



---

Année Universitaire : 2013-2014

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Lutte microbiologique contre *Erwinia chrysanthemi* et isolement des *Erwinia* pectinolytiques et cellulolytiques**

Présenté par : **Abdellatif Maghnaoui**

Encadré par : Pr. Mohammed El Hassouni

Soutenu le 23 Juin 2014

Membres de jury :

- Pr. Kawtar Fikri Benbrahim..... PES, Faculté des Sciences et Techniques-Fès
- Pr. Haggoud Abdellatif..... PES, Faculté des Sciences et Techniques-Fès
- Pr. Mohieddine Moumni.....PES, Faculté des Sciences-Meknès
- Pr. Mohammed El Hassouni.....PES, Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès

Stage réalisé au Laboratoire de Biotechnologie des Microorganismes  
Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès



---

Année Universitaire : 2013-2014

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Lutte microbiologique contre *Erwinia chrysanthemi* et isolement des *Erwinia* pectinolytiques et cellulolytiques**

Présenté par : **Abdellatif Maghnaoui**

Encadré par : Pr. Mohammed El Hassouni

Soutenu le 23 Juin 2014

Membres de jury :

- Pr. Kawtar Fikri Benbrahim..... PES, Faculté des Sciences et Techniques-Fès
- Pr. Haggoud Abdellatif..... PES, Faculté des Sciences et Techniques-Fès
- Pr. Mohieddine Moumni.....PES, Faculté des Sciences-Meknès
- Pr. Mohammed El Hassouni.....PES, Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès

Stage réalisé au Laboratoire de Biotechnologie des Microorganismes  
Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès



---

## Résumé

Les bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* notamment : *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) et *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) provoquent des dégâts de grande importance économique à la culture de pomme de terre. Ces dégâts sont dus à la capacité des *Erwinias* à sécréter des enzymes pectinolytiques. Dans ce travail nous avons essayé de construire une collection des bactéries *Erwinia* à partir de trois régions du Maroc (Guigo, Meknès et Moulay Bouselham), afin de pouvoir étudier la diversité génétique des bactéries de ce genre d'une part, et de chercher des antagonistes capables d'inhiber leur croissance d'autre part, des antagonistes qui peuvent être utilisés dans la lutte contre ces bactéries phytopathogènes et particulièrement contre *Erwinia chrysanthemi* pour remédier aux grands problèmes liés à l'utilisation des produits phytosanitaires de nature chimique.

Les résultats ont mis en évidence la rareté remarquable de ces bactéries prouvant que la pourriture molle et la jambe noire ne sont plus les deux maladies envers lesquelles il faut déclencher l'alarme. Le test d'antagonisme a permis d'identifier deux bactéries du genre *Bacillus* douées d'activité antimicrobienne contre *Erwinia chrysanthemi* souche 3739 Pin14 ce résultat qui est en parfaite concordance avec ceux cités dans les différentes références bibliographiques montrant que le genre *Bacillus* a une valeur considérable dans le domaine de la lutte biologique.

**Mots clés :** *Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia carotovora*, *Pectobacterium carotovorum*, pectinolytique, *Bacillus*, pourriture molle, jambe noire, antagonisme.



## Résumé

Les bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* notamment : *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) et *Erwinia carotovora* (*pectobacterium carotovorum*) provoquent des dégâts de grande importance économique à la culture de pomme de terre. Ces dégâts sont dus à la capacité des *Erwinias* à sécréter des enzymes pectinolytiques. Dans ce travail nous avons essayé de construire une collection des bactéries *Erwinia* à partir de trois régions du Maroc (Guigo, Meknès et Moulay Bouselham), afin de pouvoir étudier la diversité génétique des bactéries de ce genre d'une part, et de chercher des antagonistes capables d'inhiber leur croissance d'autre part, des antagonistes qui peuvent être utilisés dans la lutte contre ces bactéries phytopathogènes et particulièrement contre *Erwinia chrysanthemi* pour remédier aux grands problèmes liés à l'utilisation des produits phytosanitaires de nature chimique.

Les résultats ont mis en évidence la rareté remarquable de ces bactéries prouvant que la pourriture molle et la jambe noire ne sont plus les deux maladies envers lesquelles il faut déclencher l'alarme. Le test d'antagonisme a permis d'identifier deux bactéries du genre *Bacillus* douées d'activité antimicrobienne contre *Erwinia chrysanthemi* souche 3739 Pin14 ce résultat qui est en parfaite concordance avec ceux cités dans les différentes références bibliographiques montrant que le genre *Bacillus* a une valeur considérable dans le domaine de la lutte biologique.

**Mots clés :** *Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia carotovora*, *pectobacterium carotovorum*, pectinolytique, *bacillus*, pourriture molle, jambe noire, antagonisme.





## Contenu

Introduction .....	7
Revue bibliographique.....	9
I- Histoire, origine et maladies de la pomme de terre .....	10
1- Rappel botanique .....	10
2- Historique de la pomme de terre .....	10
2-1- Origine de la pomme de terre.....	10
2-2- Refus de cette nouvelle culture .....	11
2-3- Introduction de la pomme terre en Afrique.....	11
3- Principales maladies bactériennes de la pomme de terre .....	11
3-1- Bactériose vasculaire.....	11
3-2- Pourriture annulaire.....	12
3-3- Galle commune .....	13
3-4- La jambe noire (sur tige) .....	13
3-5- La pourriture molle (Sur tubercules).....	14
II- Généralités sur des <i>Erwinia</i> .....	15
1- <i>Erwinia chrysanthemi</i> ( <i>Dickeya dadantii</i> ).....	15
2- Pathogénicité d' <i>Erwinia chrysanthemi</i> .....	16
2-1- Structure de la paroi végétale .....	16
2-2- Aspects généraux de la pathogénie .....	17
2-3- Mécanisme de la pathogénie .....	19
2-4- Les enzymes dégradatives.....	20
2-4-1- Les Pectinases (enzymes pectinolytiques).....	20
2-4-2- Les Cellulases (enzymes cellulolytiques).....	21
2-4-3- Les Protéases.....	21
2-5- Gènes <i>pel</i> responsables de la macération des tubercules de pomme de terre .....	21
2-6- Autres facteurs de pathogénicité .....	22
2-6-1- Les Exopolysaccharides et les Lipopolysaccharides .....	22
2-6-2- Le système d'assimilation du fer .....	22
2-6-3- Le gène <i>msrA</i> (méthionine sulfoxyde réductase) et <i>sodA</i> ( superoxyde dismutase) .....	23
2-6-4- L'indigoidine.....	23
2-6-5- La mobilité.....	24
III-La lutte contre <i>Erwinia chrysanthemi</i> .....	24
1- La lutte chimique .....	24
2- La lutte biologique.....	25
2-1- Contrôle par des pratiques sanitaires et culturales .....	25
2-2- Antagonisme contre <i>Erwinia chrysanthemi</i> .....	26
2-3- Utilisation des bactériophages dans la lutte biologique .....	26
Matériel et Méthodes .....	28
I- Site de prélèvement et Échantillonnage.....	29



I-1- Sites de prélèvement.....	29
I-2- Échantillonnage .....	29
II- isolement et identification des isolats.....	29
II-1- Isolement des bactéries sur le milieu CVP.....	29
II-2- Isolement sur milieux (spécifiques) .....	29
II-3- Conservation des isolats dans le glycérol.....	30
II-4- Révélation de l'activité pectinase.....	30
II-5- Révélation de l'activité CMCCase.....	30
II-6- Test de production de l'indigoidine .....	31
II-7- Identification des <i>Erwinia pectiolytiques</i> par la technique de PCR.....	31
II-8- Séquençage du produit de PCR.....	33
II-9- Analyse bioinformatique des séquences .....	33
II-10- Détection d' <i>Erwinia chrysanthemi</i> par des amorces spécifiques.....	34
II-11- Test de pathogénicité sur pomme de terre.....	34
III- Recherches de bactéries antagonistes contre <i>Erwinia chrysanthemi</i> .....	35
III-1- Mise en évidence de la substance bioactive dans un milieu solide.....	35
III-1-1- Méthode de la surcouche .....	35
III-1-2- Méthode des stries.....	36
III-2- Production de la substance bioactive dans un milieu liquide .....	37
III-2-1- Test de l'activité antimicrobienne avec la méthode des disques imbibés.....	37
III-2-1-a- avec le surnageant .....	37
III-2-1-b- avec le concentré du surnageant .....	38
III-2-2- Test de l'activité antibactérienne avec la méthode des puits dans la gélose.....	39
III-2-2-a- Préparation des boîtes .....	39
III-3- Extraction de la substance bioactive .....	39
III-4- Test d'antagonisme sur tranche de pomme de terre.....	40
I- Isolement et identification des <i>Erwinia pectinolytiques</i> .....	42
I-1- Isolement des bactéries sur milieu CVP.....	42
I-1-1- Purification des isolats sur un milieu LB.....	42
I-1-2- Mise en évidence de l'activité pectinase .....	43
I-1-3- Mise en évidence de l'activité CMCCase .....	44
I-2- Isolement sur milieu (minimum) .....	46
II- Test de production d'indigoidine.....	47
III- Test de pathogénicité sur tranches de pomme de terre .....	49
IV- Détection et identification par PCR .....	50
IV-1- Détection par PCR de la pectate lyase .....	50
IV-2- PCR de l'ADNr 16S .....	50
IV-3- PCR du gène <i>msrA</i> .....	52
II- Recherche des bactéries antagonistes contre <i>Erwinia chrysanthemi</i> .....	53
II-1- Méthode de la surcouche.....	54
II-2- Méthode des stries.....	54
III- Production de la substance bioactive dans un milieu liquide.....	55
III-1- Méthode des disques imbibés .....	55
III-2- Méthode des puits dans la gélose.....	56



---

III-3- Test de l'activité antimicrobienne avec l'extrait du surnageant dans l'acétate d'éthyle .....	57
IV- Test d'antagonisme sur tranches de pomme de terre .....	58
IV-1-Test de pathogénicité de l'isolat antagoniste L80.....	58
IV-2- Test d'antagonisme sur tranches de pomme de terre.....	59
V- Identification de l'isolat antagoniste (L80) par PCR.....	61
Conclusion.....	65
Références Bibliographiques .....	66

## Introduction

Les bactéries du genre *Erwinia* (surtout *Erwinia chrysanthemi* et *Erwinia carotovora*) peuvent être responsables de plusieurs maladies de la pomme de terre, comme des pourritures de tiges appelées «jambes noires» et des pourritures de tubercules appelées «pourritures molles». Les symptômes de jambe noire varient d'une pourriture humide à sèche des tiges selon les conditions climatiques, les tubercules peuvent être atteints de pourritures molles au champ et en conservation (Helias, 2008). Cette pourriture molle est la plus importante maladie d'origine bactérienne de la pomme de terre à l'échelle mondiale, et les pertes économiques qui lui sont reliées sont très importantes (De Boer, 1994; Sharga et Lyon, 1998). Pourtant, ces pertes sont très difficiles à estimer, de l'aveu même de l'OEPP (organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes), parce que les symptômes due à la sécrétion extracellulaire d'enzymes dégradatives ; pectinases et cellulases, ne sont pas spécifiques à *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*), d'autres bactéries pectinolytiques comme certaines souches d'*Erwinia* provoquent des symptômes similaires. De récents travaux de taxonomie ont abouti à un remaniement de la nomenclature des pathogènes responsables de ces symptômes, qui appartiennent à deux genres : *Pectobacterium* (anciennement *Erwinia carotovora*) et *Dickeya* (anciennement *Erwinia chrysanthemi*). Ce remaniement de la classification n'a pas résolu le problème de la reconnaissance des bactéries in planta (Helias 2008).

Au Maroc, les études entreprises sur la pourriture molle des végétaux causée par les *Erwinia* pectinolytiques ont porté sur la recherche de ces bactéries dans la pomme de terre (Chouibani, 1997). Très récemment, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* et *Erwinia chrysanthemi* ont été détectées en association avec une pourriture de la betterave à sucre dans la plaine du Gharb au Maroc (Snaiki et al., 2005).



— Parmi les méthodes de lutte contre la maladie causée par les *Erwinia* pectinolytiques, la lutte chimique est la plus utilisée, mais, l'utilisation de ces produits chimiques, quoiqu'elle donne de bons résultats, est limitée à cause de la résistance que développe les bactéries au fur et à mesure des applications (Vidaver, 2002). En plus de ces raisons, il existe d'autres qui sont liées aux dangers potentiels de ces composés pour la santé humaine, l'environnement et à leurs coûts élevés (Thot et *al.*, 2003b). La lutte par utilisation de micro-organismes est une alternative très prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante. L'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action et aussi leur persistance dans l'environnement rend leur utilisation très attractive.

C'est dans ce sens que se situe l'objectif de ce travail qui consiste en la recherche et l'isolement des bactéries douées d'un pouvoir antagoniste contre les *Erwinia* pectinolytiques et particulièrement contre *Erwinia chrysanthemi* souche 3937 pin14. Dans le cas échéant, la mise en évidence et la caractérisation de la ou les substance(s) active(s) secrétée(s) par ces antagonistes seront entrepris. Également, ce travail consiste à la recherche et l'isolement des *Erwinia* pectinolytiques (*Erwinia chrysanthemi* et *Erwinia carotovora*) à partir de champs de pomme de terre de trois régions du Maroc (Meknès, Guigo (région Boulemane) et Moulay Bouselham) afin de construire une collection des *Erwinia* pectinolytiques qui sera sujette à la recherche des antagonistes contre la croissance des isolats marocains et déterminer la biodiversité génétique intraspécifique et interspécifiques des *Erwinia* pectinolytiques, travail qui sera réalisé en France par un membre de l'équipe de Meknès.

En effet, ce présent travail rentre dans le cadre d'un projet PRAD (Programme de recherche agronomique pour le développement (2014-2017) dont le coordonnateur est le Pr. Moumni (FS-Meknès). C'est un projet de recherche impliquant l'équipe de Biotechnologie des microorganismes (Laboratoire de Biotechnologie, FSDM-Fès), l'équipe Génomique cellulaire et Techniques moléculaires d'investigations (FS-Meknès) et l'Institut des Sciences du Végétal, CNRS, Paris, France.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah  
Faculté des Sciences et Techniques  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



---

# Revue bibliographique

---

**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES**

✉ B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14



---

## I- Histoire, origine et maladies de la pomme de terre

### 1- Rappel botanique

On pensait autrefois que la pomme de terre était issue d'une plante sauvage unique, l'espèce *Solanum tuberosum*. Dès 1929, les botanistes russes Juzepczuk et Bukasov avaient montré que cette origine était plus complexe, et que l'on retrouvait parmi les ancêtres des espèces de pomme de terre cultivées, des plantes sauvages différentes (Rousselle et *al.*, 1996).

Le genre *Solanum* est très vaste (environ 1000 espèces) largement distribué dans le monde. Il y a cependant une forte concentration d'espèces en Amérique du Sud et Amérique Centrale. Les solanacées tubéreuses ne représentent qu'un petit dixième du genre *Solanum*. On en connaît environ 200 espèces réparties en 21 séries taxinomiques. On les trouve dans les montagnes rocheuses au Sud du Chili, surtout en altitude. Mais certaines espèces existent dans les plaines d'Argentine, d'Uruguay et du Sud Brésil ou sur le littoral du Pacifique Péruvien et Chilien (Rousselle et *al.*, 1996).

### 2- Historique de la pomme de terre

#### 2-1- Origine de la pomme de terre

la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) a été cultivé et domestiqué pour la première fois par les Amérindiens qui vivaient il y a plus de 10.000 ans (époque néolithique : fin de la dernière période glaciaire) dans la zone côtière de l'actuel Pérou et au sud-ouest de l'Amérique Latine. L'introduction de la pomme de terre en Europe date du XV<sup>ème</sup> siècle, grâce à l'arrivée des Conquistadors lors de la colonisation espagnole des Amériques, en ce moment l'alimentation de l'empire Inca et des populations vivant dans les régions voisines était basée sur la pomme de terre et le maïs, ainsi les tubercules ont été emporté par ces Conquistadores vers les côtes de l'Europe à bord des galions, et les explorateurs du Nouveau Monde les débarqueront dans les port d'Espagne puis ceux de l'Angleterre (Ernest., 2010).

Les famines et les guerres ont contribué à l'accélération de sa conquête du territoire européen. Sa diversité allélique naturelle lui a permis d'adapter rapidement son horloge



~~circadienne aux saisons et aux climats des latitudes du vieux continent (Kloosterman et al., 2013).~~

## 2-2- Refus de cette nouvelle culture

Toutefois cette nouvelle production n'a pas été accueillie chaleureusement au début, son refus a été lié aux superstitions religieuses du moyen âge encore dominantes. Le mal (l'enfer) est sous terre. Ces tubercules qui veulent entrer en compétition avec le blé, plante sacrée productrice du pain et de l'hostie sont donc des objets sataniques. Parce qu'elle est une production souterraine, la pomme de terre est un végétal dont le nom a une connotation diabolique. Elle est censée diffuser la lèpre, voir la peste. Du fait de son appartenance aux solanacées productrices de toxines, elle est vite assimilée aux autres plantes de cette famille (mandragore, datura, belladone), toutes herbes de sorcière. Pendant un certain temps, la pomme de terre est d'ailleurs appelée morelle tubéreuse, par assimilation aux solanacées indigènes (morelle noire = *S. nigrum* et douce-amère = *S. dulcamara*). En plus de ces mythes d'autres raisons (biologiques et socio-économiques) semblent avoir joué un rôle dans le ralentissement de la propagation de cette nouvelle culture (Rousselle et al., 1996).

