

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Phytopathologie

**ANTAGONISME BACTERIEN SUR DES SOUCHES D'*ERWINIA*
SPP. PECTINOLYTIQUES AGENTS DE LA POURRITURE MOLLE
DE LA POMME DE TERRE.**

Par

Alim Djamila

Devant le jury composé de :

S.E. SNOUSSI	Professeur USD. Blida	Président
Z.KRIMI	Professeur USD. Blida	Promotrice
M.LOUANCHI	Maître de Conférences (ENSA) EL Harrach	Examinatrice
F.KARA. TOUMI	Maître de conférences USD. Blida	Examinatrice
Z.DJAZOULI	Maître de conférences USD. Blida	Examineur
H.BOUTOUMI	Maître de conférences USD. Blida	Examineur-Invité

Blida, Novembre 2011.

RESUME

ANTAGONISME BACTERIEN SUR DES SOUCHES D'*ERWINIA* SPP. PECTINOLYTIQUES AGENTS DE LA POURRITURE MOLLE DE LA POMME DE TERRE.

Cette étude a été effectuée afin d'évaluer le pouvoir antibactérien d'isolats endophytes issus de cinq plantes spontanées, envers une collection de souches virulentes d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques. Nous avons entrepris ce travail par une caractérisation plus raffinée des souches d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques qui a permis d'identifier 9 souches appartenant à *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 2 souches appartenant à *Erwinia chrysanthemi* et une souche faisait partie de la sous-espèce *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*.

La réalisation du test d'hypersensibilité sur le tabac nous a permis d'écarter les isolats endophytes présentant un pouvoir pathogène. Une analyse biochimique discriminante des endophytes sélectionnés a révélée la présence de 11 isolats à Gram négatif et 10 isolats à Gram positif. L'identification moléculaire par amplification de la séquence d'ADNr du 16S et son séquençage à l'aide du logiciel Blast, nous a permis de confirmer l'affiliation de treize isolats endophytes à trois genres majeurs ; *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., et *Curtobacterium* spp.

Le pouvoir antagoniste *in vitro* a montré une forte activité antibactérienne des différents isolats endophytes avec des zones d'inhibition atteignant 45 mm, révélant ainsi la présence d'un groupe très actif. Le test d'antagonisme *in vivo* réalisé sur trois variétés de pomme de terre a permis de confirmer les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro*. Afin de minimiser les pertes engendrées par les *Erwinia carotovora* pectinolytiques, la production de bioéthanol à partir de pommes de terre pourries semble tout à fait possible et le rendement a aussi été très encourageant. Les résultats obtenus montrent une production de 3,24 g d'éthanol par 100 g de pommes de terre pourries.

Mots clés : *Erwinia carotovora*, antagonisme, lutte biologique, virulence, endophytes, pourriture molle, bioéthanol.

ABSTRACT

BACTERIAL ANTAGONISTS ON STRAINS OF *ERWINIA* SPP. PECTINOLYTIC SOFT ROT AGENTS OF THE POTATO.

This study was conducted to evaluate the antibacterial activity of endophytic isolates from five wild plants, to a collection of virulent strains of pectinolytic *Erwinia carotovora*. We undertook this work with a more refined characterization of strains of pectinolytic *Erwinia carotovora* has identified nine strains belonging to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, two strains belonging to *Erwinia chrysanthemi* and one strain belonged to the subspecies *E. carotovora* subsp. *atroseptica*.

The realization of hypersensitivity test on tobacco has allowed us to remove the endophytic isolates with pathogenicity. Biochemical analysis of discriminant selected endophytes revealed the presence of 11 isolates Gram-negative and gram-positive isolates 10. Molecular identification of the sequence by amplification of 16S rDNA sequencing and using the Blast program, we confirmed the affiliation of thirteen isolates endophytes in three major genres; *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. and *Curtobacterium* spp.

The Power antagonist *in vitro* showed strong antibacterial activity of different isolates of endophytes with inhibition zones of up to 45 mm, revealing the presence of a very active group. The *in vivo* antagonism test carried out on three varieties of potato confirmed the results of the antibacterial activity *in vitro*. The production of bioethanol from rotten potatoes seems quite possible and performance was also very encouraging. The results show a production of 3.24 g ethanol per 100 g of rotten potatoes.

Keywords: *Erwinia carotovora*, antagonism, biological control, virulence, endophytes, soft rot, bioethanol.

ملخص

النشاط ضد بكتيري على سلالات *Erwinia carotovora* عامل التعفن اللين لدرنات البطاطا

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط الضد بكتيري لعزلات البكتيريا الداخلية التي تعيش في مختلف أنسجة

5 نباتات برية لسلالات *Erwinia carotovora* التي تعتبر الأكثر شراسة.

أجري هذا العمل باستخدام خصائص أكثر دقة لسلالات *Erwinia carotovora* و الذي سمح تحديد 9 سلالات تنتمي الى *Erwinia carotovora subsp carotovora* ، سلالتين تنتميان الى *Erwinia chrysanthemi* و سلالة واحدة منتمية إلى نوع *Erwinia carotovora subsp atroseptica*

تحقيق إختبار فرط الحساسية على التبغ ، مكننا من إستبعاد 16 عزلة للبكتيريا الداخلية الممتلثة للقدرة الإمراضية . أخضعت العزلات المختارة إلى تحاليل بيوكيميائية مختلفة، 11 عزلة من البكتيريا الداخلية هن عزلات Gram سلبي مع 5 ملامح بيوكيميائية إضافة إلى 10 عزلات بكتيريا داخلية تنتمي إلى Gram إيجابي مقسمة إلى 4 ملامح بيوكيميائية

أتاح لنا التعريف الجزيئي عن طريق تحليل تسلسل ADN16S باستخدام برنامج Blast بتعريف 13 عزلة بكتيريا داخلية.

تم تنفيذ دراسة القدرة الإمراضية *in vitro* بواسطة تقنية البقع ، هذه الأخيرة أظهرت نشاطا كبيرا مضاد للبكتيريا لمختلف عزلات البكتيريا الداخلية و بذلك كشفنا وجود مجموعة عزلات بكتيريا داخلية نشطة للغاية ضد معظم سلالات *Erwinia carotovora* والبعض منها تم إختباره في 3 أصناف بطاطا (Desirée, Bartina , Spunta).

إنتاج البيوإثانول من البطاطا الفاسدة يبدو ممكننا جدا كما أن المردود كان مشجعا للغاية حيث أظهرت النتائج إنتاج 3.24 غ إيثانول لكل 100 غ من البطاطا الفاسدة.

الكلمات المفتاحية:

نشاط ضد بكتيري. المكافحة البيولوجية . القدرة الإمراضية . بكتيريا داخلية. بيوإيثانول

ملخص

النشاط ضد بكتيري على سلالات *Erwinia carotovora* عامل التعفن اللين لدرنات البطاطا

Erwinia carotovora

Remerciements

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

Professeur **Krimi** qui a accepté de me confier ce travail et veiller à son élaboration. Je garderai toujours les meilleurs souvenirs de votre immense savoir et de votre sens du devoir. C'est avec un grand honneur et une extrême fierté que je vous adresse mes remerciements au Qu'il me soit permis de vous exprimer ici mon profond respect et mon intense admiration pour vos qualités humaines exceptionnelles je vous dédie ce travail.

Professeur **SNOUSSI**, Vous m'avez porté honneur en acceptant de présider le jury de ce travail et d'y apporter l'éclairage du scientifique. Qu'il me soit permis de vous exprimer mon estime et ma sincère reconnaissance.

Je remercie également les membres du jury Madame **KARA TOUMI** et Madame **LOUANCHI** d'avoir pris la peine d'évaluer ce travail. J'en suis très honorée Chacun d'eux mérite un remerciement plus particulier.

Un grand merci s'adresse au Docteur **DJAZOULI Z. E** pour avoir accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteur mais aussi pour tous vos conseils et vos orientations durant mon cursus universitaire Vous m'avez impressionné par votre rigueur scientifique, votre personnalité et vos qualités humaines. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude, mon grand respect et ma très haute considération.

Je remercie Docteur **BOUTOUMI** pour l'aide qui a porté. Qu'il me soit permis de vous exprimer ma sincère reconnaissance.

Dédicaces

A mes très chers parents

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant mes longues années d'études. Je n'aurais jamais espéré avoir de meilleurs parents. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité. Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.

A ma sœur FARAH qui était toujours là pour moi en tant que sœur mais aussi en tant que ma meilleure amie, Il n'y a pas assez de place pour exprimer ce que je ressens pour toi.

A mes frères: Djamel et amine

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

À HAFIDHA pour avoir pleinement occupé mon quotidien. Vous avez été avec moi depuis le début et nous avons partagé tant de moments particuliers et dans toutes sortes de situations, des plus simples au plus compliquées., sorties culturelles en tout genre, musique, Joies, rires, pleurs, colères.

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

INTRODUCTION.....	8
CHAPITRE 1 : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1. <i>Erwinia carotovora</i> spp. agents de la macération des tissus végétaux.....	11
1.1 Caractéristiques d' <i>Erwinia carotovora</i>	12
1.2 Processus infectieux d' <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	14
1.3 Facteurs de pathogénicité.....	14
1.3.1 Enzymes extracellulaires.....	14
1.3.2 Le quorum sensing.....	17
1.4 Autres facteurs affectant la pathogénie chez <i>Erwinia</i> spp. pectinolytiques.....	18
1.4.1 La motilité.....	18
1.4.2 Les lipopolysaccharides.....	18
1.4.3 Les sidérophores.....	19

1.4.4 Les systèmes de sécrétions.....	20
1.4.5 Les gènes <i>hrp</i>	22
1.5 Plantes-hôtes.....	22
1.6 Symptomatologie de la pourriture molle et de la jambe noire sur la pomme de terre.....	22
1.6.1 En végétation.....	22
1.6.2 Sur tubercules.....	23
1.7 Facteurs favorisant l'infection.....	23
1.7.1 Températures.....	23
1.7.2 Humidité.....	23
1.7.3 Influence du pH.....	24
1.8 Cycle de la maladie.....	24
1.9 Moyens de contrôle de la pourriture molle.....	25
1.9.1 La lutte chimique.....	25
1.9.2 Les cultivars résistants.....	26
1.9.3 Utilisation des sels.....	27
1.9.4 Utilisation des bactériophages.....	27
2. La lutte biologique, une alternative aux pesticides conventionnels.....	28
2.1 Définitions.....	28
2.2 Le secteur du biopesticide.....	29
2.3 Les interactions biologiques.....	30
2.3.1 Interactions endophytiques et contributions à la lutte biologique.....	30
2.3.2 La promotion de la croissance.....	33

2.3.3 Médiation de l'induction de la résistance de l'hôte.....	33
3. Les bactéries endophytes.....	35
3.1 Origine et biodiversité des bactéries endophytes.....	36
3.2 Endophytisme et antagonisme bactérien.....	37
3.2.1 L'hyperparasitisme et la prédation.....	37
3.2.2 Les antibiotiques.....	37
3.2.3 Les sidérophores.....	39
3.2.4 Les enzymes lytiques et autres sous-produits.....	40
3.2.5 La compétition.....	41
3.3 Les bactéries antagonistes des <i>Erwinia</i> spp. pectinolytiques et leur utilisation comme agents de lutte biologique.....	41
3.4 La signalisation quorum-sensing chez <i>Pectobacterium</i> spp. et les nouvelles perspectives de lutte.....	41
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	44
1. Matériel bactérien.....	44
1.1 Origine des isolats antagonistes.....	44
1.2 Inoculum et souches d' <i>Erwinia carotovora</i> étudiées.....	44
2. Identification biochimique raffinée des souches d' <i>Erwinia carotovora</i>	45
2.1 Le test d'oxydase	45
2.2 Le test catalase	45
2.3 Fermentation du glucose.....	45
2.4 Transformation du sucrose.....	46
2.5 Production d'indole.....	46

2.6 Croissance à 35°C sur milieu YS.....	46
3. Caractérisation des isolats endophytes antagonistes.....	46
3.1 La réaction d'Hypersensibilité.....	46
3.2 Caractérisation biochimiques des isolats endophytes.....	47
3.2.1 Coloration de Gram.....	47
3.2.2 Production de pigment fluorescent sur milieu B de King.....	47
3.2.3 Le test Arginine déshydrolase.....	47
3.2.4 La production de levane.....	48
3.2.5 Liquéfaction de la gélatine.....	48
3.2.6 L'hydrolyse de l'amidon.....	48
3.3 Identification par utilisation du marqueur moléculaire l'ADNr 16S.....	48
3.3.1 Mise en culture et extraction de l'ADN.....	49
3.3.2 Amplification par PCR.....	49
3.3.3 Séquençage des fragments amplifiés.....	49
4. Mesure de la densité optique nécessaire pour la réalisation des tests d'antagonisme.....	49
5. Le test d'antagonisme <i>in vitro</i>	51
5.1 Dépôt des spots des isolats endophytes.....	51
5.2 Préparation des suspensions bactériennes pour le 'spray'.....	51
5.3 Lecture des résultats.....	51
6. Test d'antagonisme <i>in vivo</i>	52
6.1 Matériel végétal.....	52
6.2 Les isolats endophytes.....	52

6.3 Méthodologie.....	52
6.3.1 Désinfection et inoculation des disques.....	52
6.3.2 Méthode d'inoculation.....	52
6.4 Les paramètres étudiés.....	53
7. Analyse statistique des résultats.....	54

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....55

1. Caractérisation biochimiques et affiliation en pathovars des souches d' <i>Erwinia carotovora</i> pectinolytiques.....	55
2. Caractérisations des isolats endophytes antagonistes.....	56
2.1 La réaction d'Hypersensibilité.....	56
2.2 Caractérisation biochimique des isolats endophytes.....	57
2.3 Identifications moléculaire par l'utilisation de l'ADNr 16S.....	60
3. Antagonisme <i>in vitro</i>	61
3.1 Analyse statistiques des résultats.....	64
3.1.1 Analyse de la variance.....	64
3.1.2 Etude des corrélations du pouvoir antibactérien des isolats endophytes et des souches d' <i>Erwinia carotovora</i> sp.....	65
4. Test d'antagonisme <i>in vivo</i>	69

CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....76

1. Virulence, hypervirulence et diversité spécifique et phénotypique des <i>Pectobacteria</i> , une espèce d' <i>Erwinia carotovora</i> spp. émergente.....	77
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

2. D'une diversité phénotypique des endophytes à une différenciation biochimique et moléculaire.....	79
3. Réaction hypersensible et virulence cryptique de certaines bactéries endophytes.....	82
4. Antagonisme <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des isolats endophytes envers les souches d' <i>Erwinia carotovora</i> spp. pectinolytiques.....	84
4.1 L'endophytisme bactérien et l'induction des réponses de résistance locale et/ou systémique chez les variétés de pomme de terre étudiées.....	88
4.2 Un brouillage du signal ou panne de communication ?.....	90
4.3 L' α -amylase, un facteur favorisant le développement de la pourriture molle.....	92

CHAPITRE 5 : VALORISATION DES SOUS-PRODUITS DE LA POURRITURE MOLLE POUR LA PRODUCTION DU BIOETHANOL.....

1. Matériels et méthodes.....	95
1.1 L'hydrolyse enzymatique.....	95
1.2 La fermentation alcoolique.....	96
1.3 La distillation.....	97
1.4 Présence d'éthanol.....	97
1.5 Vérification de la pureté.....	98
2. Résultats et discussion.....	98
2.1 Dosage du bioéthanol.....	99
2.2 Discussion.....	100

CONCLUSION GENERALE.....

APPENDICES.....108

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES123

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 Les événements possibles qui se tiennent lieu au cours de l'infection des plantes par les <i>Erwinia</i> spp. pectinolytiques.....	16
Figure 1.2 Structure du Lipopolysaccharides.....	19
Figure 1.3 Résumé des systèmes connus de la sécrétion bactérienne.....	21
Figure 1.4 Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne.....	24
Figure 1.5 Le marché mondial des biopesticides et des pesticides synthétiques, 2003-2010.....	30
Figure 1.6 Schéma des différentes interactions plante-bactéries endophyte qui ont été étudiés et leurs applications.....	33
Figure 1.7 Application de l'AFP (Autofluorescent protein) pour l'étude de l'interaction endophyte-plante.....	35
Figure 3.1 Réaction d'hypersensibilité sur feuilles de tabac 48 h après l'inoculation.....	57
Figure 3.2 Réaction de quelques isolats aux différents tests biochimiques.....	58
Figure 3.3 Pouvoir antibactérien de quelques isolats bactériens endophytes sur des souches d' <i>Erwinia carotovora</i> spp. représentés par les zones d'inhibition.....	62
Figure 3.4 Variation du diamètre des zones d'inhibition en fonction des isolats endophytes et des souches d' <i>Erwinia carotovora</i>	65
Figure 3.5 Cercle de corrélation du pouvoir antibactérien des isolats endophytes.....	66
Figure 3.6 Classification ascendante hiérarchique des différents isolats endophytes.....	67
Figure 3.7 Analyse en composantes principales (ACP) des 20 isolats endophytes à l'égard des 12 souches d' <i>Erwinia carotovora</i>	69
Figure 3.8 Réponses des trois variétés de pomme de terre au traitement des isolats endophyte.....	71
Figure 3.9. Effet des isolats endophytes sur le développement de la pourriture molle.....	73
Figure 3. 10. Effet du choix de la variété de pomme de terre sur le développement de la pourriture molle.....	73
Figure 3. 11. Effet des isolats antagonistes endophytes et variétés de pomme de terre sur le développement de la pomme de terre.....	74

Figure 3. 12. Effet du trempage des disques de pomme de terre dans la suspension d'antagoniste sur l'expression des souches d' <i>Erwinia carotovora</i>	75
Figure 3. 13. Action des souches OR2 et OS4 dans l'établissement de la pourriture molle.....	76
Figure 5.1 Procédé de fabrication de bioéthanol.....	95
Figure 5.2 Schéma des principales étapes pour la production du bioéthanol.....	96
Figure 5.3 Schéma du dispositif de distillation.....	97
Figure 5.4 Réaction des dichromates de potassiums en présence d'éthanol.....	99
Figure 5.5 Calcul de la densité optique de la solution distillée.....	100
Tableau 1.1 Caractéristiques biochimiques et physiologiques d' <i>Erwinia carotovora</i>	13
Tableau 1.2 Les déterminants bactériens et les types de résistance de l'hôte induite par des agents de lutte biologique.....	34
Tableau 1.3 Groupes d'antibiotiques produits par les agents de lutte biologique.....	39
Tableau 3.1 Caractérisation en pathovars des souches d' <i>Erwinia carotovora</i> pectinolytiques.....	56
Tableau 3. 2. Caractérisation biochimique des différents isolats.....	59
Tableau 3.3. Résultats des isolats endophytes identifiés par analyse de l'ADNr 16S.....	60
Tableau 3.4 Résultats du test d'antagonisme des isolats endophytes antagonistes envers les souches d' <i>Erwinia carotovora</i> les plus virulentes.....	63
Tableau 3.5. Modèle ANOVA appliqué aux souches d' <i>Erwinia carotovora</i> spp. sur le diamètre d'inhibition des isolats endophytes.....	64
Tableau 3.6. Modèle ANOVA appliqué aux effets des isolats endophytes antagonistes et les souches d' <i>Erwinia carotovora</i> en réponse au développement des symptômes de pourriture molle sur les variétés de pomme de terre testées.....	72

INTRODUCTION

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) est cultivée dans plus de 150 pays sur une superficie de 20 millions d'hectares et une production moyenne de 323 millions de tonnes. Elle occupe le quatrième rang mondial des productions végétales après le riz, le blé et le maïs [1]. Cette denrée constitue une bonne source d'énergie et d'acides aminés essentiels, absents chez plusieurs légumes et céréales [2 ; 3]. Elle présente également une teneur non négligeable en vitamine C et en minéraux [3]. Ces caractéristiques font de la pomme de terre le produit végétal le plus équilibré sur le plan nutritionnel parmi les produits alimentaires de base à travers le monde [3].

La pomme de terre représente l'une des productions végétales les plus affectées par les maladies en raison de son mode de multiplication végétative qui favorise le maintien et la propagation des germes d'agents pathogènes [4]. Cette dernière caractéristique fait de cette culture l'une des plus traitées par les pesticides [5].

Parmi les maladies qui nuisent à la culture de la pomme de terre, la pourriture molle causée par *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* et *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Ces bactéries qui présentent un arsenal d'enzymes de dégradation des parois végétales, peuvent causer des dommages importants sur les tubercules entreposés [1]. Bien qu'on n'a jamais estimé de façon précise les pertes directes et indirectes associées à cette maladie, en général lorsqu'un entrepôt est affecté par cette maladie, les pertes considérables peuvent atteindre plus des 2/3, voire la totalité des tubercules entreposés [6].

Les produits phytosanitaires sont très actifs pour combattre les agents pathogènes. Néanmoins, ils présentent également beaucoup d'inconvénients. Leur coût est très élevé et certains produits présentent une toxicité aiguë ou chronique pour l'homme et les organismes non cibles [7]. De plus, les agents pathogènes peuvent devenir résistants à ces produits chimiques. Ceci a entraîné l'arrêt de commercialisation de certains fongicides [8].

Les impératifs de rentabilité qui imposent des rendements élevés et des produits de qualité, dans ces systèmes, font de la protection des plantes une activité vitale. La maîtrise de ces parasites n'est accomplie qu'au prix d'interventions phytosanitaire fréquentes. Celles-ci présentent, par contre, des effets néfastes sur l'environnement et favorisent le développement de souches résistantes. La prise de conscience du coût environnemental de ces pratiques et les craintes du danger que peuvent constituer les résidus de pesticides pour leurs toxicité aiguë ou chronique auprès de l'homme et des organismes non cibles [7], font naître un intérêt grandissant pour d'autres alternatives de lutte [9].

Cette alternative consiste à utiliser des microorganismes pouvant être antagonistes des agents pathogènes et / ou éliciteurs des plantes [10]. Néanmoins, il est important de prendre en compte que ces microorganismes peuvent également stimuler directement la croissance des plantes. Du point de vue de l'agriculture, ces micro-organismes ont ainsi suscité un très grand intérêt [11].

La plupart de ces micro-organismes dérivent de la rhizosphère, entourant le système racinaire où des populations microbiennes sont en relation avec la plante [12]. Certains de ces micro-organismes sont épiphytiques, tandis que d'autres sont endophytes. Les bactéries endophytes peuvent être définies comme des bactéries qui colonisent les tissus internes de la plante ne montrant aucun signe visible d'une infection ou d'un effet négatif sur leur hôte [13 ; 14], elles colonisent une niche écologique semblable à celle des phytopathogènes, ce qui les rend appropriés comme des agents de lutte biologique [15].

Les bactéries endophytes vivant dans les tissus sains des plantes sont relativement une source potentielle et un produit naturel pour des fins

d'exploitation dans l'agriculture, la médecine, et d'autres industries [16]. En effet, certaines souches appartenant au genre *Alcaligenes*, *Kluyvera*, *Burkholderia* et *Bacillus* se sont dévoilés être des agents efficaces dans le cadre de la lutte biologique [17 ;18].

Dans le cadre de recherches portées sur la valorisation des plantes spontanées et de leurs microflore endophytes menées au laboratoire de phytobactériologie [19], le présent travail constitue une continuation visant à exploiter le pouvoir antagoniste de ces bactéries endophytes envers la collection de souches d'*Erwinia carotovora* spp. pectinolytiques.

Les objectifs de ce travail cernent les aspects suivants :

- Identification poussée des souches d'*Erwinia carotovora* préalablement caractérisées comme les plus virulentes
- Réalisation du test d'hypersensibilité sur tabac, sur les isolats endophytes afin d'écartier ceux qui présentent un pouvoir phytopathogène ou pathogène
- Une caractérisation biochimique des isolats endophytes complétée et confirmée par une étude moléculaire
- L'étude du pouvoir antibactérien des isolats endophytes *in vitro*
- Sélection des souches antagonistes les plus performantes *in vitro* et étude de leur activité *in vivo* sur une collection de trois variétés de pomme de terre vis-à-vis des souches hypervirulentes d'*Erwinia carotovora*
- Enfin, un essai de valorisation des sous produits issus de la pourriture molle d'origine pectinolytique pour la production d'éthanol.

CHAPITRE 1

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Erwinia carotovora* spp. agents de la macération des tissus végétaux

Les cultures de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et les tubercules récoltés sont sujets à de nombreuses agressions bactériennes. Il s'agit de bactéries appartenant notamment aux genres *Clavibacter*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*, et *Streptomyces*. Parmi ces derniers, un regain d'intérêt est accordé aux bactéries macergènes appartenant au genre *Pectobacterium*, plus connues sous le nom d'*Erwinia carotovora*.

Les bactéries *Pectobacterium atrosepticum* et *Pectobacterium carotovorum* (anciennement *E. carotovora* subsp. *atroseptica* et *E. carotovora* subsp. *carotovora*) sont des pathogènes de qualité qui provoquent des pertes au champ et lors de la conservation des tubercules (pourritures molles). En végétation, ces bactéries sont responsables d'attaques précoces du tubercule mère et des germes empêchant la levée, ou d'attaques plus tardives comme la maladie de la jambe noire [20].

Outre les baisses de rendement des cultures, les tubercules récoltés atteints de pourriture molle peuvent engendrer des pertes importantes lors du stockage par une contamination rapide des tubercules avoisinants.

Les tubercules jouant aussi le rôle de semence, des tubercules contaminés, même sans symptôme visible (porteurs sains), peuvent disséminer la maladie au champ lors des phases de multiplication des plants. Ces maladies affectent donc toutes les étapes de la filière pomme de terre : la production et la certification des plants, comme la production de pomme de terre de consommation ou de transformation alimentaire ou industrielle [5].

Les pertes économiques causées par la recrudescence de ces maladies bactériennes et l'absence de moyens de lutte efficaces motivent aujourd'hui le développement de recherches multidisciplinaires visant à protéger du mieux possible les cultures de la pomme de terre [5].

1.1 Caractéristiques D'*Erwinia carotovora*

Les *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) sont des bactéries psychrotrophes qui se développent à des températures comprises entre 5 et 36 °C avec un optimum entre 27 et 30 °C. Les *E. carotovora* sont des bâtonnets (0,5-1 µm de diamètre sur 1-3 µm de longueur) Gram-négatif, mobiles (flagelles péritriches), anaérobies facultatifs et ayant une forte activité pectinolytique [21; 1].

Elles utilisent l'acétate, le citrate, le formate, le lactate, le fumarate, le gluconate, le malate et le succinate, mais non le benzoate, le malonate, l'oxalate, le propionate ou le tartrate comme sources de carbone et d'énergie [21]. Les *E. carotovora* sont oxydase négatives, mais catalase positives. Contrairement à *Ecc*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* est incapable de croître à 36 °C, cette dernière produit de l'acide à partir du maltose et de l'α-méthyle glucoside. Le tableau 1.1 résume quelques caractéristiques biochimiques et physiologiques de ces deux bactéries.

La paroi des bactéries appartenant au groupe *E. carotovora* est composée d'environ 95% de phosphatidyl éthanolamine [22]. Leur membrane externe serait principalement composée d'une couche de ce phospholipide (34% du total) recouverte à l'extérieur d'une couche de lipopolysaccharides, alors que la membrane interne serait constituée d'une bicouche du même phospholipide (65% du total) [22]. La bicouche externe de la paroi de ces bactéries a un ratio protéines/lipides de 1,20, et serait moins fluide que la bicouche interne qui a un ratio protéines/lipides de 0,89. Entre les deux membranes se trouve une mince couche de peptidoglycane [22 ; 23].

Tableau 1.1 : caractéristiques biochimiques et physiologiques d'*Erwinia carotovora*. [21].

Réaction		Production d'acide	
Réponse		Réponse à partir de :	
Production de pigment rose diffusible	-	L-Arabinose	++
Production de pigment bleu	-	Cellobiose	++
Production de pigment jaune	-	Dextrine	-
Croissance mucoïde	+	Tréhalose	++
H ₂ S à partir de la cystéine	++	Xylose	++
Substances réductrices à partir du saccharose	+	Fructose	++
Présence d'acétoïne	++	D-Galactose	++
Présence d'uréase	-	D-Glucose	++
Oxydation du gluconate	-	Glycérol	+
Production de gaz à partir du D-glucose	+	Myo-Inositol	+
Hydrolyse de la caséine	+	Inuline	-
Croissance dans du bouillon au KCN	+	Lactose	++
Liquéfaction de la gélatine	++	Maltose	+
Présence de phénylalanine déaminase	-	D-Mannitol	++
Présence d'indole	-	D-Mannose	++
Réduction du nitrate	++	Mélézitose	-
Croissance dans 5% de NaCl	++	Mélibiose	++
Présence de désoxyribonucléase	-	Raffinose	++
Présence de phosphatase	-	L-Rhamnose	++
Présence de lécithinase	-	Ribose	++
Sensibilité à l'érythromycine (15µg/disque)	-	Sorbitol	++
Amidon	-	Saccharose	++

++ : Réaction positive à 80% ou plus

+ : 21-79% de positif ; **-** : inférieur ou égal à 2% de positifs.

1.2 Processus infectieux d'*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Les *Erwinia* spp. pectinolytiques causent des dégâts importants sur les cultures de nombreux végétaux et lors de la conservation des produits issus des récoltes. L'expression de la maladie est étroitement liée aux conditions climatiques et en particulier à la température environnementale, notamment parce que la multiplication cellulaire et les activités lytiques sont thermorégulées [24; 25].

Erwinia peut rester en latence pendant plusieurs mois. Après son introduction dans la plante, sous les conditions environnementales optimales, la bactérie pénètre dans l'apoplaste y compris la présence d'eau libre, la disponibilité en oxygène et la température, qui deviennent propices au développement des maladies [26].

Le principal facteur environnemental déclenchant le développement de la maladie est la présence d'eau, ce qui conduit à l'anaérobiose et la dépréciation de la résistance des systèmes dépendant de l'oxygène de l'hôte [27]. D'une manière générale, la maladie tend à se développer que lorsque la résistance de l'hôte est affaiblie par d'autres causes.

1.3 Facteurs de pathogénicité

Les enzymes extracellulaires représentent les principaux facteurs contrôlant la virulence des *Erwinia* spp. Pectinolytiques. Cependant, le *quorum sensing* détient la clef de la régulation contrôlant ainsi la sécrétion de ces enzymes extracellulaires.

1.3.1 Enzymes extracellulaires

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* produit diverses pectinases, enzymes dégradant la paroi cellulaire et des cellulases qui sont secrétées selon le système de sécrétion de Type II, et des protéases secrétées à leur tour par le système de sécrétion de Type I [26]. Les produits de dégradation sont utilisés comme une source d'énergie et de nutriments [27; 28]. Ces enzymes sont produites de façon rapide coordonnée et en grande quantité, le résultat est une macération considérable des tissus conduisant à la mort de la plante hôte.

Les pectinases constituent les principales enzymes extracellulaires de la macération impliquées dans le développement de la maladie. Elles comprennent

les pectates lyases(Pel), pectines lyases (Pnl), les polygalacturonases (Peh) et pectines methylesterases (Pme) [26]. Une dégradation efficace de la pectine résulte de l'action concentrée de ces trois types d'enzymes [29]. Beaucoup d'entre eux existent en multiple formes, isoenzymes, codés par des gènes indépendants et qui sont considérés issus de la duplication des gènes [26].

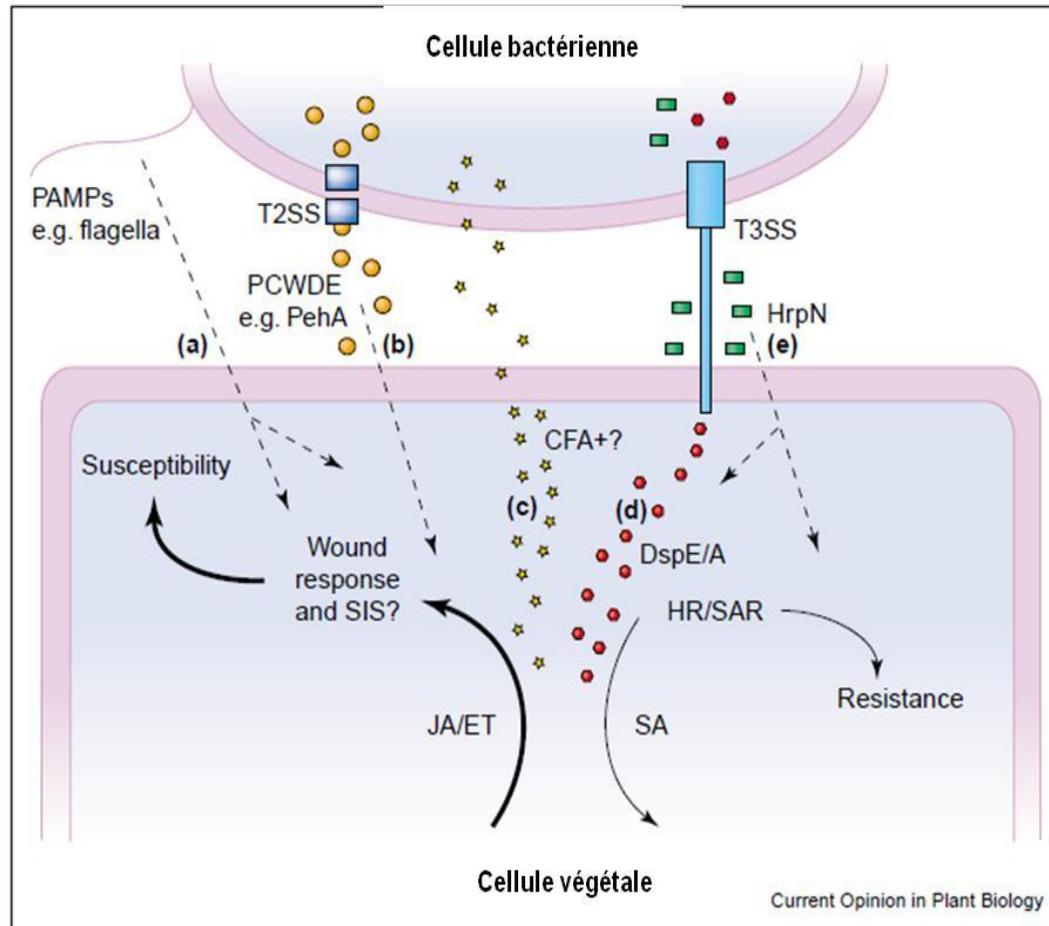


Figure 1.1 : Les événements possibles qui se tiennent lieu au cours de l'infection des plantes par les *Erwinia* spp. pectinolytiques [30].

La réussite de l'infection par les *Erwinia* pectinolytiques sur sa plante hôte est déterminée par une interaction complexe entre les produits de défense de la plante (SA, JA, ET, SAR, HR) et les stratégies de contre-défense des agents pathogènes (PAMP, PCWDE, les effecteurs du T2SS et du T3SS).

Abréviation :

PAMP: pathogène-associated molecular patterns.

PCWDE: enzymes dégradants la paroi cellulaire végétale. T2SS : system de sécrétion type 2 ; T3SS : system de sécrétion type 3 ; CFA : l'acide coronafacique.

SA : acide salicylique ; JA : acide jasmonique ; HR : réponse d'hypersensibilité ; SAR : réaction systémique acquise).

