, S.**, Effects of pear tree physiology on fire blight progression in perennial branches and on expression of pathogenicity genes in *Erwinia amylovora*. *Eur J Plant Pathol* 116, (2003), 315–324.
63. **Thomson, S. V., Gouk, S. C.**, Influence of age of apple flowers on growth of *Erwinia amylovora* and biological control agents. *Plant Dis*, 87, (2003), 502-509.
64. **Donat, V., Biosca, E.G., Rico, A., Peñalver, J., Borrueal, M., Berra, D., Basterretxea, T., Murillo, J., López, M.M.**, *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics. *Annals of Applied Biology*, 146, (2005), 105-114.
65. **Billing, E.**, Fire blight: why do views on host invasion by *Erwinia amylovora* differ? *Plant Pathol* 60, (2011), 178–189.
66. **Olamedi, J.C.**, Fire blight (*Erwinia amylovora*) of rosaceous plants: pathogen virulence and selection and characterization of biological control agents, *Teza de doctorat*, Univ.Girona Spania, (2005).
67. **Vanneste, J.L., Eden-Green, S.J.**, Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. Pp 73-83 in : Vanneste J.L. (Ed) Fire blight the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford, (2000), 370pp. ISBN 085 199 2943.
68. **Sobiczewski, P., Iakimova, E. T., Mikiciński, A., Wezgrzynowicz-Lesiak, E., Dyki, B.**, Necrotrophic behaviour of *Erwinia amylovora* in apple and tobacco leaf tissue. *Plant Pathology*, 66, (2017), 842–855.
69. **Santander R.D., Oliver J.D., Biosca E.G.** Cellular, physiological, and molecular adaptive responses of *Erwinia amylovora* to starvation. *FEMS Microbiology Ecology*, 88,(2014), 258-271.
70. **Traversa, F., Mazzucchi, U.**, One year survival of *Erwinia amylovora* in symptomless pear scions. *Journal of Plant Pathology*, 84 (3), (2002),157-160.

71. Sobiczewski, P, Kielak, K, Puławska, J, Berczy_ński, S., Winter survival of *Erwinia amylovora* in apple terminal shoot tissue. *Phytopathologia Polonica* 39, (2006), 93–103.
72. Balaž J., Aćimović S.G., Magazin N., Bacterial fire blight (*Erwinia amylovora*) of pome fruit species and ornamental Plants. Bull. 1, Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia, (2008).
73. Psallidas, P.G., Fire blight of Pomaceous trees in Greece - evolution of the disease and characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 273, (1990), 25-32.
74. Paulin, J.P., Ridé, M., Prunier, J.P., Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans: controverses et polémiques transatlantiques. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie, 324(10), (2001), 905-914.
75. Hevesi, M., Az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. hazai megjelenése almán. Növényvédelem, 32, (1996), 225–228.
76. Bonn, W.G., van der Zwet, T., Distribution and economic importance of fire blight. In Fire Blight: the Disease and its Causative Agent *Erwinia amylovora*. Vanneste, J. (ed.). Wallingford, Oxon, UK; New York: CABI Publishing, (2000), 37–53.
77. Bünter, M., Popow, G., Strickhof., Lindau, Z.H., Holliger, E., Vogelsanger, J., Schoch, B., Feu bactérien: contrôlez vos arbres ! Arboriculture. Station fédérale de recherche Wädenswil (FAW). Edition 2003, Office fédéral de l'agriculture (OFAG). (2003), 2 p.
78. Calzolari, A., Finelli, F., Mazzoli, G.L., A severe unforeseen outbreak of fire blight in the Emilia-Romagna Region. *Acta Horticulturae*, 48, (1999), 171–176.
79. Van der Zwet, T., Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases. *Acta Horticulturae*, 704, (2006), 35-36.
80. Yaich, M., Fatmi, M., Mousiba, M., Valentini, F., Scuderi, G., D'Onghia, AM., Cirvilleri, G., Fire blight (*Erwinia amylovora* [Burrill] Winslow) in Morocco: importance, geographical distribution and characterization. *Phytopathol. Mediterr* 50, (2011), 212-227.
81. Aćimović, S.G., Fire Blight Fact Sheet, Cornell University, Hudson Valley Research Laboratory, (2018), 6P.
82. Paulin, J.P., *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. In: Fire Blight, The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora* (Ed. Vanneste J), (2000), 87–116. CAB International, Wallingford (GB).
83. Brenner, D.J., Family I. Enterobacteriaceae. In: Krieg, N.R.A. and Holt, J.G. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, (1984), 408–420.
84. Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J., Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*, *Systematic and Applied Microbiology*, 21, (1998), 384–397.
85. Delaunay-Cesbron, S., Interaction entre des mutants *hrp* d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité. *Thèse de Doctorat*. Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale. Université d'Angers, (2009), 82p.
86. Krieg, N.R., Holt, J.G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 8th, edn. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, (1984), 964 p.
87. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 787p.
88. Bayot, RG., Ries, S.M., Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology* 76, (1986), 441-445.

89. **Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W.**, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. 3 Ed, 373p. St Paul, Minnesota 15 (12), **(2001)**, 1468-80.
90. **Lewis, L.N., Tolbert, N.E.**, Nitrogen requirement and metabolism of *Erwinia amylovora*. *Physiologia Plantarum*, 17, **(1964)**, 44–48.
91. **Spinelli, F.**, Changes in plant metabolism induced by dioxygenase inhibitors and their effect on the epiphytic microbial community and fire blight (*Erwinia amylovora*) control. Thèse de doctorat, Université degli Studi di Bologna, **(2002)**, 11- 28.
92. **Koczan, J.M., McGrath, M.J., Zhao, Y., Sundin, G.W.**, Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: Implications in pathogenicity. *Phytopathology*, 99, **(2009)**, 1237–1244.
93. **Lee, S.A., Ngugi, H.K., Halbrecht, N.O., O'Keefe, G., Lehman, B., Travis, J.W., Sinn, J.P., McNellis, T.W.**, Virulence characteristics accounting for fire blight disease severity in apple trees and seedlings. *Phytopathology*, 100, **(2010)**, 539–550.
94. **Roach, D.R., Sjaarda, D.R., Castle, A.J., Svircev, A.M.**, Host Exopolysaccharide Quantity and Composition Impact *Erwinia amylovora* Bacteriophage Pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*. Volume 79 Number 10, **(2013)**, 3249–3256.
95. **Berger, F., Cronfeld, P., Lex, S., Vermeulen, M.**, Fire blight on plum (*Prunus domestica*) and roses (*Rosa rugosa*). *Erwerbsobstbau*. *cabdirect.org*, Vol.42 No.6, **(2000)**, 207-210.
96. **Seemuller, E.A., Beer, S.V.**, Absence of cell wall polysaccharide degradation by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 66, **(1976)**, 433–436.
97. **Feistner, G.**, (L)-2,5-Dihydrophenylalanine from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Phytochemistry*, 27, **(1988)**, 3417-3422.
98. **Slade, M.B., Tiffin, A.I.**, Biochemical and serological characterization of *Erwinia*. In: Bergon, T. (ed.) *Methods in Microbiology*, Vol. 15. *Academic Press*, London, **(1984)**, 228–293.
99. **Gorris, M.T., Camarasa, E., López, M.M., Cambra, M.**, Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. *Acta Horticulturae*, 411, **(1996)**, 47–51.
100. **Llop, P., Donat, V., Rodríguez, M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Palomo, J. L., et al.**, An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96, **(2006)**, 900–907.
101. **Maxson-Stein, K., McGhee, G.C., Smith, J.J., Jones, A.L., Sundin, G.W.**, Genetic analysis of a pathogenic *Erwinia* sp. isolated from pear in Japan. *Phytopathology* 93, **(2003)**, 1393– 9.
102. **Foster, G.C., Gayle, C., Jones, A.L., Sundin, G.W.**, Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, **(2004)**, 7539-7544.
103. **Piqué, N., Miñana-Galbis, D., Merino, S., Tomás, J.M.**, Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *Int J Mol Sci.* 16(6), **(2015)**, 12836-54.
104. **Sebahia, M., Bocsanczy, A.M., Biehl, B.S., Quail, M.A., Perna, N.T., Glasner, J.D., DeClerck, G.A., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Bentley, S.D., Parkhill, J., Beer, S.V.**, Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *Journal of bacteriology*, Vol. 192 (7), **(2010)**.
105. **Smits, T.H., Rezzonico, F., Duffy, B.**, Evolutionary insights from *Erwinia amylovora* genomics. *J. Biotechnol.* 155, **(2011)**, 34–39.
106. **Mann, R.A., Smits, T.H.M., Bühlmann, A., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J.E., et al., 2013.** Comparative genomics of 12 strains of *Erwinia amylovora* identifies a pan-genome with a large conserved core. *PLoS ONE* 8: e55644.

107. Llop, P., Cabrefiga, J., Smits, T.H.M., Dreo, T., Barbé, S., Pulawska, J., Bultreys, A., Blom, J., Duffy, B., Montesinos, E., Lopez, M.M., *Erwinia amylovora* novel plasmid pEI70: complete sequence, biogeography, and role in aggressiveness in the fire blight phytopathogen. *PLoS ONE* 6, (2011), e28651. 10.1371/journal.pone.0028651.
108. Llop, P., González, R., Pulawska, J., Bultreys, A., Dreo, T., López, M. M., The new plasmid pEI70 is present in *Erwinia amylovora* European strains. *Acta Horticulturae*. 793, (2008), 131–136.
109. Steinberger, E.M., Cheng, G.Y., Beer, S.V., Characterization of a 56-kb plasmid of *Erwinia amylovora* Ea322: its noninvolvement in pathogenicity. *Plasmid* 24, (1990), 12-24.
110. Chiou, C.S., Jones, A.L., The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 81, (1991), 710-714.
111. Chiou, C.S., Jones, A.L., Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 175, (1993), 732–40.
112. Smits, T.H.M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J.E., Duffy, B., Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Mol. Plant Microbe Interact*, 23, (2010), 384-393.
113. Palmer, E.L., Teviotdale, B.L., Jones, A.L., A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 detected in *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 63, (1997), 4604–4607.
114. McGhee, G.C., Schnabel, E.L., Maxson-Stein, K., Jones, B., Stromberg, V.K., Lacy, G.H., Jones, A.L., Relatedness of chromosomal and plasmid DNAs of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol*, 68, (2002), 6182-6192.
115. Pusey, P.L., Smith, T.J., Relation of apple flower age to infection of hypanthium by *Erwinia amylovora*. *Plant Dis*, 92, (2008), 137-142.
116. Expert, D., Dellagi, A., Kachadourian, R., Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferrioxamineE, the main siderophore of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste J (ed) Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, (2000), 179-195.
117. Dellagi, A., Brisset, M.N., Paulin, J.P., Expert, D., Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, (1998), 734-742.
118. Whitfield, C., Valvano, M.A., *Advances in microbial physiology* 35, (1993), 135-246.
119. Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmuller, I., Geider, K., Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl and Environ Microbiol*, 61, (1995), 2636–2642.
120. Bugert, P. Geider, K., Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol Microbiol* 15, (1995), 917-933.
121. Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T., Valcke, R., Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in *Rosaceae*: State of the art. *Microbiology*, 159, (2013), 823–832.
122. Kim, J.F., Beer, S.V., *hrp* genes and harpines of *Erwinia amylovora*: A decade of discovery. In: Vanneste JL (ed) Fire Blight, the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*, (2000), 141–161. CABI Publishing, Wallingford UK; New York, USA.
123. Oh, C.-S., Beer, S.V., Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters*, 253, (2005), 185–192.
124. Nissinen, R.M., Ytterberg, A.J., Bogdanove, A.J., Van Wijk, K.J., Beer, S.V., Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected *hrp* mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Mol. Plant Pathol.* 8, (2007), 55–67.

125. Kjemtrup, S., Nimchuk, Z., Dangl, J.L., Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion in Microbiology*, 3, (2000), 73-78.
126. Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., Beer, S.V., Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257, (1992), 85-88.
127. Zhao, Y., Blumer, S.E., Sundin, G.W., Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J Bacteriol*, 187, (2005), 8088-8103.
128. Santander, R.D., Biosca, E.G., *Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low environmental temperatures. *PeerJ* 5, (2017), e3931.
129. Koczan, J.M., Lenneman, B.R., McGrath, M.J., Sundin, G.W., Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol*, 77, (2011), 7031–7039.
130. Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C., Geider, K., Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology* 88, (1998), 416-421
131. Raetz, C.R.H., Whitfield, C., Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71, (2002), 635-700.
132. Rezzonico, F., Braun-Kiewnick, A., Mann, R.A., Rodoni, B., Goesmann, A., Duffy, B., Smits, T.H.M., Lipopolysaccharide biosynthesis genes discriminate between *Rubus* and *Spiraeoideae* infective genotypes of *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant Pathology*, 13, (2012), 975-984.
133. Braun-Kiewnick, A., Altenbach, D., Oberhänsli, T., Bitterlin, W., Duffy, B., A rapid lateral-flow immunoassay for phytosanitary detection of *Erwinia amylovora* and on-site fire blight diagnosis. *J Microbiol Methods*. 87, (2011), 1–9.
134. Atanasova, I., Kabadjova, P., Bogatzewska, N., Moncheva, P., New host plants of *Erwinia amylovora* in Bulgaria. *Zeitschrift fur Naturforschungs C*, 60(11-12), (2005), 893-898.
135. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, (2000), 28p.
136. Stackebrandt, E., Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes Ed 1. *Springer Berlin Heidelberg*, (2010), 320 p.
137. Wolska, K., Kot, B., Jakubczak, A., Rymuza, K., BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J. Folia Histochem Cytobiol*, 49(4), (2011), 734-738.
138. Jock, S., Wensing, A., Pulawska, J., Drenova, N., Dreo, T., Geider, K., Molecular analyses of *Erwinia amylovora* strains isolated in Russia, Poland, Slovenia and Austria describing further spread of fire blight in Europe. *Microbiological Research*, 168, (2013), 447–454.
139. Hannou, N., Llop, P., Faure, D., Lopez, M.M., Moumni, M., Characterization of *Erwinia amylovora* strains from Middle Atlas Mountains in Morocco by PCR based on tandem repeat sequences. *Eur J. Plant Pathol*, 136, (2013), 665-674.
140. Dardouri, S., Chehimi, S., Murillo, J., Hajlaoui, MR., Molecular characterization of Tunisian strains of *Erwinia amylovora*, *J. Plant Pathol*, 99 (2), (2017), 331-337.
141. Refahi, M., Baghaee-Ravari, S., Mahdikhani-Moghaddam, E., Exploring Possible Variation among Iranian *Erwinia amylovora* Strains Using Multilocus Typing and Tandem Repeat Analysis. *J. Agr. Sci. Tech.* 19, (2017), 745-754.

142. Singh, M., Malik, M.A., Singh, D.K. *et al.* Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA)-typing of *Brucella abortus* isolates of India reveals limited genetic diversity. *Trop Anim Health Prod* 52, (2020) 1187–1194.
143. Aćimović, S. G., Mcghee, G. C., Sundin, G. W., Wise, J.C., Evaluation of trunk-injected bactericides and prohexadione-calcium for environmentally friendly control of fire blight (*Erwinia amylovora*) in apples. Proc. 7th Cong. Plant Protection Society of Serbia, EPRS and WPRS, Zlatibor, Serbia, (2015), 129–134.
144. MADR, Rapport préliminaire. Signalement du feu bactérien. Ministère de L'Agriculture et du Développement Rural. 01/DPVCT/2011-DZ, (2011), 2p.
145. INRA, Bilan de 10 ans d'essai de systèmes de culture en protection intégrée. INRA. www.essentielles.net. (2012).
146. López, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cambra, M., Roselló, M., Berra, D., Borrueal, M., Plaza, B., García, P., Palomo, J.L., Fire blight in Spain: situation and monitoring. *Acta Horticulturae*.489, (1999),187–191.
147. Malnoy, M., Chevreau, E., Brisset, M.N., Expression of a depolymerase gene in transgenic pears increased only slightly their fire blight resistance. *Acta Horticulturae*. 590, (2002), 401-405.
148. Genini, M., Feu bactérien en Valais: le point de la situation à fin 2012, Service cantonal de l'Agriculture, (2012), 10 p.
149. Brisset, M.N., Cesbron, S., Thomson, S.V., Paulin, J.P., Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *Eur J Plant Pathol* 106, (2000), 529-536.
150. Maxson-Stein, K., He S-Y, Hammerschmidt, R., Jones, A.L., Effect of Treating Apple Trees with Acibenzolar-S-Methyl on Fire Blight and Expression of Pathogenesis-Related Protein Genes. *Plant Disease*, Vol. 86 No. 7, (2002), 785-790.
151. Buban, T., Földes, L., Kormany, A., Hauptmann, S., Stammler, G., Rademacher, W., Prohexadione-Ca in apple trees: control of shoot growth and reduction of fire blight incidence in blossoms and shoots. *J Appl Botany* 77, (2003) 95-102.
152. Rademacher, W., Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51, (2000), 501-531.
153. Spinelli, F., Speakman, J.B., Rademacher, W., Halbwirth, H., Stich, K., Costa, G., Luteofolol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against *Erwinia amylovora* and other plant pathogens. *Eur J Plant Pathol*, 112, (2005),133-142.
154. Psallidas, P.G., Tsiantos, J., Epidemiology of Fire Blight. In: Vanneste JL, editor. Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. London: CAB International, (2000), 199–234.
155. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., Hanage, W.P., Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evolutionary Applications*, (2015), 240-247.
156. Gusberti, M., Urs, K., Matthias, S. Meier, Monika, M., Hunger-Glaser., Fire Blight Control: The Struggle Goes On. A Comparison of Different Fire Blight Control Methods in Switzerland with Respect to Biosafety, Efficacy and Durability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, (2015), 11422-11447.
157. Zhang, Y., Jock, S., Geider, K., Genes of *Erwinia amylovora* involved in yellow color formation and release of a low-molecular-weight compound during growth in the presence of copper ions. *Mol Gen Genet*, 264, (2000), 233–240.