## 2-3- Introduction de la pomme terre en Afrique

Son introduction en Afrique est due à l'expansion des empires coloniaux européens . Elle y était considérée par les colons comme un aliment de haute valeur et ils étaient ainsi les seuls à déguster. Avec la décolonisation elle est devenue un aliment de base ou d'accompagnement largement répandu dans la plupart des pays africaines (Kenneth et al., 2000).

## 3- Principales maladies bactériennes de la pomme de terre

### 3-1- Bactériose vasculaire

La bactériose vasculaire est une maladie grave de la pomme de terre dans les régions chaudes souvent responsable de la baisse du rendement. L'agent causal est *Pseudomonas solanacearum*. Les premiers signes de flétrissement peuvent être d'abord vu sur une seule partie de la feuille ou sur une ou plusieurs tiges d'une plantes, peu de temps après toute la plante flétrit puis meurt (**Figure 1**). Le système vasculaire devient sombre et sur une coupe transversale la plante laisse apparaître un suintement bactérien visqueux variant de gris au





brun. Une tige coupée puis plongée dans de l'eau claire laissant échapper un liquide bactérien

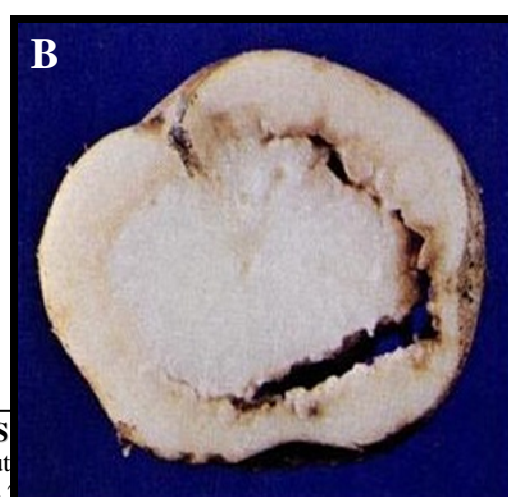


laiteux confirme l'infection (Rousselle et *al.*, 1996).

**Figure 1** : Symptômes de flétrissement sur la plante de pomme de terre induit par la bactériose vasculaire (Rousselle et *al.*, 1996)

### 3-2- Pourriture annulaire

C'est une Maladie des régions tempérées, elle apparaît occasionnellement dans les pays tropicaux, elle est due à la bactérie *Corynebacterium sepedonicum*. La plante flétrit généralement à un stade avancé de la culture, ce flétrissement est souvent accompagné de chlorose d'une ou de plusieurs tiges pouvant être suivi de la mort de la plante (**Figure 2A**). Des sections faites dans la tige ou les tubercules, montrent un système vasculaire brun qui exsude un suintement blanc laiteux de bactéries, L'anneau vasculaire du tubercule se détériore en laissant un vide (**Figure 2B**) d'où le nom de "Ring Rot" de cette maladie en anglais, par la suite des crevasses peuvent se développer à la surface des tubercules, ainsi qu'une coloration rouge des lenticelles (D'hondt-Defranco, 1984).







**Figure 2:** Symptômes de la pourriture annulaire, sur feuilles (A) et sur tubercule de la pomme de terre (B).

### 3-3- Galle commune

La galle commune est l'une des maladies du tubercule les plus répandues dans toutes les régions du monde. L'agent causal est *Streptomyces scabies*. Les symptômes peuvent être proéminents, superficiels ou réticulaire ou encore en creux. Ces lésions sont de formes et de dimensions variables et peuvent se rejoindre si bien que toute la surface du tubercule est affectée (Rousselle et *al.*, 1996) (**Figure 3**).



**Figure 3 :** Symptôme de la galle commune sur tubercule de pomme de terre.  
(Source : <http://bacteries-champignons.blogspot.com/2011/11/la-galle-commune-de-la-pomme-de-terre.html>).

### 3-4- La jambe noire (sur tige)

Les symptômes causés par les *Pectobacterium spp.* et *Dickeya spp.*, deux espèces pectinolytiques s'expriment en végétation et/ou en conservation. L'apparition et la nature des symptômes dépendent essentiellement des conditions environnementales (température,



humidité...etc.). 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 (Pérombelon *et al.*, 1988), peuvent s'observer rapidement après la plantation. Le symptôme le plus typique est celui de la jambe noire (Black leg), variant d'une pourriture humide brun foncé à noire à la base des tiges à des nécroses plus ou moins sèches (**Figure 4A**). 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 (Pérombelon et Kelman, 1987). Alors que des symptômes de macération et de pourritures des tubercules ont tendance à se produire en conditions humides (**Figure 4B**).

La jambe noire peut atteindre toutes les tiges d'une plante ou n'être localisée que sur quelques tiges, voire une seule. La pourriture aérienne correspond à toute lésion de la tige (Pérombelon et Kelman, 1987) débutant au-dessus du niveau du sol à la faveur d'une blessure ou suite à son contact avec le sol (fin de végétation). Les symptômes, similaires à ceux de la jambe noire, sont liés à des contaminations des tiges par les eaux de pluie et d'irrigation, le sol, les insectes ou les opérations culturales.

Hormis les conditions climatiques, le cultivar et la présence simultanée de plusieurs agents pathogènes influent sur le type de symptôme exprimé (Pérombelon et Kelman, 1987). Il faut par ailleurs prendre garde à ne pas confondre les flétrissements et enroulement-jaunissements liés à la jambe noire avec ceux pouvant apparaître en cas desclérotinose, de rhizoctone ou de flétrissement bactérien, causés respectivement par *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* et *Ralstonia solanacearum* (Hélias, 2008).

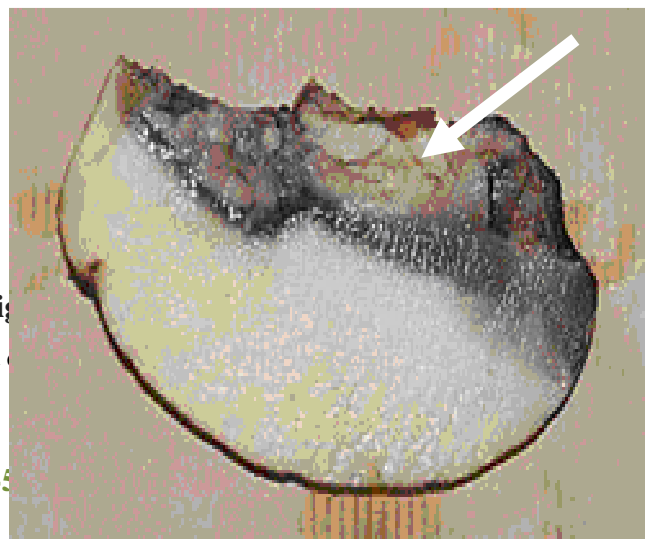


Fig. 4. A) et B) Pourritures de la tige de la tomate. A) Jambe noire. B) Pourriture aérienne.



— Les tubercules peuvent être également atteints de symptômes de pourriture molle (Soft rot) qui se développent en culture ou en conservation (**Figure 4B**). Au stockage, la pourriture molle de quelques tubercules peut entraîner la contamination rapide des tubercules avoisinants. Des bactéries pectinolytiques variées (*Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*... etc.) peuvent être les agents responsables de la pourriture des tubercules en conservation, particulièrement lorsque les températures sont élevées (Pérombelon et Kelman, 1987), 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. (De Boer, 1994).

## II- Généralités sur des *Erwinia*

Le genre *Erwinia*, a été nommé en 1920 en honneur du phytopathologiste Erwin Fank Smith (Włodarczyk, 2010). Ce genre regroupe les bactéries de la famille des Entérobacteriaceae, à Gram négatif, anaérobies facultatives, mobiles par des flagelles dont le nombre et la position varient selon les espèces. On s'intéressera ici aux deux espèces *E. chrysanthemi* et *E. carotovora*.

### 1- *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*)

*Erwinia chrysanthemi* est une  $\alpha$ -protéobactérie, de la famille des Entérobacteriaceae. C'est une bactérie à Gram négatif, en forme de bacille, anaérobie facultative et mobile par des flagelles pérित्रiches. En 2005, en se basant sur les caractères phénotypiques, sérologie et par analyse de séquences ARNr 16S et la technique d'hybridation ADN-ADN, certaines souches d'*E. chrysanthemi* ainsi que l'espèce *Brenneria paradisiaca* ont été placées dans un nouveau genre : *Dickeya*. Cette dernière a été réparties en 6 nouvelles espèces (Samson et al., 2005) : *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiaca*, *D. zae* et *D. dadantii*. La souche d'*E. chrysanthemi* 3937 fait désormais partie de l'espèce *Dickeya dadantii*. Cependant, la dénomination *E. chrysanthemi* est encore utilisée, (Samson et al., 2005).

### 2- *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*)



— L'espèce *Pectobacterium carotovorum* (*P. c.*) est une bactérie qui fait partie de la famille des Entérobacteriaceae, de forme bâtonnet, généralement disposée par deux, à Gram négatif, anaérobie facultative, non sporulante et mobile (Snaiki et *al.*, 2006).

Cette bactérie qui est définie par Gardan et ses collaborateurs en 2003, comprend deux sous-espèces : *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* et *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*.

- *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* appelée aussi *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, est distribuée dans une aire géographique étendue, aussi bien dans les zones tempérées que tropicales et sur une très large gamme d'hôtes (Pérombelon et Kelman, 1987).
- *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* appelé aussi *Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*.

Sur la pomme de terre, la bactérie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* s'exprime préférentiellement à des températures plus élevées que *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, allant de 20 à 30 °C (Smith et Bartz, 1990). Le symptôme de la jambe noire, connu comme étant caractéristique de *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* en conditions fraîches, peut également être provoqué par *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* lorsque les températures sont élevées (30-35°C). Identifié aux États-Unis dans les années 1970, (Stanghellini et Meneley, 1975), *P. c.* subsp. *carotovorum* a été identifiée plus récemment à partir de tels symptômes en Europe (Hélias et *al.*, 2006).

## 2- Pathogénicité d'*Erwinia chrysanthemi*

### 2-1- Structure de la paroi végétale

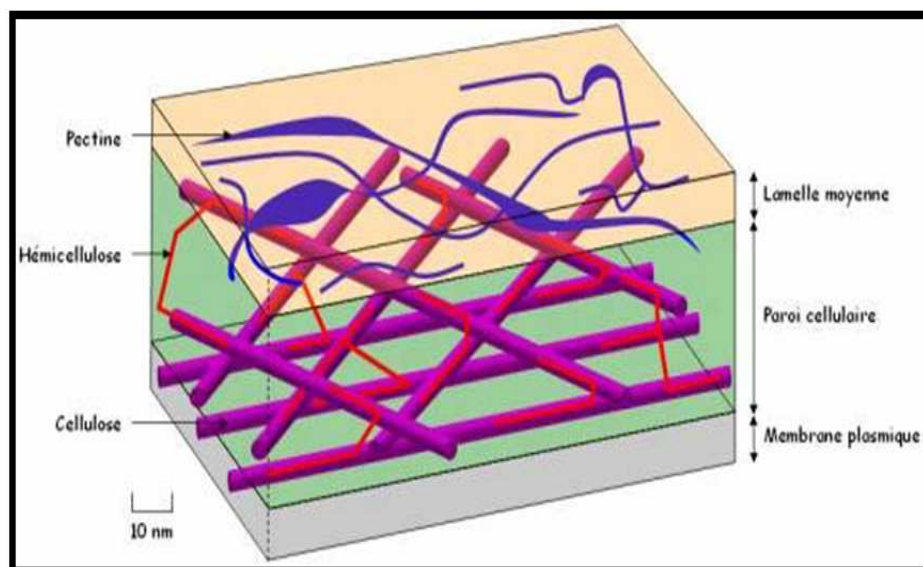
La paroi végétale à une structure hétérogène, elle est composée de polysaccharides, protéines, composés aromatiques et aliphatiques, qui confèrent une rigidité aux tissus végétaux. Il existe trois classes de polysaccharides : la cellulose, l'hémicellulose et la pectine. La pectine contient les homogalacturonanes, rhamnogalacturonanes I et II, qui sont majoritaires et les apigalacturonanes et xylogalacturonanes (Caffal et Mohnen, 2009).



L'homogalacturonane est un polymère linéaire d' $\alpha$ -(1,4)-D-acides D-galacturoniques qui peut représenter 60% des pectines de la paroi végétale. L'homogalacturonane est généralement estérifié et lié de manière covalente aux rhamnogalacturonanes I et II, qui s'intercalent entre les chaînes d'homogalacturonane (**Figure 5**) (Willats et *al.*, 2001). Aucune interaction n'a été détectée entre les rhamnogalacturonanes I et II.

La cellulose est un polymère de  $\beta$ -(1,4)-D-glucose formant des chaînes parallèles. Elle se lie avec une forte affinité avec l'hémicellulose.

L'hémicellulose est un hétéropolysaccharide, composé majoritairement de xylose mais aussi de glucose, galactose, mannose, arabinose, rhamnose, acides galacturonique et mannuronique. Le modèle actuel de la structure de la paroi végétale est un réseau de pectine et un réseau de cellulose, maintenus ensemble par les hémicelluloses (Caffal et Mohnen, 2009). L'homogalacturonane fixe des ions calcium et le rhamnogalacturonane fixe de l'acide borique, qui contribuent au maintien de la structure.



**Figure 5** : Représentation schématique des réseaux de pectine, de cellulose et d'hémicellulose de la paroi végétale (Willats et *al.*, 2001).

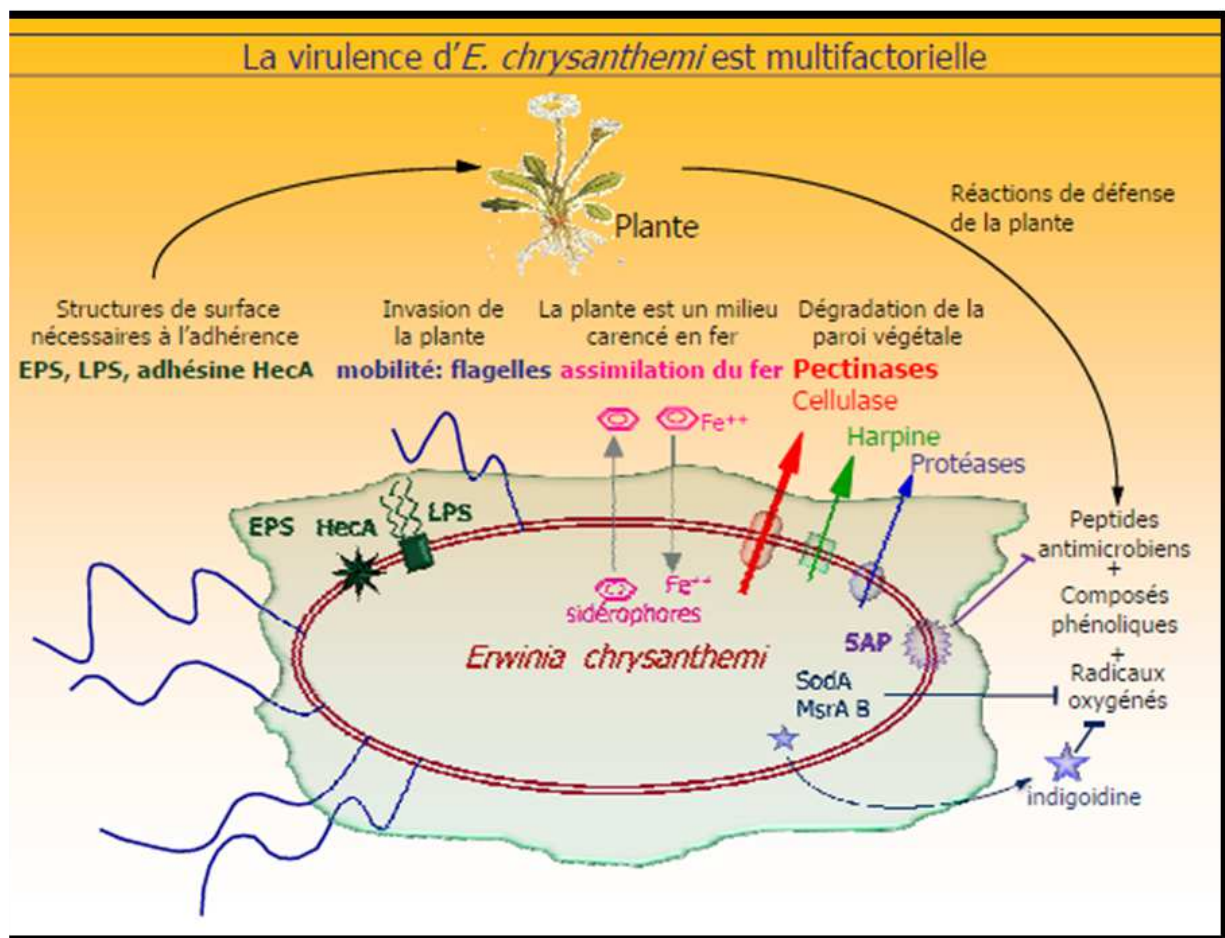
## 2-2- Aspects généraux de la pathogénie





— *Erwinia chrysanthemi* est une bactérie phytopathogène à large spectre d'hôtes. En effet, elle peut infecter de multiples plantes, mono ou dicotylédones comme la pomme de terre, l'endive, la pastèque, le concombre, le riz, le maïs ou le chrysanthème. C'est une bactérie pectinolytique provoquant la macération des tissus végétaux par dégradation de la pectine (Rapport OEPP, 2010). Les bactéries se logent dans les blessures ou les lenticelles de la plante hôte où elles peuvent rester en latence. Elles peuvent également survivre dans le sol pour infecter la culture de la compagne suivante.

