



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République algérienne démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة حسيبة بن بوعلي - الشلف -

Université Hassiba Ben Bouali Chlef

معهد العلوم الزراعية

Institut des sciences agronomiques

Mémoire de fin d'étude

*En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Option :
Ressources phytogénétiques et développement durable*

Thème:

Étude chez quelques rosacées à pépins (*Malus pumila*, *Pyrus communis* et *Eriobotrya japonica*) d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien: caractérisation phénotypique et génotypique

Présenté par :

Mr: MEDJAHED Housseyn

Membres du jury :

Président : Mr. SETTI. B.

Promoteur : Mr. SAADI. A.

Co-promoteur : Mr. SEBAIHIA. M.

Examineurs: Mr. BOUJNIBA. M.

Ms. MEZIANE. M.

Maître de conférence A ; U.H.B Chlef

Professeur ; U.H.B Chlef

Maitre de conférence A ; U.H.B Chlef

Professeur ; E.N.S. de Kouba

Maître de conférence B ; U.H.B Chlef

Année universitaire : 2013/2014

Remerciement

Au début, je remercie **Dieu** le tout puissant pour nous avoir donnés la volonté, le courage et l'amour du savoir.

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement Mr BOUJNIBA et Melle MEZIANE et qui m'ont accordé un immense privilège en acceptant d'être examinateurs de ce travail, et surtout Mr SETTI, pour nous avoir honoré d'accepter de présider ce jury.

Tout ce travail n'aurait bien sûr pas été possible sans le soutien inconditionnel et l'aide inestimable de Mr SAADI, mon encadreur et de Mr SEBAIHIA, mon co-encadreur depuis maintenant 3 ans et demi. Je tiens donc tout particulièrement à les remercier pour toute cette aventure, qui par-dessus tout aura été extrêmement enrichissante pour moi, à tous les niveaux. Merci énormément pour m'avoir accordé votre confiance.

Mes remerciements vont également à l'équipe du CNCC d'Alger. Je remercie tout d'abord infiniment Mme LAALA et Melle Wasila, qui m'ont permis d'entreprendre cette formation dans leur laboratoire. Je vous suis très reconnaissante pour toute l'aide et les conseils que vous m'avez donnés dans mon travail.

Je tiens à remercier également les membres de l'INPV de Chlef, en particulier Mr KEROUCHE, Mr et Mme MEKHANEG, Melle Yasmine et Mr KAROUZI pour toute l'aide fournie ainsi que pour les précieux conseils, je vous suis très reconnaissant pour tout le soutien que vous m'avez apporté.

Je souhaite remercier très chaleureusement tout les ingénieurs des laboratoires de la faculté des sciences et l'institut d'agronomie de l'université de Chlef, en particulier Melle KADOUICHE, Mme RIATI, Mr MAHMOUD et Mme BOUDOUR. Votre aide m'a été très précieuse.

Je souhaite sincèrement remercier Mr KOUIDRI, Mr NOUI, Mr NEDJARI BEN HADJ ALI, Mr MEROUANE, Mr CHEURFA, Melle MOSTFA DELLA, Melle DJEBAR, Melle NAAS, et Mr BELHIRECHE. Je vous suis très reconnaissant pour toute l'aide, les encouragements et les conseils que vous m'avez donnés dans mon travail d'expérimentation ainsi que lors de la rédaction de ce document. Je vous adresse tout mes vœux de réussite et je vous remercie tous infiniment pour votre bonne humeur et votre dévouement.

Un grand MERCI à ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

*C'est avec l'aide de dieu le tout puissant que j'ai pu arriver au terme de ce travail que je tiens à
dédier à :*

À mes parents,

Qui m'ont entouré de leur affection, m'ont fait grandir dans l'envie de comprendre et de découvrir la biologie.

Pour leur dévouement, leur présence constante au cours de toutes ces années d' « études », en espérant que ce travail sera digne de leurs espoirs et de leur confiance.

Avec toute ma tendresse.

À mes frères,

FATIHA, WALID et NASER EDINE, Qui partage avec moi la passion de la découverte d'autres paysages et d'autres cultures.

Pour leurs encouragements, l'intérêt constant qu'ils ont montré envers mon travail, pour avoir été toujours à mes côtés sans réserve et avec amour, qu'ils trouvent ici l'expression de mon plus profond attachement.

À mes amis

Et particulièrement: ABDELAH, ABDELAZIZ, KAMEL, MOHAMED, SALIM, NASSIMA, ABLA et HIBA. En témoignage de toute mon affection et des belles années passées ensemble.

MEDJAHED Housseyn

Liste des abréviations

- ADN** : L'Acide DésoxyriboNucléique.
- API** : Analytical Profile Index
- BET** : Bromure d'ETHidium.
- C** : Carbone.
- CDS** : CoDing Sequence
- H₂S** : Le sulfure d'hydrogène
- HRP** : Hypersensitive Reaction and Pathogenicity
- HST** : Hypersensibilité sur tabac.
- ICBN** : International Code of Botanical Nomenclature
- KB** : Milieu King B.
- KIA** : Milieu *Kligler hajna*.
- KOH** : L'hydroxyde de potassium.
- MM₂Cu** : Milieu Minimal medium 2 with Copper sulfate.
- Na₂SO₄**: Sulfate de sodium.
- NaCl** : Le Chlorure de Sodium.
- Nm** : NanoMètre.
- O** : Oxygène.
- PBS** : Tampon phosphate salin.
- PCR** : Polymerase Chain Reaction.
- RAPD** : Random Amplified Polymorphic DNA.
- RH** ou **HST**: Hypersensibilité sur tabac.
- TAE** : Tris Acétate EDTA.
- TE** : Tris EDTA.
- UV**: UltraViolette.

Liste des Figures

Figure 1: Cladogramme basé sur la séquence <i>rbcL</i> de la famille des Rosaceae au sein de l'ordre des Rosales	3
Figure 2: Arbre phylogénique de la famille des Rosaceae, dérive de l'analyse de la combinaison de 125 caractères	6
Figure 3: Cycle de développement du feu bactérien, causé <i>E. amylovora</i> , chez les Maloïdées.....	13
Figure 4: Modèle des membranes interne et externe chez <i>E. coli</i> K12.....	17
Figure 5: Ilot de pathogénicité d' <i>E. amylovora</i> incluant le cluster <i>hrp/dsp</i>	22
Figure 6 : Symptômes du feu bactérien dans différents vergers d'Algérie.....	27
Figure 7 : Exemple d'un rameau de néflier atteint par le feu bactérien.....	28
Figure 8 : Exemple de Chancre d'un rameau de néflier.....	29
Figure 9 : Aspects des colonies d' <i>E. amylovora</i> développées sur les milieux KB (A) et MM2Cu (B).....	40
Figure 10 : Fragments obtenus après amplification selon le protocole de Laala <i>et al.</i> , (2012).....	42
Figure 11 : Fragments obtenus après amplification (PCR) par le protocole de Taylor <i>et al.</i> , (2001).....	43
Figure 12 : Bactéries fluorescentes sous lumière UV.....	45
Figure 13 : Test de croissance à 39°C.....	45
Figure 14 : Test positif, Virage au jaune pour les deux tubes.....	47
Figure 15 : Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase.....	48
Figure 16 : résultat du test de citrate.....	49
Figure 17 : Test de mise en évidence de l'activité nitrate réductase après addition du réactif de Griess.....	49
Figure 18 : Test d'assimilation des glucides sur milieu KIA.....	50
Figure 19 : Test de mise en évidence de l'activité uréase.....	51
Figure 20 : Test de l'utilisation de l'indole.....	52
Figure 21: Inoculation sur jeunes feuilles (A et B) de tabac des différents isolats avec apparition de taches nécrotiques (C et D).....	54

Figure 22 : Résultats du test d'antibiogramme pour quelques isolats.....	59
Figure 23 : Profil de RAPD des 14 souches d' <i>Erwinia amylovora</i> généré avec l'amorce OPA-01.....	61
Figure 24 : Profil de RAPD des 14 souches d' <i>E. amylovora</i> généré avec l'amorce OPA-03.....	62
Figure 25 : Dendrogramme d'analyse typologique montrant la diversité morphologique parmi les échantillons d' <i>Erwinia amylovora</i>	65

Liste des Cartes

Carte 1 : Sur l'échantillonnage effectué lors de ce travail.....	27
---	----

Liste des Tableaux

Tableau I: Principaux pays producteurs de pommes en 2010.....	7
Tableau II: Principaux pays producteurs de poires en 2010.....	8
Tableau III: Les plasmides décrits chez <i>Erwinia amylovora</i> , ainsi que leurs principales caractéristiques.....	16
Tableau IV : Quelques données sur l'ensemble des échantillons collectés.....	28
Tableau V : Les séquences des amorces du protocole de Laala <i>et al.</i> , (2012).....	34
Tableau VI : Composition du PCR mix selon Laala <i>et al.</i> , (2012).....	35
Tableau VII : Les séquences des amorces du protocole de Taylor <i>et al.</i> , (2001).....	35
Tableau VIII : Composition du PCR mix selon Taylor <i>et al.</i> (2001).....	36
Tableau IX: Liste des amorces RAPD utilisées lors de ce travail.....	37
Tableau X : Résultat du test des galeries API 20E.....	53
Tableau XI : Résultats obtenus sur les différents tests phénotypiques, biochimiques et d'hypersensibilité sur tabac pour les 14 isolats.....	55
Tableau XII : Représentation des résultats de l'antibiogramme (les diamètres des zones d'inhibitions sont calculés en centimètre).....	58
Tableau XIII : Représentation des amplicons issus de l'amplification par RAPD avec les amorces OPA-01 et OPA-03.....	63
Tableau XIV : Représentation des souches d' <i>Erwinia amylovora</i> , caractérisées par la méthode de RAPD, par rapport à leurs lieux d'échantillonnage.....	67
Tableau XV : Présentations de l'ensemble des bactéries isolées.....	Annexe
Tableau XVI: Analyse RAPD des 14 isolats d' <i>Erwinia amylovora</i> généré par l'amorce OPA-01.....	Annexe
Tableau XVII: Analyse RAPD des 14 isolats d' <i>Erwinia amylovora</i> généré par l'amorce OPA-03.....	Annexe

