

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie de l'environnement



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Isolement et identification de bactéries
pectinolytiques à partir de pomme de terre

Présenté par :

HADDAD Safia & MOUALEK Fatima

Soutenu le : **14 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M^r. BELHADI.

MAA

Président

M^r. LADJOUZI.

MAA

Encadreur

M^{lle}. BELHAMICHE.

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier infiniment les membres de jury d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Mr Ladjouzi pour son soutien, son aide, ses conseils et la confiance qui nous a accordé, nous avons admiré sa sympathie et sa simplicité.

Nous remercions également toutes personnes ayant contribué de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce mémoire particulièrement Mahyous et Hachoud.

Enfin, nous exprimons notre profonde reconnaissance à tous nos enseignants pour le savoir qui nous a été transmis au long de notre parcours d'apprentissage au sein de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Dédicace :

A la mémoire de ma défunte mère.

A mon père adorable

À mes sœurs,

À mes frères,

À ma chère tante Dalila

Fatima



Dédicace

À mes très chers parents,

À ma sœur,

À mes frères.

À ma copine adorée minou.

Safia



Sommaire :

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
CHAPITRE : Les maladies de la pomme de terre liées aux	
<i>Pectobacterium sp</i>	3
1. Jambe noire.....	3
2. Pourriture molle.....	3
3. Facteurs de développement de la maladie.....	4
3.1. Facteurs biotiques.....	4
3.2. Facteurs abiotiques	5
3.2.1. Humidité.....	5
3.2.2. Anaérobiose.....	5
3.2.3. Température.....	5
3.3. Source d'inoculum et facteurs de contamination.....	5
3.3.1. Rôle du tubercule mère	5
3.3.2. Rôle du sol.....	5
3.3.3. Rôle de l'eau.....	6
3.3.4. Rôle de l'air	6
3.3.5. Transmission par le matériel et les pratiques agricoles.....	6
4. Lutte et prophylaxie	6
5. Pouvoir pathogène des <i>Pectobacterium</i>	7
5.1. Enzymes pectinolytiques.....	7
5.1.1. Pectate Lyase(PL)	7

5.1.2. Polygalacturonase	7
5.2. Enzymes non pectinolytiques.....	7
5.2.1. Cellulase	7
5.2.2. Protéase	8
5.3. Autres facteurs de virulences	8
5.3.1. Mobilité et attachement.....	8
5.3.2. Les lipopolysaccharides	8
5.3.3. Les sidérophores.....	8
CHAPITRE II : Généralités sur les <i>Pectobactérium</i> et <i>Dickeya</i>	9
1. Définition.....	9
2. Taxonomie.....	9
3. Description des bactéries pectinolytiques	10
3.1. <i>Pectobacterium carotovorum</i>	10
3.1.1. <i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>atrosepticum</i>	11
3.1.2. <i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i>	11
3.1.3. <i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>betavascularum</i>	12
3.2 <i>Dickeya</i> sp	12
Partie expérimentale	
Matériel et méthodes	
I. Matériel végétal	13
II. Méthodes	14
1. Prélèvement	14
2. Isolement	15
3. Caractérisation culturelle.....	15
4. Identification des <i>Pectobacterium</i>	15

4.1. Identification préliminaire	15
4.1.1. Examen à l'état frais	15
4.1.2. Coloration de Gram	15
4.1.2. Test de la catalase.....	16
4.2. Recherche des espèces de <i>Pectobacterium/Dickeya</i> sp	16
4.2.1. Mise en évidence de l'activité pectinolytique	16
4.2.2. Test de réduction des nitrates en nitrites.....	17
4.2.3. Recherche du métabolisme Oxydatif/fermentatif du glucose	17
4.3. Caractère distinctif entre <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i> sp	17
4.3.1. Transformation du sucrose en substance réductrice	17
4.3.2. Utilisation du α -Méthyl-Glucoside	17
4.3.4. Activité lécithinase	18
4.3.5. Activité phosphatase	18
Résultats et discussion	
II. Identification de bactéries du genre <i>pectobacterium</i>	19
1. Identification préliminaire	20
2. Mise en évidence des <i>pectobacterium spp</i> et <i>Dicheya spp</i>	22
3. Distinction entre <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i>	24
Conclusion.....	29
Références bibliographiques	

Liste des figures

Figure 01 : Cycle épidémiologique des <i>Pectobacterium sp.</i>	4
Figure 02 : Symptômes de macération induite par <i>Pctobacterium carotovorum subsp. atrosepticum</i> sur demi-tubercules	11
Figure 03 : Symptômes typiques de <i>Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum</i> sur tubercules de pommes de terre	11
Figure 04 : Echantillons de pommes de terre présentant des symptômes de pourriture molle	13
Figure 05 : Prélèvement et isolement des <i>Pectobacterium</i>	14
Figure 06 : Colonies typiques isolées sur milieu King B observées à la loupe binoculaire ...	20
Figure 07 : Résultats de la coloration de Gram	22
Figure 08 : Réaction positive de la catalase	22
Figure 09 : Lecture des résultats sur milieu Sutton	22
Figure 10 : Lecture des résultats sur Hug-Leifson	23
Figure 11 : Réaction positives sur milieu eau peptonée nitraté	23
Figure 12 : Résultats des tests d'activité lécithinase	26

Liste des tableaux

Tableau 01 : Résultats de l'identification préliminaire.....	21
Tableau 02 : Résultats de la recherche des <i>Pectobacterium/Dickeya</i>	25
Tableau 03 : Résultats des tests de distinction entre <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i>	27

Introduction

La pomme de terre, une des plantes les plus importantes de la famille des Solanacées, constitue une denrée alimentaire de base et un légume très consommé. C'est l'une des cultures les plus consommées à l'échelle mondiale, elle se situe en 4^{ème} position juste derrière le maïs, le blé et le riz (**Oswald, 2010**).

En Algérie, la production de pomme de terre est d'environ 4,6 millions de tonnes, avec un rendement de 300 kg/Ha (**FAOSTAT, 2014**), la consommation annuelle moyenne est de 106 Kg par habitant.

Du fait de sa productivité importante et de ses conditions de culture, la pomme de terre est la cible de nombreuses maladies virales, fongiques et bactériennes, ces pathologies impliquent des déficits financiers importants et constituent un sérieux handicap pour l'économie nationale.

Parmi les bactérioses de pommes de terre, la maladie de pourriture molle engendre des pertes considérables à la fois au champ, à la récolte ou en conditions de conservation. L'impact économique est difficile à chiffrer parce qu'il dépend de l'intensité de l'épidémie et des répercussions qui peuvent subsister pendant plusieurs années (**Kettani-Halabi, 2012**). En Algérie, 70% des refus sont attribués aux problèmes phytosanitaires dont 32% due à des problèmes de pourriture molle (**Yahiaoui-Zaidi et al., 2003**).

Cette maladie est induite par les bactéries pectinolytiques appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sp (anciennement nommées *Erwiniae* pectinolytiques).

Au regard de l'importance économique considérable de la pomme de terre, et des habitudes culinaires en Algérie. Et vu la dépendance actuelle de l'étranger, tant pour les tubercules pommes de terre de consommation que de semence, les problèmes phytosanitaires de cette culture se doivent d'être bien étudiés, et traités en conséquence. Aussi, il devient impératif de s'intéresser au diagnostic et à la prophylaxie de cette maladie, ceci commence par un travail d'identification et de caractérisation des agents pathogènes.

L'objectif de notre présente étude est d'établir une collection de souches à partir de divers échantillons de tubercules de pomme de terre présentant les symptômes de pourriture molle, dans le but d'isoler et d'identifier ces phytopathogènes, et d'estimer leur incidence sur les cultures de pommes de terre.

Introduction

La pomme de terre, une des plantes les plus importantes de la famille des Solanacées, constitue une denrée alimentaire de base et un légume très consommé. C'est l'une des cultures les plus consommées à l'échelle mondiale, elle se situe en 4^{ème} position juste derrière le maïs, le blé et le riz (**Oswald, 2010**).

En Algérie, la production de pomme de terre est d'environ 4,6 millions de tonnes, avec un rendement de 300 kg/Ha (**FAOSTAT, 2014**), la consommation annuelle moyenne est de 106 Kg par habitant.

Du fait de sa productivité importante et de ses conditions de culture, la pomme de terre est la cible de nombreuses maladies virales, fongiques et bactériennes, ces pathologies impliquent des déficits financiers importants et constituent un sérieux handicap pour l'économie nationale.

Parmi les bactérioses de pommes de terre, la maladie de pourriture molle engendre des pertes considérables à la fois au champ, à la récolte ou en conditions de conservation. L'impact économique est difficile à chiffrer parce qu'il dépend de l'intensité de l'épidémie et des répercussions qui peuvent subsister pendant plusieurs années (**Kettani-Halabi, 2012**). En Algérie, 70% des refus sont attribués aux problèmes phytosanitaires dont 32% due à des problèmes de pourriture molle (**Yahiaoui-Zaidi et al., 2003**).

Cette maladie est induite par les bactéries pectinolytiques appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sp (anciennement nommées *Erwiniae* pectinolytiques).

Au regard de l'importance économique considérable de la pomme de terre, et des habitudes culinaires en Algérie. Et vu la dépendance actuelle de l'étranger, tant pour les tubercules pommes de terre de consommation que de semence, les problèmes phytosanitaires de cette culture se doivent d'être bien étudiés, et traités en conséquence. Aussi, il devient impératif de s'intéresser au diagnostic et à la prophylaxie de cette maladie, ceci commence par un travail d'identification et de caractérisation des agents pathogènes.

L'objectif de notre présente étude est d'établir une collection de souches à partir de divers échantillons de tubercules de pomme de terre présentant les symptômes de pourriture molle, dans le but d'isoler et d'identifier ces phytopathogènes, et d'estimer leur incidence sur les cultures de pommes de terre.

I-Maladies de pomme de terre liées au *Pectobacterium sp*

Les genres pectinolytiques de *Pectobacterium* et *Dickeya* sont rendus responsables de nombreuses maladies de la pomme de terre. D'une part, il y'a la jambe noire et les flétrissements bactériens qui sévissent au champ avant ou durant la récolte. D'autres parts, la pourriture molle occasionne lors du stockage des symptômes sur tubercules (**Dupuis et al., 2005**).

1-Jambe noire

La maladie de la jambe noire est principalement provoquée par les espèces *P. atrosepticum*, mais sous certaines conditions elle est aussi due à *P. carotovorum* et *Dickeya sp* (**Johanna et al., 2009**).