Une fois la bactérie est installée dans la plante hôte, elle met en jeu une panoplie de moyens et de mécanismes appelés déterminants du pouvoir pathogène : pectinases, cellulases et protéases et des facteurs secondaires, qui provoquent la rupture de la structure de la paroi cellulaire et libèrent les éléments nutritifs nécessaires pour la croissance bactérienne (**Figure 6**).

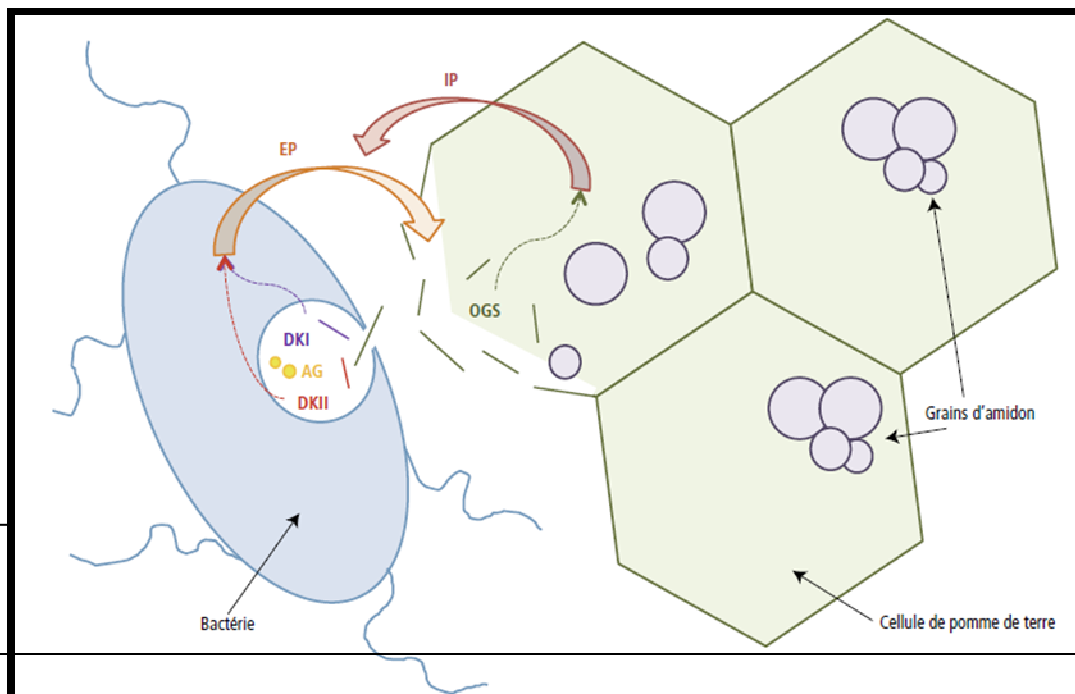




**Figure 6** : Déterminants du pouvoir pathogène d'*Erwinia chrysanthemi*.  
(Lautier., 2007)

### 2-3- Mécanisme de la pathogénie

Premièrement, la bactérie synthétise des enzymes pectinolytiques (EP), principalement des pectates lyases et des polygalacturonases (McMillan et al., 1993), qui vont dépolymériser la pectine des parois cellulaires des tissus de la pomme de terre. Les oligogalacturonates (OGS) résultant de cette dépolymérisation sont absorbés par la bactérie et dégradés en 5-keto-4-deoxyuronate (DKI), 2,5-diketo-3-deoxy-gluconate (DKII) ainsi qu'en acide galacturonique (AG) par l'action des oligogalacturonides lyases (**Figure 7**). Les DKI, DKII ainsi que d'autres composés résultant de la dégradation des parois cellulaires vont entraîner une réaction en chaîne aboutissant à une augmentation de la production d'EP et ainsi, accroître la virulence de la bactérie (Yang et al., 1992). Les OGS résultant de la dégradation de la pectine par les EP vont induire des mécanismes de résistance chez la plante contre ces attaques tels que la production d'inhibiteurs de protéases (IP) et autres phytoalexines (Weber et al., 1996).





**Figure 7** : Représentation schématique des mécanismes mis en œuvre lors de l'attaque des tissus de la pomme de terre par *Dickeya* spp.

## 2-4- Les enzymes dégradatives

### 2-4-1- Les Pectinases (enzymes pectinolytiques)

La dé-estérification et la dépolymérisation intégrale de la pectine sont amorcées par des enzymes extracellulaires. Les produits de dégradation, tri- ou digalacturonates sont acheminés vers le cytoplasme où ils sont entièrement dégradés en pyruvate et 3-phosphoglyceraldéhyde qui rentreront dans le cycle de l'acide citrique. L'ensemble de ces processus requiert deux grands groupes d'enzymes : **les pectines estérases** et **les dépolymérases** (Mathilde Lallemand, 2010).

✚ **Les pectines estérases** permettent la dé-estérification de la pectine en hydrolysant les groupements méthyles ce qui donne des polygalacturonates (PGA) et du méthanol ou des groupements acétyles (acide acétique). On distingue donc les **pectines méthylestérases** et les **pectines acétylestérases**. Il a été montré que la croissance d'*Erwinia chrysanthemi* est fortement ralentie lorsque une pectine très fortement estérifiée est la seule source de carbone (Shevchik *et al.*, 1996). La dé-estérification semble donc être une condition préalable à la dégradation complète de la pectine.

✚ **Les dépolymérases** regroupent deux types d'enzymes :

- **Les pectates lyases** : clivent par  $\beta$ -élimination les liaisons glycosidiques des polymères pectiques, généralement des polygalacturonates et génèrent des oligogalacturonates planaires avec une double liaison entre C-4 et C-5 à l'extrémité non réductrice.
- **Les pectines lyases** clivent par  $\beta$ -élimination des polymères hautement ou moyennement méthylés.
- **Les polygalacturonases** : clivent les liaisons glycosidiques des polygalacturonates par hydrolyse et génèrent également des oligogalacturonates (Tardy *et al.*, 1997).





#### 2-4-2- Les Cellulases (enzymes cellulolytiques)

---

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose produit principalement du glucose. Elle dépend fortement des caractéristiques structurales de la cellulose (Sandhya *et al.*, 1984) ainsi que de la composition et la nature du substrat.

La cellulase est un complexe enzymatique produit par un grand nombre de microorganismes, surtout les bactéries et les champignons (Bahkali, 1966). Elle comporte 3 types d'enzymes, elle appartient au groupe des hydrolases O-glycoside hydrolysant la liaison entre deux carbohydrates ou plus (Henrissat 1991 ; Henrissat et Bairoch 1996).

Les 3 types sont :

- ✚ L'endo- $\beta$  1,4-glucanase.
- ✚ L'exocellulase (cellobiohydrolase).
- ✚ La cellobiase ( $\beta$  -glucosidase).

#### 2-4-3- Les Protéases

Les Protéases fournissent les acides aminés nécessaires pour la biosynthèse des protéines microbiennes ou pour la dégradation des protéines de l'hôte liées à la résistance (Heilbronn et Lyon., 1990), elles peuvent à l'instar des pectinases et cellulases jouer un rôle dans la pathogénèse de cette bactérie (*Erwinia chrysanthemi*) (Marits *et al.*, 1999).

#### 2-5- Gènes *pel* responsables de la macération des tubercules de pomme de terre

La souche *E. chrysanthemi* 3937 produit cinq isoenzymes de pectate lyase dits majeurs car ayant une forte activité *in vitro*, elles sont codées par les gènes *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD* et *pelE*. Ces gènes sont organisés en deux clusters, *pelADE* et *pelBC*. Chaque gène *pel* est transcrit sous le contrôle de son propre promoteur. Les protéines PelA, PelD et PelE sont homologues, de même que PelB et PelC, ce qui suggère que des duplications de gènes récentes sont à l'origine de ces isoenzymes (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Ces pectate lyases appartiennent à la famille 1 des polysaccharides lyases (PSL). Aucun gène *pel* n'est indispensable à la virulence (Beaulieu *et al.*, 1993). De plus, la délétion des cinq gènes *pel* majeurs n'élimine pas totalement la capacité de macération (Beaulieu *et al.*, 1993) suggérant qu'*E. chrysanthemi* produit d'autres pectate lyases capables de dégrader les tissus végétaux,



en plus de *PelA*, *PelB*, *PelC*, *PelD* et *PelE*. Trois de ces gènes, *pelL*, *pelH* et *pelZ* ont été identifiés, ils codent pour des protéines de différentes familles : PSL9, PSL3 et PSL1 respectivement (Lojkowska *et al.*, 1995 ; Pissavin *et al.*, 1997).

## 2-6- Autres facteurs de pathogénicité

En plus des pectinases, cellulases et protéases *Erwinia chrysanthemi* dispose aussi d'autres facteurs de pathogénicité dits secondaires :

### 2--6-1- Les Exopolysaccharides et les Lipopolysaccharides

Les deux glycoconjugués majeurs de la surface bactérienne sont les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS). Le LPS est constitué d'un lipide, d'un noyau oligosaccharidique et de chaînes hétérogènes polysaccharidiques de haut poids moléculaire (l'antigène O). Les mutants affectés dans le noyau du LPS sont complètement avirulents (Schoonejans *et al.*, 1987). Les LPS pourraient être impliqués dans la fixation des bactéries aux parois végétales et dans l'induction des réactions de défense de la plante.

### 2-6-2- Le système d'assimilation du fer

Le fer est un élément essentiel pour les microorganismes, la concurrence pour le fer entre le microbe et l'hôte est un mécanisme qui peut déterminer le résultat de l'invasion de l'hôte par la bactérien (Enard *et al.*, 1988). Les végétaux stockent le fer à l'intérieur des cellules en l'associant avec des molécules de phytoferritine accumulées dans les chloroplastes. *Erwinia chrysanthemi* est capable d'entrer en concurrence avec les plantes pour le fer en sécrétant des sidérophores et/ou en utilisant des molécules chélateurs du fer.

Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire ayant une très forte affinité pour le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ). En condition de carence en fer, *E. chrysanthemi* 3937 produit deux sidérophores la chrysobactine de type catéchol et l'achromobactine de pouvoir chélateur plus faible que la chrysobactine (Masclaux et Expert, 1995). Le mutant *Ech* 3937 incapable de produire la chrysobactine est incapable de provoquer la réponse systémique lors de l'infection de *Saintpaulia* mais il provoque une macération localisée au site d'infection



(Enard et *al.*, 1988), Ce qui prouve que pour la progression de la maladie dans le végétal l'assimilation du fer par l'intermédiaire de la chrysobactine est indispensable.

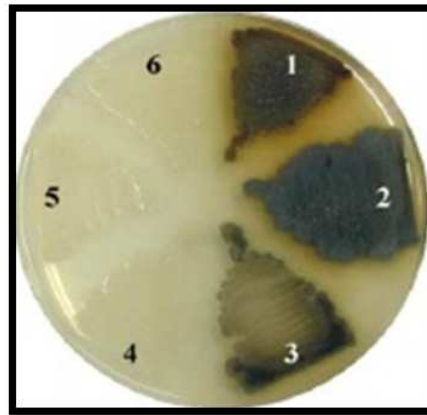
### 2-6-3- Le gène *msrA* (méthionine sulfoxyde réductase) et *sodA* ( superoxyde dismutase)

Des travaux de recherche ont mis en évidence le rôle du MsrA (méthionine sulfoxyde réductase, une enzyme de réparation des dommages au niveau des protéines bactériennes, et du SodA (manganèse-superoxyde dismutase dans la virulence d'*E. chrysanthemi* (El Hassouni et *al.*, 1999 ; Santos et *al.*, 2001),

Pour se défendre contre les bactéries phytopathogènes, les plantes recourent à une stratégie qui consiste à produire dans les cellules infectées des espèces réactives de l'oxygène (AOS) (anion superoxyde ( $O_2^-$ ), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou radical hydroxyle (OH $\cdot$ ). Cette production des AOS constitue un stress oxydatif qui peut endommager les protéines, les acides nucléiques et des membranes cellulaires de la bactérie. Les bactéries à leur tour ont développé un arsenal enzymatique inductible de détoxification et de réparation pour remédier aux dommages causés par les agents oxydants libérés par la cellule hôte. L'enzyme MsrA, impliquée dans la réparation des protéines oxydées est essentielle au pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi*. Les mutants *msrA* deviennent avirulents par rapport à la souche sauvage, la réparation des dommages oxydatifs permet aux pathogènes virulents de survivre dans l'environnement de l'hôte (El Hassouni et *al.*, 1999).

### 2-6-4- L'indigoidine

*E. chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) est la seule espèce du genre *Erwinia* qui est capable de produire un pigment bleu insoluble dans l'eau appelé : **Indigoidine (Figure 8)** (Starr et *al.*, 1966 ). En conséquence, la production de ce pigment dans un milieu appelé NGM (annexe I) peut être utilisée comme un trait chimiotaxonomique pour l'identification rapide d'*E. chrysanthemi* (Starr et *al.*, 1966., Reverchon et *al.*, 2002). Il a été montré que l'indigoidine est impliqué dans la pathogénicité d'*Erwinia chrysanthemi*, en effet, chez les mutants *indA* (incapable de produire l'indigoidine) l'agressivité est légèrement diminuée par rapport à la souche sauvage



**Figure 8 :** Milieu NGM montrant la production du pigment indigoidine.

Zones 1, 2 et 3 : 3 souches différentes d'*Erwinia chrysanthemi*.

Zones 4,5 et 6 : Autres espèces d'*Erwinia*.

### 2-6-5- La mobilité

La mobilité est un critère majeur du genre *Erwinia*, elle est aussi un facteur essentiel pour le pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi*. Des tests de pathogénicité menés par Hossain M.M. *et al.*, en 2005 ont montré que le mutant ( $\Delta$ *fliC*) qui ne dispose pas de flagelles est devenu d'une façon significative moins pathogène par rapport au type sauvage. Le même résultat a été obtenu avec le mutant ( $\Delta$ *motA*), qui dispose de flagelles mais dont le mouvement est arrêté.

## III-La lutte contre *Erwinia chrysanthemi*

### 1- La lutte chimique

On ne connaît pas de composés chimiques spécialement destinés à lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre. Toutefois, la maladie se développant facilement sur des tubercules pré-infectés par les champignons, l'utilisation de fongicides aide indirectement à contrôler cette maladie (De Boer, 1994). Expérimentalement, le traitement de tubercules avec le formaldéhyde et l'hypochlorite de sodium a permis de réduire la quantité d'inoculum bactérien sur ces derniers (De Boer, 1994). L'application post-récolte d'acétaldéhyde et de benzoate de sodium mélangés à la tourbe, pour enrober les tubercules pendant le transport a



également montré en conditions expérimentales une certaine efficacité dans la réduction de la sévérité de la pourriture molle (Wyatt et Lund, 1981).

La lutte chimique peut donner de bons résultats, mais le problème de résistance que peuvent développer ces bactéries demeure toujours un souci pour les agriculteurs (Vidaver, 2002).

## 2- La lutte biologique

Les mécanismes par lesquels les agents de la lutte biologique bactérien (contrôle microbiologique) peuvent prodiguer leur effet protecteur sont multiples et peuvent varier pour un microorganisme donné en fonction du pathosystème (couple hôte végétal/pathogène) sur lequel il est appliqué. Cependant, d'un point de vue globale, leur effet bénéfique qui conduit à un antagonisme se fonde sur certains phénomènes qui sont : l'antibiose, la compétition et la prédation ou parasitisme (Compant et *al.*, 2005).

Le pré-requis à toute efficacité biologique d'une souche donnée est son potentiel à coloniser efficacement le système racinaire et la couche environnante du sol appelée rhizosphère. Cela signifie s'imposer par rapport aux autres populations microbiennes et persister en utilisant les faibles ressources nutritionnelles disponibles dans le microenvironnement. Plusieurs propriétés intrinsèques contribuent au pouvoir colonisateur telles que la mobilité, la faible exigence nutritionnelle, et la vitesse de croissance (Van Den Broek et *al.*, 2003).

