

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Réf :.....

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Memoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme

Master Thème

**Isolement et caractérisation de bactéries
phytopathogènes à partir de tissus végétaux
symptomatiques**

Réalisé par: SAADI Lytissia & GANA Ferial

Encadré par: M. LADJOUZI Rachid

Soutenu le : 26-06-2023

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M. AMIR Nadir

MCA

Univ. De Bejaia

Président

M.BELHADI Djellali

MCA

Univ. De Bejaia

Examineur

M. LADJOUZI Rachid

MAA

Univ. De Bejaia

Encadrant

Année Universitaire : 2022-2023



Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Dieu pour nous avoir accordé la force, l'énergie et la persévérance nécessaires pour mener ce travail.

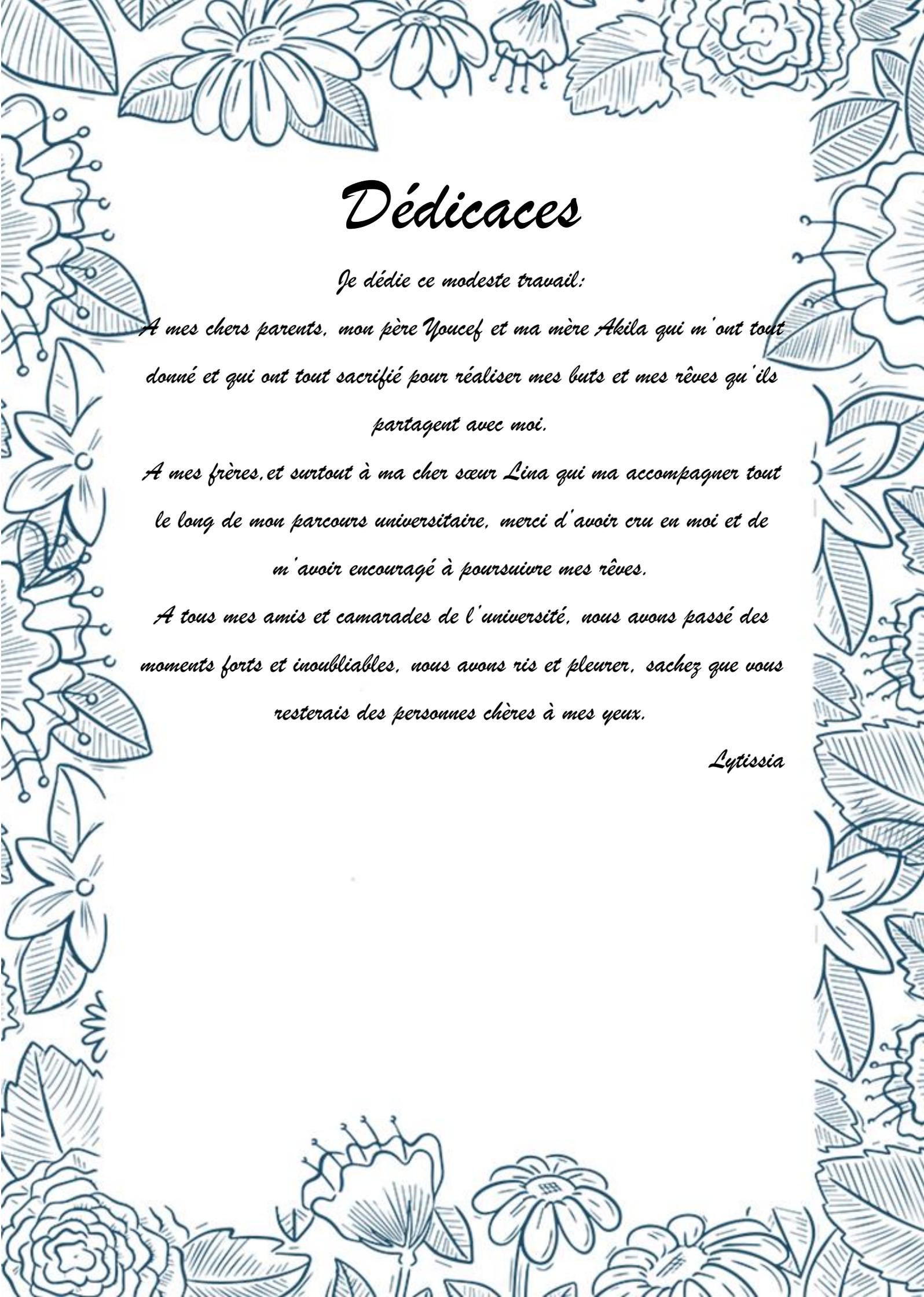
*En premier lieu, nous voudrions exprimer notre gratitude à Monsieur **LADJOUZI Rachid** notre professeur qui nous a gentiment guidé tout au long de notre travail avec patience, son soutien et ses conseils indéfectibles sont inestimables ; c'est avec plaisir que nous tenons à lui exprimer notre profond remerciement.*

En deuxième lieu, nous remercions les personnels qui travaillent au laboratoire de microbiologie appliquée (LMA), merci à eux de nous avoir orienté et d'avoir répondu à nos questions.

Nous tenons à remercier les membres du jury qui ont accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Bien sur nous souhaitons exprimer notre sincère reconnaissance à nos parents, qui ont été à nos côtés depuis notre parcours à la maternelle jusqu'à aujourd'hui. Votre amour inconditionnel, votre soutien constant et vos sacrifices sans fin nous ont permis d'accomplir ce travail.

Nous remercions également nos profs et nos camarades depuis L1.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A mes chers parents, mon père Yucef et ma mère Akila qui m'ont tout donné et qui ont tout sacrifié pour réaliser mes buts et mes rêves qu'ils partagent avec moi.

A mes frères, et surtout à ma cher sœur Lina qui ma accompagner tout le long de mon parcours universitaire, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé à poursuivre mes rêves.

A tous mes amis et camarades de l'université, nous avons passé des moments forts et inoubliables, nous avons ris et pleurer, sachez que vous resterais des personnes chères à mes yeux.

Lytissia



Dédicaces

C'est avec une immense joie que je dédie mon travail à :

A mes chers parents : pour leur amour, leurs prières et leurs sacrifices . Ainsi que mes frères qui m'ont toujours soutenu tout au long de ma vie.

A mes copines aussi qui étaient là pour moi, et mon chat qui accompagne mes nuits.

Feriel

Sommaire

Liste des tableaux

Listes des figures

Liste des Abréviations

Introduction 01

CHAPITRE I : Les maladies bactériennes des plantes

I.1 Historique 03

I.2 Les différentes classes de phytopathogènes bactériens. 04

I.2.1 Bactéries phytopathogènes a Gram-.....04

I.2.1.1 Proteobacteries.....05

I.2.2 Bactéries phytopathogènes a Gram+.....05

I.3 Les principaux symptômes des bactérioses végétales06

I.4 Moyens de luttés et prophylaxie.....08

I.4.1 pratiques culturales09

I.4.2 Lutte chimique09

I.4.3 Lutte biologique.....10

I.4.4 Lutte génétique.....11

CHAPITRE II: Description des principales bactéries phytopathogènes

II.1 Taxonomie.....12

II.2 *Ralstonia solanacearum* (pourriture brune)12

II.3 *Xanthomonas spp.*.....15

II.4 *Pectobacterium* et *Dickeya spp* (pourriture molle)16

CHAPITRE III : Matériel et méthode

III.1 Matériel.....19

III.1.1 Matériel de laboratoire.....19

III.1.2 Matrice végétale.....19

| | |
|--|-----------|
| III.1.3 Matériel bactérien..... | 19 |
| III.2 Méthodes..... | 19 |
| III.2.1 Echantillonnage..... | 19 |
| III.2.2 Isolement..... | 20 |
| III.2.3 Examen macroscopique..... | 22 |
| III.2.4 Identification biochimique..... | 23 |
| III.3 Résultats..... | 27 |
| III.4 Discussions..... | 36 |
| Conclusion..... | 38 |

Annexe

Liste bibliographique

Les abréviations

ARN : Acide ribonucléique.

BN : Bouillon nitraté.

EPS : Exo-polysaccharides.

FAO : Food and agriculture organizations.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂S : Sulfure d'hydrogène.

HR : Humidité relative.

KOH : Hydroxyde de potassium.

Man : Mannitol.

LMA : Laboratoire de microbiologie appliquée.

NR : Nitrate réductase.

SM : Solution mère.

TSI : Triple Sugar Iron.

La Lise des figures

| N° | Titre de la figure | Page |
|----|--|------|
| 01 | Position taxonomique des bactéries phytopathogènes | 04 |
| 02 | Triangle d'une maladie végétale | 06 |
| 03 | Classification taxonomique des bactéries phytopathogènes | 12 |
| 04 | Cycle infectieux de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 13 |
| 05 | Symptômes de <i>Ralstonia solanacearum</i> sur végétation | 14 |
| 06 | Symptômes de <i>Ralstonia solanacearum</i> sur tubercule | 14 |
| 07 | Symptômes de <i>Xanthomonas</i> su végétation | 16 |
| 08 | Symptômes de <i>Xanthomonas</i> su tubercules | 16 |
| 09 | Symptômes sur végétation (jambe noire) et sur tubercule (pourriture molle) | 17 |
| 10 | Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne | 18 |
| 11 | Echantillons de pommes de terre et tomates sur le site de prélèvement (lot 1 et 2) | 20 |
| 12 | Protocole de prélèvement et isolement | 21 |
| 13 | Photographie des tubercules infectés (tomate, pomme de terre, carotte) | 21 |
| 14 | Solutions mères et dilutions | 21 |
| 15 | Schématisation des étapes du protocole du test KOH | 24 |
| 16 | Colonies typiques isolées sur milieu King B et GN | 28 |
| 17 | Observation macroscopique (G : X100) de la coloration du bleu de méthylène | 29 |
| 18 | Observation microscopique (G : X100) de la coloration de Gram (négatif) | 29 |
| 19 | Résultat positif pour le test au KOH (bactérie à Gram négatif) | 30 |
| 20 | Résultats des tests biochimiques sur tubes à essai (de gauche à droite : milieu Mannitol mobilité, Bouillon nitraté, Citrate de Simmons et gélose TSI) | 30 |

La Liste des Tableaux

| N° | Titre du tableau | Page |
|----|---|------|
| 01 | Résultats des tests KOH, Catalase, Bleu de méthylène et Gram. | 31 |
| 02 | Résultats des tests TSI, Citrate, Mannitol et BN. | 34 |

Introduction

« *La phytopathologie est aux végétaux ce que la médecine et la médecine vétérinaire sont à l'homme et aux animaux, chacune de ces disciplines étudie les causes, les mécanismes et le contrôle des maladies affectant les organismes auxquelles elles se rapportent* » (**Bensemane, 2017**).

Depuis la découverte de l'agriculture et la domestication des plantes par l'Homme, ces dernières constituent la base de l'alimentation humaine ainsi que pour de nombreux animaux herbivores. Ainsi, les végétaux couvrent 80% des besoins alimentaires humains. Les céréales (blé, riz, maïs), les légumineuses (haricots, lentilles, pois) et les cultures maraîchères assurent notre sécurité alimentaire.

Cependant, les cultures végétales d'intérêt telles que la pomme de terre ou la tomate sont la cible permanente de nombreuses attaques abiotiques (gel, UV, dessiccation, déficiences nutritionnelles, pollution atmosphérique, toxicités minérales, résidus de pesticides...) et biotiques (microorganismes, parasites et insectes ravageurs). Ces sources de stress induisent des pertes économiques considérables, une dépréciation de la qualité des denrées, ainsi qu'un impact négatif sur l'autosuffisance alimentaires, notamment dans les pays en voie de développement (**Moutassem et Daho, 2018**).

L'impact des maladies végétales est considérable et bien établi que ça soit à l'échelle mondiale ou nationale. Les pertes économiques annuelles varient entre 10 à 40% de la production agricole, ces dernières ne se limitant pas à la réduction de rendement (**Faostat, 2021**).

Face aux déficits financiers substantiels engendrés et dans une optique de phytoprotection et de contrôle de ces pathogènes, de nombreuses approches sont élaborées avec plus au moins de succès, à commencer d'abord par les bonnes pratiques culturales en passant par les outils de lutte chimiques, ou génétique. Actuellement le contrôle biologique par le biais de microorganismes antagonistes et de substances bioactives a fait ses preuves et est de plus en plus utilisé, car plus respectueux de l'environnement. De nos jours, on assiste de plus en plus au développement de la lutte intégrée et de l'agriculture biologique avec des méthodes inspirées de la nature et visant à renforcer les défenses immunitaires naturelles des plantes.

Qu'elle que soit et indépendamment de la méthode de lutte à appliquer, celle-ci passe d'abord par un diagnostic de l'agent pathogène, ainsi l'isolement et l'identification des phytopathogènes sont la clef qui permet tout d'abord d'estimer et d'évaluer la biodiversité à l'intérieur de ces macergènes et de mener par la suite des actions de contrôle.