1.3.2 Le quorum sensing

Chez *Pectobacterium carotovorum* la régulation de la production des exoenzymes, les antibiotiques et du TTSS (Système De Sécrétion Type Trois) est sous le contrôle du *quorum sensing*. Ce dernier fait appel à 3 activateurs transcriptionnels qui répondent à deux types d'AHL. L'Expl homologue à *LuxI* (aussi reportée à *Carl*, *Ah1I* et *Hs1I*), fut la première enzyme auto-inductrice décrite [31].

CHATTERJEE et ses collaborateurs [76] indiquent qu'*Ecc* possède deux classes de *quorum sensing* définies par la nature d'AHL, et les caractéristiques structurales et fonctionnelles d'AHL synthase (*Ah1I*) et de l'*ExpR*. La Classe I représentée par les souches d'*E. carotovora* subsp. *atroseptica* *Eca12* et d'*E. carotovora* subsp. *carotovora* *EC153* et *SCC3193* qui produisent 3-oxo-C8-HL (*N*-3-oxooctanoyl-L-homoserine lactone) en majeur, et de faible niveau de 3-oxo-C6-HL (*N*-3-oxohexanoyl-L-homoserine lactone) mais identifiable. Par opposition, Les membres de la classe II : *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* souche *Ecb168*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* souche *Ecc71* et *SCRI193*, produit 3-oxo-C6-HL en majeur [32].

L'attaque bactérienne se déroule en 2 phases distinctes : une étape primo-invasive ou préquorum, au cours de laquelle la bactérie se multiplie au point d'infection (blessures, lenticelles, etc...) sans macérer les tissus de la plante, puis une phase lytique ou post-quorum marquée par la production massive d'une grande variété d'enzymes exocellulaires et la production d'antibiotiques « carbapen-2-em-3-carboxylic acid » dite aussi carbapenem [33].

Les carbapenems sont produites par un groupe de gènes *Car* (*carA* à *carH*) [34]. L'antibiotique présente un rôle préventif contre les autres bactéries opportunistes qui colonisent les sites d'infection au profit des nutriments [35]. Les carbapenems sont stables durant plusieurs jours à 5°C et à des pH allant de 7 à 9 mais rapidement inactifs dans des conditions de chaleur, de gel ou d'acidité [36].

Lorsque le seuil en 3-oxo-c₈-HSL est atteint, il s'attache à *ExpR1*, tandis que 3-oxo-c₆-HSL s'attache à *ExpR2*. Le complexe de ces correspondants à l'AHL inactive *ExpR1* et *ExpR2*, inhibe l'expression de *rsmA* et libère la transcription de

l'ARNm qui code pour les enzymes extracellulaires [37]. Le tableau 5 résume les différentes molécules signaux impliquées dans le *quorum sensing*.

1.4 Autres Facteurs Affectant La Pathogénie chez les *Erwinia* spp pectinolytiques

Les enzymes dégradant la paroi cellulaire végétale sont les principales causes responsables du développement des symptômes de la pourriture molle. Cependant, d'autres facteurs affectent aussi les stades précoces de l'infection, sa progression et les mécanismes de résistance de l'hôte [38]. Ces facteurs incluent la motilité, les lipopolysaccharides, les siderophores, les gènes *hrp*, les Nep1-like protéines et les peptides à activité antimicrobienne [39].

1.4.1 La motilité

La mobilité est une caractéristique importante des agents phytopathogènes dans leur habitat naturel et beaucoup d'entre eux possèdent des flagelles. La motilité semble être nécessaire pour les *Erwinia* spp. Pectinolytiques pour réussir l'invasion et l'infection des plants de pomme de terre. Les mutants d'*Erwinia carotovora subsp. carotovora* non motile présentent une virulence réduite, même si elles produisent des niveaux élevés en enzymes dégradant la paroi cellulaire [40]. L'eau libre est essentielle pour le développement optimal de la maladie et peuvent permettre aux cellules d'*Erwinia* de se déplacer plus facilement dans le tissu végétal. La motilité peut jouer un rôle important dans la contamination des tissus des tubercules au niveau des lenticelles dans les sols humides [41].

1.4.2 Les Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des complexes macromoléculaires présents de manière constitutive dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif. Sur le plan structural, les LPS sont constitués d'un lipide A et d'une partie polysaccharidique débordant la membrane externe [42].

Les lipopolysaccharides (LPS) jouent également un rôle dans l'adhérence, notamment chez *Agrobacterium tumefaciens* [43]. D'autres études mettent en évidence le rôle du LPS dans l'adhérence de *Vibrio cholerae*. En effet, un mutant dans le gène *rfp*, essentiel pour la synthèse des LPS, présente une colonisation de l'hôte mille fois moins faible par rapport à la souche parentale [44].

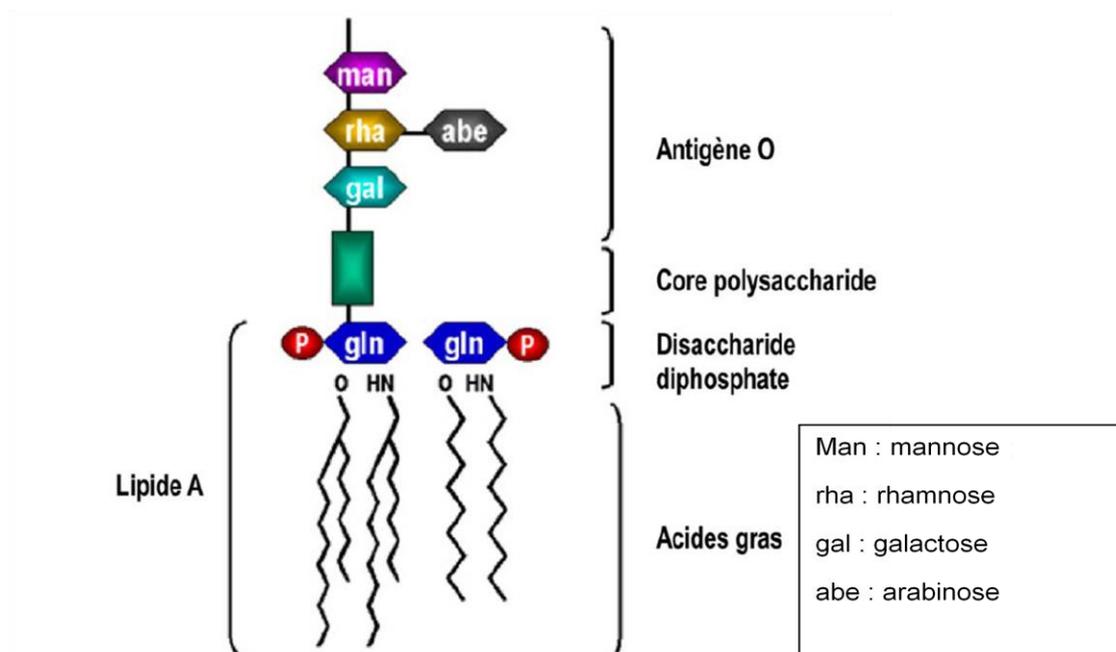


Figure 1. 2 : Structure du Lipopolysaccharides [42].

Chez les *Erwinia pectinolytiques*, les LPS fournissent une protection contre les substances antimicrobiennes de la pomme de terre, mais leur rôle est d'une moindre importance dans la pathogénicité [41]. Les mutants *d'Ecc_{SCC3193}* défectueux de LPS restent virulents, et montrent peu de sensibilité phénotypique au galactose et ils sont avirulents sur tabac et [40].

1.4.3 Les sidérophores

L'alimentation en fer représente un enjeu pour la bactérie, car cet élément est comme chez les autres organismes, un cofacteur essentiel de nombreuses réactions biochimiques et peu disponible dans les tissus biologiques [45].

Les siderophores sont de petites molécules dont de 1200 daltons, produites par les micro-organismes et certaines graminées dans leur environnement, ayant une très forte affinité pour l'ion ferrique et dont la fonction est de rendre le fer assimilable par l'organisme qui le produit. Le fer complexé au siderophores est acheminé dans la cellule par un système de transport très spécifique [45].

Chez *Erwinia carotovora*, l'acquisition du fer est postulée d'avoir une action protectrice contre le stress oxydatif, spécialement contre les niveaux élevés du fer devenu toxique qui mène à la production des formes actives d'oxygène par la

plante [95]. Chez la souche *Ecc_{W3C105}*, deux voies d'assimilation du fer mettant en jeu deux siderophores de structure différente ont été identifiés, la chrysobactine et l'aerobactine [46].

1.4.4 Les Systèmes de sécrétion

Pour réussir l'infection, il est essentiel que les enzymes dégradant la paroi végétales et les autres facteurs de virulence soient sécrétés efficacement à l'environnement extracellulaire. Les protéines sécrétées comprennent à la fois les enzymes impliquées dans l'attaque du tissu végétal et celles impliquées dans des interactions plus subtiles avec la plante hôte [26; 47].

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* possède au moins trois systèmes de sécrétion (type I-III) qui fonctionnent différemment et qui sont conservés entre les différentes espèces bactériennes. Le SSTI sécrète les métalloprotéases par un processus à une seule étape et semble avoir un effet mineur sur la virulence [48]. Le SSTII sécrète les déterminants de virulence tels que les cellulases, pectinases et les Nep1-like proteins (NLPs) par un mécanisme comprenant deux étapes. Les protéines sont exportées au périplasme par le système sec (qui transporte des protéines contenant une séquence N-terminale clivable du cytoplasme vers l'espace périplasmique) suivi par le transport extracellulaire à travers un canal couvrant le compartiment périplasmique et la membrane externe [49].

L'importance du système de sécrétion de type II chez *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* est mise en évidence dans une étude où les mutations affectant le SSTII résultant d'un phénotype avirulent [86]. Le SSTII est décrit ci-dessous (figure 1.3).

Récemment, basé sur les données génomiques de la souche d'*Eca* SCRI1043 il a été montré qu'il contient au moins trois systèmes de sécrétion indépendamment (type IV-VI) [50] (figure 1. 3). Le SSTIV est utilisé pour la translocation d'ADN et les substrats protéiques, à travers la membrane bactérienne à la cellule cible. Le SSTVI est un nouveau système de sécrétion décrit, supposé impliqué dans la virulence et la conservation de plusieurs pathogènes. Chez *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, il a été montré qu'il sécrète des protéines effectrices potentielles, telles que Hcp et V grG [51].

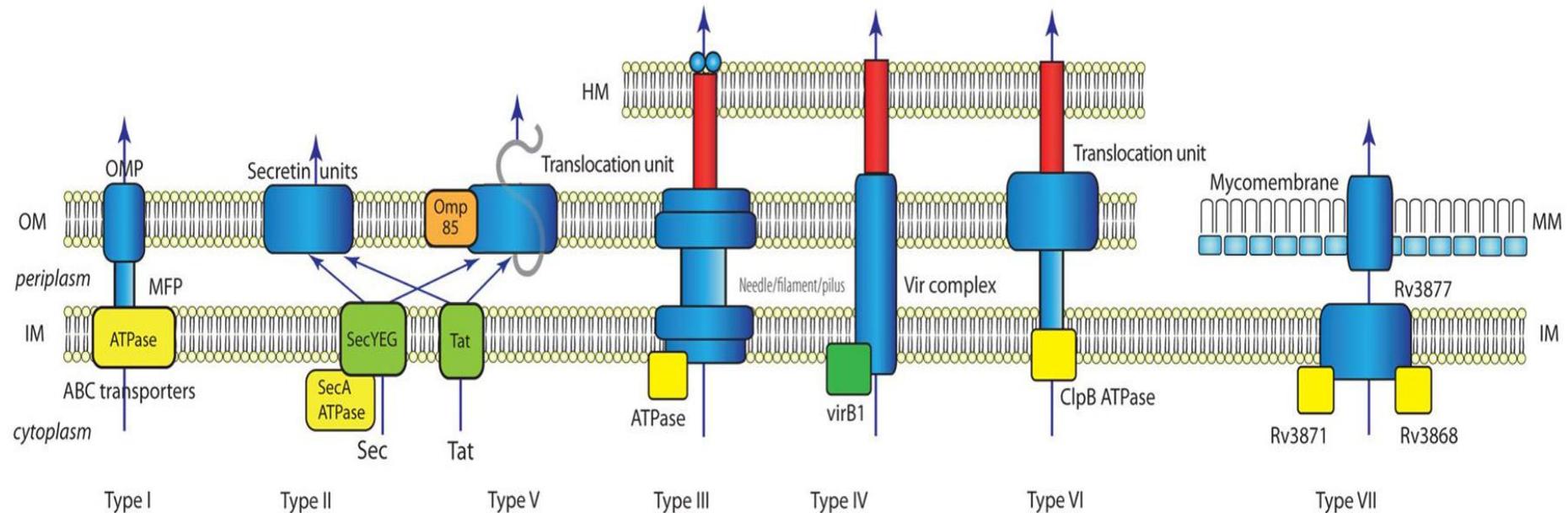


Figure 1.3: Résumé des systèmes connus de la sécrétion bactérienne [52].

HM : membrane de l'hôte ; **OM** : membrane externe ; **IM** : membrane interne ; **MM** : mycomembrane ; **OMP** : protéines de la membrane externe ; **MFP** : Protéines membranaires. ATPase et les chaperonnes sont représentés en jaune.

La **Figure 1. 3** résume les principales caractéristiques des systèmes de sécrétion connus. Chez les bactéries Gram-négatives, Certaines protéines sécrétées sont exportés à travers les membranes interne et externe en une seule étape par l'intermédiaire des voies de sécrétions de type I, type III, type IV ou VI. D'autres protéines sont d'abord exportés dans l'espace périplasmique via le system Sec ou le system (Tat), puis transporté à travers la membrane externe via le system de sécrétion de type II, type V ou, moins fréquemment, le type I ou de type IV. Cependant, chez les bactéries Gram-positives, comme les mycobactéries qui ont une couche hydrophobe, la paroi cellulaire est presque imperméable, le système de sécrétion type VII est spécialisé dans la translocation des protéines à travers la membrane et la paroi cellulaire par un canal (encore mal définie), toutefois, les étapes du processus de sécrétions reste imprécise.

1.4.5 Les Gènes *hrp*

Erwinia carotovora parvient à injecter ces facteurs de virulence directement dans les cellules végétales. Pour cela, cette bactérie a développé un système multiprotéique d'une haute complexité c'est un système de sécrétion de **type III** (TTSS, pour Type Three Secretion System) [53].

En effet, le pouvoir pathogène d'*Erwinia carotovora* dépend de ce système de sécrétion. Sans leur TTSS, ces bactéries sont incapables de se multiplier dans la plante hôte et de développer les symptômes sur le tabac, ainsi que la réaction hypersensible (HR) sur une plante non hôte ou résistante. Chez les bactéries à Gram négatif, cette faculté réside dans un groupe de gènes [54].

1.5 plantes-hôtes

Les espèces appartenant à *pectobacterium spp.* provoquent une pourriture molle qui dégrade les organes charnus. Ces bactéries se caractérisent par un spectre d'hôte très important, et elles sont donc dites: Polyphages. Dans la région OEPP, l'intérêt s'est surtout porté sur la pomme de terre ainsi que sur les plantes ornementales en tant que plantes hôtes à cette bactérie polyphages [55].

1.6 Symptomatologie de la pourriture molle et de la jambe noire sur la pomme de terre

1.6.1 En Végétation

Les symptômes causés par les *Pectobacterium spp.* s'expriment en végétation et/ou en conservation. L'apparition et la nature des symptômes dépendent essentiellement des conditions environnementales (température, humidité). Les manques à la levée, résultant de la pourriture précoce du tubercule de semence ou de l'attaque des germes avant ou lors de l'émergence peuvent s'observer rapidement après la plantation [55].

Le symptôme le plus typique est celui de la jambe noire, variant d'une pourriture humide brun foncé à noire de la base des tiges à des nécroses plus ou moins sèches. Il est provoqué par les bactéries, qui, après avoir attaqué le

tubercule mère, envahissent et dégradent une ou plusieurs tiges grâce à leur activité pectinolytique [56].

1.6.2 Sur les tubercules

Les tubercules peuvent également être atteints de symptômes qui se développent en cours de culture ou de conservation sous la forme de pourritures molles et humides souvent nauséabondes. En conservation, les pourritures molles peuvent entraîner la contamination rapide des tubercules avoisinants. Des bactéries pectinolytiques variées (*Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.) peuvent être impliquées dans la pourriture des tubercules en conservation, particulièrement lorsque les températures sont élevées [56 ; 57].

Mais les *Pectobacterium* spp. restent les agents les plus fréquents et les plus dommageables. Dans le cas d'attaques localisées aux lenticelles, les pourritures sont qualifiées de lenticellaires. Un séchage adéquat des tubercules peut toutefois bloquer leur développement. Les symptômes sont alors qualifiés de pourritures lenticellaires [5].

1.7. Facteurs favorisant l'infection

1.7.1 Température

La progression de la pourriture molle est particulièrement rapide lorsque les températures sont élevées. La température optimale de croissance de la bactérie est de 28 °C, mais la croissance, bien que lente, peut se poursuivre à des températures aussi basses que 1 à 2°C. Les dommages causés au champ par le froid peuvent prédisposer les cultures à la colonisation et à la pourriture bactérienne [58].

1.7.2 Humidité

Le principal facteur contribuant à l'essor de la maladie est sans contredit la présence d'humidité sur l'inflorescence. En effet, les maladies causées par les *Erwinia* spp. pectinolytiques sont fortement influencées par la présence d'eau libre au site d'infection. Leur survie et reproduction sont favorisées par des surfaces mouillées et la population diminue rapidement lorsque la surface s'assèche. Dans des études aux champs sur la pomme de terre détectent *E. carotovora* aussi

longtemps que la surface demeurait mouillée, mais ne pouvait plus détecter la bactérie 1 à 2 journées après assèchement de la surface [59].

1.7.3 Influence du pH

Quand les *Erwinia* pectinolytiques infectent les plantes, elles colonisent dans un premier temps le fluide intercellulaire apoplastique dont le pH varie entre 5 et 6.5 [97]. Dans les étapes plus avancées de la colonisation, les bactéries induisent la lyse des cellules végétales en provoquant une alcalinisation du milieu. Les feuilles de chicorée passent ainsi d'un pH acide à basique lors de l'infection par *Erwinia chrysanthemi*. La synthèse des *Pels* est affectée par le pH qui peut donc jouer un rôle important dans leurs production lors de l'infection [60].

1.8. Cycle de la maladie

En culture, l'infection du tubercule mère favorise la transmission de la maladie aux tubercules fils, lorsque les bactéries sont libérées dans le sol transportées par l'eau et les insectes qui assurent aussi sa transmission. Ainsi les bactéries envahissent la rhizosphère des plantes et infectent d'autres tubercules. La figure 1.4, résume les principales étapes du cycle de développement de la maladie.

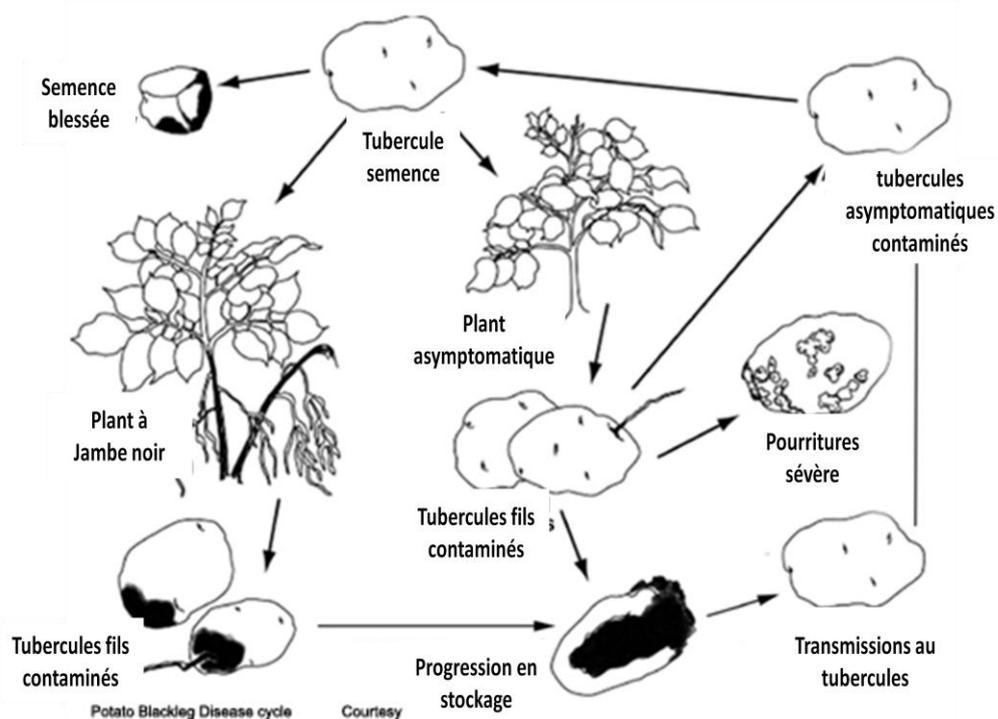


Figure 1.4 : Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne [61].

1.9. Moyens de contrôle de la pourriture molle

Les pratiques culturales et sanitaires traditionnellement utilisées pour contrôler le développement des maladies de la pomme de terre consistent à éviter de blesser les tubercules pendant les opérations de récolte et de manutention les blessures étant une porte d'entrée privilégiée pour la pourriture molle, d'autres pratiques notamment la désinfection des résidus de végétaux en entrepôts potentiellement contaminés et des équipements de lavage et de tri [5].

Une bonne subérisation des blessures après l'opération de tranchage des semences, l'application de fongicides ainsi qu'une récolte à des températures inférieures à 20 °C et par temps sec sont également recommandées [5]. L'utilisation des semences saines et un bon espacement des plants au champ, l'assurance d'une bonne régie d'entreposage ainsi que la pratique des rotations de cultures [1] permettent également de réduire l'incidence de cette maladie.

Actuellement, un contrôle partiel de la pourriture molle est obtenu principalement par l'application de certaines pratiques culturales et sanitaire, et indirectement par l'utilisation de fongicides chimiques, l'utilisation de variétés résistantes demeure encore très expérimentale [62 ; 63].

1.9.1 La lutte chimique

À ce jour, il n'existe pas de méthode de lutte efficace contre *P. atrosepticum* et *P. carotovorum*. Seules des mesures prophylactiques, basées sur une hygiène générale des exploitations et des semences ainsi que l'utilisation de pratiques culturales raisonnées et peu mécanisées, permettent de limiter les dégâts enregistrés [20]. En tenant compte des pratiques agronomiques actuelles, notamment des cultures utilisées lors de la rotation et d'études épidémiologiques réalisées récemment au champ, il est possible de limiter les pertes sur pieds dues à ces pathogènes [64].

Des mesures visant à limiter la présence des pathogènes sur le tubercule après récolte et leur dissémination dans l'environnement sont à l'étude. Par exemple, l'utilisation de réacteurs de décontamination dont la technologie est basée sur l'émission de plasmas froids est envisagée pour traiter les eaux de lavage des tubercules après récolte [65].

Au champ, les traitements chimiques des cultures à base de cuivre ou d'organomercure demeurent peu efficaces et sont déconseillés pour des raisons de protection de l'environnement [20]. De nouveaux composés capables d'altérer l'intégrité cellulaire bactérienne ou d'inhiber la croissance des *Pectobacteria* ont montré, au contraire, une réelle efficacité lors d'essais au laboratoire : il s'agit de solutions salées de chlorure d'aluminium et de méta bisulfite de sodium [66] ou de peptides de synthèses [67]. Si ces composés peuvent sembler très intéressants grâce à leur large spectre d'hôte (fongique et bactérien), le risque écologique d'altération des équilibres microbiens apparaît très important.

1.9.2 Les cultivars résistants

L'utilisation de cultivars résistants à la pourriture molle de la pomme de terre, bien que prometteuse grâce aux progrès de la biotechnologie, demeure une pratique difficile, les bases biochimiques (contrôle des allergènes par exemple) et génétiques (complexité génétique de la pomme de terre et ses agents pathogènes) de la résistance étant encore mal comprises [5]. Actuellement, tous les cultivars commerciaux sont reconnus plus ou moins sensibles à la pourriture molle [1, 68].

Ce constat a amené certains généticiens à proposer d'autres voies de sélection. L'une d'elles passe par la création de variétés transgéniques, c'est-à-dire de pomme de terre ayant intégré un ou plusieurs gènes issus d'une autre espèce microbienne, végétale ou animale. L'une des premières constructions réalisées a consisté à intégrer dans le génome de la pomme de terre un gène originaire d'un bactériophage codant pour la production de lysozyme qui dégrade la membrane de certaines bactéries. La plante modifiée fabrique du lysozyme qui est transporté vers les espaces intercellulaires des tissus végétaux. Cette opération diminue significativement la sensibilité de la variété étudiée aux attaques de *P. atrosepticum*, que ce soit lors d'essais sur tubercules ou sur plantules cultivées en serres. Ces effets bénéfiques sont attribués à la production du lysozyme qui inhiberait la multiplication des bactéries et maintiendrait leur densité en dessous du niveau de virulence [69].

1.9.3 L'utilisation des sels

Les résultats de nombreux travaux utilisant divers composés antimicrobiens pour lutter contre les agents pathogènes des plantes [70 ; 71]. Ces travaux suggèrent que les sels organiques et inorganiques peuvent constituer une alternative intéressante pour contrôler les maladies des tubercules entreposés. De plus, la biocompatibilité des sels [72], leur faible coût et le fait qu'ils possèdent un large spectre antimicrobien, les rendent intéressants en vue d'une utilisation pour lutter contre les maladies végétales [73]. Ils sont en outre simples d'utilisation et requièrent relativement peu d'exigence de la part des instances de réglementation en vue de leur acceptation comme agents antimicrobiens [74].

1.9.4 L'utilisation des bactériophages

L'approche est une application des bactériophages lytiques spécifiques à la bactérie *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, l'agent responsable de la pourriture molle des tubercules de la pomme de terre, pour lutter contre cette maladie.

Des essais de traitement des tubercules entiers de pomme de terre en condition d'entreposage ont été effectués : avec chacune des souches ou avec l'ensemble des souches d'*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* et le mélange des cinq bactériophages sélectionnés.

Les résultats ont montré une réduction significative des symptômes de la pourriture molle de la pomme de terre. L'étendue et la sévérité des symptômes ont permis d'estimer l'action protectrice des bactériophages contre le développement de la pourriture molle. Ainsi, cette étude a permis d'identifier un mélange des bactériophages présentant un potentiel comme agents de lutte biologique contre la pourriture molle de la pomme de terre en entrepôt [75].

2. La lutte biologique, une alternative aux pesticides conventionnels

Les maladies des plantes doivent être contrôlées pour maintenir la qualité et l'abondance de nourriture, de fourrage et de fibres produites à travers le monde entier. Différentes approches peuvent être utilisées pour prévenir, atténuer ou contrôler les maladies des plantes. Au-delà des bonnes pratiques agronomiques et de l'horticulture, les producteurs sont souvent fortement tributaires des engrais chimiques et des pesticides. Ces intrants à l'agriculture ont contribué de manière significative à l'amélioration spectaculaire de la productivité des cultures et la qualité au cours des 100 dernières années [76].

En outre, la propagation des maladies des plantes dans les écosystèmes naturels peuvent exclure l'application réussie de produits chimiques, en raison de l'échelle à laquelle ces demandes peuvent être appliquées, par conséquent, certains chercheurs de la lutte antiparasitaire ont concentré leurs efforts sur le développement d'autres approches aux produits chimiques de synthèse pour lutter contre les parasites et les maladies. Parmi ces alternatives, sont celles appelées communément les agents de lutte biologique [10].

Une variété de méthodes biologiques sont disponibles mais le développement et l'adoption efficace exigera une meilleure compréhension des interactions complexes entre les plantes, l'homme et l'environnement.

2.1 Définitions

Les termes «lutte biologique» et son synonyme abrégé «bio contrôle» ont été utilisés dans différents domaines de la biologie, En phytopathologie, le terme s'applique à l'utilisation des antagonistes microbiens pour supprimer les maladies ainsi que l'utilisation d'agents pathogènes spécifiques à l'hôte pour contrôler les populations de mauvaises herbes. Dans les deux domaines cités, l'organisme qui supprime l'agent pathogène ou le parasite est appelé agent de lutte biologique (biological control agent (BCA) [77].

Plus largement, le terme «contrôle biologique a également été appliqué à l'utilisation des produits naturels, extraits ou fermentés provenant de diverses sources. Ces formulations peuvent être de simples mélanges d'ingrédients

naturels à des activités spécifiques ou des mélanges complexes avec de multiples effets sur l'hôte ainsi et ciblant le parasite ou le pathogène [12].

Les définitions de la lutte biologique publiées diffèrent en fonction de la cible de répression, le nombre, le type et la source d'agents biologiques ainsi que du degré et du moment de l'intervention humaine. De façon plus générale, la lutte biologique est la suppression des activités nuisibles d'un organisme par un ou plusieurs autres organismes, souvent désignés comme ennemis naturels [76].

D'autre part, la plante hôte répond à de nombreux facteurs biologiques, à la fois pathogènes et non pathogènes, la résistance induite pourrait être considérée par conséquent comme une forme de lutte biologique [76].

2.2 Le secteur du biopesticide

Le marché des pesticides synthétiques avait diminué au cours des 5 dernières années grâce au développement des biopesticides et des récoltes génétiquement modifiées. Les biopesticides représentent 2.5% (672 millions \$ en 2005) des ventes de produits phytosanitaires (26 milliards \$) (Figure 1.5), alors qu'il était seulement de 0.2% en 2000. En dépit de sa petite taille comparé aux pesticides synthétiques, le marché des biopesticides se développe et il est prédit qu'il atteindra plus d'un milliard de dollars en 2010 [78].

Dans la gamme des biopesticides, figurent les biopesticides microbiens où une large gamme de microorganismes est utilisée comme agents de lutte biologique. Les bactéries à elles seules représentent 74% du marché mondial [78].

Plus de vingt-cinq produits microbiens (13 bactéries et 12 champignons) sont actuellement inscrits [79], et parmi eux, 36% ont été enregistrés dans les cinq dernières années. *Bacillus thuringiensis* ou Bt est considérée comme la bactérie la plus importante et la plus largement répandue. Cette bactérie domine le marché des biopesticides microbiens (70%). Plusieurs souches bactériennes de Bt produisent un mélange de différentes protéines (δ -endotoxines), qui tuent spécifiquement une ou quelques espèces de larves d'insectes [80].

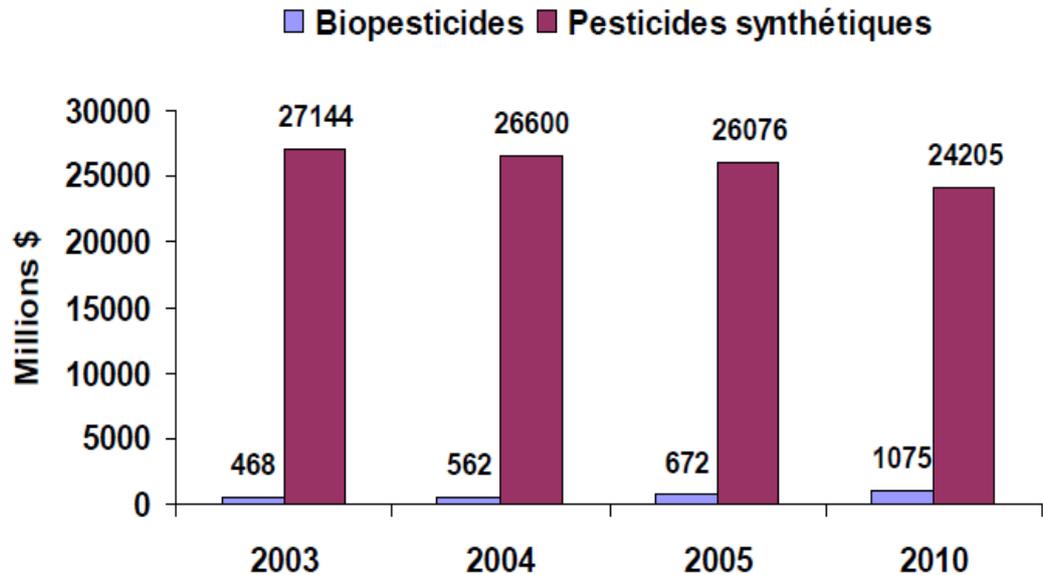


Figure 1.5. Le marché mondial des biopesticides et des pesticides synthétiques, 2003-2010 [78].

2.3 Les interactions biologiques

Toutes les plantes sont associées à au moins un type de microorganismes endophytes. La variété des interactions se passe aux limites de l'interaction hôte-microbe à l'interaction de microorganisme-microorganisme.

Les endophytes colonisent l'intérieur des tissus végétaux et contribuent aux aptitudes de l'hôte, et en retour, ils acquièrent des éléments nutritifs et la protection de l'hôte [76]. Les microorganismes endophytes sont des microorganismes qui résident dans les tissus vivants de la plante hôte [80]. Ils colonisent activement les tissus ou peuvent rester latents. La plupart appartiennent aux genres *Pseudomonas* ; *Enterobacter* ; *Burkholderia* ; *Bacillus* et *Azospirillum* [79; 81].

2.3.1 Interactions endophytiques et contributions à la lutte biologique

Tout au long de leur cycle de vie, les plantes et les pathogènes interagissent avec une grande variété d'organismes. Ces interactions peuvent influencer considérablement la santé des plantes de diverses façons [82].

Les différents types d'interactions ayant été considérés sont ; le mutualisme, le commensalisme, le neutralisme, la concurrence, l'amensalisme, le parasitisme et la prédation. Bien que la terminologie a été développée pour la macro-écologie, des exemples de tous ces types d'interactions peuvent être trouvés dans le monde naturel, tant au niveau macroscopique que microscopique. Et, parce que, le développement des maladies des plantes implique à la fois les plantes et ces micro-organismes, les interactions qui mènent à la lutte biologique prennent place à de multiples niveaux d'échelle (figure 1.6) [83].