### 2-1- Contrôle par des pratiques sanitaires et culturales

Actuellement on a recours à un contrôle partiel de la pourriture molle par un ensemble de pratiques sanitaires et culturales comme l'utilisation de semences saines, la bonne disposition des résidus végétaux dans les champs et les entrepôts après la récolte et la manutention, la réduction de l'incidence des blessures attribuables aux opérations de récolte et de manutention, ainsi que la désinfection des entrepôts et des équipements de travail. (Yaganza, 2005)



## 2-2- Antagonisme contre *Erwinia chrysanthemi*

Plusieurs chercheurs ont utilisé avec succès des bactéries, des levures et des Streptomyces pour contrôler les maladies bactériennes des plantes (Alivizatos et Pantazis , 1992; Ozaktan et al., 1999 ). L'une des méthodes alternatives pour lutter contre *E. chrysanthemi* est l'utilisation des agents de contrôle biologiques (biocontrôle). Une étude qui a été menée pour la première fois en Turquie pour contrôler *E. chrysanthemi* sur les tomates a montré que l'effet inhibiteur des antagonistes ne donne pas de corrélation entre les expériences *in vivo* et *in vitro*. Par exemple il y a un isolat qui n'est pas efficace sur boîtes de Pétri (6%), tout en réduisant de manière significative le développement des symptômes sur des tranches de pommes de terre (100%), d'autres isolats sont efficaces contre les bactéries sur boîtes de Pétri alors qu'ils ne le sont pas sur des tranches de pommes de terre et les plants en serre. La corrélation négative entre les résultats *in vitro* et *in vivo* a été rapportée par plusieurs chercheurs (Tani et al., 1990 ; Bora et Ozaktan, 1998).

Tani et al. (1990) notent que l'antagonisme *in vitro* ne doit pas être utilisé comme le seul critère de sélection des agents de lutte biologique potentiels. Il est accepté que les essais sous serre ou au champ est la méthode la plus fiable pour tester les micro-organismes efficaces, même si elles ne donnent pas toujours des résultats corrélés (Aysan et al., 2003).

## 2-3- Utilisation des bactériophages dans la lutte biologique

L'utilisation des bactériophages comme agent de biocontrôle a beaucoup de caractéristiques désirables qui incluent leur inoffensivité vis-à-vis de l'environnement, leur spécificité pour un hôte donné et le fait qu'ils sont isolés à partir du même environnement que leur hôte. (Flaherty et al., 2000).

Des bactériophages spécifiques à *Erwinia carotovora* ont été isolés à partir des plantes malades et à partir de leurs rhizosphères (Eayr et al., 1995), des essais menées par Ravensdal et ses collaborateurs ont montré que des bactériophages spécifiques à *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* réduisaient le UFC de cette bactérie responsable entre autres de la pourriture molle de la pomme de terre jusqu'à 99%, et réduisaient les symptômes de la maladie sur des tubercules jusqu'à 50%, cette réduction est observée dans les milieux de



culture qui ne contiennent pas des chélateurs de fer comme le Fe-EDTA parce que ces derniers inhibent la réplication du matériel génétique virale (Romeo et *al.*, 2001).



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah  
Faculté des Sciences et Techniques  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



---

# Matériel et Méthodes

---

**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES**

✉ B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14





---

## I- Site de prélèvement et Échantillonnage

### I-1- Sites de prélèvement

Des campagnes d'échantillonnages ont été réalisées dans trois régions différentes connues par la culture de pomme de terre, la région de Guigou (Fès-Boulemane), la Région de Meknès et la région de Moulay Bouselham (Larache).

Les dates d'échantillonnage se présentent comme suit :

Guigou : 23/11/ 2013

Meknès : 18/12/2013 et 26/12/2013

Moulay Bouselham : 18/02/2014 et le 29/04/2014

Les coordonnées GPS des sites de prélèvement et de parcelles qui ont fait l'objet d'échantillonnage sont indiquées dans l'annexe III, IV et V.

### I-2- Échantillonnage

Plusieurs échantillons sont réalisés. L'échantillonnage est un prélèvement soit du Sol, Tige, feuilles ou de tubercules.

Dans le cas où on a des plantes présentant des symptômes de la pourriture molle au niveau de feuilles, tige ou tubercules, des échantillons de chaque partie de la plante sont prélevés.

## II- isolement et identification des isolats

### II-1- Isolement des bactéries sur le milieu CVP

Pour chaque échantillon, un morceau de tige ou tubercule ou un échantillon de sol est broyé dans 10 ml de PBS. Après agitation pendant 30 min (et centrifugation en cas de besoin), 100 µl de chaque échantillon sont étalés stérilement dans une boîte de pétri contenant le milieu CVP (annexe I), Après incubation pendant 48 à 72 heures, les colonies présentant des dépressions indiquant la dégradation de la pectine sont étalées, plusieurs fois, par épuisement sur un milieu LB solide afin d'obtenir des colonies pures

### II-2- Isolement sur milieux (spécifiques)

Dans le but de forcer l'isolement des *Erwinia* (sachant qu'elles sont pourvu d'activité cellulase et pectinase et qu'elles sont Gram<sup>-</sup>), des isolements ont été réalisés sur un milieu qui



contient la pectine comme seule source de carbone (le même milieu de révélation de l'activité pectinase mais dépourvu de glycérol) et les bactéries qui y ont poussé ont été repiquées sur un milieu qui contient le CMC comme seule source de carbone (le même milieu de révélation de l'activité pectinase ne contenant ni glycérol ni glucose). A noter que nous avons ajouté le crystal violet dans les milieux de culture afin d'inhiber la croissance des bactéries à Gram<sup>+</sup>. Ainsi les bactéries isolées sont pectinase<sup>+</sup> et cellulase<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>, ce qui augmente la chance d'isoler des *Erwinia* pectinolytiques.

### II-3- Conservation des isolats dans le glycérol

Les isolats sont conservés dans du glycérol 20% et conservés à -20°C.

### II-4- Révélation de l'activité pectinase

Afin de mettre en évidence l'activité pectinase, les isolats sont ensemencés sur un milieu à base de pectine (annexe I), après incubation à 28°C pendant (48 à 72h), la révélation est faite par l'écoulement d'une solution d'acétate de cuivre à 7,5% sur la boîte, Après 10 à 20 min les boîtes sont lavées plusieurs fois avec l'eau distillée (Tamburini et al., 2003). Les pectinases sécrétés par les bactéries testées dépolymérisent le substrat. Le colorant se fixe sélectivement sur les polymères de la pectine, l'activité est caractérisée par la présence des halos clairs autour des colonies ce qui signifie une hydrolyse complète du substrat.

On peut utiliser aussi la solution de l'iode pour mettre en évidence cette activité

### II-5- Révélation de l'activité CMCCase

L'activité CMCCase est révélée sur milieu CMC (carboxy-méthyl-cellulose ; annexe I). Après 48 à 72h d'incubation à 28°C, l'activité CMCCase est mise en évidence par écoulement d'une solution de rouge de Congo à 1% sur les boîtes, ce dernier se fixe sélectivement sur les polymères de la cellulose. Après 15 minutes, les boîtes sont rincées avec une solution de NaCl 1M. L'apparition d'halos clairs autour des colonies témoigne d'une dégradation du carboxy-méthyl-cellulose.

### Estimation de l'activité enzymatique



— L'estimation des activités enzymatiques est donnée par une formule mathématique reposant sur le diamètre de la colonie (DC) et celui de l'halo (DH).

$$A \text{ (activité enzymatique)} = (DH-DC)/DC$$

## II-6- Test de production de l'indigoidine

L'indigoidine est un pigment bleu insoluble dans l'eau, il est produit exclusivement par l'espèce *Erwinia chrysanthemi* (Starr et al., 1966). C'est un critère qui peut être utilisé pour l'identification rapide de cette espèce. Pour cela nous avons ensemencé le milieu NGM (annexe I) avec les isolats, (ensemencement en patches, comme pour le test de l'activité cellulase ou pectinase) après 48 à 72h d'incubation à 28°C, les colonies qui développent une coloration bleu doivent correspondre sans doute à *Erwinia chrysanthemi*.

**Remarque :** sachant que l'indigoidine est produit par *Erwinia chrysanthemi* en réponse à un stress oxydatif, des boîtes ont été étalées avec 100 µl d'eau oxygéné 0,2 M avant l'ensemencement des bactéries à tester.

## II-7- Identification des *Erwinia* pectiolytiques par la technique de PCR

### II-7-1- Principe de la PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Un cycle de PCR comprend trois étapes :

- **Etape 1 :** Une fois tous les éléments rassemblés (voir tableau I), l'ADN à amplifier est chauffé jusqu'à 90°C pendant 30 secondes à une minute pour séparer ses deux brins.
- **Etape 2 :** Le tube est refroidi à environ 50°C (température calculée en fonction de la séquence des amorces). Cette température va permettre l'hybridation des deux brins d'ADN avec les deux amorces.
- **Etape 3 :** synthèse des brins complémentaires par la Taq polymérase (à 72°C).

Le couple d'amorces universelles utilisé pour l'amplification d'un fragment de 1500 bp de l'ADNr 16S de tous les Eubactéries est fD1 et Rs16.



❖ fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3').

❖ Rs16 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3').

**Tableau I** : réactifs utilisés pour la PCR et leurs concentrations.

<i>Réactifs</i>	<i>Concentration finale</i>
Tampon GoTaq	1 X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Taq polymérase (Promega)	0,01 U / μl
DNTPs	0,2 mM
chaque amorce	0,5 μM
ADN matrice	2 μl

## II-7-2- Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse permet de s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification.

### II-7-2-a- Préparation du gel

Le gel d'électrophorèse est préparé en ajoutant 1g d'agarose à 100 ml de tampon TAE (annexe II), ce dernier est obtenu par dilution d'une solution mère concentrée 50 fois.

Ce gel est obtenu alors en faisant bouillir la solution TAE-agarose jusqu'à dissolution complète puis en la laissant refroidir (50°C). Ensuite 2 μl de BET sont ajoutés au gel, le BET permet la visualisation de l'ADN sous lumière UV en s'intercalant entre les brins d'ADN néoformés.

Par la suite le gel est coulé dans un moule menu d'un peigne à 14 cupules (nombre qui peut varier selon le moule), après solidification le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse et immergé dans une solution de TAE 1X.

### II-7-2-b- Dépôt des produits d'amplification

Afin de suivre la migration des produits d'amplification dans le gel d'agarose, 5 μl de chaque produit est mélangé à 5 μl d'une solution de charge avant de la déposer dans les puits du gel.



—La composition de la solution de charge est la suivante :—

- Un marqueur de mobilité (bleu de bromophénol qui permet de suivre la migration).
- Un alourdisseur (glycérol) qui entraîne l'ADN au fond des puits.

### II-7-2-c- Migration

La migration est réalisée à l'aide d'un générateur de courant électrique sous un voltage de 80V, elle est considérée terminée quand le bleu de bromophénol dépasse les  $\frac{3}{4}$  du gel.

### II-7-2-d- Visualisation

Le gel est visualisé en utilisant un transilliminateur à rayons UV.

### II-8- Séquençage du produit de PCR

Le séquençage est réalisé sur les produits de PCR ayant été purifiés. Il se fait selon la technique automatisée de Sanger. Cette méthode consiste à faire une amplification (PCR) spécifique qui diffère de la PCR ordinaire par l'utilisation des didésoxynucléotides (ddNTP) généralement marqués par des fluorochromes. Ces nucléotides ne possèdent pas d'OH en position 3' du désoxyribose. L'incorporation de ce didésoxyribonucléotide par l'ADN polymérase bloque l'allongement de la molécule d'ADN en cours de synthèse. Le résultat final est donc un grand nombre de fragments d'ADN avec des longueurs différentes selon qu'un désoxynucléotide (dNTP) ou un didésoxynucléoside (ddNTP) a été, au hasard, incorporé. Mais dans tous les cas, toutes les molécules se terminent obligatoirement par un ddNMP. Ces fragments nucléiques sont séparés par électrophorèse selon leur longueur, les plus petits migrent plus vite. Le pouvoir discriminant du gel de polyacrylamide est si élevé qu'il permet de différencier des brins d'ADN ne différant en longueur que par un seul nucléotide. La séquence de l'ADN amplifié est alors lue par un balayage automatique qui permet de distinguer grâce à des fluorochromes différents les quatre bases A, T, C ou G. L'utilisation de logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire.

### II-9- Analyse bioinformatique des séquences



— Les séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S obtenues ont été analysées avec le programme BLAST pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans GenBank. La détermination du genre stipule que les homologies des séquences des ARNr 16S doivent être supérieures ou égales à 97%, une homologie inférieure ne permet pas l'identification (Drancourt et al., 2000).

## II-10- Détection d'*Erwinia chrysanthemi* par des amorces spécifiques

Afin de détecter la présence d'*Erwinia chrysanthemi* parmi nos isolats, nous avons utilisé des amorces spécifiques à cette espèce :

➤ Couple 1 :

P143 (5'-CACCCGTGGTTGTAAAACACGTTTCGG-3')

P145 (5'-GCGGTTTCCTGCTCTGTGGTT-3')

Ce couple d'amorces permet l'amplification du gène *msrA* d'*Erwinia chrysanthemi* dont la taille est de 584 pb (El Hassouni et al., 1999 ).

➤ Couple 2 :

PICB1 (5'-TCTGCGGCCAGTGGAGCAAAG-3')

PICB2 (5'-CGGCCGTTTTGGTGATGTTGT-3')

Ce couple d'amorces permet l'amplification du gène Pectate lyase de *Dickeya dadanti* 3937 dont la taille est de 650 pb.

La PCR se déroule de la même façon que (II-7), sauf que le temps requis pour la phase de l'élongation (étape 3) est réduit à 45 s à cause de la petite taille des deux fragments à amplifier (485 et 650 pb).

## II-11- Test de pathogénicité sur pomme de terre





— Sachant que les *Erwinia* pectinolytiques provoquent une pourriture molle sur la pomme de terre, le test de pathogénicité permet de restreindre l'intervalle de recherche de ces bactéries. Pour effectuer ce test des pommes de terre ont été lavés avec de l'eau de javel commerciale pendant 2 min, puis découpées et mises dans des boîtes de pétri stériles contenant du papier humide. Un volume de 15  $\mu$ l d'une culture bactérienne d'une nuit ( $D.O_{600nm} = 0,2$ ) dans milieu de culture LB liquide est déposé dans de petits puits formés à la surface des tranches de pomme de terre. Le résultat est positif lorsque le symptôme de la pourriture molle apparaît sur les tranches après 48 h à 72 h d'incubation à 28°C.



**Figure 1 :** Test de pathogénicité sur tranches de pomme de terre.

Les bactéries ayant causé le développement des symptômes de la pourriture molle ont subi le test moléculaire (PCR) comme cité avant (II-7).

### III- Recherches de bactéries antagonistes contre *Erwinia chrysanthemi*

#### III-1- Mise en évidence de la substance bioactive dans un milieu solide

##### III-1-1- Méthode de la surcouche

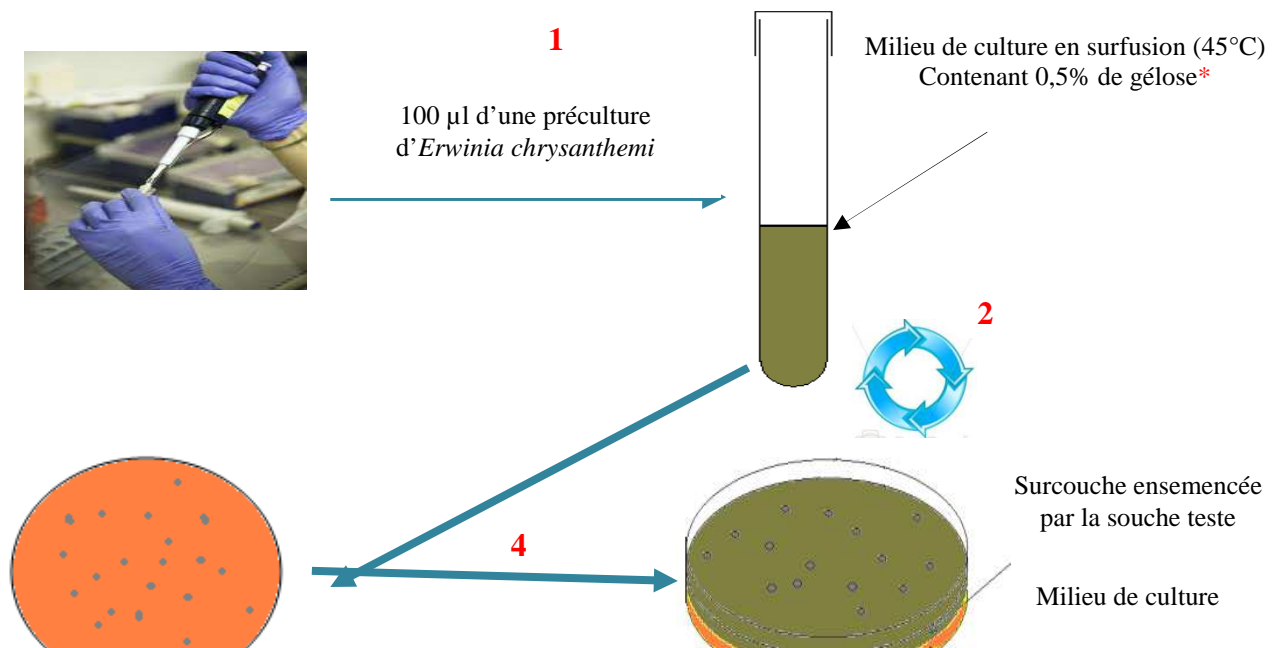
Le pouvoir antagoniste des différents isolats a été testé contre la souche *Erwinia chrysanthemi* 3937 Pin14 (collection de l'équipe de biotechnologie microbienne, Source, LCB, CNRS, Marseille). Les souches testées proviennent des champs de pomme de terre



(surtout des parties saines), et de la collection de l'équipe de biotechnologie des microorganismes, ainsi que du sol de la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz.