158. Ruz, L., Improvement of strategies for the management of fire blight (*Erwinia amylovora*). Evaluation and optimization of physical and chemical control methods, and use of decision support systems. PhD thesis. Universitat de Girona, (2003), 166p.
159. Altieri, M. A., Nicholls, C. I. et Fritz, M. A., Manage insects on your farm: a guide to ecological strategies. Ed: Sustainable Agriculture Network, (2005), 119 p.
160. Pujol, M., Badosa, E., Manceau, C., Montesinos, E., Assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and real-time PCR methods. *Appl Environ Microbiol*, 72, (2006), 2421–2427.
161. Karfach, A., Isolement et identification de bactéries antagonistes contre *Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien des rosacées à pépins. Mémoire Master: Biotechnologie microbienne. Fès : Université Sidi Mohammed Abdellah, (2015), 63p.
162. Cabrefiga, J., France´s, J., Montesinos, E., Bonaterra, A., Nutritional enhancement combined with osmoadaptation improve fitness and efficacy of a fire blight biocontrol agent. *Appl Environ Microbiol* 77, (2011), 3174–3181.
163. De la Barrera, E., Nobel, P.S., Nectar properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends Plant Sci*, 9, (2004), 65-69.
164. Suty, L., 2010. La lutte biologique Ed. Quae. 323p.
165. Maurhofer, M., Reimann, C., Sacherer, S.P., Heeb, S., Haas, D., Defago, G., Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas yuorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88, (1998), 678-684.
166. Bholay, A. D., Jadhav Priyanka, U., Borkhataria, B. V., Mayuri, V. Dhalkari, Fluorescent Pseudomonads as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Their Siderophoregenesis. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPBS)*. 2278-3008 Vol 3, Issue 1, (2012), 27-32.
167. Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M., Plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol Agents. *Genet Mol Biol* 35, (2012), 1044–1051.
168. Miljakovi´c, D., Marinkovi´c, J., Baleševi´c-Tubi´, c. S., The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*. 8, (2020), 1037; 19 p.
169. Donatelli M., Magarey R.D., Bregaglio S., Willocquet L., Whish J.P., Savary S., Modelling the impacts of pests and diseases on agricultural systems. *Agric. Syst.* 155, (2017), 213–224.
170. Dewdney, M. M., Biggs, A. R., Turechek, W.W., A statistical comparison of the blossom blight forecasts of *MARYBLYT* and *Cougarblight* with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, 97, (2007), 1164-1176.
171. Cheverry, C., Robert, M., La dégradation des sols irrigués et de la ressource en eau : une menace pour l’avenir de l’agriculture et pour l’environnement des pays au sud de la Méditerranée. *Étud. Gestion Sols*, 5(4), (1998), 217-226.
172. Mutin, G., La Mitidja décolonisation est espèces géographique. Ed.O.P.U., Alger, (1977), 607p.
173. Semmoud, B., Ladhem, A., L’agriculture périurbaine face aux vulnérabilités foncières en Algérie. *Territoire en Mouvement* 26, (2015), 25-26. (En ligne) : <https://doi.org/10.4000/tem.2845>.
174. King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. and Med.*, 44, (1954), 301-307.

175. **Klos, E.J., Ishamru, C.**, New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* vol. 74, (1984), 1342-1345.
176. **Hildebrand, D.C., Schroth, M.N., Sands, D.C.**, *Pseudomonas*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Edited by N.W. Schaad. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN, (1988), 60-80.
177. **Suslow, T. V., Schroth, M. N., Isaka, M.**, Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, (1982), 917-918.
178. **Bourgault, A.M., Lamothe, F.**, Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology. *J. Clin. Microbiol.* 26, (1988), 2144-2146.
179. **Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C.**, Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, (1990), 568p.
180. **Dickey, R S., Zumoff, C. H.**, Emended description of *Enterobacter cancerogenus* comb. nov. (formerly *Erwinia cancerogenus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, (1988), 371-374.
181. **Hugh, R., Leifson, E.**, La signification taxonomique du métabolisme fermentatif versus oxydatif des glucides par diverses bactéries Gram négatives. *Journal of Bacteriology*, 66 (1), (1953), 24.
182. **Schaad, N.W.**, Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, Bacteriol. Commit. Amr. Phytopath. Soc. Minesota, (1988).
183. **Jones, AL., Geider, K.**, *Erwinia amylovora* group. In: Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. (eds). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. *APS Press*, St. Paul, MN, USA, (2001), 40-55.
184. **Oh, C.S., Kim, J.F., Beer, S.V.**, The Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection. *Mol. Plant Pathol.* 6, (2005), 125–138.
185. **Radunović, D., Gavrilović, V., Gašić, K., Paunović, M., Stojšin, V., Grahovac, M.**, Molecular characterization of *Erwinia amylovora* strains originated from pome fruit and indigenous plant in Montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 99, (2017), 197-203.
186. **Manceau, C., Horvais, A.**, Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, (1997), 498–505.
187. **Taylor, R.K., Guilford, P., Clark, R.G., Hal, C.N., Forster, R.L.S.**, Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29, (2001), 35–43.
188. **McManus, P.S., Jones, A.L.**, Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridizations. *Phytopathology* 85, (1993), 618– 23.
189. **McKinney, H.H.**, Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, vol 26, (1923), 195-217.
190. **Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., Samiyappan, R.**, Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*, 54, (2010), 83-89.
191. **OEPP/EPPO**, Erratum- EPPO Standard PM 7/100(1) Rep-PCR tests for identification of bacteria. *Bulletin OEPP/EPP Bulletin* 44 (1), (2014), 103–104.
192. **Hunter, P.R., Gaston, M.A.**, Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, (1988), 2465–2466.

193. 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. *Phytopathol. Mediterr* 55, 2, (2016), 184–196.
194. Long, H.H., Furuya, N., Kurose, D., Takeshita, M., Takanami, Y., Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their Antibacterial Activity against Plant Pathogenic Bacteria. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ*, 48, (2003), 21-28.
195. Stonier, T., *Agrobacterium tumefaciens* Conn II. Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology* 79, (1960), 889–898.
196. Moore, L.W., Kado, C.I. Bouzar, H., *Agrobacterium*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (N.W. Schaad, ed.), *APS Press*, St. Louis, MN, USA, (1988), 16–36.
197. Koch, A.L., Growth measurement. In: P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow et al. (Editors) Manual of Methods for General Bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington, DC, (1981), 179-207.
198. Ohike, T., Matsukawa, T., Okanami, M., Kajiyama, S-i., Ano, T., *In vitro* and *in vivo* assay for assessment of the biological control potential of *Streptomyces* sp. KT. *J of Plant Studies*, 7(1), (2018), 1 – 18.
199. Kumar, S., Aharwal, R.P., Shukla, H., Rajak, R.C., Sandhu, S.S., Endophytic fungi: as a source of antimicrobials bioactive compounds. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 3, (2014), 1179–1197.
200. Rafique, M., Hayat, K., Mukhtar, T, Amna Khan, A.A., Afridi, M.S., Hussain, T., Sultan, T., Munis, M.F.H., Imran, M., Chaudhary, H.J., Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (A. Méndez-Vilas, Ed.), (2015), 373-382.
201. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M., A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40,(2000), 175 –179.
202. Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M., Lelie, D.V.D., Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6), (2002), 583–606.
203. Meyer, J.M., Abdallah, M.A., The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107, (1978), 319-328
204. Rachid, D., Bensoltane, A., Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.* 4, (2005), 697-702.
205. Neilands, J.B., Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry* 50, (1981), 715- 731.
206. Jalal, M.A.F., Vander Helm, D., Isolation and spectroscopic identification of fungal siderophores. In: Handbook of microbial iron chelates. Winklemann, G. (ed.), *Pegamon Press*, Oxford, (1990), 235-269.
207. Tailor, A.J., Joshi, H.B., Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. *J. Environ. Res. Dev.* 6, (2012), 688-694.
208. Glick, B R., Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Ed, *Springer*, Heidelberg, (2015), 243 p.
209. Nielsen, C.J., Ferrin, D.M., Stanghellini, M.E., Efficacy of biosurfactants in the management of *Phytophthora capsici* on pepper in recirculating hydroponic systems. *Can J Plant Pathol*, 28, (2006), 450– 460.

210. Bunster, L., Fokkema, N J., Schippers, B., Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Appl Environ Microbiol* 55, (1989), 1340–1345.
211. Harshey, RM., Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol*, 57, (2003), 249-273.
212. Déziel, E., Comeau, Y., Villemur, R., Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with the emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. *J. Bacteriol*, 183, (2001), 1195–1204.
213. Selvakumar, G., Kundu, S., Piyush, Joshi., Sehar Nazim., Gupta ,A. D., Gupta, H.S., Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas. *Indian J Microbiol*, 50, (2010), 50–56.
214. Baxter, I.A., Lambert ,P.A., Isolation and partial purification of a carbapenem-hydrolysing metallo- β -lactamase from *Pseudomonas cepacia*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 122, Issue 3, (October 1994), 251–256, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07176.x>.
215. Margesin, R., Schinner, F., Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, (2001), 73-83.
216. Moreno, M.DL., Pérez, D., Garcia, M.T., Mellado, E., Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life* 3, (2013), 38-51.
217. Manjunatha, B.S., A.D. Asha, N. Nivetha, Bandeppa, V. Govindasamy, M.S. Rathi Sangeeta Paul., Evaluation of Endophytic Bacteria for their Influence on Plant Growth and Seed Germination under Water Stress Conditions. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(11), (2017), 4061-4067.
218. Miller, H.J., *Erwinia amylovora* detection and its significance in survival studies. *Acta Horticulturae*, 151, (1984), 63-66.
219. Feodorova, V.A., Samelija, J.G., Devdariani, Z.L., Heat-stable serogroup-specific proteins of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Microbiol. Methods*, 52, (2003), 389–395.
220. Simpson, E. H., Measurement of diversity *Nature*, 163(4148), (1949), 688.
221. Pusey, P., Curry, E.A., Temperature and Pomaceous Flower Age Related to Colonization by *Erwinia amylovora* and Antagonists. *Phytopathology*, 94, (2004), 901-11.
222. Thomson, S.V., Epidemiology of fire blight, 9-36. In: Vanneste, J.L. (Ed.). Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing. Wallingford. UK, (2000).
223. Granatstein, D., Smith, T., Peck, G., The role of tree genetics in controlling fire blight in apples and pears. Organic tree fruit industry work group paper, (2011), (En ligne) : <http://www.tfrec.wsu.edu/pdfs/P2396.pdf>.
224. Shemshura, O.N., Shemsheyeva, Zh.N., Sadanov, A.K., Alimzhanova, M.B., Daugaliyeva, S.T., Mombekova, G.A., Rakhmetova, Zh.K., Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Chryseobacterium rhizoplanae* isolated from *Vigna radiata*. *Eco. Env. & Cons*, 25 (2), (2020), 807-812.
225. Radunovic´, D., Gavrilovic´, V., Gašic´, K., Krstic´, M., Monitoring of *Erwinia amylovora* in Montenegro. *Pesticides and Phytomedicine*, 30, (2015), 179-185.
226. Végh, A., Hevesi, M., Pájtli, É., Palkovics, L., Characterization of *Erwinia amylovora* strains from Hungary. *Eur J Plant Pathol*, 147(2), (2016), Doi : 10.1007/s10658-016-1001-z.
227. Shoeib, A., Ashmawy, N., Hammad, S., Hafez, E., Molecular and Biological Identification of *Erwinia amylovora* Egyptian Isolates Compared with Other German Strains. *J Plant Physiol Pathol*, 05, (2017), (En ligne) : <https://doi.org/10.4172/2329-955x.1000156>

228. Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., van Amerongen, A., Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*, 393(2), (2009), 569-82.
229. Ameer, A., Ennaji, M.M., Cesbron, S., Manceau, C., Rhallabi, N., Achbani, E., Characterization of Moroccan Population of *Erwinia Amylovora*, the Causal Agent of Fire Blight on Rosaceous. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 4, (2014), 200-203.
230. Amein, T.A.M., Mohamed, R.Y., Hussein, A.N., Investigation and Detection of Fire Blight Disease on Pear Caused by *Erwinia amylovora* in Erbil Province, (2020), 2019-2041.
231. Kabadjova-Hristova, P., Atanasova, I., Dousset, X., Moncheva, P., Multiplex PCR Assay for Identification of *Erwinia amylovora* - The Causative Agent of Fire Blight. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 20/2006/3, (2014), 21-25
232. Ammouneh, H, Arabi, M. I. E., Al-Daoude, A., The first record and distribution of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Syria. *Australasian Plant Pathology*, 37, (2019), 1–4.
233. Laurent, J., Barny, MA., Kotoujansky, A., Dufriche, P., Vanneste, J.L., Characterization of an ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 2, (1989), 160–164.
234. Chiang, K.S., Liu, H.I., Bock, C.H. X., A discussion on disease severity index values. Part I: warning on inherent errors and suggestions to maximise accuracy. *Annals of Applied Biology*, (1998), 1-16.
235. Getachew, G., Tesfaye, A., Kassahun, T., Evaluation of disease incidence and severity and yield loss of finger millet varieties and mycelial growth inhibition of *Pyricularia grisea* isolates using biological antagonists and fungicides in vitro condition. *J. Appl. Biosci*, 73, (2014), 5883– 5901.
236. Rico, A., Ortiz-Barredo, A., Ritter, E., Murillo, J., Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology*, 96, (2004), 302-310.
237. Rico, A., Führer, M.E., Ortiz-Barredo, A., Murillo, J., Polymerase chain reaction fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a limited phylogenetic value but allows the design of highly specific molecular markers. *Phytopathology*, 98, (2008), 260-269.
238. Barionovi, D., Giorgi, S., Stoeger, A., Ruppitsch, W., Scortichini, M., Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. *J Appl Microbiol*, 100, (2006), 1084-1094.
239. Jones, N., Ougham, H., Thomas, H., Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist*, 137, (1997), 165-177.
240. Puławska, J., Kielak, K., Sobiczewski, P., Phenotypic and genetic diversity of selected Polish *Erwinia amylovora* strains. *Acta Horticulturae*, 704, (2006), 439–444.
241. Obradovic, D., Balaz, J., Kevresan, S., Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Microbiology*, 76, (2007), 748–756. doi:10.1134/ S002626170706015X.
242. Ivanović, M., Minsavage, G., Jones, J., Gašić, K., Gavrilović, V., Balaž, J., Obradović, A., Grouping of *Erwinia amylovora* strains from Serbia and Montenegro based on PFGE. In: Book of abstracts 12th international workshop on fire blight, Warsaw, Poland, (2010), 16–20.
243. Ivanović, M., Obradović, A., Gašić, K., Minsavage, G.V., Dickstein, E.R., Jones, J.B., Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. *European Journal of Plant Pathology*, 133, (2012), 545-557.