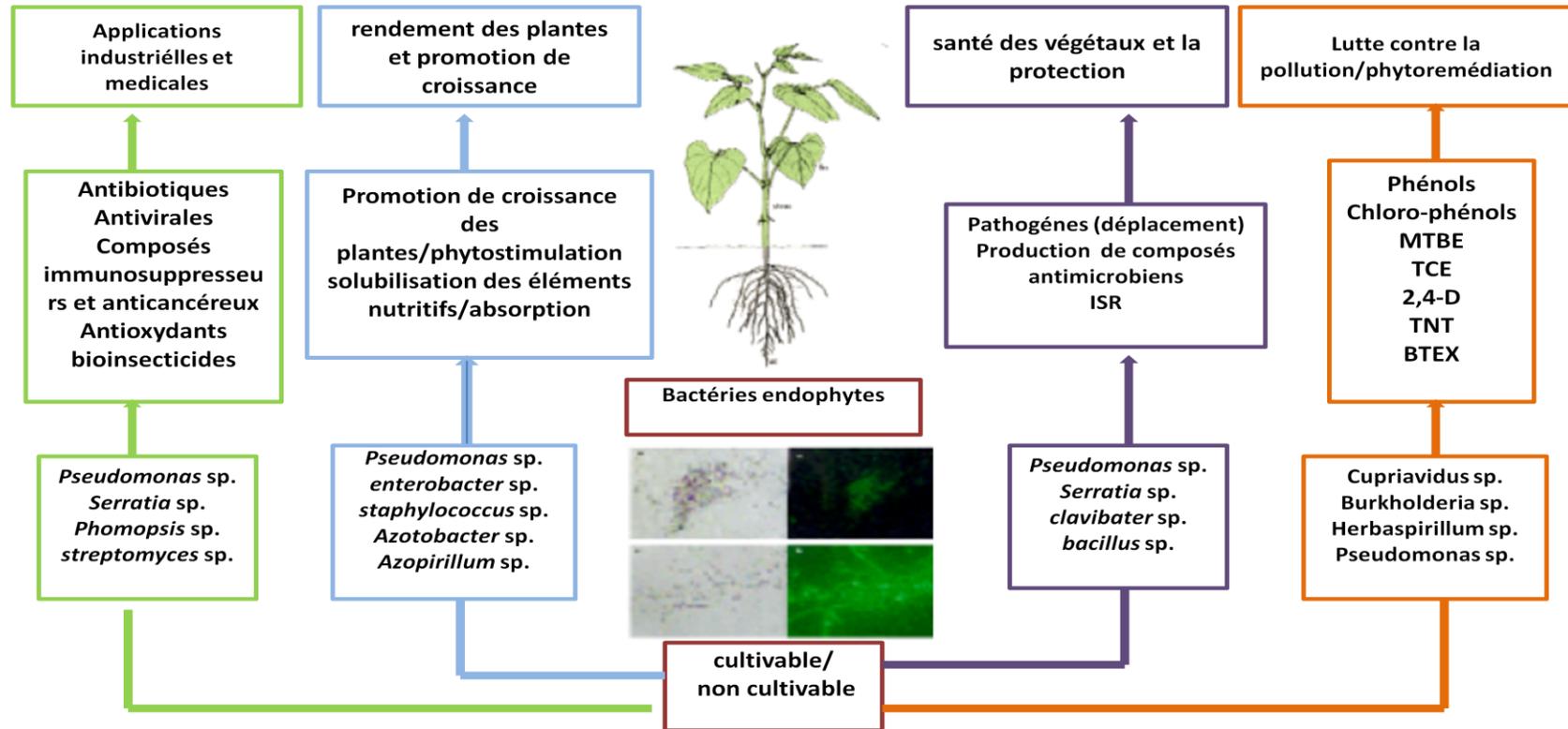


Figure 1.6: Schéma des différentes interactions plante-bactéries endophyte qui ont été étudiés et leurs applications [84].

L'intérêt de l'exploitation des bactéries endophytes est importante vue leurs implications dans différents secteurs à savoir la production d'antibiotiques et de composés immunosuppresseurs dans le secteur médicale, la promotion de croissance, les produits antimicrobiens pour la protection végétale, un autre intérêt est leur utilisation pour la phytoremédiation et la décontamination des sols.

2.3.2 La promotion de la croissance

Les bactéries endophytes présentent plusieurs mécanismes par lesquels elles peuvent promouvoir la croissance et la santé des plantes. Elles diffèrent des souches de lutte biologique qu'elles ne sont pas forcément un obstacle au développement des agents phytopathogènes, mais qui augmentent la croissance de la plante grâce à l'amélioration de l'apport en nutriments et en minéraux [84].

Les bactéries endophytes promouvant la croissance des plantes par un certain nombre de mécanismes. Il s'agit notamment de la solubilisation du phosphate [85 ; 86], la production d'acide indole acétique [87] et la production des sidérophores [88].

2. Médiation de l'induction de la résistance de l'hôte

Les plantes répondent activement à une variété de stimuli environnementaux, y compris ; la gravité, la lumière, la température, le stress physique, l'eau et la disponibilité des nutriments. Les plantes répondent aussi à une variété de stimuli chimiques produits par les microorganismes du sol et des plantes associées. Ces stimuli peuvent soit induire ou déterminer la défense de la plante hôte par un ensemble de changements biochimiques qui augmentent la résistance contre une infection ultérieure causée par une variété d'organismes phytopathogènes [76].

Il a été observé que certaines bactéries endophytes déclenchent le phénomène de résistance systémique induite (ISR), un phénomène similaire à la résistance systémique acquise (SAR). La SAR se développe lorsque les plantes réussissent à activer leurs mécanismes de défense en réponse à une primo-infection par un pathogène, notamment lorsque celle-ci induit une réaction d'hypersensibilité. A travers cette dernière réaction, le pathogène devient limité dans une lésion locale nécrotique du tissu desséché [89].

L'induction de défense de l'hôte peut être locale et/ou systémique, selon le type, la source, et la quantité de stimuli. Récemment, les études ont pu caractériser les déterminants et les voies de la résistance induite stimulés par des

agents de lutte biologique et autres microorganismes non pathogènes (tableau 2.5). La première de ces voies, appelée résistance systémique acquise (SAR), est médiée par l'acide salicylique (SA), un composé qui est souvent produit après infection par un pathogène et conduit généralement à l'expression des protéines PR (pathogenesis-related proteins) [76].

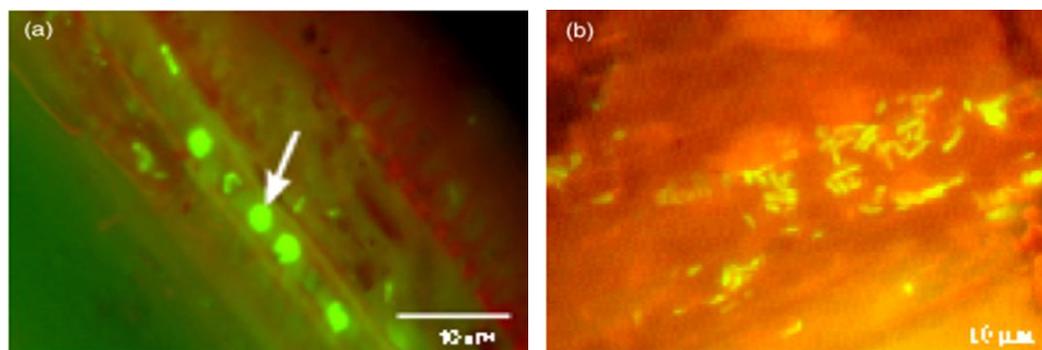
Tableau 1.2 : Les déterminants bactériens et les types de résistance de l'hôte induite par des agents de lutte biologique [76].

Souche bactérienne	plante	Déterminants bactériens	type
<i>Bacillus mycoides</i> souche Bac J	Betterave sucrière	Peroxydase, chitinase and β -1,3-glucanase	ISR
<i>Bacillus subtilis</i> GB03 et IN937a	<i>Arabidopsis</i>	2,3-butanediol	ISR
<i>Bacillus subtilis</i> CHA0	Tabac	Sidérophores	SAR
	<i>Arabidopsis</i>	Antibiotiques (DAPG)	ISR
	Tomate	Lipopolysaccharide	ISR
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Arabidopsis</i>	Lipopolysaccharide	ISR
<i>Pseudomonas putida</i> souche WCS 358	<i>Arabidopsis</i>	Lipopolysaccharides	ISR
		Sidérophores	ISR
<i>Pseudomonas putida</i> souche BTP1	haricots	Z,3-hexenal	ISR
<i>Serratia marcescens</i> 90-166	Concombre	Sidérophores	ISR

3. les bactéries endophytes

Les bactéries endophytes vivent dans les tissus de la plante sans lui apporter de préjudices et par la même, bénéficier d'autres avantages en plus de la résidence [82; 90]. Les bactéries endophytes peuvent être isolées à partir des tissus des surfaces désinfectées de la plante ou extraites des tissus internes [80]. Tel que mentionné dans les travaux de KOBAYASHI [82], les bactéries endophytes, appartenant au groupe des Gram positif ou à Gram négatif ont été isolées à partir de nombreuses espèces végétales (figure 1.7).

La diversité des endophytes bactériens cultivables est liée non seulement à la variété des espèces végétales colonisées, mais aussi par rapport aux nombreux taxons impliqués, dont la plupart appartiennent aux genres bactériens telluriques comme les *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, et *Azospirillum* [79; 81].



a : les trachées du xylème d'un arbre colonisé par une population de *Pseudomonas putida* VM1453.

b : Des microcolonies de *Pseudomonas putida* VM1450 dans le cortex des racines exposé à 54 mg de 2,4D

Figure 1.7 : Application de l'AFP (Autofluorescent protein) pour l'étude de l'interaction endophyte-plante [84].

L'identification des endophytes s'est appuyée principalement sur les méthodes de culture de base [91 ; 92]. Toutefois, en raison des exigences culturelles inconnues de nombreux microorganismes [93], l'analyse d'une population de culture indépendante conduit à une détermination moins biaisée de la diversité microbienne. Les techniques moléculaires basés sur l'étude de l'ARNr 16S comme un marqueur phylogénétique [94] fournit une approche efficace pour

contourner les inconvénients liés aux conditions de culture. Les techniques telles que l'analyse du polymorphisme (T-RFLP) [95] ou l'électrophorèse sur gel [96] en combinaison avec l'analyse séquentielle des gènes d'ARNr 16S permettent une caractérisation rapide des populations microbiennes.

3.1 Origine et biodiversité des bactéries endophytes

La niche endophyte offre une protection contre l'environnement pour les bactéries qui peuvent coloniser et se mettre en place *in planta*.

La plupart des bactéries endophytes proviennent de la rhizosphère [97]. Elles peuvent être isolées à partir des tissus des surfaces désinfectées de la plante ou extraites des tissus internes [80]. Tel que mentionné dans les travaux de Kobayashi [82], les bactéries endophytes appartenant aux groupes des Gram positif ou à Gram négatif ont été isolées à partir de plusieurs types d'espèces végétales [82].

Les endophytes entrent dans les tissus végétaux principalement par la zone racinaire; cependant, les parties aériennes des plantes, comme les fleurs, les tiges et les cotylédons, peuvent également être des voies d'entrée aux bactéries [82]. Plus précisément, les bactéries pénètrent dans les tissus au moment de la germination et l'émission des radicules et des racines [98], des stomates [97], ou à la suite des dégâts foliaires [99]. Les bactéries endophytes, se localisent soit aux points d'entrées ou se propagent de façon systémique dans toute la plante [80]. Ces micro-organismes peuvent résider à l'intérieur de la cellule végétale, dans l'espace intercellulaire [97] ou dans le système vasculaire [91].

Des variations significatives ont été signalées dans les populations des endophytes indigènes et introduites. Ces variations sont attribuées à la plante source, à son âge, au type de tissus, au moment de l'échantillonnage, et à l'environnement [100]. Généralement, les populations bactériennes sont plus élevées dans les racines et faibles dans les tiges et les feuilles [101].

Les niveaux de colonisation par les endophytes non pathogènes ont tendance à être beaucoup moins importants que les niveaux de colonisation par

des bactéries pathogènes. Les concentrations de ces derniers vont de 7×10^{10} à 10^{11} CFU/g de poids frais de tissus de la plante susceptible d'être infectée [102].

3.2 Endophytisme et antagonisme bactérien

Les bactéries endophytes colonisent une niche écologique semblable à celle des phytopathogènes, ce qui les rend appropriés comme des agents de lutte biologique [15]. En effet, de nombreux rapports ont montré que les microorganismes endophytes peuvent avoir la capacité de contrôler les agents phytopathogènes [92], les insectes [103] et les nématodes [80 ; 104].

3.2.1 L'hyperparasitisme et la prédation

En hyperparasitisme, l'agent pathogène est directement attaqué par un agent de lutte biologique spécifique qui tue ses propagules. En général, il existe quatre grandes classes d'hyperparasites : la pathogénie bactérienne obligatoire, les hypovirus, les parasites facultatifs, et les prédateurs [76].

Toutefois, l'interaction du virus, champignon, arbre, et de l'environnement détermine le succès ou l'échec de l'hypovirulence. Il existe plusieurs parasites fongiques des agents pathogènes des plantes, y compris ceux qui attaquent les sclérotés (*Coniothyrium minitans*) ainsi que pour d'autres qui attaquent les hyphes vivants (*Pythium oligandrum*) [105].

Un agent pathogène fongique peut être attaqué par plusieurs hyperparasites. Par exemple, *Acremonium alternatum*, *Acrodontium crateriforme*, *Ampelomyces quisqualis*, *Cladosporium oxysporum*, et *Gliocladium virens* sont des champignons qui ont la capacité de parasiter les agents pathogènes de l'oïdium. D'autres hyperparasites comme ; *Paecilomyces lilacinus* et *Dactylella oviparasitica* attaquent les nématodes phytopathogènes à différents stades de leur cycle biologique [105].

3.2.2 Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des toxines microbiennes qui peuvent, à de faibles concentrations, empoisonner ou tuer d'autres microorganismes. La plupart des microorganismes produisent et sécrètent un ou plusieurs composés présentant

une activité antibiotique. Dans certains cas, les antibiotiques produits par des microorganismes ont été révélés particulièrement efficaces pour supprimer les agents phytopathogènes et les maladies qu'ils causent [106] (Tableau 3.2).

Dans tous les cas, les antibiotiques se sont révélés particulièrement efficaces à la suppression de la croissance de l'agent pathogène cible *in vitro* et/ou *in situ*. Pour être efficaces, les antibiotiques doivent être produits en quantité suffisante à proximité de l'agent pathogène afin d'avoir un effet biologique. La production d'antibiotiques *in situ* par plusieurs agents de lutte biologique a été mesurée par Thomashow [107].

Toutefois, les quantités efficaces sont difficiles à estimer en raison des faibles quantités produites d'un agent à un autre ; moins toxiques, les composés organiques présents dans la phytosphère. Et tandis que les méthodes n'ont pas été développées pour déterminer quand et où les agents de biocontrôle peuvent produire des antibiotiques. L'efficacité des antibiotiques au cours de l'infection est difficile à cause de la distribution hétérogène des germes associées aux plantes et des sites potentiels d'infection [108].

Tableau 1.3 : Groupes d'antibiotiques produits par les agents de lutte biologique [76].

Antibiotique	Source	Pathogène cible	maladie
2, 4-diacetyl phloroglucinole	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Pythium</i> spp.	Fonte de semis
Agrocine 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	galle du collet
Bacillomycine, fengycin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium oxysporum</i>	flétrissement
Xanthobaccine A	<i>Lysobacter</i> sp. strain SB-K88	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	Fonte de semis
Gliotoxine	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pourriture racinaire
Herbicolin	<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	<i>Erwinia amylovora</i>	Feu bactérien
Iturine A	<i>B. subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinerea</i> and <i>R. solani</i>	Fonte de semis
Mycosubtiline	<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Fonte de semis
Zwittermicine A	<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>Phytophthora medicaginis</i> et <i>P. aphanidermatum</i>	Fonte de semis

3.2.3 Les sidérophores

Les mécanismes proposés par lesquels les bactéries contrôlent les agents phytopathogènes sont aussi variés que les micro-organismes bioactifs. Les siderophores, qui chélatent le fer ou d'autres métaux, contribuent à la suppression

de la maladie en conférant un avantage concurrentiel à des souches de bio-contrôle. Les siderophores bactériens sont des composés de faible poids moléculaire avec une affinité élevée à la chélation du Fe^{3+} . Ils sont responsables de la solubilisation et du transport de cet élément dans les cellules bactériennes [109].

Certaines bactéries produisent des siderophores de type hydroxamates, tandis que d'autres bactéries produisent des siderophores de type catecholate [110]. Dans un état de limitation en fer, les micro-organismes producteurs de siderophores sont également capables de se lier et de transporter des complexes fer-siderophores par l'expression de protéines spécifiques [60]. La production de siderophores par les micro-organismes est bénéfique pour les plantes, car ils peuvent indirectement inhiber la croissance des agents phytopathogènes [110].

3.2.4 Les enzymes lytiques et autres sous-produits

Divers micro-organismes sécrètent et excrètent d'autres métabolites qui peuvent interférer avec la croissance des pathogènes et/ou leurs activités. De nombreux micro-organismes produisent et libèrent des enzymes lytiques qui peuvent hydrolyser une grande variété de composés polymères, y compris la chitine, des protéines, la cellulose, l'hémicellulose, et l'ADN [76].

L'expression et la sécrétion de ces enzymes par les différents micro-organismes peuvent parfois aboutir à la suppression directe d'activités des agents phytopathogènes. Par exemple, le contrôle de *Sclerotium rolfsii* par *Serratia marcescens* semble être médié par l'expression de chitinase [111], un β -1,3-glucanase qui contribue de manière significative aux activités de lutte biologique de *Lysobacter enzymogenes* souche C3 [112].

Pour la lutte contre les maladies post-récolte, l'addition du chitosane peut stimuler la dégradation microbienne des agents pathogènes similaires à celle d'un hyperparasite appliqué [113]. Le chitosane est un polymère non-toxique et biodégradable du β -1,4-glucosamine produit à partir de la chitine par acylation alcaline. L'amendement de substrat de croissance des plantes avec du chitosane a supprimé la pourriture des racines causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* chez la tomate [114].

3.2.5 La compétition

Du point de vue microbien, les sols et les surfaces de la plante sont des milieux limités en éléments nutritifs. Pour réussir à coloniser la phytosphère, un microorganisme doit concurrencer efficacement les éléments nutritifs disponibles. Sur la surface des plantes, les éléments nutritifs fournis par l'hôte comprennent des exsudats, des lixiviats ou des tissus en sénescence [76].

Les travaux d'ANDERSON ont révélé que la production d'une glycoprotéine végétale appelée agglutinine a été corrélée avec le potentiel de *P. putida* à coloniser le système racinaire. Les mutants de *P. putida* déficients en cette capacité exprimaient une réduction de la capacité à coloniser la rhizosphère et une réduction de la capacité de réprimer la fusariose chez le concombre [115].

3.3 Les bactéries antagonistes des *Erwinia* spp. pectinolytiques et leur utilisation comme agents de lutte biologique

Dès le début des années 1980, Kloepper [229], proposa d'utiliser les capacités antagonistes de certaines bactéries vis-à-vis des *Erwinia carotovora* pour protéger les tubercules et les plants de pomme de terre. *Erwinia carotovora*, est inhibée par de nombreuses bactéries endophytes, y compris plusieurs souches de *Pseudomonas* sp. [116], *Curtobacterium luteum*, et *Pantoea agglomerans* [117].

Les bactéries protectrices ciblées étaient qualifiées de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et appartenaient au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les espèces bactériennes de ce groupe se caractérisent par un métabolisme versatile et par une capacité élevée à extraire le fer du sol pour leurs besoins nutritionnels, grâce à des siderophores particulièrement affines. Ces caractéristiques expliquent en grande partie leur aptitude à s'installer en nombre et durablement sur et à proximité des racines [25].

3.4 La signalisation quorum-sensing chez *Pectobacterium* spp. et les nouvelles perspectives de lutte

La connaissance et la compréhension des stratégies de parasitisme chez les organismes phytopathogènes constitue un élément clé pour la réflexion à une

méthode de lutte appropriée. L'expression des facteurs de virulence des les *Pectobacterium spp.* est régulée par un mécanisme original découvert au début des années 1990 : le quorum-sensing [118]. Celui-ci, permet l'expression des gènes de virulence seulement lorsque le quorum bactérien est atteint c'est-à-dire pendant la phase pré-quorum.

L'existence du signal de quorum-sensing chez toutes les espèces de *Pectobacterium* macergènes et son importance stratégique dans la maladie [119] désignent ce signal bactérien comme une cible privilégiée pour développer des outils de lutte contre la virulence des *Pectobacteria*. Ces nouvelles méthodes de lutte n'ont pas vocation à éliminer ce pathogène, mais à en atténuer la virulence : ce principe est donc appelé antivirulence [120].

Ces stratégies d'antivirulence ont toutes pour but l'interruption de la signalisation quorum-sensing des *Pectobacterium* : on parle de quorum-quenching [120].

Il s'agit de procédés multiples, parfois complémentaires :

- des composés chimiques qui perturbent la perception par les pathogènes du signal quorum-sensing ;
- des agents de biocontrôle sélectionnés pour leur capacité à dégrader les signaux du quorum-sensing (les HSL) ;
- des composés chimiques capables de stimuler la croissance des populations microbiennes capables de dégrader ces signaux (cette méthode peut être employée en synergie avec l'application d'agents de biocontrôle) ;
- des plantes sauvages ou transgéniques capables de dégrader les HSL.

Ces stratégies d'antivirulence sont en cours d'expérimentations dans différents laboratoires de recherche et certains résultats intéressants peuvent être [120]. Une large gamme de molécules est actuellement décrite comme susceptibles d'affecter directement la signalisation quorum-sensing. Les plus étudiées sont des furanones halogénées de synthèse ou issues d'une algue, *Delisea pulchra*. Ces molécules, qui n'ont pas été décrites chez la pomme de terre, ont généralement pour cible la protéine bactérienne impliquée dans la

perception du signal. Certaines ont été évaluées *in vitro* par exemple contre *Pectobacterium carotovorum* [121]. L'origine végétale de la plupart de ces composés suggère qu'ils pourraient participer aux systèmes de défense naturels des plantes ; leur présence pourrait être recherchée chez la pomme de terre et intégrée dans des processus d'amélioration et de création variétale.

Par ailleurs, de nombreuses bactéries de la rhizosphère et du sol sont capables de dégrader les HSL. Ces bactéries appartiennent à différents groupes bactériens, les Firmicutes [122 ; 123] les Actinobactéries [124 ; 125] ou les Protéobactéries [124]. Certaines de ces bactéries comme *Bacillus* et *Rhodococcus* sont d'efficaces agents de lutte biologique contre des souches de *Pectobacterium in vitro* [124 ; 126].

Ces bactéries dégradant les HSL représentent de 5 à 10 % des populations bactériennes cultivables des sols [123]. Une étude récente montre qu'il est possible, grâce à l'application de composés chimiques biodégradables, de stimuler la croissance de ces bactéries dégradant les HSL, comme *Rhodococcus* et *Delftia*, dans la rhizosphère de la pomme de terre [127]. Ces résultats ont été obtenus lors de culture hors sol; leur effet en champ n'a pas été encore étudié.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

Nous avons mené ce travail afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats bactériens endophytes testées *in vitro* et *in vivo* sur une collection de souches d'*Erwinia carotovora* ayant un fort pouvoir pectinolytiques.

1. Matériel bactérien

1.1 Origine des isolats antagonistes

Les bactéries endophytes supposées antagonistes ont été isolées à partir de cinq plantes spontanées (*Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia peplus* et *Euphorbia helioscopia*). Les isolats endophytes sélectionnés pour les tests d'antagonisme sont ceux qui ont produit des zones d'inhibition envers la souche de référence d'*Erwinia carotovora*. Le choix des 36 isolats a été porté sur la zone d'inhibition supérieure à 20 mm [19].

1.2 Souches d'*Erwinia carotovora* étudiées

Les souches utilisées pour la présente étude ont été isolées et identifiées par voie biochimique et biologique par KERROUCHE [128]. En rappel, ce sont des souches isolées à partir de tubercules de semences de pomme de terre de consommation appartenant à six génotypes à savoir, Spunta, Agria, Condor, Désirée, Ditta et Pontiac rouge. Ces semences importées de divers pays étaient destinées à la plantation pour la consommation humaine. Par ailleurs, il est nécessaire de rappeler que ces semences présentant divers symptômes, nous ont été fournies par l'Institut National de Protection des végétaux (INPV), le Centre National de Contrôle et de Certification (CNCC) et des producteurs de pommes de terre de consommation de Ain-defla et de Guemar [128].

Pour notre expérimentation, en fonction des réponses symptomatologiques exprimées sur la pomme de terre (intensité de la pourriture) et le temps de réaction [129], nous avons préféré utiliser pour les tests ultérieurs seulement les souches les plus virulentes c'est-à-dire celles dont les symptômes se développent rapidement *in vitro* et sur tous les disques [129]. Nous avons choisi 12 souches pour le test d'antagonisme *in vitro* et par la suite pour le test d'antagonisme *in vivo*, nous avons sélectionnés 5 souches plus une souche de référence [130].

2. Identification biochimique complémentaire des souches d'*Erwinia carotovora*

Afin d'approfondir la caractérisation biochimique des souches d'*Erwinia carotovora* et de discriminer les différentes sous-espèces, nous avons réalisé une série de tests biochimiques [131].

2.1 Le test d'oxydase

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase. Une culture bactérienne âgée de 24h cultivée sur le milieu King B [132] est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur papier filtre imprégné d'une solution aqueuse à 1% de Tetramethylparaphenylene diamine dihydrochloride. Le développement d'une coloration violette en moins de 10 secondes indique la présence de l'enzyme oxydase [133].

2.2 Le test catalase

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, une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les souches bactériennes âgées de 24 h sont déposés dans la solution de peroxyde d'hydrogène. Après 2 minutes, la présence de bulles révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive [132].

2.3 Fermentation du glucose

Le milieu Hugh & Leifson est utilisé pour différencier entre la voie fermentative et la voie oxydative [250]. Une culture âgée de 24h estensemencée sur le milieu de base Hugh& Leifson. La présence d'une coloration jaunâtre indique la fermentation du glucose par la bactérie. Les *Erwinia* spp. pectinolytiques fermentent le glucose [134].

2.4 Transformation du sucrose

Le test sucrose sert à déterminer si la bactérie transforme le sucrose en une substance réductrice. Une culture bactérienne de 24h est déposée à l'aide d'une anse stérile sur le milieu de culture liquide RS [133]. A la suite de l'incubation, 2,5 ml de réactif de Bénédict est ajouté puis amené à ébullition sur une plaque chauffante. Un changement de la couleur indique que la réaction est positive. Les *Erwinia* spp. Répondent de manière variable la transformation du sucrose selon la sous-espèce [131].

2.5 Production d'indole

Une culture bactérienne âgée de 24h, sur le milieu de culture liquide d'indole est déposée à l'aide d'une anse stérile. A la suite de l'incubation, trois gouttes de réactif de Kovac's sont ajoutées, la présence d'un anneau rouge en surface indique la production d'indole à partir du tryptophane par la bactérie ; les *Erwinia* spp. pectinolytiques répondent de façon différente selon les pathovars [135].

2.6 Croissance à 35°C sur milieu YS

Les souches d'*Erwinia* spp. sont ensemencées sur le milieu de culture YS. La croissance est observée 2 à 7 jours après incubation à 35°C, les souches d'*Erwinia carotovora* répondent de manière variable à ce test selon le pathovar [136].

3. Caractérisation des isolats endophytes antagonistes

3.1 La réaction d'Hypersensibilité

Le test d'hypersensibilité du tabac met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement des zones inoculées sur les feuilles de tabac [137]. Dans un tube de 2 ml d'eau distillée stérile une suspension bactérienne concentrée de 10^7 CFU/ml correspondant à une densité optique de 0.2 a été préparée à partir d'une culture bactérienne âgée de 24 h. Les feuilles d'un plant de tabac *Nicotiana tabacum* var. *White burley* au stade 5 feuilles sont infiltrées par injection sous épidermique d'une suspension bactérienne à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml. Le témoin négatif consiste à injecter de l'eau distillée stérile au niveau du limbe foliaire. Pour chaque isolat bactérien, une feuille de tabac a été inoculée.

La lecture des résultats est effectuée 24 à 48h après inoculation, un résultat positif se traduit par la présence d'une zone nécrotique mettant en évidence ainsi le pouvoir pathogène de la bactérie testée [137].

3.2 Caractérisation biochimiques des isolats endophytes

En plus des tests décrits ci-avant (oxydase, catalase, fermentation du glucose, transformation du sucrose et la production d'indole), d'autres tests ont été réalisés.

3.2.1 Coloration de Gram

La coloration de la paroi des bactéries a été réalisée selon la méthode de la coloration de Gram décrite par Hildbrand [138] et selon la technique du test KOH décrit par Ryu [139].

La fixation de la bactérie à tester se réalise à la chaleur et en présence d'une goutte d'eau distillée stérile après la préparation du frottis par étalement d'une culture bactérienne âgée de 24h sur une lame. Le frottis ainsi fixé est d'abord coloré au violet de gentiane, suivi par l'application d'une solution de lugol. La décoloration est ensuite effectuée par un lavage à l'alcool des lames jusqu'à la disparition de la couleur violette. Après un lavage abondant avec un jet d'eau distillée stérile, le frottis subit une deuxième coloration à l'aide d'une solution de fuschine basique. On réalise ensuite une observation microscopique des frottis après un lavage à l'eau et un séchage au dessus de la flamme d'un bec bunsen. Les bactéries colorées en rose sont dites à Gram négatif, alors que celles colorées en violet sont à Gram positif [138].

3.2.2 Production de pigment fluorescent sur milieu B de King

Les colonies ciblées sont prélevées individuellement et repiquées sur le milieu KB [132]. La production de pigments fluorescents est notée par la présence d'une couleur verdâtre diffusible sur le milieu gélosé de King B, la fluorescence est détectée sous lumière UV.

3.2.3 Le test Arginine déshydrolase

Le test Arginine deshydrolase sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine par l'enzyme arginine deshydrolase. À l'aide d'une anse stérile, une culture bactérienne âgée de 24 h est déposée sur le milieu de culture liquide.

Après 24 h d'incubation à 27°C, le milieu devient jaune orangé indiquant la transformation de l'arginine par l'enzyme [138].

3.2.4 La production de levane

Le test levane sert à déterminer la polymérisation du fructose en polyfructose. Une culture bactérienne âgée de 24 h estensemencée en stries sur le milieu à base de levane à l'aide d'une anse stérile. Une réaction négative indique la présence de stries prostrées. Dans le cas d'une réaction positive, les stries apparaissent bombées et brillantes [138].

3.2.5 Liquéfaction de la gélatine

Les souches bactériennes sontensemencées sur un milieu à base de gélatine. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les tubes sont placés à 4°C pendant 30 minutes. Un résultat positif est indiqué par l'hydrolyse de la gélatine [132].

3.2.6 L'hydrolyse de l'amidon

Sur des boites de pétri contenant le milieu amidon, les bactéries sontensemencées en spot à raison de 5 spots par boite de Pétri. Après 24 à 48h d'incubation à 27 °C, l'addition du colorant lugol ne provoque pas l'apparition d'une coloration jaune autour du spot, ce qui indique que la bactérie n'utilise pas l'amidon. Dans le cas d'une réaction positive à ce test, un anneau transparent apparait autour du spot bactérien [138].

3.3 Identification par utilisation du marqueur moléculaire l'ADNr 16S

Les techniques moléculaires basées sur l'étude de l'ARNr 16S comme un marqueur phylogénétique fournit une approche efficace pour contourner les inconvénients liés aux conditions de culture. Les techniques telles que l'analyse séquentielle des gènes d'ARNr 16S permettent une caractérisation rapide des populations microbiennes [94].

L'identification moléculaire des bactéries endophytes a été réalisée par séquençage de l'ADN ribosomal 16S, cette étape a été réalisée au laboratoire (CNR, Protezione Delle Piante Firenze, Italie) par KRIMI Z. et RAIO A.

4.3.1 Mise en culture et extraction de l'ADN

De chaque isolat endophyte, une colonie a été utilisée pour l'extraction d'ADN. Chaque colonie a été déposée de façon aseptique dans 5 ml de bouillon de LB (Luria Bertani) puis mise en croissance sous un agitateur rotatif pendant une nuit pour extraire l'ADN ultérieurement.

L'extraction d'ADN a été effectuée grâce à un Kit DNeasy (Qiagen). Un millilitre de chaque culture a été utilisé pour l'extraction de l'ADN en utilisant le protocole définie par ABOLMAATY et ses collaborateurs [140].

4.3.2 Amplification par PCR

Le mélange pour la réaction PCR contient (25µl) par tube eppendorf, le tampon, la Taq DNA polymérase 0,5U, 0,75 µl MgCl₂, 0,5 µl de dNTP, 15,75 µl de H₂O et des primers FD1 1.0 /rP1/rP2 1.0 et enfin 3µl d'ADN (Pioux, 2009)

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur Cycler ADN (Pioux, 2008). Les produits d'amplification ont été purifiés et séquencés par Primm s.r.l. (Milan, Italie) en utilisant les amorces impliquées dans la réaction PCR.

4.3.3 Séquençage des fragments amplifiés

La similitude des séquences nucléotidiques partielles d'ADNr 16S (1400-1500 bp) avec des séquences connues dans la base de données NCBI GenBanka a été déterminée par le logiciel BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les souches ont été attribuées à une espèce si elles présentent une homologie d'identité de séquences supérieure à 99% d'ADNr 16S ou à un genre si l'homologie des séquences est supérieure à 97% d'ADNr 16S [141].

4. Mesure de la densité optique nécessaire pour la réalisation des tests d'antagonisme

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats antagonistes contre les souches d'*Erwinia carotovora*, nous avons considéré le ratio de 10 :1, c'est-à-dire que la concentration en bactéries endophytes supposées antagonistes est dix fois plus supérieure par rapport à celle des souches d'*Erwinia carotovora* spp [142]. La concentration cellulaire prise d'isolats antagonistes est de 5×10^7

CFU/ml ce qui correspond à une valeur de densité optique égale à 0.35 [254]. La concentration des souches d'*Erwinia carotovora* est de 5×10^6 CFU/ml correspondant ainsi à une DO égale à 0,25 [40 ; 143].

De très nombreuses techniques permettent de mesurer la biomasse d'une suspension bactérienne. La mesure de la densité optique est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600 à 650nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible). D'une manière générale, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire.

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 48h cultivée sur le milieu LPGA. Une souche parmi la collection d'*Erwinia carotovora* à tester, a été choisie au hasard. Cette dernière a été par la suite mise en suspension dans un tube à essai contenant de l'eau distillée stérile. 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'eau distillée stérile.

A l'aide du spectrophotomètre (Prolabo, Paris), nous avons effectué la lecture de la densité optique de chaque dilution des suspensions bactériennes 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 dernier 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 28°C pendant 48h.

Après une incubation de 48 à 72h, le comptage des colonies est réalisé sous la loupe. Pour le comptage des colonies bactériennes issues des isollements, les boîtes dont le nombre est inférieur à 30 et supérieur à 300 ne sont pas dénombrées [144].

5. Le test d'antagonisme *in vitro*

5.1 Dépôt des spots des isolats endophytes

A l'aide d'une micropipette, nous avons prélevé un volume de 20µl de la suspension préparée qui sera par la suite déposé en spot dans les boîtes de pétri contenant le milieu de culture LPGA. Nous avons préparé 3 spots de 0.9 mm de diamètre correspondant par conséquent à 3 répétitions par boîte et par isolat endophyte.

Les boîtes contenant les spots des isolats endophytes à tester pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis les souches d'*Erwinia carotovora* sont mises en incubation pendant 24 à 48 heures à 28°C [145].

5.2 Préparation des suspensions bactériennes pour le 'spray'

Les souches d'*Erwinia carotovora* à pulvériser sur les boîtes contenant les spots, doivent avoir le même âge que les isolats bactériens ; soit 24h à 48h.

La densité optique des suspensions des souches d'*Erwinia carotovora* est égale à 0.27 correspondant à une densité cellulaire de 5.10^7 CFU/ml [40 ; 143]. Les boîtes contenant les spots des bactéries endophytes, sont préparées pour une pulvérisation (spray). L'opération de spray nécessite d'abord en une désinfection de la pompe (pulvérisateur, atomiseur) utilisée à l'aide de l'éthanol 95° qui sera suivie de deux rinçages à l'eau distillée stérile. Les boîtes sont inclinées verticalement puis pulvérisées sur toute la surface de manière à répartir d'une manière homogène toutes les microgouttelettes des souches pathogènes d'*Erwinia carotovora*.