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
1. ROSACEAE.....	3
1.1 Origines.....	3
1.2 Morphologie.....	4
1.3 Aire de distribution et taxonomie.....	4
1.4 L'importance économique.....	5
1.4.1 <i>Maloideae</i>	6
a. Pommes.....	7
b. Poires.....	8
c. Néflier.....	9
1.5 Importance économiques des Rosacées en Algérie.....	9
2. E.AMYLOVORA AGENT DU FEU BACTERIEN.....	10
2.1 Aperçu historique sur la maladie.....	10
2.2 Les dégâts du feu bactérien.....	10
2.3 Gamme d'hôte du feu bactérien.....	11
2.4 Cycle de la maladie.....	12
2.5 Localisation de la bactérie dans les tissus infectés.....	13
2.6 Génétique d' <i>E. amylovora</i>	14
2.7 Les plasmides d' <i>E. amylovora</i>	15
2.8 Composants de surface cellulaires.....	15
2.8.1 <i>Le lipopolysaccharide (LPS)</i>	15
2.8.2 <i>Les flagelles</i>	17
2.9 Les facteurs de virulences.....	18
2.9.1 <i>Le système d'acquisition du fer</i>	18
2.9.2 <i>L'exopolysaccharide (EPS) ou amylovorane</i>	19
2.9.3 <i>Système de sécrétion de type III ou T3SS</i>	20
a. Les effecteurs de type III d' <i>Erwinia amylovora</i>	23
2.10 Analyse histologique des symptômes.....	23
2.11 Méthode de lutte et gestion de la maladie.....	24
3. MATERIELS ET METHODES.....	26
3.1 Matériel biologique.....	26
3.2 Isolement.....	26
3.2.1 <i>Prélèvement des échantillons</i>	26
3.2.2 <i>Traitement des échantillons</i>	29
3.2.3 <i>Isolement des isolats d'E. amylovora</i>	29
3.3 Identification des isolats d' <i>E. amylovora</i>	30
3.3.1 <i>Tests phénotypiques</i>	30
a. Test de fluorescence.....	30
b. Test de croissance.....	30
3.3.2 <i>Identification biochimique</i>	30
a. Test de potasse indicateur de GRAM.....	31
b. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose.....	31
c. Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase.....	31

d. Test d'utilisation du citrate.....	31
e. Test de mise en évidence de l'activité nitrate-réductase.....	32
f. Test d'assimilation des glucides.....	32
g. Test de mise en évidence de l'activité uréase.....	32
h. Test d'utilisation de l'indole.....	32
i. Identification par le système API 20E.....	32
3.3.3 Test d'hypersensibilité sur tabac (HST).....	33
3.3.4 Identification moléculaire.....	33
a. Extraction de l'ADN chromosomique.....	33
b. Le choix des amorces.....	34
c. Amplification.....	34
d. Electrophorèse de l'ADN sur gel.....	36
3.4 Test de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme).....	36
3.5 Caractérisation des souches d' <i>Erwinia amylovora</i> par l'utilisation de la random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD).....	37
4. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	38
4.1 Collecte des échantillons.....	38
4.2 Isolement d' <i>E. amylovora</i> sur milieux de culture sélectifs.....	39
4.3 Identification des isolats d' <i>E. amylovora</i>	40
4.3.1 Identification moléculaire d' <i>Erwinia amylovora</i>	40
4.3.2 Tests phénotypiques.....	44
a. Test de fluorescence sur KB.....	44
b. Test de croissance à 39°C.....	45
4.3.3 Identification biochimique.....	45
a. Test de potasse indicateur de GRAM.....	46
b. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose.....	46
c. Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase.....	47
d. Test d'utilisation du citrate.....	48
e. Test de mise en évidence de l'activité nitrate-réductase.....	48
f. Test d'assimilation des glucides.....	49
g. Test de mise en évidence d'une activité uréase.....	50
h. Test d'utilisation de l'indole.....	51
i. Identification par le système API 20E.....	52
4.3.4 Test d'hypersensibilité sur tabac.....	53
4.4 Test d'antibiogramme.....	57
4.5 Caractérisation des souches d' <i>Erwinia amylovora</i> par l'utilisation de la Random Amplified Polymorphic DNA fragments (RAPD).....	60
CONCLUSION.....	68

INTRODUCTION

Les Rosacées forment une famille qui compte environ 3100 espèces réparties en plus d'une centaine de genres (Mabberley, 1987 ; Judd *et al.*, 1999). Ils jouissent d'une grande importance économique car une grande partie des fruits cultivés dans les régions tempérées est produite par des espèces appartenant à cette famille. La superficie des Rosacées en Algérie à pratiquement doublé en 10 ans, passent de 35 403 ha en 2001 à plus de 72 000 ha en 2011. Ces chiffres traduisent l'importance grandissante accordée ces dernières années à la culture des Rosacées en Algérie (FAO, 2013 ; Abdelguerfi, 2003).

Les Rosacées ont plusieurs ennemis naturels ; champignons (*Fusicladium* et *Venturia*), insectes (*Cydia pomonella* et *Aphidoidea*) et bactéries (*Pseudomonas syringae*), mais l'ennemi le plus redoutable reste le feu bactérien, causé par la bactérie ; *Erwinia amylovora*.

Le genre *Erwinia* appartient à la famille des Entérobactéries qui comprend de nombreuses espèces pathogènes d'animaux, d'insectes ou de plantes. Il comprend des espèces pathogènes comme *E. amylovora*, *E. carotovora*, *E. pyrifoliae*, *E. mallotivora*, *E. papayae*, *E. psidii*, *E. rhapontici*, ou épiphytes comme *E. billingiae*, *E. toletana*, *E. trachaeophila*, *E. aphidicola*, *E. persicina*, et *E. tasmaniensis* (Llop *et al.*, 2011).

Le feu bactérien affecte les Maloïdées, une sous-famille des Rosacées, qui comprenant les arbres fruitiers à pépins (pommier, poirier...) et des arbustes d'ornement (aubépine, *Pyracantha*, amélanchier...). Le nom de la maladie est dû à une description de ces caractéristiques major. C'est une maladie sporadique qui peut provoquer des dommages considérables, car elle est nécrogène et évolue très rapidement. L'impact économique est difficile à chiffrer parce qu'il dépend de l'intensité de l'épidémie et qu'une attaque de feu bactérien peut avoir des répercussions sur plusieurs années. Il est probable que cet impact économique soit croissant puisque la maladie est en constante progression dans le monde et il n'existe pas de moyen de lutte chimique facile à employer contre l'agent causal. Néanmoins, il existe toujours dans le monde certaines zones de production qui restent épargnées comme la Chine en Asie (premier producteur mondial) ou le Brésil en Amérique du Sud.

L'Algérie, a été longtemps épargné par le feu bactérien mais au cours de ces deux dernières décennies des symptômes similaires à cette maladie ont été détectés dans plusieurs vergers de poiriers et néflier (*Pyrus communis* et *Eriobotrya japonica*). En effet, ils sont signalés dans différentes régions du pays à l'exemple de : Aïn Témouchent, Tlemcen, Sidi

Bellabes, Oran, Mascara, Dahra, Ain Defla, Boumerdès, Bouira, Béjaïa, Tizi Ouzou, Constantine et Mila (Ziad, 2011). Des échantillons ont été analysés au laboratoire et la présence d'*Erwinia amylovora* a été confirmée en 2011 (OEPP, 2011).

La wilaya de Chlef, figure aussi parmi les régions les plus affectées par ce fléau puisque de nombreux foyers ont été signalés comme : Medjaja, Cheggua, Sobha et Oued Sli.

Le constat qu'on peut faire est que la maladie semble gagner du terrain, d'année en année, dans notre pays. Seul un bon diagnostic peut contribuer de manière efficace dans le cadre des mesures préventives et de lutte contre cette maladie. Les échecs dans la détection ou le diagnostic peuvent avoir des impacts directs sur la production agricole et par conséquent sur l'économie.

Plusieurs approches pour la détection et l'identification d'*E. amylovora* ont été décrites (Powney *et al.*, 2011). Ces méthodes sont basées sur les propriétés physiologiques, sérologiques et moléculaires de la bactérie.

La détection d'*E. amylovora* peut se faire sur plusieurs milieux semi-sélectifs (Bereswill *et al.*, 1998 ; Jones et Geider, 2001) et sur milieux différentiels (King *et al.*, 1954). Cependant, il y a des limites dans l'utilisation de certaines de ces méthodes, par exemple, l'isolement de bactéries prend plusieurs jours et les résultats peuvent être ambiguës (Zhang *et al.*, 2000 ; Geider *et al.*, 2006).

Les techniques moléculaires, comme la PCR, sont couramment utilisées pour la détection d'*E. amylovora* de préférence aux diagnostics sérologiques et culturels (Powney *et al.*, 2011) compte tenu de leurs efficacités et rapidités.

Le présent travail s'inscrit dans ce contexte. Il s'agit de procéder à des isollements et des caractérisations biochimiques et moléculaires des souches d'*E. amylovora* à partir de 03 espèces de Rosacées (pommier, poirier et néflier) symptomatiques ou non de la maladie du feu bactérien. L'échantillonnage s'est effectué dans plusieurs régions avec différentes communes du pays notamment : Chlef, Ain Defla, Blida et Tipaza.

1. ROSACEAE

1.1 Origines

L'origine du nom rosacée donné à la famille provient du latin rose, qui désignait à la fois l'arbuste et la fleur. Peu après la publication de Linné de son œuvre majeure « Systema Naturae » en 1735, les botanistes ont travaillé pour améliorer la classification systématique. Ainsi, Michel Adanson en 1763 fut le premier à publier le mot « Rosaceae » comme nom d'une famille de plante dans son livre intitulé « Familles des Plantes ». L'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) (2006) accepte aujourd'hui d'attribuer la paternité de ce nom au botaniste Antoine Laurent de Jussieu (1789) (Hummer et Janick, 2009).

Plusieurs auteurs parlent des origines des rosacées. Selon Heywood, (2007), les rosaceae sont bien assésés à d'anciennes dicotylédones d'après les conclusions des études conduites sur certains fossiles. D'autres fossiles du Turonian datés de 90 millions d'années, confirment leur appartenance à cette famille (Crepet *et al.*, 2004). D'après les travaux de Wikstrom *et al.*, (2001), le groupe des rosacées date de 76 millions d'années et que la divergence des sous groupes est estimée entre 47 et 46 millions d'années. Certains auteurs comme Hutchinson (1964) suggèrent que les Rosaceae sont une ramification d'ancien Magnolias ligneux et une ligne commune de l'évolution conduisant à des ordres tels que les Fabales, Araliales, Fagales et Juglandales, qui ont des inflorescences plus spécialisées.

La famille des Rosaceae est robuste et à une grande diversité morphologique, au point d'être indéfinissable (Challice, 1974 ; Dickinson *et al.*, 2002). L'analyse de la séquence rbcL appuie fortement la monophylie des rosacées (Figure 1) (Morgan *et al.*, 1994).

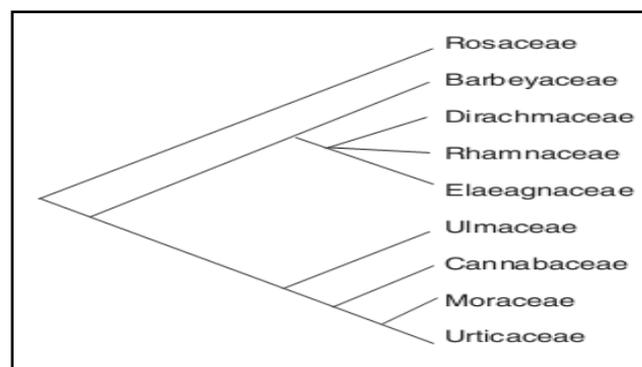


Figure 1: Cladogramme basé sur la séquence rbcL de la famille des Rosaceae au sein de l'ordre des Rosales (Morgan *et al.*, 1994).

1.2 Morphologie

Les Rosacées forment une famille de plantes dicotylédones, comprenant des herbes, des arbres et des arbustes, le plus souvent épineuse mais peut être parfois rhizomateuse (Judd *et al.*, 1999). Les feuilles sont pennées souvent alternes et rarement simple. Les fleurs sont souvent très spectaculaires, bisexuels ou rarement unisexuels. Les sépales sont généralement pentamères, parfois en alternance avec des lobes calicule. La corolle est généralement pentamère (5 pétales), rarement 4, et insérés sur un disque plus ou moins épais. A l'encontre du calice, les pièces de la corolle sont caduques. L'androcée compte un nombre indéfini d'étamines libres et implantées sur le même disque que la corolle. On les rencontre souvent au nombre de 15 au plus, parfois 10 ou même moins. Les filaments sont distincts ou fusionnent avec le disque de nectar. Leurs anthères sont biloculaires et introrses et s'ouvrent par deux fentes longitudinales. Le gynécée est formé de carpelles libres en nombre variable ou de carpelles soudés donnant naissance à un ovaire à plusieurs loges. Les carpelles sont au nombre de 01 ou plus, distincts ou sous forme de cône. L'ovaire varie de supérieur à inférieur selon le genre, les styles sont présent aux mêmes nombres que les carpelles. Le fruit peut être sous forme de follicule, akène, à pépins, drupes, agrégat ou en accessoire come drupéoles, ou plus rarement une capsule. L'embryon droit n'a pas d'albumen et sa radicule est dirigée vers le hile (Judd *et al.*, 1999).