Etant donné l'importance économique des cultures précédemment citées, il est primordial d'accorder une attention particulière aux problèmes phytosanitaires affectant ces végétaux en menant des études approfondies sur ces maladies et de prendre des mesures appropriées en conséquence. Un aspect crucial de cette démarche consiste à se concentrer sur le diagnostic de ces maladies, ce qui implique l'identification précise et la caractérisation des agents pathogènes responsables.

Parmi les agresseurs microbiens, on recense diverses maladies dues à des agents bactériens et fongiques, ainsi les pathologies végétales dues aux champignons *Botrytis cinerea* et *Phytophthora infestans*, de même que les bactéries *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium* et *Dickeya spp* sont de loin les plus virulentes sur une large gamme de plantes hôtes et non hôtes.

Notre étude vise tout d'abord à constituer une collection de souches bactériennes à partir d'échantillons variés : tubercules de pommes de terre, de carottes et fruits de tomates symptomatiques afin de les identifier et de mieux comprendre l'étendu de ces infections. Notre travail est divisé en deux sections distinctes :

Dans la synthèse bibliographique de notre ouvrage, nous avons abordés des généralités sur les principaux pathogènes bactériens des cultures, en nous focalisant sur la description des espèces concernées, les symptômes engendrés et mécanismes d'action ainsi que les stratégies de lutte et prophylaxie les plus utilisées.

Dans la partie expérimentale et dans le but d'apporter une contribution à l'étude des maladies des plantes, nous avons réalisé dans ce mémoire des prélèvements de différents tissus végétaux symptomatiques (pommes de terre, tomates et carottes), suivi d'un isolement et identification pour caractérisation morphologique et biochimique des isolats sélectionnés.

Chapitre I : Maladies bactériennes des plantes

1- Historique :

L'histoire de la phytopathologie remonte aux origines de l'agriculture, les anciennes civilisations (grecs, chinois, hindous, aztèques) avaient déjà acquis une certaine connaissance sur l'existence des maladies des plantes. La première mention d'une maladie végétale remonte à 2000 A.C., il s'agirait de la Samana (maladie des orges), de même qu'il existe d'anciens écrits et références sur les moisissures des récoltes. Ces maladies étant d'abord été considérées comme une malédiction ou punition divine (**Dahou, 2014**).

Le premier pathologiste végétal, considéré comme le père de la phytopathologie fut un grec nommé Cleidemus, qui réalisa des observations sur les maladies des figuiers, oliviers et raisins. De nombreuses dates historiques furent des événements clés marquants qui ont contribué à la progression et l'évolution de nos connaissances sur les maladies végétales :

- ✓ **2000 A.J.C** : Dans l'Égypte antique, les agriculteurs ayant connu des ravageurs et des maladies des plantes, ont été amenés à concevoir des moyens de lutte comme l'utilisation de la poudre de soufre et autres substances hautement toxiques pour l'homme et les animaux (à base de plomb, d'arsenic ou de cuivre).
- ✓ **400 A.J.C** : Hippocrate, considéré à son époque comme le père de la médecine, nota des symptômes de maladies de plantes.
- ✓ **14^{ème} siècle** : l'ergot du seigle a fait des ravages dans l'armée Russe, par la consommation de farine de seigle empoisonné par des alcaloïdes provenant du champignon *Claviceps purpurea* (**Allioui, 2020**).
- ✓ **1500** : Les conquistadors espagnols introduisirent à partir du XV^{ème} siècle dans le nouveau monde (Amérique du sud et Amérique centrale) les agents de la rouille de la vigne et la fusariose du maïs, éradiquant ainsi les cultures autochtones.
- ✓ **1700** : La rouille du blé est signalée pour la première fois en Europe (**Dahou, 2014**).
- ✓ **1845** : En Irlande, manifestation du Mildiou de la pomme de terre engendrant une grande famine, causant la mort de plusieurs centaines milliers de personnes, ainsi que l'exode massif de plus de 2 millions d'Irlandais, principalement en Amérique du nord.
- ✓ **19^{ème} siècle** : avec les travaux de Koch et de Pasteur, différents types d'agents pathogènes responsables des maladies parasitaires ont été identifiés : les virus et les viroïdes, les procaryotes, les protozoaires, les champignons et les phanérogames parasites des plantes.

- ✓ **1861** : Anton du Bary décrit de nombreux champignons phytopathogènes.
- ✓ **1865** : Edification de la phytopathologie moderne par le botaniste allemand Anton de Bary par la publication de son ouvrage intitulé « La création de la Symbiose».
- ✓ **1878** : Prillieux (France) et Burill (USA) montrent l'existence des bactéries phytopathogènes.
- ✓ **Années 1950** : utilisation de pesticides organochlorés et organophosphorés et autres molécules développées par l'industrie phytopharmaceutique (Allioui, 2020).
- ✓ **1970** : Utilisation de biopesticides, comme les insecticides à base de *Bacillus thuringiensis* (Kumar et al., 2021).
- ✓ **1990** : Développement de la PCR (réaction en chaîne par polymérase) pour la détection des agents pathogènes dans les cultures (Grosdidier et al., 2017).
- ✓ **2000** : Apparition d'une discipline de la biologie moderne, la génomique, outil révolutionnaire grâce à l'identification de gènes de résistances (Eggen, 2003).
- ✓ **2010** : Utilisation des drones et des capteurs pour mieux surveiller les cultures et la détection des signes de maladies (Ait Issad, 2020).

2- Les différentes classes de phytopathogènes bactériens

La totalité des bactéries phytopathogènes Gram négatives appartiennent à la classe des protéobactéries, alors que celles Gram positives sont classées au niveau des mollicultes et firmicutes (figure 1).

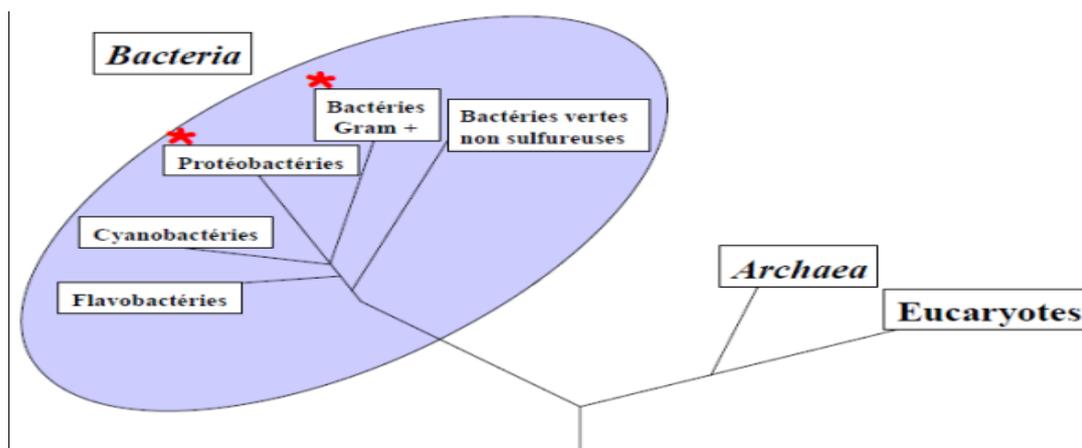


Figure 1 : position taxonomique des bactéries phytopathogènes (Lepoivre, 2003).

2-1) Bactéries phytopathogènes à Gram négatif

2-1-1) Protéobactéries : constituent un groupe de procaryotes très diversifié et riche, composé d'environ 5000 espèces, parmi lesquels, on compte de nombreux phytopathogènes répartis dans 3 classes : Alpha (α), Beta (β) et Gamma (γ) *proteobacteria*. A noter que les classes Delta (δ) et Epsilon (ϵ) ne comprennent aucune espèce phytopathogène (**Cooper, 2006**).

a)- α -protéobactéries : Cette classe comprend de multiples bactéries symbiontes, parasites et les photosynthétiques. La plupart sont des oligotrophes, non exigeantes. Parmi les principaux phytopathogènes appartenant à cette classe, on dénombre :

Agrobacterium tumefaciens : responsable de la galle de collet chez plusieurs plantes (**White et Winans, 2007**).

Xylella Fastidiosa : provoque la Pierce de la vigne en obstruant les vaisseaux conducteurs de sève (**Clavijo-Coppens, 2019**).

Candidatus liberibacter : phytopathogènes, principalement transmis par des insectes vecteurs, les psylles (**Wang, N et al., 2017**).

b)- β -protéobactéries : regroupe différents organismes qui colonisent divers environnements : sol, eau... Parmi les phytopathogènes qui appartiennent à cette classe on trouve :

- *Herbadipirillum seropeicae* : généralement bénéfique, mais peut provoquer dans certaines conditions des symptômes de nécrose foliaire et flétrissement.
- *Burkholderia glumae* : provoque la maladie de la fausse-adurée chez le riz, caractérisée par une pourriture des grains et des taches folioles (**Lee, H et al., 2016**).

c)- γ -protéobactéries : les espèces de cette classe occupent de nombreux habitats tels que les eaux salées et douces, sols, plantes, animaux et humains, peuvent aussi survivent dans des milieux extrêmes. Les principaux phytopathogènes sont :

- *Ralstonia solanacearum* : affecte de nombreuses plantes, notamment les tomates, pommes de terre, banane et tabac, causant la flétrissure bactérienne (**Genin, 2010**).
- *Pectobacterium carotovorum* : agent causale de la pourriture molle (**Latour, X et al., 2008**).

2-2) Bactéries phytopathogènes à Gram positif : sont réparties dans deux grands groupes les Firmicutes (Ex : *Bacillus megaterium* et *pumilus*, *Clostridium*) Actinobacteria

(*Clavibacter michiganensis*, *Nocardia*, *Streptomyces*) ainsi que les Mollicutes (*Candidatus phytoplasma*) (Cooper, 2006).

3- Principaux symptômes des bactérioses végétales

Pour que la maladie se manifeste, il doit y avoir le concours de 3 facteurs majeurs : une plante susceptible d'être un hôte, un agent pathogène virulent, des conditions environnementales favorables à la croissance de l'agent pathogène, et le temps pour que la maladie se développe.

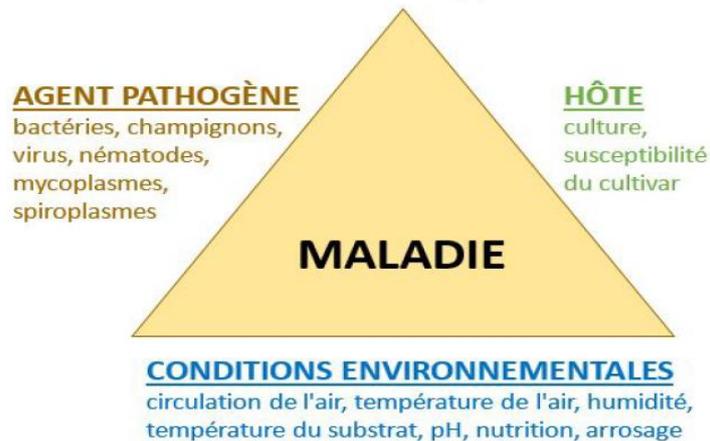


Figure 2 : Triangle d'une maladie végétale (Kilalo, 2015).

Les symptômes macroscopiques ou morphologiques d'une maladie végétale peuvent être classés comme suit :

- a) nécrotiques,
- b) hypoplasiques
- c) hyperplasiques (Narla, 2015).

a)-Nécroses : la dégénérescence des tissus est localisée. Comprend des tâches foliaires, brûlures, pourritures, etc.

a-1) Flétrissement : parmi les symptômes de nécrose, le flétrissement est la perte de pression de turgescence dans une plante menant à la perte temporaire ou permanente de feuilles, pousses, ou des plantes entières pour cause de manque d'eau ou d'infection par différents agents pathogènes. Exemples : Fusariose de la tomate, flétrissement bactérien.

a-2) Tache : c'est une lésion précise, localisée, ronde régulière, souvent avec une bordure de couleur différente, caractérisée quant à l'emplacement (tâche des feuilles, tâche des fruits) et la couleur (tâche brune, tâche noire). Exemples : tâche grise de la feuille de tomate, tâche noire de la rose, tâche angulaire de feuille de haricots.

a-3) Brûlure: coloration soudaine ou totale et mort d'une grande surface d'une feuille, repousses, tiges ou de la plante entière, généralement de jeunes tissus sont attaqués, le nom de la maladie va souvent de pair avec le nom de l'hôte et la partie attaquée, brûlure de fleur, brûlure des rameaux, brûlure de pointe/bout.

a-4) Pourriture: les pourritures: se réfèrent à la décomposition et la putréfaction de cellules, plus tard de tissus et d'organes. La pourriture peut être sèche, aqueuse ou pâteuse comme la pourriture bactérienne de la molle. Certains genres provoquent des pourritures molles qui se manifestent par un ramollissement et effondrement des tiges et des racines, accompagnés d'une odeur désagréable.