La détection de l'antagonisme bactérien est réalisée selon la méthode décrite par *Tagg et al.* (1976) avec modification. Elle consiste à recouvrir les boîtes de Pétri contenant des colonies des bactéries à tester par une surcouche (milieu liquide à 0,5% de gélose maintenu en surfusion) contenant une bactérie indicatrice (dans notre cas 100 µl d'une préculture fraîche d'*Erwinia chrysanthemi*), après solidification les boîtes sont incubées à la température optimale de croissance d'*Erwinia chrysanthemi* (28°C). (Figure 2)

**Remarque : ce test ainsi que les tests suivants sont réalisés en duplicata.**



**Figure 2 :** Technique de surcouche permettant la détection des bactéries antagonistes.

\* La quantité normale de 1,5% de gélose risque d'empêcher l'accès de l'air aux colonies testés, pour cette raison une concentration plus faible qui est de 0,5% est utilisée.

d'*Erwinia chrysanthemi* souche 3937 *Pin14* sont potentiellement antagonistes.

### III-1-2- Méthode des stries

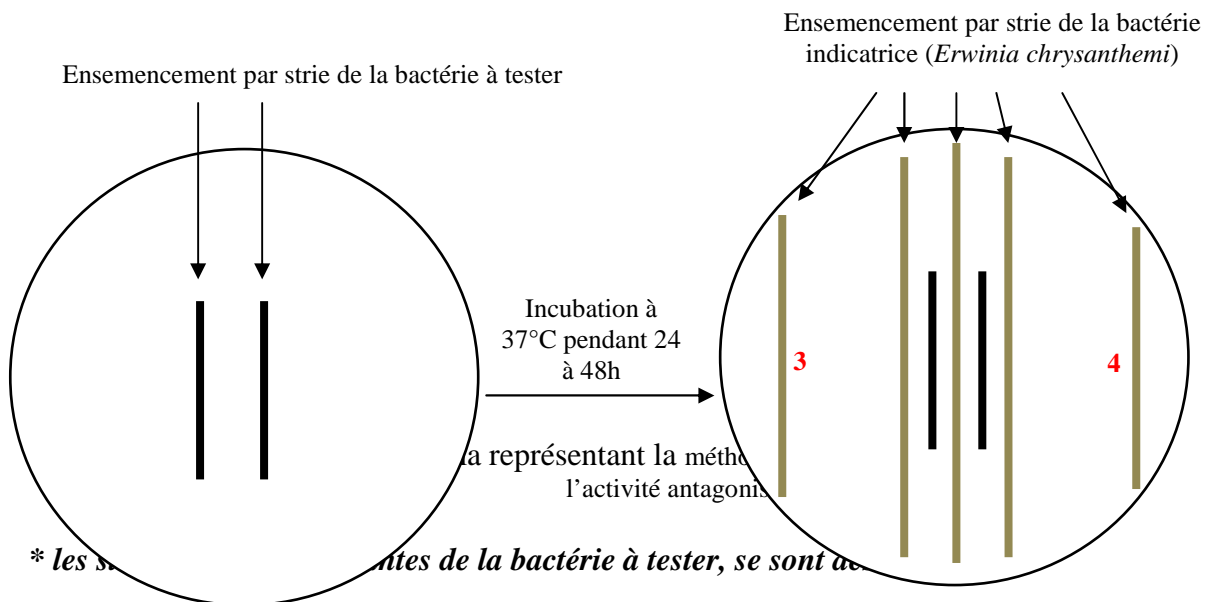
La méthode des stries est une autre méthode permettant de mettre en évidence l'activité antimicrobienne d'une bactérie donnée, cette méthode consiste à étaler la bactérie à tester en





forme de stries au milieu d'une boîte de pétri contenant un milieu approprié (dans notre cas milieu LB), puis l'incuber pendant une durée suffisante (de 24 à 48h) pour permettre la production de la substance bioactive qui diffusera dans la gélose. La souche *Erwinia chrysanthemi* est ensemencée parallèlement à côté et à distance de cette bactérie, des boîtes témoins contenant des stries de *E. coli* au lieu de la bactérie antagoniste sont préparées parallèlement (voir schéma 1 pour plus d'explication).

Un autre test d'antagonisme par stries a été effectué différemment du premier, la bactérie antagoniste et *Erwinia chrysanthemi* ont été ensemencés en même temps, sans incubation préalable de la bactérie antagoniste.



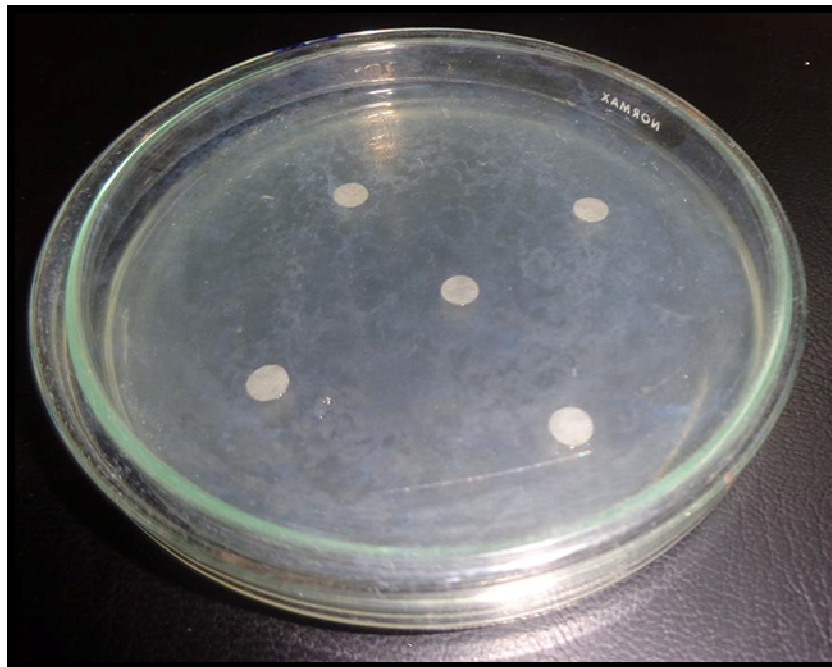
### III-2- Production de la substance bioactive dans un milieu liquide

#### III-2-1- Test de l'activité antimicrobienne avec la méthode des disques imbibés

##### III-2-1-a- avec le surnageant



— Afin de vérifier si la substance bioactive est produite dans un milieu liquide, des tubes LB liquides sontensemencés avec les bactéries ayant montré un pouvoir antagoniste sur milieu solide (isolats L80 et L55, avec un tube contenant *E. coli* comme témoin négatif), après une nuit d'incubation à 37°C, les tubes sont centrifugés, le surnageant est récupéré. L'activité antibactérienne a été testé par la méthode des disques imbibés avec 15 µl du surnageant sur des boite où ont été étalés 100 µl d'une préculture d'*Erwinia chrysanthemi* ( $D.O_{600nm} = 0,18$ ) ce qui correspond à  $10^8$  bactéries/ml. L'inhibition de la croissance est vérifiée après incubation à 30°C pendant 24 à 48 h.



**Figure 4 :** Test de l'activité antimicrobienne avec la méthode des disques imbibés

### III-2-1-b avec le concentré du surnageant

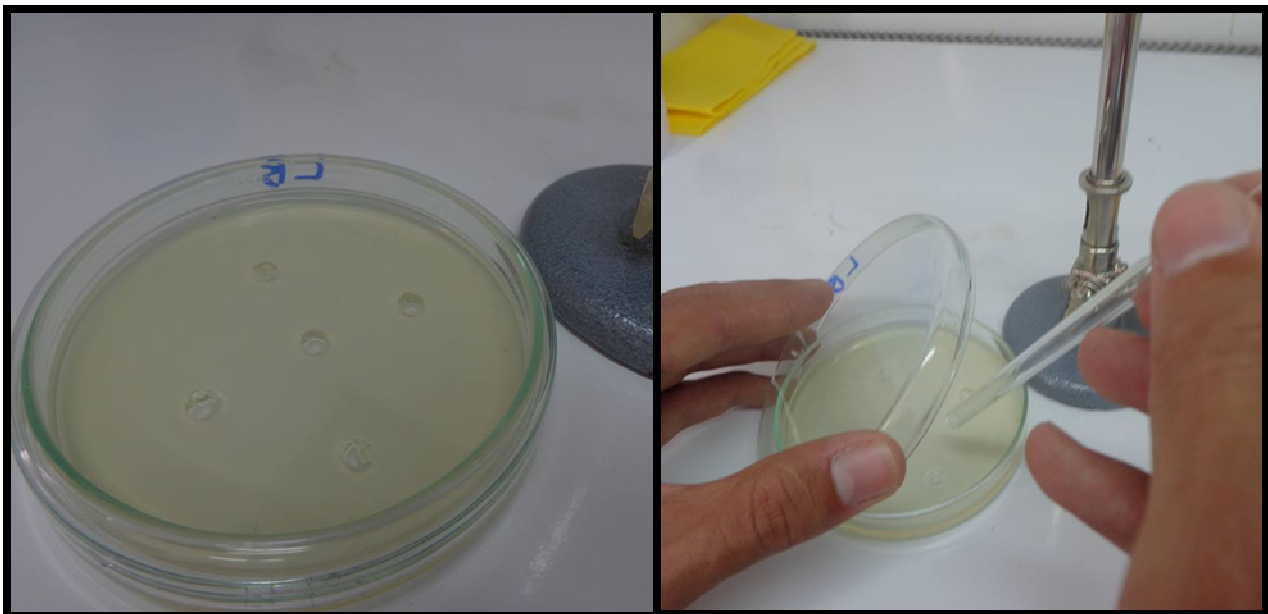
Le même protocole que (III-2-1-a) a été suivi, la seule différence c'est que le surnageant a été concentré à l'aide du "rotavapor" pour obtenir une grande quantité de la substance bioactive dans un petit volume. (Surnageant 20 X concentré).



## III-2-2- Test de l'activité antibactérienne avec la méthode des puits dans la gélose

### III-2-2-a- Préparation des boîtes

La technique des puits consiste à répartir 5 ml du milieu LB agar dans des boîtes de pétri, après solidification 10 ml du même milieu est ajoutée aux boîtes, les puits sont formés dans la première couche de la gélose après solidification (pour empêcher le surnageant de couler en dessous de la gélose) à l'aide d'une pipette pasteur stérile.



**Figure 5 :** Boîtes utilisées dans la méthode des puits dans la gélose

Après avoir étalé 100  $\mu$ l d'une préculture fraîche ( $D.O_{600nm} = 0,18$ ) d'*Erwinia chrysanthemi*. 60  $\mu$ l du surnageant concentré a été déposée stérilement dans ces puits.

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de croissance autour des puits.

### III-3- Extraction de la substance bioactive

L'extraction de la substance bioactive est réalisée dans différents solvants. Ainsi 20 ml du milieu LB liquide sont ensemencés avec une colonie de la bactérie ayant manifesté un pouvoir antagoniste, après incubation pendant une nuit, la culture est centrifugée pour récupérer le surnageant. 20 ml d'acétate d'éthyle (A.E.) est mélangée avec le surnageant dans une



ampoule à décantation, le mélange est laissé décanter, après 20 min les deux phases solvanique et aqueuse sont séparées. La fraction solvanique est récupérée et évaporée dans un "rotavapor" à 50°C jusqu'à obtenir un petit volume (1ml environ, 20 X concentré).

Afin de tester si l'extrait solvanique contient cette substance bioactive, 100 µl d'une préculture d'*Erwinia chrysanthemi* sont étalés sur le milieu LB, les disques stériles imbibés avec 15 µl de l'extrait sont déposés. Les disques témoins contenant l'A.E sont utilisés comme témoin négatif.

#### III-4- Test d'antagonisme sur tranche de pomme de terre

Les tubercules de pomme de terre ont été lavées avec de l'eau de javel, découpées et posées dans de grandes boîtes de pétri contenant du papier imbibé avec de l'eau pour assurer une humidité convenable. Le test d'antagonisme a été effectué de deux façons :

1- en pulvérisant une préculture fraîche de la bactérie à tester sur ces tranches, ensuite 20 µl d'une préculture d'*Erwinia chrysanthemi* a été déposé dans de petits puits formés à la surface de la pomme de terre, des témoins ou la bactérie antagoniste n'est pas pulvérisée ont été testé aussi.

2- en mélangeant 15µl d'une préculture d'*Erwinia chrysanthemi* avec 15µl d'une préculture de l'isolat à tester dans le même puit.

Après 3 jours d'incubation à 28°C, le diamètre de chaque macération a été mesuré, le résultat est positif si les symptômes de la pourriture molle sont réduits par rapport au témoin.

**Remarque :** la pathogénicité de la bactérie antagoniste a été testé comme indiquée dans (I-10) pour voir si elle provoque une macération des tissus ou non.



---

# Résultats et discussion

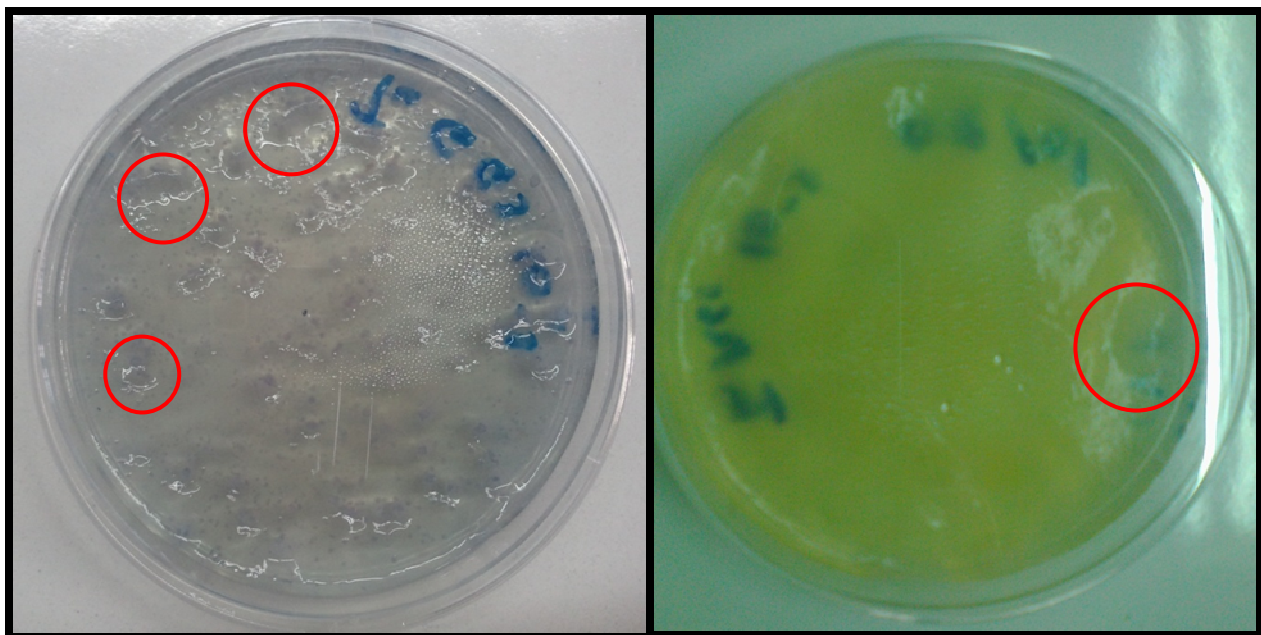


## I- Isolement et identification des *Erwinia pectinolytiques*

### I-1- Isolement des bactéries sur milieu CVP

Le but de cette manipulation est d'isoler le maximum de bactéries pectinolytiques à Gram<sup>-</sup> dans le milieu CVP (annexe I), l'apparition des dépressions dans le milieu témoin d'une dégradation de la pectine, et l'ajout du Crystal violet, qui est un inhibiteur des bactéries à Gram<sup>+</sup>, au milieu de culture implique que les bactéries ayant poussé sont à Gram<sup>-</sup>.