5.3 Lecture des résultats

Après incubation, si la souche est sensible à l'isolat, sa croissance sera inhibée autour du spot central laissant apparaître une zone d'inhibition claire autour du spot bactérien. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant le diamètre en mm des zones d'inhibition à l'aide d'un double décimètre.

6. Test d'antagonisme *in vivo*

6.1 Matériel végétal

Pour notre expérimentation, nous avons testé une gamme de variétés de pomme de terre qui représente la plante hôte la plus attaquée par les souches d'*Erwinia* pectinolytiques [56].

Nous avons testé trois variétés de pomme de terre. *Solanum tuberosum* L. var (Bartina ; Spunta et Désirée). Ces variétés nous permettent de comparer les réponses de virulence des souches testées. Elles nous ont été gracieusement fournies par les agriculteurs producteurs de pomme de terre de consommation.

6.2 Les isolats endophytes

Pour le test d'antagonisme *in vivo*, nous avons sélectionné 5 isolats endophytes les plus performants. Le choix était porté sur le résultat du test d'antagonisme *in vitro*.

6.3 Méthodologie

6.3.1 Désinfection et inoculation des disques

Le matériel végétal utilisé est rincé abondamment sous le robinet, puis subi une première désinfection avec une solution constituée d'eau distillée stérile et de l'eau de javel à 5% pendant 5 minutes. Le matériel végétal est par la suite désinfecté pendant une durée d'une heure dans une solution d'hypochlorite de calcium 4%. Trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile sont réalisés afin d'éliminer l'excès d'hypochlorite de calcium.

Le matériel végétal (pomme de terre) est découpé en rondelles d'une hauteur de 15 mm, Ces rondelles sont découpées en disques de 25 mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Les disques sont par la suite déposés dans des microplaques de culture cellulaire (Costar, cell culture cluster dish) renfermant 12 puits.

6.3.2 Méthode d'inoculation

Afin de tester l'effet d'antagonisme *in vivo*, nous avons choisi le dispositif suivant :

Les disques de pomme de terre sont d'abord trempés dans la suspension bactérienne contenant l'isolat endophyte à 10^7 CFU/ml pendant 2 minutes [146]. Ces mêmes disques trempés par la souche antagoniste sont déposés dans des microplaques contenant 12 alvéoles de 25 mm de diamètre et répartis en 4 colonnes et 3 rangées. Dans chaque microplaque, 2 souches ont été inoculées (6 puits par isolat endophyte).

Pour l'étape d'inoculation des souches d'*Erwinia carotovora*, nous avons préparé des suspensions bactériennes à une densité optique ; $DO=0,25$ à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond à une densité cellulaire de 5×10^6 CFU/ml [40 ;143].

A l'aide d'une micropipette, un volume de 50 μ l est déposé à la base du puits (alvéole) c'est-à-dire en dessous des disques de tissus végétaux préparés, afin d'étudier le développement des symptômes de type pourriture sur toute la hauteur des disques préalablement trempés et déposés dans les alvéoles.

Les traitements réalisés sont au nombre de quatre, ils sont représentés comme suit :

T0 : le témoin négatif représente les disques de pomme de terre inoculés avec de l'eau distillée stérile préalablement désinfectés.

T1 : trempage des disques de pommes de terre dans la suspension bactérienne d'endophyte puis inoculés par la souche d'*Erwinia carotovora*.

T2 : un second traitement consiste à tremper les disques de pomme de terre dans la suspension d'endophyte.

T3 : le troisième traitement représente les disques de pomme de terre inoculés directement avec la suspension d'*Erwinia carotovora*.

6.4 Les paramètres étudiés

L'activité antibactérienne des isolats endophytes *in vivo* est évaluée par l'absence ou la diminution du développement des symptômes de la pourriture molle et leur intensité par rapport au troisième traitement.

La lecture des résultats de l'expression des symptômes se fait après 4 jours précédant l'inoculation avec prise des mensurations de l'évolution de la pourriture à chaque fois. Les dimensions de l'évolution de l'infection (pourriture) sont mesurées à l'aide d'un double décimètre.

7. Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus pour le test d'antagonisme des isolats endophytes envers les souches d'*Erwinia carotovora* spp. *in vitro* et *in vivo* ont été analysés en premier lieu par le logiciel statistique « Systat » vers. 12, SPSS 2009 afin d'analyser tous les paramètres considérés (isolats endophytes, souches d'*Ecc*).

Dans le but de bien ressortir les groupes d'isolats les plus actifs vis-à-vis de la gamme de souches d'*Erwinia carotovora* spp. Nous avons eu recours à une deuxième analyse statistique avec le logiciel PAST - PAlaeontological STatistics, ver. 1.81. [147].

CHAPITRE 3

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1. Caractérisation biochimiques et affiliation en pathovars des souches d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques

Les tests biochimiques constituent une approche classique, mais particulièrement utile, pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces de bactéries phytopathogènes. Les caractéristiques biochimiques des souches d'*Erwinia carotovora*, nous ont permis de mieux distinguer les différentes sous-espèces appartenant aux *Erwinia carotovora* spp. pectinolytiques.

En effet, le test de la tolérance à des températures élevées indiqué par DYE [40] est discriminant. Les résultats nous ont révélé que sur des 12 souches caractérisées, 9 souches appartiennent à *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 2 souches à *Erwinia chrysanthemi* et une souche d'*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (tableau 3. 1).

Tableau 3. 1 : Caractérisation en pathovars des souches d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques.

		oxydase	catalase	fermentation	sucrose	Indole	Croissance à 35°C
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	ECC	-	+	+	-	-	+
	A13	-	+	+	-	-	+
	A48	-	+	+	-	-	+
	A101	-	+	+	-	-	+
	A12	-	+	+	-	-	+
	A292	-	+	+	-	-	+
	A41	-	+	+	-	-	+
	A1001	-	+	+	-	-	+
	A81	-	+	+	-	-	+
A452	-	+	+	-	-	+	
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	A491	-	+	+	-	+	+
	A4	-	+	+	-	+	+
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	A3003	-	+	+	+	-	-

ECC : souche de référence *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

+ : réaction positive au test

- : réaction négative au test.

2. Caractérisation des isolats endophytes antagonistes

2.1 La réaction d'Hypersensibilité

Parmi les 36 isolats endophytes testés, 16 provoquent la réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac. Cette réaction se manifeste par la formation d'une zone nécrotique autour de la partie infiltrée après 2 jours (figure 3. 1).

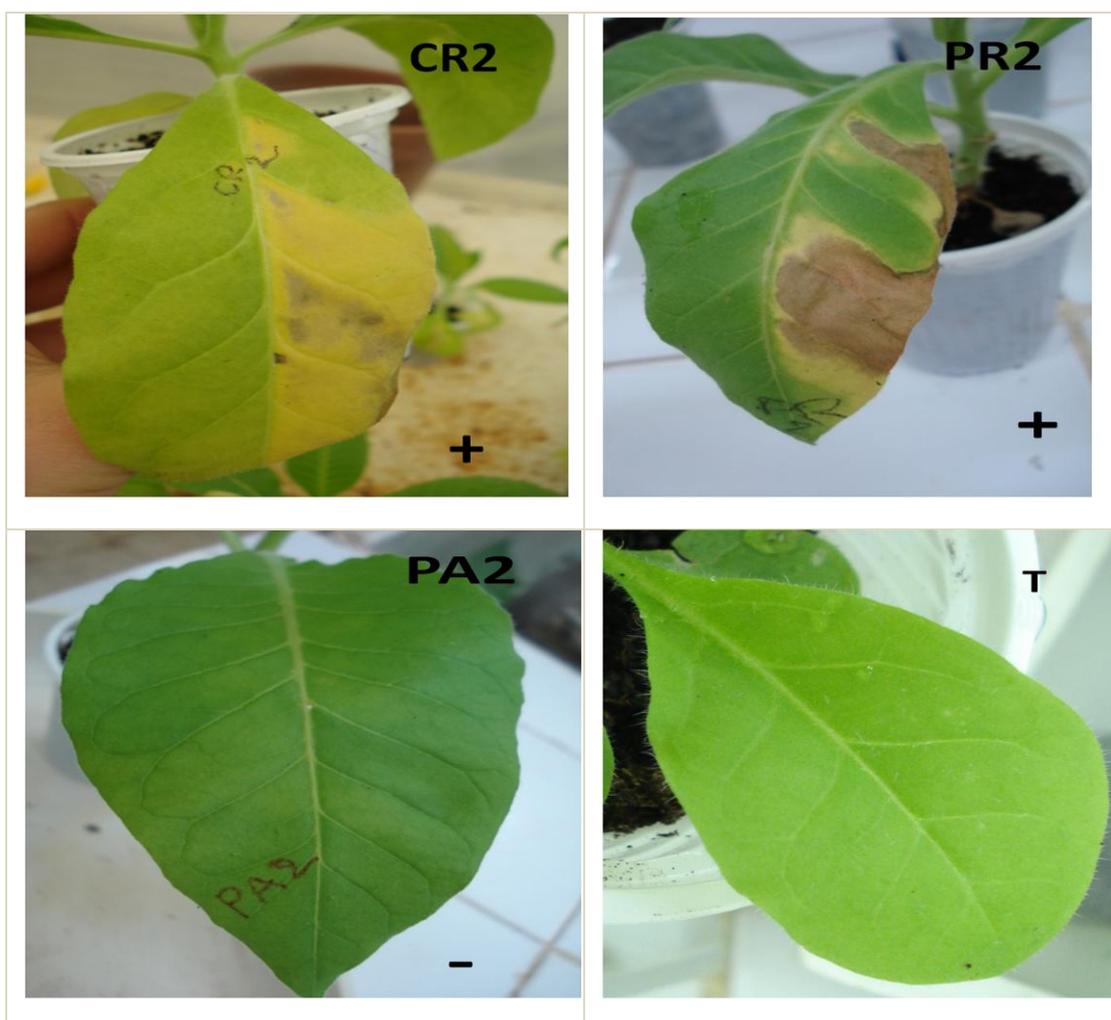


Figure 3.1 : Réaction d'hypersensibilité sur feuilles de tabac 48 h après l'inoculation.

+ : réaction positive au test d'hypersensibilité sur tabac (nécrose) (isolat CR2, PR2).

- : réaction négative au test HR (isolat PA2).

T : témoin inoculé avec l'eau distillée stérile.

2.2 Caractérisation biochimique des isolats endophytes

Les isolats endophytes qui ont répondu négativement au test d'hypersensibilité au tabac, ont fait l'objet d'une identification inspirée des caractères biochimiques les plus communs. La coloration de Gram nous a permis de classer 10 isolats appartenant au groupe des Gram positif avec quatre profils biochimiques différents et 11 isolats comme étant des bactéries à Gram négatif, 4 souches appartenaient au genre *Pseudomonas* et les sept isolats repartis en cinq profils biochimiques différents.

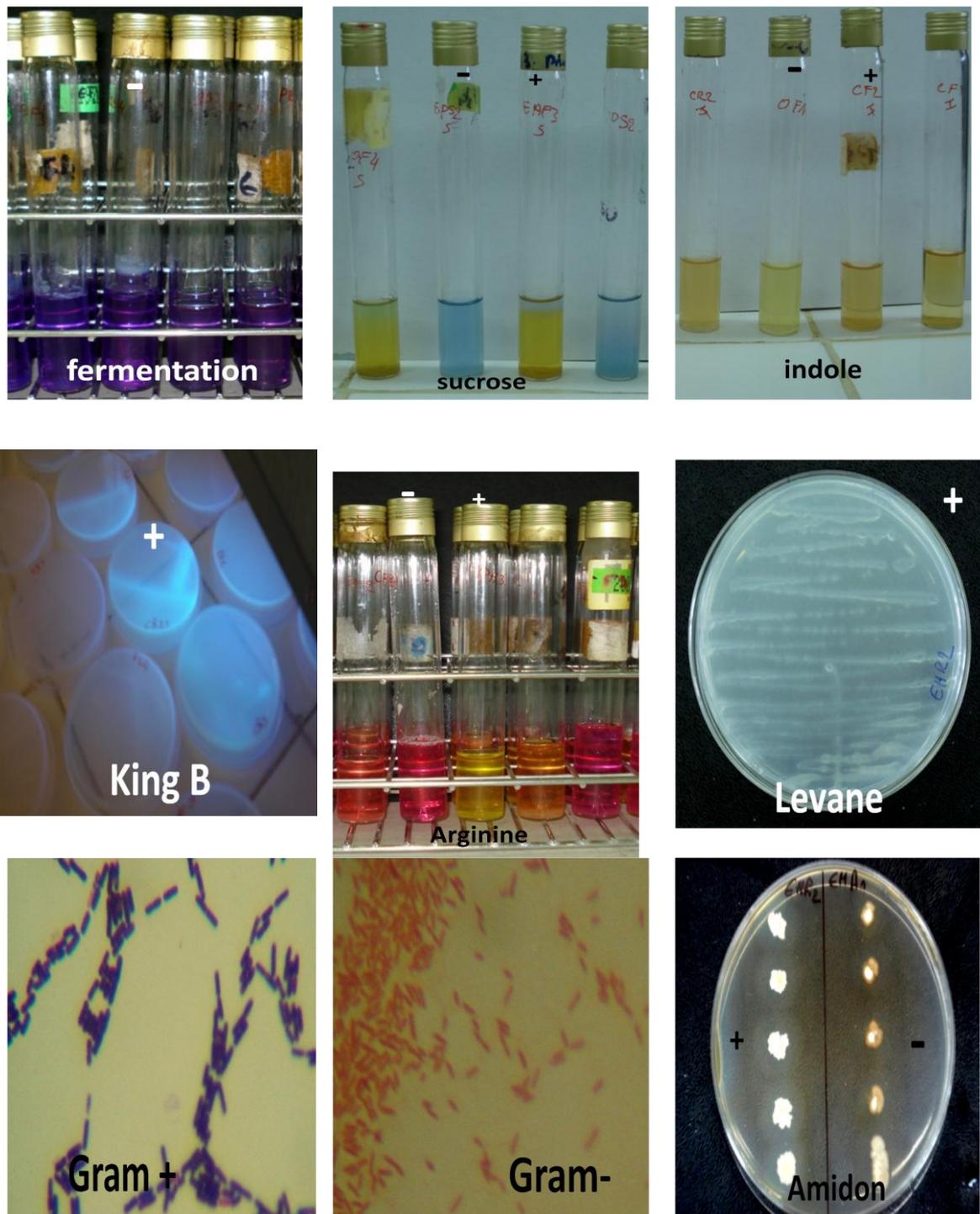


Figure 3.2 : Réaction de quelques isolats aux différents tests biochimiques.

+ : Réponse positive ; - : Réponse négative.

Tableau 3.2: Caractérisation biochimique des différents isolats

	K.B	Profil	souche	levane	oxydase	catalase	Indole	Sucrose	fermentation	arginine	gélatine	Amidon	
Gram-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	PA2	+	-	+	-	-	-	-	+	+	
			CS1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
			PS1	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
			EPR3	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
	-	Profil5	CF4, OF4	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
		Profil6	OA3, PF4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		Profil7	EHA2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
		Profil8	EHR2, EPF3	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
		Profil9	PA3	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+

KB : milieu B de King [248].

		souche	catalase	Indole	Sucrose	fermentation	arginine	gélatine	Amidon
Gram+	Profil1	CF1	+	+	-	-	-	+	+
	Profil2	CR1, EHS1, PR1	+	-	-	-	-	+	+
	Profil3	OA1, EPS2, PS2	+	-	-	-	+	+	+
	Profil4	OR2, OS4	+	+	+	+	+	+	+

2.3 Identifications moléculaire par l'utilisation de l'ADNr 16S

Contrairement à l'identification par voie biochimique, l'analyse de la séquence d'ADNr 16S permet une identification bactérienne universelle plus raffinée. L'examen moléculaire a permis en premier lieu de confirmer les résultats obtenus par les tests biochimiques réalisés sur les isolats endophytes. Cette identification moléculaire par l'analyse du Blast (Basic Local Alignment Search Tool) nous a permis l'identification de treize isolats endophytes, huit souches bactériennes d'entre elles appartenant au genre *Bacillus* repartis en quatre espèces différentes (*Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis*), une souche appartenait à *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* et trois souches faisaient partie du genre *Pseudomonas*.

Tableau 3.3 : Résultats des isolats endophytes identifiés par séquençage d'ADNr 16S.

Isolats endophytes	Espèces identifiées
OR1, OS1, EHR1	<i>Bacillus cereus</i>
OR2, OS4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
OS2	<i>Bacillus pumilus</i>
EHF3	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv <i>beticola</i>
EHF5	<i>Bacillus subtilis</i>
	Genres identifiés
EPR3, PS1, CR2	<i>Pseudomonas</i> spp.
CR1	<i>Bacillus</i> spp.

3. Antagonisme *in vitro*

Les isolats endophytes se sont révélés aussi actifs sur les souches d'*Erwinia carotovora* spp. que sur la souche de référence utilisée pour ce test. L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'un halo autour du spot bactérien actif qui représente la zone d'inhibition. Les dimensions de la zone d'inhibition varient en fonction des souches testées (figure 3.3).

Les résultats exposés dans le tableau (3.4) indiquent que les souches d'*Erwinia carotovora* spp répondent de façon variable au test d'antagonisme par rapport à la souche de référence.

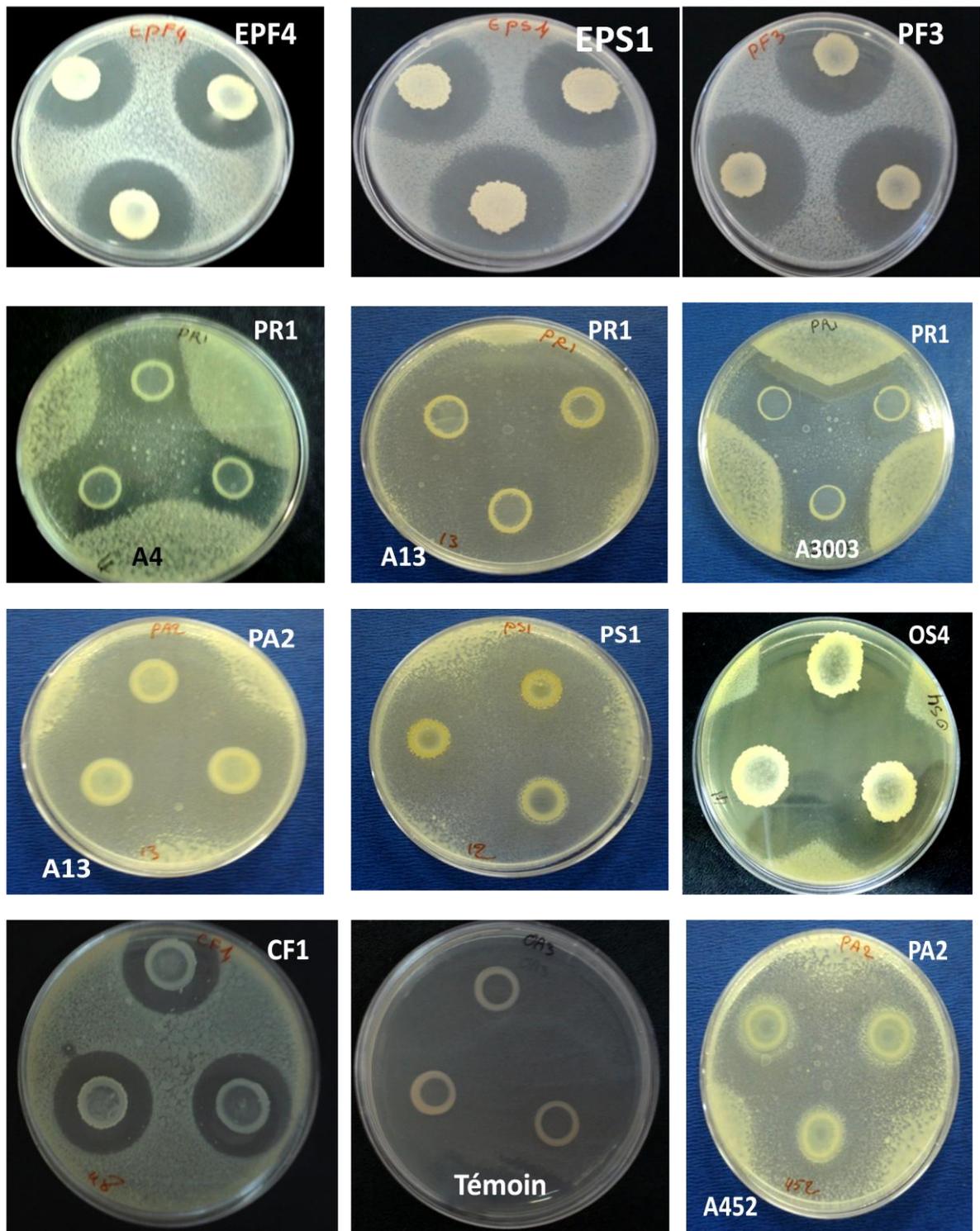


Figure 3.3 : Pouvoir antibactérien de quelques isolats bactériens endophytes sur des souches d'*Erwinia carotovora* spp. représentés par les zones d'inhibition (zones claires autour des spots).

Tableau 3.4 : Résultats du test d'antagonisme des isolats endophytes antagonistes envers les souches d'*Erwinia carotovora* les plus virulentes.

isolats endophytes	Souches d' <i>Erwinia carotovora</i> spp (zone d'inhibition en mm)											
	A81	A48	A101	A12	A13	A452	A4	A41	A292	A491	A1001	A3003
PA2	30,63	31,77	23,70	25,33	45,00	45,00	32,00	17,00	29,33	45,00	45,00	29,67
PA3	11,33	0,00	23,70	0,00	21,00	45,00	22,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PR1	29,67	36,00	28,80	26,00	45,00	45,00	28,00	26,07	30,67	26,07	45,00	45,00
CR1	0,00	0,00	22,83	0,00	22,23	45,00	0,00	0,00	0,00	25,33	27,00	0,00
OA1	0,00	0,00	22,67	0,00	0,00	45,00	0,00	0,00	24,33	0,00	11,33	0,00
OA3	16,00	38,67	21,43	29,67	45,00	45,00	29,67	30,33	13,33	32,33	0,00	33,67
OR2	37,70	17,00	22,33	45,00	42,00	45,00	45,00	35,00	43,00	33,33	40,67	31,27
EHA2	39,27	24,00	19,73	31,33	34,77	23,33	18,00	23,67	18,67	27,77	24,00	24,33
EHR2	38,00	22,63	0,00	23,80	31,73	34,33	0,00	0,00	35,00	0,00	30,00	0,00
EPR3	26,67	25,47	22,20	26,33	0,00	45,00	24,33	20,67	0,00	45,00	45,00	31,77
PF4	31,63	15,37	20,27	18,00	45,00	45,00	0,00	0,00	18,00	20,67	18,40	0,00
PS1	30,70	39,70	21,33	45,00	45,00	0,00	0,00	23,00	32,67	0,00	45,00	0,00
PS2	28,23	0,00	21,40	0,00	16,73	45,00	0,00	0,00	26,00	24,33	20,10	16,97
CF1	35,50	30,37	21,40	45,00	26,00	45,00	36,33	30,00	0,00	45,00	34,63	27,00
CF4	0,00	0,00	22,70	0,00	17,00	45,00	0,00	18,00	0,00	17,33	19,67	0,00
CS1	0,00	0,00	0,00	0,00	14,33	45,00	24,33	26,67	16,33	27,33	20,33	0,00
OF4	38,13	20,73	24,33	29,30	0,00	45,00	24,77	16,00	24,00	23,33	35,03	0,00
EHS1	0,00	17,30	24,70	0,00	0,00	45,00	0,00	0,00	24,00	0,00	0,00	0,00
EPF3	23,73	23,57	18,33	0,00	41,00	37,40	13,67	26,00	21,07	27,67	26,30	0,00
EPS2	42,00	37,60	22,67	23,30	26,67	45,00	25,00	21,00	25,03	45,00	20,67	15,33
OS4	45	45,00	21,97	45,00	45,00	45,00	45	39,33	26,00	45,00	45	45,00

3.1. Analyse statistiques des résultats

3.1.1 Analyse de la variance

Une analyse de la variance à l'aide du logiciel statistique « systat » est utilisée pour effectuer une analyse globale des résultats. Cette dernière est réalisée sur les douze souches d'*Erwinia carotovora* testées.

Les résultats de cette analyse indiquent que la variation du diamètre des zones d'inhibition dépend étroitement des isolats antagonistes et des souches d'*Erwinia carotovora* testées (tableau 3.5).

Tableau 3. 5: Modèle ANOVA appliqué aux souches d'*Erwinia carotovora* spp. sur le diamètre d'inhibition des isolats endophytes.

Source de variation	Somme des carrés	d.d.l	Carrés moyens	F-ratio	P
Endophyte	65768.958	20	3288.448	282.948	0.000
Erwinia	33621.794	11	3056.527	262.993	0.000
Endophyte*Erwinia	89002.563	220	404.557	34.809	0.000

d.d.l : degré de liberté.

F-ratio : test de Fisher.

P: Propabilité.

La figure (3.4) montre que le diamètre des zones d'inhibition varie en fonction des souches pathogènes testées, donnant une valeur hautement significative démontrant ainsi cette dépendance. La souche A452 s'est avéré la plus sensible aux isolats bactériens antagonistes montrant un pic à la valeur du diamètre des zones d'inhibition de 40 mm : tandis que la souche A3003 s'est dévoilée la moins sensible aux tests antibactériens des isolats où le diamètre le plus faible avoisine les 15 mm de diamètre.

Les isolats endophytes OS4 et OR2 sont les plus actifs, vu que les zones d'inhibition enregistrées dépassent les 35 mm de diamètre. Tandis que les isolats EHS1 et OA3 présentent les plus faibles valeurs des zones d'inhibition.

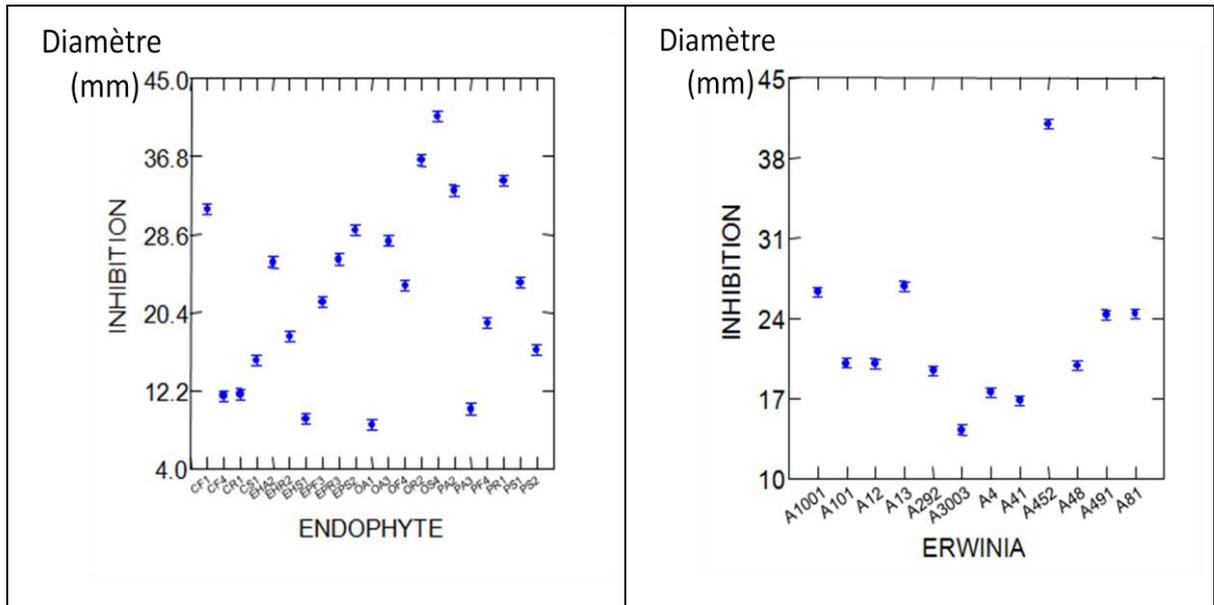


Figure 3.4: Variation du diamètre des zones d'inhibition en fonction des isolats endophytes et des souches d'*Erwinia carotovora*.

3.1.2 Etude des corrélations du pouvoir antibactérien des isolats endophytes et des souches d'*Erwinia carotovora* spp.

L'analyse en composantes principales (ACP) effectuée sur le pouvoir antibactérien de 20 isolats endophytes qui ont montré un fort pouvoir inhibiteur envers les souches d'*Erwinia carotovora*, met en évidence la présence d'une corrélation positive entre les valeurs constituant la matrice des données et qui est vérifiée par le cercle de corrélation (figure 3.5).

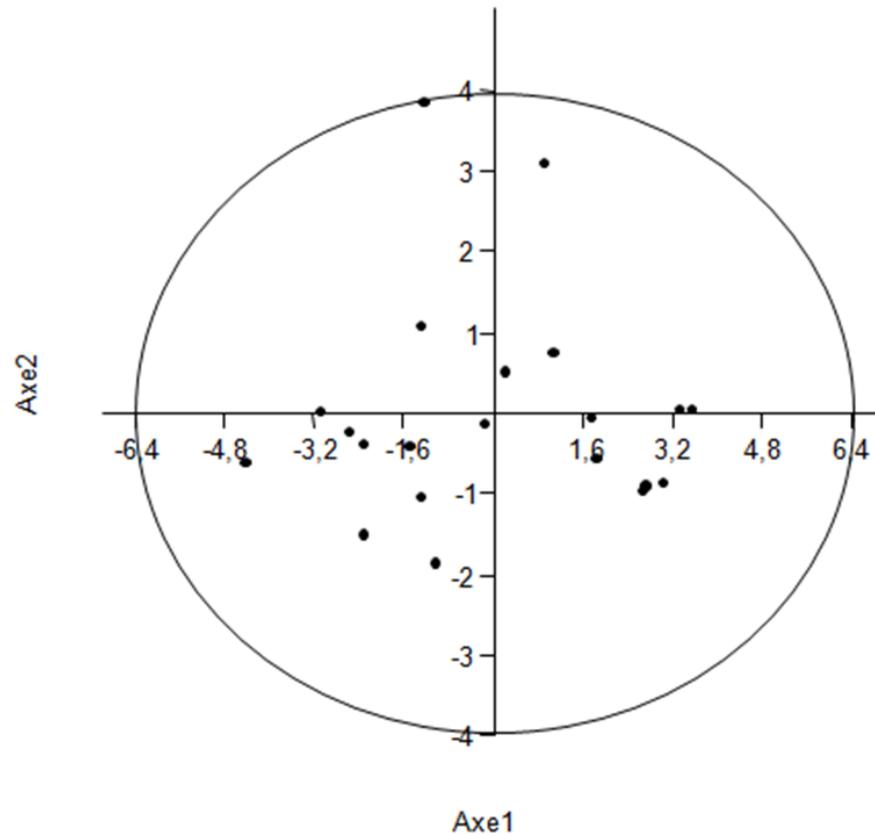


Figure 3.5 : Cercle de corrélation du pouvoir antibactérien des isolats endophytes.

L'étude des corrélations a été réalisée sur le plan 1 et 2 (figure 3.5) du moment qu'ils présentent une forte contribution à l'identification des nuages avec des valeurs respectives de 46,291% et 17,586%.

L'axe 1 représente les isolats endophytes étudiés, où ceux les plus actifs représentent les contributions les plus importantes. À l'opposé de cet axe, les plus faibles contributions sont représentées par les isolats endophytes les moins actifs.

L'axe 2 représente la réponse des onze souches d'*Erwinia carotovora* qui se traduit par différents diamètres de zones d'inhibition.

Le cercle de corrélation (figure 3.5) et Les calculs des distances euclidiennes ont été faits sur la base d'une similarité de -4.8 (figure 3.6). Ils révèlent la présence de trois groupes constitués des observations qui ont des caractéristiques similaires (figure 3.7).

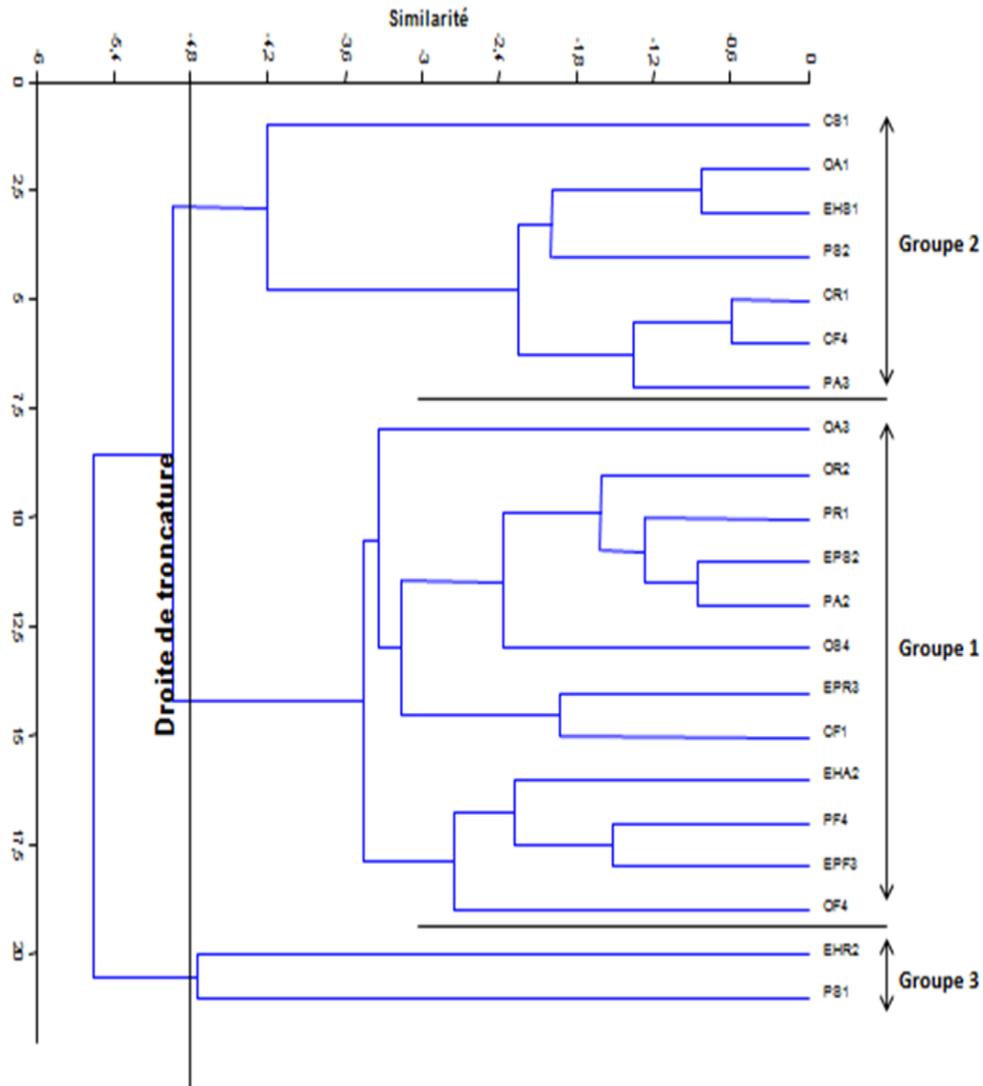


Figure 3.6 : Classification ascendante hiérarchique des différents isolats endophytes (calculée par le biais des distances euclidiennes selon la méthode de Ward).