Les maladies de la pourriture molle sont causées par des agents pathogènes qui sécrètent des enzymes capables de décomposer les structures de la paroi cellulaire, détruisant ainsi la texture du tissu végétal, c.-à-d. que le tissu végétal devient macéré (molle et aqueuse). Les pourritures molles surviennent fréquemment sur les légumes charnues comme la patate, la carotte, le piment-poivron, la courge et la tomate.

Flétrissement subite ou la mort de jeunes bourgeons, des fleurs ou des jeunes fruits; incapacité de produire des fruits ou des graines telles que Botrytis de roses, des oignons, des fraises, brûlure du riz cf. *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*).

a-6) Chancre : une zone morte définie, souvent enfoncée ou enflée et craquelée sur une tige, une branche, un tronc, un tubercule ou une racine entourée par des tissus vivants.

Les nécroses et lésions foliaires : peuvent provoquer des nécroses (zones de tissus mortes) sur les feuilles des plantes. Ces lésions peuvent être de différentes formes telle que des taches brunes, des bords noirs ou zones de tissus desséchés.

Le flétrissement et dépérissement des plantes : en perturbant le système vasculaire qui empêche la circulation de l'eau et des nutriments dans les tissus végétaux. Cela entraîne un flétrissement avec des feuilles qui se fanent et qui finissent par mourir.

Les taches et la pourriture des fruits : les infections de protéobactérie peuvent également affecter les fruits en provoquant des taches et des pourritures et une détérioration des fruits. Le fruit infecté peut présenter des zones molles, décolorées et pourris ont des lésions visibles.

La déformation et le retard de croissance : certaines bactéries peuvent entraîner une déformation et un retard de croissance des organes végétaux (feuilles, fruits).

b)- Hypoplasie ; défaillance des plantes ou d'organes à se développer pleinement, c.-à-d. d'obtenir la taille normale. La taille anormale et la coloration pâle est le symptôme le plus fréquent de hypoplasie. D'autres symptômes incluent les suivants:

Nanisme : sous-développement de la plante ou de certains de ses organes ;

Rosettes : raccourcissement des pousses et des branches, produisant un mode de croissance du bouquet dont l'exemple est la rosette d'arachide.

Albication est la répression complète de couleur provoquée par des virus, des bactéries, des champignons et la carence en fer menant à l'albinisme ou le blanchiment des tissus foliaires.

Chlorose: jaunissement ou blanchiment des tissus naturellement verts causé par une défaillance partielle ou complète de la chlorophylle pour se développer, symptômes pouvant se développer en raison de différentes maladies.

Mosaïque: coloration anormale par jaunissement, rougissement, bronzage, ou violâtre dans des zones localisées de feuilles où la chlorophylle a été détruite.

c)- Hyperplasiques : l'hyperplasie est le surdéveloppement (en taille et couleur) des parties de la plante. Hypertrophie d'autre part est le développement exclusif d'un organe d'une plante dû à un excès d'hyperplasie et ils comprennent les cas suivants:

Boucles de feuille : Surcroissance de tissu sur un côté d'une feuille ou d'un pétale résultant en laminage de feuilles.

Les tumeurs : symptômes provoqués par des agents pathogènes qui stimulent la multiplication incontrôlée des cellules végétales, entraînant la formation de grandes structures anormales.

4- Moyens de lutte et prophylaxie

Jusqu'à présent, aucun moyen de lutte n'est directement efficace contre les pathologies bactériennes des cultures. En général, la gestion de ces bactérioses passe par la mise en place d'un ensemble d'actions ayant pour but soit la réduction des niveaux d'inoculum bactérien de départ ou bien la recherche de conditions les moins favorables à la multiplication et transmission de la maladie. Cette démarche se fait par l'établissement de différentes techniques culturales préventives, d'outils chimiques, génétiques et biologiques, ainsi que la combinaison de plusieurs de ces méthodes (**Rousselle, 1996**).

4-1) Pratiques culturales et préventives

La lutte contre les différentes maladies végétales implique d'abord d'établir des mesures prophylactiques qui s'appuyant essentiellement sur la prévention. Ainsi que par une contribution d'éléments précis permettant d'évaluer et de gérer les risques sanitaires liés aux sources potentielles de survie et de contamination dans l'environnement comme les systèmes aquatiques, sol et substrat et plantes hôtes (**Viniflor, 2006**). Les principales recommandations en matière de phytoprotection sont résumées comme suit :

- ✓ désinfection et nettoyage du matériel agricole après usage (machines, équipements, magasins, plateaux de stockage, boîtes et matériaux d'emballage) (**Van der Wolf et al., 2005, Le Hingrat et al., 2012**).
- ✓ utilisation d'organes de propagation et de matériel végétal sain et exempt de maladies (semences, plants, greffons, boutures...) (**Asdrubal, 2010**).
- ✓ éviter les conditions humides qui favorisent la contamination par l'intermédiaire des lenticelles (**Hélias et al., 2000**).
- ✓ empêcher l'introduction, dans une zone donnée, de nouveaux pathogènes.
- ✓ se débarrasser des plants infectés et mauvaises herbes réduisant ainsi tout risque de contaminations (**Elphinstone et Pérombelon, 1986**).
- ✓ récolter à maturité et avec soins en évitant les blessures qui constituent des portes d'entrée du pathogène (**Pérombelon et Kelman, 1980**).
- ✓ (**Pérombelon et Kelman, 1980**).
- ✓ réduction des vecteurs susceptibles de transmettre les germes, comme les insectes et vers (**Molina et al., 1974**).
- ✓ Le séchage permet de bloquer le développement des bactéries et donc réduire les sources d'inoculum dans les produits destinés à être replantés (**Dionne, et al., 2017**).
- ✓ Pratique des rotations de culture sur 3 ans au minimum ainsi que l'irrigation goutte à goutte (**Kerlan et Tribodet, 1996**).
- ✓ Fertilisation azotée et défanage de récolte (**Banville, 2008**).

4-2) Lutte chimique

Appliqué pour la première fois, il y'a près de 140 ans, avec l'utilisation de la bouillie bordelaise par **Milliardet (1985)**.

La lutte chimique contre la flore phytopathogène bactérienne, dépend de plusieurs stratégies basées sur l'éradication de l'agent pathogène et/ou la création de conditions

environnementales défavorables pour le développement de la maladie, en modifiant un ou plusieurs facteurs clefs comme le pH, température de conservation... (Czajkowski *et al.*, 2011).

Dans le cadre de la lutte contre les phytopathogènes, les produits les plus utilisés sont les herbicides, fongicides, insecticides et nématicides qui présentent également une action antivirale. Avec l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques, ça implique que la plupart des outils de lutte chimique ne sont pratiquement pas dirigé contre les bactéries.

Cependant, à l'échelle de laboratoire, de nombreux produits ont montré leur efficacité lors d'essais expérimentaux, à l'instar de l'utilisation de désinfectants à base d'ammonium quaternaire et d'iodophores, efficace contre la pourriture annulaire causée par *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* (Van der Wolf *et al.*, 2005). Ou bien, l'action des sulfites et nitrates de calcium contre les maladies de pourriture molle et jambe noire (*Pectobacterium* et *Dickeya sp*) (Mantsebo, *et al.*, 2014).

Par ailleurs, les solutions salées comme le chlorure d'aluminium ou le métabisulfite de sodium (Yaganza *et al.*, 2004), ainsi que des peptides de synthèse (Kamysz *et al.*, 2005) sont capables d'inhiber la croissance des *Pectobacteria* en altérant l'intégrité cellulaire et la croissance de ces pathogènes (Latour *et al.*, 2008).

4-3) Lutte biologique :

Cette méthode de lutte est basée sur l'usage des antagonistes qui ciblent les pathogènes soit directement soit via des mécanismes tels que l'antibiose. Ce mécanisme est réalisé grâce aux substances antibactériennes produites par les antagonistes qui ont la capacité de limiter le développement du pathogène

- Les bactéries lactiques produisent des acides organiques, de peroxyde d'hydrogène et des sidérophores qui sont capables d'inhiber les pathogènes (Lefort, 2010).
- Les *Pseudomonas* jouent un rôle majeur dans le bio-contrôle, cela revient à leurs capacités de se développer dans les rhizosphères et leurs production des métabolites variés comme : les sidérophores et les antibiotiques qui entrent en compétition en nutriments avec les pathogènes qui colonisent la rhizosphère (Lefort, 2010).

- Utilisation de biopesticides : ce sont des produits dérivés de plantes, champignons ou bactéries tels que l'extrait de neem, l'huile romarin, l'extrait d'ail.
- Des champignons antagonistes comme *Trichoderma spp*, ont été efficaces pour lutter contre *Ralstonia solanacearum*, ils sont directement appliqués sur les racines ou comme un traitement du sol (**Lefort, 2010**).

4-4) Lutte génétique :

- Plantes résistantes : elles peuvent être obtenues soit par sélection naturelle ou par modification génétique.
- Manipulation génétique de la bactérie : elle consiste à modifier le génome pour réduire la virulence pour la rendre détectable.
- Utilisation de diverses techniques comme la sélection de variétés résistantes, la transgénèse, l'interférence ARN et la thérapie phagique.

Cette sélection de variétés résistantes est une technique de lutte génétique courante qui consiste à identifier et à cultiver des variétés de plantes qui sont naturellement résistantes aux maladies (**Samaliev et Andreev, 1998**).

On trouve certaines variétés qui sont moins sensibles à la pourriture molle. En effet une étude a montré que Ackersegen est la souche de pomme de terre la plus sensible tandis que Kerpondy est la plus résistante (**Moreau, 1980**).

Le clonage du gène AHL LACLONASE de *Bacilles spp* dans les plantes de pomme de terre transgéniques a une résistance élevée contre *Pectobacterium carotovorum* (**Carreras, 2011**).

Chapitre II: Description des principales bactéries phytopathogènes.

II.1 Taxonomie

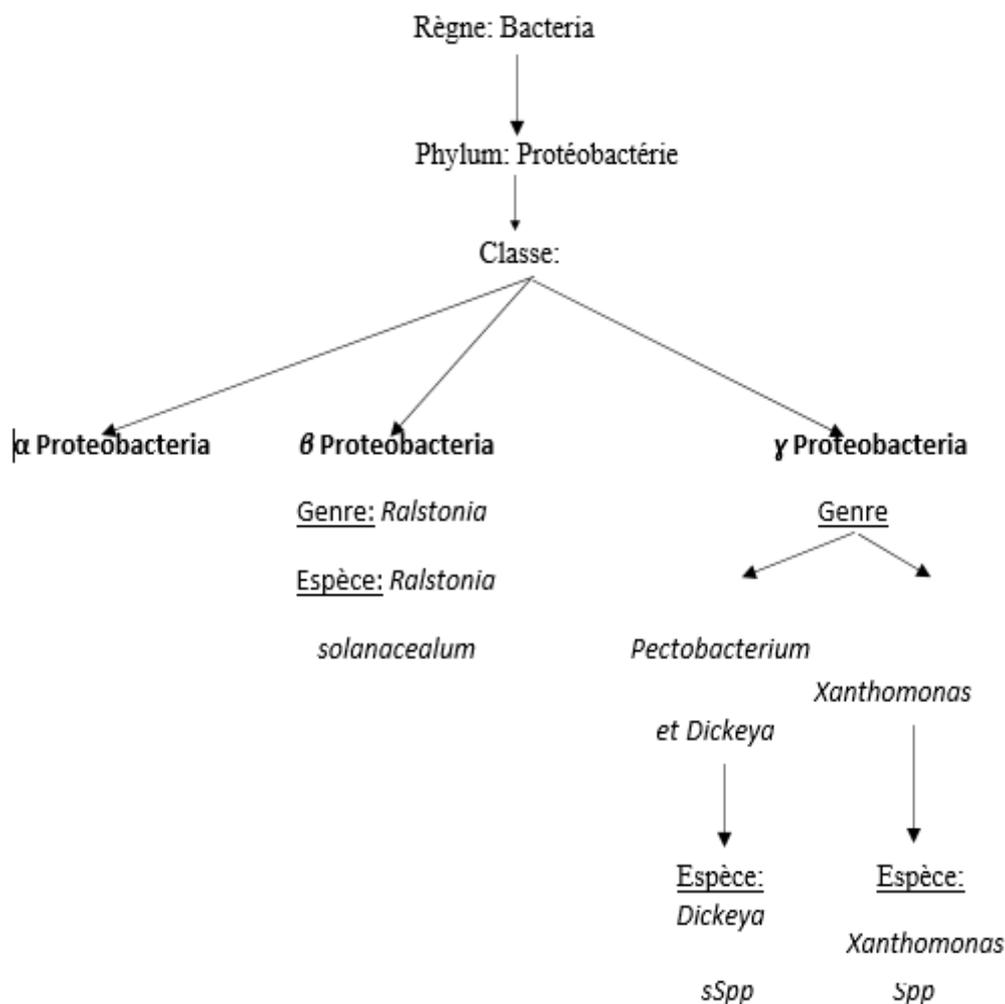


Figure 3 : classification taxonomique des bactéries phytopathogènes

II.2 *Ralstonia solanacearum* (pourriture brune)

II.2.1 Description

Ralstonia solanacearum est considéré comme l'un des agents pathogènes les plus destructeurs et virulents au monde. Plus de 250 espèces végétales sont touchés par cette bactérie transmissible par le sol, causant la maladie du flétrissement bactérien (pourriture brune), impactant une large gamme de végétaux dont de nombreuses cultures d'intérêt économique comme la tomate, pomme de terre, aubergine, banane, poivrons, caféiers et le tabac (Genin, 2010).