1.3 Aire de distribution et taxonomie

La distribution de la famille des Rosaceae est cosmopolite et elle est très diversifiée, particulièrement dans l'hémisphère nord (Judd *et al.*, 1999). Les espèces herbacées poussent dans les forêts tempérées, dans les marais ou les eaux douces, dans la toundra arctique, les champs abandonnés et le long des routes. Plusieurs espèces ligneuses sont des pionniers et occupent une place importante dans les premiers stades de succession forestière. Les arbres des Rosaceae peuvent aussi être des composants mineurs de forêts de feuillues (Hummer et Janick, 2009).

La famille des Rosaceae est la 19^{ème} plus grande famille de plantes puisqu'elle comprend entre 95 à 100 genres et entre 2830 à 3100 espèces (Mabberley, 1987 ; Judd *et al.*, 1999 ; AWP, 2007).

La structure du gynécée varie grandement entre les espèces au sein de la famille des Rosaceae. Cette variation a été à la base de sa classification en 4 sous-familles (Figure 2) qui sont :

- Rosoideae (gynécée avec un ou plusieurs carpelle et donnant des fruits de type akènes ou polydrupes) ;
- Amygdaloideae (Prunoideae) (gynécée avec 3 à 5 carpelles et donnant des fruits de type groupe de follicule) ;
- Spiraeoideae, (gynécée comprenant un seul carpelle avec un fruit de type drupe à une seule graine) ;
- Maloideae (Pomoideae) (gynécée comprenant 1 à 5 carpelles et ovaire adhérent au réceptacle avec un fruit de type drupe soudé au réceptacle (fruit composé) (Takhtajan, 1997), (Figure 2).

L'hypothèse traditionnelle sur l'origine des Rosaceae, suggère que les Maloïdes (Pomoideae) sont les descendants d'un événement de polyploidisation, parce que le nombre chromosomiques des Maloïdes est $X=17$, tandis que celui des autres Rosaceae est $X=7,8$ ou 9 (Hummer et Janick, 2009). Selon Challice (1981), les Maloïdes descendent d'un événement de allotétraploidisation, suivie d'une ancienne hybridation entre les ancêtres des Amygdaloïdes ($X=8$) et Spiraeoïdes ($X=9$). Une seconde théorie suggère qu'une allo- ou bien une auto-polyploidisation est survenue seule dans les Spiraeoïdes, donc les Maloïdes sont originaires des Spiraeoïdes (Hummer et Janick, 2009).

1.4 L'importance économique

La famille des Rosaceae, inclue des espèces qui sont bien connues avec une grande importance économiques, particulièrement les fruits comestibles, ornementales et médicinales, mais aussi pour la production de bois (Janick, 2005). Selon des estimations de la FAO, la production mondiale totale des fruits comestibles de la famille des Rosaceae en 2005, a atteint les 113 millions de tonnes. Cette production avait une valeur à la ferme de 400 \$ US par tonne, soit un total de 45 milliards de dollars US. Ajoutant à cela, les produits des autres cultures comme les amandes, les rosiers et les autres produits, on peut suggérer alors que la culture des Rosacée peut valoir au moins 60 milliards de dollars annuelles (Hummer et Janick, 2009).

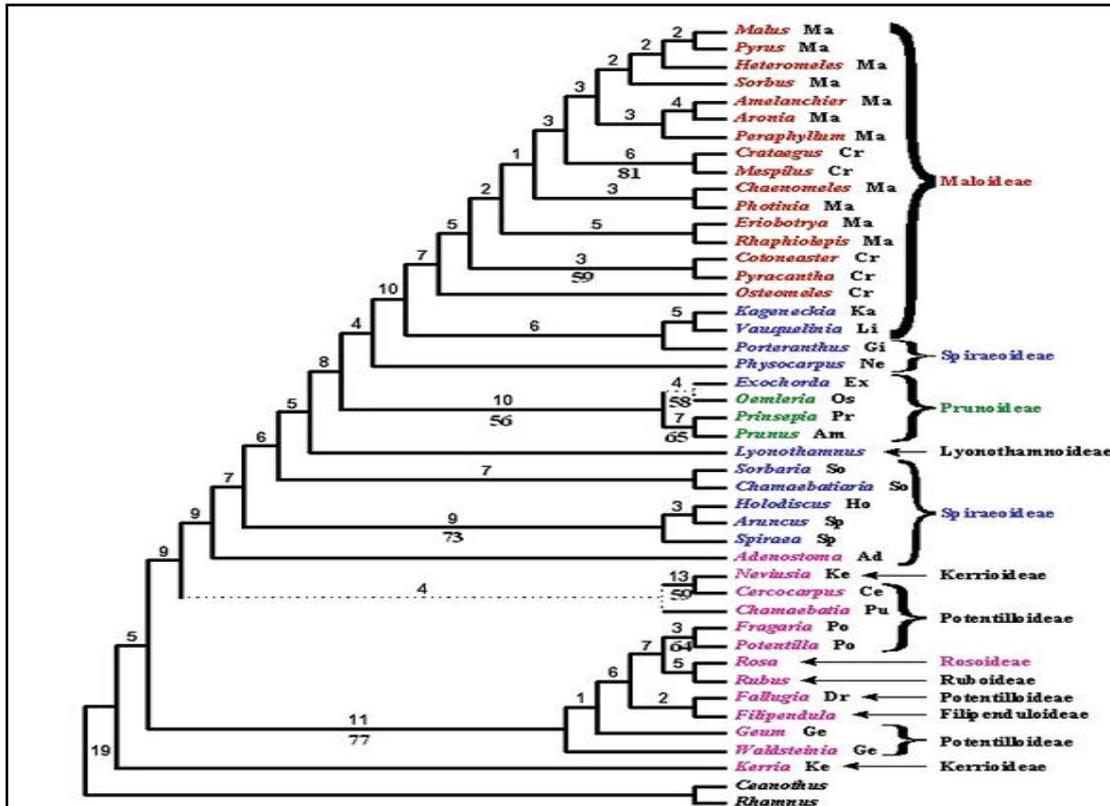


Figure 2: Arbre phylogénique de la famille des Rosaceae, dérive de l'analyse de la combinaison de 125 caractères (61 caractères non moléculaires + 64 caractères moléculaires basé sur les séquences ndhF, rbcL et nrITS) (Dickinson *et al.*, 2002). Les couleurs représente les traditionnelle sous famille (rouge= Maloideae, bleu= Spiraeoideae, vert= Amygdaloideae, rose= Rosoideae), Les noms en noir représente les sous familles proposé par Takhtajan, (1997).

1.4.1 Maloideae

La sous famille des Maloideae inclut comprend beaucoup de fruits comestibles et un grand nombre de plantes ornementales. Parmi les espèces célèbres de cette sous famille figure : le pommier, le poirier, le néflier et le cognassier.

a. Pommes

La pomme (*Malus pumila*) est l'un des fruits les plus consommés au monde après les agrumes, la banane et le raisin (Hummer et Janick, 2009). En 2010, la production mondiale de pommes a atteint environ les 69 millions de tonnes (FAO, 2013). Le premier producteur mondial de pomme est la Chine, suivie des USA et de la Turquie (Tableau I).

La culture des pommes se fait dans tous les pays tempérés et subtropicaux du monde, avec une production mineure dans les hautes altitudes. La popularité de la pomme vient du fait que le fruit est multi usage. Il peut être consommé frais et stocké pendant de longues périodes, tandis que les récoltes peuvent être traitées pour produire des sauces et des jus. Son utilisation sous forme coupé, il est l'ingrédient favori des pâtisseries pour la préparation des gâteaux, biscuits et tartes. Le jus peut être fermenté pour produire du cidre et des vinaigres (Hummer et Janick, 2009).

Tableau I: Principaux pays producteurs de pommes en 2010 (FAO, 2013).

Pays	Production annuelle (tonne)
Chine	33 265 186
États-Unis d'Amérique	4 210 060
Turquie	2 600 000
Italie	2 204 970
Pologne	1 858 970
Inde	1 777 200
France	1 711 230
République islamique d'Iran	1662 430
Brésil	1 279 030
Chili	1 100 000
Monde	69 511 975

b. Poires

Le genre *Pyrus* regroupe les espèces les plus importantes sur le plan économique chez les Rosaceae, après les pommes (Hummer et Janick, 2009). En 2010, La production mondiale de ce fruit s'est élevée à plus de 21 millions de tonnes (FAO, 2013) avec en tête la Chine, suivie des USA et de l'Italie (Tableau II).

Du point de vue économique, il existe trois espèces importantes : *Pyrus communis* (poire d'Europe), *Pyrus pyrifolia* (poire du Japon ou Nashi) et *Pyrus usuriensis* (poire de Chine). Les Japonais et les Coréens cultivent de complexes hybrides entre *Pyrus pyrifolia* et *Pyrus usuriensis* (Hummer et Janick, 2009).

La poire à des utilisations similaires au pomme, bien que sa popularité est peut être plus faible à cause de l'éphémèrement rapide de sa qualité. Le poirier est également une plante ornementale très prisée en Asie car il est considéré comme un signe de porte bonheur (Hummer et Janick, 2009).

Tableau II: Principaux pays producteurs de poires en 2010 (FAO, 2013).

Pays	Production annuelle (tonne)
Chine	15 231 858
États-Unis d'Amérique	738 085
Italie	738 646
Argentine	704 200
Espagne	473 400
Inde	382 000
Turquie	380 003
Afrique du Sud	368 495
République de Corée	307 820
Belgique	307 270
Monde	21 900 000

c. Néflier

Le néflier (*Eriobotrya japonica*), en dépit de son nom, il est originaire de Chine. C'est un fruit très prisé par les consommateurs (premier fruit à apparaître en été) (Hummer et Janick, 2009). La production est aujourd'hui en augmentation rapide en Chine, et la production progresse également dans les pays méditerranéens. L'Espagne est le premier exportateur principal de la nêfle (Hummer et Janick, 2009).

1.5 Importance économiques des Rosacées en Algérie

La relance du développement de la culture des espèces fruitières à noyaux et à pépins en Algérie a commencé réellement en 2000, dans le cadre du programme National de Développement Agricole (PNDA) (Chaouia, 2003). Le verger arboricole fruitier, représenté par les rosacées à noyaux et à pépins ainsi que les espèces dites rustiques, essentiellement le figuier et l'amandier, occupe selon les statistiques de l'an 2000 une superficie estimée à 131 120 ha, environ 27 % de la superficie arboricole. Environ 73 % de cette superficie sont réservés aux rosacées à noyaux et à pépins et 27 % aux rustiques, comme le figuier. La superficie totale moyenne est passée de 105 000 ha en 1980 à environ 130 000 ha en 1999, une progression qui concerne l'ensemble des espèces (Abdelguerfi, 2003).

Pour répondre aux besoins en plants dans les campagnes de plantation, notre pays a eu recours à l'importation de l'étranger. Seulement, l'importation et l'introduction de nouvelles espèces et variétés de l'étranger, principalement les espèces à pépins, n'a pas toujours fait l'objet de précautions d'usage, nécessaires pour évaluer les risques et apprécier leur comportement, notamment en matière de maladies et d'adaptation (Abdelguerfi, 2003).