La plantation d'un tubercule infecté peut provoquer des manques à la levée et un retard de croissance (**Seebold, 2014**). En conditions humides, la maladie se manifeste sous forme d'une nécrose sur les tiges qui prennent alors une couleur noire, la pourriture se propage du tubercule mère jusqu'à la tige. Dans les conditions sèches, les symptômes ont tendance à conduire à un retard de croissance, jaunissement et dessèchement des tiges et feuilles (**Humphris et al., 2015**). Le flétrissement du feuillage est dû à l'obstruction de la circulation de la sève brute dans le xylème, ce dernier étant colonisé par les bactéries (**De Werra et al., 2015**).

➤ Epidémiologie

Les voies de transmission du pathogène se font via les débris, tubercules, outils et aussi par les semences. Les insectes et les nématodes peuvent servir de vecteur entre les plantes malades et saines, La contamination des tubercules, ainsi que la survie du pathogène dans le sol est favorisée par des conditions humides et fraîches, tandis que les symptômes sur tige (jambe noire) sont favorisés par des conditions humides et chaudes (**D'Hondt-Defrancq, 1984**).

2-Pourriture molle :

Les espèces *Pectobacterium carotovorum* (*Pc*), *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) *Pectobacterium brasiliense* et le nouveau genre *Dickeya spp* sont les principaux agents responsables de la pourriture molle sur tubercules (**Mantsebo et al., 2014**).

En conditions humides, La lésion peut atteindre l'ensemble du tubercule, ce dernier est macéré donnant ainsi une consistance crémeuse qui vire au noir en contact de l'air et développe une

mauvaise odeur due à l'action de microorganismes secondaires qui envahissent les tissus décomposés (Czajkowski *et al.*, 2011).

➤ **Epidémiologie**

L'infection a lieu à travers des blessures, les lenticelles ou le stolon comme points d'entrée. Le lavage des tubercules avant stockage est particulièrement propice à la maladie. Cette dernière est favorisée par des conditions chaudes et humides et mal aérées. (D'Hondt-Defrancq, 1984)

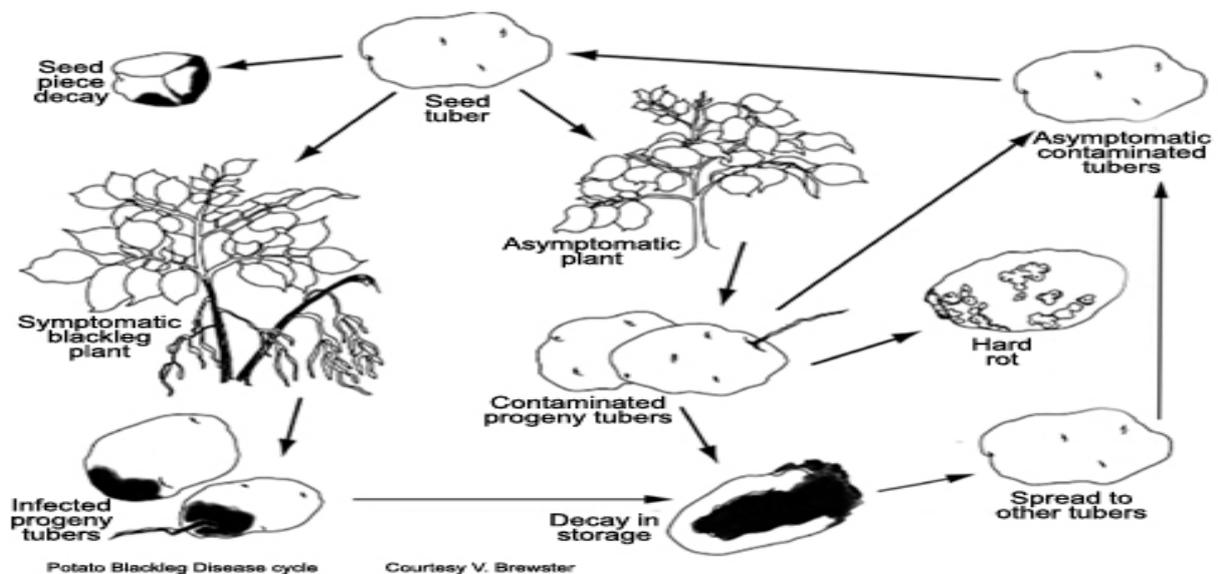


Figure N° 01 : Cycle épidémiologique des *Pectobacterium sp* (De Boer, 2004)

3-Facteurs de développement des maladies

L'apparition, ainsi que la gravité des dégâts liés à ces maladies sont multifactorielles. Elles dépendent de la réceptivité de la culture, du potentiel infectieux environnemental et des conditions pédoclimatiques tels que la température, l'humidité du sol les facteurs génétiques et chimiques tel que le contenu minérale du tubercule (Latour *et al.*, 2008 ; Mantsebo, 2014).

3-1 Facteurs biotiques :

➤ **Inoculum**

Le tubercule-mère, qui peut assurer, lors de la culture suivante, la survie et la transmission des bactéries aux tubercules fils, constitue la source d'inoculum la plus connue. Le niveau de contamination du tubercule de semence est un facteur important pour le

développement de la maladie. Ainsi, des tubercules fortement contaminés présentent un risque de développement de la maladie plus important, indépendamment des conditions environnementales (**Rousselle et al., 1996 ; Hélias, 2008**).

3-2 Facteurs abiotiques

a)-Humidité

La présence de film d'eau à la surface des tubercules entraîne le maintien des conditions d'anaérobiose favorisant ainsi la multiplication bactérienne et l'initiation de la pourriture (**Czajkowski et al., 2011**). De plus, les populations bactériennes sont globalement faibles dans les sols secs et élevées en conditions humides ou en sols irrigués (**Rouffiange, 2013**).

b)-Anaérobiose

L'anaérobiose affaiblit le système de résistance de l'hôte par son effet défavorable sur la synthèse des métabolites secondaires, elle inhibe la lignification et la subérfication des tissus végétaux et altère les parois cellulaires induisant l'augmentation de la perméabilité membranaire (**Pérombelon, 2002**).

c)-Température

L'accroissement de la température ambiante et des quantités d'eau libres induit une raréfaction de l'air du sol, accélérant ainsi la multiplication bactérienne, ce qui augmente l'intensité et la sévérité des macérations (**Schaerer, 2010**). La répartition géographique des *Pectobacterium* est essentiellement liée aux exigences thermiques du milieu. Son développement est optimal entre 15 et 25 °C, tandis que *Pectobacterium carotovorum* possède une gamme de températures plus large : entre 20 et 40 °C. *Dickeya spp* sont issues de climats tropicaux, subtropicaux ou tempérés chauds (**Rouffiange et al., 2013**).

3-3 Sources d'inoculum et facteurs de contamination

a)- Rôle du tubercule mère

Les tubercules contaminés, asymptomatiques, récoltés qui ne pourrissent pas durant le stockage, sont une cause principale du maintien du cycle de la maladie au champ. Sous terre, les tubercules-mère continuent de libérer des milliards de bactéries pour contaminer les tubercules fils et voisins (**Schaerer et Dupuis, 2010**).

b)- Rôle du sol

La survie des *Pectobacterium* et *Dickeya* dans le sol est limitée à 1 semaine jusqu'à 6 mois, selon les conditions environnementales (température, humidité et pH du sol) (**Toth et al., 2011**).

Cette présence est aussi liée à la disponibilité des nutriments provenant de la dégradation des débris végétaux et des exsudats racinaires des plantes hôtes. En effet, la viabilité de ces microorganismes diminue fortement dès qu'ils se retrouvent dissociés des tissus de leurs plantes hôtes (**khayi, 2015**).

c)- Rôle de l'eau

La propagation des bactéries à partir de tubercules mère peut se faire via l'eau les rendant ainsi considérablement mobiles (**Van der Wolf et al., 2008**). Les *Pectobacterium* sp sont retrouvées dans l'eau des drains souterrains des champs plusieurs années après culture. Les aérosols générés par la pluie ou l'arrosage par aspersion des tiges malades, ou lors du défanage avant récolte peuvent également disperser les l'inoculum sur plusieurs centaines de mètres (**Hélias, 2008**).

d)- Rôle de l'air

La contamination des cultures de pomme de terre peut également se produire à partir de l'air, La transmission de bactéries est effectuée par les insectes présents dans l'air sur de longues distances d'une plante infectée à une plante saine (**Czajkowski et al., 2011**).

e)- Transmission par le matériel et les pratiques agricoles

Le passage de machines agricoles contaminées lors de la culture constitue un autre moyen de dissémination des bactéries. La plantation, la récolte et le tri mécanique des tubercules peuvent également être la cause de la propagation des pathogènes entre les lots de et au sein des stocks. Cette contamination a principalement lieu lors du contact de tubercules sains avec des tubercules ou du matériel infectés (**Augustin, 2012**).

4 Lutte et prophylaxie

La vulnérabilité physique du tubercule, l'âge physiologique, le repos végétatif minimum, la précocité de maturation et de tubérisation sont des notions systématiquement vulgarisées et intégrées à la prévention des maladies végétales. La phytoprotection de la pomme de terre devint étroitement liée aux bases physiologiques végétales et aux méthodes générales

de gestion de la production sous tous ses aspects : destination de la récolte, variété, fertilisation azotée, entreposage, dates de plantation, de défanage et de récolte (**Banville, 2008**).

5- Pouvoir pathogène des *Pectobacterium*

Le déclenchement de la pourriture molle nécessite la production d'enzymes extracellulaires, notamment des pectinases tel que la pectate lyase (Pel), la polygalacturonase (Peh) et de lyase de pectine (PNL), responsables de la dégradation des composants pariétaux cellulaire (**Chatterjee, 1995**).

Il existe d'autres mécanismes important impliqués dans le pouvoir pathogène à savoir : la mobilité, l'acquisition du fer via la production des sidérophores, la formation de biofilms, le chimiotaxisme, etc... (**Kettani-Halabi, 2012**).