R. solanacearum est une espèce très diversifiée, subdivisée en plusieurs groupes de phénotypes et génotypes, eux-mêmes subdivisés en races, bio vars et pathotypes en fonction de leurs propriétés physiologiques et pathogènes. Cette largediversité a conduit à la création de plusieurs sous-espèces et variétés définies en fonction de leur géographie, leur hôte ainsi que leur pathogénicité (Fegan et al. 2005).

Ce pathogène a été identifié pour la première fois au début du 20ème siècle, défini comme un complexe d'espèces qui peut être divisé en quatre phylotypes correspondant à leur origine géographique c'est-à-dire les phylotypes I, II, III, IV respectivement à l'Asie, Amérique, Afrique, et l'Indonésie (Ailloud et al., 2015).

II.2.2 Cycle de vie

Le processus dont lequel cette bactérie est capable de se développer commence par la pénétration du germe tellurique au niveau des racines grâce aux ouvertures ou blessures (Kelman et Sequiera, 1965). Colonisant les espaces intercellulaires par la suite les vaisseaux du xylème (Vasse et al. 2015), ou elle se multiplie et synthétise des exo-polysaccharides (EPS) et des enzymes de dégradation des parois. Empêchant la circulation de l'eau dans la plante alors elle provoque le flétrissement des feuilles et jaunissement jusqu'à la mort de la plante.

Cette bactérie se transmet aussi de racine à racine (Kelman and Sequiera, 1965), une dissémination due à l'homme grâce aux outils contaminés, par les eaux de ruissellement et d'irrigation, aussi par insectes comme la maladie de Moko (Buddenhagen et Elsasser, 1962).

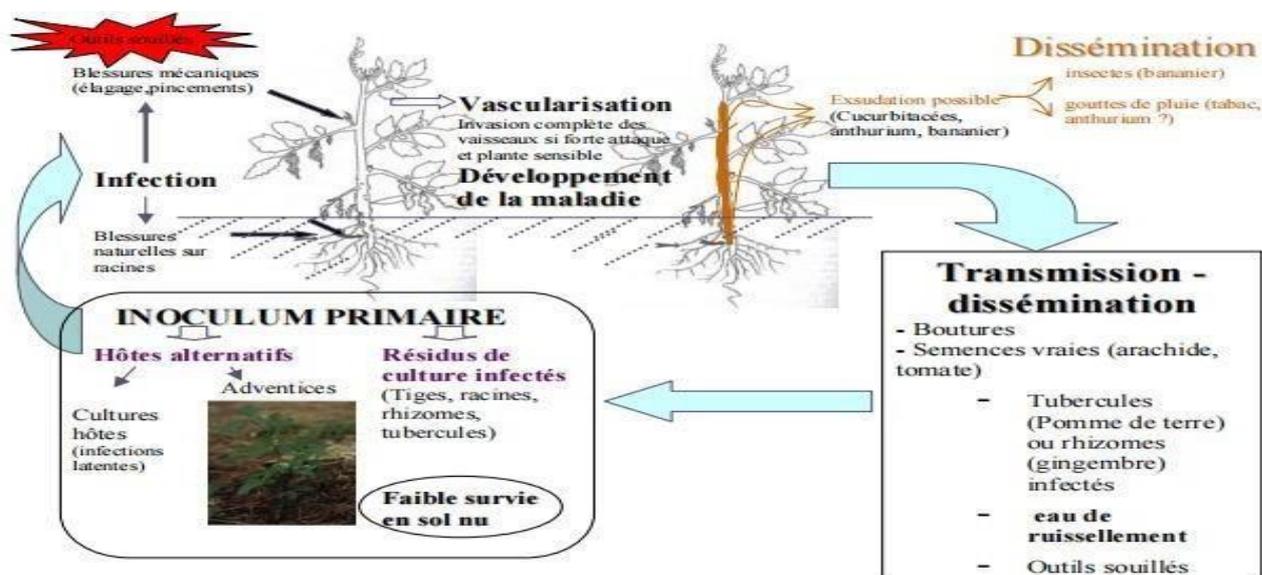


Figure 4 : Cycle infectieux de *Ralstonia solanacearum* (Wicker, 2004).

II.2.3 Symptômes

R. solanacearum est une bactérie qui induit plusieurs symptômes que ça soit sur végétation (au champ) ou sur tubercule (condition de conservation).

Sur végétation : en végétation on remarque le flétrissement des feuilles, dessèchement des tiges avec développement de lésions brun foncé ou noires, nécrose des feuilles et pourriture des racines (Lebas, 2010).



Figure 5 : Symptômes de *Ralstonia solanacearum* sur végétation.

Sur tubercule : la manifestation de la maladie sur les tubercules se caractérise par le noircissement des tubercules, les lésions peuvent être superficielles ou pénétrer profondément dans la chair de la pomme de terre, ce qui rend les tubercules impropres à la consommation humaine. Généralement les symptômes peuvent être visibles ou non à partir de l'état du développement de la maladie similaire à ceux de la pourriture annulaire (*Clavibacter michiganensis* sub sp. *sepedonicus*) (Lebas, 2010).



Figure 6 : Symptômes de *Ralstonia solanacearum* sur tubercules.

II.3 *Xanthomonas spp*

II.3.1 Description :

Xanthomonas spp se sont des bactéries à Gram négatif obligatoirement aérobie, en forme de bâtonnet (**Gancalves et Rosato, 2002**), possédant un flagelle polaire unique leur donnant une mobilité pour la nage dans des milieux liquide (**Rajagopal et al., 1997**). Les espèces de ce genre colonisent les eaux, sols et tissus végétaux (**Li et al., 1990**). Une définition était faite principalement par Morse en 1995, comme étant une infection qui apparaît récemment dans une population. La majorité d'entre elles sont causée par des bactéries multi-résistantes (**Jones et al., 2005**).

Connues pour causer des maladies chez la plante, *Xanthomonas spp* comprend plus de 100 espèces différentes, chacune est typiquement adaptée pour infecter un type de plante précise et spécifique tel que *Xanthomonas campestris* et *Xanthomonas citri* qui infectent les agrumes, *Xanthomonas oryzae* qui infecte le riz, *Xanthomonas arboricola* qui infecte les pruniers et *Xanthomonas euvesicatoria* qui infecte à son tour la tomate et beaucoup plus le poivron.

II.3.2 Cycle de vie et mode de transmission

Xanthomonas, vit de façon épiphyte pendant plusieurs semaines à la surface des feuilles hôtes et non hôtes pour se multiplier sans provoquer de symptômes (**Pernezny et Collins, 1997**). Les conditions au développement de la maladie favorisent sa propagation en colonisant principalement les parties aériennes des plantes sans causer de symptômes (**Kuan et al, 1986**).

Cette bactérie pénètre par des blessures ou par entrées naturelles et colonise l'intérieur des tissus (Hayward, 1974), et cela par le processus infectieux des bactéries pathogènes qui commence par la rencontre de ces derniers avec leur plante hôte grâce aux exopolysaccharides et lipopolysaccharides extracellulaires qui favorisent leur adhésion à leur hôte (**Jacques, 1996**).

Transmission par des vecteurs tels que les pucerons, cicadelles, thrips. Des températures qui se varient entre 25 et 28 °C favorisent aussi leur développement et qui sera lente (Hunter et al. 1975). Néanmoins sa survie sur les feuilles dépend des conditions environnementales avec de fortes valeurs d'humidité relative (HR > 90%). Contrairement à sa survie dans le sol est très faible deux semaines maximum (**Bashan et al, 1982**).

II.3.3 Symptômes

Les symptômes de *Xanthomonas spp* peuvent varier selon les espèces et les plantes hôtes affectée.



Figure 7 : Symptômes de *Xanthomonas* sur végétation.

Sur végétation : les symptômes de cette maladie provoquent des taches foliaires à brun sur les feuilles, dessèchement et chute prématurée des feuilles, entraînant le brunissement des vaisseaux conducteurs de sève.

Sur tubercule : apparition de taches brunâtre sur la surface des tubercules, détérioration de la qualité du tubercule.



Figure 8: Symptômes de *Xanthomonas* sur tubercules.

II.4 *Pectobacterium* et *Dickeya spp* (pourriture molle)

II.4.1 Description

Les pathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* sont des bactéries responsables de la pourriture molle chez de nombreuses plantes cultivées. Ils appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae, précédemment connus sous le nom d'Erwinia comprenant plusieurs pathogènes. Ces bactéries sont généralement présentes dans les sols et eaux souterraines qui

ont la capacité de vivre en saprophytisme ou épiphytisme jusqu'à la rencontre d'un hôte potentiel, peuvent causer des infections chez un large éventail de plantes, y compris les cultures légumières et ornementales notamment les pommes de terre. Parmi les conditions environnementales favorisant leur croissance et les températures modérées et une humidité élevée.

II.4.2 Symptômes

La pourriture molle et jambe noire est une maladie bactérienne qui affecte les plantes au champ, tubercules et au cours du stockage.

Sur végétation : la maladie se manifeste en condition sèches, les symptômes ont tendance à conduire à un retard de croissance, jaunissement et dessèchement des tiges et feuilles (**Humphris et al. 2015**). Une mauvaise alimentation en eau entraîne un flétrissement du feuillage, un jaunissement et enroulement des feuilles. Les plantes atteintes sont facilement visibles contrairement aux pourritures internes des tiges visibles lors d'attaque de certaines souches (**Khayi, 2015**).



Figure 9 : Symptômes sur végétation (jambe noire) et sur tubercule (pourriture molle).

- Sur tubercules : on remarque une pourriture molle interne, symptômes clairs brunissent rapidement (**Khayi, 2015**).

II.4.3 Cycle de vie et mode de transmission

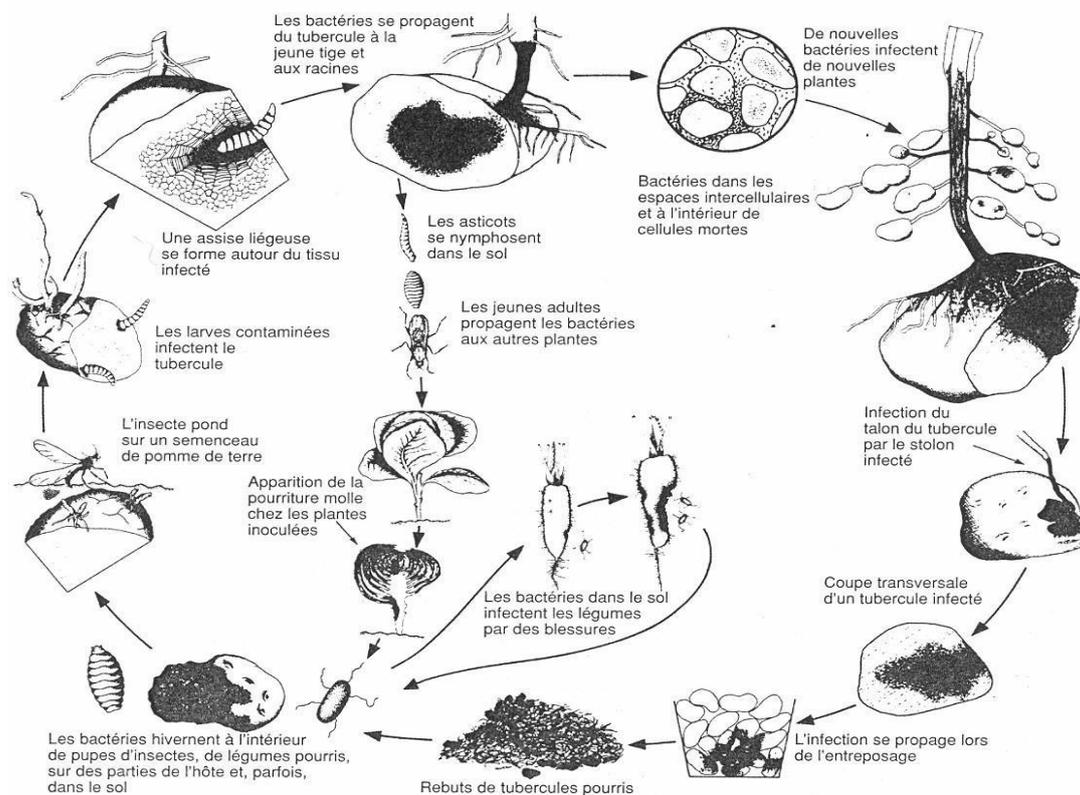


Figure 10 : Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne (Yaganza, 2005).