La Pomme est le fruit le plus consommé en Algérie en 2011 (450 000 tonnes), après les Pastèques (1 350 000 tonnes), les Raisins (650 000 tonnes) et les Oranges (600 000 tonnes). Bien que les superficies du Pommier en Algérie soient importantes (47 000 ha en 2011), les rendements demeurent encore faibles, les principales variétés de pommiers existants en Algérie sont : Llorca, Anna, Dorset Gold, Golden, Reine des reinettes et la Starkrimson (FAO, 2013; Abdelguerfi, 2003).

La culture des poires occupe une partie très importante dans l'arboriculture Algérienne, avec une superficie estimée à 24 500 ha en 2011 et une production évaluée autour de 180 000 tonnes dans la même année (FAO, 2013). La principale variété cultivée en Algérie est : Santa Maria.

2. E.AMYLOVORA AGENT DU FEU BACTERIEN

2.1 Aperçu historique sur la maladie

L'espèce *Erwinia amylovora* est reconnue comme étant la première bactérie phytopathogène observée, en 1884 à l'aide du postula de Koch's (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011). Décelée pour la première fois vers 1780 dans la vallée de l'Hudson aux Etats-Unis, le feu bactérien gagne en 1900 la côte pacifique. La maladie a été signalée par la suite en Nouvelle-Zélande (1919) et en Europe (1957) dans le Kent en Grande-Bretagne, ou des échanges avec la Nouvelle-Zélande seraient à l'origine de l'infection. Dès lors, la maladie s'étend sur le pourtour de la mer du Nord et de la Baltique : Angleterre, Pays-Bas, Belgique, Danemark et le nord de l'Allemagne (Van der Zwet et Keil, 1979 ; Gautier, 1988).

En France, les premiers foyers ont été découverts en 1972 dans l'arrière pays de Dunkerque sur des haies d'aubépine. De 1978 à 1980, des vergers de Poirier sont atteints par la maladie du feu bactérien dans la région de Dax (Pyrénées Atlantiques), dans la vallée de la Garonne (Marmande) et la vallée de la Dordogne (Sainte-Foy-La-grande). A partir de 1982, des foyers sporadiques se font jour en Alsace sur plantes d'ornements, dans le Val d'Oise, le limousin, la région d'Orléans en verger. Hors de France, la progression du feu bactérien atteint le Sud de l'Allemagne et la Suisse (Gautier, 1988).

Depuis le début des années 1980, le feu bactérien s'est répandu dans l'Est méditerranéen (Grèce, Liban, Turquie, Chypre et Jordanie) et en 1995-96 des attaques ont eu lieu dans des zones jusqu'ici indemnes comme l'Espagne, la Hongrie, l'Italie et la Roumanie (OEPP, 2011).

Pour ce qui est de l'Afrique, le premier pays qui a été touché par la maladie fut l'Egypte en 1983 (OEPP, 1990). La maladie s'est déclarée par la suite dans d'autres pays comme le Maroc (2006) où certains vergers de la province de Meknès (Ain Arma) ont été atteints. Dans cette province la maladie a ravagé environ 2 830 ha (Bami, 2010). L'Algérie est le troisième pays d'Afrique touché par le feu bactérien (OEPP, 2011).

2.2 Les dégâts du feu bactérien

Depuis sa découverte, le feu bactérien a été considéré comme étant la maladie la plus destructrice et un important facteur limitant de la culture du pommier et du poirier. Le

développement de la maladie et le degré des pertes semble être fortement liés aux conditions météorologiques qui sont favorables au développement de la maladie (Sobiczewski *et al.*, 1997 ; Vanneste, 2000). Les dégâts causés par la maladie sont considérables puisqu'en 1990, plus d'un demi-million d'arbres fut détruits, seulement en Italie (Vanneste, 2000). En 1998, les pertes fut estimée à plus de 68 millions de dollars (US) dans le Nord West des USA et 10 millions de dollars (NZ) dans la région du Hawke's Bay en Nouvelle-Zélande (Vanneste, 2000). En plus de cela, l'utilisation de la streptomycine pour le contrôle de la maladie d'une part et l'apparition progressive de souches résistantes d'autres part causent annuellement plus de 100 millions de dollars de perte aux USA (Norelli *et al.*, 2003).

2.3 Gamme d'hôte du feu bactérien

L'espèce *E. amylovora* est une bactérie redoutable qui affecte la famille des Rosaceae. Elle possède une très large gamme d'hôte à l'intérieur de cette famille (Gautier, 1988 ; Hummer et Janick, 2009).

Selon Van der Zwet et Keil, (1979), la maladie a été décrite chez approximativement 200 espèces végétales, appartenant à 40 genres (avec 4 sous famille de la famille des Rosaceae : Maloideae (syn. Pomoideae), Rosoideae, Amygdaloideae (syn. Prunoideae), et Spiraeoideae. Dans la dernière sous famille l'inoculation ne peut se faire de manière naturelle, c'est pour cela qu'elle n'est plus considéré aujourd'hui comme hôte de la maladie (Van der Zwet et Keil, 1979).

La sous famille des Maloideae est la plus fragile puisqu'elle détient plusieurs espèces très sensibles à la maladie. Ladite sous famille comprend aussi des espèces à grande valeur économique. Les genres : *Pyrus*, *Malus*, *Cydonia*, *Eryobotria*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha* et *Sorbus*, appartenant à cette sous famille, sont considérés comme étant les plus cultivés au monde en plus d'être les hôtes les plus communs de la maladie (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011).

Le feu bactérien a été aussi détecté sur d'autres espèces comme le framboisier (*Rubus idaeus*) (Starr *et al.*, 1951) et plus récemment sur *Rosa rugosa* en Allemagne (Vanneste *et al.*, 2002) et le prunier en république Tchèque (Kobra et Sillerova, 2010).

L'espèce *E. amylovora* est très homogène génétiquement. La majorité des souches sont agressives sur l'ensemble des plantes de la gamme d'hôte. Il existe cependant quelques exceptions : certaines souches peuvent infecter les plantes du genre *Rubus* mais pas le genre *Malus* ou *Pyrus* (Momol et Aldwinckle, 2000). Entre une souche isolée de *Rubus* et une

souche pathogène de pommier/poirier, des différences au niveau d'un gène de biosynthèse des polysaccharides et des gènes de protéines hypothétiques ont été mises en évidence (Triplett et al., 2006). De même, la comparaison phylogénétique d'une souche isolée d'Amelanchier avec des souches isolées d'autres Maloïdées montre une variabilité de cette souche au sein de l'espèce (Barionovi et al., 2006).

2.4 Cycle de la maladie

L'infection au feu bactérien survient quand l'hôte se trouve en position de sensibilité, l'inoculation du photogène est suffisante quand les conditions environnementales sont optimales (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011).

Le cycle de la maladie a été décrit par plusieurs auteurs (Van der Zwet et Keil, 1979 ; Van der Zwer et Beer, 1995 ; Paulin, 1996 ; Thomson, 2000). La principale voie d'infection d'*E.amylovora* est à travers les fleurs. La bactérie se dissémine à partir de lésions actives via des insectes pollinisateurs pendant la période de floraison, ou grâce à des phénomènes physiques. Elle pénètre dans l'hôte par des ouvertures naturelles ; nectaires, stomates ou accidentelles (blessures) causées par le vent, insectes, grêle ou activité agricole en période de floraison ou de croissance des pousses. Une fois dans l'apoplaste, elle se multiplie préférentiellement dans les tissus jeunes en croissance, ce qui peut se traduire par l'apparition à leur surface de gouttelettes d'exsudat (mélange de polysaccharides bactériens et de cellules bactériennes). Cet exsudat permet une rapide dissémination de la maladie. Les tissus atteints se nécrosent, les rameaux et les feuilles flétrissent et se dessèchent. La bactérie peut envahir l'ensemble de la plante en se multipliant dans les espaces intercellulaires du parenchyme cortical mais elle peut aussi atteindre les vaisseaux du xylème où elle se déplace contre le flux ascendant de la sève (Bogs *et al.*, 1998). L'hôte tente de limiter la propagation de l'infection en scellons les tissus infectés par déposition de plusieurs couches de liège dans le cortex, conduisant à la formation de chancres sur les branches ou le tronc, dans lesquels la bactérie peut se conserver pendant la période de repos végétatif ou l'hiver (Eden Green et Billing, 1974). Elle reprend sa multiplication au printemps suivant (Figure 3).

La maladie peut se transmettre très facilement d'une plante à l'autre par l'intermédiaire de l'exsudat, la propagation de la maladie sur une courte distance est assurée par le vent, la pluie, les aérosols, les insectes (spécialement les abeilles) et les activités agricoles. La propagation sur de longues distances survient principalement par l'utilisation de matériels infectés (Sobiczewski *et al.*, 1997 ; Thomson, 2000 ; Palacio-Bielsa *et al.*, 2009 ;

Donat *et al.*, 2007). Le rôle des oiseaux dans la propagation de la maladie a été suggéré par Van der Zwet et Keil, (1979) mais il n'a jamais été démontrée (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011).

La gravité de la maladie reste difficile à prédire. De fortes épidémies peuvent être suivies de plusieurs années sans attaque ou avec de faibles attaques si les conditions climatiques sont défavorables à la maladie.

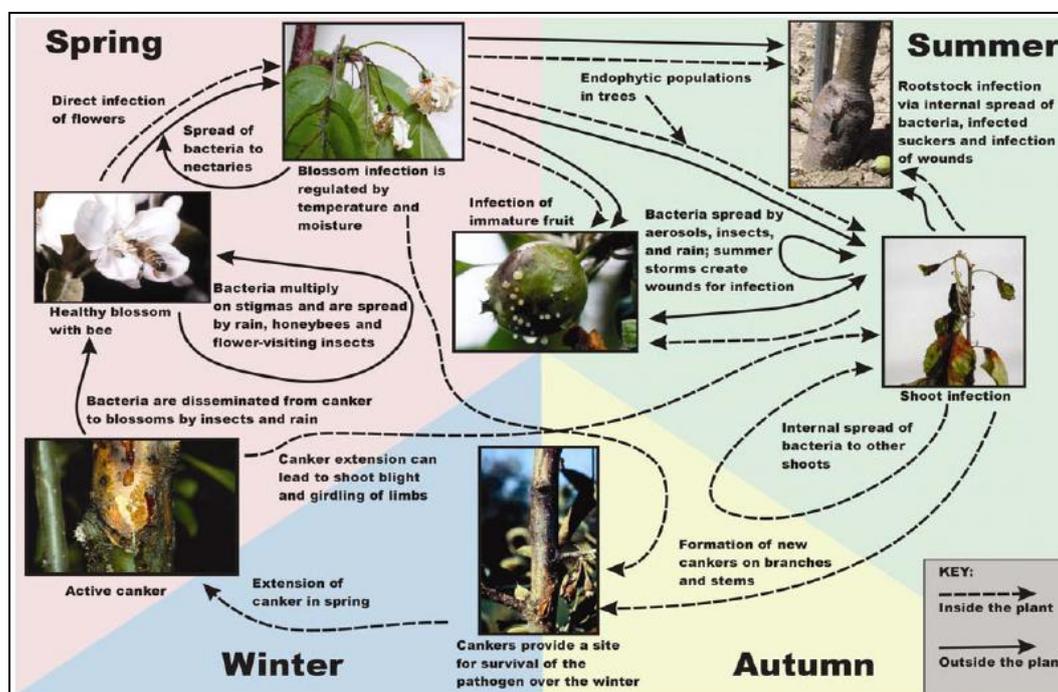


Figure 3: Cycle de développement du feu bactérien, causé *E. amylovora*, chez les Maloïdées. Les lignes pointillées représentent le mouvement de la bactérie et la propagation de la maladie au sein de la plante, et les lignes pleines, le mouvement de la bactérie à l'extérieur de la plante (Thomson, 2000).