5-1 Enzymes pectinolytiques

a)- Pectate lyases

La pourriture molle est principalement due à l'activité de la Pectate lyases (**Walker, 1993**). L'activité PeL a été mise en évidence en 1962 à partir d'*Erwinia carotovora* et *Bacillus* sp (**Rodriguez, 2003**). Cette enzyme dépolymérise la pectine des parois cellulaires ce qui provoque la macération des tissus parenchymateux, détruisant ainsi l'intégrité des tissus (**Pissavin et al., 1996**). Le clivage des liaisons glycosidiques α -(1-4) des polymères d'acide galacturonique par β -élimination produit des oligomères insaturés à leurs extrémités (**Lei et al, 1987 ; Pissavin et al., 1996**). Les PeL jouent aussi un rôle dans l'activation des systèmes de défense par libération d'oligogalacturonides des parois cellulaires (**Rodriguez, 2003**).

b)- Polygalacturonase

Les Polygalacturonases catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α (1-4) au niveau des acides pectiques (**Ibiam et Arinze, 2007**), *P. carotovorum* produit l'endopolygalacturonase pehA qui induit d'intenses symptômes de macération (**Pickersgill, 1996**).

5-2 Enzymes non pectinolytiques

a)- Cellulases

Les cellulases sont des endohydrolyses de la cellulose. Leur pH optimal est de 7, elles agissent par synergie (**Kettani-Halabi, 2012**). *D. dadantii* 3937 synthétise 02 cellulases codées

par les gènes *celZ* et *celY*. *celZ* représente 97% de l'activité cellulosique (Reverchon, 1994). Ainsi, des mutants *CelV* chez *Pectobacterium carotovorum* ont montré une grande diminution de leur capacité de macération par rapport au type sauvage (Walker, 1993).

b)- Protéases

Les espèces et sous-espèces pectinolytiques sécrètent de grandes quantités de protéases qui facilitent la dégradation des parois végétales, des membranes cytoplasmiques et des protéines cytosoliques (Ladjouzi, 2007). Ces enzymes peuvent être produites de façon constitutive ou induites par la présence de peptides dans le milieu, et peuvent ainsi accélérer la macération et la perte de cohésion des tissus (Lagha, 2007).

5-3 Autre facteurs de virulences

a)- Mobilité et attachement

Avant d'envahir son hôte, l'agent pathogène doit se fixer aux cellules végétales, cette première étape du processus infectieux nécessite le déplacement de la bactérie vers un point d'infection (stomates, blessures, apex racinaires...), puis l'attachement de la bactérie à la cellule végétale (Planer, 2010).

b)- Lipopolysaccharides

Chez *P. atrosepticum*, un mutant altéré dans la synthèse de LPS présente une virulence diminuée. Ces composés de la surface membranaire pourraient être impliqués dans les phénomènes de reconnaissance entre la plante et le pathogène (Lautier, 2007).

c)- Sidérophores

Les sidérophores sont de petites molécules produites par les micro-organismes et certaines graminées dans leur environnement, ayant une très forte affinité pour l'ion ferrique. *P. chrysanthemi*, possède deux voies d'assimilation du fer mettant en jeu deux sidérophores différents, la chrysobactine et l'achromobactine (McMahon *et al.*, 2008). Ces derniers jouent ainsi un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Expert, 1999 ; Franza *et al.*, 1999 ; Franza *et al.*, 2005).

II-Généralités sur les genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sp

1-Définition

Les bactéries pectinolytiques, *Pectobacterium* et *Dickeya* sp, anciennement nommées *Erwinia* sp sont des entérobactéries phytopathogènes responsables de deux maladies de la pomme de terre (pourriture molle et jambe noire) (**Chatterjee et Starr, 1973**). Les caractéristiques physiologiques et biochimiques de espèces de l'ancien genre *Erwinia* sont données en annexe

2-Taxonomie

La première description des bactéries pectinolytiques remonte à 1901 à partir d'une pourriture humide de la carotte et fût nommée *Bacillus carotovorus*. En 1902, un organisme semblable est isolé d'une jambe noire de pomme de terre et dénommé *B. phytophthorus*. En parallèle, aux Pays-Bas, Van Hall (1902) isola d'un symptôme similaire une bactérie nommée *B. atrosepticus*. Winslow en 1917 classa ces bactéries pectinolytique dans le genre *Erwinia* (**Winslow et al, 1917 ; Hélias, 1999**).

La prépondérance du caractère pectinolytique chez les bactéries du genre *Erwinia* a conduit **Waldee (1945)** à les séparer des autres espèces non pectinolytiques et à proposer le genre *Pectobacterium* (**Brenner et al., 1972**).

En 1968, 04 grands groupes furent créés : Le groupe *Amylovora* constitué d'espèces non pectinolytiques, le groupe *Herbicola* qui contient des *Erwinia* a pigment jaune, le groupe *carotovora* qui englobe les bactéries pectinolytiques et enfin un quatrième groupe composés d'espèces atypiques (**Mergaert, 1984**).

Le séquençage des ARN 16S ont conduit **Hauben et al., (1998)** à réarranger les *Erwinia* en quatre genres distincts :

- ✓ Le genre *Erwinia* : constitué d'espèces nécrotiques strictes telles qu'*E. amylova*.
- ✓ Le genre *Pectobacterium* : regroupe les espèces possédant une activité pectinolytique qui provoquent une forte macération des tissus végétaux.
- ✓ Le genre *Brenneria* : rassemble des espèces responsables des maladies des arbres.
- ✓ Enfin, le genre *Pontoeco* comprend les espèces *E. herbicola* et *E. stewartii* qui sécrètent une pigmentation jaune (**Lautier, 2007**).

Des analyses récentes taxonomiques et phylogénétiques associant des techniques moléculaires, phénotypiques et sérologiques ont conduit les auteurs à répertorier les bactéries pectinolytiques et phytopathogènes de la pomme de terre, définitivement dans le genre *Pectobacterium*, avec deux espèces majeures *P. carotovorum* et *P. chrysanthemi* (en remplacement des espèces *E. carotovora* et *E. chrysanthemi*) (**Hélias, 2008**).

De même le séquençage et l'identification par PCR de nouvelles souches isolées en 2013 et 2014, confirment leur appartenance aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* (**De Werra et al., 2015**).

3-Description des bactéries pectinolytiques

Les bactéries pectinolytiques du genre *Pectobacterium* et *Dickeya* sp, sont des bactéries à Gram négatif, non sporulées, en bâtonnet droit, de 0,5 à 1,0 par 1,0 à 3,0 µm de diamètre. Les cellules sont mobiles par des flagelles péritriches d'environ 1 à 6 flagelles. Elles peuvent être isolées, par paires ou en courtes chaînes. Elles sont caractérisées par un métabolisme fermentatif ; de type respiratoire : aéro-anaérobie-facultatif, oxydase négative, catalase positive et nitrate réductase positive. La température optimale de croissance de ces espèces est de 27 et 30 à 32°C, leur température maximale varie de 32 à 42°C. Elles possèdent une forte activité pectinolytique due à la production de pectinases (Ce sont des bacilles Gram négatif, anaérobie facultatives et mobiles par flagelles peritriches (**Murashi et al., 1965 ; Yahiaoui-Zaidi et al., 2003 ; Lautier, 2007**)).

3-1) *Pectobacterium carotovorum*

P. carotovorum sont des bactéries qui se développent à des températures allant de 5 à 36°C avec un optimum de 27 à 30°C. Ces espèces peuvent infecter différents végétaux, beaucoup de leurs gènes de virulence ont été identifiés. D'après leurs caractéristiques sérologiques, on distingue plus de 40 sérogroupes, *Carotovorum* constitue un taxon complexe, composé de souches ayant des caractéristiques phénotypiques, biochimiques, environnementales et génétiques très variées.

Les analyses moléculaires, phénotypiques, sérologiques et phylogénétiques ont prôné une nouvelle classification, avec trois sous-espèces ; *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* (*Pca*), *Pectobacterium carotovorum* ssp. *betavasculorum* (*Pcb*) et *Pectobacterium carotovorum* ssp. *wasabiae* (*Pcw*) à l'échelle de l'espèce pour devenir *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium betavasculorum* et *Pectobacterium wasabiae*. (**Ladjouzi, 2007**)

a)-*Pectobacterium carotovorum ssp. atrosepticum*

Pca peut croître à des températures entre 15 à 25C°, elle produit des composés réducteurs à partir du saccharose, produit du cellobiose et raffinose et lactose à partir d'un acide-méthyl glucosideuse ce groupe est le principal responsable des maladies de jambe noire au champ et pourriture molle des tubercules au cours du stockage, C'est aussi un pathogène d'autres cultures végétales comme la tomate. (Gardan *et al*, 2003).



Figure N° 02 : Symptômes de macération induits par *Pectobacterium atrosepticum* sur demi-tubercules (Carvalho et Mello, 2008)

b)-*Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum*

Pcc s'étend à une aire géographique importante avec une gamme d'hôtes plus large, elle est responsable de la pourriture humide de nombreux fruits et légumes. Par ailleurs, elle semble dotée de meilleures capacités de conservation hors de ses hôtes (sol/eau). Elle se développe à des températures allant de 20 à 37- 40C° (Rousselle *et al.*, 1996 ; Carvalho et Mello, 2008).



Figure N° 03 : Symptômes typiques de *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* sur tubercules de pommes de terre (Carvalho et Mello, 2008)

c)-*Pectobacterium carotovora ssp. Betavascularum*

Elle est l'agent responsable de nécrose vasculaire des racines de la betterave à sucre, et est négligemment isolée de tournesol, artichaut et pommes de terre. Pcb se développe à 36 °C, produit des composés réducteurs du saccharose, ne possède pas la gélatinase et produit de l'acide diméthyl- α -glucoside, inuline, lactose et raffinose (**Gardan et al, 2003**).

3-2) *Dickeya sp*

Les espèces du genre *Dickeya* (anciennement *P. chrysanthemi*) sont l'agent pathogène de pourriture molle, elles dégradent les organes végétaux charnus succulents comme les racines, tubercules, boutures de tiges et feuilles épaisses, elles colonisent également le xylème. *Dickeya sp* est capable de survivre dans le sol sur les débris végétaux. Une forte humidité et de l'eau libre favorise la diffusion et la pénétration de ces bactéries. Leurs températures de développement sont généralement élevées (30 à 37 °C) (**Janse et Ruissen, 1988**).

Pectobacterium chrysanthemi a été isolée pour la première fois sur le chrysanthème, c'est un pathogène de nombreuses plantes dans les régions tropicales et subtropicales, et peut également infecter certaines culture dans les régions tempérées comme les endives, les pommes de terre, le saintpaulia. Cette bactérie se développe à des températures de croissance élevées (35-37 °C) (**Hélias, 1999 ; Prouvost, 2008**).