Cette bactérie peut survivre plusieurs mois sur les débris végétaux, racines, hôte, et dans le sol. Pénètre la plante par des blessures ou ouvertures naturelles (stomates et lenticelles), ou adhèrent à la surface. On les retrouve dans les eaux d'irrigations, et sont disséminer par divers insectes leur assurant leur survie en hiver.

Chapitre III : Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé dans laboratoire de microbiologie appliquée (LMA) au sein de l'université de Bejaia, campus Targa-Ouzemour durant la période allant d'Avril à Juin 2023.

III.1 Matériel :

III.1.1 Matériel de laboratoire :

Au fur et à mesure de l'avancement du travail, les équipements utilisés seront progressivement introduits.

III.1.2 Matrice végétale :

Echantillons végétaux de pommes de terre, tomates et carottes.

III.1.3 Matériel bactérien :

Plusieurs souches bactériennes isolées et identifiées ultérieurement.

III.2 Méthodes :

III.2.1 Echantillonnage :

Des prélèvements ont été réalisés au niveau du marché bi-hebdomadaire de l'Edimco-ville de Béjaia, les échantillons récoltés sont principalement des tubercules de pomme de terre, ainsi que des légume-racine de carottes et fruits de tomates infectés. Tous les échantillons sélectionnés présentent des symptômes d'infection microbienne visibles, certains sont typiques (macération des tissus, nécroses, aspect spongieux, couleurs brunes-crèmes et odeurs caractéristiques...). D'autres tubercules présentent aussi des blessures et parties endommagées dues à l'action d'engins mécaniques.

93 échantillons végétaux (48 pommes de terre, 30 tomates et 15 carottes) ont été sélectionnés étiquetés et numérotés, chacun dans un sac de congélation afin de minimiser tout risque de contaminations croisées.

La récolte a été réalisée sur plusieurs séries des différents lots, dans le marché de l'Edimco le mois d'avril 2023. Tous les tubercules ont été rangés dans de petits sachets séparément pour éviter la contamination et le mélange des germes.



Figure 11 : échantillons de pommes de terre et tomates sur le site de prélèvement (lots 1 et 2).

III.2.2 Isolement :

Le prélèvement et l'isolement de bactéries à partir des tissus infectés sont réalisés selon les protocoles modifiés et combinés de **Hyman *et al* (1998)**, **Lacroix et Vézina (2003)** et **Kotan et Sahinet (2006)**, comme résumé dans le schéma suivant :

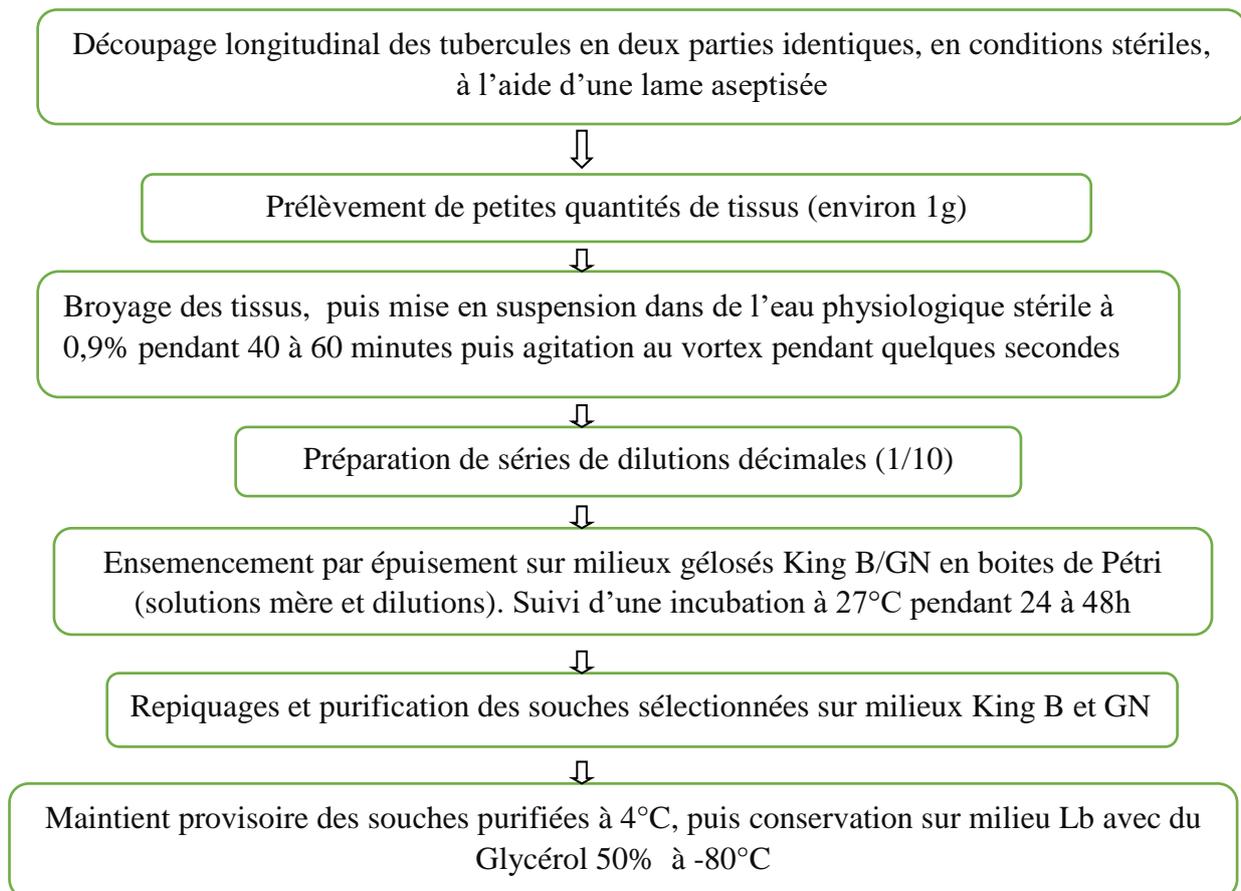


Figure 12 : Protocole de prélèvement et isolement (**Lacroix et Vezina, 2003**)

Chapitre III : Matériel et méthodes

A noter que le même mode opératoire est appliqué également aux échantillons de tomates et carottes (à l'exception que les fruits de tomates ne sont pas découpés en parties vu leur nature juteuse).



Figure 13 : Photographie des tubercules infectés (tomate, pomme de terre, carotte).



Figure 14 : Solutions mères et dilutions

2-Tests d'identification microbiologique et biochimique

Après ensemencement, les colonies bactériennes sélectionnées sont purifiées et conservées en vue de réaliser une galerie d'identification. Afin d'identifier les souches observées, il est nécessaire de passer par plusieurs étapes telles que les tests biochimiques. Les tests biochimiques constituent une approche classique d'identification des bactéries, utiles pour la détermination des quelques espèces et sous espèces.

III.2.3 Examen macroscopique :

Visuellement, on peut observer différents aspects culturels, prenant en compte :

- L'aspect et forme des colonies
- Leur couleur
- La taille

Examen microscopique :

L'observation microscopique des cultures bactériennes est réalisée par deux méthodes : coloration simple au bleu de méthylène et une coloration différentielle (Gram).

Coloration de Gram :

Considérée comme un test clé pour l'identification bactérienne, cette technique mise au point en 1882 par le bactériologiste Hans Christian Gram, a pour but de distinguer entre les espèces bactériennes sur la base de la composition et propriétés physico-chimiques de leur paroi, en deux types : les bactéries Gram positif, colorées en violet, et les Gram négatif en rose.

a)- Préparation de la lame : un frottis est réalisé à partir de colonies issues de cultures fraîches âgées de 18 à 24h, puis étalé et fixé à la chaleur de la flamme du bec bunsen.

b)- Coloration :

- coloration au Violet de Gentiane durant 1 min ;
- rinçage à l'eau de l'excès de colorant ;
- mordantage au Lugol pour stabiliser la coloration durant 15 à 20 secondes ;
- lavage à l'eau afin d'éliminer l'excès du complexe Lugol-Violet de Gentiane ;
- décoloration rapide à l'éthanol goutte à goutte, puis rinçage sous un filet d'eau ;
- contre coloration avec de la fuchsine basique pendant 1 min ;
- rinçage à l'eau puis séchage de la lame.

Chapitre III : Matériel et méthodes

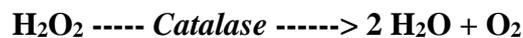
c)- **Observation microscopique** : Après ajout d'une goutte d'huile a immersion, l'observation est réalisée au grossissement 100 sous microscope optique équipé d'une camera Euromex CMEX Pro 3.

Coloration simple au bleu de méthylène : préparation d'un frottis, coloration au bleu de méthylène pendant 1 min, puis rinçage, séchage et observation sous microscope.

III.2.4 Identification biochimique

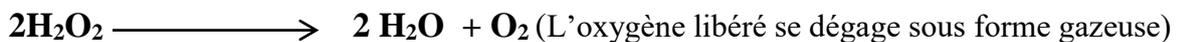
c)-Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



Le test consiste à mettre un amas de colonies bactériennes en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 30 volumes). Une réaction positive se traduit par la formation instantanée de bulles et d'effervescence, ce qui indique la dégradation, via l'enzyme catalase, du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène gazeux (**Mezaache, 1997**).

a) **Principe** : La catalase est l'enzyme responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène, selon la réaction suivante :



b) **Technique** : Sur une lame porte-objet, dépôt d'une goutte d' H_2O_2 (à 30 volumes) ; puis ajout d'un amas de colonies bactériennes prélevé à partir d'une culture jeune.

c) **Lecture** : La présence de la catalase se traduit par un dégagement immédiat de bulles gazeuses (**Lacroix et Vézina, 2003**).



Test au KOH

Principe : test rapide permettant de différencier les bactéries Gram + des Gram - en se basant sur les caractéristiques de leurs paroi cellulaire sans passer par préparation pour observation microscopique.

Mode opératoire :

- Une goutte d'une solution de KOH à 3% est déposée sur une lame propre.
- A l'aide d'une anse de platine stérile, prélever un amas de colonies bactériennes et mélanger doucement avec le KOH, durant une minute.

Lecture :

- Si la bactérie est Gram- : l'aspect de la colonie devient visqueux et gélatineux
- Si la bactérie est Gram+ : l'aspect reste dans son état initial

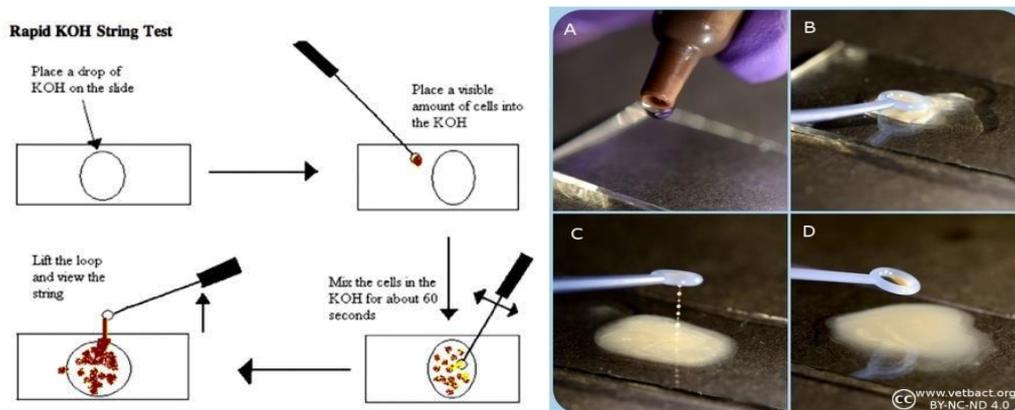


Figure 15 : schématisation des étapes du protocole du test KOH

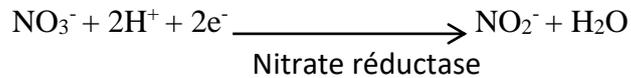
Ensemencements sur milieux gélosés

Après les tests à observation immédiate, d'autres tests nécessitant une incubation sont réalisés.

- 48 H, qui se réalise sur tubes : TSI (triolet suggère iron.), citrate de Simmons, BN (bouillon nitraté), mannitol mobilité.