Le premier groupe renferme les isolats OA3, EHA2, EPF3, PR1, EPS2, PA2, EPR3, CF1, OF4, OR2, PF4 et OS4 qui correspondent aux isolats les plus actifs et dont la réponse antibactérienne est régulière envers la plupart des souches d'*Erwinia carotovora*.

Ce groupe est corrélé positivement avec les différents vecteurs qui représentent les souches d'*Erwinia carotovora*, il est caractérisé par son fort

pouvoir antagoniste vis-à-vis des souches testées qui se traduit par un diamètre variant entre 30 et 45 mm.

Le second groupe est constitué par les isolats CS1, CR1, CF4, PA3, OA1, EHS1 et PS2 qui correspondent aux isolats endophytes les moins actifs et dont les zones d'inhibitions sont variables.

Ce dernier groupe est corrélé négativement avec les vecteurs des souches d'*Erwinia carotovora*, et est caractérisé par un faible pouvoir antibactérien qui se traduit par un diamètre de zones d'inhibition beaucoup moins réduit sur toutes les souches d'*Erwinia carotovora* par rapport au premier groupe et dont les réponses sont hétérogènes.

Le troisième groupe renferme les deux isolats EHR2 et PS1 qui correspondent aux isolats ayant les plus faibles activités antibactériennes (Figure 3.7).

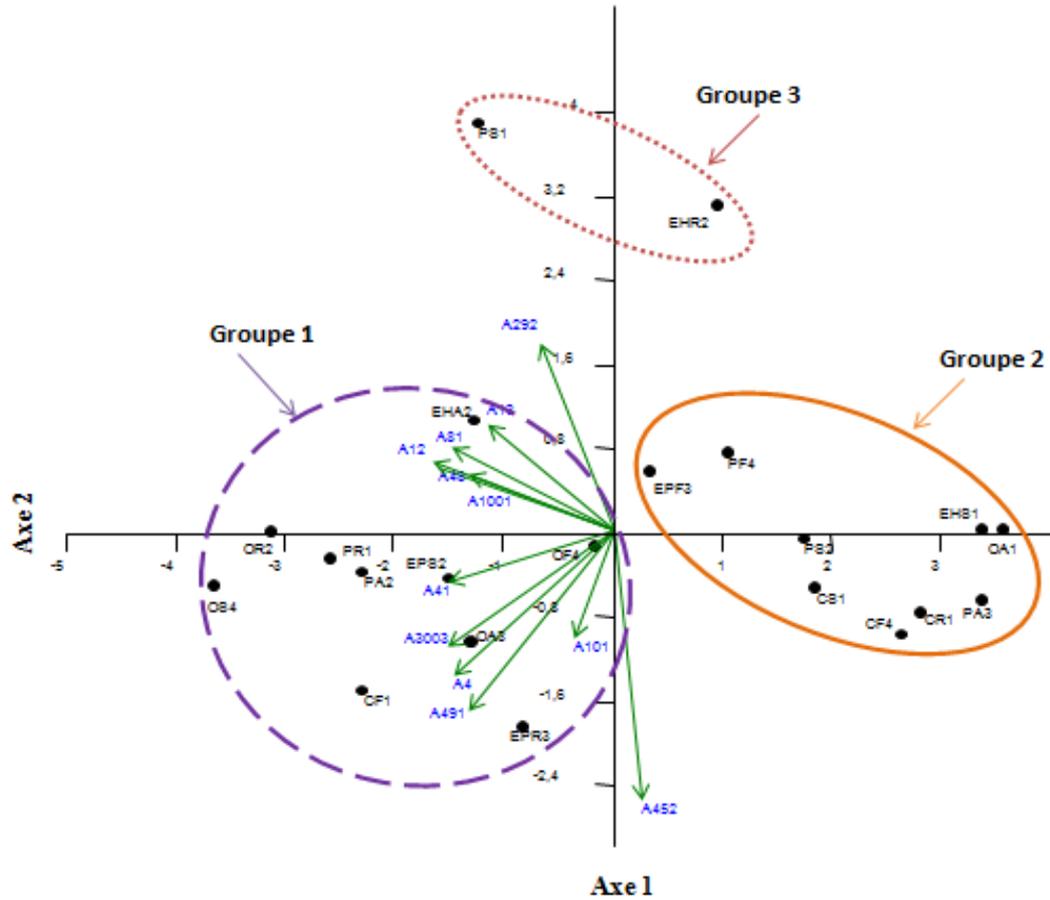


Figure 3.7 : Analyse en composantes principales (ACP) des 20 isolats endophytes à l'égard des 12 souches d'*Erwinia carotovora*.

Tous les vecteurs sont corrélés positivement entre eux, du fait que l'angle entre les différents vecteurs est inférieur à 45° , ce qui suggère et confirme par la même que l'ensemble des souches bactériennes testées sont sensibles aux isolats endophytes testés.

4. Test d'antagonisme *in vivo*

Le test d'antagonisme *in vivo* a été réalisé sur trois variétés de pomme de terre inoculées avec cinq isolats d'endophytes bactériens appartenant tous au premier groupe c'est à dire celui renfermant les isolats les plus actifs (diamètre entre 30 et 45 mm).

Les résultats obtenus à travers l'étude du pouvoir antibactérien *in vivo*, nous ont permis de constater une diminution et parfois même une absence totale de symptômes de pourriture molle sur les disques de pomme de terre trempés au préalable dans la suspension bactérienne d'endophytes comparés à ceux inoculés directement avec les souches d'*Erwinia carotovora* constituant les témoins positifs (figure 3.8).

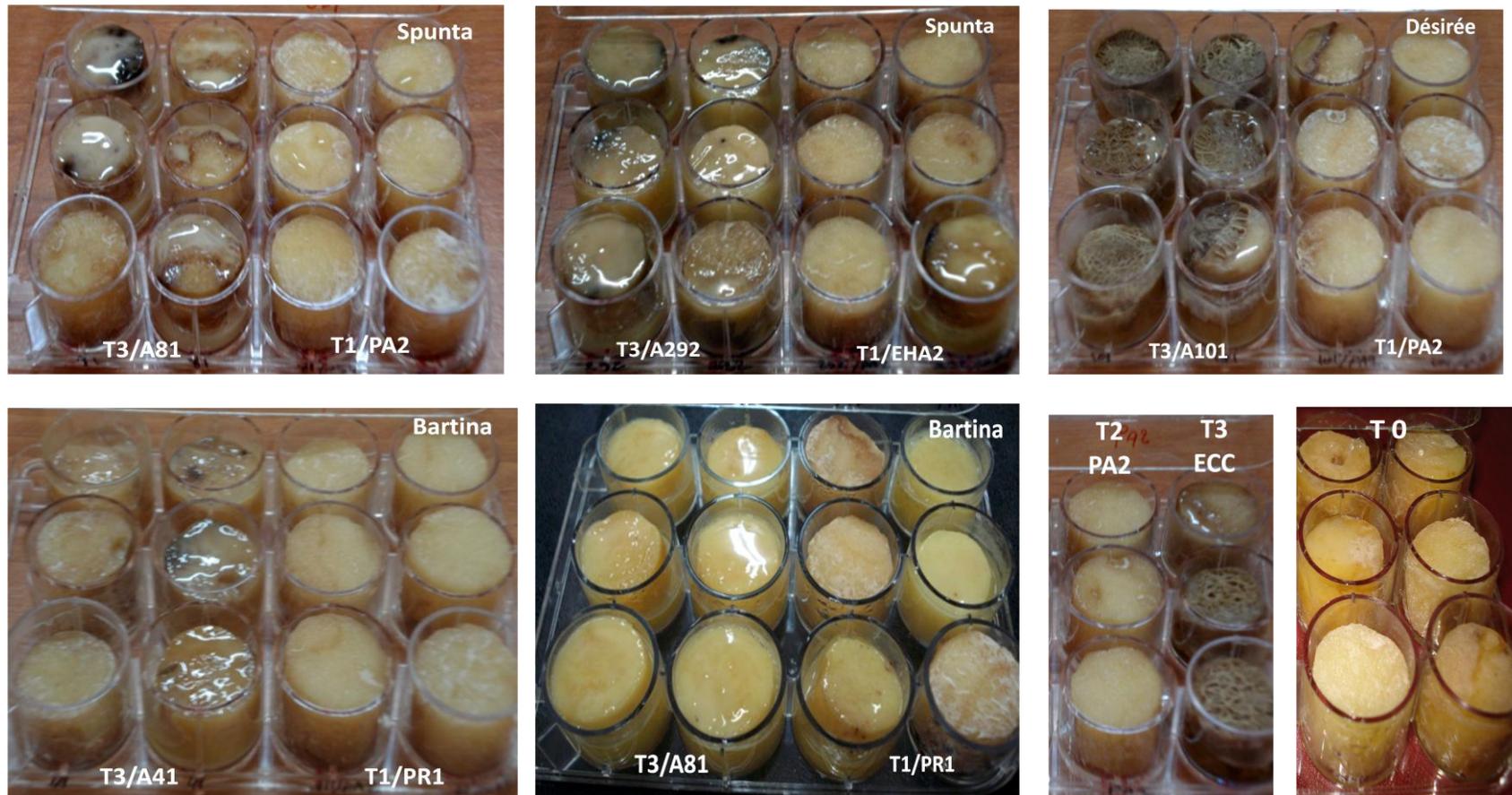


Figure 3.8 : Réponses des trois variétés de pomme de terre au traitement des isolats endophyte.

T0 : le témoin négatif avec de l'eau distillée stérile préalablement désinfectés ; **T1** : trempage des disques de pommes de terre dans la suspension bactérienne d'endophyte puis inoculés par la souche d'*Erwinia carotovora*.

T2 : trempage des disques de pomme de terre dans la suspension d'endophyte ; **T3** : les disques de pomme de terre inoculés directement avec la suspension d'*Erwinia carotovora*.

L'application du modèle ANOVA pour les 540 données (tableau 3.6, figure 3.9), a permis de déduire que les effets antibactériens des isolats endophytes sont hautement significatifs selon la variété de pomme de terre, la souche d'*Erwinia carotovora* inoculée et enfin l'isolat endophyte testé.

Tableau 3.6 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des isolats endophytes antagonistes et les souches d'*Erwinia carotovora* en réponse au développement des symptômes de pourriture molle sur les variétés de pomme de terre testées.

Source de variation	Somme des Carrés	d.d.l	Carrés moyens	F-ratio	p
endophyte	8086,28	4	2021,57	215,630	0,000000000000000000
<i>Erwinia</i>	321,04	5	64,21	6,849	0,00000357504422754
variété	780,03	2	390,02	41,601	0,000000000000000000
endophyte*<i>Erwinia</i>	1245,66	20	62,28	6,643	0,000000000000000044
endophyte*variété	1134,86	8	141,86	15,131	0,000000000000000000
<i>Erwinia</i>*variété	1432,41	10	143,24	15,279	0,000000000000000000

d.d.l : degré de liberté ; **F-ratio** : test de Fisher, **P**: Propabilité.

Au vu des résultats indiqués sur le tableau 2.6, les isolats endophytes antagonistes testés révèlent que leurs actions génèrent un effet très important sur l'apparition des symptômes de la pourriture molle, montré par les valeurs très hautement significatives de l'analyse statistique des résultats (P= 0,000) (figure 2.9).

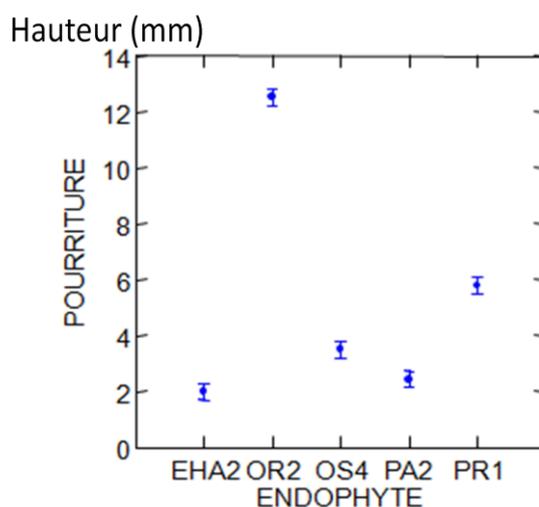


Figure 3.9: Effet des isolats endophytes sur le développement de la pourriture molle.

Le choix de la variété de pomme de terre influence d'une façon prépondérante sur sa prédisposition à l'installation des symptômes de la pourriture molle, où chaque variété répond de manière différente aux traitements subis ($P=0,000$). La variété Bartina s'est dévoilé la plus sensible au test effectué, tandis que la variété désirée s'est révélé la moins sensible où la pourriture molle n'a pas dépassé les 5 mm de hauteur (figure 3.10).

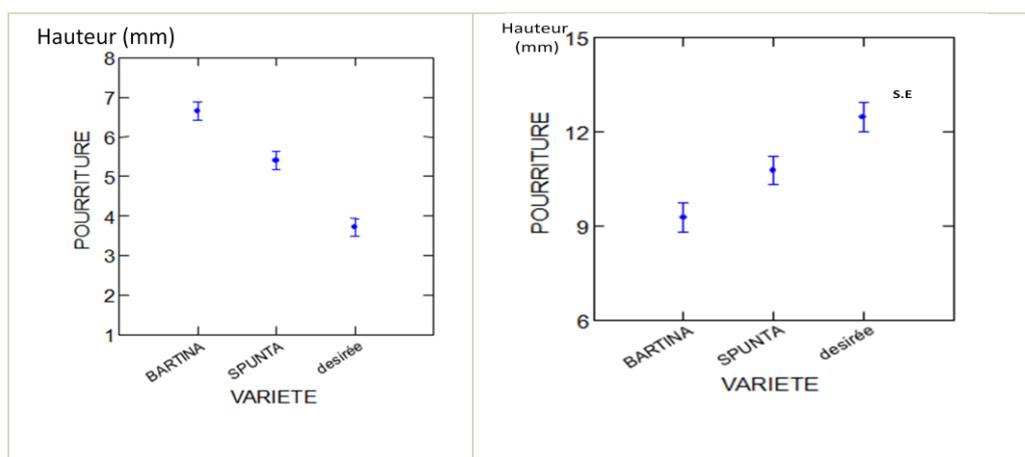


Figure 3. 10 : Effet du choix de la variété de pomme de terre sur le développement de la pourriture molle.

S.E : témoin positif (traitement sans endophyte).

À travers les résultats obtenus (figure 3.11), nous avons constaté que les interactions entre les variétés de pomme de terre, les isolats endophytes

antagonistes et les souches d'*Erwinia carotovora* sont hautement significatives ($P= 0000$).

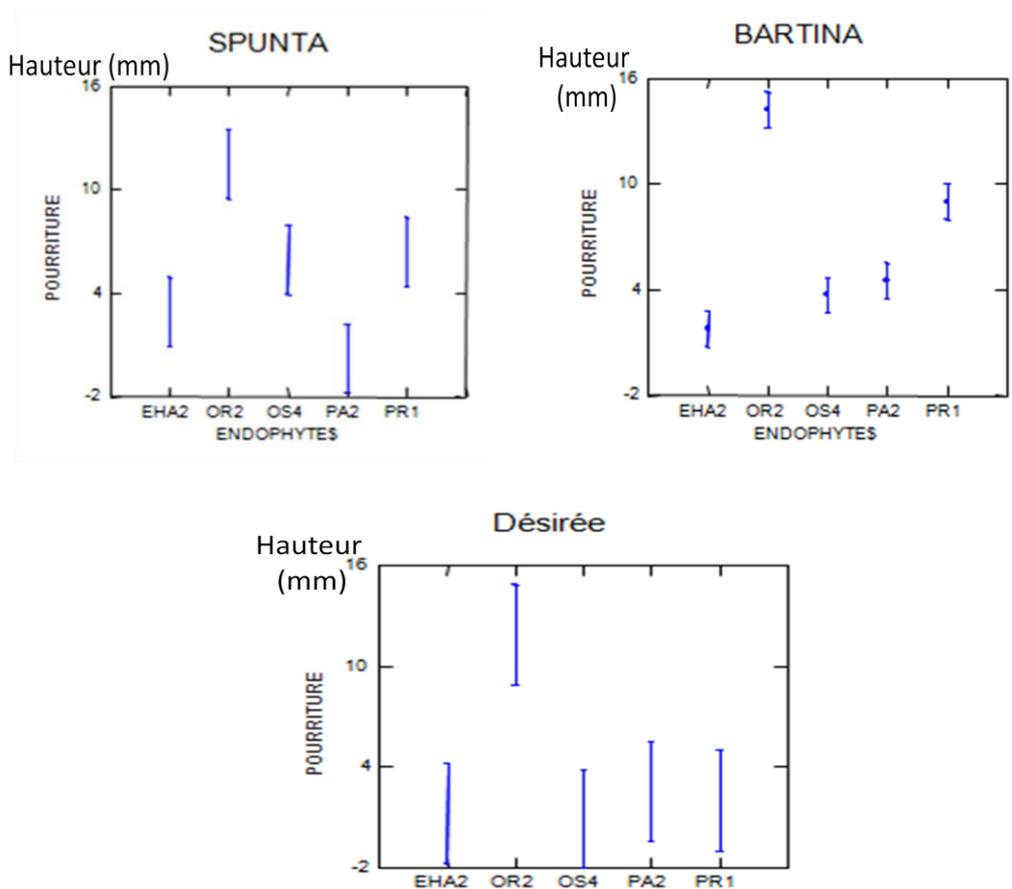


Figure 3. 11: Effet des isolats antagonistes endophytes et variétés de pomme de terre sur le développement de la pomme de terre.

Les résultats révèlent que les souches PA2 et EHA2 se sont montrées les plus efficaces où la pourriture molle n'a pas dépassé les 5 mm de hauteur. Cependant, à travers les graphes réalisés, nous avons remarqué que les disques de pomme de terre traités au préalable par les isolats endophytes OR2 et OS4 étaient les moins actifs où des pics de hauteur de pourriture molle maximale ont été enregistrés après deux jours d'inoculation. Contrairement aux résultats du test d'antagonisme *in vitro*, ces deux souches ont exhibé un pouvoir antibactérien le plus actif. Ces résultats suggèrent que ces deux antagonistes se comportent différemment entre une analyse *in vitro* et *in vivo* (figure 3.13).

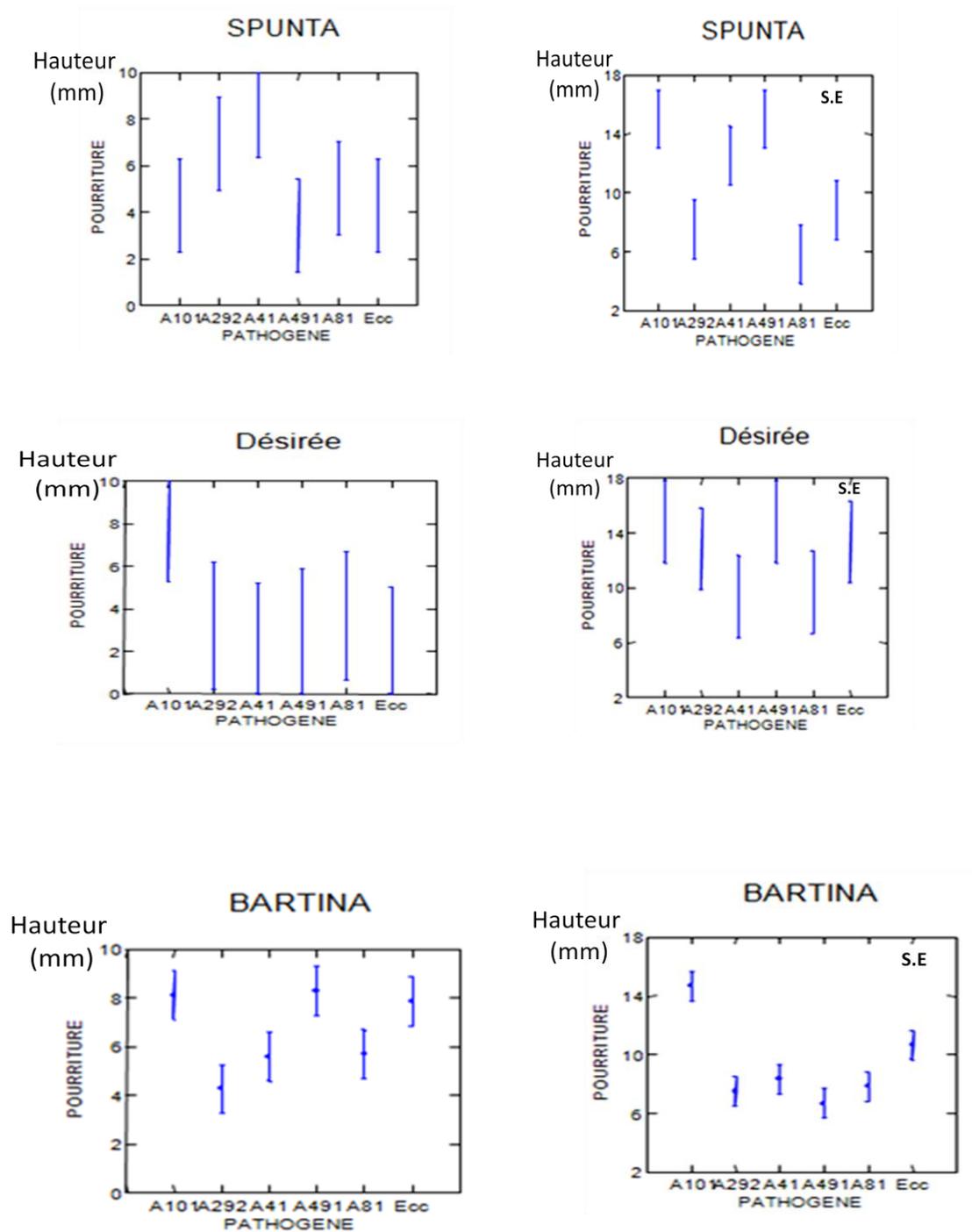


Figure 3. 12 : Effet du trempage des disques de pomme de terre dans la suspension d'antagoniste sur l'expression des souches d'*Erwinia carotovora*.

S.E : témoin positif (traitement sans endophyte).

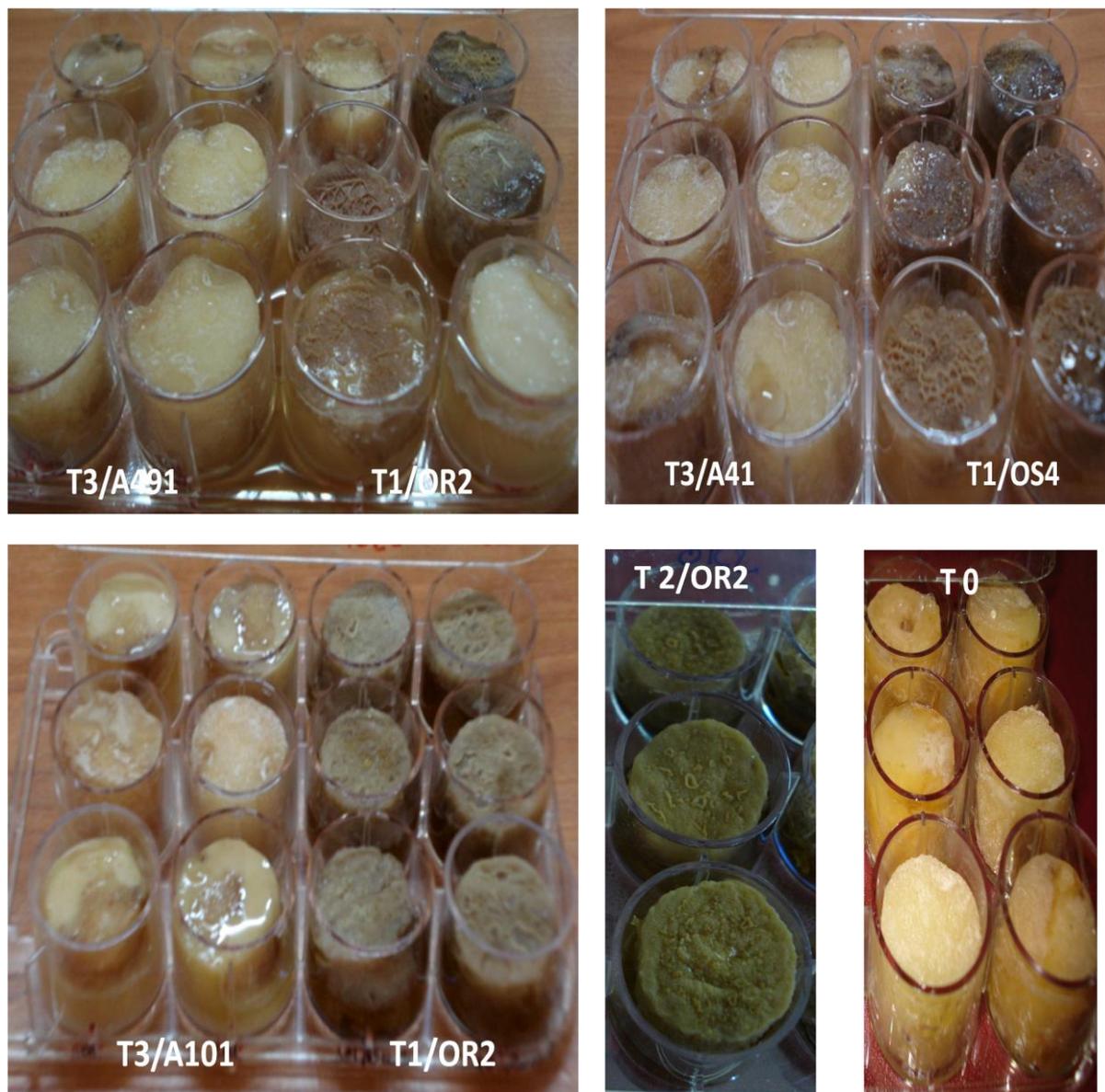


Figure 3. 13 : Action des souches OR2 et OS4 dans l'établissement de la pourriture molle.

T0 : le témoin négatif avec de l'eau distillée stérile préalablement désinfectés.

T1 : trempage des disques de pommes de terre dans la suspension bactérienne d'endophyte puis inoculés par la souche d'*Erwinia carotovora*.

T2 : les disques de pomme de terre trempés dans la suspension d'endophyte.

T3 : les disques de pomme de terre inoculés directement avec la suspension d'*Erwinia carotovora*.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'apparition et la gravité des dégâts liés à *Pectobacterium* sont multifactorielles. Elles dépendent de la réceptivité de la culture à la maladie, du potentiel infectieux environnemental et des conditions pédoclimatiques lors de la culture. Ces dernières, expliquent en grande partie la prédominance de l'une ou l'autre des deux espèces impliquées dans la maladie. Il est cependant impératif de connaître les espèces en cause pour apporter une méthode de lutte appropriée.

En effet, si les symptômes sont toujours favorisés par une atmosphère confinée et humide, par un excès de pluies et par les blessures qui favorisent la pénétration des bactéries, la présence des bactéries *Pectobacterium atrosepticum*, se limite habituellement aux tubercules cultivés dans les sols tempérés, tandis que les bactéries de l'espèce *P. carotovorum* sont très représentées dans les zones plus chaudes, notamment subtropicales et tropicales [148].

Les résultats d'isolement et de caractérisation des *Pectobacteria* de la présente étude signalent l'existence de souches très virulentes, virulentes et moyennement virulentes, indiquant que le pouvoir pathogène de ces souches est directement lié à leur activité pectinolytique. En effet, chez les *Pectobacteria*, le pouvoir pathogène corrélé à un arsenal enzymatique, est particulièrement bien adapté à la dégradation de tous les composants des parois cellulaires végétales, ce qui explique l'ampleur des dégâts observés et leur vitesse d'apparition. Ce complexe enzymatique associe des protéases, des cellulases et de nombreuses enzymes pectinolytiques (pectine et pectate lyases, pectate hydrolases et pectine méthylestérases) [149].

Nous avons mené ce travail afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats bactériens endophytes testées *in vitro* et *in vivo* sur une collection de souches d'*Erwinia carotovora* ayant un fort pouvoir pectinolytiques. Les résultats

se sont révélés très prometteurs, du fait que la majorité des isolats endophytes testés inhibaient la croissance des *Erwinia* pectinolytiques *in vitro* et *in vivo*.

1. Virulence, hypervirulence et diversité spécifique et phénotypique des *Pectobacteria*, une espèce d'*Erwinia carotovora* spp. émergente

Pour notre expérimentation, en fonction des réponses symptomatologiques exprimées sur la pomme de terre (intensité de la pourriture) et le temps de réaction [129], nous avons préféré utiliser pour les tests ultérieurs uniquement les souches les plus virulentes c'est-à-dire celles dont les symptômes de macération se développent rapidement *in vitro* et sur tous les disques de pomme de terre [129]. Les disques macérés ont un aspect mou, réticulé, de couleur claire au début puis brun au contact de l'air accompagnés d'une odeur nauséabonde.

Les profils des caractéristiques biochimiques des souches bactériennes affiliées aux *Erwinia carotovora* sont variables selon les biovars. Ces résultats concordent avec ceux des travaux de DE BOER [150]. C'est ainsi que les tests de la croissance à 35°C et de la production d'indole sont variables selon les biovars. Dans le présent travail, 9 souches (75%) sont apparentées aux *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ce qui fait de cette sous-espèce la plus dominante, deux souches montrent les réponses des *Erwinia chrysanthemi* et enfin une seule souche comme étant *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Ces résultats confirment ce qui a été rapporté par la littérature du fait de la distribution géographique de ces sous-espèces [56].

En effet, représentée par 75% des souches identifiées, l'espèce *P. carotovorum* anciennement *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* définie par GARDAN [45] est distribuée dans une aire géographique étendue, aussi bien dans les zones tempérées que tropicales et sur une gamme d'hôtes très large [56]. Sur la pomme de terre, la bactérie s'exprime préférentiellement à des températures plus élevées allant de 20 à 30 °C, comparée à *P. atrosepticum* [261].

La température la plus favorable à la maladie est ainsi comprise entre 15 et 20 °C pour *P. atrosepticum* et aux environs de 25 °C pour *P. carotovorum*. Cela s'explique par une différence d'activité métabolique des espèces impliquées ; pour chacune d'elles, c'est dans cette gamme de températures particulières que la

capacité de multiplication et de production d'enzymes lytiques est suffisamment élevée, voire optimale, pour causer des dégâts aux cultures [151].

Une seule souche représentative de *P. atrosepticum* a été isolée sur nos milieux de culture et par la même sélectionnée pour sa virulence. Le symptôme de la maladie de la jambe noire sur la pomme de terre, connu comme étant caractéristique de *P. atrosepticum* en conditions fraîches, peut également être provoqué par *P. c. subsp. carotovorum* lorsque les températures sont élevées (30-35 °C). Les *E. chrysanthemi* sont désormais intégrées dans le nouveau genre *Dickeya*. Avec une température de croissance optimale élevée (35-37 °C) [152], *Dickeya* a été jusqu'à présent surtout identifiée sous les climats chauds et en serre [5].

Ces résultats suggèrent que l'aire de répartition de cette espèce est probablement entrain de s'étendre à cause des échanges commerciaux entre les pays. Rappelons à juste titre que les différentes souches des *Pectobacteria* constituant la présente étude, ont été isolées à partir de semences de pomme de terre d'importation. De plus, vu sa température de croissance optimale, nous pouvons avancer l'idée que le potentiel d'adaptation (fitness) de l'espèce *Pectobacterium chrysanthemi* à de nouvelles conditions environnementales pourrait s'établir grâce à la plasticité de son matériel génétique. Il est connu que de nombreux gènes de virulence portés par le plasmide ou le chromosome bactérien peuvent subir des recombinaisons ou des flux, suite aux variations des conditions écologiques [153].

Auparavant, ces bactéries étaient trouvées dans des niches écologiques distinctes. Depuis quelques années, les producteurs de pomme de terre du nord notamment en Europe font face au développement de bactérioses causées par *Erwinia chrysanthemi*. Le réchauffement planétaire et les variations climatiques brusques pourraient en être la cause de l'émergence en milieu tempéré de cette bactérie d'origine tropicale [154]. Par conséquent, nous attirons l'attention par rapport à cette espèce émergente qui pourrait constituer des menaces d'épidémies dans les plantations de pomme de terre dans un proche avenir notons que dans la région de l'OEPP cette bactériose est répertoriée dans la liste A2 des organismes phytopathogènes de quarantaine [42].

2. D'une diversité phénotypique des endophytes à une différenciation biochimique et moléculaire

La seconde partie a été réservée à l'étude et à la caractérisation de bactéries endophytes d'un point de vue d'identification et de recherche de leur pouvoir antagoniste.

L'analyse physiologique et biochimique des isolats ont fait ressortir que lors de l'observation microscopique de la coloration de Gram effectuée sur 20 organismes endophytes, cette dernière a permis de les répartir en deux groupes. Onze isolats endophytes sont affiliés aux Gram négatif avec 5 profils biochimiques dont la présence du genre *Pseudomonas*. Cependant, les isolats endophytes à Gram positif sont répartis en quatre profils biochimiques, ce qui révèle une variabilité phénotypique et une diversité métabolique de ces mêmes isolats.

L'identification moléculaire après extraction, purification d'ADN et amplification du fragment de l'ADN 16S et enfin son analyse par la technique du BLAST a permis d'identifier en majorité deux genres importants, le premier est le genre *Bacillus* un Gram positif comprenant les espèces ; *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis*. Le second un Gram négatif est en l'occurrence, le genre *Pseudomonas*. Il est à signaler que l'analyse biochimique et l'analyse moléculaire sont concordantes et aboutissent aux mêmes résultats. La présence de ces genres et espèces bactériennes dans les tissus végétaux comme endophytes a déjà été signalée par plusieurs travaux [80 ; 82].

Les bactéries endophytes sont localisées spécifiquement dans les espaces intercellulaires des tissus épidermiques, elles ont même été trouvées dans les tissus conducteurs de la sève [130 ; 131]. Elles adhèrent aux cellules de la plante par des filaments, montrant ainsi qu'il existe une compatibilité structurale entre l'endophyte et les parois des cellules végétales [155]. Cependant, d'autres bactéries endophytes peuvent être localisées à l'intérieur des cellules végétales [156] et dans les tissus vasculaires [91].

Les bactéries endophytes vivant dans les tissus sains des plantes sont relativement une source potentielle et un produit naturels pour des fins d'exploitation dans l'agriculture, la médecine, et d'autres industries [16]. En effet,

certaines souches appartenant aux genres bactériens telluriques comme les *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, et *Azospirillum* se sont dévoilés expérimentalement des agents efficaces dans le cadre de la lutte biologique [79 ; 81].

Dans l'ensemble, les bactéries endophytes ont un impact positif sur la plante, par le biais d'un effet protecteur ou via une stimulation de sa croissance, elles ont été communément regroupées sous le terme de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes, ou PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) [157].

Le premier genre *Bacillus* spp. présente un large éventail de mécanismes qui peuvent stimuler le développement des plantes. Tout d'abord, *Bacillus* sp. produit des antibiotiques structurellement différents [158 ; 159]. Certaines espèces appartenant à ce genre colonisent rapidement les racines des plantes et présentent la capacité de se multiplier sur les racines [160]. De plus, ils restent proches de l'extrémité des racines par les déplacements passifs au niveau du méristème.