Samson et al. (2004) ont suggéré le transfert des espèces *Pectobacterium chrysanthemi* et *Brenneria paradisiaca* vers le genre *Dickeya* (*Dickeya chrysanthemi* et *Dickeya paradisiaca*), et ont décrit quatre nouvelles espèces (*Dickeya dadantii*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya dieffenbachiae* et *Dickeya zaeae*).

I- Matériel végétal

L'échantillonnage a été réalisé durant la période Mars-Avril 2016, à partir de tubercules de pomme de terre symptomatiques de semence ou de consommation, qui appartiennent principalement à la variété Diamant. Les échantillons ont été récoltés au niveau des marchés hebdomadaires, ainsi que sur les champs de culture de la wilaya de Bejaia.

Les tubercules de pommes de terre utilisés présentent les symptômes typiques de la pourriture molle due aux *Pectobacterium*, les parties infectées sont de couleur crème à brun foncé, avec une consistance granuleuse et un aspect spongieux, laissant échapper une odeur désagréable caractéristique.



Figure N° 04 : Echantillons de pommes de terre présentant des symptômes de pourriture molle

II-Méthodes

1-Prélèvement

Le prélèvement et l'isolement de micro-organismes à partir des tissus infectés sont réalisés selon les méthodes modifiées de **Hyman *et al.*, (1998)** et **Lacroix et Vézina (2003)** comme résumé dans le schéma suivant :

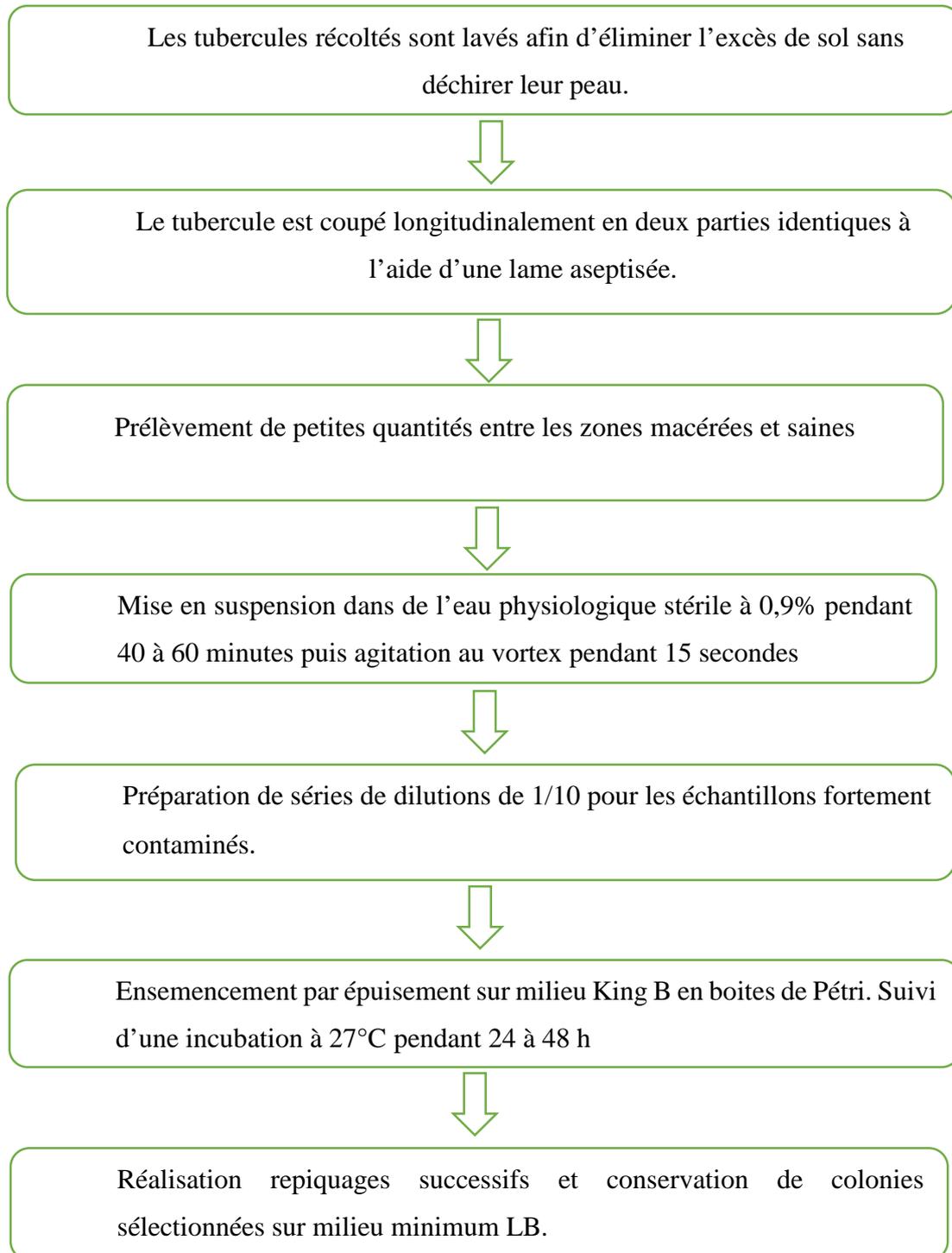


Figure N° 05 : Prélèvement et Isolement des *Pectobacterium* (Lacroix et Vezina, 2003)

2-Isolement

À l'aide d'une anse de platine stérilisée, 50 à 100 µl de suspension bactérienne sont prélevées et ensemencées par stries d'épuisement sur boîtes de Pétri contenant le milieu semi-sélectif King B. Après 24/48h d'incubation à 27°C des boîtes ensemencées, les colonies présentant les caractéristiques typiques recherchées et présumées appartenir aux *Pectobacterium/Dickeya* sp sont sélectionnées et repiquées, puis purifiées par des repiquages successifs sur milieu King B. Par la suite, les isolats sont conservés sur milieux Luria Bertani (LB) en gélose inclinée. (Lacroix et Vezina, 2003).

3-caractérisation culturelle :

Les critères de sélection des colonies tiennent compte des caractéristiques suivantes :

- Forme des colonies
- Taille et diamètre.
- Relief et contour
- Couleurs et aspect
- Odeur

4-Identification des *Pectobacterium*

4-1) Identification préliminaires

Cette étape a pour objectif de vérifier la pureté des isolats sélectionnés. Elle constitue donc une première orientation et comprends l'étude de la morphologie des cellules, la coloration de Gram et le test de catalase.

a)-Examen à l'état frais

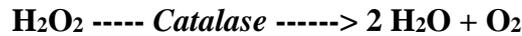
Permet d'observer les cellules vivantes (aspect et forme des cellules), leur mode de groupement et leur mobilité.

b)-Coloration de Gram

Elle facilite l'observation microscopique, est réalisée sur frottis séchés et fixés, et permet non seulement d'observer la forme des cellules, mais également de diviser les bactéries en deux grands groupes taxonomiques : bactéries Gram positif et Gram négatif.

c)-Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :



Le test consiste à mettre un amas de colonies bactériennes en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ 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).

4-2) Recherche des espèces de *Pectobacterium/Dickeya* sp :

Les tests biochimiques constituent une approche classique, mais particulièrement utile, pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces de bactéries phytopathogènes (Snaiki *et al.*, 2006).

L'identification biochimique des *Pectobacterium* et *Dickeya* sp est réalisée en deux étapes importantes :

- ✓ Détection des *Pectobacterium*.
- ✓ Distinction entre les espèces *P.carotovorum* et *P.chrysanthemi* (*Dickeya* spp).
- ✓ Des cultures fraîches âgées entre 18 et 24h sont utilisées pour l'ensemble des tests.

Les principaux tests biochimiques caractéristiques des *Pectobacterium* sont la mise en évidence de l'activité pectinolytique, la recherche du caractère respiratoire et fermentatif, ainsi que la recherche de l'enzyme nitrate réductase.

a)-Mise en évidence de l'activité pectinolytique :

Le test pectinase permet la mise en évidence de l'activité pectinolytique chez les espèces du genre *Pectobacterium* en déterminant leur capacité à dégrader la pectine présente comme seule source de carbone dans le milieu de culture (Lacroix et Vézina, 2003 ; Snaiki *et al.*, 2006).

Les souches sont ensemencées par piqûre centrale dans des tubes à essai contenant 3 ml du milieu Sutton. Après 24h d'incubation à 27°C, la présence d'une activité pectinolytique se traduit par le virage de l'indicateur de couleur du bleu au jaune, ce qui signifie une acidification du milieu. Après 48h, la liquéfaction du milieu désigne la dégradation de la source de pectine (Hélias, 1999).

b)-Test de réduction des nitrates en nitrites

Il s'agit de la mise en évidence de la capacité des isolats à réduire les nitrates (NO₃) en nitrites (NO₂), en conditions d'aéro-anaérobiose (Smid *et al.*, 1993 ; Terta *et al.*, 2010).

Une colonie bactérienne est prélevée puisensemencée sur milieu Eau peptonée nitraté (EPN) en tubes à essai. Après 24h d'incubation à 27 °C, la lecture est réalisée en ajoutant quelques gouttes de réactifs de révélation A (acide sulfanilique) et B (α -naphtylamine).

Une réponse positive est caractérisée par l'apparition d'une coloration rouge dans le milieu attestant la présence de nitrate-réductase. En absence de coloration, de la poudre de Zinc est additionnée et si le milieu reste toujours incolore alors, la bactérie est considérée nitrate positive (Freney *et al.*, 1992 ; INPV, 2005).

c)-Recherche du métabolisme Oxydatif/fermentatif du glucose :

L'ensemencement se fait par piqure centrale dans des tubes contenant 5 ml de milieu Hugh et Leifson. Après 24h d'incubation, on observe soit :

- ✓ Un virage de couleur au jaune, la bactérie est dite « fermentative ».
- ✓ Absence de changement de couleur, bactérie oxydative du glucose, mais n'acidifiant pas le milieu en anaérobiose (Hugh et Leifson, 1953).

4-3) Caractères distinctifs entre *Pectobacterium* et *Dickeya* sp

a)-Transformation du sucrose en substances réductrices :

Le test sucrose permet de vérifier la conversion du saccharose en substances réductrices. Les colonies bactériennes sontensemencées dans 2ml de Bouillon transformation du sucrose en substances réductrices, puis incubées à 27° C durant 24 heures. La lecture se fait par l'ajout de 2 ml du réactif de Bénédict, puis chauffage au bain-marie pendant 5 min.