2.5 Localisation de la bactérie dans les tissus infectés

D'après les résultats d'une étude menée sur un semis sensibles de pommier inoculés par blessure (Dellagi *et al.*, 1999), la bactérie a été localisée, grâce à la technique d'immunofluorescence, dans le mésophylle (à proximité des parois végétales), dans le parenchyme cortical de la nervure centrale ainsi que dans certains éléments déformés du xylème. Bien que ces données n'aient pas été généralisées à l'ensemble des hôtes sensibles d'*E. amylovora*, le système vasculaire de la plante, et plus particulièrement le xylème, semble constituer un élément essentiel pour assurer la migration du pathogène (Huang et Goodman, 1976 ; Suhayda et Goodman, 1981 a et b ; Goodman et White, 1981 ; Bogs *et al.*, 1998 ; Bogs *et al.*, 2004). Lorsque

la bactérie est retrouvée dans le limbe, il semble que ce soit préférentiellement dans le parenchyme lacuneux (Dellagi *et al.*, 1999 ; Heyens et Valcke, 2004).

2.6 Génétique d'*E. amylovora*

Le génome de trois souches d'*E. amylovora* ; ATCC 49946, CFBP 1430 et ATCC BAA-2158, ont été séquencé et publié par plusieurs auteurs (Sebahia *et al.*, 2010 ; Smits *et al.*, 2010 ; Powney *et al.*, 2011). La souche ATCC 49946 a été isolée sur pommier à New York, USA (Sebahia *et al.*, 2010). La souche CFBP 1430 a été isolée de l'aubépine (*Crataegus*) en France par Paulin et Samson (1973), alors que la souche ATCC BAA-2158, elle a été isolée des Ronces (*Rubus*) en Illinois, aux USA (Ries et Otterbacher, 1977).

Les trois souches ont un chromosome circulaire d'une taille approximative de 3,81 Mb, avec un pourcentage en (GC) de 53,6 %. Cependant, les plasmides des trois souches présentent des différences (voir section 2.7).

Le génome de la souche bactérienne d'*E. amylovora* séquencé par Sebahia *et al.*, (2010) est constitué d'un chromosome circulaire de 3.805.874 pb et deux plasmides : le plasmide AMYP1 (28,243 bp) et le plasmide AMYP2 (71,487 bp). Les régions codantes dans le chromosome comptent 85,1 % de la séquence totale, avec 3.483 séquences codantes identifiées (CDS). Les résultats montrent que 254 CDS (7 %) n'ont pas de correspondances dans les bases de données NCBI actuelles ; 114 CDS (3,3 %) correspondent à des protéines hypothétiques conservées. Aussi, 49 CDS (1,4 %) sont similaires aux gènes mobiles comme intégrases, transposases, et des bactériophages et 110 CDS (3,2 %) ont été classés comme pseudogènes. Les autres 2 956 CDS annotés comprennent, entre autres des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire et des protéines de surface (299 CDS [11%]) et les gènes impliqués dans la transduction du signal et de la réglementation (228 CDS [8%]). Les résultats selon les travaux de Sebahia *et al.*, (2010) ont permis d'identifier 7 opérons d'ARNr et 78 séquences d'ARNt dans le chromosome. Aussi, deux nouveaux clusters ont été identifiés (AMY1550-1575 et AMY2648-2676) qui ressemblent à la SST3- encoding SSR-1 de l'ilot de *Sodalis glossinidius*.

2.7 Les plasmides d'*E. amylovora*

Bien que les souches d'*E. amylovora* ne semblent pas présenter de différence vis-à-vis des tests biochimiques et sérologiques (Paulin, 2000 ; Smits *et al.*, 2010), elles présentent par contre des différences capitales vis-à-vis d'autres tests comme la virulence et la variabilité de la gamme d'hôte (Norelli *et al.*, 1984 ; Wang *et al.*, 2009). Ces différences peuvent être expliquées par la flexibilité du génome de la bactérie y compris ceux des plasmides. L'information génétique contenue dans le matériel extra-chromosomique est très importante pour la virulence (Llop *et al.*, 2011). Les scientifiques pensaient que le plasmide pEA29 était universel (Llop *et al.*, 2008 ; Mohammadi, 2010) mais plusieurs travaux ont montré par la suite l'existence de plusieurs plasmides dans différentes souches de ce pathogène (Maxon-stein *et al.*, 2003 ; Foster *et al.*, 2004). Les principaux plasmides d'*Erwinia amylovora* découverts, avec leurs caractéristiques, sont présentés dans le Tableau III.

2.8 Composants de surface cellulaires

2.8.1 Le lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide est le composé de surface majoritaire des bactéries à Gram négatif. C'est une macromolécule tripartite composée d'un lipide (appelé A) ancré dans la membrane externe, d'un oligosaccharide (ou « core ») et d'un polysaccharide appelé antigène - O (ou chaîne O) (Figure 4) (Raetz *et al.*, 2002).

Le LPS peut être considéré comme une protection physique des cellules bactériennes qui contribue à réduire la perméabilité membranaire, permettant ainsi la croissance bactérienne dans un environnement défavorable : les mutants affectés dans la synthèse du LPS ont, en effet, une sensibilité accrue aux antibiotiques et leur croissance est limitée (Kingsley *et al.*, 1993 ; Dow *et al.*, 1995). La composition et la structure du LPS d'*E. amylovora* ont été déterminées en 1987 par Ray *et al.*, (1987). D'après cette étude la fraction lipidique est composée de glucosamine phosphate et de plusieurs acides gras qui sont communs aux Entérobactéries. Quant à la fraction carbohydrate, elle est composée :

- d'une chaîne courte (chaîne O ou antigène O) composée de sous-unités répétées de trois sucres neutres : fucose, glucose et galactose,

Tableau III: Les plasmides décrits chez *Erwinia amylovora*, ainsi que leurs principales caractéristiques.

Plasmide	Souche d'origine	Taille (pb)	Hôte	Paye	Numéro d'accès	Références
pEA72	Ea273	71,487	<i>Malus sp</i>	USA	FN666577	Sebahia <i>et al.</i> , 2010
pEI70	IVIA1614-2a	65,840	<i>Crataegus sp</i>	11 pays européens	CP002951	Llop <i>et al.</i> , 2008; 2011
pEL60	LebB66	60,145	<i>Malus sp</i> <i>Pyrus sp</i>	Liban	NC_005246	Foster <i>et al.</i> , 2004
pCPP60	Ea322	56 Kb	<i>Crataegus sp</i>	France	–	Steinberger <i>et al.</i> , 1990
pEA34	CA11	34 Kb	<i>Pyrus sp</i> <i>Malus sp</i>	USA	–	Chiou et Jones 1991 ; 1993
pEU30	UTRJ2	30,314	<i>Pyrus sp</i> <i>Malus sp</i>	USA	NC_005247	Foster <i>et al.</i> , 2004
pEA29	Ea88	28,314	<i>Pyrus sp</i>	USA	AF264948	McGHEE et Jones, 2000
	Ea273	28,243	<i>Malus sp</i>	USA	FN666576	Sebahia <i>et al.</i> , 2010
	CFBP1430	28,259	<i>crataegus</i>	France	FN43411	Smits <i>et al.</i> , 2010
pEA8.7	CAR3	9Kb	<i>Pyrus sp</i>	USA	–	Palmer <i>et al.</i> , 1997
pEAR5.2	ATCCBAA2158	5,251	<i>Rubus sp</i>	USA	FR719211	Powney <i>et al.</i> , 2011
pEAR4.3	ATCCBAA2158	4,369	<i>Rubus sp</i>	USA	FR719210	Powney <i>et al.</i> , 2011
pEA2.8	IL-5	2,825	<i>Rubus sp</i>	USA	AY123047	MacGhee <i>et al.</i> , 2002
pEA1.7	IH3-1	1,711	<i>Crataegus sp</i>	USA	AY123046	MacGhee <i>et al.</i> , 2002

- d'un « core » contenant des oligosaccharides (heptose, glucose et acide uronique), des composés aminés et du 3-desoxy-2-octulosonic acid (KDO).

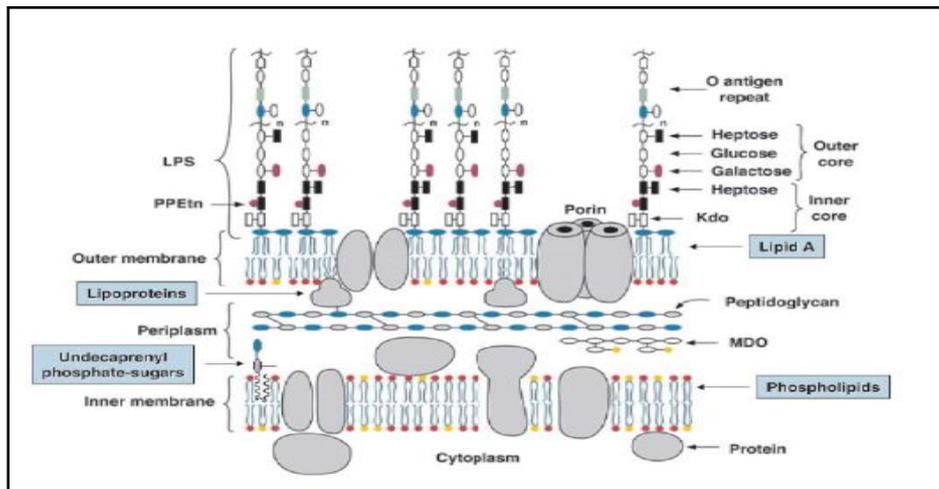


Figure 4: Modèle des membranes interne et externe chez *E. coli* K12 (d'après Raetz et al., 2002).

2.8.2 Les flagelles

La bactérie d'*E. amylovora* porte des flagelles péritriches nécessaires à la mobilité (2 à 7 par cellule), comme la plupart des Entérobactéries. La synthèse des flagelles dépend de facteurs externes comme la température, le pH et l'osmolarité (Raymundo et Ries, 1980, 1981). Sur la plante, la mobilité a été observée en surface des stigmates mais par contre n'a pas été mise en évidence dans les espaces intercellulaires de tissus infectés (Raymundo et Ries, 1980 ; Thomson, 1986).

Expérimentalement, la mobilité facilite l'infection des bouquets floraux de pommier lorsque la bactérie est inoculée par pulvérisation. Elle n'intervient plus lorsque le pathogène est inoculé à la seringue directement dans les pousses puisque que, quelle que soit la mobilité de la souche, on obtient dans ce cas le même taux d'infection (Bayot et Ries, 1986). En lien avec la mobilité, les bactéries montrent un comportement complexe appelé chimiotactisme qui leur permet de percevoir des composés chimiques du milieu et de se déplacer vers les produits attractifs ou de fuir les produits répulsifs (Blair, 1995). Chez *E. amylovora*, le chimiotactisme dépend de la température et du pH avec un optimum situé entre 20 et 28 °C et un pH de 6 à 8 (Raymundo et Ries, 1980). La bactérie *E. amylovora* présente un chimiotactisme positif pour le nectar de pomme, l'acide aminé (aspartate) et pour plusieurs

acides organiques (fumarate, malate, maleate, malonate, oxaaloacétate et succinate) mais pas pour les sucres suivants : fructose, galactose, glucose, lactose, mannitol, raffinose, ribose, sorbitol et sucrose (Raymundo et Ries, 1980).