Le second genre *Pseudomonas*; identifié parmi la collection d'isolats endophytes forme un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Ces bactéries Gram négatives, non sporulantes, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines pouvant utiliser le NO_3 comme accepteur d'électrons. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires, et elles ont un métabolisme mésophile et chimio organothorphe, la plupart étant des saprophytes [161]. Quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'humain. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique [162]. Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *P. fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars [161].

Les *Pseudomonas* spp. sont des bactéries Gram-négatives, aérobies, omniprésentes dans les sols agricoles, leur croissance est bien adaptée à la culture dans la rhizosphère. Les *Pseudomonas* spp. possèdent de nombreux traits qui les rendent bien adaptés comme agents de lutte biologique et peuvent assurer par conséquent la promotion de la croissance des plantes auxquelles elles sont

associées [163]. Dans le sol, les *Pseudomonas* spp. représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique [109].

L'identification moléculaire par analyse d'ADN 16S, a indiqué la présence de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* parmi les espèces identifiées. Décrite pour la première fois par YONG-FANG CHEN et YAN-NI YIN [164], La maladie des taches foliaires de la betterave sucrière a été découverte en 1995 en Chine. L'agent pathogène est une bactérie Gram-positive, de petits bacilles irréguliers, à flagelles latéraux, aérobies, et catalase positive. Les colonies des souches isolées de la betterave sucrière produisent un pigment jaune pâle. La température optimale pour leur croissance est de 24 à 27 °C [164].

Il est à noter que la réponse négative induite par cette bactérie au test d'hypersensibilité sur tabac est due au fait qu'elle constitue une plante non-hôte. En effet, la classification et la nomenclature pathovar sont basées sur la capacité de ces bactéries phytopathogènes à causer des symptômes distinctifs ou par référence à leur gamme d'hôtes prouvée [165].

Les bactéries du genre *Curtobacterium* ont été isolées comme des endophytes de nombreuses cultures, notamment du trèfle rouge [166], du riz [167], de la pomme de terre [92], d'igname [166], des plantes de prairie [168], et d'agrumes [169]. Plusieurs rapports bibliographiques ont indiqué que *Curtobacterium luteum* et *Curtobacterium flaccumfaciens* peuvent être utilisés comme des agents de lutte biologique contre de nombreux pathogènes, et peuvent opérer soit par le déclenchement de la résistance systémique induite [170] ou par antibiose [92].

3. Réaction hypersensible et virulence cryptique de certaines bactéries endophytes

Dans le cas des bactéries phytopathogènes, l'apparition de la maladie résulte de l'infection par le pathogène d'une plante dite hôte au cours d'une réaction dite compatible. Par contre, si une bactérie pathogène attaque une plante non hôte au cours d'une réaction incompatible, celle-ci met en place un système de résistance très efficace dite réaction hypersensible (HR).

Les bactéries sont diverses dans leur taxonomie ainsi que dans leur pathogénicité. Cependant, elles possèdent toutes les gènes *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity). Ces derniers, confèrent aux bactéries la capacité de se multiplier dans la plante et de développer les symptômes sur la plante hôte, ainsi que la réaction hypersensible (HR) sur une plante non hôte ou résistante [171]. Les gènes *hrp* codent pour un système de sécrétion de type III qui a la faculté d'injecter les protéines *avr* (avirulence) à travers les cellules de la paroi végétale et de la membrane plasmique [172]. Les protéines bactériennes secrétées par le SSTIII ont la faculté d'injecter des protéines effectrices dans les cellules hôtes. La dénomination des protéines *Avr* est basée sur leurs capacité à dissimuler l'agent pathogène contre le système de résistance de la plante codé par les gènes R, et ainsi cibler la réaction HR [173]. Cependant, les protéines *Avr* semblent être la clef du parasitisme (réaction compatible) dans les plantes hôtes lorsque les protéines du pathogène ne sont pas détectées et la réaction HR n'est pas exprimée.

Les SST3 sont présents dans les bactéries pathogènes aux animaux et aux plantes à l'exemple du SST3 de *Yersinia* spp. [174] cet agent pathogène des animaux sont des parasites primaires extracellulaires leurs protéines yops (*yersinia* outer proteins) sont secrétées directement dans les cellules hôtes [175]. Les gènes codants pour les SST3 sont groupés en cluster, le concept d'émergence des gènes assemblés aux fonctions de virulence réunis sur le plasmide sont acquis par transfert horizontal des ilots de pathogénicité tel que *Salmonella*. Ce concept a une implication importante dans l'acquisition de la pathogénicité microbienne [176].

De ce fait, certaines bactéries possèdent un groupe de gènes aux fonctions apparentées constitués par leur capacité à cloner les gènes *hrp* et qui leur permet d'éliciter la réaction HR comme les agents non pathogènes à l'exemple d'*E. coli*. ce qui a été rapporté par le cosmide pHIR11 de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ; pCPP430 d'*Erwinia amylovora* [172] ; pPPY430 de *P. syringae* pv. *phaseolicola* [177] et pCPP2156 d'*Erwinia chrysanthemi* [178]. Les cosmides ainsi transportés, adjacents au cluster *hrp*, le gène *hrmA*, a une *avr*-apparentée dans la production d'un phénotype avirulent lorsqu'il s'exprime dans les pathogènes des tabac et devient létal lorsqu'ils s'expriment à l'intérieur des cellules du tabac [172].

Nous avons réalisé le test d'hypersensibilité sur le tabac dans le but d'écarter parmi les isolats, ceux qui seraient phytopathogènes. Le test de la réaction d'hypersensibilité effectué sur le tabac a permis d'éliminer 16 isolats endophytes causant des symptômes de nécrose sur un total de 36 isolats, indiquant ainsi leur pouvoir pathogène. Par conséquent, les 20 isolats retenus font l'objet de plusieurs tests ultérieurs.

La réaction aboutit au confinement du pathogène au site de l'attaque et en sa neutralisation. La mise en place de la réaction incompatible est déterminée au niveau génétique par une réaction dite « gène pour gène », avec les gènes d'avirulence *avr* chez la bactérie et les gènes R de résistance chez la plante. La présence d'un gène *avr* chez le pathogène induit une réponse hypersensible si la plante infectée porte le gène R correspondant [177].

Dans le cas de certaine bactéries phytopathogènes telles que celles possédant un arsenal enzymatique déprédatives, l'infection est si brutale que la plante n'a pas le temps de mettre en place une réponse hypersensible [88]. En absence de toute méthode de lutte fiable, la lutte biologique a été décrite comme une stratégie non dangereuse visant à réduire les dommages causés aux cultures par les agents phytopathogènes par rapport à l'usage exclusif de la lutte chimique contre les maladies des plantes [178].

Les mécanismes par lesquels les agents de lutte biologique peuvent se comporter comme antagonistes envers les pathogènes en général, inclut la prédation, la compétition pour des niches écologiques et pour les éléments nutritifs, l'antibiose et l'induction d'une réponse de défense chez les plantes [179].

La lutte biologique semble être une alternative rationnelle pour l'agriculture. Un intérêt considérable a été porté dans l'élaboration de stratégies biologiques en utilisant les bactéries endophytes à activités antimicrobiennes afin de contrôler les agents pathogènes [80; 180]. Nos résultats sont prometteurs du fait que les endophytes isolés et identifiés font partie de genres et d'espèces ayant donné des résultats probants dans des expérimentations antérieures.

Nous avons mené ce travail afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats bactériens endophytes testés sur une collection de souches d'*Erwinia carotovora* ayant un fort pouvoir pectinolytique. Les isolats endophytes sélectionnés pour les tests d'antagonisme sont ceux qui ont produit des zones d'inhibition envers la souche de référence d'*Erwinia carotovora*. Le choix des 36 isolats a été porté sur la taille de la zone d'inhibition supérieure à 20 mm. Les bactéries endophytes supposées antagonistes ont été isolées à partir de cinq plantes spontanées (*Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia peplus* et *Euphorbia heliscopia*) [19].

4. Antagonisme *in vitro* et *in vivo* des isolats endophytes envers les souches d'*Erwinia carotovora* spp. pectinolytiques

La réalisation du test de pathogénicité sur le tabac nous a permis de retenir 20 isolats endophytes qui ont révélé une réponse négative au test d'hypersensibilité. Ces 20 isolats ont fait l'objet d'un test d'antagonisme *in vitro* envers une collection de souches d'*Erwinia carotovora* spp. considérées comme étant les plus virulentes.

La technique utilisée pour le test d'antagonisme *in vitro*, dite technique des spots a montré une forte activité antibactérienne des différents isolats vis-à-vis les *Erwinia* pectinolytiques. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse statistique des résultats qui a indiqué que la variation du diamètre des zones d'inhibition dépend étroitement des isolats antagonistes et des souches d'*Erwinia carotovora* testées. La souche A452, identifiée *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* s'est avérée la plus sensible aux isolats bactériens antagonistes, tandis que la souche A3003 définie comme une *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* s'est dévoilée la moins sensible aux tests antibactériens. Ceci pourrait être expliqué par le fait que

les sous-espèces d'*Erwinia carotovora* présentent un métabolisme différent et distinct [148].

L'analyse en composante principale (ACP) ainsi que le classement hiérarchique des résultats obtenus, a révélé la présence de trois groupes distincts classés selon leur homologie. Ces derniers sont la conséquence d'une interaction entre les deux paramètres étudiés, à savoir l'isolat endophyte et la souche d'*Erwinia carotovora* spp.

Les résultats montrent l'efficacité de ces endophytes dans le test d'antagonisme *in vitro* qui se traduit par des zones d'inhibition allant jusqu'à 40 mm voir la totalité de la boîte de pétri. Cette inhibition de la croissance des souches d'*Erwinia carotovora* a été attribuée à la production de métabolites secondaires antimicrobiens dont des antibiotiques [163]. De nombreux travaux ont mis en évidence le pouvoir antibactérien des bactéries endophytes. L'étude menée par Long et ses collaborateurs a démontré que les isolats endophytes bactériens isolés à partir de *Solanum* spp. ont une action antibactérienne sur une gamme de bactéries phytopathogènes [181].

Nos résultats montrent que les souches qui appartiennent au premier groupe (OA3, EHA2, EPF3, PR1, EPS2, PA2, EPR3, CF1, OF4, OR2, PF4 et OS4) sont les plus actifs envers la majorité des souches d'*Erwinia carotovora*. Il est important de noter que ce groupe renferme des souches qui ont été identifiées par voie moléculaire, c'est le cas des isolats OR2 et OS4 appartenant à l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens*.

B. amyloliquefaciens est une bactérie qui permet de promouvoir la croissance des plantes. Isolée à l'origine de la plante de soja à la station de recherche agricole du centre de la Thaïlande [182], La souche KPS46 a été identifiée comme un promoteur potentiel de croissance des végétaux et un agent de lutte biologique en induisant la résistance systémique [183]. La sécrétion d'éliciteurs et de métabolites antimicrobiens pour inhiber la croissance des agents phytopathogènes transmis par le sol ou par les semences dans différentes plantes a également été décrite chez cette espèce bactérienne [184 ; 185]. En plus de la souche KPS46, d'autres souches classées dans *B. amyloliquefaciens* et dans *B. subtilis* ont été rapportées pour être efficaces pour la lutte biologique contre les

agents phytopathogènes et pour la promotion de la croissance des plantes [186]. La variation des diamètres des zones d'inhibition à l'issue des tests d'antagonisme peut être expliquée par la diversité des isolats endophytes. Ce qui a été démontré par la caractérisation biochimique de ces isolats endophytes, qui a révélé la présence de plusieurs profils biochimiques. Par conséquent, les isolats endophytes produisent des métabolites secondaires variés dont l'action sur les souches testées était diverse.

Nos résultats mettent en lumière la présence d'une souche de *B. subtilis* présentant une activité antagoniste efficace. En effet, cette bactérie est l'un des agents de lutte biologique le plus efficace et présente une activité biologique contre plusieurs bactéries et champignons phytopathogènes. Cet antagonisme a été attribué à la production de peptides antibiotiques [187] et à la capacité de colonisation de la plante [188].

De même, *Bacillus cereus*, est l'une des espèces qui a été identifiée parmi les isolats endophytes. C'est une Gram positif, sporulante, très commune dans les sols et les plantes [189]. Pour le contrôle des maladies des plantes, la souche *B. cereus* UW85, est capable de produire deux antibiotiques responsables de suppression des maladies fongiques [190].

Cette bactérie s'est révélée être un agent de lutte biologique fiable de *Phytophthora* agent de la fonte des semis et la pourriture racinaire de soja [191]. La souche de *B. cereus* 65, produit une chitobiosidase une enzyme chitinolytique qui a également prouvé son efficacité contre *Rhizoctonia solani* chez le coton [192]. Cependant, le rôle de chitobiosidase dans l'antagonisme de la souche *B. cereus* 65 envers les pathogènes fongiques n'est pas clairement compris [193].

Récemment, l'utilisation de *Bacillus* spp. a fait l'objet d'étude pour le contrôle de la maladie bactérienne la plus importante des crucifères, connue sous le nom de la pourriture noire, causée par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Dans les expériences à effet de serre, Assis et ses collaborateurs [194], ont observé que *B. subtilis* R14, isolé de la surface des feuilles de choux, a totalement contrôlé la maladie lors d'un essai sur le chou contre trois souches de *X. campestris* pv. *campestris* dans toutes les périodes d'application testées, ce qui suggère son utilisation comme traitement préventif de la [194]. Nos résultats de

l'essai *in vitro* et *in vivo* sont concordants avec ceux trouvés par les autres auteurs sur d'autres organismes phytopathogènes et nous amènent à proposer cette souche comme efficiente envers les *Erwinia carotovora* agents de pourriture molle des organes souterrains.

Nos résultats indiquent aussi que parmi les souches les plus actives, certaines font partie des Gram négatif dont celles qui appartiennent au genre *Pseudomonas*, à l'exemple de la souche PA2 et EPR3 qui ont montré un fort pouvoir antibactérien. En effet, Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro* [109].

La capacité des *Pseudomonas sp.* à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable [195]. Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires [196]. De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques [197].

La capacité d'inhibition de ce groupe de bactéries peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers permettent la compétition pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire indirectement la sévérité de la maladie [109]. Il a été rapporté également pour certaines souches de *Pseudomonas sp.* une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante [198]. Mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène.

4.1 L'endophytisme bactérien et l'induction des réponses de résistance locale et/ou systémique chez les variétés de pomme de terre étudiées

Le test d'antagonisme *in vivo* a été réalisé sur trois variétés de pomme de terre inoculées avec cinq isolats d'endophytes bactériens appartenant tous au premier groupe c'est à dire celui renfermant les isolats les plus actifs.

Les résultats obtenus à travers l'étude du pouvoir antibactérien *in vivo*, nous ont permis de constater une diminution et parfois même une absence totale de symptômes de pourriture molle sur les disques de pomme de terre traités. Cependant, chaque variété répond de façon différente. Cette variabilité de réponse est due aux propriétés histologiques de chaque variété.

La variété Bartina s'est dévoilée la plus sensible au test, suivie par la variété Spunta. Ces deux variétés renferment une teneur en matière sèche assez faible et par conséquent, une teneur en eau importante [199], ce qui favorise le développement rapide des *Erwinia* pectinolytiques et facilite l'extériorisation des symptômes de pourriture molle. Des études ont montré que *E. carotovora* est détectée aussi longtemps que la surface des pommes de terre demeure mouillée [59].

La variété Désirée quant à elle s'est avérée la moins sensible au test d'antagonisme, cette dernière contient une teneur en matière sèche assez élevée et par conséquent la proportion d'amyloplaste est importante. À l'opposé, la teneur en eau est assez faible ce qui se traduit par une croissance moins rapide des souches d'*E. carotovora* [59].

Les isolats endophytes testés *in vivo* ont montré un effet protecteur sur les disques de pomme de terre à l'égard des souches d'*Erwinia carotovora*. Les souches PA2 et PR1 ont donné les meilleurs résultats.

La résistance systémique s'est avérée être induite par des microorganismes variés et plus particulièrement par des rhizobactéries. Celles-ci incluent des bactéries Gram+ comme *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloquefaciens* et *Bacillus thuringiensis* [200], ou des bactéries Gram- qui sont les plus étudiées dans le contexte de l'ISR. Bien que des entérobactéries comme *Serratia* (*Serratia marcescens*, *Serratia plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* interviennent dans la mise en alerte de la plante-hôte, la plupart des souches

Gram- impliquées appartiennent au genre *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas aeruginosa*) [89].

Le trempage des disques de pomme de terre dans la suspension bactérienne d'endophyte a limité l'installation et l'expression des *Erwinia* pectinolytiques. Cela est expliqué par la présence d'une situation d'incompatibilité entre la souche bactérienne régulée par les gènes *hrp* et l'espèce végétale inoculée [201]. C'est ainsi que certains auteurs expliquent ce phénomène par l'absence d'action protectrice fournie par les Lipopolysaccharides (LPS) de certaines souches d'*Erwinia carotovora* contre les produits antimicrobiens des variétés de pomme de terre et les métabolites secondaires des isolats endophytes conduisant à une multiplication moins importante [27]. Ceci, du fait que certaines variétés ont répondu positivement à l'inoculation avec d'autres souches définies comme virulentes malgré le traitement préalable aux souches endophytes.

Nos résultats indiquent que la souche PA2 appartient au genre *Pseudomonas*, depuis une vingtaine d'années, un grand intérêt est porté envers les rhizobactéries du genre *Pseudomonas* à cause de leur capacité remarquable à inhiber la croissance des agents pathogènes racinaires. De plus, il a été démontré que la production d'antibiotiques par différentes souches de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororapis* et *Pseudomonas aureofaciens* est directement reliée à ce pouvoir inhibiteur. Pour certains de ces antibiotiques comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), l'acide phénazine carboxilique (PCA), la pyrrolnitrine (PRN) et la pyoluteorine (PLT), les voies métaboliques menant à la synthèse de ces produits ont été caractérisées et les gènes codant pour les enzymes impliquées dans ces voies ont été séquencés [109].

Il a été apporté que le DAPG produit par *Pseudomonas fluorescens* F113 supprime la pourriture molle de la pomme de terre d'*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, la fonte des semis de la betterave à sucre causée par *Pythium ultimum* et le nématode à kyste causée par *Globodera rostochiensis* [202]. Une identification plus fine de notre isolat pourrait nous amener à caractériser le rang taxonomique de l'espèce et identifier le gène responsable de l'effet antagoniste sur les *Pectobacteria* de cette étude.

4.2 Un brouillage du signal ou panne de communication ?

D'une manière générale le processus d'infection chez les souches pectinolytiques d'*Erwinia* passe par deux étapes ; une étape dite primo-invasive et une étape d'infection proprement dite. Lors de la première phase, les bactéries se multiplient d'une manière exponentielle au niveau du site d'infection, pour pouvoir réaliser la seconde étape.

D'autre part, l'étape de multiplication des *Pectobacteria* est définie comme très longue et est liée à une mauvaise adaptation aux conditions de l'environnement d'où le faible développement des symptômes de pourritures molle sur les disques de pomme de terre. Par conséquent, l'absence de la production d'enzymes extracellulaires nécessaires pour l'étape invasive est due à un défaut au niveau du seuil du *quorum sensing*, suite à une faible accumulation des molécules signal. Ce dernier, existant chez toutes les espèces de *Pectobacterium* macergènes et son importance stratégique dans la maladie [149] lui désigne comme un outil privilégié de lutte contre la virulence des *Pectobacterium*.

C'est grâce au processus du *Quorum Sensing* (QS) via la production de N-acyl homosérine lactones (HSL) que l'attaque est coordonnée. Contrairement à ce qui était supposé, les activités associées à la phase primo-invasive ne sont pas sous le contrôle du QS. Par contre, la concentration extracellulaire en HSL induit bien les activités liées à la phase de macération [25].

Beaucoup de bactéries pathogènes ont développé des mécanismes de communication cellulaire (quorum sensing) pour réguler l'expression des facteurs de virulence. Les éléments clés des systèmes de régulation sont les acyl homosérine lactones (AHL), qui agissent comme des molécules signal. Il a été démontré que certaines espèces de *Bacillus sp.* telles que *Bacillus thuringiensis* sont capables de décomposer l'AHL par la production de N-acyl homosérine lactone lactonases, qui ouvrent le cycle lactone de l'AHL, ce qui réduit de manière significative et décline la virulence bactérienne [203]. Nous pouvons suggérer à travers les résultats révélés par notre étude que les espèces de *Bacillus spp.* endophytes utilisées pour l'antagoniste ont agi par décomposition des molécules signal et par conséquent ont brouillé le signal du quorum sensing induisant la pectinolyse.

Bacillus subtilis et *E. carotovora* sont les organismes du sol commensaux. Une large gamme de molécules est actuellement décrite comme susceptibles d'affecter directement la signalisation du quorum-sensing. Les molécules les plus étudiées sont les furanones halogénées de synthèse ou issues d'une algue, *Delisea pulchra*. Ces molécules, qui n'ont pas été décrites chez la pomme de terre, ont généralement pour cible la protéine bactérienne impliquée dans la perception du signal. Certaines ont été évaluées *in vitro* par exemple contre *Pectobacterium* spp. [121].

Des gènes bactériens impliqués dans la dégradation des HSL ont été identifiés. Ils appartiennent à trois familles distinctes de protéines : deux familles de lactonase dont les archétypes ont été identifiées chez *Bacillus* [122] et *Rhodococcus* [125] et une famille d'amidohydrolase chez *Ralstonia* [204]. *Bacillus subtilis* fabrique une enzyme appelée AiiA qui est homologue à metallohydrolases lié au zinc. Cette enzyme inactive l'auto-inducteur HSL d'*E. carotovora*. Même s'il n'est pas certain, il est supposé que AiiA (AHL-degrading enzyme) hydrolyse la liaison amide qui se joint à la chaîne latérale acyle à la fraction de l'homosérine lactone auto-inducteur ou bien l'AiiA hydrolyse la liaison ester dans la lactone. L'inactivation de d'AiiA des auto-inducteur d'*E carotovora* rend la bactérie avirulente [122], ce qui pourrait être le type d'antagonisme dans notre cas.

Le gène bactérien codant une lactonase de *Bacillus* a été introduit dans la pomme de terre par transgénèse. Il confère aux plantes, y compris le tubercule, la propriété de dégradation des HSL. Ces plantes transgéniques sont plus résistantes que leurs parents sauvages à une infection par *Pectobacterium* [117; 205]. L'impact environnemental de plantes exprimant ce type de transgène est en cours d'évaluation.

D'autres groupes de composés fréquemment rapportés à être sécréter par *Bacillus* spp. comprennent les lipopeptides, les iturines et les surfactines qui sont bien connus pour leurs forte activité antibiotique [206].

Serratia liquefaciens et *Pseudomonas putida* qui colonisent les racines de tomate produisent des AHSLs dans la rhizosphère qui permet d'augmenter la résistance systémique des plants de tomates contre le pathogène fongique *Alternaria* [207]. L'origine végétale de la plupart de ces composés suggère qu'ils

pourraient participer aux systèmes de défense naturels des plantes; leur présence pourrait être recherchée chez la pomme de terre et intégrée dans des processus d'amélioration et de création variétale. Nos résultats concordent avec ceux trouvés dans d'autres travaux et pourraient révéler de multiples secrets quant à la diversité des molécules impliquées et aux mécanismes de leur action dans ce cas de figure relatant l'antagonisme envers les *Pectobacteria*. Une étude plus fine permettrait d'aboutir à de résultats ouvrant la voie à leur application future.

4.3 L' α -amylase, un facteur favorisant le développement de la pourriture molle

Le genre *Bacillus* comprend une variété d'espèces importantes utilisées dans l'industrie de la fermentation. Les *Bacillus spp.* ne sont pas pathogènes, sécrètent de protéines et des métabolites, et facile à cultiver [208]. *Bacillus amyloliquefaciens* a été découvert dans le sol en 1943 par un scientifique japonais nommé Fukumoto, qui a donné à la bactérie son nom du fait qu'elle produit (faciens) une liquéfaction (liqué) amylase (amylo) [209].

Les disques de pomme de terre trempés dans les suspensions d'endophytes d'OR2 et d'OS4 étaient les plus affectés par les souches d'*Erwinia carotovora* où la hauteur de la pourriture molle était maximale. Ces deux isolats endophytes ont été identifiés sous l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens*. L'alpha amylase de *B. amyloliquefaciens* est souvent utilisé dans l'hydrolyse de l'amidon. *B. amyloliquefaciens* est également une source de la subtilisine (serine endopeptidase), une enzyme qui catalyse la dégradation des protéines d'une manière similaire à la trypsine [210].

Contrairement aux tests d'antagonisme *in vitro* où les souches appartenant à *B. amyloliquefaciens* présentaient un fort pouvoir antibactérien, ces même souches testées *in planta* sur les disques de pomme de terre ont été les moins actifs. Ceci est expliqué par leur caractère métabolique et leur faculté enzymatique à hydrolyser l'amidon par le biais de l'Alpha amylase. les α -amylases sont des groupes d'enzymes classés comme hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des composés ortho-glycosyl de l'amidon et du glycogène. Elles catalysent l'hydrolyse des matières amylacées en de petites sous-unités qui sont à leur tour actionnés par d'autres types d'amylases pour produire le glucose [211].

En effet, Les produits de dégradation suite à l'action enzymatique des *B. amyloliquefaciens* combinée aux enzymes extracellulaires notamment les Enzymes Pectinolytiques d'*Erwinia carotovora* sont utilisés comme une source d'énergie et de nutriments [28]. Ce qui explique le développement important de la pourriture sur la totalité des disques de pomme de terre [27].

La présente étude a porté sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des isolats endophytes envers les souches d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques. Les résultats ont révélé un fort pouvoir antagoniste de ces isolats endophytes *in vitro* et *in planta*. Ces résultats sont très prometteurs et suggère des études plus approfondie afin de mettre en place une formulation permettant leur homologation et par la suite leur utilisation sur cette culture en plein champ comme en conditions de stockage.

CHAPITRE 5

VALORISATION DES SOUS-PRODUITS DE LA POURRITURE MOLLE POUR LA PRODUCTION DU BIOETHANOL

En marge de notre travail dont l'objectif principale était l'étude du pouvoir antagoniste des isolats endophytes à l'égard des souches d'*Erwinia carotovora* Spp. nous avons voulu vérifier l'hypothèse qui consiste à la production d'éthanol à partir de la pomme de terre infectée par la pourriture molle.

L'éthanol est aujourd'hui produit à partir de deux grands types de cultures : les plantes sucrières (canne à sucre, betterave) et des plantes amylacées (blé, maïs). Ces différentes filières passent toutes par une étape de fermentation qui transforme les sucres en éthanol et une étape plus ou moins poussée de distillation qui sépare l'alcool de l'eau [212].

La production de bioéthanol à partir de pommes de terre est basée sur l'utilisation des pommes de terre pourries. Des statistiques ont montré que le taux de pomme de terre pourries obtenus après récolte est de l'ordre de 5-20% [213]. À partir de cette donnée et dans le but de récupérer les sous produits, nous avons projeté de réaliser les étapes suivantes permettant d'aboutir à la production d'éthanol.

Le présent travail est basé sur l'hypothèse suivante : 100 g de pommes de terre produisent entre 8 à 10 ml d'éthanol. L'éthanol se produit en quatre principales étapes : l'hydrolyse enzymatique, la fermentation, la distillation et la vérification (Figure 5. 1) [214].

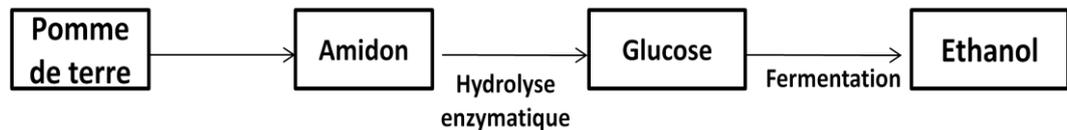


Figure 5.1 : procédé de fabrication de bioéthanol.

Les Alcools (éthanol et le méthanol) ont été considérés comme des carburants alternatifs [215]. Actuellement, la production d'éthanol repose sur la fermentation du saccharose à partir de la canne à sucre et la mélasse ou le glucose provenant de cultures à base d'amidon comme le maïs, le blé et le manioc [216].

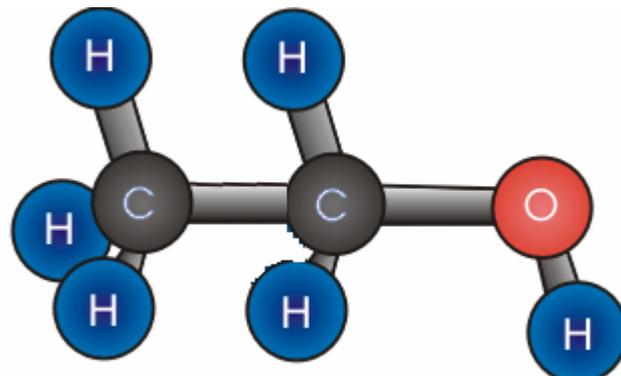


Figure 5.2 : représentation de l'éthanol [215].

1 Matériels et méthodes

Afin de mettre en évidence la présence du bioéthanol, nous avons pesé 100g de pomme de terre de variété Spunta présentant des symptômes de pourriture molle affectées par *Erwinia carotovora* spp. 100 g de pommes de terre pourries ont été broyées en utilisant un mixeur. Un chauffage au four Pasteur à 70 ° C pendant 7 heures est réalisé jusqu'à ce que toute la quantité d'eau soit séchée. La masse solide obtenue est découpée en petites portions.

1.1 L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est une étape cruciale de cette expérimentation, car c'est l'enzyme qui a le rôle de couper l'amidon en glucose. Une enzyme est une protéine constituée d'acide aminé. L'enzyme choisie pour cette expérience est l' α -amylase, car celle-ci répond aux exigences (efficacité à des températures

optimales et sa rapidité). L'amidon quant à lui s'hydrolyse en oligosaccharide, par la suite en maltose et finalement en glucose. 500 ml d'eau et 3 g d'enzyme diastase (amylase) ont été ajoutés. Le contenu est mis à chauffer à 30 °C pendant une demi-heure. L'enzyme est de nouveau rajoutée, le contenu est refroidi à température ambiante pendant 60 min.

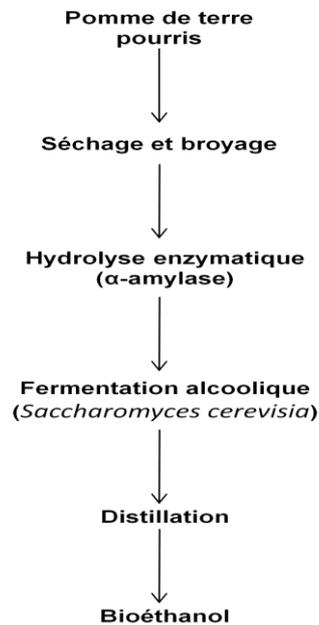


Figure 7. 2 : schéma des principales étapes pour la production du bioéthanol.

1.2 La Fermentation alcoolique

La fermentation consiste à transformer le glucose obtenu lors de l'hydrolyse enzymatique. Pour ce faire, l'ajout de levures au mélange était nécessaire. La levure utilisée est la *Saccharomyces cerevisia* (levure à bière) [214].

Il s'agit d'un des micro-organismes les plus utilisés du point de vue académique et industriel, qui bénéficie actuellement d'un monopole dans le domaine de la production d'éthanol à usage de biocarburant et revêt aujourd'hui un intérêt majeur, avec des enjeux économiques et environnementaux au niveaux nationaux et mondiaux [217]. La réhydratation des levures s'est faite en ajoutant

celle-ci à l'eau distillée à une température de 40 °C. La proportion utilisée est de 5 g de levures pour 50 mL d'eau distillée.

Le pH du contenu est ajusté afin de le rendre acide en ajoutant un tampon phosphaté pour permettre l'accélération du processus de fermentation [214].

1.3 La distillation

La distillation consiste à séparer d'un mélange deux liquides volatiles qui sont complètement miscibles. En ce qui concerne l'éthanol et l'eau, le mélange ne doit pas être chauffé à plus de 90 °C, car l'eau a un point d'ébullition de 100 °C et l'éthanol à un point d'ébullition de 78 °C [218]. La distillation s'effectue à plusieurs reprises, car à chaque fois, il y avait une petite quantité d'éthanol recueillie.

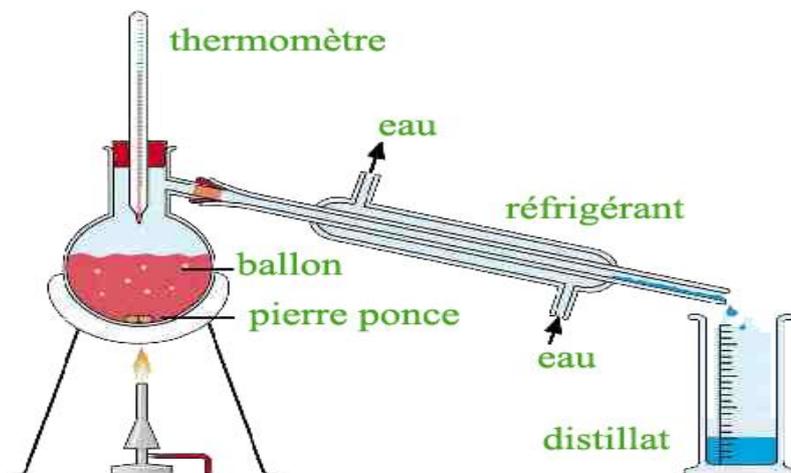
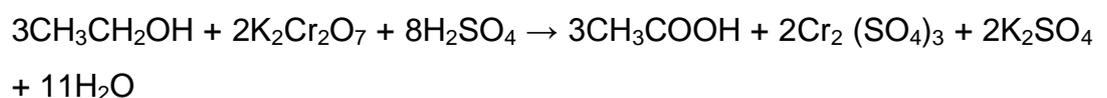


Figure 5. 3 : Schéma du dispositif de distillation.

1.4 Présence d'éthanol

Le dichromate de potassium est en particulier utilisé dans les éthylotests. En effet, l'éthanol est un alcool primaire qui, en présence d'un excès d'oxydant, s'oxyde en acide éthanoïque selon la réaction :



L'ion dichromate est orangé et la couleur passe au vert (couleur des ions chrome III) avec la réaction, indiquant par là la présence ou non d'alcool.

1.5 Vérification de la pureté

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

$$D.O = \epsilon \lambda . l . C$$

D.O est l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ ;

C (en mol.m⁻³) est la concentration de l'espèce absorbante ;

l (en m) est la longueur du trajet optique ; dans les conditions expérimentales *l* est égale à 10⁻² m

$\epsilon\lambda$ (en mol⁻¹.m²) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Il prend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde λ définie à 450 nm.

Afin de calculer la concentration de la solution de bioéthanol, nous avons établi une courbe d'étalonnage, cette dernière représente les densités optiques des différentes dilutions de la solution d'alcool éthylique d'un titre connu.

A l'aide du spectrophotomètre (Prolabo, Paris), nous avons effectué la lecture de la densité optique de chaque dilution des solutions y compris la solution distillée à la longueur d'onde de 450 nm.