Une réaction positive est traduite par l'apparition de dépôt jaune, indiquant une transformation du sucrose en substances réductrices (Lacroix et Vézina, 2003).

b)-Utilisation de l' α -Méthyl-Glucoside

Le test permet de déterminer la métabolisation du sucre α -méthyl-glucoside comme seule source de carbone, ainsi que la production d'acide à partir de cette source (Lacroix *et al.*, 1994 ; Baghaee-Ravarin *et al.*, 2010).

Un amas de culture bactérienne est ensemencé par dépôt en pique centrale dans 2 ml de milieu de culture α -méthyl-D-glucoside. Après incubation à 27° C/24h, L'utilisation de ce sucre se traduit par une acidification du milieu (couleur jaune), l'absence d'un virage de couleur signifie une réaction négative (**Hélias, 1999**).

c)-Activité lécithinase

L'ensemencement est réalisé par dépôt d'amas de colonies sur milieu de base additionné de jaune d'œuf, l'incubation se fait à 27°C pendant 2 à 7 jours.

L'activité lécithinase est visualisée par l'apparition d'une zone hautement turbide et dense qui entoure les colonies *Dickeya*, le même test permet aussi de détecter la présence d'un autre enzyme, la lipoprotéinase (**Ahmed, 2001**).

d)-Activité phosphatase

Après ensemencement sur milieu phosphatase et incubation à 27°C durant 48h.1ml d'une solution d'ammonium à 33% est versé sur les boites de Pétri. La lecture est réalisée après 10 secondes de contact. Seules les souches des *Dickeya* montrent une réaction positive au test de phosphatase (**Ahmed, 2001**).

II- Identification de bactéries du genre *Pectobacterium*

Notre étude s'est portée sur un ensemble de 90 tubercules de pommes de terre prélevées et qui présentent des symptômes plus au moins typiques de pourriture molle bactérienne. Après un criblage et une série de tests, beaucoup d'isolats sont éliminés. La culture sur milieu King B a permis d'isoler et de sélectionner des bactéries appartenant aux *Pectobacterium* sp.

Ainsi, en se basant sur les critères cultureux et les observations macroscopiques, les colonies sélectionnées présentent le profil suivant (Fig 06) :

- ✓ Couleur blanchâtre avec une consistance crémeuse ;
- ✓ Surface lisse avec bords réguliers ;
- ✓ Forme sont bombées à semi-bombée ;
- ✓ Aspect irisé et translucide ;
- ✓ Diamètre des colonies situé entre 2 à 8 mm ;
- ✓ Certaines d'entre elles dégagent une odeur nauséabonde.

Néanmoins, l'observation morphologique et culturale est un test préliminaire et subjectif, en effet certaines espèces et genres bactériens comme *E.coli*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* non fluorescents présentent des colonies similaires à celles des *Pectobacterium* sur King B.

Par ailleurs, le risque de contamination étant élevé, les contaminants les plus fréquemment observés sont les moisissures, les 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 décisif et à ce stade, l'identification morphologique est incomplète et sujette à caution.

Ainsi sur un total de 90 échantillons récoltés, nous avons sélectionné 30 isolats ayant le même profil morphologique que les *Pectobacterium*, ce qui représente 1/3 des lots échantillonnés.

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

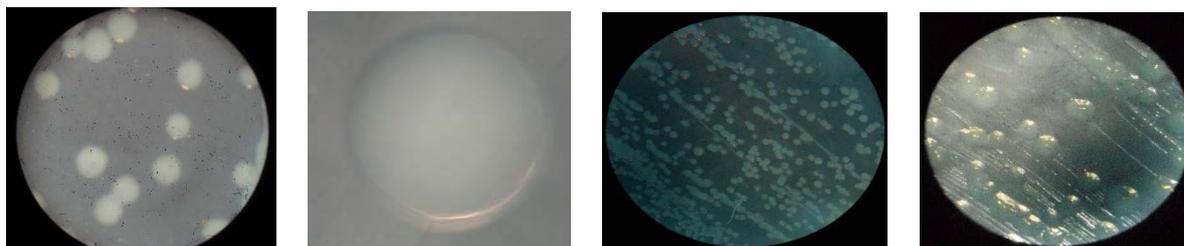


Figure N° 06 : Colonies typiques isolées sur milieu King B observées à la loupe binoculaire

1-Identification préliminaire

Afin de purifier les colonies isolées 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 30 isolats observés se présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles colorés en rose à Gram-négatif (Fig 07). Ce résultat est prévisible, en effet, la plupart des phytopathogènes de pommes de terre sont des bactéries à Gram négatif (Axelrrod, 1988 ; Barabote *et al.*, 2003 ; Bosgelmez-tinaz, 2003).

Bien que les cellules des *Pectobacterium* soient des bacilles longs, 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 30 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, 09 isolats des 27 restants ont eu une réaction un peu tardive et de faible intensité. Ainsi on peut classer les bactéries 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). Bien que non pertinents, les tests préliminaires d'identification demeurent nécessaires pour le criblage des colonies isolées.

Tableau N° 01 : Résultats de l'identification préliminaire

Souches	Test	Gram	Catalase
3		-	Réaction faible
4		-	Réaction faible
5		-	+
6		-	-
7		-	+
9		-	+
10		-	+
11		-	Réaction faible
13		-	Réaction faible
14		-	-
15		-	Réaction faible
19		-	Réaction faible
20		-	+
21		-	-
22		-	Réaction faible
23		-	+
24		-	+
25		-	+++
26		-	+
27		-	+
28		-	+
29		-	+
30		-	+++
31		-	+
32		-	Réaction faible
33		-	+
34		-	+
35		-	+
36		-	+
37		-	Réaction faible

+ : Résultat positif

++ : Très forte activité (pour le test de la catalase)

- : Résultat négatif

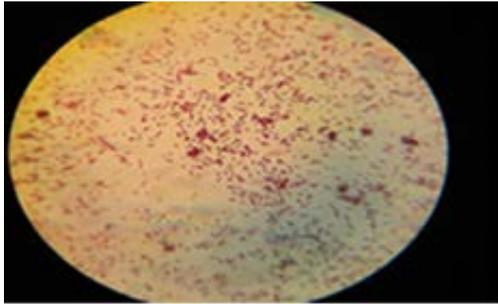


Figure N° 07 : Observation des cellules
Après coloration de Gram.



Figure N°08 : Réaction positive de la
catalase.

2- Mise en évidence des *Pectobacterium* et *Dickeya*

Après une deuxième étape de sélection comprenant la détermination de l'activité pectinolytique ainsi que la recherche du caractère respiratoire et de l'activité nitrate réductase, sur 27 souches sélectionnés, seul 08 ont montré un potentiel pectinolytique plus au moins important en acidifiant et liquéfiant le milieu de culture Sutton après 48h d'incubation (Fig 08).

Une réaction tardive qui dépasse les 72h, un virage de couleur au vert, ainsi qu'un jaunissement sans liquéfaction sont autant considérées comme des réactions négatives. Ainsi, l'acidification et la liquéfaction du milieu Sutton est un test clef pour l'identification des colonies d'*Erwinia* pectinolytiques (Henz *et al.*, 2006).

Cependant, il faut signaler qu'il existe d'autres espèces comme *Bacillus* qui produisent des pectinases qui peuvent aussi dégrader la pectine contenue dans le milieu Sutton. Néanmoins, ce test permet d'éliminer les espèces pectinolytiques de *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Flavobacterium* qui peuvent acidifier le milieu sans le liquéfier pour autant (Hélias, 1999).

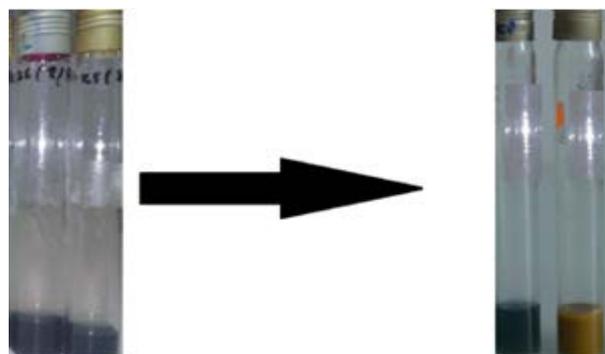


Figure N° 09 : Lecture des résultats sur milieu Sutton.

Tube bleu : réaction négative.

Tube vert : réaction négative.

L'étude du caractère respiratoire sur milieu Hugh et Leifson a permis d'éliminer 19 souches qui sont incapables de fermenter le glucose et d'acidifier le milieu et donc n'ont pas induit le virage de couleur pour n'en retenir que 11 isolats.

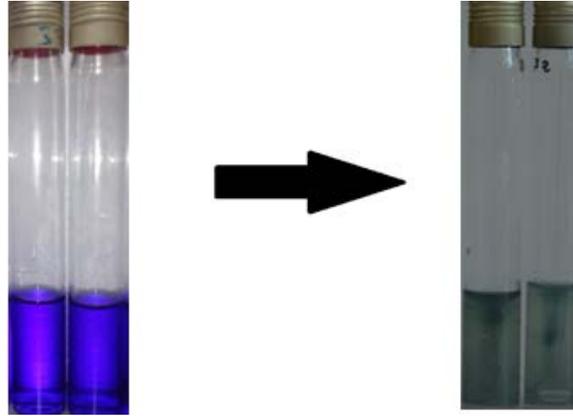


Figure N° 10 : acidification de milieu Hugh-Leifson.

Pour l'utilisation du glucose sur milieu Hugh et Leifson, les souches positives acidifient le milieu en aérobiose et en anaérobiose, et sont par conséquent dites fermentatives. On remarque aussi que cette acidification s'accompagne d'une forte production de gaz qui a eu pour résultat un décollement de la gélose parfois très important (Fig 09).

Pour la réduction des nitrates en nitrites, 100% des souches testées ont révélé une réaction positive, ce résultat étant prévisible, en effet l'activité nitrate réductase est un trait assez commun chez la plupart des bactéries Gram négatif présentes chez les végétaux (Fig 10).

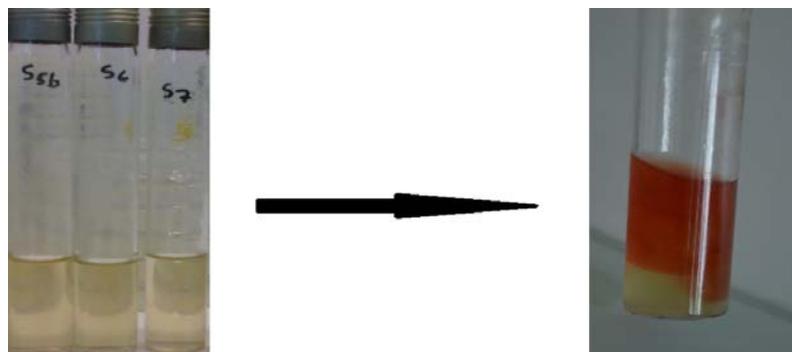


Figure N° 11 : Réaction positive sur milieu eau peptonée nitraté.