244. Radunović, D., Gavrilović, V., Gašić, K., Paunović, M., Stojšin, V., Grahovac, M., Molecular characterization of *Erwinia amylovora* strains originated from pome fruit and indigenous plant in Montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 99, (2017), 197-203.
245. Jones, A.L., Schnabel, E.L., The development of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste J.L. (ed.). Fire blight: The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, (2000), 235-251. CABI Publishing, Wallingford, UK.
246. Janse, J.D., *Phytopathology - Principles and Practice*. CABI Publishing, UK, (2006).
247. Alnaasan, Y., Hyperspectral discrimination of fire blight infection in apple and pear, and molecular typing of some mediterranean isolates of its causal agent *Erwinia amylovora*. Department of Agriculture, Forestry, Nature, Energy Science and Technology (DAFNE). *Thèse Doctorat*, (2015), 132p.
248. Alnaasan, Y., Valentini, F., Balestra, GM., Mazzaglia, A., D'Onghia, AM., Varvaro, L., Modification of a multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing isolates of *Erwinia amylovora*. *Plant Pathol*, 66, (2017), 1075–1080. 10.1111/ppa.12660.
249. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya, S.V., Anisimov, A.P., Yang, R., Vergnaud, G., Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS ONE* 4(6): e6000, (2009), 1-9.
250. Cabrefiga, J., Montesinos, E., Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology*, 95, (2005), 1430-1437
251. Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S., Beer, S.V., Virulence of *Erwinia amylovora* strains to *Malus* sp. Novole plants grown *in vitro* and in the greenhouse. *Phytopathology*, 78, (1988), 1292-1297.
252. Ülke, G., Çınar, Ö., Biological control studies on fire blight caused by *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. *Acta Horticulturae*, 489, (1999), 611–614.
253. Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Berczynski, S., Selection of bacteria from epiphytic populations on apple trees and soil environment for ability to control fire blight (*Erwinia amylovora*). *Phytopathol Polonica*, 47, (2008), 43–55.
254. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S-W., Sa, T-M., *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanolutilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, (2010), 2490–2495.
255. Chen, X., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mogel, G., Kunz, S., Borriss, R., Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol*, 140, (2009), 38-44.
256. Yuan, J., Li B., Zhang, N., Waseem, R., Shen, Q., Huang, Q., Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. *J. Agric. Food Chem*, 60, (2012), 2976–2981.
257. Zhang, S., Wang, Y., Meng, L., Li, J., Zhao, X., Cao, X., Chen, X., Wang, A., Li, J., Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *African J Microbiol Res*, 6, (2012), 1747–1755.
258. Daryaei, H., Balasubramaniam, V., Yousef, A., Legan, J., Tay, A., Lethality enhancement of pressure-assisted thermal processing against *Bacillus amyloliquefaciens* spores in low-acid media using antimicrobial compounds. *Food Control* 59, (2015), 234–242.
259. Beris, D.; Theologidis, I.; Skandalis, N.; Vassilakos, N., *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus Y. *Sci. Rep*, 8, (2018), 10320.

260. Gerami, E., Hassanzadeh, N., Abdollahi, H., Ghasemi, A., Heydari A., Evaluation of some bacterial antagonists for biological control of fire blight disease. *Journal of Plant Pathology*, 95, (2013), 127–134.
261. Temple, T. N., Stockwell, V. O., Loper, J.E., Johnson, K.B., Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* strain A506 on flowers of pear and apple. *Phytopathology*, 94, (2004), 1286-1294.
262. Mikiciński, A., Puławska, J., Sobiczewski, P., Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Eur J Plant Pathol*, 156, (2020), 257–272.
263. Galasso, O., Sponza, G., Bazzi, C., Vanneste, J. L., Characterisation of two fluorescent strains of *Pseudomonas* as biocontrol agents against fire blight. *Acta Horticulturae*, 590, (2002), 299–307.
264. Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Loper, J.E., Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. *Phytopathology*, 88, (1998), 506-513.
265. Pusey, P.L., Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. *Plant Dis*, 86, (2002), 639-644
266. Whipps, J.M., Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot*, 52, (2001), 487–511.
267. Duffy, B.K., Défago, G., Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, (1999), 2429–2438.
268. Lindow, S.E. ., Suslow, T.V., Temporal Dynamics of the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* Strain A506 in Flowers in Inoculated Pear Trees. *The American Phytopathological Society*, Vol. 93, No. 6, (2003), 727- 737.
269. Wilson, M., Lindow, S.E., Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 and *Erwinia amylovora* in pear flowers. *Phytopathol* 83, (1993), 117-123.
270. Anderson, L. M., Stockwell, V. O., Loper, J. E., An extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* inactivates antibiotics of *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology*, 94, (2004),1228-1234.
271. Liu, X., Germaine, K.J., Ryan, D., Dowling, D.N., Whole-cell fluorescent biosensors for bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Sensors*, 2, (2010), 1377–1398. doi: 10.3390/s100201377.
272. Ongena, M., Jacques, P., *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*, 16, (2008), 115–125.
273. Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., Ongena, M., The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defense responses. *Cell Microbiol*, 13, (2011), 1824-1837.
274. Bais, H. P., Fall, R., Vivanco, J. M., Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol*, 134, (2004), 307–319.
275. Wang, K., Yan, J., Chen, R., Dang, W., Zhang, B., Zhang, W., Song, J., Wang, R., Membrane-active action mode of *Polybia*-CP, a novel antimicrobial peptide isolated from the venom of *Polybia paulista*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(6), (2012), 3318–3323.
276. Djellout, H., Raio, A., Boutoumi, H., Krimi, Z., *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. strains induce a response in phenolic profile and enhance biosynthesis of antioxidant enzymes in *Agrobacterium tumefaciens* infected tomato plants. *Eur J Plant Pathol*,(2020), 157.

277. Loewen, P.C., Switala, J., Fernando, W.G.D., de Kievit, T., Genome Sequence of *Pseudomonas brassicacearum* DF41. *Genome Announc*, 2(3), (2014), e00390-14.
278. Novinscak, A., Gadkar, V.J., Joly, D.L., Filion, M., Complete Genome Sequence of *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300, a Disease-Suppressive Bacterium with Antagonistic Activity toward Fungal, Oomycete, and Bacterial Plant Pathogens. *Genome Announcements*, 4(1), (2016), e01623-15:1-2.
279. Davey, M.E., O'Toole, G.A., Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, (2000), 847–867.
280. Santos, S., Neto, I.F.F., Machado, M.D., Soares, H.M., Soares, E.V., Siderophore Production by *Bacillus megaterium*: Effect of Growth Phase and Cultural Conditions. *Appl Biochem Biotechnol*, 172, (2014), 549–560
281. Yu, S., Teng, C., Bai, Liang, J., Song, T., Dong, L., Jin, Y., Qu, J., Optimization of Siderophore Production by *Bacillus* sp. PZ-1 and Its Potential Enhancement of Phytoextraction of Pb from Soil. *J. Microbiol. Biotechnol*, 27(8), (2017), 1500–1512.
282. Linget, C., Slylianou, D.G., Dell, A., Wolff, R.E., Piemont, Y., Abdallah, M.A., Bacterial siderophores: the structure of a desferriferribactin produced by *P. fluorescens* ATCC 13525. *Tetrahedron Lett.* 33, (1992), 3851e3854.
283. Sasirekha, B., Srividya, S., Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*, 50, (2016), 250-256.
284. Kraus, J., Loper, J.E., Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol*, 61, (1995), 849–854.
285. Raaijmakers, J., de Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 34, (2010), 1037–1062.
286. Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Ullah, M.A., Sessitsch, A., Hafeez, F.Y., Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *13(6):e0198107*, (2018), 1-15p.
287. Burch, A., Shimada, B., Browne, P., Lindow, S., Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl Environ Microbiol*, 76, (2010), 5363–5372.
288. Akit, J., Cooper, D. G., Mannien, K. I., Zajic, J. E., Investigation of potential biosurfactant production among phytopathogenic Corynebacteria and related microbes. *Curr. Microbiol*, 6, (1981), 145-150.
289. Kearns, D. B., Losick R., Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol*, 49, (2003), 581–590.
290. Rashid, M. H., Kornberg, A., Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (97), (2000), 4885–4890.
291. Latorre, J.D., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, R.E., Vicente, J.L., Wolfenden, A.D., Menconi, A., Bielke, L.R., Hargis, B.M., Tellez, G., Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Front. Vet. Sci*, 3, (2016), 95. doi: 10.3389/fvets.2016.00095.
292. Awais, M., Ali shah, A., Abdul, H., Hasan, F., Isolation, identification and optimization of *Bacillus* sp. *Pak J Bot*, 39, (2007), 1303-1312.

- 293. Paul, D., Nair, S.,** Stress adaptations in a Plant Growth Promoting *Rhizobacterium* (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *Journal of basic microbiology*, 48, (2008), 378-84.
- 294. Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R.,** Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 42, (2004), 565–572.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Composition de milieu King B pour formuler 1 L d'eau distillée [174].

| | |
|----------------------------------------|-------|
| Protéose-peptone No. 3..... | 20 g |
| Glycérol..... | 10 ml |
| Phosphate de potassium dibasique..... | 1,5 g |
| Sulfate de magnésium heptahydraté..... | 1,5 g |
| Agar bactériologique..... | 15 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

pH =7-7,2

Annexe 2 : Composition de milieu Levane pour formuler 1L d'eau distillée [182].

| | |
|---------------------------------|------|
| Extrait de levure | 2 g |
| Bactopeptone | 5 g |
| Saccharose..... | 50 g |
| Chlorure de sodium (NaCl) | 5 g |
| Agar bactériologique..... | 20 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

pH =7-7,2

Annexe 3 : Composition du milieu LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) pour formuler 1L d'eau distillée [182].

| | |
|---------------------------|------|
| Extrait de levure | 8 g |
| Bactopeptone | 8 g |
| Glucose..... | 5 g |
| Agar bactériologique..... | 20 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

pH =7-7,2

Annexe 4 : Composition du milieu LB (Luria-Bertani) pour formuler 1L d'eau distillée [182].

| | |
|---------------------------------|------|
| Extrait de levure | 5 g |
| Tryptone | 10 g |
| Chlorure de sodium (NaCl) | 10 g |
| Agar bactériologique..... | 20 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

pH =7-7,2

Annexe 5 : Composition du milieu tryptone gélosé [212].

| | |
|---------------------------------|------|
| Peptone | 5 g |
| Tryptone | 15 g |
| Chlorure de sodium (NaCl) | 5 g |
| Agar bactériologique..... | 20 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

pH =7-7,2

Annexe 6 : Composition du milieu Indole [182].

| | |
|--------------------|------|
| Peptone..... | 20 g |
| NaCl..... | 5 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

pH =7-7,2

Annexe 7 : Composition du milieu Hugh et Leifson [181].

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Bactotryptone..... | 2 g |
| Phosphate de potassium dibasique..... | 0,3 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Bleu de bromothymol..... | 0,03 g |
| D(+)-glucose..... | 10 g |
| Agar bactériologique..... | 0,3 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

Annexe 8 : Composition du milieu liquide 523 [182].

| | |
|----------------------------------------|-------|
| Saccharose | 10 g |
| Caséine..... | 8 g |
| Extrait de levure..... | 4 g |
| Phosphate de potassium dibasique..... | 2 g |
| Sulfate de magnésium heptahydraté..... | 0.3 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

Annexe 9 : Composition du bouillon transformation de sucrose en substances réductrices [182].

| | |
|----------------------|------|
| Sucrose | 40 g |
| Peptone..... | 10 g |
| Extrait de bœuf..... | 5 g |
| Eau distillée..... | 1 L |

Annexe 10 : Valeurs moyennes des zones d'inhibition en (mm) des souches endophytes vis-à-vis les deux souches phytopathogènes d'*Erwinia amylovora*.

| Endophytes | Diamètre de zone Inhibition (mm) | |
|------------|----------------------------------|----|
| | E1 | E5 |
| EHR1 | 22 | 23 |
| EPS1 | 46 | 50 |
| OR1 | 30 | 28 |
| OR2 | 50 | 47 |
| PF1 | 22 | 23 |
| PF3 | 53 | 50 |
| OS2 | 25 | 30 |
| OS1 | 23 | 23 |
| CR1 | 18 | 19 |
| EPF1 | 20 | 25 |
| EHF5 | 45 | 45 |
| EHF3 | 23 | 20 |
| CR2 | 24 | 23 |
| EPR3 | 20 | 20 |
| EPS3 | 20 | 25 |
| OS3 | 30 | 30 |
| CS1 | 23 | 24 |
| OPR3 | 24 | 23 |
| OS4 | 45 | 45 |
| PS1 | 27 | 25 |

Annexe 11 : Coordonnées géographiques des sites de prospections des vergers présentant les symptômes du feu bactérien (N : Nord, E : Est)

| N° | Année de prospection | Degrés d'infection | Région d'origine | Lieu d'origine | Cordonnées GPS/Nom du verger | Hôte | Variété |
|----|----------------------|--------------------|------------------|----------------|----------------------------------------------------|------------|------------------|
| 1 | 2011 | 75% | Blida | Chiffa | Latitude :36° 27.775 N ; longitude :2° 34.403 E | poirier | Santa Maria |
| 2 | 2011 | 75% | Blida | Chiffa | Latitude :36°27'46.89 N longitude :2°45'05.63 E | poirier | Santa Maria |
| 3 | 2011 | 75% | Blida | Mouzaïa | Latitude :36° 32.123 N ; longitude 2° 40.620 E | poirier | Santa Maria |
| 4 | 2011 | 75% | Tipaza | Attatba | Latitude :36° 33.502 N ; longitude :2° 40.718 E | poirier | Santa Maria |
| 5 | 2012 | 75% | Blida | Boufarik | EAC BEN SALEH | poirier | Santa Maria |
| 6 | 2012 | 75% | Blida | Boufarik | EAC SOUIDANI | poirier | Santa Maria |
| 7 | 2012 | 75% | Blida | Boufarik | Propriété Benali 1 | poirier | Santa Maria |
| 8 | 2012 | 75% | Blida | Boufarik | Propriété Benali 2 | poirier | Santa Maria |
| 9 | 2012 | 75% | Blida | Oued El Alleug | EAC N°04 Kada Aissa | poirier | Santa Maria |
| 10 | 2012 | 75% | Blida | Oued El Alleug | Propriété Sidi Yahia | poirier | Santa Maria |
| 11 | 2012 | 75% | Blida | Oued El Alleug | Propriété Moussa Messaoud Taieb1 | poirier | Santa Maria |
| 12 | 2012 | 75% | Blida | Oued El Alleug | Propriété Moussa Messaoud Taieb2 | poirier | Santa Maria |
| 13 | 2012 | 75% | Blida | Oued El Alleug | Propriété Moussa Messaoud Taieb3 | poirier | Santa Maria |
| 14 | 2013 | 75% | Blida | Chiffa | Propriété BEN ALLAL 1 | poirier | Santa Maria |
| 15 | 2013 | 75% | Blida | Chiffa | Propriété BEN ALLAL2 | poirier | Santa Maria |
| 16 | 2013 | 75% | Blida | Chiffa | EAC N°3 frères BOUDISSA | poirier | Santa Maria |
| 17 | 2013 | 75% | Blida | Mouzaïa | EAC Aiddat | poirier | Santa Maria |
| 18 | 2013 | 75% | Blida | Mouzaïa | Propriété BEN BRAHIM | poirier | Santa Maria |
| 19 | 2013 | 40% | Tipaza | Attatba | Propriété DJIBLI | Pommier | Golden Délicious |
| 20 | 2014 | 75% | Blida | Oued El Alleug | Latitude:36°32'13.32"N, longitude:2°45'42.49"E | poirier | Santa Maria |
| 21 | 2014 | 75% | Blida | Bensalah | latitude: 36°33'52.72"N , longitude: 2°48'46.08"E | poirier | Santa Maria |
| 22 | 2014 | 75% | Blida | Bensalah | latitude:36°33'55.56"N , longitude:2°48'44.42"E | poirier | Santa Maria |
| 23 | 2014 | 75% | Blida | Sidi Yahia | latitude:36°34'39.06"N, longitude:2°47'3.94"E | poirier | Santa Maria |
| 24 | 2014 | 75% | Blida | Sidi Yahia | latitude:36°34'34.35"N, longitude:2°47'0.72"E | poirier | Santa Maria |
| 25 | 2014 | 75% | Alger | Birtouta | latitude:36°37'40.39"N, longitude: 3° 0'13.42"E | poirier | Santa Maria |
| 26 | 2014 | 75% | Alger | Birtouta | latitude:36°37'52.10"N, longitude:3° 0'16.21"E | poirier | Santa Maria |
| 27 | 2014 | 75% | Alger | Tessala | latitude:36°38'7.00"N, longitude:2°52'29.75"E | poirier | Santa Maria |
| 28 | 2015 | 75% | Tipaza | Attatba1 | Latitude :36°34'10.18 N ; longitude : 2°40'36.86 E | poirier | Santa Maria |
| 29 | 2015 | 75% | Tipaza | Attatba2 | Latitude :36°34'10.18 N; longitude :2°40'36.86 E | poirier | Santa Maria |
| 30 | 2015 | 40% | Médéa | El hamdnia | Latitude :36°18'26.60 N ; longitude : 2°48'10.53 E | cognassier | |
| 31 | 2015 | 40% | Médéa | El hamdnia | frères Mazouz | cognassier | |
| 32 | 2015 | 75% | Médéa | Ouzera | Latitude :36°15'45.69 N ; longitude : 2°48'14.46 E | poirier | Santa Maria |