La mobilité des microorganismes pathogènes est considérée comme un facteur de virulence essentiel à la colonisation de l'hôte. Cependant, les filaments flagellaires ont des propriétés antigéniques révélées lors du contact avec les animaux et les plantes hôtes. De plus, la mobilité flagellaire est très coûteuse en énergie pour la cellule en raison du nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle et de son fonctionnement. Par conséquent, il n'est pas surprenant que la synthèse du flagelle soit régulée par des facteurs externes, incluant l'interaction des cellules bactériennes avec leur hôte (Parkhill *et al.* , 2001 ; Parkhill *et al.* , 2003).

2.9 Les facteurs de virulences

Concernant le pouvoir pathogène, plusieurs déterminants ont été identifiés à ce jour : le système d'acquisition du fer, l'EPS et les protéines sécrétées par un système de sécrétion de type III.

2.9.1 Le système d'acquisition du fer

La bactérie *E. amylovora* possède un système d'acquisition du fer composé de sidérophores de type hydroxamate et d'un récepteur FoxR (Kachadourian *et al.*, 1996 ; Expert, 2000). Ce système est important pour la survie de la bactérie en milieu carencé en fer comme l'apoplaste. Le sidérophore majoritairement produit par *E. amylovora* est cyclique (DFO E) mais de petites quantités d'autres sidérophores du même type, cycliques (DFO D, X) ou linéaires (DFO G), sont synthétisées (Feistner *et al.*, 1993 ; Kachadourian *et al.*, 1996). Le sidérophore se lie au Fe³⁺ pour former la ferrioxamine et l'ensemble est réinternalisé grâce à FoxR. Un mutant *dfoA*, affecté dans la synthèse du sidérophore, est incapable d'utiliser le citrate ferrique (principal transporteur de fer dans la plante) comme source de fer (Kachadourian *et al.*, 1996). Sur fleurs, les mutants *dfoA* et *foxR* montrent une capacité de colonisation des fleurs plus faible que la souche sauvage et induisent un niveau moindre de maladie (Dellagi *et al.*, 1998). Ce système est donc impliqué dans l'agressivité de la bactérie.

2.9.2 L'exopolysaccharide (EPS) ou amylovorane

La cellule bactérienne d'*E. amylovora*, est entourée d'une couche de polysaccharides (galactose, glucose, mannose et acide uronique) organisée en capsule, formant l'exopolysaccharide (EPS) (ou amylovorane) qui semble jouer un rôle important dans la virulence (Bugert et Geider, 1995). Un mutant affecté dans la synthèse d'EPS est avirulent. Contrairement au LPS, l'EPS n'est pas immunogène. La bactérie *E. amylovora* produit un autre polysaccharide, un homopolymère de fructose appelé levane. Les mutants affectés dans la synthèse du levane restent virulents mais ils sont moins agressifs que la souche sauvage (Geier et Geider, 1993).

Le feu bactérien, dépend fortement de l'EPS durant tous les stades de croissance de la bactérie pour pouvoir échapper aux réactions de défense naturelle de la plante (Bellemann *et al.*, 1994). La biosynthèse de l'EPS requiert un grand nombre de gènes. La plupart de ces gènes sont localisés dans une région du chromosome d'environ 17kb appelée *ams* (amylovoran synthesis) (Bugert et Geider, 1995). Les quantités d'EPS synthétisées varient selon les souches mais aussi en fonction de la température, du pH, et de la concentration en sels du milieu et de la source de carbone. Les mutants altérés dans la synthèse de l'amylovorane, donc dépourvus de capsule, sont non pathogènes (Bernhard *et al.*, 1993), ce qui fait de l'amylovorane un facteur de virulence.

La structure exacte de l'amylovorane a été déchiffrée pour la première fois par Nimtz *et al.*, (1996) et confirmée par Maes *et al.*, (2001). L'amylovorane est constitué d'une longue série de répétition d'unité de hétéropolysaccharides ; une combinaison de pentasaccharides et de hexasaccharides. Selon Maes *et al.*, (2001), l'amylovorane des souche prélevées sur le genre *Malaceae* est constitué de 30 à 40 % de hexasaccharide. Alors que celles prélevées sur le genre *Rubus* sont 100 % constitués de pentasaccharide.

Le rôle de l'EPS dans le mécanisme de l'infection a été élucidé depuis longtemps. Il participe au premier contact intime entre la bactérie et son hôte. Il joue un rôle dans la perturbation et l'obstruction du système vasculaire de la plante (Suhayda et Goodman, 1981b ; Denny, 1995) et protège la bactérie contre les réactions de défense de la plante (Leigh et Coplin, 1992 ; Kiraly *et al.*, 1997).

2.9.3 Système de sécrétion de type III ou T3SS

Le système de sécrétion de type III est caractéristique des bactéries Gram-. Il est décrit comme un système de micro-injection de facteurs de virulence et permet la sécrétion de protéines du cytosol bactérien directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes hôtes (Cornelis, 2006 ; Da Cunha *et al.*, 2007).

Le système Hrp est une structure ressemblant à une seringue, composée d'anneaux, membranaires et d'un filament extracellulaire appelé pilus Hrp chez les bactéries phytopathogènes qui sert au transport à longue distance de protéines sécrétées à travers la paroi des cellules de la plante (Roine *et al.*, 1997 ; Kubori *et al.*, 1998).

La structure du T3SS ressemble au corps basal flagellaire avec deux anneaux interagissant avec la membrane externe, deux anneaux internes situés au niveau de la membrane cytoplasmique, et une extension extracellulaire de 8 nm de diamètre et environ 80 nm de long (Taira *et al.*, 1999 ; Jin *et al.*, 2001).

Les systèmes de sécrétion de type III impliqués dans la sécrétion de protéines de virulence sont présents chez de nombreuses bactéries pathogènes des plantes et des animaux (Hueck, 1998), ainsi que chez des bactéries symbiotiques des plantes comme *Rhizobium* spp. ou des animaux comme *Sodalis glossinidius* (Dale *et al.*, 2001) et *Photorhabdus luminescens* (Ffrench-Constant *et al.*, 2000). Chez *E. amylovora*, les gènes *hrp-dsp* (pour Hypersensitive Reaction and Pathogenicity- Disease SPecific) codent un système de sécrétion de type III, nécessaire pour l'induction de la maladie sur plante hôte et de l'hypersensibilité sur plante non hôte. La plupart des mutations dans les gènes *hrp* conduisent à la perte de la virulence (Willis *et al.*, 1991). Ce système est utilisé pour délivrer des protéines appelées effecteurs directement dans les cellules de l'hôte. Les gènes *hrp-dsp* peuvent être classés en trois catégories selon leur fonction : gènes de régulation, gènes de structure et gènes de protéines sécrétées. Les protéines de régulation contrôlent l'expression des autres gènes *hrp-dsp*, les protéines de structure forment l'appareil de sécrétion par lequel transitent les protéines sécrétées impliquées dans le parasitisme de l'hôte (Tang *et al.*, 2006).

Chez *E. amylovora*, l'expression des gènes *hrp-dsp* est activée *in planta* et en milieu minimum mais elle est réprimée en milieu riche (Wei *et al.*, 1992). Les signaux environnementaux qui affectent l'expression des gènes incluent les sources de carbone et d'azote, le pH, la température et l'osmolarité (Wei *et al.*, 1992 ; Gaudriault *et al.*, 1997).

Les expériences de marquage montrent que le pilus Hrp est impliqué spécifiquement dans la sécrétion des effecteurs. Cette sécrétion se déroule tout au long de l'assemblage du

pilus Hrp. Il a été démontré que le pilus Hrp fonctionnait comme un conduit permettant d'acheminer les effecteurs et s'allongeait par l'extrémité distale (Li *et al.*, 2002).

Les gènes codant les T3SS sont presque toujours groupés en cluster d'environ 20 à 25 gènes sur le chromosome ou sur un plasmide (par exemple chez *Ralstonia*) (Tampakaki *et al.*, 2004), formant un îlot de pathogénicité (PAI). Ces PAI ont souvent un pourcentage en G+C différent du reste du chromosome (Hacker et Kaper, 2000).

La présence des SST3 est nécessaire à l'expression du pouvoir pathogène et de la maladie chez les plantes hôtes ou sensibles mais aussi à l'observation d'une réaction d'hypersensibilité chez les plantes non hôtes ou résistantes (Lindgren *et al.*, 1986 ; Büttner et He, 2009). L'hypersensibilité est une réaction rapide de défense de la plante induisant la mort programmée des cellules et la production de divers agents antimicrobiens bloquant ainsi la progression du pathogène (Klement, 1982 ; Hueck, 1998).

Le cluster *hrp-dsp* d'*E. amylovora* fait partie d'un îlot de pathogénicité (PAI) de 62 Kb divisé en quatre parties (Figure 5) (Oh et Beer, 2005) :

- L'îlot de transfert (IT) dont le rôle est mal connu.
- La région HAE (Hrp-associated enzymes) dont les gènes pourraient coder pour des enzymes impliquées dans la synthèse de peptides.
- La région HEE (Hrp effectors and elicitors).
- La région *hrp/hrc* codant les protéines régulatrices telles que HrpL, HrpS et HrpX et Y, ainsi que les protéines du système de sécrétion conservées chez d'autres organismes et notées Hrc (Hr et conserved).

Neuf des gènes *hrp* sont très conservés parmi les bactéries pathogènes d'animaux et de végétaux et sont appelés aussi gènes *hrc* (Bogdanove *et al.*, 1996). Les analyses phylogénétiques des gènes conservés permettent de classer les différents SST3 en sept familles différentes (Sorg et Cornelis, 2009). Les clusters *hrp* de *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea agglomerans* et *Vibrio parahaemolyticus* constituent un premier groupe de clusters : les clusters de la famille Hrp-I.

Le pourcentage de GC du PAI est en moyenne de 53,2 %, peu différent de celui de l'ADN génomique (53,6 à 54,1%). Toutefois, ce pourcentage GC varie le long du locus IT et s'écarte souvent significativement de la moyenne (Figure 5). Par contre, le pourcentage GC de la région contenant le cluster *hrp* reste relativement constant mais légèrement plus élevée que la moyenne du génome.

Le HrpL est la protéine clé pour le contrôle des gènes *hrp* et *hrc* chez les bactéries du groupe Hrp1 (Figure 5). C'est un facteur sigma qui régule des fonctions extracytoplasmiques (Lonetto *et al.*, 1992) et qui active tous les opérons de sécrétion (les gènes de harpine et les gènes *dsp*) (Wei et Beer, 1995 ; Gaudriault *et al.*, 1997). Les protéines HrpL sont très conservées au niveau de la séquence en acides aminés et reconnaissent la «hrp box» (Innes *et al.*, 1993) une séquence consensus (GGAACC-N15/16-CCACNNA) située dans le promoteur des opérons *hrp* et des effecteurs de type 3 (Fouts *et al.*, 2002).

La région HAE contient cinq gènes dont trois sont impliqués dans le caractère systémique de la maladie : *hsvA* (*hrp*-associated systemic virulence), *hsvB*, *hsvC*. Ces trois ORF sont situées dans un même opéron et sont contrôlées par HrpL (Figure 5) (Oh *et al.*, 2005).