II-4-3-2) Réduction des nitrates

a) **Principe :** L'enzyme nitrate réductase est synthétisée par la plupart des bactéries anaérobies, elle réduit le nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-) selon la réaction suivante :



Elle peut parfois se poursuivre jusqu'à la dénitrification complète avec formation d'ammoniaque ou d'azote comme suit :



b) **Technique :** Les colonies bactériennes sontensemencées dans des tubes à essai contenant 5 ml d'eau peptonée nitrée puis incubée à 27°C pendant 24 à 48 heures. Les nitrites (NO_2^-) sont ensuite recherchés par adjonction de 3 à 4 gouttes de réactifs de révélation A (acide sulfanilique) et B (N, N-diméthyle naphthylamine).

c) **Lecture :-** Apparition d'un trouble dans les tubes incubés

- une couleur rouge sang apparaît après ajout des réactifs A et B

Si le milieu ne change pas de couleur, plusieurs possibilités existent:

- 1) Les bactéries possèdent la nitrate réductase qui ramène également le nitrite plus loin à l'ammoniaque ou diazote.
- 2) Ils possèdent d'autres enzymes ramenant le nitrite à l'ammoniaque
- 3) Les nitrates ne sont pas réduits par les bactéries.

Dans ce cas une pincée de poudre de zinc est ajoutée aux tubes

- L'apparition d'une couleur rose ou rouge met en évidence la présence de nitrate (NO_3^-) intacts dans le milieu donc la bactérie ne possède pas le nitrate réductase.

- Si le milieu ne se colore toujours pas, cela signifie que la bactérie a réduit les nitrites (NO_2^-) en azote (N), alors la bactérie possède le nitrate réductase (**Prescott, 2002**).

III.2.4.5 Mannitol mobilité

Test utilisé pour évaluer la capacité d'une souche bactérienne à fermenter le mannitol et à mettre en évidence la mobilité cellulaire.

Mode opératoire :

- Préparation du milieu.

Chapitre III : Matériel et méthodes

- Inoculation : à l'aide d'une anse de platine stérile on prélève une colonie bactérienne pure et faire une piqûre centrale.
- Incubation à 28 °C pendant 24-48h.

Résultat :

- Virage de couleur vers le jaune : capacité de fermenter le mannitol (mannitol+).
- Pas de virage de couleur : les bactéries sont incapables de fermenter le mannitol (mannitol -).
- Si la croissance des bactéries est sur la piqûre centrale : les bactéries sont immobiles.
- Si y a une croissance même sur les bords : les bactéries sont mobiles.

III.2.4.7 Croissance sur gélose au citrate de Simmons :

Le citrate de Simmons est utilisé pour étudier la capacité des bactéries à utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Il est basé sur la recherche de l'enzyme citrate perméase.

Mode opératoire :

- Inoculation : à l'aide d'une anse de platine stérile on prélève des colonies et étaler sur la surface du milieu.
- Incubation de 24- 48 H à 28 °C.

Résultat : Si le milieu prend une coloration bleue : Citrate +.

Si le milieu reste vert : Citrate -.

III.2.4.8 TSI (Triple Sugar Iron)

Ce milieu est utilisé pour différencier les bactéries en fonction de leur capacité à fermenter les sucres (glucose, saccharose et lactose) et à produire du gaz et des sulfures (H₂S).

Mode opératoire :

- Inoculation : à l'aide d'une anse de platine un amas de colonies bactériennes est prélevé et ensemencé en piquant le culot, puis par stries sur la surface.

Chapitre III : Matériel et méthodes

Résultat : Fermentation du glucose :

Culot rouge : glucose non fermenté.

Culot jaune : glucose fermenté.

- Fermentation du lactose et saccharose :
 - Pente inclinée rouge : lactose et saccharose fermentés.
 - Pente inclinée jaune : lactose et saccharose non fermentés.
- Production du gaz : décalage de la gélose vers le haut de tube.
- Production de H₂S : formation d'une coloration noire entre le culot et la pente.

III.3 Résultat :

Notre étude s'est portée sur un ensemble de 93 échantillons composés en majorité de tubercules de pommes de terre (48 échantillons), et qui présentent des symptômes plus au moins typiques de macération bactérienne, en plus des échantillons de tomates (30 échantillons) et carottes (15 échantillons). Après criblage et une série de tests d'identification, beaucoup d'isolats sont éliminés. La culture sur milieu King B a permis de sélectionner d'abord les souches appartenant aux *Pectobacterium sp.*

Ainsi, en se basant sur les critères phénotypiques et les observations macroscopiques, les colonies sélectionnées présentent le profil suivant (**Figure 16**) :

- ✓ Couleur blanchâtre avec une consistance crémeuse.
- ✓ Surface lisse avec bords réguliers.
- ✓ Forme sont bombées à semi-bombée.
- ✓ Aspect irisé et translucide.
- ✓ suspensions homogènes sur bouillon.
- ✓ Certaines d'entre elles dégagent une forte odeur de pourriture.

La mesure des diamètres des colonies, qui est un outil non négligeable pour l'identification culturale macroscopique, n'a pas pu être réalisée pour toutes les souches, pour cause de croissance importante empêchant toute observation de colonies séparées et distinctes.

Certaines espèces et genres bactériens présentent des colonies similaires et peuvent être confondus, pour un œil non exercé, avec celles des *Pectobacterium* sur King B.

En plus des souches pectinolytiques, précédemment citées, nous avons isolé et purifié de nombreuses souches appartenant au genre *Ralstonia* (*R. solanacearum*), caractérisées par leur pigmentation tirant vers le rose. La particularité et le trait marquant de ces espèces est le fait qu'elles poussent d'abord les premières 24 heures après incubation, sous forme de colonies crémeuses de couleur blanchâtre, pour ensuite développer, après quelques heures une pigmentation caractéristique de couleur rose/rouge (selon les phénotypes, l'intégralité des colonies sont colorées ou bien des colonies avec un centre pigmenté). Cette aptitude culturale propre aux souches du genre *Ralstonia*, fait qu'il est aisé de les reconnaître après ensemencement sur milieu gélose.

Par ailleurs, d'autres colonies avec une pigmentation rouge sang ont été isolées.

Par ailleurs, le risque de contamination étant élevé, les contaminants les plus fréquemment observés sont les moisissures, levures, les *Pseudomonas* fluorescents, ainsi que certaines colonies à pigmentation rouge, présumée appartenant au genre *Serratia* produisant un pigment caractéristique la prodigiosine (Barnard *et al.*, 2007).

Cependant, l'aspect externe des cultures ne constitue pas toujours un critère d'identification décisive. A ce stade, l'identification morphologique est incomplète et sujette à caution.

Ainsi sur un total de 93 échantillons récoltés, nous avons sélectionné 28 isolats ayant le même profil morphologique que les *Pectobacteria*.

L'aspect des colonies isolées sur milieu King B et GN est représentés dans la figure suivante.

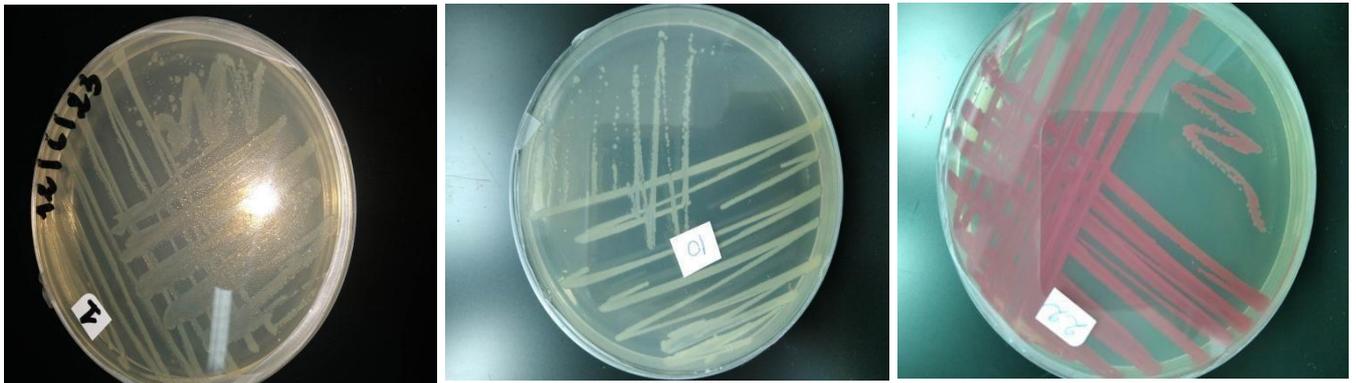


Figure 16 : Colonies typiques isolées sur milieu King B et GN

1-Identification préliminaire

Afin de trier les colonies sélectionnées et dans le but d'éliminer les isolats non correspondants, une première étape de tests s'avère nécessaire.

Après observation et coloration de Gram, la totalité des 28 isolats observés se présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles colorés en rose à Gram-négatif (**Figure 18**). Ce résultat est prévisible, en effet, la plupart des phytopathogènes de pommes de terre sont des bactéries à Gram négatif (Axelrod, 1988 ; Alfano et Collmer, 1996 ; Baraboteet *al.*, 2003 ; Bosgelmez-tinaz, 2003).

Bien que les cellules des *Pectobacterium* soient des bacilles longs (Rodriguez-Para et al., 2022), certaines de nos observations montre des coccobacilles et des bacilles courts agencés en paire. D'après Snaiki et al. 2006), certaines souches pectinolytiques peuvent présenter ces formes.

Concernant le test de la catalase, sur les 28 souches, la majorité a donné une réaction positive avec effervescence, seules trois isolats n'ont pas montré d'activité catalase.

Selon l'intensité du dégagement gazeux et sa spontanéité, 07 isolats des 28 restants ont eu une réaction un peu tardive et de plus faible intensité. Ainsi on peut classer les isolats en deux groupes : celles avec une très forte activité catalytique et d'autres ayant une moindre activité. On note aussi la présence de deux souches avec une activité catalase très élevée (tableau 1).

Observation de la morphologie de la cellule (Cocci, bacille, coccobacille).

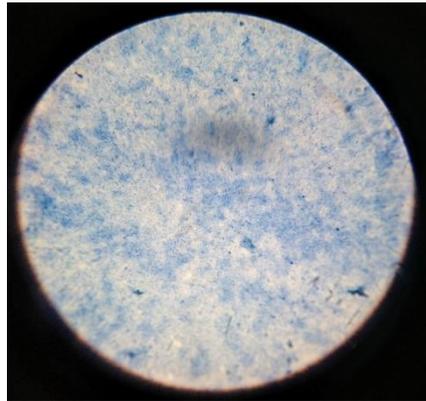


Figure 17 : Observation macroscopique (G : X100) de la coloration du bleu de méthylène.



Figure 18 : observation microscopique (G : X 100) de la coloration de Gram (négatif).

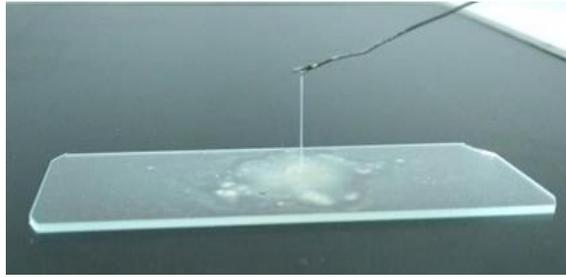


Figure 19 : Résultat positif pour le test au KOH (bactérie à Gram Négatif)