| | | | | | | | |
|----|------|---------|------------|--------------------|-------------------------------------------------------|---------|---------------------|
| 33 | 2015 | 40% | Médéa | Ouzera | Latitude :36°15'45.69 N ; longitude : 2°48'14.46 E | Pommier | Golden Délucious |
| 34 | 2015 | 75% | Tipaza | Attatba3 | Latitude :36°34'10.18 N ; longitude :2°40'36.86 E | poirier | Santa Maria |
| 35 | 2015 | 75% | Tipaza | Aattatba4 | Latitude :36°34'10.18 N ; longitude : 2°40'36.86 E | poirier | Santa Maria |
| 36 | 2015 | 75% | Tipaza | Sidi Rached | Latitude :36°33'26.70 N ; longitude : 2°31'07.75 E | poirier | Santa Maria |
| 37 | 2015 | 75% | Blida | Mouzaia | Latitude :36°26'49.75 N ; longitude : 2°40'19.71 E | poirier | Santa Maria |
| 38 | 2017 | 65- 70% | Médéa | Kefaifi | Latitude :36°12'30.69 N ; longitude : 2°54'42.17 E | poirier | Santa Maria |
| 39 | 2017 | 65- 70% | Blida | L'Arbaa | Latitude :36°35'45.88 N ; longitude : 3°10'53.59 E | poirier | Santa Maria |
| 40 | 2017 | 65- 70% | Blida | L'Arbaa | Latitude :36°38'1.47 N ; longitude : 3° 9'2.67 E | poirier | Santa Maria |
| 41 | 2017 | 65- 70% | Blida | L'Arbaa | Latitude :36°35'48.55 N ; longitude : 3°10'13.93 E | poirier | Santa Maria |
| 42 | 2017 | 65- 70% | Blida | L'Arbaa | Latitude :36°38'19.50 N ; longitude : 3°11'5.25 E | pommier | Golden Délucious |
| 43 | 2017 | 60% | Bouira | Lakhdaria | Latitude :36°55'98.10 N ; longitude : 3°61'00.23 E | poirier | Santa Maria |
| 44 | 2017 | 60% | Bouira | Lakhdaria | Latitude :36 56 45 36 N ; longitude : 3 61 03 04 E | poirier | Santa Maria |
| 45 | 2017 | 60% | Bouira | M'chedallah | Latitude :36 35 99 37 N ; longitude : 4 28 03 34 E | poirier | Santa Maria |
| 46 | 2017 | 60% | Bouira | Hachimia | Latitude :36°24'67.89 N ; longitude : 3°84'26.19 E | poirier | Santa Maria |
| 47 | 2017 | 60% | Bouira | Hachimia | Latitude :36 24 96 70 N ; longitude : 3 83 88 45 E | poirier | Santa Maria |
| 48 | 2017 | 60% | Bouira | Hachimia | Latitude :36 14 50 68 N ; longitude : 3 50 46 51 E | poirier | Santa Maria |
| 49 | 2017 | 60% | Bouira | Hachimia | Latitude :36 14 15 73 N ; longitude : 3 50 41 71 E | poirier | Santa Maria |
| 50 | 2017 | 60% | Bouira | hachimia | Latitude :36 15 05 49 N ; longitude : 3 50 10 22 E | poirier | Santa Maria |
| 51 | 2017 | 60% | Bouira | M'chedalla | Latitude :36°35'99.37 N ; longitude : 4°28'03.34 E | poirier | Santa Maria |
| 52 | 2017 | 60% | Bouira | Ait laziz | Latitude :36 25 28 86 N ; longitude : 3 53 57 81 E | poirier | Santa Maria |
| 53 | 2017 | 60% | Bouira | Ain bessam | Latitude :36 11 57 48 N ; longitude : 3 45 11 18 E | poirier | Santa Maria |
| 54 | 2017 | 70% | Boumerdes | Hammedi | Latitude :36°66'75.23 N ; longitude : 3°27'54.70 E | poirier | Santa Maria |
| 55 | 2017 | 70% | Boumerdes | Boudouaou. | Latitude :36 37 75 85 N ; longitude : 3 41 19 33 E | poirier | Santa Maria |
| 56 | 2017 | 70% | Boumerdes | Boudouaou | Latitude :36 44 32 51 N ; longitude : 3 24 42 76 E | poirier | Santa Maria |
| 57 | 2017 | 70% | Boumerdes | Corso | Latitude :36 72 43 25 N ; longitude : 3 46 12 29 E | poirier | Santa Maria |
| 58 | 2017 | 70% | Boumerdes | Tidjelabine | Latitude :36 44 09 04 N ; longitude : 3 27 17 38 E | poirier | Santa Maria |
| 59 | 2017 | 70% | Boumerdes | Tidjelabine | Latitude :36 43 15 37 N ; longitude : 3 28 15 45 E | poirier | Santa Maria |
| 60 | 2017 | 60% | Tizi Ouzou | Draâ Ben Khedda | Latitude :36°43'40.06 N ; longitude : 3°59'00.22 E | poirier | Santa Maria |
| 61 | 2017 | 60% | Tizi Ouzou | Oued Falli | Latitude :36°43'34.83 N ; longitude : 3°59'39.38 E | poirier | Santa Maria |
| 62 | 2017 | 60% | Tizi Ouzou | Tizi Ouzou | Latitude :36°46'06.27 N ; longitude : 3°53'53.96 E | poirier | Santa Maria |
| 63 | 2017 | 40% | Tizi Ouzou | Draâ Ben Khedda | Latitude :36 44 30 40 N ; longitude : 3 57 56 36 E | pommier | Golden Délucious |
| 64 | 2017 | 60% | Tizi Ouzou | Tassadorte | Latitude :36 41 47 49 N ; longitude : 4 00 44 90 E | poirier | Santa Maria |
| 65 | 2017 | 65- 70% | Médéa | Médéa | Latitude :36°11'50.79 N ; longitude : 2°31'44.55 E | poirier | Santa Maria |

| | | | | | | | |
|----|------|---------|--------|-------------|-------------------------------------------------------|------------|----------------------|
| 66 | 2017 | 65- 70% | Médéa | Médéa | Latitude :36°12'2.89 N ; longitude : 2°31'31.58 E | poirier | Santa Maria |
| 67 | 2017 | 65- 70% | Médéa | Médéa | Latitude :36°13'26.37 N ; longitude : 2°38'1.96 E | poirier | Santa Maria |
| 68 | 2017 | 40% | Médéa | Médéa | Latitude :36°12'25.45 N ; longitude : 2°54'45.00 E | pommier | Golden Délucious |
| 69 | 2017 | 40% | Médéa | Médéa | Latitude :36°12'30.69 N ; longitude : 2°54'42.17 E | cognassier | Géant du Portugal |
| 70 | 2018 | 60% | Bouira | M'chadallah | Propriété Dauba | poirier | Santa Maria |
| 71 | 2018 | 60% | Bouira | M'echdallah | Propriété Thamourth n zitoune | poirier | Santa Maria |
| 72 | 2018 | 60% | Bouira | Lakhdharia | Propriété Oued Elmahdia 1 | poirier | Santa Maria |
| 73 | 2018 | 60% | Bouira | Lakhdharia | Propriété Oued Elmahdia 2 | poirier | Santa Maria |

Annexe 12 : Moyennes de la densité optique du test production de sidérophores sur succinate

| Souches | Succinate 400 nm sans FeCl ₃ | Succinate 430 nm avec FeCl ₃ (hydroxamates) | Succinate 490 nm avec FeCl ₃ (catecholates) |
|---------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| CR2 | 0,785 | 0,083 | 0,06 |
| PS1 | 1,989 | 0,136 | 0,17 |
| EHF5 | 0,278 | 0,163 | 0,024 |
| PF3 | 1,02 | 0,038 | 0,065 |
| Témoin | 0 | 0 | 0 |

Annexe 13 : Moyennes de la densité optique du test production de sidérophores sur king B

| Souches | KB 400 nm sans FeCl ₃ | KB 430 nm avec FeCl ₃ (hydroxamates) | KB 490 nm avec FeCl ₃ (catecholates) |
|---------|----------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| CR2 | 1,145 | 0,155 | 1,135 |
| PS1 | 1,45 | 1,293 | 0,386 |
| EHF5 | 1,969 | 0,485 | 0,358 |
| PF3 | 0,394 | 0,236 | 1,128 |
| Témoin | 0 | 0 | 0 |

Annexe 14 : Moyenne de la taille de demi diamètre de motilité de type swimming (cm)

| | EHF5 | PF3 | CR2 | PS1 | <i>P.chlororaphis</i> | <i>E.coli</i> |
|-----|------|-----|------|-----|-----------------------|---------------|
| 24h | 0 | 0,1 | 0,82 | 1 | 2,36 | 0,1 |
| 48h | 2,7 | 2,5 | 1,6 | 1,9 | 3,62 | 0,1 |

Annexe 15 : Moyenne de la taille de demi diamètre de motilité de type swarming (cm)

| | EHF5 | PF3 | CR2 | PS1 | <i>P.chlororaphis</i> | <i>E.coli</i> |
|-----|------|-----|-----|------|-----------------------|---------------|
| 24h | 0,6 | 0,4 | 0,1 | 0,15 | 2,9 | 0 |
| 48h | 4,5 | 4,5 | 0,2 | 0,2 | 4 | 0 |

Annexe 16 : Test d'osmolarité (moyennes de densité optique) des souches antagonistes

| Souche | PEG 0% | PEG 20% | PEG 40% | PEG 60% |
|--------|--------|---------|---------|---------|
| PS1 | 1,923 | 0,280 | 0,109 | 0,041 |
| CR2 | 1,819 | 0,279 | 0,293 | 0,058 |
| EHF5 | 1,406 | 0,350 | 0,096 | 0,027 |
| PF3 | 1,705 | 0,445 | 0,078 | 0,033 |
| Témoin | 1,001 | 0,223 | 0,062 | 0,050 |

Annexe 17 : Résultats du test de biofilm (DO : densité optique)

| Souche antagoniste | Temps | DO | Souche antagoniste | Temps | DO |
|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|
| PF3 | 3h | 0,749 | EHF5 | 3h | 0,304 |
| PF3 | 3h | 0,466 | EHF5 | 3h | 0,320 |
| PF3 | 3h | 0,435 | EHF5 | 3h | 0,352 |
| PF3 | 5h | 0,301 | EHF5 | 5h | 0,449 |
| PF3 | 5h | 0,624 | EHF5 | 5h | 0,375 |
| PF3 | 5h | 0,412 | EHF5 | 5h | 0,211 |
| PF3 | 20h | 0,367 | EHF5 | 20h | 0,838 |
| PF3 | 20h | 0,510 | EHF5 | 20h | 0,85 |
| PF3 | 20h | 0,345 | EHF5 | 20h | 1,004 |
| CR2 | 3h | 0,635 | PS1 | 3h | 1,162 |
| CR2 | 3h | 0,630 | PS1 | 3h | 0,425 |
| CR2 | 3h | 0,985 | PS1 | 3h | 0,457 |
| CR2 | 5h | 0,480 | PS1 | 5h | 0,583 |
| CR2 | 5h | 0,580 | PS1 | 5h | 0,441 |
| CR2 | 5h | 0,497 | PS1 | 5h | 0,409 |
| CR2 | 20h | 1,150 | PS1 | 20h | 1,285 |
| CR2 | 20h | 1,570 | PS1 | 20h | 0,71 |
| CR2 | 20h | 1,561 | PS1 | 20h | 0,917 |

Annexe 18 : Résultats du test d'osmolarité (DO : densité optique)

| Souche | DO (0% PEG) | DO (20% PEG) | DO (40% PEG) | DO (60% PEG) |
|--------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| PS1 | 1,8825 | 0,361 | 0,198 | 0,075 |
| PS1 | 1,806 | 0,31 | 0,109 | 0,009 |
| PS1 | 1,959 | 0,17 | 0,02 | 0,039 |
| EHF5 | 1,841 | 0,322 | 0,228 | 0,033 |
| EHF5 | 1,435 | 0,129 | 0,047 | 0,02 |
| EHF5 | 0,943 | 0,6 | 0,013 | 0,028 |
| PF3 | 1,896 | 0,245 | 0,146 | 0,008 |
| PF3 | 1,947 | 0,612 | 0,064 | 0,066 |
| PF3 | 1,274 | 0,48 | 0,026 | 0,026 |
| CR2 | 1,806 | 0,427 | 0,32 | 0,05 |
| CR2 | 1,82 | 0,16 | 0,456 | 0,08 |
| CR2 | 1,83 | 0,25 | 0,102 | 0,043 |
| Témoin | 1,856 | 0,23 | 0,0615 | 0,097 |
| Témoin | 1,8485 | 0,23 | 0,083 | 0,016 |
| Témoin | 1,841 | 0,21 | 0,04 | 0,038 |

Annexe 20 : Taux de nécroses sur les fruits immatures traités curativement par les bactéries antagonistes exprimés en pourcent (%)

| Traitement | Taux de nécroses | Traitement | Taux de nécroses |
|------------|------------------|------------|------------------|
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 80 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 100 | EHF5/E1 | 100 |
| EHF5/E5 | 80 | EHF5/E1 | 80 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 80 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| PF3/E5 | 100 | PF3/E1 | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| E5 (T+) | 100 | E1(T+) | 100 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |
| T- | 0 | T- | 0 |



Molecular characterization of Algerian *Erwinia amylovora* strains by VNTR analysis and biocontrol efficacy of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum* antagonists

Lamia Taffet · Aida Raio · Maria C. Holeva ·
Redhouane Dikhai · Chawki Ould Kouskoussa ·
Sophie Cesbron · Zoulikha Krimi

Accepted: 16 January 2020 / Published online: 25 January 2020
© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2020

Abstract Samples of pear shoots, blossoms and leaves showing typical fire blight symptoms were collected from diseased pear trees during spring and summer over a period of 3 years from orchards situated in the Mitidja region, a main pear producing area in Northern Algeria. From all collected plant samples, thirty-seven putative *Erwinia amylovora* strains were isolated and identified by biochemical, serological and molecular tests. Molecular typing of these strains was performed using six

variable number of tandem repeats sequences (VNTRs). Minimal spanning trees showed that four different haplotypes were present within the bacterial population analyzed. The efficacy of twenty potential bacterial antagonists was evaluated in vitro against two *E. amylovora* pathogenic strains. Four antagonists (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus methylotrophicus* and two *Pseudomonas brassicacearum*) were selected to perform a biocontrol assay on immature pear fruits. Results showed that the two *Pseudomonas* strains were the most effective for preventive treatment on pear fruits, leading to a necrosis reduction of up to 90%. No curative effect was observed. The four selected antagonists were characterized for features linked to biocontrol activity, such as biofilm, siderophores and biosurfactant-production, motility, and effect of environmental conditions on bacterial growth.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10658-020-01938-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Taffet (✉) · R. Dikhai · C. O. Kouskoussa · Z. Krimi
Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources
Agro-Biologiques, Département de Biotechnologies, Faculté des
Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahlab-Blida1,
09000 Blida, Algeria
e-mail: lamia.taffet@hotmail.fr

L. Taffet
Département des Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences de
la Nature et de la Vie, Université Akil Mohand Oulhadj,
10000 Bouira, Algeria

A. Raio
Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante – CNR, Via
Madonna del Piano, 10, 50019 Sesto Fiorentino, FI, Italy

M. C. Holeva
Laboratory of Bacteriology, Department of Phytopathology,
Benaki Phytopathological Institute, Kifissia, Greece

S. Cesbron
IRHS, Agrocampus-Ouest, INRA, University of Angers, SFR
4207 QuaSaV, 49071 Beaucouzé, France

Keywords Biocontrol · *Erwinia amylovora* · Fire
blight · MLVA- VNTR

Introduction

Erwinia amylovora, the pathogen responsible for fire blight disease of many *Rosaceae* plants, is ranked among the most destructive bacterial plant pathogens (Mansfield et al. 2012). This quarantine pest, assigned to the A2 list of the European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO), belongs to enterobacteria which includes Gram-negative, mobile, and facultative aero-anaerobic bacteria (EPPO 2013).