La région IT inclut 17 gènes, deux seraient des gènes de virulence. Aucun promoteur HrpL-dépendant n'a été détecté dans cette région (Figure 5). De plus, un mutant délété de la région IT n'est affecté ni dans l'élicitation de l'hypersensibilité sur tabac, ni dans la réponse à l'inoculation de poire immature (Oh et Beer 2005).

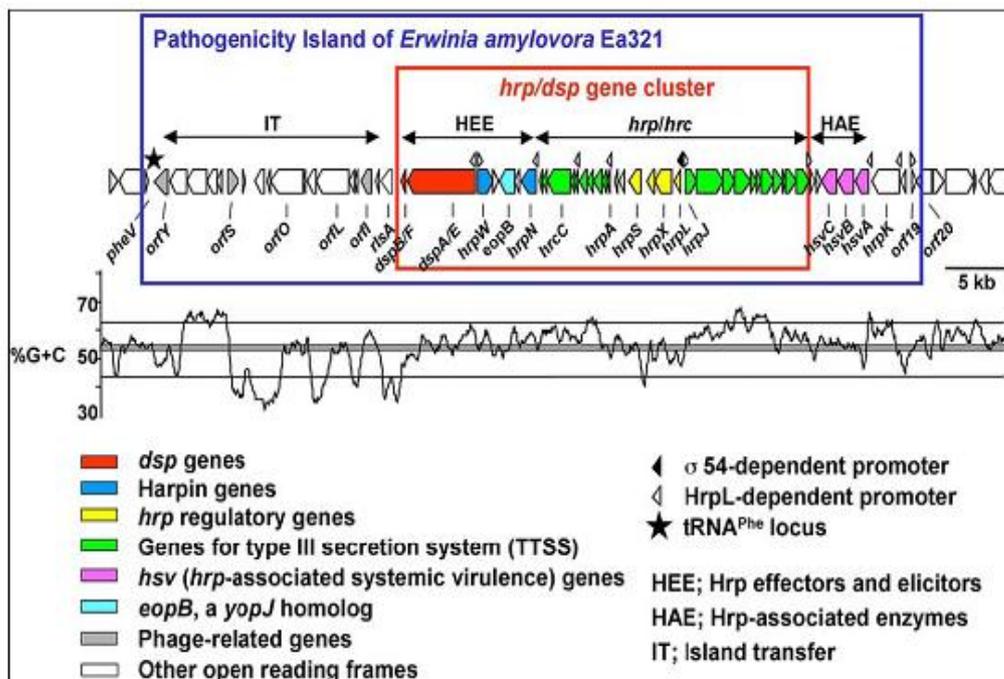


Figure 5: Ilot de pathogénicité d'*E. amylovora* incluant le cluster *hrp/dsp* (Oh et Beer, 2005).

a. Les effecteurs de type III d'*Erwinia amylovora*

Les protéines effectrices des pathogènes sont décrites selon leur mode d'action. Chez les phytopathogènes, il existe cinq grands groupes principaux : 1) les suppresseurs de la mort programmée des cellules ; 2) les activateurs de la voie métabolique de l'acide jasmonique ; 3) les inhibiteurs des modifications membranaires ; 4) les activateurs de transcription chez la plante ; 5) les inhibiteurs de l'activation des protéines de résistance (Mudgett, 2005).

L'analyse du sécrétome d'*E. amylovora* a permis l'identification de plusieurs protéines sécrétées par le T3SS (Nissinen *et al.*, 2007) :

- Les harpines HrpN (Wei *et al.*, 1992) et HrpW (Gaudriault *et al.*, 1998 ; Kim et Beer, 1998). Ils constituent un groupe de protéines effectrices chez les phytopathogènes (Galán et Collmer, 1999 ; Kjemtrup *et al.*, 2000) et sont riches en glycine et stables à la chaleur. Les mutants HrpN sont affectés dans leur capacité à induire la nécrose sur plante hôte et non hôte (Barney, 1995). Le HrpN induit un burst oxydatif et une hypersensibilité sur tabac (Wei *et al.*, 1992).

- DspA/E : Protéines qui jouent un rôle essentiel dans le pouvoir pathogène (un mutant *dspA* est non pathogène) (Gaudriault *et al.*, 1997 ; Bogdanove *et al.*, 1998).

- HrpJ : Protéine jouant un rôle important dans le pouvoir pathogène puisqu'un mutant *hrpJ* est non pathogène. Cette protéine est nécessaire à l'accumulation extracellulaire de HrpN et HrpW (Bogdanove *et al.*, 1996 ; Nissinen *et al.*, 2007).

- HrpA : Protéine constituant la sous-unité structurale du pilus Hrp (Jin *et al.*, 2001).

- Il existe aussi de nombreuses autres protéines comme : la EopB (Oh et Beer, 2005) (Oh *et al.*, 2005) ; la HrpK (Oh *et al.*, 2005) ; les Eop2, Eop3, Eop4, TraF et FlgL (Nissinen *et al.*, 2007) ; la HopPtoCEa (Zhao *et al.*, 2005) ; etc..

2.10 Analyse histologique des symptômes

Une des observations majeures faites sur les coupes histologiques d'un pommier infecté par la maladie est l'occlusion des vaisseaux du xylème par un matériel fibreux d'origine polysaccharidique (callose), accompagnée d'une déstructuration (plasmolyse et vésiculation) des cellules voisines. Ces phénomènes ont été détectés dans le génotype sensible Jonathan sur pommier. Toujours dans ce génotype, les dépôts de callose sont réprimés sous l'action de DspA/E car les mutants n'expriment plus cet effecteur, qui sont par ailleurs non virulents (Gaudriault *et al.*, 1997).

Par conséquent, la répression des dépôts de callose pourrait constituer un facteur de sensibilité chez l'hôte (DebRoy *et al.*, 2004).

Bien qu'observé sur une plante non-hôte, DspA/E exprimé transitoirement dans le tabac provoque des perturbations cellulaires caractérisées par une lyse des cellules du mésophylle, une désorganisation des noyaux et un étirement des parois cellulaires (Boureau *et al.*, 2006). De même, l'infiltration de HrpN dans des feuilles de tabac provoque l'hypersensibilité. Ils impliquent notamment une migration des chloroplastes dans les cellules (vers le pôle basal pour les cellules du parenchyme palissadique et vers le pôle apical pour celles du parenchyme lacuneux) ainsi qu'un remaniement des thylakoïdes (Boccaro *et al.*, 2007).

2.11 Méthode de lutte et gestion de la maladie

Les méthodes de lutte actuelles contre le feu bactérien sont diverses mais chacune d'elle reste d'une efficacité limitée. La gestion efficace du feu bactérien nécessite une approche intégrée de plusieurs pratiques qui visent :

- 1) à réduire la quantité d'inoculum ;
- 2) à imposer des obstacles à l'établissement de l'agent pathogène sur l'hôte ;
- 3) à réduire la sensibilité de l'hôte aux infections (Aldwinckle et Beer, 1979 ; Van der Zwet et Beer, 1995).

La plupart des stratégies de gestion du feu bactérien développés au cours du XXe siècle ont porté sur la réduction de l'inoculum dans le verger et l'utilisation des traitements antimicrobiens pour prévenir l'infection (Norelli *et al.*, 2003).

Des progrès récents ont permis de changer ce paradigme dans le XXIe siècle (Norelli *et al.*, 2003). Tout d'abord, les programmes de sélection des porte-greffes de pommiers ont développé de nouveau porte-greffes (souvent naine) qui sont résistantes au feu bactérien et sont actuellement disponibles pour un usage commercial (Norelli *et al.*, 2003). Deuxièmement, l'utilisation de cultivars commerciaux de pommes, sélectionnés génétiquement, pour augmenter la résistance au feu bactérien, et des plantes transgéniques sont actuellement l'objet d'essais sur le terrain (Aldwinckle et Norelli, 2000). Troisièmement, les traitements chimiques qui améliorent la résistance de l'hôte (Maxson-Stein *et al.*, 2002).

Les stratégies de gestion du feu bactérien actuelles reposent sur les mesures phytosanitaires nécessaires pour réduire l'inoculum dans le verger et l'utilisation de

traitements par pulvérisation pour prévenir l'infection, en particulier les infections des fleurs. Réduire l'inoculum primaire dans le verger en enlevant chancres au cours de la taille d'hiver a été établi comme un élément essentiel des stratégies de gestion du feu bactérien (Schroth *et al.*, 1974). L'application de la pulvérisation de cuivre (produits cupriques : bouillie bordelaise) pour réduire l'inoculum primaire dans le verger afin de réduire la quantité d'inoculum disponible (Van der Zwet et Beer, 1995).

Plusieurs modèles basés sur les données climatiques ont été développés pour prédire l'apparition de périodes d'infection de feu bactérien durant la floraison, améliorant ainsi notre capacité à contrôler cette phase de la maladie par l'application en temps opportun des pulvérisations d'antibiotiques (Billings, 1999 ; Smith, 1999 ; Steiner, 1990).

Malgré ces progrès, le feu bactérien reste une maladie difficile à contrôler. L'application correctement chronométrées de la streptomycine durant la floraison peuvent éliminer jusqu'à 90 % des souches sensibles à la streptomycine de l'agent pathogène. De longues périodes de temps pluvieux, empêche souvent l'application opportune de la Streptomycine, qui pour être efficace doit être appliqué 24 à 48 heures avant, ou 24 heures après une période d'infection (Norelli *et al.*, 2003). Des souches résistantes à la Streptomycine de *E. amylovora* se sont développées dans la plupart des régions, ce qui réduit l'efficacité de la streptomycine. Bien que l'Oxytétracycline peut être utilisé dans les zones où les souches résistantes à la streptomycine se produisent, il n'a été que partiellement efficace.

À ce jour, les agents de lutte biologique n'ont pas fourni des niveaux constamment élevés de contrôle. *Pantoea agglomerans* (anciennement *Erwinia herbicola*) par exemple, produit des composés inhibant la croissance d'*E. amylovora* (Wodzinski et Paulin, 1994). Une autre espèce, *Pseudomonas fluorescens*, a été largement étudiée. Elle agirait par compétition nutritive (Wilson et Lindow, 1993). Par ailleurs, des mutants avirulents d'*E. amylovora*, altérés dans la région *hrp*, sont capables expérimentalement de bloquer l'infection par la souche virulente lorsqu'ils sont inoculés avant ou en même temps que celle-ci (Tharaud *et al.*, 1997, Faize *et al.*, 1999 ; Faize *et al.*, 2006). En outre, la nature sporadique des infections et des épidémies de feu bactérien encourage les producteurs à devenir laxiste dans la mise en œuvre des pratiques de contrôle coûteuses après plusieurs années sans graves flambées de feu bactérien (Norelli *et al.*, 2003).

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Matériel biologique

Les souches de références utilisées dans ce travail (Ea350 et Ea1430) nous ont été aimablement fournies par le Centre National de Certification et de Contrôle (CNCC) d'Alger. Avant chaque utilisation, les bactéries sont cultivées à 25°C pendant 24 heures sur milieu King B (KB) solide.

3.2 Isolement

3.2.1 Prélèvement des échantillons

Afin d'isoler la bactérie *Erwinia amylovora*, nous avons effectué notre échantillonnage dans quatre wilaya du pays : Chlef, Ain Defla, Blida et Tipaza (Carte 1). Ces régions sont les plus touchées par la maladie du feu bactérien en Algérie. L'échantillonnage s'est effectué sur les espèces fruitières les plus sensibles à la maladie mais aussi les plus importantes sur le plan économique et agronomique dans notre pays. Parmi ces espèces figurent des pommiers (*Malus pumila*), des poiriers (*Pyrus communis*) et des Néfliers (*Eriobotrya japonica*). L'échantillonnage, réalisé de manière aléatoire sur des vergers symptomatiques et asymptomatiques, s'est déroulé durant la période allant du mois d'avril jusqu'au mois de juillet 2012 (Figure 6 et Tableau IV).