Ainsi 97 isolats ont été isolés et purifiés

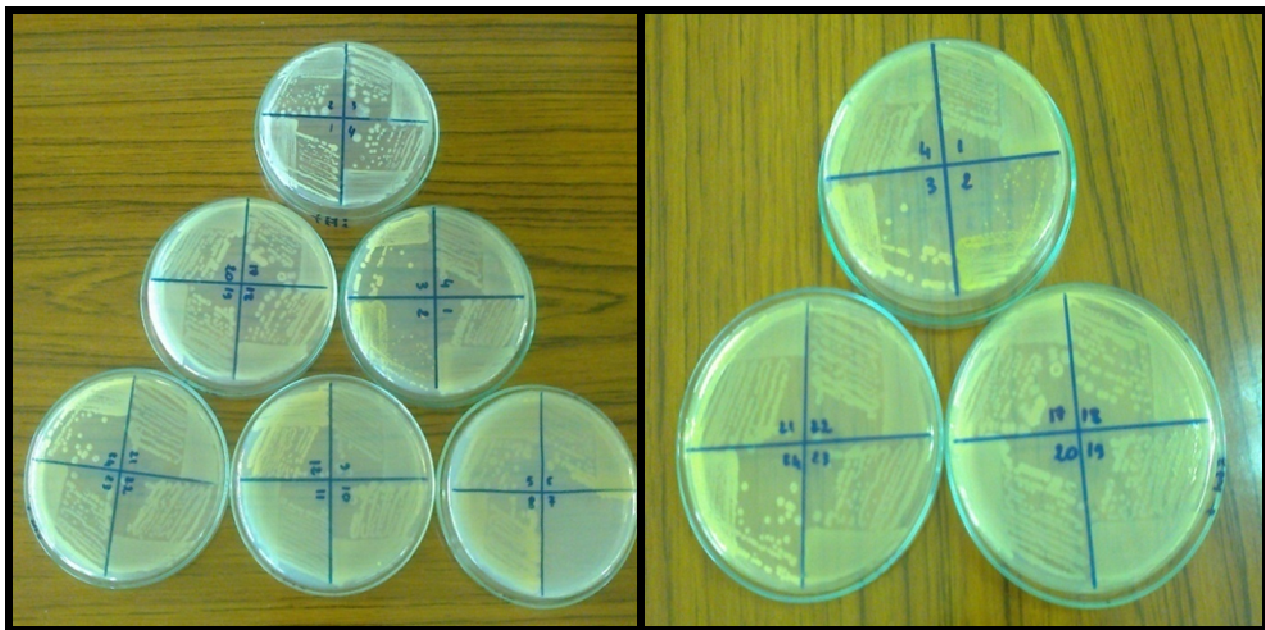


**Figure 1 :** Apparition des dépressions dans la gélose CVP après dégradation de la pectine.

#### I-1-1- Purification des isolats sur un milieu LB

Les bactéries ayant poussé au niveau des dépressions sur milieu CVP ont été repiquées dans un milieu LB avec étalement par épuisement, une culture est considérée pure après trois ou quatre repiquages de colonies isolées.





**Figure 2 :** Colonies purifiées à partir du milieu CVP sur milieu LB.

Le code des différents isolats ainsi que les échantillons dont ils proviennent sont indiqués dans le tableau 1 :

**Tableau 1 :** Échantillons et codes des Isolats purifiés à partir du milieu CVP.

source	Échantillons	Code des isolats
Tubercule	TB8	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
	TA61	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21
	TA62	22, 23, 24
	TG2	42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49
	TG3	50, 51, 52, 53
	TG5	60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79
	TG8	92, 93, 94, 95, 96, 97
Tige	gA6	25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41
	gBD1	84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91
Sol	SBD2	54, 55, 56, 57, 58, 59
	SBD3	80, 81, 82, 83

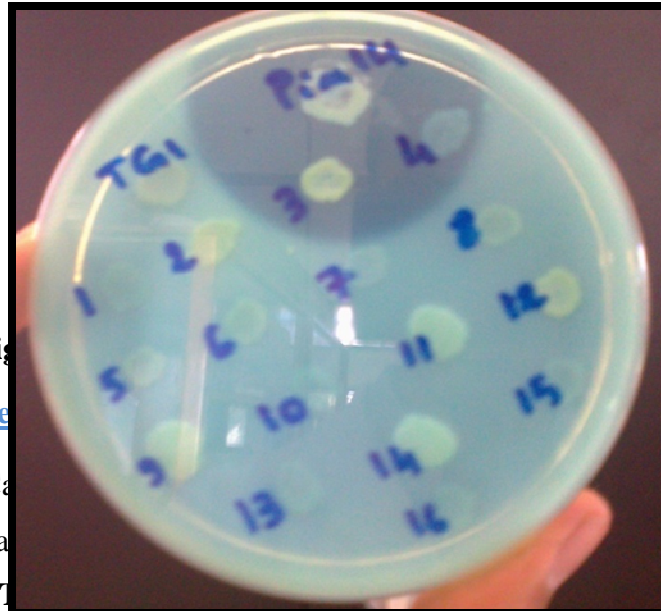
### I-1-2- Mise en évidence de l'activité pectinase

Le test de dégradation de la pectine a montré qu'aucun isolat n'est pectinase<sup>+</sup>, par contre le témoin positif qui est la souche 3937 Pin14 d'*Erwinia chrysanthemi* a donné un halo de





dégradation très claire (figure 3). Ce résultat est étonnant vu que tous les isolats testés ont été purifiés à partir des dépressions formées sur milieu CVP, ces dépressions qui sont normalement dues à la dégradation de la pectine.



### I-1-3- Mise en évidence

L'activité CMCa  
Glycérol), les résultats

ivre.

glucose) et (CMC+

C.

milieu	Isolats cellulase <sup>+</sup>	Isolats cellulase <sup>-</sup>	Pas de croissance
CMC + Glycérol	2	82	12
CMC + Glucose	2	91	4

Les deux isolats (26 et 88) sont capables de dégrader le CMC dans les deux milieux (CMC + Glucose et CMC + glycérol), mais d'après ce tableau (2) le nombre d'isolat qui n'ont pas poussé sur le milieu CMC + glycérol (12 isolats) est supérieur à celui des isolats qui n'ont pas poussé sur le milieu CMC + glucose (4 isolats), ce qui suggère que les bactéries favorise le glucose comme source de carbone par rapport au glycérol.

Parmi 97 isolats testés, 2 se sont révélés capables de dégrader le CMC (tableau 2), le pourcentage de bactéries cellulolytiques est alors de :

\* 2,30% sur milieu CMC + glycérol.

\* 2,15% sur milieu CMC + glucose.



Figure 4 : Révélation de l'activité CMCCase par le rouge congo.

#### Estimation de l'activité cellulase et pectinase

L'estimation des activités pectinase et CMCCase, a donné les résultats indiqués dans les deux tableaux suivants :

Tableau 3 : Estimation de l'activité cellulase.

code	isolat	Diamètre de la colonie (DC) cm	Diamètre de l'halo (DH) cm	Activité CMCCase
26	gA6	0,4	1,2	2
88	gBD1	0,3	1	2,33
<i>E.ch</i> 3937 Pin14	-	0,3	1,8	5

Ce tableau montre que la souche 3937 Pin14 d'*Erwinia chrysanthemi* a une activité CMCCase plus élevée que celle des deux autres isolats.

Tableau 4 : Estimation de l'activité pectinase pour *E.ch* 3937 Pin14.

code	Diamètre de la colonie (DC) cm	Diamètre de l'halo (DH) cm	Activité pectinase
<i>E.ch</i> 3937 Pin14	0,4	2	4



— Ce tableau montre que la souche 3937 *Pin14* d'*Erwinia chrysanthemi* est douée d'une forte activité pectinase.

En conclusion, les 97 isolats isolés de la région de Meknès et Guigou ne possèdent pas à la fois les activités pectinase et cellulase et par conséquent n'appartiendraient pas au genre *Erwinia*. C'est la raison pour laquelle, l'isolement, dorénavant, est réalisé sur milieu minimum avec CMC ou pectine comme source de carbone.

### I-2- Isolement sur milieu (minimum)

Afin de forcer l'isolement des *Erwinia* pectinolytiques, Les échantillons provenant de la région de Moulay Bouselham ont été étalés sur milieu minimum contenant la pectine comme seul source de carbone, les bactéries qui y ont poussé ont été repiquées sur un milieu qui contient la CMC comme seul source de carbone.

Ainsi 800 isolats sont obtenus sur milieu à base de pectine. Seulement 173 ont montré la capacité d'utiliser le CMC comme source de carbone. Ainsi le pourcentage (**P**) des bactéries ayant à la fois l'activité cellulase et pectinase est de 21,3% (voir annexe ).

$$P = (173/800) * 100 = \mathbf{21,3\%}$$



**Figure 5 :** Bactéries isolées sur milieu contenant la pectine comme seule source de carbone.

« Dans le cadre du projet PRAD, les 173 ont été envoyés à Paris afin que la détection et l'identification d'*Erwinia chrysanthemi* et *carotovora* par approche moléculaire soit réalisé par KHAYI. S. doctorant à la faculté des sciences de Meknès sous la direction de Pr. Moumni. »

## II- Test de production d'indigoidine

La production de l'indigoidine est mise en évidence par l'apparition d'une coloration marron à noirâtre avec parfois, selon les souches, une nuance bleuâtre sur milieu NGM composé de gélose nutritive, glycérol et manganèse (Yung-An Lee, Cheng-Pin Yu, 2006).

Parmi la totalité des isolats qui ont été testé (97+173), aucun n'a développé la coloration marron-noirâtre attendu. Mais il y a des isolats qui ont développé une coloration jaunâtre, d'autres une coloration jaunâtre-marron (tableau 5). Même *Erwinia chrysanthemi* 3937 Pin 14 n'a pas développé la coloration marron à noirâtre. Les auteurs de l'article cité ci-dessus, suite à une conversation par mail, ont expliqué que cette coloration marron-noirâtre dépend de la nature de la gélose nutritive utilisée.



— L'addition de  $H_2O_2$  dans le milieu MGN n'a pas permis d'obtenir la coloration marron attendu et ce test malheureusement n'a pas pu discriminer entre *Erwinia chrysanthemi* 3937 *Pin 14* et les autres *Erwinia* pectinolytiques.

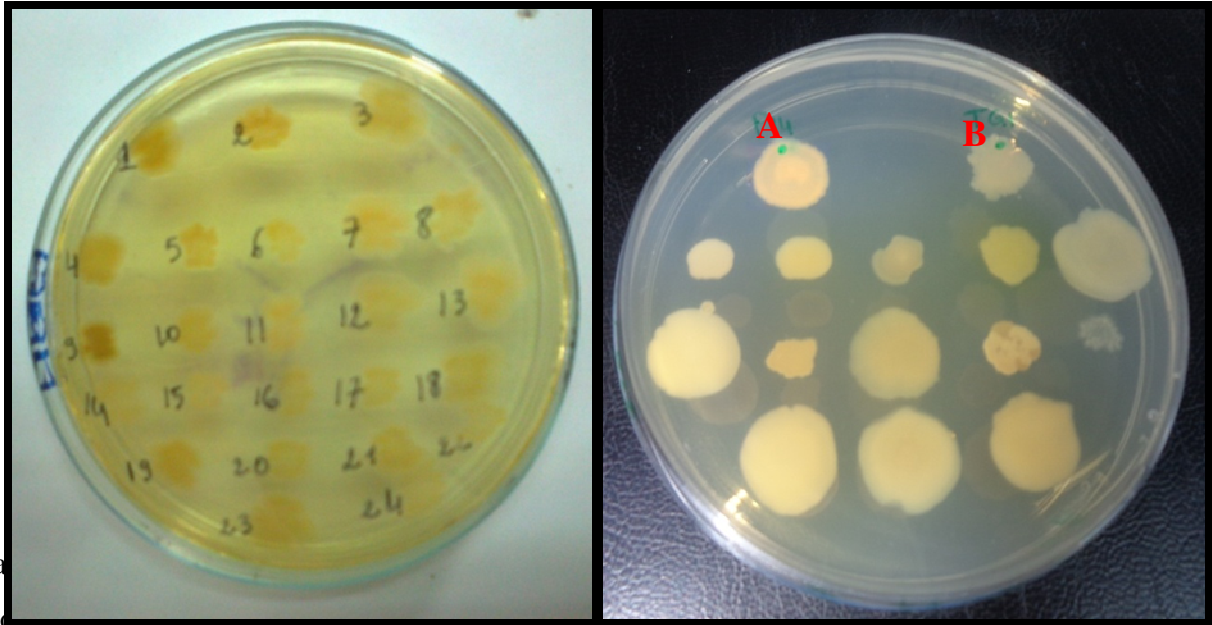
Tableau 5 : Test de production de l'indigoidine.

Coloration sur milieu NGM	Nombre d'isolats
Jaunâtre-marron	26
jaunâtre	52
aucune	19

La production de l'indigoidine est très importante pour *Erwinia chrysanthemi*, c'est un pigment qui joue un rôle dans sa pathogénicité ainsi que dans sa défense contre les intermédiaires actif de l'oxygène produite par la plante hôte, c'est le chercheur Yung-An et ses collaborateurs qui ont mis au point le milieu NGM pour faciliter la détection d'*Erwinia chrysanthemi* par rapport aux autre *Erwinia*.

Le gène de l'indigoidine peut être induit par le glycérol (Reverchon et al., 2002). L'addition du manganèse dans le milieu favorise la production de ce pigment avec un mécanisme qui n'est pas encore bien éclairci, des hypothèses ont été alors émises pour expliquer ce mécanisme, l'une de ces hypothèses suggère que l'indigoidine est produit par la condensation de deux molécules de glutamine (Reverchon et al., 2002), et que le manganèse est un cofacteur de la glutamine synthétase (Ruiz et al., 1989), ainsi cet ion augmente la production de la glutamine et par conséquent celle de l'indigoidine. D'autres chercheurs supposent que si le manganèse provoque un stress oxydative chez *Erwinia chrysanthemi* comme c'est le cas chez les cellules animales (Chen and Liao, 2002), ce stress pourrait être à l'origine de l'augmentation de cette production.





tra  
 pr

est, soit molle ( plus ou moins semblable à celle provoquée par le témoin positif *Erwinia chrysanthemi* souche 3937 Pin 14), soit sèche (figure 7). Ceci nous permet de déterminer le pourcentage de bactéries pathogènes qui est de 35%.

**Tableau 6 :** Test de pathogénicité sur tranches de pomme de terre.

Isolats pathogènes (pourriture molle)	Isolats pathogènes (pourriture dure)	Isolats non pathogènes
4	10	26

**Figure 7 :** Test de pathogénicité sur tranche de pomme de terre.





---

Souche non pathogène 1, *Erwinia chrysanthemi* 3937 pin14, 2 et 3.

#### IV- Détection et identification par PCR

Dans l'objectif de détecter et d'identifier *Erwinia chrysanthemi* et *Erwinia carotovora*, trois gènes sont ciblés pour être amplifié :

- Gène pectate lyase avec les amorces PICB1 et PICB2.
- Gène *msrA* pour détecter spécifiquement *Erwinia chrysanthemi*.
- Gène de l'ARNr 16S pour l'identification.

#### IV-1- Détection par PCR de la pectate lyase

Cette PCR est réalisé en France par le doctorant Slimane Khayi de la faculté des sciences de Meknès, avec des amorces spécifiques du gène de pectate lyase en utilisant les amorces Y1 et Y2 et ADE1 et ADE2 pour détecter *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi* respectivement :

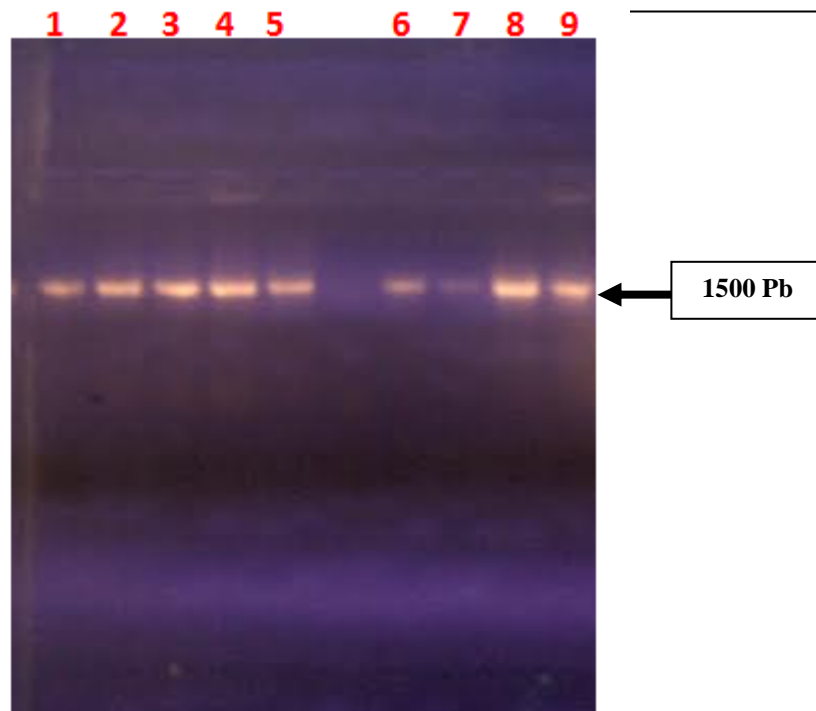
Les résultats, après avoir testé seulement 97 isolats de la région Meknès, ont montré l'absence des bactéries *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) et *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*). Les isolats isolés de la région moulay bouselham 1 et 2 sont envoyés à Paris et le test d'identification est en cours de réalisation.