E. amylovora was the first bacterium described as the causative agent of a plant disease (Burrill 1883).

E. amylovora enters hosts mainly through the nectarthodes of flowers and establishes systemic infections (Norelli et al. 2003). The pathogen moves through the intercellular spaces of parenchyma, then along the xylem vessels, and incites necrosis (Dellagi et al. 1998; Piqué et al. 2015). The symptoms include dieback and blight of inflorescences, shoots, leaves, fruits, trunks as well as production of bacterial exudate (van der Zwet and Beer 1995). Symptoms resembling those of fire blight were observed in several pear orchards in different provinces in north Algeria and the presence of *E. amylovora* in these orchards was confirmed in 2011 by the national official control services (The Agriculture Ministry and National Institute of Plant Protection INPV). Phytosanitary measures have been introduced to control the disease in these areas (Laala et al. 2012).

Treatment of plants with antibiotics could be employed for the control of fire blight, but their use in plant protection within the European Union has only been permitted on an emergency basis, under tightly restricted conditions (Fried et al. 2013). In Algeria, antibiotics are also prohibited. Their use is linked to an increased risk for selection of resistant strains of *E. amylovora* and other bacteria inhabiting orchards and the possible negative impact on the environment. Because of these limitations, the research interest in finding new solutions for fire blight control has increased, including the use of bacterial biocontrol agents (Mikiciński et al. 2016).

Several biopesticides using bacteria are available, such as *Bacillus subtilis* QST 713 (Aldwinckle et al. 2002), *B. subtilis* BD170 (Broggini-Schärer et al. 2005), *Pseudomonas fluorescens* A506 (Wilson and Lindow 1993) and *Lactobacillus plantarum*, however; they have a low efficacy against *E. amylovora* (Roselló et al. 2013). The main mechanism of action of these strains to control fire blight is based on competition through nutrient depletion and site colonization (Cabrefiga et al. 2007). Research is also being carried out with the aim of improving the efficacy of these biopesticides as well as the selection of new effective strains with different mechanisms of action (Pusey and Wend 2012).

In this context, the aim of this work was to study the molecular diversity of Algerian *E. amylovora* population in pear orchards and identify possible biocontrol agents against them. To this end, we isolated and identified *E. amylovora* strains from different pear orchards

of Northern Algeria. Analysis of genomic sequences of *E. amylovora* isolates was performed using VNTR markers, which have high discriminatory power that allows distinguishing different strains within a population (Bühlmann et al. 2014). Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) using VNTRs have been already used successfully to perform molecular typing of *E. amylovora* (Bühlmann et al. 2014) and several other bacterial species such as *Staphylococcus aureus* (Schouls et al. 2009), *Acinetobacter baumannii* (Pourcel et al. 2011), *Mycobacterium tuberculosis* (Aandahl et al. 2012) and *Pseudomonas aeruginosa* (Lashgarian et al. 2018). For these species, the VNTR technique has proved to be highly valuable in ecological, epidemiological and evolutionary studies. Knowledge of the *E. amylovora* population structure contributes to our understanding on how fire blight spreads over a geographical region.

Fire blight is difficult to control, as *E. amylovora* is able to rapidly spread in the plant and effective control methods are still lacking. Various mechanisms were proposed to explain the inhibitory effect of different bacterial antagonists against *E. amylovora*, including the production of toxic secondary metabolites and competition for nutrients and space (Cabrefiga et al. 2007). Moreover, *Pseudomonas fluorescens* and *Pantoea agglomerans* strains showing high potential as biological control agents against fire blight, were shown to inhibit growth of *E. amylovora* through a mechanism related to the production of antibiotics (Anderson et al. 2004; Temple et al. 2004). With the aim to select effective biocontrol agents of fire blight, native Algerian strains that were isolated as endophytes of different spontaneous plants (Krimi et al. 2016) were tested in vitro as well as in vivo on pear fruits in this study to evaluate their efficacy against *E. amylovora*.

Material and methods

Field surveys and collection of samples from diseased plants

Surveys were carried out during spring and summer from 2014 to 2017 in orchards of *Pyrus communis* cv. Santa Maria located in an area of pear fruit production in the Mitidja zone (Northern Algeria) which was officially declared affected by fire blight in 2011 by the Ministry of Agriculture and National Institute of Plant Protection.

In these orchards, about 70% of trees, 15 to 20 years old, showed various typical fire blight symptoms, such as necrosis of shoots, flowers, leaf petioles and fruits, oozed shoots, and mummified fruits.

Oozing shoots, blossoms and leaves were collected from 14 orchards (farms) located in seven different provinces: Sidi Yahia, Oued El Alleug, Bensalah, L'Arbaa, Birtouta, Tessala El Merdja and Attatba (nine farms at Blida, three at Algiers and two at Tipaza) (Fig. 1). Plant material was placed in sterile plastic bags, labeled, transported to the laboratory and stored at 4 °C until isolation of bacteria that was performed during the same week of sampling.

Isolation and purification of *E. amylovora* strains

The collected samples of infected shoots and twigs were examined for the presence of exudates that developed during storage on the plant surface allowing easy isolation. Part of these exudates were suspended in 2 ml of sterile distilled water (SDW) and streaked on Levan and King B media (Schaad et al. 1988). Plates were kept for 1 week at 27 °C and observed daily for bacterial growth. Single colonies of putative *E. amylovora* isolates showing mucoid, circular, white and domed morphology (Yaich et al. 2011) were selected and transferred to Levan medium (Schaad et al. 1988). The purification

step was repeated three to four times in order to obtain pure cultures (Jones and Geider 2001). Pure isolates were maintained at 4 °C on Levan agar medium slants for further testing and in 30% glycerol solution at –80 °C for long term storage.

Biochemical characterization of bacterial isolates

Gram staining (Suslow et al. 1982) and a series of assays to determine biochemical features of the bacterial isolates, i.e. gelatin liquefaction, fluorescent pigment production on King's B medium, reducing substances from sucrose, utilization of citrate, oxidation/fermentation of glucose (O/F), catalase production, oxidase production, growth at 39 °C and indole production were carried out using the EPPO identification protocol (EPPO 2013). The phenotypic properties were determined according to the methods of Jones and Geider (2001).

Serological test

The isolates were tested by the commercially available rapid lateral flow immunosorbent assay named 'AgriStrip test' (BIOREBA). For this assay, strips were inserted into tubes containing bacterial suspensions at the recommended concentration (10^6 cfu ml⁻¹). Strains

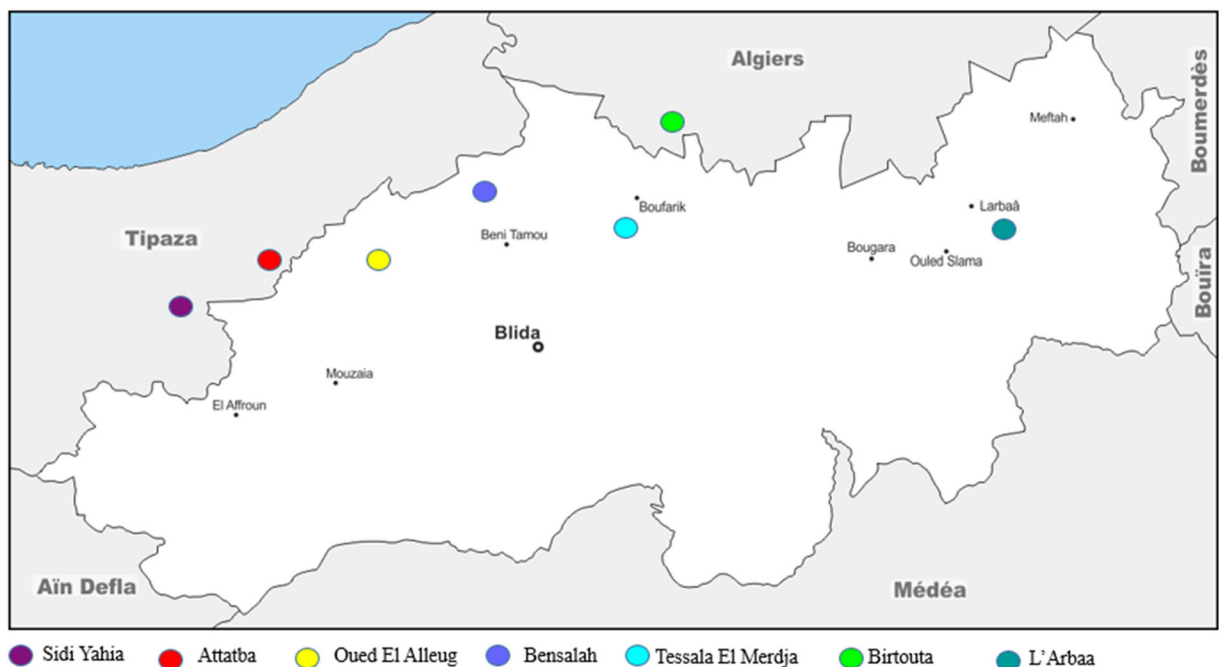


Fig. 1 Geographical location of pear orchards in North Algeria

producing a red band on the strip were considered positive and identified as *E. amylovora* species.

Tobacco hypersensitivity test

The tobacco hypersensitivity (HR) test was performed on young leaves of *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi*. The test was carried out using 24 h old bacterial cultures grown on Levan medium. For each isolate, a bacterial suspension (10^8 cfu ml⁻¹) was infiltrated using a needle into parenchymatic tissues of tobacco leaves (Vanneste et al. 1990). Tobacco plants were kept at room temperature. A complete collapse of the infiltrated tissue within 24–48 h was considered a positive response.

Pathogenicity test on immature pear fruits

Immature fruits collected from symptomless pear trees were inoculated following the protocol described by Zhao et al. (2005) with some modifications. Pear fruits were surface sterilized using 75% ethanol, wounded with a sterile scalpel (5 wounds/fruit) and inoculated with 5 µl of suspension (10^6 cfu ml⁻¹) of the putative *E. amylovora* 37 pathogenic strains. As negative control, pear fruits were inoculated with 5 µl of SDW. Fruits were placed in plastic boxes containing sterile Whatman paper on the bottom, daily sprayed with SDW and incubated at 25–26 °C. The experiment was repeated four times. Symptoms were recorded over a period of 5 to 7 days. Production of bacterial exudates and/or development of necrotic areas around or underneath the inoculation point was recorded as a positive response (Billing et al. 1960).

Duplex PCR

Thirty-seven strains with *Erwinia amylovora* biochemical features, identified as HR positive, and pathogenic on pear fruits, were tested by duplex PCR (Hannou et al. 2013). Forty-eight hour-old bacterial colonies were picked-up from Levan agar medium, transferred into Levan broth and incubated at 28 °C overnight on a rotary shaker. The bacterial cultures were centrifuged for 10 min at 14000 rpm and the pelleted bacterial cells were resuspended in SDW. Cells suspensions in SDW were lysed by heating for 15 min at 95 °C, quickly cooled on ice and centrifuged for 5 min at 7000×g. The obtained supernatants were used to perform amplification by duplex PCR. The duplex PCR protocol was

carried out using two pairs of primers: a) AJ75 (5-CGTATTCACGGCTTCGCAGAT) and AJ76 (5-ACCCGCCAGGATAGTCGCATA), a pair that amplifies an 844-bp fragment of the 29-kb plasmid pEA29 of *E. amylovora* (McManus and Jones 1995), and b) AMSbL (5-GCTACCAGCAGGGTGAG-3) and AMSbR (5-TCATCACGATGGGTGTAG-3), a pair that amplifies a 1.6-Kb fragment of the chromosomal *ams*-region of *E. amylovora* (Bereswill et al. 1995). Sterile water and genomic DNA extracted from the French *E. amylovora* strain CFBP 1430 were used as negative and positive amplification controls, respectively. PCR amplification was performed as described in Hannou et al. (2013).

The PCR program included an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 45 s at 94 °C for denaturation, 45 s at 52 °C for annealing, and 1 min and 45 s at 72 °C for extension; with a final extension at 72 °C for 10 min (Hannou et al. 2013). Amplified fragments were loaded on 1,5% agarose gel to be separated by electrophoresis. VNTR analyses.

Twenty-five selected *E. amylovora* strains isolated in this study were analyzed using six VNTRs primers described in Bühlmann et al. (2014) applying a Multiple-Locus VNTR Analysis (MLVA). Bacterial DNA templates were obtained using a direct lysis method, as previously described in Bühlmann et al. (2014), of overnight cultures grown on King's B medium at 28 °C. DNA-containing supernatants (1 µl) were used as the template in the PCR reaction mixtures containing 12.8 µl ultrapure water, 4 µl GoTaq Flexi 5X buffer (Promega, Fitchburg, WI, USA), 1.2 µl MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl dNTP 10 mM, 0.25 µl each primer 10 µM, 0.05 µl (0.25 u) GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) in a final volume of 20.05 µl. The amplification was performed in a GeneAmp PCR system model 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) following the steps: 95 °C for 5 min, 32 cycles denaturation at 95 °C for 30 s, annealing for 30 s at a temperature depending on the VNTR primer, elongation at 72 °C for 30 s, and a final elongation step at 72 °C for 10 min.

The VNTR primers described by Bühlmann et al. (2014) were used at the following annealing temperatures: 60 °C for VNTR A, B and H, 50 °C for VNTR C, 52 °C for VNTR D and 56 °C for VNTR F (Online Resource 1).

The VNTR primers were labelled with one of the following fluorescent dyes: Atto550 for VNTR A, HEX for VNTR B and D, FAM for VNTR C and H and

Atto565 for VNTR F (Eurofins Genomics, France) at the 5' end. Up to four differently labelled PCR products were diluted 1/30 and pooled to prepare the DNA samples. Then, 2.4 μL aliquots of the DNA samples were mixed with 9.35 μL HiDi formamide (SigmaAldrich, Saint Quentin, France) and 0.15 μL GeneScan 500 Liz internal lane size standard (Applied Biosystems) and denatured at 95 °C for 5 min prior to capillary electrophoresis analysis with an ABI PRISM 3130 analyzer (Applied Biosystems).

Peak data were analyzed using Peakscanner™ Software V1.0 (Life Technologies) to calculate the repeat number for each VNTR locus on the basis of fragment length and fluorescent label (Bühlmann et al. 2014). Simpson's index of diversity (Hunter and Gaston 1988) was calculated using Bionumerics Software V7.6.3 (Applied Maths). Minimum-spanning-trees (MST) were generated using Bionumerics Software V7.6.3 using the standard categorical coefficient and the maximum number of single-locus variants as a priority rule.

The categorical coefficient discriminates between different repeat numbers, however it does not quantify the difference. Equal weight was assigned to each of the retained VNTR loci.

Selection of effective antagonistic strains against *E. amylovora* and their characterization

Potential antagonistic *Pseudomonas* and *Bacillus* species evaluated in this study belong to the collection of the phytobacteriology laboratory of Blida University, Algeria. All strains were endophytes isolated from various spontaneous weeds (*Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Euphorbia peplus*, *Plantago lanceolata* and *Urtica dioica*) showing antagonistic activity against different phytopathogenic bacteria (Krimi et al. 2016).

Twenty *Pseudomonas* and *Bacillus* strains from the previously mentioned bacterial collection (Blida University, Algeria) were screened for in vitro antagonistic activity against pathogenic *E. amylovora* strains by the dual culture assay, i.e. a plate-spraying technique (Stonier 1960) as modified by Cooksey and Moore (1980). A volume of 100 μL of suspension (10^7cfu ml^{-1}) of each potential antagonistic strain was spotted at the center of YPGA medium (Hildebrand et al. 1988). The plates were incubated for 48 h at room temperature (RT). After incubation,

the plates were sprayed with cell suspensions of two *E. amylovora* strains E1 and E5, isolated and characterized in this study. Inoculum of pathogens was prepared from late log-phase cultures grown in YPG broth on a rotary shaker at 25 ± 2 °C and diluted to about 1×10^8 cells ml^{-1} in SDW. The plates were let again at RT for 24–48 h. Generally in this kind of assay, the antibacterial agent from the antagonistic strain diffuses into the agar and inhibits growth of the test microorganism. Antagonism is detected as the presence of a zone of growth inhibition of the test microorganism around the growth of the spotted antagonistic strain (Cabrefiga et al. 2007), and then the diameter of growth inhibition zones are measured using a graduated precision rule (mm) (Lindow 1988).

The test was repeated three times for each of the twenty antagonistic strain tested. Antagonistic strains able to inhibit both pathogenic strains E1 and E5 were tested for biocontrol of fire blight on immature pear fruits. For the negative control, the plates were sprayed with cell suspensions of *E. amylovora* strains E1 and E5 without any antagonistic strain.