L'apparition d'une couleur rouge sang après l'ajout de réactif A et B est indicatrice de la présence de nitrites (**Rahman et al., 2012**) ainsi la réaction était positive pour toutes les souches testées.

Ainsi, 8 souches sur 30 isolats ont donné une réponse positive au test d'activité pectinolytiques, réduisent les nitrates en nitrites et fermentent le glucose. Selon **Baghaee-Ravari et al., (2010)** et **de Terta et al., (2010)** ces souches sont identifiés comme des *Pectobacterium*.

3- Distinction entre *Pectobacterium* et *Dickeya spp*

Après l'étape de mise en évidence des souches pectinolytiques de *Pectobacterium* et *Dickeya*, la prochaine série de tests consiste en la distinction et la différenciation entre les deux genres, ainsi nous avons réalisé les essais d'utilisation du saccharose et de l' α -méthyl-D-glucoside, ainsi que la recherche des lécithinase et phosphatase.

Seule 11 souches sur les 30 utilisées, et incluant les 06 souches pectinolytiques ont montré un résultat positif sur milieu lécithinase avec des halos clairs entourant les amas de colonies développés. A vrai dire, les autres souches ont montré une croissance avec des pourtours insignifiants qu'ils sont considérés comme négatifs à la lécithinase. La dégradation enzymatique des lécithines constitue un paramètre important dans la caractérisation des espèces appartenant au genre *Dickeya* sp (Fig 11).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau N° 02 : Résultats de la recherche des *Pectobacterium/Dickeya*

Tests Souches	Caractère respiratoire		Activité pectinolytique		Nitrate réductase
	Après 24h	Après 48h	Après 24h	Après 48h	
3	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	+

5	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	+
7	-	-	-	-	+
9	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	+
13	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	+
19	-	-	-	-	+
20	+	+	-	-	+
21	-	-	-	-	+
22	-	-	-	-	+
23	-	-	-	-	+
24	+	+	-	+	+
25	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	+
27	+	+	-	+	+
28	-	-	-	-	+
29	-	-	-	-	+
30	-	+	-	-	+
31	-	-	-	-	+
32	+	+	+	+	+
33	+	+	-	+	+
34	+	+	+/-	+	+
35	-	-	-	-	+
36	-	+	+/-	+	+
37	-	+	-	-	+

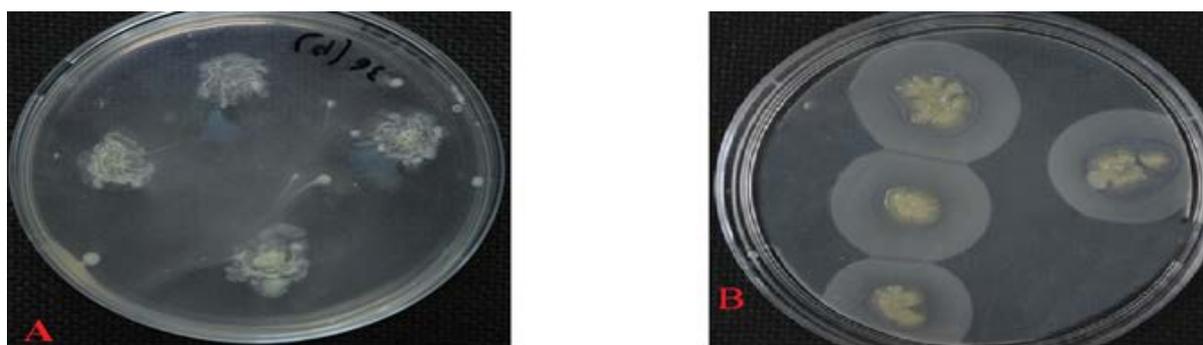


Figure N° 12 : Résultats des tests d'activité Léithinase A (négatif) et B (positif)

Toutes les bactéries testées n'ont montré aucune réaction positive au test d'utilisation de l' α -méthyle-D-glucoside, avec l'absence d'un virage de couleur au jaune ce qui indique qu'il n'y a pas de souches de *P. atrosepticum* dans notre collection. Ce résultat est expliqué par le fait que ce sont surtout les espèces *P. carotovorum* qui prédominent dans les cas d'infections multiples, alors que *P. atrosepticum* malgré son grand potentiel pathogène n'est pas très présente en co-culture.

Pour le test de métabolisation du sucrose, les souches sélectionnés n'ont pas induit de virage de couleur du milieu, et donc ne sont pas capables de transformer le saccharose en substances réductrices. Ce qui indique leur appartenance à l'un ou l'autre des deux groupes (*P. carotovorum* ou *Dickeya* sp).

Ces résultats sont conformes aux données bibliographiques rapportées sur le profil biochimique des *Pectobacterium* par de nombreux auteurs tels que **Dickey (1979)**, **Holt et al, (1994)** et **Hyman et al, (1998)**.

Les résultats des quatre tests biochimiques sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N° 03 : Résultats des tests de distinction entre *Pectobacterium* et *Dickeya*

Test Souches	α -méthyl glucoside	SRS	Activité lécithinase	phosphatase
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	+	-	-
7	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
13	-	+	+	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
19	-	-	+	-
20	-	+	+	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	+	-
25	-	-	+	-
26	-	-	-	-
27	-	+	+	-
28	-	+	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	+	-
33	-	-	+	-
34	-	-	+	-
35	-	-	-	-
36	-	-	+	-
37	-	+	+	-

Le test de mise en évidence de l'activité phosphatase n'a donné aucun résultat positif, de ce fait, on pense que c'est lié à un défaut dans la composition du milieu (constituants défaillant).

Le premier objectif de notre travail fut d'établir une collection diversifiée de souches de bactéries pectinolytiques à partir de pommes de terre dans la région de Bejaïa en Algérie.

A l'issue de ce travail, et à travers une galerie de tests biochimiques, nous avons caractérisé partiellement 08 souches susceptibles d'appartenir aux espèces anciennement nommés *Erwinia* pectinolytiques. Toutefois, rappelons qu'il est indispensable de compléter notre identification par d'autres tests biochimiques afin de pouvoir affirmer d'une manière plus précise l'appartenance, et le rang taxonomique de ces bactéries.

Nous signalons aussi la fréquence de détection des *Pectobacterium/Dickeya* (08 souches) sur l'ensemble des 90 tubercules utilisés pour cette étude, dont 02 souches sont affiliée à l'espèce *P. carotovorum*, tandis que six isolats présentent les caractéristiques de *Dickeya* sp, ce qui correspond à un pourcentage de 12%. En outre, les 08 isolats identifiés sur les 30 souches sélectionnées pour la série de tests, correspondent à environ 25%.

Les résultats obtenus après isolement et identification biochimique s'accordent pour confirmer l'incidence des bactéries pectinolytiques des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sp sur les tubercules de pommes de terre.

Par ailleurs, il apparait clairement que la prédominance de l'espèce *Dickeya* (*P. chrysanthemi*) est beaucoup plus fréquente sur pomme de terre, par rapport aux autres *Pectobacterium*. Ceci est dû à son large spectre d'hôtes et son ubiquité lui permettent de coloniser la plupart des végétaux, ainsi qu'à sa vaste gamme de température de croissance et d'activité enzymatique. En effet, beaucoup d'études ont récemment rapporté la grande incidence des espèces du genre *Dickeya* sur pommes de terre (Czajkowski, 2011 ; Toth *et al.*, 2011 ; Czajkowski *et al.*, 2015).

Conclusion

L'objectif principal de ce travail consiste à mettre en évidence et à caractériser les bactéries pectinolytiques affiliées aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya sp* responsables des symptômes de pourriture molle sur tubercules de pommes de terre de semences ou de consommation infectés, prélevés au niveau des marchés hebdomadaires, ainsi que sur les champs de culture de la wilaya de Bejaia et d'acquérir une vision globale sur la diversité de ces micro-organismes.

L'isolement et l'identification biochimique réalisée sur un lot de 90 tubercules présentant des signes de macération a permis de caractériser 08 souches bactériennes pectinolytiques appartenant potentiellement au genre *Pectobacterium* dont 2 souches présentent les caractéristiques de *Pectobacterium carotovorum* et 6 autres qui correspondent au genre *Dickeya (P. chrysanthmi)*.

Au terme de cette étude nous sommes en mesure d'attester et de confirmer l'intensité et le degré d'infection de ces phytopathogènes pectinolytiques sur tubercules. Ainsi, on a réussi à isoler et identifier 08 souches de *Pectobacterium* à partir de 31 isolats initiaux sur un total de 90 tubercules testés. C'est-à-dire un pourcentage approximatif de 25%, ce qui démontre le grand potentiel infectieux de ces agents pathogènes. Ces résultats confirment la présence et la diversité des bactéries pectinolytiques du genre *Pectobacterium* dans la région de Bejaia.

Cependant, l'identification biochimique présente des limites et reste partielle, Pour une meilleure identification des souches, il est recommandé de compléter les tests d'identification biochimique par une identification sérologique.

Les *Pectobacterium* constituent un des risques majeurs pour la sécurité alimentaire, ils sont capables de réduire de manière significative les rendements des cultures et d'accroître les pertes économiques, ainsi bien caractériser ces phytopathogènes constitue un atout majeur en phytoprotection.

En guise de perspectives, nous souhaiterions que les données récoltées durant cette étude, ainsi que les conclusions tirées constitueraient une base d'étude pour de futurs travaux

afin de mieux explorer les contraintes liées à l'importation des semences non conformes et le risque économique qui en découle.

Il est aussi important de signaler que l'identification biochimique réalisée est partielle et incomplète. Une caractérisation détaillée de ces pathogènes doit être confirmée par d'autres tests biochimiques additionnels, ainsi que par l'utilisation d'outils moléculaires et sérologiques. Nous recommandons aussi pour les études ultérieures un élargissement de la gamme d'échantillonnage à d'autres fruits et légumes les plus consommés en Algérie.

Enfin, il serait aussi souhaitable de porter un intérêt à l'évolution de la maladie en végétation (jambe noire).