#### IV-2- PCR de l'ADNr 16S

Un certain nombre d'isolats (CMCas<sup>+</sup> et pectinase<sup>+</sup>) est pris au hasard pour amplifier et séquencer l'ADNr 16S dans l'objectif de les identifier.

La figure 8 montre le profil électrophorétique des produits d'amplification de l'ADN 16S de quelques isolats.





**Figure 8 :** Profil électrophorétique des produits d'amplification par PCR avec le couple d'amorces FD1 et RS16 pour quelques isolats de Moulay Bouselham 2 sur gel d'agarose (1%).

- 1 :** Isolats C170  
**2 :** Isolats C171  
**3 :** Isolats C172  
**4 :** Isolats C174  
**5, 6, 7, 8 et 9 :** Isolats de l'équipe de B.M

La séquence est obtenue pour 4 isolats, C370, C371, C372 et C374 (voir annexe). L'alignement de ces séquences avec celles de la banque des séquences NCBI est réalisé par Blast et les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 7 :** Résultat de l'alignement des séquences de l'ADNr 16S avec celles de NCBI.

Isolat	Pourcentage d'homologie	Genre proche ou espèce
C170	99%	- <i>Salmonella bongori</i>
		- <i>Salmonella sp.</i>
		-



C171	99%	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>
C172	99%	-	<i>Enterobacter sp.</i>
C174	99%	-	<i>Enterobacter sp.</i>
		-	<i>Escherichia sp.</i>
		-	<i>Acinetobacter rudis</i>
		-	<i>Acinetobacter</i>

Comme le montre le tableau ci-dessus, les 4 isolats n'appartiennent pas au genre *Erwinia*

#### IV-3- PCR du gène *msrA*

Au laboratoire, il a été démontré que la PCR du gène *msrA* avec les amorces P143/P145 permet de détecter spécifiquement *Erwinia chrysanthemi* (Terta et al., 2010). La PCR a été testé sur la souche de référence *Erwinia chrysanthemi* 3937 (chromosome du pin32), un fragment attendu de 564 pb a été amplifié (figure 9). Cette PCR est en cours de réalisation pour détecter *Erwinia chrysanthemi* parmi les isolats CMC<sup>+</sup> et pectinase<sup>+</sup>.

Aussi l'amplification du gène de la pectate lyase a été testé sur *Erwinia chrysanthemi* et un fragment attendu de 650 a été obtenu (figure 9). Cette PCR est également en cours de réalisation pour détecter *Erwinia chrysanthemi* parmi les isolats CMC<sup>+</sup> et pectinase<sup>+</sup> isolés.





**Figure 9 :** Electrophorèse en gel d'agarose (1%) des produits d'amplification par PCR avec les couples des amorces (P143/P145), (pIBC1/pIBC2) (Fd1/R16) ( à partir d'ADN génomique et de chromosome d' *Erwinia chrysanthemi*.

- 1 et 2 : PCR avec amorces Fd1/R16S à partir de l'ADN Erch pin 14
- 3 : PCR avec amorces Fd1/R16S à partir d'une colonie Erch Pin 14
- 4 : PCR avec amorces pIBC1/pIBC2 à partir de l'ADN Erch pin14
- 5 : PCR avec amorces pIBC1/pIBC2 à partir de l'ADN Erch pin32
- 6 : PCR avec amorces pIBC1/pIBC2 à partir d'une colonie Erch Pin 14
- 7 : PCR avec amorces 143/145 à partir de l'ADN Erch pin32

## II- Recherche des bactéries antagonistes contre *Erwinia chrysanthemi*

Les isolats isolés de différents biotopes sont testés dans l'objectif de sélectionner celui ou ceux ayant un effet inhibiteur de la croissance d'*Erwinia chrysanthemi* (tableau 9) :

**Tableau 8 :** Isolats testés pour la recherche d'antagoniste contre *Erwinia chrysanthemi*.

origine	Nombre d'isolats testés
Biotope salin	41
Sol de champs de meknès (milieu CVP)	97
sol de champs de Meknès	15
sol de champs Moulay Bouselham 1	21
sol de champs de Moulay Bouselham 2	16
sol du jardin de la faculté des sciences Dhar el Mehras	9



## II-1- Méthode de la surcouche

L'inhibition de la croissance de la souche *Erwinia chrysanthemi* est manifestée par l'apparition d'un halo d'inhibition de croissance autour de la colonie testée,

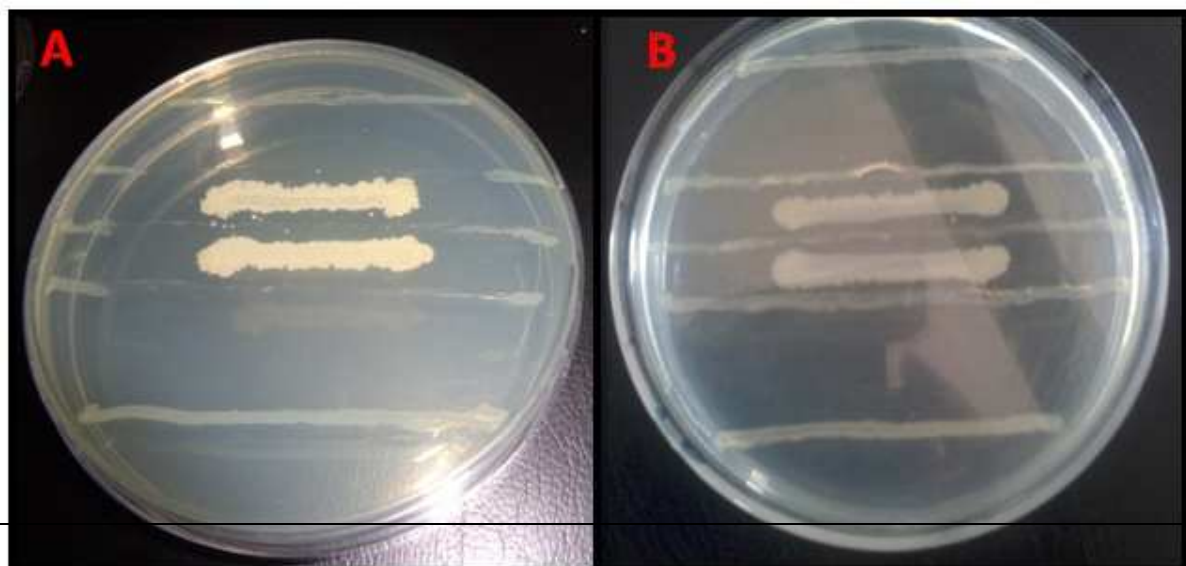


**Figure 10** : Méthode de la surcouche utilisée pour la détection des bactéries antagonistes.

Les isolats ayant manifesté un pouvoir antagoniste contre *Erwinia chrysanthemi* sont : L55 et L80. Pour confirmer ce résultat le test d'antagonisme est réalisé par la méthode de stries

## II-2- Méthode des stries

La figure 11 montre une inhibition de croissance d'*Erwinia chrysanthemi* au voisinage





des stries de l'isolat testé, une inhibition qui est due à la diffusion de la molécule bioactive produite par l'antagoniste dans la gélose, dans la photo 2 nous avons remplacé l'isolat antagoniste avec la souche *TG1* d'*E. coli* qui n'a aucun effet sur la croissance d'*Erwinia chrysanthemi* confirmant ainsi l'effet inhibiteur de l'isolat L80.

**Figure 11:** Photo montrant l'inhibition de la croissance d'*Erwinia chrysanthemi* par l'antagoniste L80 avec la méthode des stries (A), aucun effet avec les stries d'*E. coli* (B).

### III- Production de la substance bioactive dans un milieu liquide

#### III-1- Méthode des disques imbibés

Pour la méthode des disques imbibés, le témoin négatif qui est le surnageant concentré de la souche *TG1* d'*E. coli* n'a montré aucune activité, confirmant ainsi que l'inhibition de croissance n'est pas due à la concentration des composés du milieu de culture mais à une molécule bioactive produite par l'isolat L80 (Figure 12 et 13). Pour cette raison cet isolat a été choisi pour le test d'antagonisme sur les tranches de pomme de terre.

L'isolat L55 a montré une inhibition moyenne de la croissance de *Erwinia chrysanthemi* sur milieu solide avec la méthode de surcouche, mais lorsqu'il a été cultivé en milieu liquide son surnageant n'a pas montré une inhibition, chose qui peut être expliquée de plusieurs manières :

- 1- peut être que cet isolat est incapable de produire la substance bioactive lorsqu'il pousse en milieu liquide où il n'est pas immobilisé comme c'est le cas du milieu solide LB, parce que l'immobilisation des cellules peut être un facteur déterminant dans la production de plusieurs substances.
- 2- peut être que la production de la substance bioactive est induite par le contact entre la bactérie productrice et une autre bactérie, en absence de ce contact la production n'a pas lieu.
- 3- peut être que la substance bioactive est produite dans le milieu liquide mais elle est assez diluée que même la concentration du surnageant avec le "rotavapor" ne permet pas de la mettre en évidence.





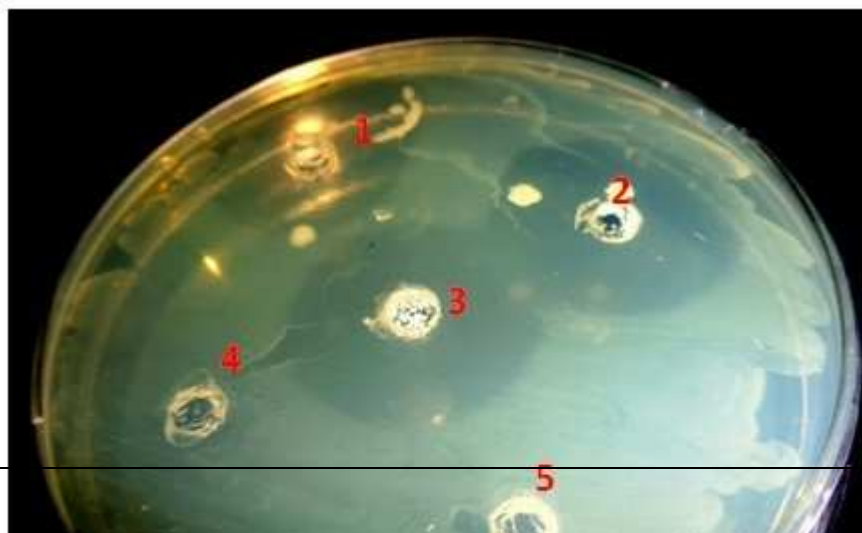
4 peut être que cette substance est produite dans le milieu liquide à une dose faible et c'est une molécule thermolabile. La concentration par évaporation à 60°C entraîne l'inactivation de la molécule.



**Figure 12 :** Inhibition de croissance de la bactérie *Erwinia chrysanthemi* par le surnageant concentré de l'isolat L80 (1 et 2) par la méthode des disques. 3 et 4 surnageant de *E. coli*)

### III-2- Méthode des puits dans la gélose

L'avantage de cette méthode par rapport à celle des disques imbibés c'est qu'elle permet de déposer une grande quantité du surnageant (jusqu'à 100  $\mu$ l), ce qui augmente la chance de mettre en évidence une activité antimicrobienne qui peut passer inaperçue avec d'autres méthodes. La figure 13 montre des halos d'inhibition obtenus après avoir déposé 70 $\mu$ l du surnageant concentré de l'isolat L80 dans les puits formés dans la gélose.





**Figure 13 :** Photo montrant une inhibition de croissance d'*Erwinia chrysanthemi* autour des puits contenant le surnageant concentré de l'isolat L80 : (1, 2, 3). Aucun effet autour des puits contenant le surnageant concentré de *E. coli* : (4, 5).

### III-3- Test de l'activité antimicrobienne avec l'extrait du surnageant dans l'acétate d'éthyle

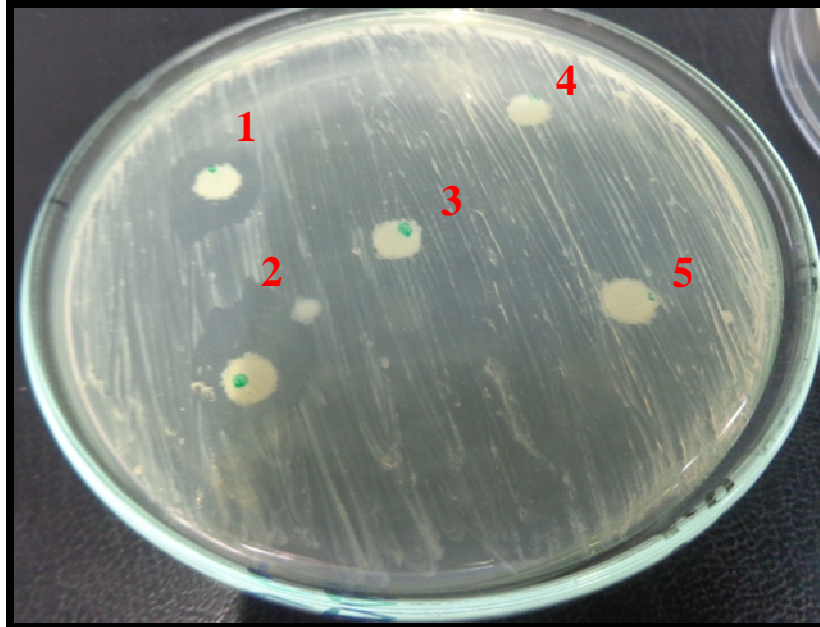
Le surnageant de l'isolat L80 a subi une extraction dans le solvant acétate d'éthyle (figure 14). L'extrait solvanique n'a pas montré d'effet inhibiteur de croissance d'*Erwinia chrysanthemi* (figure 15), ce qui montre que la substance bioactive recherchée n'est pas soluble dans l'acétate d'éthyle.







**Figure 14 :** Ampoule de décantation montrant les deux phases formées lors de l'extraction du surnageant avec l'acétate d'éthyle.

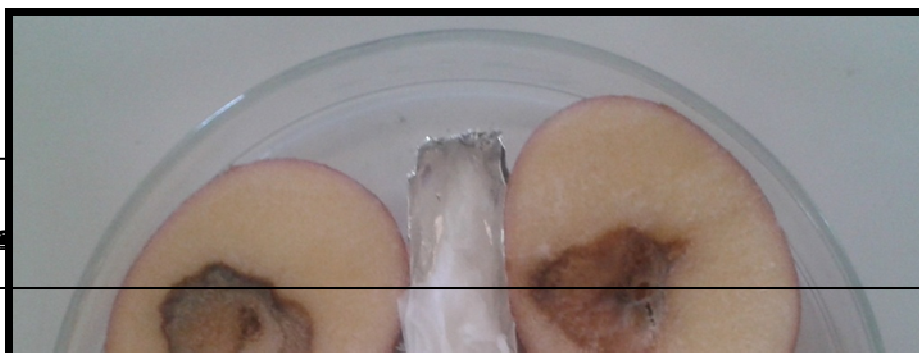


**Figure 15 :** Inhibition de la croissance d'*Erwinia chrysanthemi*. Acétate d'éthyle pur (1,2). Extrait du surnageant par l'acétate d'éthyle (3, 4, 5).

Nous remarquons dans la figure 15 que l'acétate d'éthyle inhibe la croissance d'*Erwinia chrysanthemi* (1, 2) lorsqu'il est appliqué seul, mais l'extrait du surnageant par ce solvant n'a aucun effet (3, 4, 5).

#### IV- Test d'antagonisme sur tranches de pomme de terre IV-1-Test de pathogénicité de l'isolat antagoniste L80

L'isolat L80 qui a montré un pouvoir antagoniste remarquable contre *Erwinia chrysanthemi* est doué d'activité cellulase et pectinase, par conséquent, le test de pathogénicité a montré qu'il provoque une pourriture sur tranches de pomme de terre (figure 16), cette pourriture est différente de celle molle provoquée par *Erwinia chrysanthemi*, mais ce résultat indique que la lutte avec cette bactérie vivante n'est pas possible, il faut alors penser à utiliser la substance bioactive responsable de l'inhibition.





---

**Figure 16 :** pourriture provoquée par l'isolat L80 sur tranches de pomme de terre.

#### **IV-2- Test d'antagonisme sur tranches de pomme de terre**

Les résultats de ce test ont montré que l'isolat L80 est capable de diminuer les symptômes de la pourriture molle causée par *Erwinia chrysanthemi* seule de 7cm de diamètre (figure 17, 1) à 3 cm de diamètre quand les bactéries sont co-inoculés ensemble (figure 17 : 2 et 3). Mais l'isolat L80 comme le montre la figure 16 provoque une pourriture molle d'un diamètre de 2 cm de diamètre.

Des essais d'antagonisme semblables menés par Aysan et *al.*, en 2003 ont montré que l'effet antibactérien d'un antagoniste donné sur boîte n'implique pas que cet isolat soit efficace sur tranches ou *in vivo*. Ces expériences ont mis en évidence un isolat qui n'est pas efficace sur des boîtes de Pétri (6%), alors qu'il réduit les symptômes sur des tranches de pommes de terre (100%), d'autres isolats, par contre, se sont révélés efficaces contre les bactéries sur boîtes de Pétri alors qu'ils ne le sont pas sur des tranches de pommes de terre et *in planta*. Pour cette raison le choix d'un antagoniste doit être basé sur son effet sur boîte, sur tranches, et *in vivo*.