Bacteria motility, siderophore, biofilm and biosurfactant production

Motility helps bacteria to reach the most favorable environment and to successfully compete with other microorganisms (Harshey 2003) and then may represent a remarkable competitive advantage for putative biocontrol agents. Tests to evaluate swimming and swarming motility of the four selected antagonistic strains (CR2, EHF5, PF3, and PS1) were performed according to the protocol of Déziel et al. (2001). A volume of 2 μL of each bacterial suspension (10^8 cfu ml^{-1}) was spotted in the center of plates containing tryptone swim and swarm agar media, respectively (Déziel et al. 2001). For each strain, three plates per medium were seeded. After 24 and 48 h of incubation at 25 ± 2 °C, two radius measurements per colony were made. *Pseudomonas chlororaphis* M71 and *E. coli* DH5 α were used as positive and negative controls, respectively. The experiment was carried out twice.

To evaluate the ability to produce siderophores, a volume of 200 μL of overnight cultures of the four selected antagonistic bacterial strains (10^8 cfu ml^{-1}) was added to 50 ml of iron-free succinate and KB broth media respectively (Sasirekha and Srividya 2016). The flasks were incubated at room temperature for 72 h on a

horizontal shaker. After centrifugation for 10 min at 10,000 rpm, the absorbance of supernatants were measured at 400 nm using spectrophotometer (Meyer and Abdallah 1978). The experiment was performed twice. The medium without bacteria was used as negative control. Bacterial growth and siderophore production in KB medium were compared to those in succinate medium containing ammonium sulphate (Tailor and Joshi 2012). The negative control was used as reference to quantify the difference between absorbance in KB medium and succinate medium. To characterize the nature of siderophores, 5 ml of 2% aqueous solution of FeCl₃ were added to each supernatant and OD was determined at 490–515 nm for catecholate (Jalal and Vander Helm 1990) and at 420 to 450 nm for hydroxamate (Neilands 1981). Non-inoculated media were used as reference.

The ability of the antagonistic strains to produce biofilm was tested by adding 15 µL of an overnight culture of strains EHF5, PF3, CR2 and PS1 (10^8 cfu ml⁻¹) to 0.5 ml of Luria-Bertani (LB) broth. Suspensions were incubated without agitation at 28 °C and biofilm was quantified after 3, 5 and 20 h. LB medium without bacteria was used as negative control. The experiment was repeated 3 times. Cultures were stained with 1 ml of 0.4% (w/v) crystal violet (CV) for 20 min at RT and then rinsed thoroughly and vigorously with distilled water to remove unattached cells and residual dye. One volume of ethanol (70%) was used to solubilize the dye. The absorbance of the solubilized dye was determined by a spectrophotometer at 570 nm wavelength (O'Toole and Kolter 1998; Stepanovic et al. 2000).

The ability to produce biosurfactant compounds was determined by the drop collapsing test described by Bunster et al. (1989) with some modifications. Strains were grown in KB broth amended with 1% of yeast extract for 48 h at 28 °C on a rotary shaker. Bacterial cultures were then centrifuged and the supernatant was filter-sterilized. An amount of 10 µl of each supernatant was then placed on a parafilm strip and mixed with 1 µl of 1% bromophenol blue solution. *P. chlororaphis* M71 strain and sterile KB broth were used as positive and negative controls respectively. The strip was covered with a Petri dish and kept in humid and sterile conditions. The diameter, size, and shape of drops were observed after 24 and 36 h. Flat drops with a diameter size wider than negative control indicates biosurfactant production by the tested strains.

Effect of environmental factors on bacterial growth

The effect of temperature, pH and NaCl concentration was determined by growing the antagonists on LB agar plates. Bacteria were streaked on agar surface and incubated at 4 °C, 30 °C, 35 °C, 42 °C and 45 °C for 24 to 48 h and then checked for growth (Rhodes 1958). Bacterial growth at 27 °C was used as reference temperature. To determine the effect of pH, bacteria were streaked on LB agar plates with pH 4, 6, 8 and 10. PH 7 was considered as the reference value. To test salt tolerance, the following amounts of NaCl were added to LB agar: 0.3 M (17.58 g l⁻¹), 0.5 M (29.3 g l⁻¹), 0.8 M (46.88 g l⁻¹) and 1 M (58.6 g l⁻¹) NaCl. Three replicates were used per sample. LB medium supplemented with 0.17 M (10 g l⁻¹) of NaCl (Rabhi 2011) was used as reference.

To study the effect of osmotic stress on antagonist growth, nutrient broth (NB) supplemented with different concentrations of PEG 8000 (20%, 40% and 60%) was used. Tubes containing 5 ml of supplemented NB were inoculated with 100 µl of each bacterial suspension and incubated at RT on a horizontal shaker for 72 h. Three replications per sample were maintained. Non-supplemented NB broth was used as negative control. Strain growth was determined by measuring the O.D. at 600 nm with a spectrophotometer (Manjunatha et al. 2017).

Fire blight control by *Bacillus* and *Pseudomonas* strains

Immature pear fruits cv. Santa Maria were used to determine the effectiveness of the bacterial antagonists in controlling locally pathogenic *E. amylovora* strains. Fruits were washed under running tap water, superficially disinfected with ethanol and then rinsed three times in SDW. Five wounds of 10 mm long and 3 mm deep were made on each fruit by using a sterile syringe needle. The fruits for each antagonist/pathogen combination were inoculated with 50 µL of 10^8 cfu ml⁻¹ suspension of each antagonistic strain and 50 µl of 10^7 cfu ml⁻¹ of the suspension of the pathogenic strains. Pear fruits wounded and treated with SDW were used as negative control. Treatments were arranged in a completely randomized design with two replications per treatment, five pear fruits per replicate and five wounds per fruit. Disease incidence was assessed for each repetition.

The biocontrol activity was tested by treating the wounds with the antagonists 24 h before or 24 h after inoculation with two strains of *E. amylovora* (E1, E5), to evaluate their preventive and curative activity, respectively. After inoculation, pear fruits were placed in sterile containers at RT. One week after inoculation the presence or absence of the necrotic lesions and exudate production were recorded. Disease severity was evaluated considering the size of fruit necrosis and production of bacterial exudates according to the following disease index: 0: no necrosis, 1: necrosis formation around the wound without ooze production, 2: necrosis of less than 50% of fruit surface with ooze production, 3: necrosis of 50%–80% of fruit surface with ooze production, 4: 100% fruit necrosis and ooze production (Ohike et al. 2018).

Results

Isolation of *E. amylovora* strains and their characterization by biochemical, serological and pathogenicity assays

Thirty-seven bacterial strains isolated from the samples of pear shoots and twigs collected during the field survey, which formed *E. amylovora*-like colonies, were selected for further study. The colonies were mucoid, white, shiny, domed, with radial stripes and dense flocculent centers on Levan medium (Billing et al. 1961; Ashmawy 2010). The isolates were Gram-negative, oxidase-negative, catalase-positive, citrate utilizers, gelatin degraders, non-fluorescent on King's B medium and sucrose reducers. Moreover, they did not grow at 39 °C (Online Resource 2). Serological test of the 37 isolates were positive for *E. amylovora*, and all isolates produced a positive HR reaction on tobacco leaves. Pathogenicity test on all isolates induced necrosis and

brownish coloration of tissues surrounding the artificially inoculated wounds. Within two to three days after inoculation, symptoms spread to the whole fruit and ooze production was observed. SDW negative control did not cause any symptom on the pear fruits.

Molecular identification of *E. amylovora* isolates

There was amplification of the 844-bp fragment of pEA29 plasmid with AJ75/AJ76 primers (McManus and Jones 1995) in all 37 isolates, suggesting the ubiquitous presence of this plasmid in the tested strains. In addition, all strains (Online Resource 3) produced a clearly visible 1.6-kb band corresponding to the *ams* chromosomal region with the AMSbL/AMSbR primers (Bereswill et al. 1995).

A variable number of tandem repeat sequences (VNTR) assay was used successfully to genotype 25 selected *E. amylovora* strains. Only two loci (A and F) were polymorphic with repeats per locus ranging from five to seven for locus A and from six to seven for locus F (Table 1).

Minimal spanning tree analysis (MST) showed that four haplotypes were present within the 25 tested isolates that differed for one VNTR repeat number. The analysis did not originate distinct groups on the basis of year of isolation. (Fig. 2). One distinct haplotype was instead found only from one farm of Attatba province when the analysis was performed considering the geographical origin of strains (Fig. 3).

Compared to data published in Bühlmann et al. (2014), strains 40b, 44, 45, 46 shared the same haplotype with strain NIBZ-1058 isolated from *Pyrus* in 2007 in Slovenia. Other Algerian strains harboured new haplotypes when compared to Bühlmann's data.

Table 1 Results of MLVA analysis performed on twenty-five isolates of *E. amylovora*

| loci | Number of different alleles | Number of repeats min | Number of repeats max | Diversity index (Simpson) |
|------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| A | 3 | 5 | 7 | 0.4432 |
| B | 1 | 3 | 3 | 0 |
| C | 1 | 7 | 7 | 0 |
| D | 1 | 9 | 9 | 0 |
| F | 2 | 6 | 7 | 0.8528 |
| H | 1 | 8 | 8 | 0 |

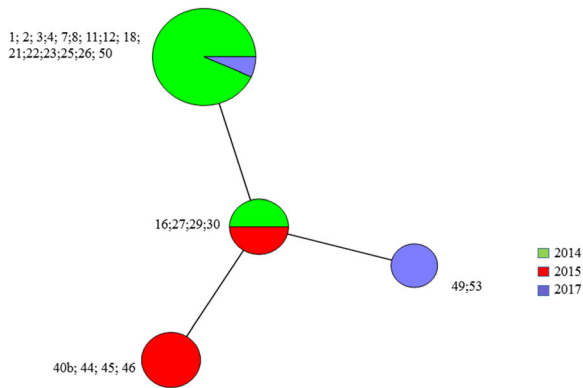
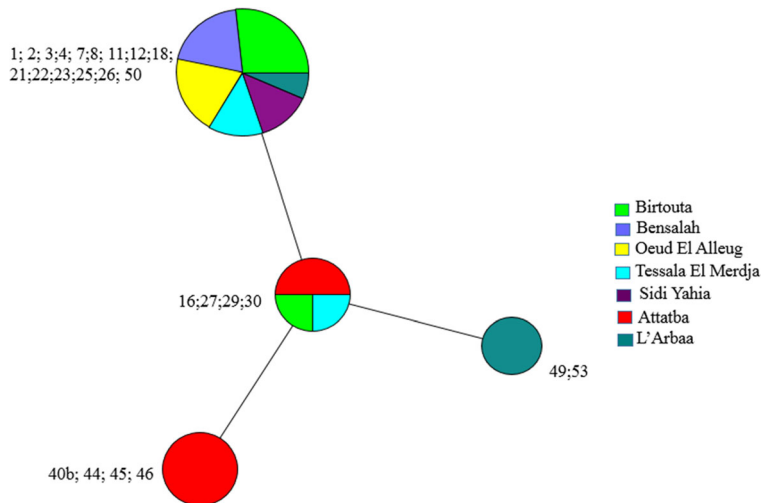


Fig. 2 Minimal spanning tree of Algerian *E. amylovora* isolates colored according to year of isolation. Each circle represents an MLVA type with a size corresponding to the number of strains that share an identical MLVA type. MLVA types connected by a thick solid line differ by at most one VNTR locus

In vitro selection of bacteria antagonistic to *E. amylovora* strains

All twenty potential antagonistic strains screened in this study by the dual culture assay inhibited the growth of both *E. amylovora* strains (E1 and E5) in vitro, with inhibition zones ranging from 18 mm for *Bacillus amyloliquefaciens* CR1 to 53 mm for *B. methylotrophicus* PF3 (Online Resource 4. Among this group of antagonistic strains, four were selected for further study, including a) two *Bacillus* strains (*B. amyloliquefaciens* EHF5 and *B. methylotrophicus* PF3) that produced wide inhibition zones as well as presenting traits such as rapid growth and colonization, aggressiveness towards

Fig. 3 Minimal spanning tree on Algerian *E. amylovora* isolates colored according to geographical origin. Each circle represents an MLVA type with a size corresponding to the number of strains that share an identical MLVA type. MLVA types connected by a thick solid line differ by at most one VNTR locus



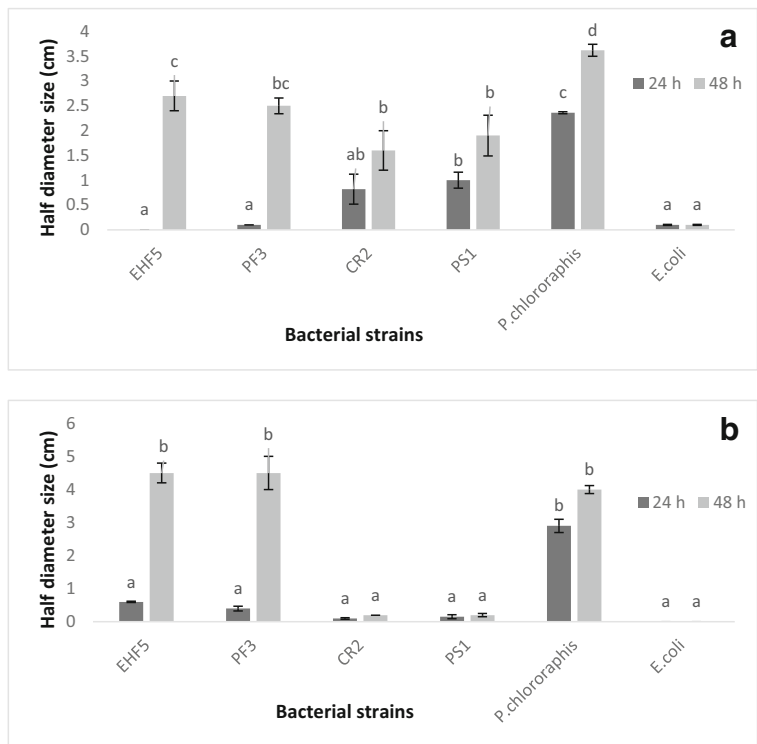
other microorganisms and adaptation to environmental stress, making them good potential biocontrol agents, and b) two *Pseudomonas* strains (*P. brassicacearum* CR2 and PS1) that had been shown also in previous work (Krimi et al. 2016) to be interesting beneficial strains with potential biocontrol and growth promotion activities.

Characterization of antagonists

The swimming ability of EHF5, PF3 and CR2 strains at 24 h was comparable to that of the negative control (*E. coli*), while PS1 showed a swimming activity significantly higher than the negative control but lower than the positive control (*P. chlororaphis*) (Fig. 4a). After 48 h of incubation all four strains were able to swim, even though *Pseudomonas* strains were slower than *Bacillus* and *P. chlororaphis*. There were no significant differences in swarming ability among the four antagonistic strains at 24 h of incubation, however; after 48 h of incubation, *Bacillus* colonies covered the whole agar surface while *Pseudomonas* colonies did not show any swarming ability (Fig. 4b).

The four strains showed a different ability to produce siderophores on KB and succinate media. Strain EHF5 was the most active siderophore producer on KB medium without ferric chloride while strains CR2 and PS1 produced catecholate and hydroxamate siderophore type on KB medium amended with FeCl₃ respectively (Fig. 5). On succinate medium amended with FeCl₃, all strains produced fewer siderophores than on succinate without ferric chloride (Online Resource 5).

Fig. 4 Swimming (a) and swarming (b) activity of antagonists at 24 and 48 h of incubation. Data represent the average measure of the half diameter of the bacterial colonies. Two half diameters for each colony were measured on three repetitions. The experiment was carried out twice. The bars represent the standard error. Significant differences ($p \leq 0,05$) at 24 and 48 h were determined by Tukey test



The four antagonistic strains produced biofilm in vitro. No significant difference was observed among the strains after 3 and 5 h of incubation. EHF5 was the most active after 5 h of incubation and did not differ from PS1 strain at 20 h of incubation. After 20 h of incubation, strain CR2 was the most active biofilm producer. Conversely, PF3 showed a low ability to produce biofilm (Fig. 6).