2 Résultats et discussion

Après distillation, nous avons vérifié la présence du bioéthanol dans le distillat par réaction colorimétrique contenant la solution de dichromate de potassium (figure 5. 4).

Dans le tube de droite, nous avons introduit une quantité de dichromate de potassium dans la solution à tester (solution A). Une coloration bleu-vert se développe qui témoigne de la réduction des ions $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ en ions Cr^{3+} révélant ainsi la présence d'éthanol (figure 5. 4).

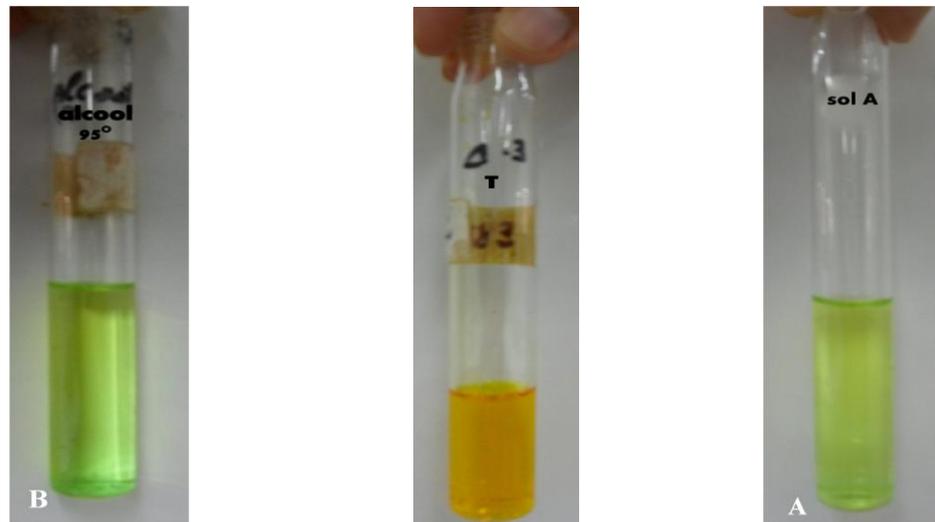


Figure 5.4 : Réaction des dichromates de potassium en présence d'éthanol.

Solution **A** : la solution à testée, réponse positive indiquant la présence d'éthanol.

Solution **B** : témoin positif contenant une solution d'alcool.

T : le témoin négatif représente l'eau distillée testée par le dichromate de potassium.

2.1 Dosage du bioéthanol

La densité optique de la solution est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde 450 nm et qui a donné la plus haute valeur de l'espèce chimique à étudier (éthanol).

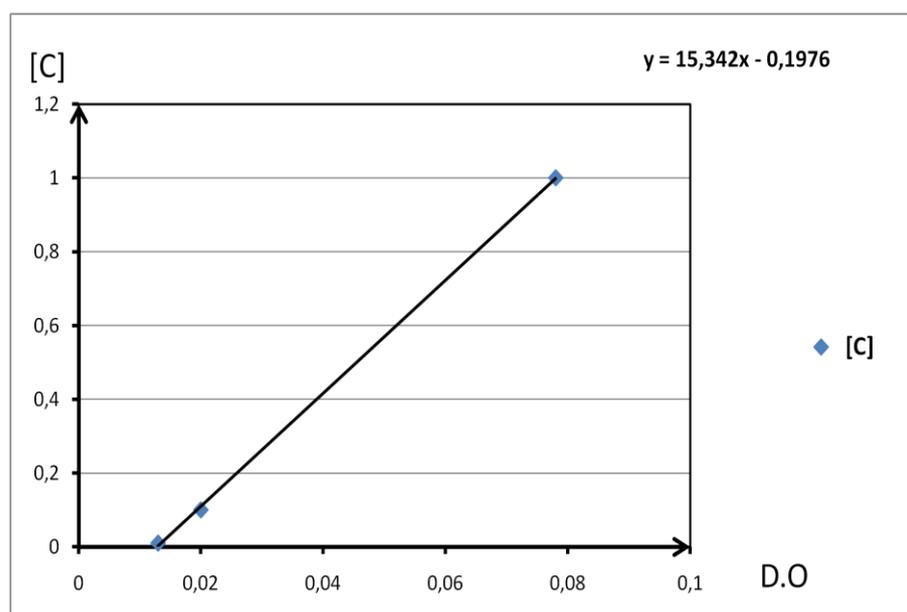


Figure 5. 5: Calcul de la densité optique de la solution distillée.

La courbe d'étalonnage (figure 5. 5) nous a permis de calculer la concentration d'éthanol dans le distillat qui est égale à 25,63 g/l soit une concentration v/v de 3,24%.

2.2 Discussion

La présente étude consistait de vérifier la possibilité de produire du bioéthanol à partir de la pomme de terre pourrie considérée comme des pertes et déchets de cette culture. L'éthanol a été mis en évidence par la réaction colorimétrique contenant la solution de dichromate de potassium qui a indiqué sa présence dans la solution distillée.

La vérification de la pureté de l'éthanol à été réalisé par la méthode de spectrophotométrie. La spectrométrie d'absorption est une méthode physique d'analyse chimique. Elle s'utilise principalement sur les liquides. Ce qui nous a permis de recueillir 3,24ml dans 100 ml de distillat ce résultat est significatif et concorde avec les travaux de RAMESH [214].

Les *Erwinia carotovora ssp. pectinolytiques* possèdent un arsenal d'enzyme pectinolytiques dégradant la paroi cellulaire et des cellulases [26]. Les produits de dégradation sont utilisés comme une source d'énergie et de nutriments [28; 27].

La production de bioéthanol à partir de pommes de terre est basée sur l'utilisation d'amidon contenu dans cette dernière.

Les pommes de terre pourries représentent 5 à 20% des sous-produits de la culture de pommes de terre [213]. En moyenne 1,5 millions kg de déchets et de pommes de terre pourries sont produite par an [216]. L'intérêt écologique devient de plus en plus grand. Initialement les biocarburants étaient utilisés pour leur capacité à réduire les émissions de polluants mais aujourd'hui, ils sont surtout développés pour leurs faibles rejets de gaz à effet de serre. Ils ont un bilan positif surtout en ce qui concerne le biodiesel.

Les biocarburants sont complètement intégrés dans les préoccupations du développement durable et pour un avenir plus propre, ils s'inscrivent comme compléments aux produits pétroliers d'aujourd'hui. La récente augmentation du prix du baril de pétrole et la crise économique que traverse le monde, n'ont fait que relancer leurs intérêts [212].

CONCLUSION GENERALE

Pectobacterium carotovorum (anciennement *Erwinia carotovora*) est une bactérie de la famille des *Enterobacteriaceae* responsable de l'apparition de pourritures molles sur diverses espèces végétales cultivées, telles que la carotte, le melon, la courgette, et la pomme de terre, particulièrement en zones tempérées humides. Le pouvoir pathogène de la bactérie repose sur la production et la sécrétion de différents facteurs protéiques tels, des peptides toxiques appelés harpines, et des enzymes (cellulase, pectate lyase, pectate méthylestérase et protéase) responsables de la macération des parois végétales.

A l'échelle expérimentale, *Erwinia carotovora* est considérée comme très polyphage, cependant les sous espèces d'*Erwinia carotovora* sont associées à des plantes hôtes particulières montrant ainsi une spécificité distincte de chaque sous espèce. Quoique cette limitation d'hôtes n'est pas d'origine génétique [219].

Les maladies bactériennes dont celles liées aux *Pectobacterium* sont difficiles à contrôler en raison du caractère imprévisible des bactéries qui peuvent demeurer latentes avant de se multiplier et d'infecter rapidement les plantes et/ou les tubercules à la faveur de conditions d'humidité et de température adéquates. Par ailleurs, contrairement à d'autres pathogènes et ravageurs de la pomme de terre contre lesquels la lutte chimique est possible (*Phytophthora*, pucerons vecteurs de virus), l'utilisation de bactéricides est largement interdite en raison du risque de développement de résistance chez les bactéries.

Parmi les alternatives envisagées, les recherches se sont penchées sur le développement de nouveaux moyens de lutte biologiques qui visent à contrôler les agents phytopathogènes par des biopesticides. Dans ce contexte, nous avons mené ce travail afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats bactériens endophytes testés sur une collection de souches d'*Erwinia carotovora* antérieurement isolées et détenant un fort pouvoir pectinolytique.

Les bactéries endophytes supposées antagonistes ont été isolées à partir de cinq plantes spontanées (*Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago*

lanceolata, *Euphorbia peplus* et *Euphorbia helioscopia*). Les isolats endophytes sélectionnés pour les tests d'antagonisme sont ceux qui ont produit des zones d'inhibition envers la souche de référence d'*Erwinia carotovora*. Le choix des 36 isolats a été porté sur une zone d'inhibition supérieure à 20 mm [19].

Nous avons entrepris ce travail par une caractérisation plus raffinée des souches d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques afin de les distinguer en sous-espèces. Les tests biochimiques effectués et qui ont été rapportés par plusieurs auteurs [31], nous ont permis de classer 9 souches appartenant à *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 2 souches ont été qualifiées d'appartenir à *Erwinia chrysanthemi* et une souche faisait partie de la sous-espèce *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*.

Afin de mieux exploiter le pouvoir antibactérien des isolats endophytes en lutte biologique, nous avons réalisé le test d'hypersensibilité sur le tabac. Ce dernier, et en tenant compte de la réaction locale induite (nécrose) par ces endophytes, nous avons pu écarter 16 isolats qui présentaient un pouvoir pathogène, ce qui rendent leur exploitation ultérieure impossible.

Les isolats endophytes sélectionnés ont fait l'objet d'une série de tests biochimiques visant à mieux les discriminer. En effet, sur la base de la coloration de Gram deux groupes se sont révélés. 11 isolats endophyte sont des Gram négatif avec 5 profils biochimiques dont la présence des *Pseudomonas*. Cependant, les isolats endophytes à Gram positif sont repartis en quatre profils biochimiques.

L'identification moléculaire par l'analyse de la séquence ADNr du 16S à l'aide du logiciel Blast nous a permis de confirmer l'identification de treize isolats endophytes. D'une manière générale, les espèces identifiées appartenaient à deux genres distincts, un Gram+ et un Gram-, respectivement, *Bacillus* et *Pseudomonas*. Ces deux genres sont connus pour leur présence dans les tissus végétaux en tant qu'endophytes et pour leur utilisation en lutte biologique et notamment dans la promotion de la croissance des plantes.

Par la suite, la réalisation du test d'antagonisme *in vitro* par la technique des spots a montré une forte activité antibactérienne des différents isolats vis-à-vis

les *Erwinia* pectinolytiques. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse statistique qui a indiqué que la variation du diamètre des zones d'inhibition dépend étroitement des isolats antagonistes et des souches d'*Erwinia carotovora* testées.

Le test d'antagonisme *in vitro* nous a révélé la présence d'un groupe d'isolats endophytes très actifs envers la majorité des souches d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques dont certains ont été testés *in vivo* sur trois variétés de pomme de terre (Désirée, Spunta et Bartina), toutes sensibles aux *Erwinia carotovora*.

Les résultats de ces tests sont très prometteurs, le trempage des disques de pomme de terre dans des suspensions d'endophytes puis inoculés par les souches d'*Erwinia carotovora*. a permis de constater une diminution et parfois même une absence totale de symptômes de pourriture molle sur les disques de pomme de terre selon la variété inoculée. Ces dernières, ont répondu de manière différente vis-à-vis des souches d'*Erwinia carotovora* pectinolytiques. Cette différence de la réaction des variétés infectées varie en fonction de la virulence des souches bactériennes et de la rapidité du développement des symptômes. La divergence de réponse à l'inoculation s'explique par l'interaction entre trois facteurs qui sont les caractéristiques génétiques des souches inoculées, le pouvoir antibactérien des isolats endophytes et les caractéristiques agronomiques de chaque variété étudiée.

Un cas de résultat du test d'antagonisme *in vivo* est cependant surprenant, il a révélé que certains isolats au lieu de limiter l'extension de la pourriture molle, plutôt, les souches favorisaient le développement de la pectinolyse. Nous avons grâce à la bibliographie variée et disponible, expliqué ce cas par le fait que les isolats en question appartenaient à l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens* qui dispose d'une activité enzymatique amylolytique. De nombreux auteurs ont relaté l'exploitation de cet agent microbien dans le domaine industriel.

Les espèces du genre *Bacillus*, en particulier *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis*, ont été démontré pour produire une série de dipeptides antimicrobiens ou des lipopeptides cycliques. Certaines de ces métabolites sont spécifiques à la

souche et peuvent être associées à certaines espèces et sous-espèces de *B. amyloliquefaciens* et de *B. subtilis* [220].

Les produits à base de bactéries présentent un fort potentiel dans les systèmes de lutte intégrée IPM (Integrated Pest Management). Malheureusement, une moindre attention a été entreprise sur leur intégration avec les autres outils de lutte intégrée tels que les pratiques culturelles, la résistance de l'hôte, la lutte chimique, et l'utilisation d'autres agents de lutte biologique.

Les interventions phytosanitaires présentent des effets néfastes sur l'environnement et favorisent le développement de souches résistantes aux matières actives utilisées. Face à ce problème et à l'attitude des consommateurs sensibilisés aux problèmes de santé liés aux résidus de pesticides dans les denrées alimentaires et exigeant des produits de qualité, de nouvelles stratégies de protection vis-à-vis des parasites des cultures, basée sur l'utilisation de biopesticides tentent d'émerger et visent à assurer une rentabilité pour l'agriculteur et éviter les effets négatifs sur l'environnement. Les microorganismes endophytes ont attiré l'attention des chercheurs en raison de leur potentiel de servir comme agents de lutte biologique [84].

Les résultats obtenus par la présente étude se sont avérés très intéressants et originaux du fait de l'utilisation de bactéries endophytes isolées de plantes spontanées et qui sont considérées comme des ennemis des cultures. Il est à rappeler que les extraits de ces mêmes plantes ont montré une bonne activité antibactérienne envers la même gamme de souches phytopathogènes [221 ; 222].

À la lumière de nos résultats, la protection efficace des plantes par des agents de lutte biologique nécessite leur mise en place correcte dans la plante hôte. Le chimiotactisme, la motilité et la croissance sont des acteurs essentiels dans ce processus afin contribuer à la colonisation végétale et à la persistance dans l'environnement de la plante. En effet, la lutte biologique contre les maladies des plantes en plein champ s'est avérée souvent moins efficace que la lutte chimique. La viabilité et la croissance de l'agent de lutte biologique sont très souvent dépendantes des conditions du milieu, notamment, les fluctuations climatiques telles que la température, l'humidité et les radiations UV. Ce qui se

traduit par un manque de compétitivité des biopesticides par rapport aux pesticides de synthèse. Nous pouvons écarter ces cas de figure, vu que nos bactéries endophytes ont été isolées de plantes et en l'occurrence de plantes spontanées supposées plus coriaces, résistantes et mieux adaptées aux conditions adverses du milieu environnant.

La formulation et les méthodes d'application restent des questions clés qui influent sur l'efficacité des produits commerciaux, la recherche sur ces thèmes devrait être axée sur le dépassement des contraintes environnementales, qui sont les principales raisons de l'échec et sur le manque de cohérence des agents de lutte biologique en plein champ. Le génie génétique peut fournir un outil utile pour l'amélioration de la performance de ces agents de lutte biologique.

Pour conclure l'expérience, nous avons testé la production d'éthanol à partir de pommes de terre ayant subi une pourriture molle. Le principe de la méthode est basé sur quatre étapes : l'hydrolyse enzymatique, la fermentation, la distillation et la vérification. L'hypothèse de départ était de produire de 8 à 9 g d'éthanol à partir de 100 g de pommes de terre pourries.

La production de bioéthanol à partir de pommes de terre pourries semble tout à fait possible et le rendement a aussi été très encourageant. Les résultats obtenus montrent une production de 3,24 g d'éthanol par 100 g de pommes de terre pourries. Cette quantité pouvait être plus élevée dans le cas où nous pouvions réaliser une distillation fractionnée afin de récupérer un maximum d'éthanol.

La pomme de terre est l'une des denrées alimentaires de base dans le monde, produisant une importante quantité de matière sèche et de protéines à l'hectare [3]. Les pertes directes et indirectes associées à cette culture sont considérables. La production du bioéthanol à partir des déchets de pomme de terre représente une alternative visant d'un côté de minimiser les pertes engendrées et un recyclage de ces déchets qui permet d'obtenir un biocarburant respectant l'environnement.

La lutte biologique a connu un essor au fil des années, considérée comme une option de la lutte, elle occupe aujourd'hui une place importante dans la

protection des cultures. Comme continuation de ce travail, il serait intéressant de réaliser une comparaison entre la microflore endophyte de la pomme de terre ou de la plante en question et celles des plantes spontanées qui lui sont associées afin de mieux comprendre le caractère invasif de ces dernières.

Face à la grande diversité des bactéries endophytes et de leurs pouvoir antagoniste vis-à-vis les agents phytopathogènes il serait de même importance de les classer selon le type d'antagonisme. De nombreuses travaux ont porté sur d'ISR induite par les PGPR, il serait intéressant d'axer les recherches sur les caractéristiques biochimiques conduisant à la promotion de la croissance de la plante et enfin associer le changement de son métabolisme avec l'acquisition de la résistance vis –à-vis des différents agents phytopathogènes.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

Cfu	unité de colonie formée
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Log	fonction logarithmique
%	pourcentage
j	jours
l	litre
ml	millilitre
µl	microlitre
g	gramme
mm	millimètre
cm	centimètre
al.	collaborateurs
D.O	Densité optique
°C	Degré Celsius
<i>ECC</i>	<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>
<i>Eca</i>	<i>Erwinia carotovora subsp. atroseptica</i>
<i>Echr</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
Pel	Pectates lyases

APPENDICE B

Compositions des milieux de cultures utilisés

(Données pour un litre de milieu)

1. Milieu LPGA (levure peptone glucose agar)

Bactopeptone	5g
Extrait de levure	5g
Glucose	10g
Agar	15g

Ajuster le pH à 7,2, avant d'ajouter l'agar.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

2. Milieu pour le test d'hydrolyse de l'amidon [253].

Extrait de levure	2,5g
Amidon	10g
Agar	9g

Ajuster le pH 7,2. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

3. Milieu pour le test d'hydrolyse de la gelatine [248].

Extrait de levure	3g
Bactopeptone	5g
Gelatine	12g

pH =7,2. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

4. Milieu Arginine [253].

Arginine mono Hcl	10g
Bactopeptone	1g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Rouge de phénol	0,01g

Gélose 3g

Eau distillée 1000ml

pH= 7,2, autoclaver pendant 20mn à 120°C

5. Milieu de levane [253].

Extrait de levure 2g

Bactopeptone 5g

NaCl 5g

Saccharose 50g

Eau distillée 1000ml

pH =7, autoclaver pendant 20mn à 120°C.

6. Milieu B de king [248]

Peptone 20g

Glycerol 15ml

K₂HPO₄ 1,5g

MgSO₄ 1, 5g

Agar 15g

Eau distillée 1000ml

pH =7, autoclaver pendant 20mn à 120°C.

7. Milieu liquide d'indole [251]

Peptone 20g

NaCl 5g

Eau distillée 1000ml

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

8. Sucrose peptone agar [247] :

Sucrose	20.0 g/l
Peptone	5.0 g/l
K ₂ HPO ₄	0.5g/l
MGSO ₄ 7H ₂ O	0.25g/l
Agar	12g/l
H ₂ O disillée	1l

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

9. Milieu High et Leifson [250] :

Bacto tryptone	2g/l
Nacl	5g/l
PO ₄ K ₂ H	0,3g/l
Bleu de Bromothymol	0,03g/l
H ₂ O disillée	1l

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

10. Milieu YS [40] :

NH ₄ H ₂ PO ₄	9g/l
K ₂ HPO ₄	0.5g/l
MGSO ₄ 7H ₂ O	0.2g/l
Nacl	5g/l
Extrait de levure	5g/l
Agar	17g/l
H ₂ O disillée	1l

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

APPENDICE C

Tableau C: Calcul de la densité bactérienne.

SOUCHE/REPETITION	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
BOITE 1	859	289	21	11	1
BOITE 2	834	250	14	2	0
MOYENNE	846,5	269,5	17,5	6,5	0,5
Moyenne * 10	8645	2695	175	65	5
LOG 10	3,92	3,43	2,24	1,81	0,69
DENSITE OPTIQUE	0,14	0,11	0,009	0,006	0,003

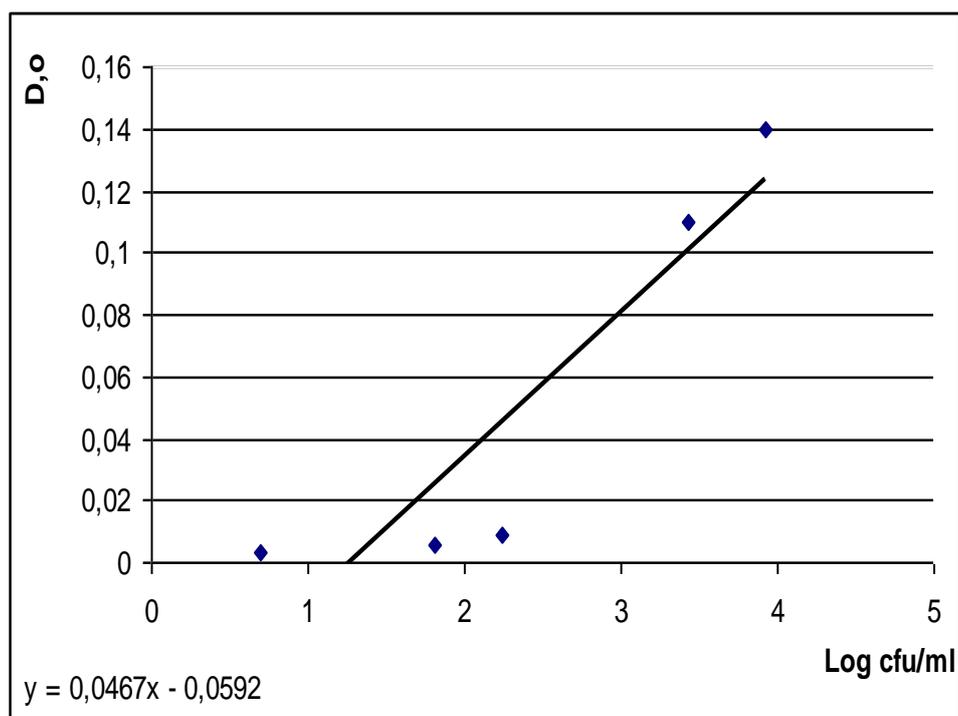


Figure C : Recherche de la densité optique nécessaire à l'inoculation.

APPENDICE D

Tableau D: résultats des tests d'antagonismes des isolats endophytes sélection à l'égard des souches d'*Erwinia carotovora* spp pectinolytiques (zone d'inhibition supérieure à 20 mm) [29].

Plantes spontanées	Isolats endophytes	<i>Erwinia carotovora</i> (mm)
<i>Plantago lanceolata</i>	PA2	26
	PA3	20.3
	PR1	26
	PR2	28
	PR3	20
	PS1	21
	PS2	24
	PF3	28.6
	PF4	22.3
<i>Calendula arvensis</i>	CR1	23
	CR2	20.6
	CS1	27
	CF1	23
	CF2	23.6
	CF4	24.6
<i>Urtica dioïca</i>	OR2	33
	OF2	21
	OF4	23.3
	OS2	20.6

	OS4	31.6
	Oa1	20.6
	Oa3	26
<i>Euphorbia heliscopia</i>	EHF5	29.3
	EHA2	26,3
	EHR2	30,6
<i>Euphorbia heliscopia</i>	EHS1	20.3
	ESH2	25.6
	EPR3	24
	EPS1	25.6
	EPS2	26
	EPS3	22
<i>Euphorbia peplus</i>	EPS4	28.6
	EPF1	22.3
	EPF2	22.3
	EPF3	24.6
	EPF4	25.6

APPENDICE E

tableau1: Résultats du test d'antagonisme *in vitro* des isolats endophytes envers les souches d'*Erwinia carotovora*.

endophyte	A81				A48			
	zone1	zone2	zone3	moyenne	zone1	zone2	zone3	moyenne
PA2	34,9	30	27	30,63	30,1	32	33,2	31,77
PA3	0	13	21	11,33	0	0	0	0,00
PR1	36	25	28	29,67	39	36	33	36,00
CR1	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
OA1	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
OA3	15	16	17	16,00	39	38	39	38,67
OR2	37	39	37,1	37,70	25	26	0	17,00
EHA2	39,8	33	45	39,27	22	20	30	24,00
EHR2	41	38	35	38,00	22	21	24,9	22,63
EPR3	25	27	28	26,67	24,3	26	26,1	25,47
PF4	31,9	32	31	31,63	15,2	14,9	16	15,37
PS1	36	20	36,1	30,70	39,1	41	39	39,70
PS2	27	28,7	29	28,23	0	0	0	0,00
CF1	35,5	36	35	35,50	30,8	30,2	30,1	30,37
CF4	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
CS1	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
OF4	39,4	38	37	38,13	21,2	21	20	20,73
EHS1	0	0	0	0,00	17,9	17	17	17,30
EPF3	25	23	23,2	23,73	22	24,7	24	23,57
EPS2	42	42	42	42,00	38	37	37,8	37,60
OS4	45	45	45	45,00	45	45	45	45,00
endophyte	A101				A12			
	zone1	zone2	zone3	moyenne	zone1	zone2	zone3	moyenne
PA2	23	22,9	25,2	23,70	27	21	28	25,33
PA3	23	23	25,1	23,70	0	0	0	0,00
PR1	27,8	30,1	28,5	28,80	26	27	25	26,00
CR1	23	22,4	23,1	22,83	0	0	0	0,00
OA1	24	23	21	22,67	0	0	0	0,00
OA3	24,1	21	19,2	21,43	30	31	28	29,67
OR2	22	23	22	22,33	45	45	45	45,00
EHA2	20	20,2	19	19,73	32	30	32	31,33
EHR2	0	0	0	0,00	26,2	22,2	23	23,80
EPR3	22	23	21,6	22,20	26	27	26	26,33
PF4	20	20,8	20	20,27	16	17	21	18,00
PS1	23	21	20	21,33	45	45	45	45,00
PS2	20	22	22,2	21,40	0	0	0	0,00

APPENDICE F

tableau1: Résultats du test d'antagonisme *in vivo* des isolats endophytes envers les souches d'*Erwinia carotovora* sur la pomme de terre variété Spunta.

Endophyte	souches d' <i>Erwinia carotovora</i>					
EHA2	A41	A81	A101	A292	A491	Ecc
0	0	0	10	0	10	0
0	10	10	0	0	11	0
0	2	1	11	0	10	5
0	0	10	5	0	10	6
0	0	6	0	0	5	0
0	0	0	0	0	0	2
PR1						
0	15	10	0	15	0	0
0	15	0	0	15	2	0
0	14	0	5	15	1	0
0	15	0	5	15	0	0
0	0	15	10	15	0	0
0	5	15	11	15	2	0
PA2						
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	2	0	0	0
0	0	0	5	0	0	0
OR2						
5	15	15	10	15	5	10
6	14	15	11	15	4	11
5	14	14	10	14	5	10
5	15	10	10	14	6	10
6	15	15	9	15	5	12
4	15	15	10	15	5	10
OS4						
0	15	0	5	0	0	0
0	15	0	6	10	1	2
0	15	0	5	15	0	10
0	14	0	5	0	0	11
0	15	0	10	0	10	15
0	13	0	11	5	11	15

APPENDICE G

tableau 2: Résultats du test d'antagonisme *in vivo* des isolats endophytes envers les souches d'*Erwinia carotovora* sur la pomme de terre variété Désirée.

Endophyte	souches d' <i>Erwinia carotovora</i>						
	PA2	A41	A81	A101	A292	A491	Ecc
	0	1	0	15	0	0	0
	0	0	0	14	0	1	0
	0	1	0	15	1	2	1
	0	3	0	10	3	1	1
	0	0	0	9	2	3	0
	0	2	0	7	0	0	0
OR2							
	15	10	14	15	15	15	10
	15	10	15	14	15	1	9
	14	5	14	15	15	14	5
	15	11	13	13	13	15	5
	15	12	15	14	15	15	4
	14	10	15	15	14	13	5
OS4							
		0	0	5	0	0	0
		0	0	5	0	0	0
		1	1	6	1	1	1
		1	1	5	1	1	1
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
PR1							
	0	0	0	10	0	0	0
	0	0	1	10	0	0	1
	0	0	0	11	0	0	0
	0	0	0	10	0	0	0
	0	0	2	10	0	0	2
	0	0	5	5	0	0	5
EHA2							
	0	0	0	10	0	0	5
	0	0	0	5	0	0	0
	0	0	5	0	0	5	0
	0	0	4	0	0	0	4
	1	0	1	0	1	0	1
	0	0	4	0	0	0	0

APPENDICE H

Tableau 3: Résultats du test d'antagonisme *in vivo* des isolats endophytes envers les souches d'*Erwinia carotovora* sur la pomme de terre variété Bartina.

Endophyte	souches d' <i>Erwinia carotovora</i>						
	PA2	A41	A81	A101	A292	A491	Ecc
	0	0	0	10	0	5	0
	0	10	0	10	1	5	1
	0	1	0	9	5	6	5
	0	0	1	11	5	1	7
	0	6	10	10	0	10	2
	0	5	11	10	0	5	1
OR2							
	15	14	10	15	14	15	14
	15	15	11	15	15	15	15
	15	15	14	14	15	14	15
	13	14	15	15	14	14	13
	15	13	15	15	13	14	15
	14	15	15	14	15	14	14
OS4							
	0	10	9	0	0	15	14
	0	10	0	0	0	0	15
	2	10	5	0	0	14	3
	0	0	1	0	0	14	0
	14	5	5	0	0	0	3
	13	0	0	0	0	0	0
PR1							
	0	0	15	0	0	15	15
	0	0	14	15	0	14	15
	10	10	15	15	10	15	15
	10	9	0	5	0	14	14
	0	10	2	0	10	15	15
	4	10	2	10	10	15	15
EHA2							
	0	0	0	5	0	0	0
	0	0	0	10	0	0	0
	0	1	0	10	0	0	5
	0	0	0	11	0	0	4
	1	0	0	5	1	0	1
	2	0	1	10	0	0	0

REFERENCE

1. **STEVENSON W. A., R. LORIA, G. D. FRANC, ET D. P. WEINGARTNER. 2001.** Compendium of potato diseases. American Phytopathological Society. 2e éd. St-Paul, Minnesota. 106p.
2. **VAN ES A., ET K. J. HARTMANS. 1987.** Structure an chemical composition of the potato. Pp 15-78. *Dans* Rastovski A. et Es van A. (éd.). Storage of potatoes: Post-harvest behaviour, store design, storage practice, handling. Wageningen, The Netherland. Pudoc.
3. **STOREY R. J. M., ET H. V. DAVIES. 1992.** Tuber quality. Pp 507-569. *Dans* The Potato Crop. Paul Harris (éd). Chapman & Hall. Londres.
4. **AGRIOS G. N. 1997.** Plant pathology. 4e édition. Academic Press Inc., San Diego Californie. 635p.
5. **DE BOER, S. H. 1994.** Prospects for control of potato diseases caused by pectolytic *Erwinias*. In : Zehnder GW, Powelson ML, Jansson RK, Raman KV, eds. Advances in potato pest biology and management. Saint-Paul, Minnesota : APS Press : 136-48.
6. **RANGANNA B., A. C. KUSHALAPPA, ET G. S. V. RAGHAVAN. 1997.** Ultraviolet irradiance to control dry rot and soft rot of potato in storage. *Can. J. Plant Pathol.* 19:30-35.
7. **LEROUX P. 2004.** Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 195-222.
8. **PANON M.L., PANIGAI L., WALKER A.-S. AND LEROUX P. 2006.** Les nouveautés concernant la pourriture grise : en quelques points. *Le Vigneron Champenois* 127: 26-36.
9. **EL GUILLI M., ACHBANI E., FAHAD K., JIJAKLI H. 2009.** Alternative à la lutte chimique. Symposium international, Agriculture durable en region mediteranéenne. 266P.

10. **NOWAK J. AND SHULAEV V. 2003.** Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plantarum* 39: 107-124.
11. **MORRISSEY J.P., DOW J.M., MARK G.L. AND O'GARA F. 2004.** Are microbes at the root of a solution to world food production? *EMBO Reports* 5: 922-926.
12. **HINSINGER P. AND MARSCHNER P. 2006.** Rhizosphere—perspectives and challenges—a tribute to Lorenz Hiltner 12–17 September 2004- Munich, Germany. *Plant and Soil* 283: vii–viii.
13. **HOLLIDAY P. 1989.** A Dictionary of Plant Pathology. Cambridge University Press, Cambridge.
14. **SCHULZ B & BOYLE C. 2006.** What are endophytes? Microbial Root Endophytes (Schulz BJE, Boyle CJC & Sieber TN, eds), pp. 1–13. Springer-Verlag, Berlin.
15. **BERG, G., KRECHEL, A., DITZ, M., SIKORA, R. A., ULRICH, A., AND HALLMANN, J. 2005.** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:215-229.
16. **STROBEL G, DAISY B, CASTILLO U & HARPER J. 2004.** Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod* 67: 257–268.
17. **BEVIVINO A, DALMASTRI C, TABACCHIONI S, CHIARINI L. 2000.** Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biol. Fertil. Soils*, 31: 225-231.
18. **KUDRYASHAVA E, VINOKUROVA N, ARISKINA E. 2005.** *Bacillus subtilis* and phenotypically similar strains producing Hcxacne antibiotics. *Appl. Biochem. Microbiol.* 41: 486-489.
19. **KHOUDJA R., SMAIN K. 2010.** Pouvoir antagoniste d'isolats bacteriens endophytes de diverses plantes adventices à l'égard d'une gamme de bacteries phytopathogènes. pp 36.
20. **PRIOU S, JOUAN B. 1996.** Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. In : Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC, eds. Mieux comprendre la pomme de terre. Paris (France : Inra éditions, 1996.
21. **LELLIOT R. A., ET R. DICKEY. 1984.** Genus *Erwinia*. Pp 469-475. Dans *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins.

22. **SHUKLA S. D., C. GREEN, ET J. M. TURNER. 1980.** Phosphatidylethanolamine distribution and fluidity in outer and inner membranes of the Gram-negative bacterium *Erwinia carotovora*. *Biochem. J.* **188**:131-135.
23. **SHUKLA S. D., C. GREEN, ET J. M. TURNER. 1978.** Proteins, phospholipid distribution and fluidity in membranes of the Gram-negative bacterium *Erwinia carotovora*. *Biochem. Soc. Trans.* **6**:1347-1349.
24. **LAURENT, P., BUCHON, L., BURINI, J.F., AND ORANGE, N. 2001.** Low pH and cold temperature combine to limit growth and pectate lyase production by psychrotrophic bacterium *Erwinia carotovora ssp. carotovora* MFCL0. *Biotechnology Letters.* **23**: 753-756.
25. **SMADJA B., LATOUR X., TRIGUI S., BURINI J-F., CHEVALIER S., ORANGE N. 2003a.** Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) subspecies. *Canadian Journal of Microbiology.*
26. **TOTH, I. K., BELL, K. S., HOLEVA, M. C., AND BIRCH, P. R. J. 2003.** Soft-rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol Plant Pathology* **4**: 17-30.
27. **PEROMBELON, M. C. M. 2002.** Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol* **51**: 1-12.
28. **COLLMER, A., AND KEEN, N. T. 1986.** The role of the pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**:383-409.
29. **SHEVCHIK, V. E., ET HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. 1997.** Identification of bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **24** : 1285-1301.
30. **TOTH, I. K., NEWTON, J. A., HYMAN, L. J., LEES, A. K., DAYKIN, M., ORTORI, C., WILLIAMS, P. & FRAY, R. G. 2004.** Potato plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones increase susceptibility to soft rot erwiniae. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 880–887.
31. **PIRHONEN, M. ET AL. 1993.** A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* **12**,2467–2476.
32. **BARNARD, A.M. AND SALMOND, G.P. 2007.** Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 415–423.