Références bibliographiques

Ahmed, M.E.E. (2001). Detection and effects of latent contamination of potato tubers by soft rot bacteria, and investigations on the effect of hydrogen peroxide on lipopolysaccharides of *Erwinia carotovora* in relation to acquired resistance against biocides. Thèse de Doctorat. Université Georg-August, Allemagne, 166p.

Allefs, J.H.M., Van Dooijeweert, W., Prummel, W., Kaizer, L.C.P et Hoogendoorn, J (1996). Components of partial resistance to potato blackleg caused by pectolytic *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. chrysanthemi*. *Plant Pathology*. **45**, 486-496.

Augustin MOH, A (2012). Etude des facteurs écologiques influençant la croissance et le développement des *pectobacterium* spp infectant les tubercules de pomme de terre. Thèse de Doctorat en sciences Agronomiques et ingénierie biologique. Université de Liege gembloux agro-bio tech, Belgique, 110 p.

Axelrood, P. E., Rella, M and Schroth, M. N. (1988). Role of antibiosis in competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. *Applied and Environmental Microbiology* .**54**, 1222-1229.

Baghaee-Ravari, S., Shams-Bakhsh, M., Rahimian H., Safaie, N. (2010). Phenotypic and genotypic diversity of pectolytic *Erwinias* isolated from ornamental hosts in some northern parts of Iran. *Journal of Plant Pathology* .**46**, 61-64.

Banville G. (2008) : La pomme de terre au Québec de 1908 à 2008 : un siècle de protection Contre les maladies. *Phytoprotection* .**89**, 73-75

Barabote, R.D., Johnson, O.L., Zetina, E., San Francisco, S.K., Fralick, J.A. and San Francisco, M. J. D. (2003). *Erwinia chrysanthemi tolC* is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *Journal of Bacteriology* .**185**, 5772-5778.

Barnard, A.M.L., Bowden, S.D., Burr, T., Coulthurst, S.J., Monson, R.E., and Salmond, G.P.C. (2007). Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. Philosophical Transactions of the Royal Society B. *Biological Sciences* .**362** ,1165-1183

Boşgelmez-Tinaz, G. (2003). Quorum sensing in gram-negative bacteria. *Journal of Biology* .**27**, 85-93.

Brenner, D. J., Fanning, G. R. and Steigerwalt, A. G. (1972). Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *Erwinia* and between *Erwinia* species and other *Enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology* .**110**, 12-17.

Carvalho, C.F and Mello, S.C.M. (2008). *Pectobacterium carotovorum* : taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle.

Chatterjee, A, Cui, Y, Liu, Y, Dumenyo, C.K and Chatterjee, A.K. (1995). Inactivation of rsmA leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases and proteases in *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxyhexanoyl)-L-homoserine Lactone.

Applied and Environmental Microbiology .**61**, 1959-1967.

Chatterjee, A. K. and Starr, M. P. (1973). Transmission of lac by the sex factor E in *Erwinia* strains for human clinical sources.
Infection and Immunity .**8**, 563-572.

Corbaz Roger. (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Edition : ISBN, Suisse. 285p.

Cothier, E. J. and Blakeney, A. B. (1987). The specific detection of indole production by *Erwinia* species and some other *Enterobacteria* on agar.
Journal of Applied Bacteriology. **63**, 329-334.

Czajkowski, R., Perombelon M.C.M., Johannes, A., van Veen et Jan M van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species. *Plant Pathology*. **60**, 999-1013.

Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., Jafra S., Lojkowska E., Potrykus M., Van der Wolf J.M and Sledz W (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot.
Annals of Applied Biology .**166**, 18–38.

De Boer, S. H. (2004). Blackleg of potato.
The Plant Health Instructor. DOI : 10.1094/PHI-I-2004-0712-01.

D'HONDT-DEFrancqO, M.(1984). Les principales maladies bactériennes et cryptogamiques de la pomme de terre. Cours International sur la culture de la Pomme de Terre.p20.

De Werra, P., Bussereau, F., Kellenberger, I., Dupuis, B., Schaerer., S et Keiser, A .(2015). Pomme de terre : l'Empire *Pectobacterium* contre-attaque.
Production végétale .**6**, 256–263.

Dickey, R. S. (1979). *Erwinia chrysanthemi* : a comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species.
Phytopathology. **69**, 324-329.

Duarte, V, De Boer, S, Ward, L and Oliveira, A. (2004). Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil.
Journal of Applied Microbiology .**96**, 535-545.

Dupuis, B., Michelante, D., Garcia-Albeniz, N. and Nimal, C. (2005). Le point sur les infections par *Erwinia* spp. en plant de pommes de terre.
Journée d'étude Pomme de terre-CRA-W Gembloux 1-7.

Elphinstone, D. (1999). With holding and exchanging iron : interactions between *Erwinia* spp. And their plant hosts.
Annual review of Phytopathology. **37**, 307-334.

Expert, D. (1999) : With holding and exchanging iron ; interactions between *Erwinia* spp and their plant hosts.
Annual Review of Phytopathology .37: 307-334.

FAO. (2014). FaoStat Database. Available from <http://faostat3.fao.org/home/E>

Franza, T., Mahé, B. and Expert, D. (2005). *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection.
Molecular Microbiology .55, 261-275.

Franza, T., Sauvage, C. and Expert, D. (1999). Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937 ; role of the fur repressor protein.
Molecular. Plant-Microbe Interactions. **12**, 119-128.

Freney, J., Renaud, F., Hansen, W et Bollet, C. (1992). Manuel de bactériologie clinique
Elsevier Collection. **1**, 79-143.

Gardan, L., Gouy, C., Christen, R. and Samson, R. (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. Nov.
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology .53: 381-391.

Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. and Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*.
Systematic Applied Microbiology .21: 384-397.

Hélias V. (1999). Mise au point d'outils de caractérisation et de détection d'*Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* agent de la jambe noire et de la pourriture molle de pomme de terre. Application à l'étude de la transmission de la bactérie, via la plante, du tubercule mère vers les tubercules fils en cours de culture. Thèse de Doctorat en Biologie et Agronomie. Renne, France, 190p.

Hélias V. (2008). *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. De la pomme de terre .nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomologie, épidémiologie et prophylaxie.
Cahiers agricultures. **17**, 394-354.

Henz, G.P, Reifschneider, F.J.B and Duarte, V. (2006). *Erwinia chrysanthemi*: pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil.
Pesquisa Agropecudria Brasileira .41, 1567-1571.

Holt J G,Krieg N R,Sneath P, Staley H A et Williams S T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition Williams &Wilkins, 787p.

Humphris, S.N., Cahill, G., Elphinstone, J.G., Kell, R., Parkinson, N.M, Pritchard, L, Toth IK and Saddler GS. (2015). Detection of the Bacterial Potato Pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. Using Conventional and Real-Time PCR
Plant Pathology.1302, 1-16.

Hyman, L. J., Toth, I. K. and Pérombelon, M. C. M. (1998). Isolation and identification in Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes : a laboratory manual.
Pérombelon, M.C.M. and Van Der Wolf, J. M. pp.66-77.

Ibiam, O and Arinze, A. (2007). Determination of *in vitro* and *in vivo* production of polygalacturonase (pg) by storage mold *Aspergillus niger* v. Tieghem during storage of rice (*Oryzae sativa* l) seeds.
Journal of Applied Sciences and Environmental Management 11.

Janse, J. D. and Ruissen, M. A. (1988). Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in the Netherlands.
Phytopathology .78: 800-808.

Kettani-Halabi M. (2012). Etude de la diversité de *Pectobacterium* spp et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes.
Thèse de doctorat, Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012.

Khayi, S. (2015). Génomique comparative des bactéries *Dickeya solani* et *Pectobacterium wasabiae*, pathogènes chez *Solanum tuberosum*. Thèse de doctorat-Université Paris-Saclay, France 146p.

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.

Lacroix, C, Vézina, L, Desjardins, S, Beaulieu, C. (1994). Comparaison de techniques d'identification des *Erwinia* et des *Pseudomonas* responsables de la pourriture molle.
Phytoprotection .76, 27-37

Ladjouzi R. (2007). Recherche et identification des *Pectobacterium*, agents de la pourriture molle sur différentes plantes hôtes : pomme de terre, tomates et carottes. Mémoire magister. Université de Bejaia, Algérie ,74p.

Lagha, S. (2007). Effet des extraits de plantes (*Pistacia lentiscus* L. et *Olea europaea sativa*) et d'un co-produit (grignon d'olive) sur la croissance de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* sur *Solanum tuberosum* L. Mémoire magister, Université de Bejaia, Algérie 72p.

- 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**: 355-360.
- Lautier T. (2007).** Rôle de la protéine associée au nucléotide Fis dans le contrôle de la virulence chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemae*. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 200p.
- Lei, S-P, Lin, H, Wang, S-S, Callaway, J and Wilcox, G. (1987).** Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *Journal of Bacteriology* .**169**, 4379-4383.
- McMahon, S.A, Oke, M, Liu, H, Johnson, K.A, Carter, L, Kadi, N, White, M.F, Challis, G.L and Naismith, J.H. (2008).** Purification, crystallization and data collection of *Pectobacterium chrysanthemi* AcsD, a type A siderophore synthetase. ACTA Crystallographica, Section F
Structural Biology and Crystallization Communications .**64**, 1052-1055.
- Mantsebo C.C., Mazarura U., Goss M and 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 .**19**, 1509-1515
- Mergaert, J, Verdonck, L, Kersters, K, Swings, J, Boeufgras, J-M and De Ley, J. (1984).** Numerical Taxonomy of *Erwinia* species using API systems.
Microbiology .**130**, 1893-1910.
- Mezaache, S. (2014).** Etude des propriétés suppressives d'une souche de *Pseudomonas* isolée de la rhizosphère de la pomme de terre sur la croissance de deux bactéries et de deux champignons phytopathogènes. Mémoire de Magister. Université de Tlemcen, Algérie, 89p.
- Muraschi, T. F., Friend, M. and Bolles, D. (1965).** *Erwinia*-Like microorganisms isolated from animal and human hosts.
American Society for Microbiology .**13**, 128-131.
- Oswald A, Calvo Velez P, Zúñiga Dávila D and Arcos Pineda J (2010).** Evaluating soil rhizobacteria for their ability to enhance plant growth and tuber yield in potato
Annals of Applied Biology Volume 157, Issue 2, pages 259–271, September 2010
- Pérombelon M.C.M. (2002).** Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of Pathogenesis. *Plant Pathology*. **51**. 1–12.
- Pickersgrill, R, Smith, D, Worboys, K and Jenkins, J. (1998).** Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*.
Journal of Biological Chemistry. **273**. 24660-24664.
- Pissavin, C., Robert-Baudouy, J. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1998).** Biochemical characterization of the pectate lyase PelZ of *Erwinia chrysanthemi* 3937.
Biochimica et Biophysica Acta .**1383**: 188-196.