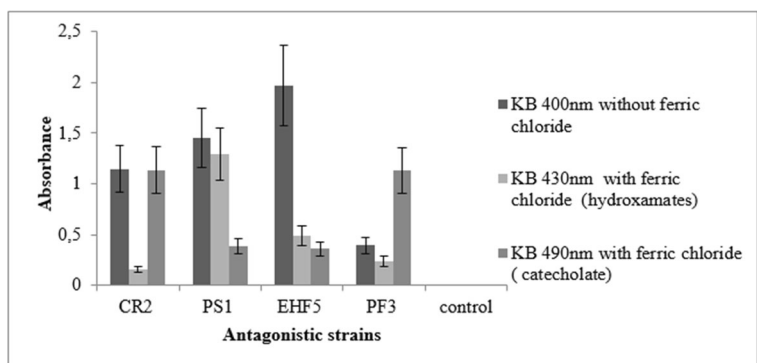
The drop collapsing test showed that only the two *Bacillus* strains were able to produce biosurfactant compounds determining the spread of bacterial suspension over the solid surface (results not shown). The drops for these two strains appeared larger and flatter than the

negative control (up to 7–8 mm diameter vs 4–5 mm of the negative control). On the contrary, both *Pseudomonas* strains did not produce biosurfactant compounds in this test since the diameter and shape of their drops were similar to those of the negative control.

Effect of environmental factors on the growth of antagonists

The antagonistic strains grew at pH values 4–8 (except for CR2 strain that did not grow at pH 4.0) and did not grow at pH 10. All strains grew at temperature ranging between 30 and 42 °C, while at the temperatures of 4 °C

Fig. 5 Type of siderophores detected in cultural filtrates of the antagonistic strains grown on KB medium. Bacterial suspension at 10^8 cfu ml⁻¹. The columns represent the average of 2 repeats and the bars represent standard error



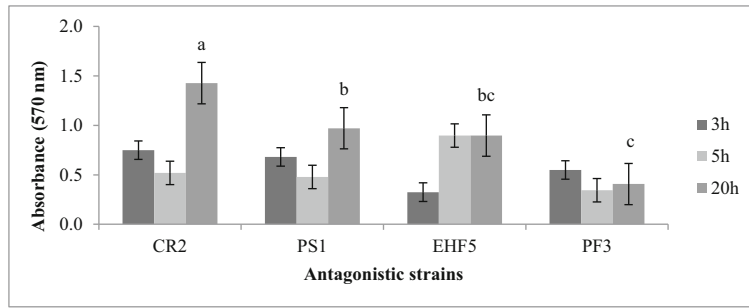


Fig. 6 Biofilm production by the four antagonistic strains at 3, 5 and 20 h post incubation. Bacterial suspension had a concentration of 10^8 cfu ml⁻¹. The columns represent the average of 3 repeats

and the bars represent standard error. Significant differences ($p \leq 0,05$) were obtained by Tukey test only for results obtained after 20 h of incubation

and 45 °C, no growth was recorded. The two *Pseudomonas* strains were not inhibited by concentrations of NaCl ranging between 0,3 M and 1,0 M, while both *Bacillus* strains did not grow at 1.0 M NaCl (Table 2).

Strain tolerance to osmotic stress decreased with increasing concentrations of PEG. In the presence of 20% PEG, growth of the two pseudomonads was reduced more than 80% while growth of *Bacillus* spp. was reduced by approximately 70%, indicating that all strains were very sensitive to osmotic stress. At a concentration of 40% PEG, bacterial growth was further reduced, and at a concentration of 60% PEG, absorbance values of broth cultures were close to zero. No significant differences were found among the different strains (Fig. 7).

Fire blight control by Bacillus and Pseudomonas strains

The strains *Bacillus methylotrophicus* PF3, *B. amyloliquefaciens* EHF5, *P. brassicacearum* CR2 and PS1 were selected to test their ability to control fire blight. These strains were selected based on results for the in vitro evaluation of their antagonistic activity, their

bio-control linked performances, and their resistance to abiotic factors.

A significant reduction of disease symptoms ($P \leq 0.05$) was recorded when *E. amylovora* was inoculated on pear fruits after wound protection with the *Bacillus* and *Pseudomonas* strains under study (Fig. 8). *Pseudomonas* strains CR2 and PS1 were the most effective against both *E. amylovora* strains used, with symptoms on pear fruits reduced to a necrotic area of few millimeters surrounding the wounds and without bacterial exudate (disease index 1) (Fig. 9). *Bacillus* strains also caused a significant reduction of disease symptoms, but the efficacy was lower than *Pseudomonads* (disease index 2). The effect of antagonists on the necrosis spread and ooze production was not significant when the *E. amylovora* strains (E1 and E5) were inoculated 24 h before the wound protection (data not shown).

Discussion

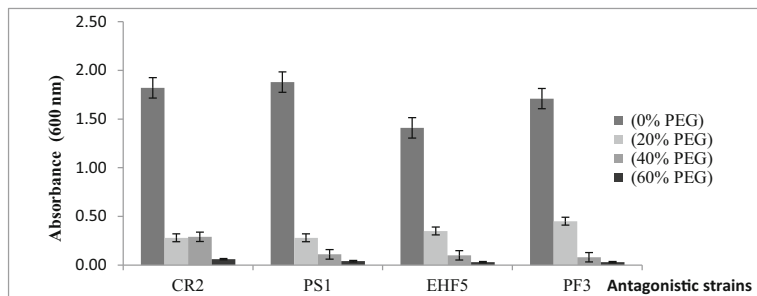
Fire blight has been reported since 2010 in Tipaza and Oued El Alleug provinces of Algeria on pear, apple and

Table 2 Effect of different pH, temperature and salt concentrations on the growth of antagonistic strains

| Antagonistic Strain | pH | | | | | Temperature (°C) | | | | | NaCl concentration (M) | | | |
|--------------------------------------|----|---|---|---|----|------------------|----|----|----|----|------------------------|-----|-----|-----|
| | 4 | 6 | 7 | 8 | 10 | 4 | 30 | 35 | 42 | 45 | 0,3 | 0,5 | 0,8 | 1,0 |
| CR2 (<i>P. brassicacearum</i>) | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + |
| PS1 (<i>P. brassicacearum</i>) | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + |
| EHF5 (<i>B. amyloliquefaciens</i>) | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | - |
| PF3 (<i>B. methylotrophicus</i>) | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | - |

+: bacterial growth occurred
 -: no bacterial growth occurred

Fig. 7 Effect of osmotic stress on the growth of the antagonistic bacteria. Bacterial suspension had a concentration of 10^8 cfu ml⁻¹. The columns represent the average of 3 repeats and the bars represent standard error. No significant differences were obtained by Tukey test



quince trees. The disease spread quickly to other fruit growing regions in the north of Algeria such as Blida and Algiers. Infected areas in Blida province reached 400 Ha 1 year after the first *E. amylovora* record in this area (Laala et al. 2012).

Several plasmids (pEA29, pEI70, pEA34, pEA8.7, pCPP60, pEA72, pEL60, pEA2.8, and pEU30) have been identified in *E. amylovora* strains (McGhee and Jones 2000; Foster et al. 2004). However, pEA29 is the plasmid playing a significant quantitative role in pathogenicity (Laurent et al. 1989). Indeed, sequences of this plasmid are used for genetic differentiation of *E. amylovora* strains (Sebahia et al. 2010).

In this study, 37 strains isolated from diseased pear trees in orchards located in different areas of North Algeria were identified as *E. amylovora* species by biochemical tests, PCR based methods, a serological identification test (Agristrip) and pathogenicity assay. AJ75 /AJ76 primers annealing to plasmid pEA29 and

AMSbL /AMSbR primers annealing to *ams* chromosomal region were used for molecular identification of these strains. At the same time, the ubiquitous presence of the plasmid pEA29 in the Algerian strains tested was confirmed.

Genetic diversity of *E. amylovora* is low given the relatively recent global spread of this pathogen. Indeed, at genome level, 99.4% identity was found within the Rubus-infecting strains and 99.98% within the Spiraeoideae-infecting strains (Mann et al. 2013). The genetic diversity of *E. amylovora* has been studied in Morocco, Tunisia and Iran by VNTR analysis (Hannou et al. 2013; Dardouri et al. 2017; Refahi et al. 2017) using the same VNTRs as described in Hannou et al. (2013). Additional MLVA analysis (Alnaasan et al. 2017) was performed with the primers described by Bühlmann et al. (2014) to study strains from the Mediterranean area. No database is publicly available for MLVA on *Erwinia amylovora*. In this study, VNTR analysis differentiated four haplotypes within the Algerian *E. amylovora* strains identified. Previous analysis performed on strains isolated in North Africa showed that five different genotypes were present within the Tunisian collection of *E. amylovora* (Dardouri et al. 2017) while two distinct patterns were found among the Moroccan *E. amylovora* strains (Hannou et al. 2013).

Bühlmann et al. (2014) showed the presence of 227 haplotypes by studying a total of 833 *E. amylovora* strains of worldwide origin in a work based on MLVA analysis. One of these strains originated from Slovenia shared the same haplotype as four Algerian isolates of the present study. According to Alnaasan et al. (2017), Italian isolates of *E. amylovora* showed a high diversity which let hypothesize multiple events of introduction of the bacterium from several countries. Two of these isolates were closely related to strains from Algeria and Egypt (Alnaasan et al. 2017). This suggested that *E. amylovora* could have been introduced in Italy and

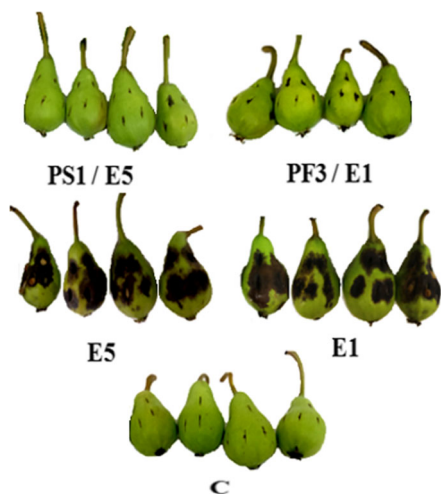


Fig. 8 Effect of selected antagonistic strains (PS1, PF3) in preventing fire blight on immature pear fruits artificially inoculated with *E. amylovora* (E1, E5 strains). Symptom evaluation was recorded 7 days after the pathogen inoculation. C: Negative Control

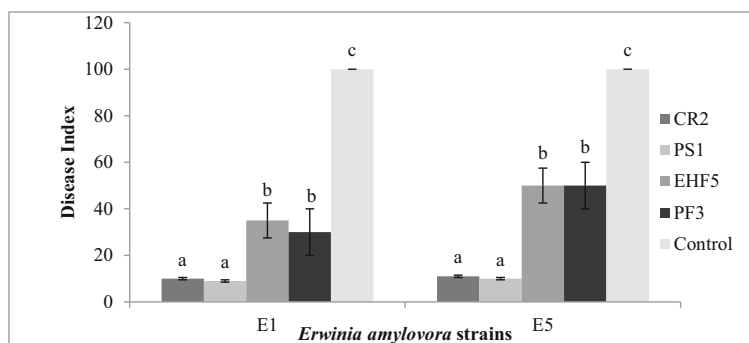


Fig. 9 Disease symptoms on pear fruits developed around wounds protected with the antagonistic strains (CR2, PS1, EHF5, PF3) and inoculated with *E. amylovora* (E1 or E5 strain).

The bars represent standard error. Values were elaborated by using McKinney disease index (DI) and significance among the differences were calculated by Tukey test ($p \leq 0,01$)

Algeria during the same period even though no official report from Algeria is available. It is possible that the high volume of traded plants and the inherent difficulty to intercept latently infected plants, have contributed to the introduction and spread of *E. amylovora* in these Mediterranean countries. Further comparisons with isolates from other countries in North Africa are needed to conclude on the routes and the number of introductions in Algeria.

Regardless of the *E. amylovora* diversity present in each country and the pathways of pathogen's introduction in new areas, sustainable management measures to address plant infections by this disastrous pathogen are urgently needed. To this respect, research on biological control agents has been initiated in the past, including various *Pseudomonas* and *Bacillus* strains. *Pseudomonas* spp. are very ubiquitous, colonize a wide variety of ecological niches, and can be isolated from water, soil and plants. They grow in temperatures ranging from 4 °C to 42 °C (Chakravarty and Gregory 2015). In this study, the *Pseudomonas* strains did not grow at 4 °C and 45 °C, which are extreme temperatures, apart from CR2 (*P. brassicacearum*) which grew at 4 °C. Species of the genus *Bacillus* possess significant physiological and metabolic diversity that allow them to survive in extreme habitats, they can be thermophilic and psychrophilic and are capable at growing at pH, temperatures, and salt concentrations (Awais et al. 2007).

Pseudomonas accumulate from the external environment or by synthesis of several varieties of compatible solutes. Glutamate and trehalose are used by *Pseudomonas* species during growth in a medium of high osmolarity (D'Souza-Ault et al. 1993; Pocard et al. 1994). Pseudomonads are able to survive and multiply in pH between 6 and 8. However, their survival is low in

acidic medium such as pH 4 (Garrity 2005). The *Bacillus* have physiological properties and varied habitats (Awais et al. 2007) shown with PF3 and EHF5 (acidophilic) but alkaline-sensitive at basic pH 10 for all strains.

Strains of *Bacillus* were moderately halotolerant, tolerating up to 0.8 M NaCl, However, *Pseudomonas* strains were more halotolerant they grow at 1 M NaCl. *Pseudomonas* are particularly resistant to hyper-osmotic shock in LB medium. There is a synergistic effect between the different osmoprotective agents of the LB medium which explains the high yield of growth at high osmolarity (Ghoul 1990). For *Bacillus*, the sudden decrease in the activity of cytoplasmic water induces severe plasmolysis. It inhibits cellular functions such as nutrient absorption, DNA replication and biosynthesis of macromolecules (Csonka 1989).

In this study, four strains were identified that strongly inhibited *E. amylovora* in vitro (dual culture) and in vivo (on pear fruits), and their biocontrol performances characterized. Even though several studies have shown that the best performing strains in the in vitro assay to evaluate antagonistic effect, are not always the most effective biocontrol agents in vivo (Ülke and Inar 1999; Mikiciński et al. 2008), this in vitro assay still represents the best technique to screen among large number of putative antagonistic bacterial strains. The two *P. brassicacearum* strains as well as the *B. amyloliquefaciens* and *B. methyloptrophicus* strains, selected based on their in vitro antagonistic activity and other known characteristics, showed a variable biocontrol efficacy against *E. amylovora* on artificially inoculated immature pear fruits. This pathogenicity test is a very reliable tool both for biocontrol and virulence studies (Cabrefiga and Montesinos 2005). Both

P. brassicacearum strains were highly effective (more than the *Bacillus* strains) in reducing symptom development (small necrosis size and suppression of bacterial exudates production) on pear fruits, even though in dual culture test the *Bacillus* strains. Had shown the best inhibiting activity.

Gerami et al. (2013) also showed that the bacterial antagonists *Pseudomonas putida* and *Serratia marcescens* were effective *in planta* but not *in vitro*. The discrepancy may be related to biocontrol mechanisms other than antibiosis such as competition for space and nutrients, siderophore and nonvolatile inhibitory metabolites production (Stockwell et al. 2001; Temple et al. 2004). Competition is a mechanism effective against *E. amylovora* reported both for *P. fluorescens* A506 (Wilson and Lindow 1993) as well as *P. fluorescens* EPS62e (Cabrefiga et al. 2007). Siderophores produced by strain *Pseudomonas graminis* 49 M strongly inhibited *E. amylovora* growth *in vitro*, but clear evidence of their role in the biocontrol of the pathogen *in vivo* have not yet been found (Mikiciński et al. 2016). Similarly to our results, there are several reports on the ability of antagonistic bacteria of *Pseudomonas* spp. in suppressing fire blight disease (Mercier and Lindow 2001; Ait Bahadou et al. 2018).

In this research line, further work is under way to determine the mechanisms of action underlying the *in vivo* biocontrol of *E. amylovora*. *Pseudomonas* CR2 and PS1 strains, that were more effective than *Bacillus* in controlling the pathogen on immature pear fruits, produced hydroxamate and catecholate siderophores on KB medium, were able to swim but not swarm on appropriate agar media and were more active producers of biofilm than *Bacillus* strains. The high siderophore production in succinate medium may be related to the production of pyoverdine in which the three amino moieties of the chromophore are replaced by various acyl groups derived from succinate, malate, α -keto-glutarate (Linget et al. 1992; Sasirekha and Srividya 2016). This kind of siderophore may act also as an antibiotic (Kraus and Loper 1995). Biofilm formation is another important feature for bacteria to succeed during colonization of plant surfaces and intercellular spaces since it increases their survival and activity and allows water retention (Zhang et al. 1998). Biofilms are made up mostly of exopolysaccharide (EPS), proteins, lipids and nucleic acids (Davey and O'toole 2000) and protects bacteria against unfavorable environmental conditions (Flemming 1993). The significantly higher

ability of the two *Pseudomonas* strains to form biofilm in comparison with the *Bacillus* spp. strains may be one important trait linked to its biocontrol activity. Biofilm formation, production of siderophores and antibiotic synthesis are regulated by the quorum sensing (QS) system. This is a mechanism of intercellular signaling among bacteria that operates through small molecular weight QS signals to regulate the transcription of target genes (Maddula et al. 2006).