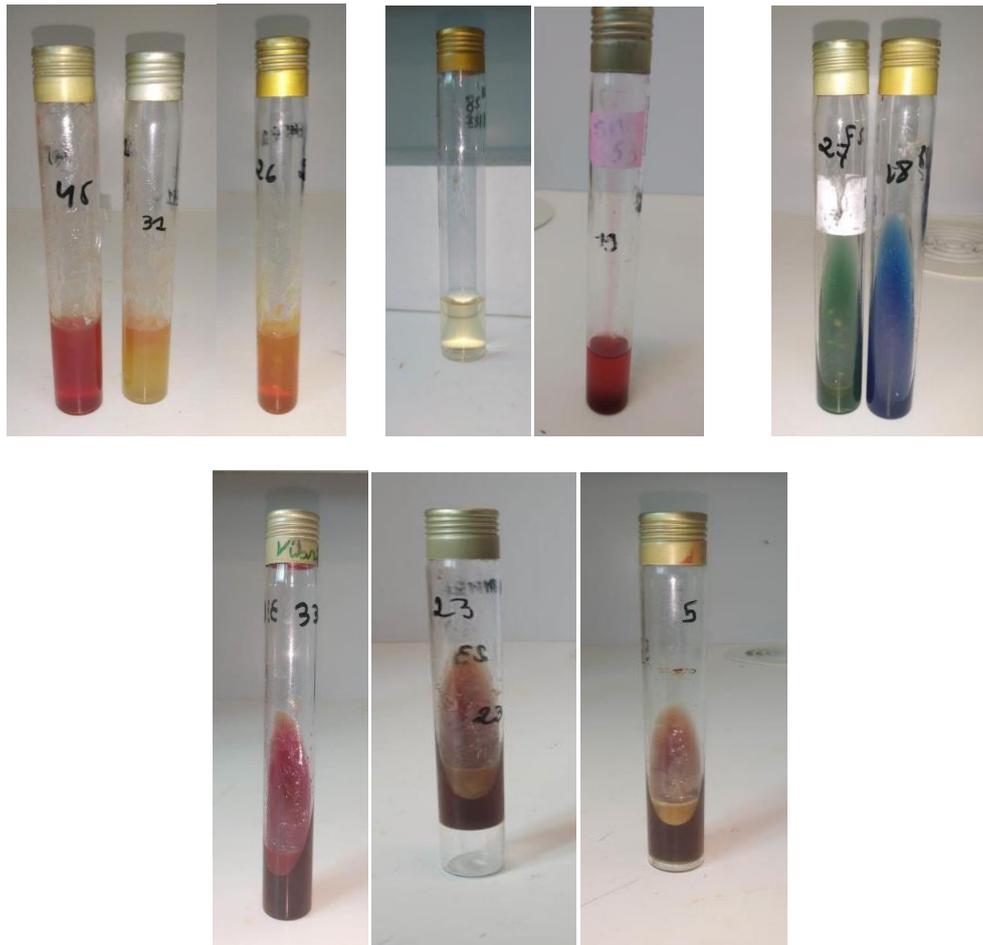


Figure 20 : Résultats des tests biochimiques sur tubes à essai (de gauche à droite : milieu Mannitol mobilité, Bouillon nitraté, Citrate de Simmons et gélose TSI)

Tableau 1: Résultats des tests KOH, Catalase, Bleu de méthylène et Gram.

| N°: souche | KOH | Catalase | Bleu | Gram |
|------------|-----|----------|--------------|--------------------------------------|
| 1 | + | + | Cocci | Cocci G - |
| 2 | + | + | Bacille | Bacille G - |
| 3 | + | - | Cocci | Cocci G - |
| 4 | - | - | Cocci | Cocci G + |
| 5 | + | - | Cocci | Cocci G - |
| 6 | + | - | Bacille | Bacille G - |
| 7 | + | - | Cocci | Cocci G - |
| 8 | - | + | Bacille fin | Bacille fin G + |
| 9 | + | ++ | Bacille | Bacille G - |
| 10 | - | - | Bacille | Bacille G + |
| 11 | + | - | Cocci | Cocci G - |
| 12 | - | - | Coccobacille | Coccobacille G + |
| 13 | + | - | Coccobacille | Coccobacille en chaîne G - |
| 14 | + | - | Bacille | Bacille G ⁻ |
| 15 | + | ++ | Bacille | Bacille G ⁻ |
| 16 | + | + | Cocci | Cocci en chainette G ⁻ |
| 17 | + | - | Bacille | Bacille fine G ⁻ |

| | | | | |
|-----|---|----|---------------------------|--|
| 18 | + | + | Coccobacille | Coccobacille G ⁻ |
| 19 | + | + | Coccobacille | Coccobacille en amas petites G - |
| 20' | + | + | Bacille | Bacille courtes bombées G ⁻ |
| 20" | + | ++ | Cocci | Cocci en chaine G ⁻ |
| 21 | + | ++ | Bacille longues | Bacilles G ⁻ |
| 22 | + | ++ | Bacille | Bacille en amas G - |
| 23 | + | + | Cocci | Cocci G - |
| 24 | + | - | Coccobacille en chaine | Coccobacille G - |
| 25 | + | - | Cocci | Cocci en chainette G ⁻ |
| 26 | + | - | Bacille | Bacille en chainette en double G ⁻ |
| 27 | + | - | Bacille | Bacille fine G ⁻ |
| 28 | + | + | Coccobacille | Coccobacille G - |
| 29 | + | + | Bacille | Bacille G - |
| 30 | + | ++ | Cocci | Cocci G ⁻ |
| 31 | + | + | Bacille | Bacille en chainette G ⁻ |
| 32 | + | + | Bacille | Bacille courte G ⁻ |
| 33 | + | ++ | Bacille | Bacille courte G ⁻ |

| | | | | |
|----|---|----|---------------|--------------------------------|
| 34 | + | - | Bacille | Bacille G- |
| 35 | - | + | Cocci | Cocci G + |
| 36 | + | + | Cocci | Cocci G ⁻ |
| 37 | + | + | Bacille | Bacille fine G ⁻ |
| 38 | - | - | Bacille | Bacille court G + |
| 39 | + | ++ | Cocci | Cocci G ⁻ |
| 40 | + | + | Cocci | Cocci en chaînette G - |
| 41 | + | + | Bacille | Bacille G ⁻ |
| 42 | + | - | Bacille court | Bacille G - |
| 43 | + | - | Bacille | Bacille G ⁻ |
| 44 | + | - | Bacille | Bacille G ⁻ |
| 45 | + | - | Coccobacille | Coccobacille G - |

Tableau 2: Résultats des tests Citrate, Mannitol et BN.

| N° : souche | Citrate | Mannitol | BN |
|-------------|----------|--------------------|-----------|
| 2 | + (Bleu) | Man - / mobile | +(rouge) |
| 9 | + (Bleu) | Man - / mobile | -(jaune) |
| 13 | + (Bleu) | Man -/ Immobile | + (rouge) |
| 14 | + (Bleu) | Man - / mobil | + (rouge) |
| 15 | - (Vert) | Man -/ Immobile | + (rouge) |
| 16 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 18 | + (Bleu) | Man - /immobile | + (rouge) |
| 19 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 20' | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 20" | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 21 | - (Vert) | Man -/immobile | + (rouge) |
| 22 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 23 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 24 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 25 | - (Vert) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 26 | + (Bleu) | Man -/immobile | + (rouge) |

| | | | |
|----|----------|----------------------|-----------|
| 27 | - (Vert) | Man -/immobile | + (rouge) |
| 28 | + (Bleu) | Man -/ Immobilier | + (rouge) |
| 30 | + (Bleu) | Man - /immobile | + (rouge) |
| 31 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 32 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 33 | + (Bleu) | Man - /immobile | + (rouge) |
| 36 | + (Bleu) | Man - /immobile | + (rouge) |
| 37 | - (Vert) | Ma - /immobile | + (rouge) |
| 39 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 41 | + (Bleu) | Man - / mobile | + (rouge) |
| 43 | + (Bleu) | Man - /Immobilier | -(jaune) |
| 44 | + (Bleu) | Man - / mobile | -(jaune) |
| 45 | - (Vert) | Man - / mobile | -(jaune) |

III.4 Discussion :

D'après les résultats qu'on a obtenus on suppose que les souches identifiées appartiennent aux genres : *Pectobacterium*, *Ralstonia* et *Xanthomonas* vue la compatibilité des caractéristiques macroscopiques observés respectivement :

- ✓ Grosses colonies (2 à 5 mm de diamètre), blanchâtres, crémeuses, translucides

avec des reflets bleutés et une forme bombée accompagné d'une odeur désagréable (**La croix et vezina, 2003**).

On a remarqué un changement de couleur qui passent d'un aspect crémeux à une couleur rouge clair ou rose par la suite elle devient complètement rouge. On sait que ce genre d'informations correspond à une bactérie connue sous le nom de *Ralstonia* (**LE CONSEIL, 1998**).

Observation des colonies petites (1 à 2 mm de diamètre), rouge claire ou rose, lisse, arrondies et rugueuses et translucides (**Cellier, 2010**).

- ✓ observation des petites colonies jaunes (1 à 3 mm) d'un aspect opaque, arrondies bombées, translucide est lisses.

La plupart des résultats obtenus lors de nos expériences, montrent que les souches bactériennes identifiées sont des Gram -, cela a été confirmé par les tests biochimiques suivants:

- KOH: la majorité des bactéries sont positifs à ce test (KOH+) comme le montre le (tableau 1)
- Le KOH est une solution alcaline utilisée pour la lyse cellulaire. Les bactéries à Gram sont les plus sensibles aux tests KOH cela revient à leurs paroi cellulaire mince et fragile, tandis que les bactéries à Gram+ ont une paroi rigide riche en EPS ce qui rend leur lyse difficile.

Les souches bactériennes KOH+ deviennent visqueuses et on observe une forme gélatineuse qui se développe. Hors que les bactéries KOH-, restent dans leur état initial.

- Coloration de Gram : on observe des souches bactériennes qui prennent la coloration violette, mais la majorité des souches se sont colorées en rose, cela confirme le test précédent.

- Bleu de méthylène : la forme des cellules dominante est bâtonnet qui est appropriée aux bactéries Gram-.
- Test de catalase : on observe une effervescence sur toutes les souches identifiées, cela veut dire que ces dernières sont catalase +.
- Test mannitol /mobilité :

Il y a certains genres de bactéries qui ont la capacité de fermenter le mannitol, un type de sucre, comme source de carbone. Néanmoins, nos souches sont incapable de le fermenté (mannitol-), la couleur du milieu reste rouge.

Ce test est aussi utilisé pour déterminer la mobilité des espèces (mobile /immobile). On a eu de sortes de résultats : celles qui sont mobiles (diffusion des bactéries au tour de tube). D'après nos connaissances, ce caractère est approprié aux genres : *Pectobacterium* et *Ralstonia* qui ont un mécanisme de déplacement grâce aux flagelles.

Immobilis : observation d'une croissance bactérienne au tour de la piqûre centrale, ce caractère peut s'identifier au genre : *Xanthomonas* qui est dépourvu de flagelles (**Saddler et al, 2015**).

Pour le test nitrate réductase (BN), la majorité des résultats récoltés étaient positifs à ce test. En effet la réduction des nitrates en nitrites a été effectuée, c'est un caractère présent chez la plupart des bactéries car la majorité d'entre elles sont des dénitrifiantes.

Citrates de Simmons :

On observe que certains tubes virent au bleu, et d'autres restent intacts (vert). Selon Schaad, 2001 : le genre *Pectobacterium* est incapable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Contrairement aux genres : *Ralstonia* et *Xanthomonas*.

Conclusion

L'intérêt porté aux bactérioses végétales est justifié par la grande incidence de ces dernières, de même que les pertes et préjudices économiques considérables dus chaque année aux phytopathogènes. Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution dans les domaines de la phytopathologie et de la protection des cultures.

L'objectif de notre étude est la mise en évidence de la biodiversité bactérienne existante au sein des tissus végétaux symptomatiques, incluant aussi bien la flore pathogène, que les bactéries du sol ou autres microflore. Pour cela, notre attention s'est portée sur 3 cultures d'intérêt économique majeur, à savoir les pommes de terre, les tomates et les carottes.

Au terme d'un isolement sur un total de 93 échantillons, 46 souches bactériennes sont sélectionnées pour une identification partielle, dont de nombreux agents pathogènes appartenant principalement aux genres *Pectobacterium*, *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas sp.*

Cette étude a permis de mettre l'accent sur la grande incidence des maladies végétales, dans la mesure où les isollements effectués nous ont permis de mettre en évidence la présence de souches appartenant à l'espèce *R. solanacearum*, micro-organisme de quarantaine, considéré comme l'un des pathogènes les plus virulents sur de nombreuses cultures maraichères et dont la présence en Algérie, ainsi qu'en Afrique du nord, n'a jamais été signalée avant dans aucune étude ni rapport.

De même, des souches de *Xanthomonas campestris*, qui est aussi l'un des pathogènes les plus répandus sur différentes cultures, ont été isolées et identifiées à partir d'échantillons de tomates, sur la base de caractères cultureux et biochimiques.

Il est important de tirer certaines conclusions et de prendre des mesures appropriées en fonction des résultats obtenus qui montrent la présence de ces phytopathogènes causant des pourritures et infections multiples. La lutte contre ces fléaux qui ravagent nos cultures, passe d'abord par un diagnostic et une caractérisation de l'agent pathogène.

Cependant, l'identification biochimique effectuée reste très limitée avec seulement quelques tests biochimiques de routine, Pour une meilleure identification des souches, il est recommandé de compléter la caractérisation par une galerie de tests biochimiques additionnels plus pertinents ainsi que par un séquençage ARN16S, réputé plus fiable.

Nous recommandons aussi pour les études ultérieures un élargissement de la gamme d'échantillonnage à d'autres cultures alimentaires tout aussi répandues en Algérie (oignons, poivrons...).