Une autre étude concernant l'antagonisme contre *Erwinia chrysanthemi* et *Erwinia carotovora* qui a été réalisée par Krzyzanowska et ses collaborateurs en 2012, a mis en évidence 12 bactéries antagonistes capables d'inhiber la croissance de ces deux phytopathogènes *in vitro*. Les 12 isolats ont été identifiés par PCR, 4 appartenant à l'espèce



~~*Pseudomonas putida*, six à l'espèce *P. fluorescense*, un isolat a été identifié comme étant *B. subtilis* et le dernier *B. simplex*.~~

L'antibiose n'est pas le seul mécanisme qui doit être pris en considération lors de la recherche des antagonistes réduisant les symptômes de la pourriture molle (Haas et Defago., 2005), la sécrétion des pectinases et cellulases par les bactéries phytopathogènes est régulée de plusieurs manières (Barras et al., 1994; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996), ainsi les gènes responsables de la pathogénèse ne sont exprimés que si la production de l'AHL responsable du phénomène appelé « quorum sensing » par ces bactéries atteint un seuil déterminé. (Fuqua et al., 1994). Krzyzanowska et ses collaborateurs ont mis en évidence cinq espèces du genre *Bacillus* capables de freiner la production des AHL par ces bactéries phytopathogènes, le séquençage de l'ADNr 16S a montré que ces espèces sont : *B. cereus*, *B. thuringensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis*, et *B. mycoides*.



**Figure 17 :** Test d'antagonisme sur tranches de pomme de terre montrant



---

la pourriture causée par *Erwinia chrysanthemi* seule (1), et celle provoquée  
par *Erwinia chrysanthemi* en présence de l'isolat L80 (2 et 3).

### V- Identification de l'isolat antagoniste (L80) par PCR.

Après amplification et séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S de l'isolat L80, la séquence obtenue d'une taille de 1461 pb (figure 18) a été comparé à celles disponibles dans la base de données Genbank en utilisant le programme BLAST via NCBI.

Pour montrer le degré d'homologie nous avons réalisé un alignement entre la séquence de notre isolat et celles de la base de données (Figure 19). Les résultats ont montré que l'isolat L80 appartient à l'espèce *Bacillus subtilis*. Confirmant ainsi que le genre *Bacillus* est celui qui contient le plus d'espèces douées de pouvoir antagoniste comme c'est cité dans la plupart des références bibliographiques.

```
CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATG
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGG
CTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGAGGTAACG
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACC
GGGGAGGGTCAATTGGAAGTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
TGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCC
ACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCC
GCCGAAGGTGGACAGAGATGGG
```

**Figure 18:** Séquence du gène de l'ARNr 16S de l'isolat L80 obtenue après chevauchement entre les deux amorces FD1 et RS1





**Université Sidi Mohammed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



---

**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES**

 B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – **Fax** : 212 (35) 60 82 14



La figure suivante représente l'alignement entre le gène de l'ARNr 16S de l'isolat L80, amplifié par les deux amorces fD1 et RS16 et celui de *Bacillus subtilis*.

```
Query 1      CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGT 60
          |||
Sbjct 8      CTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGT 67

Query 61     TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG 120
          |||
Sbjct 68     TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG 127

Query 121    GAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGC 180
          |||
Sbjct 128    GAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGC 187

Query 181    TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGAGGTAACGG 240
          |||
Sbjct 188    TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCGCGGCATTAGCTAGTTGGT---GAGGTAACGG 244

Query 241    CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG 300
          |||
Sbjct 245    CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG 304

Query 301    ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC 360
          |||
Sbjct 305    ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC 364

Query 361    TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG 420
          |||
Sbjct 365    TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG 424

Query 421    GAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACG 480
          |||
Sbjct 425    GAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACG 484

Query 481    GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT 540
          |||
Sbjct 485    GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATT 544

Query 541    GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG 600
          |||
Sbjct 545    GGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCG 604

Query 601    GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTC 660
          |||
Sbjct 605    GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTC 664

Query 661    TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT 720
          |||
Sbjct 665    TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT 724

Query 721    GTAACGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC 780
          |||
Sbjct 725    GTAACGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC 784

Query 781    CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA 840
          |||
Sbjct 785    CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA 844

Query 841    ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC 900
          |||
Sbjct 845    ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC 904
```







---

## Conclusion

La pourriture molle et la jambe noire sont des maladies redoutables provoquant d'importants dégâts aux champs et au stockage. Ces deux maladies sont dues essentiellement à des bactéries de la famille des Entérobactériacées, du genre *Erwinia*, pathogènes primaires des cultures, en végétation comme en post-récolte. Ces bactéries sécrètent des enzymes, notamment des pectates lyases, qui hydrolysent les tissus, engendrant une perte d'électrolytes et la mort des cellules des tubercules d'où d'énormes pertes économiques. Jaafar SNAIKI a déclaré que l'observation de la pourriture molle pour la première fois au Maroc date de 2001, elle a été trouvée dans la plaine du Gharb, et le genre *Erwinia* a été identifié au Centre technique des Cultures sucrières, par isolement sur milieu de culture.

Au terme de cette étude, les résultats de l'isolement et identification des bactéries pectinolytiques ont mis en évidence une rareté de ce genre dans les parcelles qui ont fait objet d'échantillonnage, ce qui prouve que les menaces liées à la pourriture molle et la jambe noir ne sont plus inquiétantes, effectivement, sur un nombre de 97 isolats caractérisés par approche moléculaire, aucun d'entre eux ne s'est montré appartenant au genre *Erwinia*.

La rareté de ce genre mise en évidence par cette étude peut être due à l'application des produits phytosanitaires de nature chimique qui inhibent la croissance de ces bactéries. Ces produits qui ont plusieurs aspects négatifs sur la santé humaine et environnementale. Pour ces raisons la recherche des agents de contrôle biologique a été effectuée durant ce travail. Cette recherche a mis en évidence 3 bactéries appartenant au genre *Bacillus* capable de freiner la multiplication de la souche 3937 Pin 14 d'*Erwinia chrysanthemi*. Malheureusement, ces antagonistes se sont révélés doués d'activité pectinolytique et cellulolytique provoquant ainsi une pourriture sèche sur tranches de pomme de terre.

L'utilisation dans ce cas de la molécule bioactive produite par ces antagonistes est une solution prometteuse pour remédier à ce problème. Reste à savoir si cette molécule affecte uniquement le genre désiré ou bien il peut avoir un effet inhibiteur sur les bactéries phyto-bénéfiques.



# References

## Bibliographiques

- **Alivizatos A.S., Pantazis S.** (1992). Preliminary studies on biological control of potato common scab caused by *streptomyces sp.* In : Biological Control of Plant Diseases Progress and Challenges for the Future, NATO ASI Series, Vol. 230. (ed. Kluwer E.C. Tjamos, Papavizas, G.C. and Cook, R.J.), Academic Publishers. Dordrecht. pp. 85–93.
- **Alkorta I., Garbisu C., Laima M.J., Serra J.L.** (1998). Industrial application of pectic enzymes. *Process. Biochem.* 33(1): 21-28.
- **Aysan Y., Karatas A., Cinar O.** (2003). Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Protection* 22: (2003) 807–811.
- **Bahkali A.H.** (1996). Influence of various carbohydrates on xylanase Production by *V.tricopus*. *Bioreactor. Technol.* 33(3).265-268.
- **Barras F., Van Gijsegem F., Chatterjee A.K.**(1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *erwinia*. *Annual. Review of Phytopathology* 32: 201-234.
- **Beaulieu C., Boccara M., Van Gijsegem F.** (1993). Pathogenic behavior of pectinasedefective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Mol. Plant-Microbe In.* 6: 197-202.
- **Bora T., Ozaktan H.** (1998). Bitki Hastalyklaryyla Biyolojik Savas. Prizma Matbaasy-Yzmir, Turkey.
- **Caffall K H., Mohnen D.** (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pecticopolysaccharides. *Carbohydr Res* 344(14), 1879-1900.
- **Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A.** (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.
- **Condemine G., Castillo A., Passeri F., Enard C.** (1999). The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact.* 12: 45-52.



- ~~D'hondt-defranco M.~~ (1984). les principales maladies bactériennes et cryptogamiques de la pomme de terre, Cours International sur la culture de la Pomme de Terre. Cambérène.
- **Dass P., Bonroin J.H.** (2002). Investigation of non-esterified galacturonic acid distribution in pectic with endo-polygalacturonase. Carbohydr. Res. 318: 135-145.
- **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.
- **Eayre C.G., Bartz J.A., Concelmo D.E.** (1995). Bacteriophages of *Erwinia carotovora* and *Erwinia ananas* isolated from freshwater lakes. Plant Dis. 79 : 801-804.
- **El hassouni M., Chambost J.P., Expert D., Van Gijsegem F., Barras F.** (1999). The minimal gene set member msrA, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *E. Chrysanthemi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 887-892.
- **Enard C., Diolez A., Expert D.** (1988). Systemic Virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Requires a Functional Iron Assimilation System, Laboratoire de Pathologie Vegetale, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 75231 Paris Cedex 05, France.
- **Ernest R.** (1898). Histoire de la Pomme de Terre. Kessinger Publishing, 2010. 482 pages.
- **Flaherty J.E., Jones J.B., Harbaugh B.K., Samodi G.C., Jackson L.E.** (2000). Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h-mutant bacteriophages. HortScience, 35 : 882-884.
- **Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R.** (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. And *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int J Evol Microbiol* ; 53 : 381-91.
- **Haas D., Defago G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonads*. Nature Review of Microbiology 3: 307-319.
- **Heilbronn J., Lyon G.D.** (1990). The ineffectuality of potato protease inhibitor on the extracellular protease from *Erwinia carotovora*. J. Appl. Bacteriol. 69: 25-29.
- **Hélias V.** (2008). *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. on potato: a new nomenclature for *Erwinia* spp., symptoms, epidemiology and disease prevention. In: Cahiers Agricultures 17, 349–54.



- **Hélias V., Le Roux A.C., 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.
- **Henrissat B.** (1991). A classification of glycerol hydrolyses based on amino acid sequence similarities. *Biochem.J.* 280:309-318.
- **Henrissat B., Bairoch A.** (1996). Production, purification and Characterisation of a low molecular-mass Xylanase from *Aspergillus* sp. And its application in baking. *App. Biochem. Biotech.* 3 : 159-171.
- **Hossain M.M., Shibata S., Aizawa S.I., Tsuyumu S.** (2005). Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Physiol. Mol. Plant P.* 66:134-143.
- **Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S.** (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology* 50: 213-257.
- **Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S.** (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50 : 213-257.
- **Kenneth F.K., Bowling Green State University, Ohio et Kriemhild Coneè Ornelas,** (2000). *The Cambridge World History of Food*, Cambridge University Press.
- **Kloosterman B., Abelenda J.A., Gomez M.M., Oortwijn M., De boer J.M., Kowitwanich K., Horvath B.M., Van eck H.J., Smaczniak C., Prat S., Visser R.G., Bachem C.W.** (2013). Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes., Laboratory of Plant Breeding, Department of Plant Sciences, Wageningen-UR, PO Box 386, 6700 AJ Wageningen, The Netherlands., US National Library of Medicine National Institutes of Health.
- **Krzyzanowska D.M., Potrykus M., Golanowska M., Polonis K., Gwizdek-Wisniewska A, Lojkowska E., Jafra S.** (2012). Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *pectobacterium* and *dickeya spp.* Strains. *Journal of Plant Pathology*, 94 (2), 367-378
- **Lallemant M.** Dissection des interactions entre les composants du système de sécrétion de type II chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). *Microbiologie Moléculaire*. Lyon. L'institut national des sciences appliquées. 2010. 293p.
- **Legrand M.** (1996). Mécanismes moléculaires de défense des plantes vis-à-vis de micro-organismes pathogènes : détermination, signaux et régulation. In *Maladies des arbres fruitiers et*



résistance variétale — 10<sup>ème</sup> Colloque sur les recherches fruitières. Angers, France : CTIFL, INRA, p. 15–29.

- **Lojkowska E., Masclaux C., Boccara M., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat J.** (1995). Characterization of the *pelL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Mol. Microbiol. 16: 1183-1195.
- **Marits R., Koiv V., laasik E., Mae A.** (1999). Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* strain Scc3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. Microbiology. 145: 1959-1966.
- **McMillan G.P., Hedley D., Fyffe L., Perombelon M.C.M.** (1993). Potato resistance to soft rot *Erwinias* is related to cell-wall pectin esterification. Physiological and Molecular Plant Pathology 42, 279–89.
- **Métraux J.P.**(2001). Systemic acquired resistance and salicylic acid : current of knowledge. Eur. J. Plant Pathol. 107, p. 13–18.
- **Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes.** 2010.
- **Ozaktan H., Bora T., Vardar-Sukan F., Sukan S., Sargin S.** (1999). Studies on determination on antagonistic potential and biopreparation of some bacteria against the fire blight pathogen. Proceedings of the International Workshop on Fire Blight. Acta Hort. 489, 663–668.
- **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.
- **Pérombelon M.C.M., Lopez M.M., Carbonell J.** (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 non-emergence and blackleg development in Valencia, Spain. Potato Res ; 31 : 591-9.
- **Pissavin C., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N.** (1996). Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi*3937. J Bacteriol. 178: 7187-7196.
- **Reverchon S., Rouanet C., Expert D., Nasser W.** (2002). Characterization of Indigoidine Biosynthetic Genes in *Erwinia chrysanthemi* and Role of this Blue Pigment in Pathogenicity. Journal of Bacteriology. 184: 654-665.
- **Romeo A.M., Christen L., Niles E.G., Kosman D.J.** (2001). Intercellular chelation of iron by bipyridyl inhibits DNA virus replication. Biol. Chem. 276 : 24 301- 24 308.



- **Rousselle P., Yvon R., Crosnier J.** (1996). *La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations.* INRA. Paris. 552P.
- **Samson R., Legendre J.B., Christen R, Saux M.F.L., Achouak W., Gardan L.** (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. And *Dickeya zae* sp. nov., *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 4), 1415--1427.
- **Sandhya S., Joshi S.R., Swainathan T.**(1984). Bioconversion of cellulosic wastes-an Appraisal of processus and potential. *J.Sc. Ind. Res.* 43 (8) : 452-458.
- **Shevchik V.E., Condemine G., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J.** (1996), Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937., *Mol Microbiol* 19(3), 455--466.
- **Smith C., Bartz J.A.** (1990). Variation in the pathogenicity and agressiveness of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. *Plant Dis.* 74 : 505-9.
- **Snaiki J., Nadif A., Ouhssine M.** (2006). Détection biochimique d'*erwinia carotovora* subsp. *carotovora* de tubercules de betterave sucrière atteints de pourriture molle *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 145, 53-60.
- **Stanghellini M.E., Meneley J.C.** Identification of soft rot *Erwinia* associated with blackleg of potato in Arizona. *Phytopathology* 1975 ; 65 : 86-7
- **Stephen R.D., Williawm S.A., Edward J.T., Todd B.V., Michael E.** (2005). Antomated filter paper: Assay for determination of cellulose activity. Vol. 107.
- **SticherL., Mauch-Mani B., Métraux J.P.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, p. 235--270.
- **Tani A., Takeuchi T., Horita H.** (1990). Biological control of scab, black scurf and soft rot of potato by seed tuber bacterization. In: Horney, D. (Ed.), *Biological Control of Soil Borne Plant Pathogens.* CAB International Wallingford, UK, pp. 143--164.
- **Tardy F., Nasser W., Robert-Baudouy J., Cotte-Pattat N.H.** (1997), Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors., *J Bacteriol* 179(8), 2503--2511.





- **Terta M., El Karkouri A., Ait Mhand R., Achbani E., Barakate M., M. Amdan, Annajar B., El Hassouni M., Val F., Bouteau F. and Ennaji1 M.M.** (2010). Occurrence of *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in morocco. *Cell. Mol. Biol.* 56. OL1324-33.
- **Van Den Broek D., Chin-A-Woeng., T.F.C., Eijkemans K., Mulders I.H.M., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.J.**(2003) Biocontrol traits of *Pseudomonas spp.* are regulated by phase variation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 1003-1012.
- **Vidaver A.K.** (2002). Uses of Antimicrobials in Plant Agriculture. *Clinical Infectious Diseases.*3: 107-110.
- **Weber J., Olsen O., Wegener C., Von Wettstein D.** (1996). Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48, 389–401.
- **Willats W.G., McCartney L., Mackie W., Knox J.P.** (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47(1-2), 9-27.
- **Wlodarczyk A.** Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii* ), Microbiologie environnementale. Lyon. Institut National des Sciences Appliquées. 122p.
- **Wyatt G.M., Lund B.M.** (1981). The effect of antibacterial products on bacterial soft rot of potatoes. *Potato Res.* 24:315-329.
- **Yang Z., Cramer C.L., Lacy G.H.** (1992). *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectic enzymes – in planta gene activation and roles in soft-rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5, 104–12.





**Université Sidi Mohammed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences et Techniques**  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



---

**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES**

 B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – **Fax** : 212 (35) 60 82 14