QS also affects motility and biosurfactants production of bacteria that are considered two important activities for a bacterial biocontrol agents. In particular, swarming motility is involved in colonization process of leaf and root surface and is described as a movement of bacteria in groups of tightly bound cells (Harshey 2003). Both *Bacillus* strains showed higher swimming and swarming activity than the two *Pseudomonas* strains and were able to produce biosurfactants; nevertheless their *in vivo* biocontrol activity was less effective than that of *Pseudomonas* strains. The *in vivo* biocontrol efficacy of microbial antagonists is the result of the activation of several mechanisms which interact with the target pathogen, the autochthonous microflora, the host genotype and the environmental conditions. Given the complexity of these interactions, the result is not always predictable on the basis of the information provided by the experimental *in vitro* trials. On the other hand, it is also possible that further powerful mechanisms as 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) and hydrogen cyanide (HCN), not investigated in this work, are involved in biocontrol of *E. amylovora* by *P. brassicacearum* strains (Paulin et al. 2017).

Extreme conditions of pH, temperature, salt concentration and osmolarity were equally tolerated by the *Bacillus* spp. and *P. brassicacearum* strains showing their ability to face stressing environmental conditions.

In the light of the results obtained during this study, it is reported here that *E. amylovora* is widespread in Northern Algeria orchards and that *P. brassicacearum* could constitute a potential biocontrol agent to be exploited against this pathogen. *P. brassicacearum* has been already reported as an effective biological control agent against *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae* and also *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (Loewen et al. 2014; Novinscak et al. 2016). Further studies are needed to identify the mechanisms involved in *P. brassicacearum* interaction with *E. amylovora* and to assess its practical use in field. In addition, there is a

need to optimize the formulation for maximum activity and survival of the bacterial cells, and to assess the vegetative stage and rate of application. To this end, monitoring viable cells *in planta* could aid the design of a suitable application scheme (Daranas et al. 2018). Likewise, the improvement of ecological fitness of *P. brassicacearum* PS1 and CR2 could be investigated and further studies under different agricultural and climatic conditions are needed to confirm their performance in the field.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interests.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Aandahl, R. Z., Reyes, J. F., Sisson, S. A., & Tanaka, M. M. (2012). A model-based Bayesian estimation of the rate of evolution of VNTR loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Computational Biology*, 8, e1002573.
- Ait Bahadou, S., Ouïjja, A., Karfach, A., Tahiri, A., & Lahlali, R. (2018). New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. *Microbial Pathogenesis*, 117, 7–15.
- Aldwinckle, H. S., Bhaskara Reddy, M. V., & Norelli, J. L. (2002). Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Horticulturae*, 590, 325–331.
- Alnaasan, Y., Valentini, F., Balestra, G. M., Mazzaglia, A., D'Onghia, A. M., & Varvaro, L. (2017). Modification of a multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing isolates of *Erwinia amylovora*. *Plant Pathology*, 66, 1075–1080. <https://doi.org/10.1111/ppa.12660>.
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., & Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 535–544.
- Ashmawy, NA. (2010). Pathological and molecular studies on *Erwinia amylovora* the causal agent of fire blight disease. Ph.D. Thesis, Alexandria University, Egypt.
- Awais, M., Ali Shah, A., Abdul, H., & Hasan, F. (2007). Isolation, identification and optimization of *Bacillus sp.* *Pakistan Journal of Botany*, 39, 1303–1312.
- Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmuller, I., & Geider, K. (1995). Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2636–2642.
- Billing, E., Crosse, J. E., & Garrett, C. M. E. (1960). Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight of pears. *Plant Pathology*, 9, 19–25.
- Billing, E., Baker, L. A. E., Crosse, J. E., & Garret, C. M. E. (1961). Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *Journal of Applied Bacteriology*, 24, 195D211.
- Broggini-Schärer, G. A. L., Duffy, B., Holliger, E., Scharer, H. J., Gessler, C., & Patocchi, A. (2005). Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 93–100.
- Bühlmann, A., Dreo, T., Rezzonico, F., Pothier, J. F., Smits, T. H., Ravnkar, M., & Duffy, B. (2014). Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2112–2125.
- Bunster, L., Fokkema, N. J., & Schippers, B. (1989). Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1340–1345.
- Burrill, T. J. (1883). New species of *Micrococcus* (bacteria). *The American Naturalist*, 17, 319.
- Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2005). Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology*, 95, 1430–1437.
- Cabrefiga, J., Bonaterra, A., & Montesinos, E. (2007). Mechanism of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *International Microbiology*, 10, 123–132.
- Chakravarty, S., & Gregory, G. (2015). The genus *Pseudomonas*. In E. Goldman & L. H. Green (Eds.), *Practical handbook of microbiol* (pp. 321–344). New York: CRC Press.
- Cooksey, D. A., & Moore, L. W. (1980). Biological control of crown gall with fungal and bacterial antagonists. *Phytopathology*, 70, 506–509.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53, 121–147.
- Daranas, N., Bonaterra, A., Francés, J., Cabrefiga, J., Montesinos, E., & Badosa, E. (2018). Monitoring viable cells of the biological control agent *Lactobacillus plantarum* PM411 in aerial plant surfaces by means of a strain-specific viability quantitative PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(10), e00107–e00118.
- Dardouri, S., Chehimi, S., Murillo, J., & Hajlaoui, M. R. (2017). Molecular characterization of Tunisian strains of *Erwinia amylovora*. *Journal of Plant Pathology*, 99(2), 331–337.
- Davey, M. E., & O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847–867.
- Dellagi, A., Brisset, M. N., Paulin, J. P., & Expert, D. (1998). Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 734–742.
- Déziel, E., Comeau, Y., & Villemur, R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with the emergence of hyperperiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and

- twitching motilities. *Journal of Bacteriology*, 183, 1195–1204.
- D'Souza-Ault, M. R., Smith, L. T., & Smith, G. M. (1993). Roles of N-Acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 473–478.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). (2013). PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*. <https://doi.org/10.1111/epp.12019>.
- Flemming, H. C. (1993). Biofilms and environmental protection. *Wat Sci Technol*, 27, 1–10.
- Foster, G. C., Gayle, C., Jones, A. L., & Sundin, G. W. (2004). Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7539e7544.
- Fried, A., Schell, E., Moltman, E., & Wensing, A. (2013). Control of fire blight in Baden-Württemberg at the end of the streptomycin era. *Acta Horticulturae*, 1056, 55–56.
- Garrity, G. M. (2005). The Proteobacteria - part B: The Gammaproteobacteria. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer: New York.
- Gerami, E., Hassanzadeh, N., Abdollahi, H., Ghasemi, A., & Heydari, A. (2013). Evaluation of some bacterial antagonists for biological control of fire blight disease. *Journal of Plant Pathology*, 95, 127–134.
- Ghoul, M. (1990). Halotolerance de *Escherichia coli*: effet des osmoprotecteurs naturels. Thèse de Doctorat, Université de Rennes I, France.
- Hannou, N., Llop, P., Faure, D., Lopez, M. M., & Moumni, M. (2013). Characterization of *Erwinia amylovora* strains from middle Atlas Mountains in Morocco by PCR based on tandem repeat sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 665–674.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 57, 249–273.
- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N., & Sands, D. C. (1988). *Pseudomonas*. In N. W. Schaad (Ed.), *Laboratory guide for identification of plant pathogenic Bacteria: 60–80*. St. Paul: APS.
- Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2465–2466.
- Jalal, M. A. F., & Vander Helm, D. (1990). Isolation and spectroscopic identification of fungal siderophores. In G. Winklemann (Ed.), *Handbook of microbial iron chelates* (pp. 235–269). Oxford: Pergamon Press.
- Jones, A. L., & Geider, K. (2001). *Erwinia amylovora* group. In N. W. Schaad, J. B. Jones, & W. Chun (Eds.), *Laboratory guide for identification of plant pathogenic Bacteria* (pp. 40–55). St. Paul: APS Press.
- Kraus, J., & Loper, J. E. (1995). Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 849–854.
- Krimi, Z., Alim, D., Djellout, H., Tafifet, L., Mohamed-Mahmoud, F., & Raio, A. (2016). Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., and promote growth of tomato plants. *Phytopathol. Mediterr*, 55(2), 184–196.
- Laala, S., Manceau, C., Valentini, F., Kerkoud, M., & Kheddad, M. (2012). Fire blight survey and first characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Algeria. *Journal of Plant Pathology*, 94, 693–696.
- Lashgarian, H. E., Marzban, A., Estaji, M., Gholami, M., Masoumi Asl, H., & Raheb, J. (2018). Multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from urine samples of different patients. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 20(2), 56–63.
- Laurent, J., Barny, M. A., Kotoujansky, A., Dufriche, P., & Vanneste, J. L. (1989). Characterization of an ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2, 160–164.
- Lindow, S. E. (1988). Lack of correlation of *in vitro* antibiosis with antagonism of ice nucleation active bacteria on leaf surfaces by non-ice nucleation active bacteria. *Phytopathol*, 78, 444–450.
- Linget, C., Slylianou, D. G., Dell, A., Wolff, R. E., Piemont, Y., & Abdallah, M. A. (1992). Bacterial siderophores: the structure of a desferriferribactin produced by *P. fluorescens* ATCC 13525. *Tetrahedron Letters*, 33, 3851–3854.
- Loewen, P. C., Switala, J., Fernando, W. G. D., & de Kievit, T. (2014). Genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* DF41. *Genome Announcements*, 2(3), e00390–e00314.
- Maddula, V., Zhang, Z., Pierson, E. A., & Pierson, L. S. (2006). Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) strain 30–84. *Microbial Ecology*, 52, 289–301.
- Manjunatha, B. S., Asha, A. D., Nivetha, N., Bandeppa Govindasamy, V., Rathi, M. S., & Sangeeta, P. (2017). Evaluation of endophytic bacteria for their influence on plant growth and seed germination under water stress conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 4061–4067.
- Mann, R. A., Smits, T. H. M., Bühlmann, A., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J. E., et al. (2013). Comparative genomics of 12 strains of *Erwinia amylovora* identifies a pan-genome with a large conserved core. *PLoS One*, 8, e55644.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: top 10 plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*, 13, 614–629.
- McGhee, G. C., & Jones, A. L. (2000). Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and interspecies variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4897e4907.
- McManus, P. S., & Jones, A. L. (1995). Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. *Phytopathology*, 85, 618–623.
- Mercier, J., & Lindow, S. E. (2001). Field performance of antagonistic bacteria identified in a novel laboratory assay for biological control of fire blight of pear. *Biological Control*, 22, 66–71.
- Meyer, J. M., & Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification, and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 107, 319–328.

- Mikićinski, A., Sobiczewski, P., & Berczyn'ski, S. (2008). Selection of bacteria from epiphytic populations on apple trees and soil environment for ability to control fire blight (*Erwinia amylovora*). *Phytopathologia Polonica*, *47*, 43–55.
- Mikićinski, A., Sobiczewski, P., Puławska, J., & Malusa, E. (2016). Antagonistic potential of *Pseudomonas graminis* 49M against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Archives of Microbiology*, *198*, 531–539.
- Neilands, J. B. (1981). Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry*, *50*, 715–731.
- Norelli, J. L., Jones, A. L., & Aldwinckle, H. S. (2003). Fire blight management in the twenty-first century: Using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, *87*, 756–765.
- Novinscak, A., Gadkar, V. J., Joly, D. L., & Fillion, M. (2016). Complete genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300, a disease-suppressive bacterium with antagonistic activity toward fungal, oomycete, and bacterial plant pathogens. *Genome Announcements*, *4*(1), e01623–e01615 1–2.
- Ohike, T., Matsukawa, T., Okanami, M., Kajiyama, S.-i., & Ano, T. (2018). *In vitro* and *in vivo* assay for assessment of the biological control potential of *Streptomyces* sp. KT. *Journal of Plant Studies*, *7*(1), 1–18.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, *28*, 449–461.
- Paulin, M. M., Novinscak, A., Lanteigne, C., Gadkar, V. J., & Fillion, M. (2017). Interaction between 2,4-diacetylphloroglucinol- and hydrocyanide-producing *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the tomato rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*, e00073–e00017. <https://doi.org/10.1128/AEM.00073-17>.
- Piqué, N., Miñana-Galbís, D., Merino, S., & Tomás, J. M. (2015). Virulence factors of *Erwinia amylovora*: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*, 12836–12854.
- Pocard, J. A., Smith, L. T., Smith, G. M., & Le Rudulien, D. (1994). A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *Journal of Bacteriology*, *176*, 6877–6884.
- Pourcel, C., Minandri, F., Hauck, Y., D'Arezzo, S., Imperi, F., Vergnaud, G., & Visca, P. (2011). Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in acinetobacter baumannii and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(2), 539–548.
- Pusey, P. L., & Wend, C. (2012). Potential of osmoadaptation for improving *Pantoea agglomerans* E325 as biocontrol agent for fire blight of apple and pear. *Biological Control*, *62*, 29–37.
- Rabhi, N. H. (2011). Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Thes Mag, *Gen microbiol*. Univ Setif :121.
- Refahi, M., Baghaee-Ravari, S., & Mahdikhani-Moghaddam, E. (2017). Exploring possible variation among Iranian *Erwinia amylovora* strains using multilocus typing and tandem repeat analysis. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *19*, 745–754.
- Rhodes, M. E. (1958). The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. *Journal of General Microbiology*, *18*, 639.
- Roselló, G., Bonaterra, A., Francés, J., Montesinos, L., Badosa, E., & Montesinos, E. (2013). Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. *European Journal of Plant Pathology*, *137*, 621–633.
- Sasirekha, B., & Srividya, S. (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*, *50*, 250–256.
- Schaad, N. W., Hildebrand, D. C., Schoth, M. N., & Sands, D. C. (1988). In plant pathologic bacteria, laboratory guide for identification. ed N°02. N. W. APS Minnesota. USA. 37–53.
- Schouls, L. M., Spalburg, E. C., van Luit, M., Huijsdens, X. W., Pluister, G. N., et al. (2009). Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus Aureus*: Comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spotyping. *PLoS One*, *4*(4), e5082.
- Sebahia, M., Bocsanczy, A. M., Biehl, B. S., Quail, M. A., Pema, N. T., Glasner, J. D., DeClerck, G. A., Cartinhour, S., Schneider, D. J., Bentley, S. D., Parkhill, J., & Beer, S. V. (2010). Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *Journal of Bacteriology*, *192*, 2020–2021.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, *40*, 175–179.
- Stockwell, V. O., Johnson, K. B., & Loper, J. E. (2001). Enhancement of biocontrol of fire blight with an iron chelate. *Phytopathology*, *91*, S86.
- Stonier, T. (1960). *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology*, *79*, 889–898.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N., & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, *72*, 917–918.
- Taylor, A. J., & Joshi, H. B. (2012). Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. *Journal of Environmental Research and Development*, *6*, 688e694.
- Temple, T. N., Stockwell, V. O., Loper, J. E., & Johnson, K. B. (2004). Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* A506 on flowers of pear and apple. *Phytopathology*, *94*, 1286–1294.
- Ülke, G., & Inar, Ö. (1999). Biological control studies on fire blight caused by *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. *Acta Horticulturae*, *489*, 611–614.
- van der Zwet, T., & Beer, S. (1995). Fire blight: Its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. USDA Agricultural Information Bulletin, No. 631.
- Vanneste, J. L., Paulin, J. P., & Expert, D. (1990). Bacteriophage mu as a genetic tool to study *Erwinia amylovora* pathogenicity and hypersensitive reaction on tobacco. *Journal of Bacteriology*, *172*(2), 932–941.

- Wilson, M., & Lindow, S. E. (1993). Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 and *Erwinia amylovora* in pear flowers. *Phytopathology*, *83*, 117–123.
- Yaich, M., Fatmi, M., Mougisiba, M., Valentini, F., Scuderi, G., D'Onghia, A. M., & Cirvilleri, G. (2011). Fire blight (*Erwinia amylovora* [Burrill] Winslow) in Morocco: importance, geographical distribution and characterization. *Phytopathologia Mediterranea*, *50*, 212–227.
- Zhang, X. Q., Bishop, P. L., & Kupferle, M. J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology*, *37*, 345–348.
- Zhao, Y., Blumer, S. E., & Sundin, G. W. (2005). Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *Journal of Bacteriology*, *187*, 8088–8103.