Pissavin, C., Robert-Baudouy, J. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1996). Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937.

Journal of bacteriology **178**,7187–7196

Prouvost, A-F. (2008). Rôle du périplasme dans la perception par la bactérie de son environnement: utilisation des β -galactanes par *Erwinia chrysanthemi* : voie de signalisation du système Rcs dans la virulence d'*Erwinia chrysanthemi*

These de doctorat- Université des Sciences et Technologies de Lille- 174p

Rahman M M, Eaquib Ali M, Khan A A, Hashim U, Akanda A M et Hakim M A. (2012). Characterization and identification of soft rot bacterial pathogens in Bangladeshi potatoes. *African Journal of Microbiology Research*. **6**, 1437-1445.

Reverchon, S., W. Nasser, and J. Robert-Baudouy. (1994). *pecS*: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*.

Mol. Microbiol. **11**:1127–1139.

Rodriguez, M.C, Orchard, J and Seymour, G.B. (2003). Pectate lyase, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany* .**53**, 2115-2119.

Rouffiange J., Gerardin D., Kellenberger I., Schaerer S. & Dupuis B., (2013). Sensibilité de la pomme de terre aux pourritures de tiges provoquées par *Dickeya* spp.

Recherche Agronomique Suisse. **4**, 432–439

Rousselle P., Robert Y., Grosnier J.C. (1996) .La pomme de terre production, Amélioration, Ennemis et Maladies. INRA .Paris. P607.

Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Achouak, W. and Gardan, L. (2004). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. nd *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.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology .**54**, 1-13.

Schaerer Santiago et Dupuis Brice. (2010). Nouvelles pratiques pour contrer la jambe noire. *Production Vegetale*. pp.28-29

Seebold, K.W. (2014). Blackleg & Bacterial Soft Rot of Potato
Plant Pathology Extension.PPFS-VG-18

Smid, E., Antonius H., Jansen, J and Tuijn Cees, J (1993). Anaerobic Nitrate Respiration by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* during Potato Tuber Invasion

Applied And Environmental Microbiolog. **59**,3648-3653.

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 .**146**, 53-60.

Sutra Laurent, Christen Richard, Bollet Claude, Simoneau Philippe et Gardan Louis. (2001). *Samsonia erythrinae* gen. nov., sp. nov., isolated from bark necrotic lesions of *Erythrina* sp., and discrimination of plant-pathogenic *Enterobacteriaceae* by phenotypic features. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**, 1291–1304.

Terta M, El Karkouri A, Ait M'hand R, Achbani E, Barakate M, Amdan M, Annajar B, El Hassouni M, Val F, Bouteau F, Ennaji M. M. (2010). Occurrence OF *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in Morocco. *Cellular and Molecular Biology* .**56**, 1324-1333

Toth I. K, Van der Wolf J. M, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsror L and Elphinstone J. G (2011). *Dickeya* species : an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*. **60**, 385–399,

Van Der Wolf J.M, Czajkowski R, Velvis H, (2008). Why is *Dickeya* spp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) taking over? The ecology of a blackleg pathogen. In. Symposium KNPV Pests and Climate Change. Wageningen, The Netherlands, 34

Waldee, E. L. (1945). Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. Iowa State Coll. J. *Sci.***19**, 435-484.

Walker, D.S, Reeves, P.J, Salmond, G. (1994). The major secreted cellulase, CelV of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* is an important soft rot virulence factor. *Molecular Plant Microbe Interactions* .**7**, 425-431.

Winslow, C-E, A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., krumwiede Jr, C., Rogers, L.A. and Smith, G.H. (1917). The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of Bacteriology* .**2**, 505-566.

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

Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B. and Andrivon, D. (2003). Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*. **52**, 28-40.

Annexe des milieux de culture :

La plupart des milieux de cultures sont stérilisés à l'autoclave, à une température de 120°C pendant 20 minutes.

I) Milieux gélosés pour la culture et la conservation des *Pectobacterium***1. Milieu d'isolement :**

1. Milieu king B ; pH 7.2

composition	Par litre
Peptone	20g
K ₂ HPO ₄	1.145g
MgSO ₄	1.5g
Glycérol	15ml
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

2. Milieux de conservation des souches :

2. Milieux Luria Bertani ; pH 7.2

Composition	Par litre
Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

3. Bouillon Levure Peptone (LP)

Composition	Par litre
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Eau distillée	1000ml

II) Milieux utilisés pour l'identification biochimique des *Pectobacterium***1) Milieux pour la mise en évidence des *Pectobacterium*****1.1. Milieux Hugh et Leifson ; pH (6.8 – 7)**

Composition	Par litre
Tryptone	2g
Extrait de levure	1g
NaCl	5g
Bleu de Bromothymol	0.03g
Glucose	10g
Agar	3g
Eau distillée	1000ml

1.2. Milieux Sutton ; pH 7.2

Composition	Par litre
NaOH 1N	11ml
CaCl ₂ , 2H ₂ O (10%)	16.5ml
Bleu de Bromothymol (05%)	6ml
Extrait de levure	5g
Plypectate de sodium	15g
Eau distillée	1000ml

1.3. Milieu eau peptonée nitraté ; pH (6.8 – 7.2)

Composition	Par litre
Peptone	10g
KNO ₃	1g
Eau distillée	1000ml

Réactif de révélation de l'activité nitrate réductase

Réactif A		Réactif B	
composition	Par litre	Composition	Par litre
Acide sulfanilique	8g	Acide alpha naphtylique	5g
Acide acétique	1000ml	Acide acétique 5N	1000ml

II-2) Milieux pour la distinction entre *Pectobacterium* et *Dickeya*

2.1. Milieu Lécithinase

Composition	Par litre
Tryptone	10 g
Na ₂ HPO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	1g
NaCl	2 g
MgSO ₄ ,	0,1 g
7H ₂ O	2 g
Glucose	20 g
Agar	1000
Eau distillée	

2.2. Milieu phosphatase ; pH7

Composition	Par litre
Peptone	10 g
Extrait de boeuf	5 g
Agar	15
Eau distillée	1000

2.3. Milieu alpha méthyl D-glucoside ; pH (7 – 7.2)

Composition	Par litre
Peptone	10 g
NaCl	5 g
a-méthyl-D-glucoside	10 g
Bleu de bromothymol (0,5%)	6 ml
Eau distillée	1000

2.4. Bouillon transformation du sucrose en substance réductrices (SRS) ; pH7

Composition	Par litre
Sucrose	40 g
Peptone	10 g
Extrait de bœuf	5 g
Eau distillée	1000 ml

Réactif de Benedict

composition	Par litre
Citrate de Na ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	173 g
Carbonate de Na (Na_2CO_3)	85.5 g
Sulfate de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	17,3 g
Eau distillée	1000 ml

Tableau N° 01 : Caractères biochimiques et physiologiques des espèces du genre *Erwinia*
(Holt et al, 1994)

Micro-organisme \ Test	<i>E. amylovora</i>	<i>E. ananas</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>E. cyripedii</i>	<i>E. herbicola</i>	<i>E. malloivora</i>	<i>E. nigrifluens</i>	<i>E. quercina</i>	<i>E. rhapontici</i>	<i>E. rubrifaciens</i>	<i>E. salicis</i>	<i>E. stewartii</i>	<i>E. tracheiphila</i>	<i>E. uredoovora</i>
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Culture en anaérobiose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w	+
Besoins en facteurs de croissance	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Pigmentation rose diffusible	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Pigmentation bleue	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentation jaune	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Colonies muqueuses	+	+	d	d	d	d	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Croissance à 36°C	-	+	d	+	+	+	-	+	+	d	+	-	d	-	+
Production d'H ₂ S	-	d	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Réduction du saccharose	+	+	d	-	-	d	+	-	+	d	-	+	d	d	+
Production d'acétoïne	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	d	+
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Dégradation des pectates	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Oxydation du gluconate	-	-	-	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-
Gaz à partir du glucose	-	-	d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de la caséine	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Culture dans du KCN	-	-	d	d	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Liquéfaction de la gélatine	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Phénylalanine désaminase	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Réduction des nitrates	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Croissance dans NaCl à 5%	nd	+	+	d	+	+	-	nd	nd	+	nd	nd	+	-	+
Désoxyribonucléase	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	+
Phosphatase	nd	nd	-	+	d	nd	nd	nd	nd	d	nd	nd	nd	nd	nd
Lécithinase	nd	nd	-	+	-	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd

Résumé

Les bactéries pectinolytiques appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, sont responsables des maladies de jambe noire et pourriture molle sur pommes de terre lors de la culture et du stockage des tubercules, ce qui provoque des dégâts importants aux cultures et des pertes économiques considérables. Dans le but de caractériser ces pathogènes et dans une optique de prophylaxie, une galerie de tests biochimiques et physiologiques est réalisée pour procéder à une sélection ou criblage des isolats obtenus.

Après isolement et identification de souches locales sur tubercules de pommes de terre symptomatiques, 08 souches ont été identifiées comme appartenant aux *Pectobacterium* parmi lesquelles 02 isolats sont affiliés à l'espèce *Pectobacterium carotovorum*, tandis que 6 autres souches sont affiliées au genre *Dickeya*.

Cette étude est une contribution à la mise en évidence de la biodiversité des espèces pectinolytiques phytopathogènes au niveau de la région de Béjaia

Mots clefs : Identification, Pomme de terre, *Pectobacterium*, *Dickeya*, Pourriture molle

Abstract

Pectinolytic bacteria belonging to the genera *Pectobacterium* and *Dickeya*, are responsible for blackleg and soft rot diseases on potatoes crops during cultivation and tubers storage, causing significant crop damage and great economic losses. In order to characterize these pathogenic bacteria and for prophylaxis perspectives, a biochemical and physiological tests gallery are performed to make a selection or screening of resulting isolates. After isolation and identification of local strains from symptomatic potatoes tubers, 8 strains were identified as belonging to *Pectobacterium* including 2 isolates are members of the species *Pectobacterium carotovorum*, while 6 other strains affiliated gender *Dickeya*.

This study is a contribution to highlighting the biodiversity of plant pathogens pectinolytic species in the region of Bejaia

Key Words: Identification, Potatoe, *Pectobacterium*, *Dickeya*, Soft rot