33. **JOSEPH, T. BYERS, CLAIRE LUCAS, GEORGE P. C. SALMOND, AND MARTIN WELCH. 2001.** Nonenzymatic Turnover of an *Erwinia carotovora* Quorum-Sensing Signaling Molecule. Vol. 184, No. 4. Cambridge, United Kingdom.
34. **MCGOWAN, S. M., M. SEBAIHIA, S. O'LEARY, K. R. HARDIE, P. WILLIAMS, G. S. A. B. STEWART, B. W. BYCROFT, AND G. P. C. SALMOND. 1997.** Analysis of the carbapenem gene cluster of *Erwinia carotovora*: definition of the antibiotic biosynthetic genes and evidence for a novel β -lactam resistance mechanism. *Mol. Microbiol.* **26**:545–556.
35. **AXELROOD, P. E., M. RELLA, AND M. N. SCHROTH. 1988.** Role of antibiosis in competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. *J. Bacteriol.* **54**: 1222–1229.
36. **PARKER, W. L., M. L. RATHNUM, J. S. WELLS, JR., W. H. TREJO, P. A. PRINCIPE, AND R. B. SYKES. 1982.** SQ 27,860, a simple carbapenem produced by species of *Serratia* and *Erwinia*. *J. Antibiot.* **35**:653–660.
37. **CARLIER A., UROZ S., SMADJA B., FRAY R., LATOUR X., DESSAUX Y., FAURE D. 2003.** The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM* paralogous gene, *aiiB*, also encoding *N*-acyl homoserine lactonase activity. *Applied Environmental Microbiology* 69 : 4989-4993.
38. **NORMAN-SETTERBLAD, C., VIDAL, S., AND PALVA, E.T. 2000.** Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 430-438.
39. **GARCIA-OLMEDO, F., MOLINA, A., ALAMILLO, J.M., RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. 1998.** Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**: 479-491.
40. **PIRHONEN, M., SAARILAHTI, H., KARLSSON, M-B., AND PALVA, E.T. 1991.** Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**: 276-283.
41. **PEROMBELON, M. C. M. 2002.** Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol* **51**: 1-12.
42. **LAUTIER, T., ET NASSER, W. 2007.** The DNA nucleoid-associated protein Fis coordinates the expression on the main virulence genes in phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol microbiol* in press.

43. **REUHS, B. L., KIM, J. S., ET MATTHYSSE, A. G. 1997.** Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of a cell associated, Acidic polysaccharide. *J Bacteriol* **179** :5372-5379.
44. **MERRELL, D. S., HAVA, D. L., ET CAMILI, A. 2002.** Identification of novel factors involved in colonisation and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **43** :1471-1491.
45. **EXPERT D, RAUSCHER L, FRANZA T. 2004.** – *Erwinia*, a plant pathogen. *In*, Iron Transport in Bacteria. J-H Crosa, AR Mey and SM Payne (Eds), ASM Press, Washington D.C., pp. 402-412.
46. **ISHIMARU, C.A., AND LOPER, J.E. 1992.** High-affinity iron uptake systems present in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* include the hydroxamate siderophore aerobactin. *J Bacteriol* **174**: 2993-3003.
47. **PEMBERTON, C., AND SALMOND, G. P. C. 2004.** The Nep1-like proteins - a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Mol Plant Pathology* **5**: 353–359.
48. **DELEPELAIRE, P. AND WANDERSMAN, C. 1991.** Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol.* **5**:2427-34.
49. **JOHNSON, T.L., ABENDROTH, J., HOL, W.G. AND SANDKVIST, M. 2006.** Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett.* **255**:175-86.
50. **BELL, K.S., SEBAIHIA, M., PRITCHARD, L., HOLDEN, M.T., HYMAN, L.J., HOLEVA, M.C., THOMSON, N.R., BENTLEY, S.D., CHURCHER, L.J., MUNGALL, K., ATKIN, R., BASON, N., BROOKS, K., CHILLINGWORTH, T., CLARK, K., DOGGETT, J., FRASER, A., HANCE, Z., HAUSER, H., JAGELS, K., MOULE, S., NORBERTCZAK, H., ORMOND, D., PRICE, C., QUAIL, M.A., SANDERS, M., WALKER, D., WHITEHEAD, S., SALMOND, G.P., BIRCH, P.R., PARKHILL, J. AND TOTH, I.K. 2004.** Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**:11105-10.
51. **LIU, H., COULTHURST, S.J., PRITCHARD, L., HEDLEY, P.E., RAVENSDALE, M., HUMPHRIS, S., BURR, T., TAKLE, G., BRURBERG,**

- M.B., BIRCH, P.R., SALMOND, G.P. AND TOTH, I.K. 2008.** Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathog.* 4:e1000093.
- 52.**TSENG, T .T; BRETT .M TYLER AND JOÃO C SETUBAL. 2009.** Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol*, **9**(Suppl 1):S2.
- 53.**PAULIN, J. P. DURON, M. 2004.** Inoculation of callus root tissues of *Malus domestica* cv Golden delicious for the identification of pathogenic strains of *Erwinia amylovora*. P 24-49.
- 54.**Alfano, J.R., And Collmer, A. 1996.** Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* **8**: 1683-1698.
- 55.**PEROMBELON M. C. M, LOPEZ MM, CARBONELL J, ET AL.1988.** Effects of contamination by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* of potato seed tubers and of cultivar resistance on blanking or nonemergence and blackleg development in Valencia, Spain. *Potato Res*; **31** : 591-9.
- 56.**PÉROMBELON M. C. M, KELMAN A. 1987.** Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*; proposal for revision of terminology. *Plant Dis*; **71** : 283-5.
- 57.**CAMPOS E, MAHER EA, KELMAN A. 1982.** Relationship of pectolytic *clostridia* and *Erwinia carotovora* strains to decay of potato tubers in storage. *Plant Dis*; **66** : 543-6.
- 58.**Richard C Et Boivin G .1994.** Maladies et ravageurs des cultures légumières au Canada.
- 59.**LUDY RL, POWELSON ML ET HEMPHILL, J. R., D.D., 1997.** Effect of sprinkler irrigation on bacterial soft rot and yield of broccoli. *Plant Disease* **81**: 614–618.
- 60.**NACHIN, L., ET BARRAS, F. 2000.** External pH : an environmental signal that helps to rationalize Pel gene duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **13** : 882-886.
- 61.**HOWARD, R. J., J. A. GARLAND, AND W. L. SEAMAN. 1994.** Diseases and pests of vegetable crops in Canada. An illustrated compendium. The Canadian Phytopathological Society and Entomological Society of Canada, Ottawa.

62. **SECOR G. N., M. GUDMESTAD, ET D. RODRIGUEZ. 1996.** NDSU making progress on management of silver scurf. Valley Potato Grower. Pp 26-27.
63. **RODRIGUEZ-SAONA L. E., ET R. E. WROLSTAD. 1997.** Influence of potato composition on chip color quality. Am. Potato J. **74**:87-106.
64. **HELIAS V, 2008.** Pectobacterium spp. et Dikeya spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour Erwinia spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. Cah Agric 2008 ; 17 : 349-54.
65. **Moreau M, Feuilloley MGJ, Orange N. 2005.** Lethal effect of the gliding arc discharges on Erwinia spp. J Appl Microbiol; 98 : 1039-46.
66. **YAGANZA ES, RIOUX D, SIMARD M, ET AL. 2004.** Ultrastructural alterations of Erwinia carotovora subsp. atroseptica caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. Appl Environ Microbiol 2004 ; 70 : 6800-8.
67. **KAMYSZ W, KROLICKA A, BOGUCKA K, ET AL. 2005.** Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic Pectobacterium species. J Pathol 2005 ; 153 : 313-7.
68. **RODRIGUEZ-SAONA L. E., ET R. E. WROLSTAD. 1997.** Influence of potato composition on chip color quality. Am. Potato J. 74:87-106.
69. **DÜRING K, PORSCH P, FLADUNG M, ET AL. 1993.** Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora. Plant J 1993 ; 3 : 587-98.
70. **HERVIEUX V., E. S. YAGANZA, J. ARUL, ET R. J. TWEDDELL. 2002.** Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. Plant Dis **86**:1014-1018.
71. **MECTEAU M. R., J. ARUL, ET R. J. TWEDDELL. 2002.** Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of Fusarium sambucinum, a causal agent of potato dry rot. Mycol Res **106**:688-696.
72. **HORST R. K., S. O. KAWAMOTO, ET L. L. PORTER. 1992.** Effect of sodium bicarbonate and oils on the control of powdery mildew and black spot of roses. Plant Dis. **76**:247-
73. **OLIVIER C., D. E. HALSETH, E. S. G. MIZUBUTI, ET R. LORIA. 1998.** Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers. Plant Dis. **82**:213-217.

74. **AHARONI Y., E. FALLIK, A. COPEL, M. GIL, S. GRINBERG, ET J. D. KLEIN. 1997.** Sodium bicarbonate reduces postharvest decay development on melons. *Post harvest Biol. Technol.* **10**:201-206.
75. **BAHI, M. LAPOINTE ET C. BEAULIEU. 2005.** Lutte biologique contre la pourriture molle de la pomme de terre provoquée par *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* à l'aide des bactériophages. Centre Sève, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec), Canada J1K 2R1.
76. **PAL, K. K. AND B. MCSPADDEN GARDENER, 2006.** Biological Control of Plant Pathogens *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
77. **VRIJE, T.; ANTOINE, N.; BUITELAAR, M.R.; BRUCKNER, S.; DISSEVELT, M.; DURAND, A.; GERLAGH, M.; JONES, E.E.; LÜTH, P.; OOSTRA, J.; RAVENSBERG, W.J.; RENAUD, R.; RINZEMA, A.; WEBER, F.J.; WHIPPS, J.M. 2001.** The Fungal Biocontrol Agent *Coniothyrium minitans*: Production by Solid-state Fermentation, Application and Marketing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**(1-2), 58-68.
78. **THAKORE, Y. 2006.** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology.* (3):294-208.
79. **HALLMANN, J., A. QUADT-HALLMANN, W. F. MAHAFFEE, AND J. W. KLOPPER. 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**:895– 914.
80. **LODEWYCKX, C., J. VANGRONSVELD, F. PORTEOUS, E. R. B. MOORE, S. TAGHAVI, M. MERGEAY, AND D. VAN DER LELIE. 2002.** Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**:583–606.
81. **MASTRETTA, C., T. BARAC, J. VANGRONSVELD, L. NEWMAN, S. TAGHAVI, AND D. VAN DER LELIE. 2006.** Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **23**:175–207.
82. **KOBAYASHI, D. Y., AND J. D. PALUMBO. 2000.** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, p. 199–233. *In* C. W. Bacon and J. F. White (ed.), *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
83. **ODUM, E. P. 1953.** *Fundamentals of Ecology*. W. B. Saunders, Philadelphia / London.

84. **RYAN RP, GERMAINE K, FRANKS A, RYAN DJ & DAVID N .2008.** Bacterial endophytes: recent developments and applications FEMS Microbiol Lett 278.
85. **VERMA SC, LADHA JK & TRIPATHI AK .2001.** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J Biotechnol 91: 127–141.
86. **WAKELIN S, WARREN R, HARVEY P & RYDER M .2004.** Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. Bio Fert Soils 40: 36–43.
87. **LEE S, FLORES-ENCARNACION M, CONTRERAS-ZENTELLA M, GARCIA-FLORES L, ESCAMILLA JE & KENNEDY C .2004.** Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. J Bacteriol 186: 5384–5391.
88. **COSTA JM & LOPER JE .1994.** Characterization of siderophore production by the biological-control agent *Enterobacter cloacae*. Mol Plant Microbe Interact 7: 440–448.
89. **BAKKER P.A.H.M., PIETERSE C.M.J. & VAN LOON L.C., 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, **97**, 239-243.
90. **KADO, C. I. 1992.** Plant pathogenic bacteria, p. 659–674. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), The prokaryotes, vol. I. Springer-Verlag, New York, N.Y.
91. **BELL, C. R., G. A. DICKIE, W. L. G. HARVEY, AND J. W. Y. F. CHAN. 1995.** Endophytic bacteria in grapevine. Can. J. Microbiol. **41**:46–53.
92. **STURZ AV & MATHESON BG .1996.** Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. Plant Soil 184: 265–271.
93. **THOLOZAN, J. L., J. M. CAPPELIER, J. P. TISSIER, G. DELATTRE, AND M. FEDERIGHI. 1999.** Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Appl. Environ. Microbiol. **65**:1110–1116.
94. **AMANN, R. I., W. LUDWIG, AND K. H. SCHLEIFER. 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**:143–169.

95. **SESSITSCH, A., A. WEILHARTER, M. H. GERZABEK, H. KIRCHMANN, AND E. KANDELER. 2001.** Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4215– 4224.
96. **SMALLA, K., G. WIELAND, A. BUCHNER, A. ZOCK, J. PARZY, S. KAISER, N. ROSKOT, H. HEUER, AND G. BERG. 2001.** Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4742– 4751.
97. **PATRIQUIN, D. G., AND J. D&ORING;BEREINER. 1978.** Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* **24**:734–742.
98. **AGARWAL, S., AND S. T. SHENDE. 1987.** Tetrazolium reducing microorganisms inside the root of *Brassica* species. *Curr. Sci.* **56**:187–188.
99. **LEBEN, C., G. C. DAFT, AND A. F. SCHMITTHENNER. 1968.** Bacterial blight of soybeans: population levels of *Pseudomonas glycinea* in relation to symptom development. *Phytopathology* **58**:1143–1146.
100. **DENISE K. ZINNIEL,^{1,2} PAT LAMBRECHT,¹ N. BETH HARRIS,² ZHENGYU FENG,² DANIEL KUCZMARSKI, PHYLLIS HIGLEY, CAROL A. ISHIMARU, ALAHARI ARUNAKUMARI, RAUL G. BARLETTA, AND ANNE K. VIDAVER¹. 2002.** Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants.
101. **LAMB, T. G., D. W. TONKYN, AND D. A. KLUEPFEL. 1996.** Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can. J. Microbiol.* **42**:1112–1120.
102. **GRIMAULT, V., AND P. PRIOR. 1994.** Invasiveness of *Pseudomonas solanacearum* in tomato, eggplant and pepper: a comparative study. *Eur. J. Plant Pathol.* **100**:259–267.
103. **AZEVEDO JL, MACCHERONI J JR, PEREIRA O & ARA WL .2000.** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electr J Biotech* 3: 40–65.
104. **HALLMANN J, QUADT-HALLMANN A, RODRÍGUEZ-KÁBANA R & KLOPPER JW .1998.** Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biol Biochem* 30: 925–937.

105. **KISS, L. 2003.** A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Manag. Sci.* 59:475-483.
106. **FRAVEL, D.R. 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 337-359.
107. **THOMASHOW, L. S., BONSTALL, R. F., AND WELLER, D. M. 2002.** Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. Pages 638-647 in: *Manual of Environmental Microbiology* (2nd ed.), ASM Press, Washington DC.
108. **NOTZ, R., MAURHOFER, M., SCHNIDER-KEEL, U., DUFFY, B., HAAS, D., AND DEFAGO, G. 2001.** Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology* 91:873-881.
109. **ALLAIRE M., 2005.** Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. pp 5-10.
110. **NEILANDS, J. B. 1981.** Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50:715-731.
111. **ORDENTLICH, A., ELAD, Y., CHET, I. 1988.** The role of chitinase of *Serratia marcescens* in the biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78:84-88.
112. **PALUMBO, J. D., YUEN, G. Y., JOCHUM, C. C., TATUM, K., AND KOBAYASHI, D. Y. 2005.** Mutagenesis of beta-1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward *Bipolaris* leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology* 95: 701-707.
113. **BENHAMOU, N. 2004.** Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology* 94:693-705.
114. **LAFONTAINE, P. J., AND BENHAMON, N. 1996.** Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radici-lycopersici*. *Biocontrol Sci. Technol* 6:111-124.

115. **ANDERSON, A. J., TARI, P. H., AND TEPPER, C. S. 1988.** Genetic studies on the role of an agglutinin in root colonization by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:375-380.
116. **KLOEPPER, J. W. 1983.** Effect of seed piece inoculation with plant-growth promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathology* **73**:217–219.
117. **STURZ, A. V., B. R. CHRISTIE, B. G. MATHESON, W. J. ARSENAULT, AND N. A. BUCHANAN. 1999.** Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathol.* 48:360–369.
118. **FUQUA WC, WINANS SC, GREENBERG EP. 1994** .Quorumsensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*; 176 : 269-75.
119. **SMADJA B, LATOUR X, FAURE D. 2004.** Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout the plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol Plant Microbe Interact*; 17 : 1269-78.
120. **LATOUR X, DELORME S, MIRLEAU P, ET AL.2003.** Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie*; 23 : 397-405.
121. **RASMUSSEN TB, GIVSKOV M .2006.** Quorum-sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology*; 152 : 895-904.
122. **DONG YH, XU JL, LI XZ, ET AL.2000.** AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97 : 3526-31.
123. **D'ANGELO-PICARD C, FAURE D, PENOT I, ET A.L2005.** Diversity of N-acylhomoserine lactoneproducing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ Microbiol*; 7 : 1796-808.
124. **UROZ S, D'ANGELO C, CARLIER A, ET A L.2003.** Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing regulated functions of plant pathogenic bacteria. *Microbiology*; 149 : 1981-9.

125. **Park SY, Hwang BJ, Shin MH, et al. 2006.** N-acylhomoserine lactonase producing *Rhodococcus spp.* with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiol Lett*; 261 : 102-8.
126. **DONG YH, ZHANG XF, XU JL, ET AL. 2004.** Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Environ Microbiol*; 70 : 954-60.
127. **Cirou A, Diallo S, Kurt C, et a. 2007.** Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ Microbiol*; 9 : 1511-22.
128. **Kerrouche, A. 2007.** Détection et identification biochimique de genres bactériens isolés de quelques variétés de semences de pomme de terre. Thèse ing. Université de Blida, 53P.
129. **ALIM, D. 2009.** Analyse du pouvoir pathogène de souches d'*Erwinia carotovora* isolées de semences de pomme de terre Thèse ing. Université de Blida, 41P.
130. **BOUZAR H., MOORE L. W. SCHAAD N.W. 1983.** A crown gall of Pecan: A survey of *Agrobacterium* strains and potential of biological control in Georgia. *Plant Dis.* 67:310-312.
131. **SCHAAD, N.W. 1988.** Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd Edition. Pp. 44-81.
132. **DICKEY, R. S., KELMAN, A., 1988:** In plant pathogenic bacteria, laboratory guide for identification. In Schaad (Ed). N.W. APS. Minnesotc. USA, 158P.
133. **KOVACS, N. 1956.** Identification of *Pseudomonas pyocyan*a by the oxydase reaction. *nature.* 187-703p.
134. **HUGH. R., LEIFSON E., 1953:** the taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacterial.* 66, 24-26 p.
135. **LELLIOTT R. A., DICKEY, R.S., 1984.** Genus VII. *Erwinia*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 469-476 p. Williams and Wilkins, Baltimore, Etats-unis.
136. **DYE, D. W. 1968.** A taxonomic studies of the genus *Erwinia*. I. The « *amylovora* » group. *New Zealand Journal of Science* 11 : 590-607.
137. **YABUUCHI E., smith J., 1999:** la lute contre *Ralstonia solanacearum*, 1-34p.

138. **HILDBRAND D. C., SCHROTH M.N., SANDS D.C., 1988.** In plant pathogenic bacteria, laboratory guide for identification, In Schaad (Ed) . N.W.APS. Minnesota. USA, 158P.
139. **RYU, E., 1938.** On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *J Jpn Soc Vet Sci* 17, 31.
140. **ABOLMAATY, A.; VU, C.; OLIVER, J.; LEVIN, R. E.; . 2000.** Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios* 101, 181-189.
141. **HAUBEN, L., MOORE, E. R. B., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT, J., VERDONCK, L. & SWINGS, J. 1998.** Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol* 21, 384–397.
142. **STONIER, L. 1960.** *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *J. Bacteriol.* 79:880-898.
143. **BARTZ, J. A., AND KELMAN, A. 1984.** Inoculation of potato tubers with *Erwinia carotovora* during simulated commercial washing and fluming practices. *Am. Potato J.* 61 : 495-507.
144. **KOCH, A.L. 1981.** Growth measurement. In. Gerhardt, P. et al., eds. *Manual of Methods for General Bacteriology*. AS. M., PP. 179-207.
145. **KERR, A., ROBERTS W.P., 1976.** *Agrobacterium* correlations between transfer of pathogenicity, octopine and nopaline metabolism and bacterium 84 sensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 9 : 205-211.
146. **LIAO, C. H., 2009.** Control of Foodborne Pathogens and Soft-Rot Bacteria on Bell Pepper by Three Strains of Bacterial Antagonists. *J. Food Prot.*, Vol. 72, No. 1
147. **HAMMER O., HARPER D.A.T., et RYAN P. D., 2001-** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
148. **SMADJA B, LATOUR X, TRIGUI S, ET AL. 2004.** Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Can J Microbiol*; 50 : 19-27.

149. **SMADJA B, LATOUR X, FAURE D. 2004.** Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout the plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol Plant Microbe Interact*; 17 : 1269-78.
150. **DE BOER S. H., ET M. SASSER. 1986.** Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *E. carotovora* ssp. *atroseptica* on the basis of cellular fatty acid composition. *Can. J. Microbiol.* 32:796-800.
151. **SMITH C, BARTZ JA .1990.** Variation in the pathogenicity and aggressiveness of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. *Plant Dis*; 74 : 505-9.
152. **JANSE JD, RUISSEN MA .1988.** Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in The Netherlands. *Phytopathology*; 78 : 800-8.
153. **MILLER, S. I., ERNST, R. K., AND BADER, M. W. 2005.** LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Rev* 3: 36-46.
154. **HELIAS V, LE ROUX AC, MONTFORT F. 2006.** Potato blackleg in France: incidence of causal *Erwinias* species and field symptoms expression. 1st International *Erwinia* Workshop, Dundee, Scotland. 7–9th July; 15.
155. **BOWEN, G.D., 1979.** Integrated and experimental approaches to the study of growth of organisms around roots. In: Schippers, B., Gams, W. (Eds.). *Soilborne Plant Pathogens*, Academic Press, London, pp. 207-227.
156. **JACOBS, M. J., W. M. BUGBEE, AND D. A. GABRIELSON. 1985.** Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *can. J. Bot.* 63: 1262-1265.
157. **MERCADO-BLANCO J. & BAKKER P.A.H.M., 2007.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 367-389.
158. **LIU, B., QIAO, H., HUANG, L., BUCHENAUER, H., HAN, Q., KANG, Z., GONG, Y., 2009.** Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biol. Control* 49, 277–285.
159. **SWAIN, M.R., RAY, R.C., 2009.** Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiol. Res.* 164, 121–130.

160. **DIJKSTRA, A.F., SCHOLTEN, G.H.N., VAN VEEN, J.A., 1987.** Colonization of wheat seedling (*Triticum aestivum*) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Biol. Fert. Soils* 4, 41–46
161. **BOSSIS, E., LEMANCEAU, P., LATOUR, X., AND L. GARDAN. 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20, 51-53.
162. **MAVRODI, D. V., R. F. BONSALL, S. M. DELANEY, M. J. SOULE, G. PHILLIPS, AND L. S. THOMASHOW. 2001.** Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 183:6454- 6465.
163. **WELLER, D. M. 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.
164. **YONG-FANG CHEN AND YAN-NI YIN. 2007.** *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola*, A New Pathovar of Pathogens in Sugar Beet. *Plant Disease*. Vol. 91 No. 6.
165. **YOUNG, J. M., TAKIKAWA, Y., GARDAN, L., AND STEAD, D. E. 1992.** Changing concept in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:67-105.
166. **TOR, M., S.H. MANTEL, AND C. AINSWORTH. 1992.** Endophytic bacteria expressing beta-glucuronidase cause false positives in transformation of *dioscorea* species. *Plant Cell Rep.* 11, 452-456.
167. **ELBELTAGY, A., K. NISHIOKA, H. SUZUKI, Y.I. SATO, H. MORISAKI, H. MITSUI, AND K. MINAMISAWA. 2000.** Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 617-629.
168. **ZINNIER, D.K., P. LAMBRECHT, N.B. HARRIS, Z. FENG, D. KUCZMARSKI, P. HIGLEY, C.A. ISHIMARU, A. ARUNAKUMARI, R.G. BARLETTA, AND A.K. VIDAVER. 2002.** Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2198-2208.
169. **ARAUJO, W.L., W. MACCHERONI, JR., C.I. AGUILAR-VILDOSO, P.A.V. BARROSO, H.O. SARIDAKIS, AND J.L. AZEVEDO. 2001.** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47, 229-236.

170. RAUPACH, G.S. AND J.W. KLOEPPER. 1998. Mixtures of plant growthpromoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88, 1158-1164.
171. LINDGREN PB. 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 35:129-152. A comprehensive review of Hrp systems, their genetics, component proteins, regulation, interactions with Avr (avirulence) proteins. The discussion of the role of the Hrp system in the suppression of plant defenses is particularly important.
172. ALFANO JR, COLLMER A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol*, 179:5655-5662. A review of Hrp systems emphasizing type III secretion functions and the delivery of Avr (avirulence) proteins into plant cells. Contains a useful comparison of group I and II *hrp* gene arrangements and a table of Hrc (hypersensitive response, conserved) protein homologs in *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* spp.
173. VIVIAN A, GIBBON MJ. 1997. Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signals or weapons? *Microbiology*, 143:693-704. An excellent review and the most current general overview of *avr* genes. The article has many good insights, for example, in the conceptually useful division of *avr* genes into two groups: *P. syringae*-type and *avrBs3*-like.
174. FINLAY B, FALKOW S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61:136-169.
175. CORNELIS GR, WOLF-WATZ H. 1997. The *Yersinia* Yop regulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol*, 23:861-867.
176. HACKER J, BLUM-OEHLER G, MUHLDOERFER I, TSCHAPE H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*, 23:1089-1097. A definitive overview of pathogenicity islands, which deals exclusively with animal pathogens and focuses on *Pais* (pathogenicity islands) encoding type III secretion systems.
177. STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F. M., BAKER, B.J., ELLIS, J. G., ET JONES, J.D. 1995. Molecular genetics of plant diseases resistance. *Science* 268: 661-667.
178. HAM JH, BAUER DW, COLLMER A. 1998. A cloned *Erwinia chrysanthemi* Hrp (type III protein secretion) system functions in *Escherichia coli* to deliver

- Pseudomonas syringae* Avr signals to plant cells and to secrete Avr proteins in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.
179. **HE RL, WANG GP, LIU XH, ZHANG CL, LIN FC .2009.** Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. *Afr. J. Biotechnol.* 8(2): 191-195.
180. **KAVINO M, HARISH S, KUMAR N, SARAVANAKUMAR D, DAMODARAN T, SOORIANATHASUNDARAM K, SAMIYAPPAN R .2007.** Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. *Soil Biol. Biochem.* 39: 1087-1098.
181. **LONG H.H., FURUYA N., KUROSE D., TAKESHITA M., TAKANAMI Y., 2003.** Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their Antibacterial Activity against Plant Pathogenic Bacteria. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 48: 21-28.
182. **PRATHUANGWONG, S. AND S. KASEM. 2003.** Potential of new antagonists for controlling bacterial pustule increasing soybean yield and reducing bactericide application. pp. 29-3.26. *In Proc. of the Summary of the 8th Internat. Con. of Plant Pathology.* Christchurch.
183. **PRATHUANGWONG, S. AND N. BUENSANTEAI. 2006.** *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, peroxidases, and 1, 3-*b* glucanases in soybean plants. *Acta Phytopathologica.* In press.
184. **BUENSANTEAI, N., D. ATHINUWAT, AND S. PRATHUANGWONG. 2007.** *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* caused agent soybean bacterial pustule with increased phenolic compounds and phenylalanine ammonia lyase. *Proc of the 45th Kasetsart University Annual Conference.* Thailand.
185. **PRATHUANGWONG, S. AND N. BUENSANTEAI. 2007.** *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, peroxides, and 1,3- α -glucanase in soybean plant. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 42: 321-330.
186. **IDRISS, E.E., D.J. IGLESIAS, M. TALON AND R. BORRISS. 2007.** Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of

- plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *MPMI* 20: 619-626.
187. **MCKEEN, C.D., REILLY, C.C., AND PUSEY, P.L. 1986.** Production and Partial Characterization of Antifungal Substances Antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*, *Phytopathology*, 76, 136-139 .
188. **LOEFFLER, W., TSCHEN, S.M., VAMITTANAKOON, N., KUGLER, M., KNORPP, E., HSIEH, T.F., AND WU, T.G .1986.** Antifungal Effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A Comparison With Activities of Other *Bacillus* Antibiotics, *Journal of Phytopathology*, 115, 204-213.
189. **MARTINEZ, C., MICHAUD, M., BELANGER, R. R. AND TWEDDELL, R. J. 2002.** Identification of soils suppressive against *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1861-1868.
190. **SILO-SUH, L. A., LETHBRIDGE, B. J., RAFFEL, S. J., HE, H., CLARDY, J. AND HANDELSMAN, J.1994.** Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2023-2030.
191. **EMMERT, E. A. B. AND HANDELSMAN, J.1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 1-9.
192. **PLEBAN, S., CHERNIN, L. AND CHET, I. 1997.** Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 284-288.
193. **CHIEN-JUI HUANG, TANG-KAI WANG, SHU-CHUN CHUNG AND CHAO-YING CHEN.2005.** Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol Agent, *bacillus cereus* 28-9. *J. biochemistry and molecular biology*, vol. 38, no. , pp. 82-88.
194. **ASSIS, S.M.P., MARIANO, R.L.R., MICHEREFF, S.J., SILVA, G., AND MARANHÃO, E.A.A.1997.** Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* on Cabbage Phylloplane in Field, In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria . Present Status and Future Prospects.* Ogoshi, A., Kobayashi, Y., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N., and Akino, S. (eds.), Sapporo: Univ. of Hokaido/OECD, 345-348 .
195. **HAAS, D., AND C. KEEL. 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:117-153.

196. **CHIN-A-WOENG, T. F., G. V. BLOEMBERG. AND B. J. LUGTENBERG. 2003.** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol.* 157 : 503-523.
197. **CHIN-A-WOENG, T. F., J. E. THOMAS-OATES, B. J. LUGTENBERG, AND G. V. BLOEMBERG. 2001.** Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1006-1015.
198. **KIM, M. S., Y. C., KIM, AND CHO, B. H. 2004.** Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biol.* Mar-Apr;6(2):105-108.
199. **GAULT A .1938.** *La pomme de terre - Culture, sélection, utilisation*, Paris, Flammarion, coll. « La Terre, Encyclopédie paysanne », 148 p.
200. **KLOEPPER J.W., RYU C.M. & ZHANG S.A., 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, **94**, 1259-1266.
201. **DE BOER, S.H. 2003.** Characterization of pectolytic *erwinias* as highly sophisticated pathogens of plants. *Eur J Plant Pathology* **109**: 893-899.
202. **CRONIN, D., MOENNE-LOCCOZ, Y., FENTON, A., DUNNE, C., DOWLING, D. N., AND O'GARA, F. 1997.** Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1357- 1361.
203. **ZHOU Y, CHOI Y-L, SUN M, YU Z.2008.** Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control of plant diseases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80:563-572.
204. **LIN YH, XU JL, HU J, ET AL.2003.** Acylhomoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol*; 47 : 849-60.
205. **DONG YH, WANG LH, XU JL, 2001.** Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acylhomoserine lactonase. *Nature*; 411 : 813-7.
206. **ONGENA, M., E. JOURDAN, A. ADAM, M. PAQUOT, A. BRANS, B. JORIS, J.L. ARPIGNY AND P. THONART. 2007.** Surfactin and fengycin

- lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084-1090.
207. **SCHUHEGGER, R., IHRING, A., GANTNER, S., BAHNWEIG, G., KNAPPE, C., VOGG, G., HUTZLER, P., SCHMID, M., VAN BREUSEGEM, F., EBERL, L., HARTMANN, A. AND LANGEBARTELS, C. 2006.** Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29:909-18.
208. **LUNA. C.L., R.L.R.MARIANO AND A.M.SOUTO-MAIOR. 2002.** Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease .*Bra. J. Chemical Engineering.* Vol. 19, No. 02, pp. 133 – 140.
209. **FUKUMOTO, J. 1943.** Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution (in Japanese). *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 19: 487-503.
210. **PRIEST F.G, GOODFELLOW M, SHUTE L.A. AND BERKELEY R.C.W.1996.** *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1987, 37, 69-71.
211. **ESPINO TM, TAMBALO RD & ELEGODO FB.1996.** Microbial production of α -amylase for food and other industrial applications. *IC Biotech.* 19: 669-677.
212. **HIS S., 2005.** Les biocarburants dans le monde. Panorama documents IFP.
213. **KIMMO V, LIISA M. 1999.** Bioetanolin valmistus jäteperunasta – Esiselvitys teknisestä toteutuksesta ja taloudellinen arviointi, Report 239, Oulun yliopisto, Prosessitekniiikan osasto.
214. **RAMESH, A. ASHA, D. L. AND R. BALAJI R. 2010.** Production of bio-ethanol from *Pectobacterium carotovorum* induced soft rotten potatoes. *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 4 (12) pp. 1340-1342.
215. **GHOBIAN B, RAHIMI H. 2004.** Biofuel: past, present and future perspective. International Iran and Russian Congress of Agricultural and Natural Science. Shahre Kord, Iran: Shahre- Kord University.
216. **WYMAN CE. 1999.** Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annu Rev Energy En.* 24:189–226.
217. **VERMA G, NIGAM P, SINGH D, CHAUDHARY K. 2000.** Bioconversion of starch to ethanol in a single-step by co-culture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. *Bioresour Technol*;72:261–6.

- 218.**ROBERT H. PERRY ET DONALD W. GREEN. 1997.** *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, USA, McGraw-Hill. 7^e éd., 2400 p. (ISBN [0-07-049841-5](#)), p. 2-50.
- 219.**AVROVA, A. O., HYMAN, L. H., TOTH, R. L. & TOTH, I. K. 2002.** Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Appl Environ Microbiol* 68, 1499–1508.
- 220.**ROMERO D, DE VICENTE A, RAKOTOALY RH, DUFOUR SE, VEENING JW, ARREBOLA E, CAZORLA FM, KUIPER OP .2007.** The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20: 430–440.
- 221.**DJELLOUT H., 2009.** Evaluation du pouvoir antibactérien de quatre plantes spontanées. *thes ing phytopathol* . Univ Blida. 60 p .
- 222.**TAFIFET L., 2010.** Effet bactéricide, fongicide et nematicide *in vitro* de quatre espèces végétales spontanées. *thes mag phytopathol*. Univ Blida. 66p.