Liste Bibliographique

- Afaf, B. O. U. K. H. A. R. I. (2020). L'emploi des métabolites secondaires fongiques dans la lutte contre les maladies des plantes (Doctoral dissertation).
- Ailloud, F. (2015). Le pouvoir pathogène chez *Ralstonia solanacearum* phylotype II génomique intégrative et paysages transcriptomiques en relation avec l'adaptation à l'hôte (Doctoral dissertation, La Réunion).
- Ait Issad, H. (2020). Déploiement intelligent de drones pour une agriculture du futur (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Alonso Ugaglia, A. (2011). Une approche évolutionniste de la réduction des pesticides en viticulture (Doctoral dissertation, Bordeaux 4).
- BADJI Amel, S. M. (2020). Impact de la fertilisation chimique et biologique sur la productivité et la santé des plantes (Doctoral dissertation).
- Banks, E. (2004). Potato field guide: insects, diseases and defects. Ministry of Agriculture & Food.
- Bashan, Y., & Assouline, I. (1983). Complementary bacterial enrichment techniques for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in infested tomato and pepper seeds. *Phytoparasitica*, *11*, 187-193.
- Beattie, G. (2006). Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. *Plant-associated bacteria*, 1-56.
- Bernier, D., Rioux, S., & Dostaler, D. (2008). Prix et hommages du centenaire de la Société de protection des plantes du Québec. *Phytoprotection*, *89*(2), 143-164.
- Brenner, D. J., & Farmer, J. (2015). Enterobacteriaceae (w) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Brenig, B., Broad, T. E., Cockett, N. E., & Eggen, A. (2003). Achievements of research in the field of molecular genetics. *WAAP Book of the Year*, 73-84.
- Bourass, K., Léger, J. F., Zaïme, A., Qninba, A., Rguibi, H., El Agbani, M. A., ... & Hingrat, Y. (2012). Observations on the diet of the North African houbara bustard during the non-breeding season. *Journal of Arid Environments*, *82*, 53-59.

- Carreras, B. (2011). Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 129-133.
- Cellier, G. (2010). Description des écotypes du phylotype II dans le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* : diversité et évolution (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).
- CHEKIMA, C., BELAID, A., MENECEUR, R., & TIDJANI, M. T. (2022). Etude de l'effet de l'extrait du piment sur la lutte contre les maladies de la pomme de terre dans la région de Souf.
- Clavijo-Coppens, D. F. (2019). Adaptation de la thérapie phagique contre *Xylella fastidiosa* (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).
- Cooper, W. R., Garczynski, S. F., & Horton, D. R. (2015). Relative abundance of *Carsonella ruddii* (Gamma Proteobacterium) in females and males of *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera : Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Journal of Insect Science*, 15(1), 65.
- Czajkowski, R., Perombelon, M. C., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant pathology*, 60(6), 999-1013.
- Fegan, M., & Prior, P. (2005). How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*, 1(15), 449-461.
- Genin, S. (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist*, 187(4), 920-928.
- Gerardin, D., Rouffiange, J., Kellenberger, I., Schaerer, S., & Dupuis, B. (2013). Sensibilité de la pomme de terre à la pourriture molle provoquée par *Dickeya* spp. *Recherche Agronomique Suisse*, 4(6), 288-295.
- Grosdidier, M., Aguayo, J., Marçais, B., & Ioos, R. (2017). Detection of plant pathogens using real-time PCR: how reliable are late Ct values. *Plant Pathology*, 66(3), 359-367.
- Hayward, A. C. (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 27(2), 265-277.
- Hélias, V. (2008). *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre:

nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. Cahiers Agricultures, 17(4), 349-354.

- Humphris, S. N., Cahill, G., Elphinstone, J. G., Kelly, R., Parkinson, N. M., Pritchard, L., ... & Saddler, G. S. (2015). Detection of the bacterial potato pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. using conventional and real-time PCR. *Plant pathology : techniques and protocols*, 1-16.
- Hunter, T. O. N. Y., Hunt, T., Jackson, R. J., & Robertson, H. D. (1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *Journal of Biological Chemistry*, 250(2), 409-417.
- Jacques, P. F., Bostom, A. G., Williams, R. R., Ellison, R. C., Eckfeldt, J. H., Rosenberg, I. H., ... & Rozen, R. (1996). Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 93(1), 7-9.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Khayi, S. (2015). Génomique comparative des bactéries *Dickeya solani* et *Pectobacterium wasabiae*, pathogènes émergents chez *Solanum tuberosum* (Doctoral dissertation, Université Paris Saclay (COMUE); Université Moulay Ismaïl (Meknès, Maroc)).
- Kifer, D., Sulyok, M., Jakšić, D., Krska, R., & Šegvić Klarić, M. (2021). Fungi and their metabolites in grain from individual households in Croatia. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 14(2), 98-109.
- Kilalo, D. (2015). Transmission et propagation des maladies et des arthropodes nuisibles.
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10(6), 1185.
- Lacroix C et Vézina L. (2003) .Technique de laboratoire pour le diagnostic des bactéries phytopathogène. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection pour la détection et l'identification des bactéries phytopathogènes. 50p.
- Ladjouzi, R. (2007). Recherche et identification des *pectobacterium*, agents de la pourriture molle sur différentes plantes hotes : pomme de terre, tomates et

carottes (Doctoral dissertation, Béjaia, Université Abderrahmane Mira. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie).

- Latour, X., Faure, D., Diallo, S., Cirou, A., Smadja, B., Dessaux, Y., & Orange, N. (2008). Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*). *Cahiers Agricultures*, *17*(4), 355-360.
- Lebas, M. A. (2010). Evaluation du potentiel assainissant de 6 espèces végétales vis-à-vis du flétrissement bactérien de la tomate (*Ralstonia solanacearum*), en conditions semi-contrôlées (serre) (Doctoral dissertation, Agrocampus Ouest).
- Lee, H. H., Park, J., Kim, J., Park, I., & Seo, Y. S. (2016). Understanding the direction of evolution in *Burkholderia glumae* through comparative genomics. *Current genetics*, *62*, 115-123.
- Lefort, F. (2010). Lutte biologique et lutte microbiologique: des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes. *Hepia*, *57p*.
- LE CONSEIL, D. L. U. E. DIRECTIVE 98/57/CE DU CONSEIL du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., ... & Charkowski, A. O. (2007). Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, *97*(9), 1150-1163.
- Mantsebo, C. C., Mazarura, U., Goss, M., & Ngadze, E. (2014). The epidemiology of *Pectobacterium* and *Dickeya* species and the role of calcium in postharvest soft rot infection of potato (*Solanum tuberosum*) caused by the pathogens: A review. *African Journal of Agricultural Research*, *9*(19), 1509-1515.
- Mokrani, S., & Nabti, E. H. (2021). Rapid screening of phytopathogenic *Erwinia* sp. of two potato varieties (spunta and desiree) from Algerian agricultural fields. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, *21*(2), 123-133.
- Moutassem, D. (2018). Les maladies et les accidents chez les plantes (Les maladies des plantes concepts généraux). Université Bordj Bou Arreridj Pernezny, K., & Collins, J. (1997). Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper: Relationships to host-plant resistance and exposure to copper sprays. *Plant disease*, *81*(7), 791-794.
- MOREAU, J. (1980). Relations entre le doryphore et sa plante-hôte. EPPO

Bulletin, 10(4), 469-474.

- Narla, R. (2015). Signes, symptômes effets des maladies des plantes.
- Palazon, C., Gil, R., PALAZÓN, I., & DELGADO, I. (1990). Efficacité de quelques fongicides dans la lutte contre *Phytophthora capsici* sur poivron 1. *EPPO Bulletin*, 20(1), 177-184.
- Rajagopal, L., Sundari, C. S., Balasubramanian, D., & Sonti, R. V. (1997). The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS letters*, 415(2), 125-128.
- Richard C. & Boivin G. (1994). Pourriture rose de la pomme de terre. Dans *Maladies et Ravageurs des Cultures Légumières au Canada*. La Société Canadienne de Phytopathologie et la Société d'Entomologie du Canada, Canada.p.262.
- Rodriguez-Parra, J. A., Moreno-López, J. P., & González-Almario, A. (2022). *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas asplenii* : causal agents of bacterial soft rot in cyclamen plants (*Cyclamen persicum* Mill.) in Colombia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 44(4), 485-503.
- Rolland, M., Lacroix, C., Blanchard, A., Baldwin, T., Kerlan, C., & Jacquot, E. (2008). Le virus Y de la pomme de terre (PVY): de la première description aux derniers épisodes d'émergence. *Virologie*, 12(4), 261-273.
- Rouschop, P., Baudoin, J. P., Mayta, F. C., Drion, A., & Mergeai, G. (1999). Analyse préliminaire de la situation et des perspectives de la culture du haricot de Lima (*Phaseolus lunatus* L.) sur la Côte péruvienne (Vallées d'Ica, Pisco et Casma). *BASE*.
- Samaliev, H., & Andreev, R. (1998). Relationship between initial population density of potato cyst nematode *Globodera pallida* Thorne and the yield of partially resistant potato varieties. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 4(4), 421-427.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I. V., Stromberg, P. E., ... & Vidaver, A. M. (2006). Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Papers in Plant Pathology*, 96.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American

Phytopathological society (APS press).

- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., & Orange, N. (2004). Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(11), 1269-1278.
- Smadja, B., Latour, X., Trigui, S., Burini, J. F., Chevalier, S., & Orange, N. (2004). Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 19-27.
- Toth, I. K., Van Der Wolf, J. M., Saddler, G., LOjkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., ... & Elphinstone, J. G. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant pathology*, 60(3), 385-399.
- Vasse, M. (2015). Evolutionary ecology of social bacterial populations under antibiotic and bacteriophage pressure (Doctoral dissertation, Université Montpellier).
- Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y., ... & Martins Jr, J. (2017). The Candidatus *Liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annual review of phytopathology*, 55, 451-482.
- White, C. E., & Winans, S. C. (2007). Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1135-1148.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and immunology*, 39(11), 897-904.
- Yaganza, E. S. (2005). Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre : base physico-chimique (Doctoral dissertation, Université Laval).
- Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B., & Andrivon, D. (2003). Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*, 52(1), 28-40.

- Yahiaoui-Zaidi, R. (2004). Contribution à l'étude des *Erwinia* pectinolytiques isolées chez *Solomum tuberosum L.* en Algérie. Thèse Doctorat, Université de Sétif, Algérie 187 p.

- **Milieux de cultures :**

Gélose OGA (oxytetracycline glucose aggar).

Gélose KB (king B).

Gélosé nutritive (GN).

LB (Luria Bertani).

- **Préparation des milieux :**

Tous les milieux et les outils utilisés on étaient stérilisés et autoclavés à 120 °C pendant un cycle de 20 min.

- L'eau physiologique : 1000 ml d'eau distillée + 8.5 g de NaCl
- OGA : 15g OGA +500 ml d'eau distillée.
- GN : 14g de GN +500ml d'eau distillée.
- KB : 20 g de peptone + 1,145 g de K₂HPO₄ +1.5 g de MgSO₄ +1,5 g de glycerol +15g d'agar +11 d'eau distillée.
- LB liquide : 5g tryptone +2.5g extrait de levure +5g NaCl +500 ml d'eau distillée (pour le LB solide on ajoute 7.5 g d'agar pour chaque 500 ml d'eau distillée).

Résumé :

Ce mémoire présente une approche phytopathologique et microbiologique, visant à isoler et caractériser les bactéries phytopathogènes à partir de tissus végétaux symptomatiques.

Plusieurs bactérioses touchent les pommes de terre, tomates et carottes, engendrant des dégâts économiques et écologiques au champ et lors du stockage.

Malgré les méthodes de lutttes et prophylaxies récentes, l'élimination complète de ces pathogènes reste impossible.

Afin d'identifier ces bactéries et de minimiser leurs dégâts, une galerie de tests biochimiques est réalisée à partir des échantillons ramassés du marché de l'EDIMCO de Bejaia.

Les résultats obtenus ont révélés que les espèces mises en évidence appartiennent au phylum de Proteobacterie : *Ralstonia solanacearum* (β -proteobacterie), *Xanthomonas spp* et *Pectobacterium* (γ -protéobactérie).

Mots clés : Phytopathologique, phytopathogènes, bactérioses, prophylaxie, tests biochimiques, proteobactérie, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas spp* et *Pectobacterium*.

Abstract :

This thesis presents a phytopathological and microbial approach to isolate and characterize phytopathogenic bacteria from symptomatic plant tissues. Several bacterial diseases affect potatoes, tomatoes and carrots, resulting in economic and ecological damage in the field and during storage. Despite recent control and prophylaxis methods, complete elimination of these pathogens is not possible. In order to identify these bacteria and minimize their damage, a gallery of biochemical tests is carried out from samples collected from the Bejaia EDIMCO market. The results revealed that the species identified belong to the Proteobacteria phylum : *Ralstonia solanacearum* (β -proteobacteria), *Xanthomonas spp* and *Pectobacterium* (γ -proteobacteria).

Key words : phytopathological, phytopathogenic, bacterial disease, prophylaxis, biochemical tests, Proteobacteria, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas spp* and *Pectobacterium*.