La prospection visuelle est la principale voie emprunter pour détecter le feu bactérien sur les lieux d'échantillonnages puisque toutes les parties aériennes des plantes-hôtes peuvent être contaminées par le pathogène.

L'échantillonnage peut se faire à partir de plusieurs organes de la plante (feuilles, rameaux, tiges, fleurs et fruits) en se servant d'un sécateur préalablement désinfecté par l'alcool à 70°. Les parties nécrosées ou noircies (mortes) des organes prélevés sont éliminées ; seules les parties inférieures (zones 2 et 3) seront conservées (vivante) (Figure 7).

De chaque verger, nous avons prélevé plusieurs rameaux (échantillon) d'environ 10 cm de long qui peuvent contenir des feuilles, fleurs ou fruits. Une fois prélevés, les échantillons sont mis dans des sacs en plastique hermétiquement fermés et étiquetés pour les traiter immédiatement au laboratoire soit les conserver à 4°C (pour quelques semaines).



Carte 1 : Sur l'échantillonnage effectuer lors de ce travail.



Figure 6 : Symptômes du feu bactérien dans différents vergers d'Algérie (Pommier, Poirier et Néflier de la région de Boufarik).

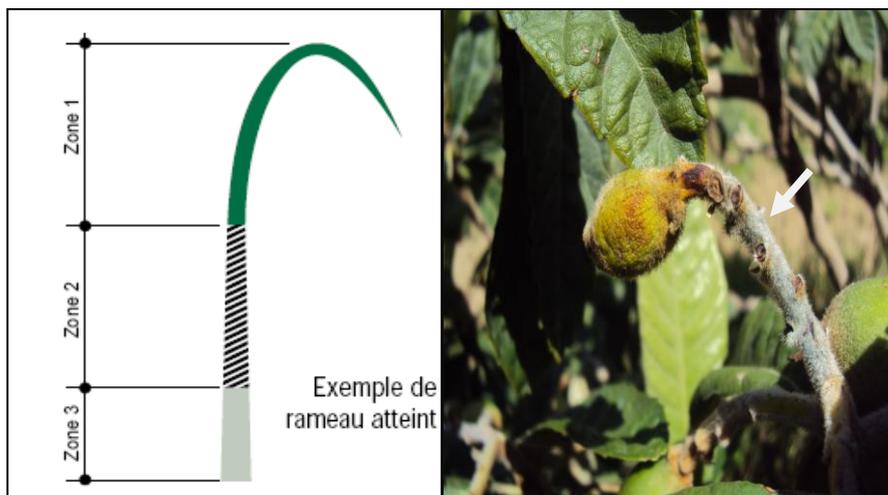


Figure 7 : Exemple d'un rameau de néflier atteint par le feu bactérien (flèche) avec la zones à éliminer (zone 1) et les parties à conserver (zone 2 et 3).

Tableau IV : Quelques données sur l'ensemble des échantillons collectés.

Lieu d'échantillonnage		Nombre d'échantillon prélevé			Nombre	
		Pommier	Poirier	Néflier	Partielle	Totale
Chlef	Symptomatique	00	08	06	14	34
	Asymptomatique	06	09	05	20	
Ain- Defla	Symptomatique	00	03	00	03	05
	Asymptomatique	00	02	00	02	
Blida	Symptomatique	00	04	01	05	08
	Asymptomatique	01	02	00	03	
Tipasa	Symptomatique	00	02	04	06	06
	Asymptomatique	00	00	00	00	

3.2.2 Traitement des échantillons

Les échantillons asymptomatiques (petits rameaux) prélevés sont d'abord désinfectés superficiellement à l'aide de coton imbibé d'alcool (éthanol à 70°), puis découpés en petits segments de 1 cm de longueur à l'aide d'un scalpel stérile et mis dans une solution tampon PBS stérile sous agitation pendant 1 à 2 heures.

Pour les échantillons symptomatiques du feu bactérien, ils sont prélevés à partir de chancres (endroits favorables pour la conservation de la bactérie *Erwinia amylovora*) (Figure 8). Après la désinfection du chancre à l'éthanol à 70°, un grattage est effectué à l'aide d'un scalpel stérile. Le gratta obtenu est récupéré par la suite dans une solution tampon PBS stérile avec agitation pendant quelques minutes. Cela nous conduit à obtenir un macérât.

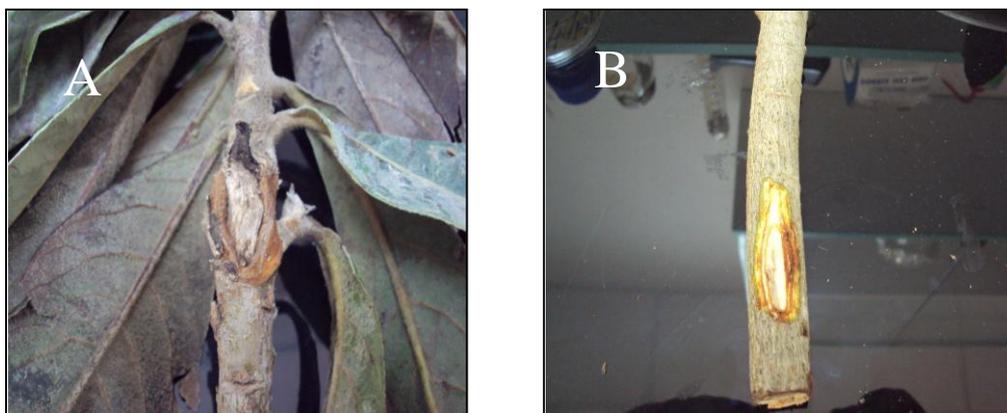


Figure 8 : Exemple de Chancre d'un rameau de néflier avant (A) et après (B) traitement.

3.2.3 Isolement des isolats d'*E. amylovora*

Pour l'isolement, deux principaux milieux de culture sélectifs pour *E. Amylovora* ont été utilisés : le milieu King B (KB) (King *et al.*, 1954) et le milieu MM2Cu (Bereswill *et al.*, 1998). Nous avons étalé environ 50 µl du macérât, précédemment obtenu, sur toute la surface d'un milieu KB. Les boîtes de cultureensemencées sont incubées à 25 C° pendant 24 à 48 heures. Pour obtenir des cultures pures à partir des colonies suspectes, plusieurs repiquages sont réalisés par étalement sur les milieux KB et MM2Cu. Après incubation, les colonies d'*E.*

amylovora cultivées sur milieu KB prennent une coloration blanchâtre et un aspect circulaire, tendant à s'étaler et non fluorescentes sous lumière UV à 365 nm (Bellemann *et al.*, 1994). Par contre sur milieu minimum MM2Cu, les colonies apparaissent jaunes et muqueuses à différents degrés (Bereswill *et al.*, 1998).

3.3 Identification des isolats d'*E. amylovora*

Pour identifier les souches d'*E. amylovora* nous nous sommes basés sur quatre tests : phénotypiques, biochimiques, test d'hypersensibilité sur tabac et moléculaires.

3.3.1 Tests phénotypiques

a. Test de fluorescence

Une colonie bactérienne estensemencée en stries sur une boîte de pétri contenant le milieu KB. Après une incubation d'environ 48 heures à 25 ± 03 °C la fluorescence des colonies est observée en exposant la boîte de pétri à des radiations UV dans une pièce noire (Schaad *et al.*, 2001).

b. Test de croissance

Une colonie bactérienne estensemencée dans un tube contenant le milieu liquide 523 puis incubée à une température de 39 °C pendant 24 à 72 heures sous agitation. Le test est jugé positif si un développement de la bactérie est observé et par voie de conséquence le milieu devient trouble. Par contre, si le milieu demeure claire, le test est jugé négatif (Schaad *et al.*, 2001).

3.3.2 Identification biochimique

Les colonies sur milieu KB solide sont blanches, bombées, brillantes avec un anneau central dense après 2 à 3 jours de culture à 25 °C (King *et al.*, 1954). La croissance d'*E. amylovora* en anaérobiose est faible, ce qui la différencie des autres Entérobactéries. Elle est également incapable de réduire les nitrates en nitrites. En milieu minimum, la présence d'acide nicotinique est nécessaire à sa croissance (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011).

Plusieurs tests biochimiques ont été effectués lors de ce travail.

a. Test de potasse indicateur de GRAM

Le présent test vise à déterminer si la bactérie est gram positif ou négatif. Une colonie bactérienne de 24 à 48 heures est mélangée à une goutte de solution de KOH (3%) préalablement déposée sur une lame de microscope. Le gram est considéré comme négatif s'il y a formation de filament en soulevant l'anse. En cas d'absence de filaments, le gram est positif (Suslow *et al.*, 1982).

b. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose

A l'aide d'un fil de platine stérilisé, nous procédons à un prélèvement de colonie fraîche (de 24 à 48 heures) qui est ensuiteensemencée par piqure centrale dans deux tubes à essai gélosés contenant le milieu Hugh et Leifson. Un des tubes est incubé en condition d'aérobiose, l'autre en condition d'anaérobiose pendant 48 à 72 heures à une température de 25°C. Lorsque les deux cultures virent au jaune, la bactérie est dite « fermentative ». Si, par contre, la coloration jaunâtre se produit uniquement dans les cultures soumises aux conditions d'aérobiose, la bactérie est dite oxydative (Hugh et Leifson, 1953).

c. Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase

Une colonie bactérienne estensemencée sous forme de stries sur une boîte de Pétri contenant un milieu levane solide, puis incubée pendant 48 heures à 25°C. L'apparition d'une culture abondante, bombé, blanche, brillante et très muqueuse après 01 à 02 jours à $25 \pm 03^\circ\text{C}$ indique une activité levane sucrase (test positif). En l'absence de ces caractéristiques le test est jugé négatif (Lelliott et Stead, 1987).

d. Test d'utilisation du citrate

Une colonie bactérienne estensemencée par strie sur la pente gélosée contenant le milieu citrate de Simmons et incubée à une température de $25 \pm 03^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. Les bactéries « citrate positives » poussent sur le milieu de Simmons en provoquant une alcalinisation du milieu qui se traduit par un virage au bleu de la coloration du tube. Les bactéries « citrate négatives » ne croissent pas sur le milieu (Schaad *et al.*, 2001).

e. Test de mise en évidence de l'activité nitrate-réductase

Une colonie bactérienne est ensemencée sur le milieu semi liquide du mannitol mobilité, puis incubée à $25 \pm 03^{\circ}\text{C}$ pendant 24 ou 72 heures. Après incubation et ajout de quelques gouttes des réactifs de nitrate réductase I et II, le milieu soit, il change de coloration et devient rouge rose attestant la présence de la nitrate réductase (nitrates réduits en nitrites) et le test est positif, soit, il demeure incolore et le test est jugé négatif (Freney *et al.*, 1992).

f. Test d'assimilation des glucides

Une colonie bactérienne est ensemencée par piqûre centrale dans un tube gélosé contenant le milieu KIA, puis incubé pendant 24 à 84 heures à $25 \pm 03^{\circ}\text{C}$. Lorsque l'indicateur coloré vire au jaune cela atteste l'assimilation du lactose et du glucose et le test est considéré positif. En l'absence de coloration, le test est négatif (Ayers *et al.*, 1919).

g. Test de mise en évidence de l'activité uréase

Une colonie bactérienne est ensemencée sur le milieu urée indole et incubé pendant 24 à 48 heures à $25 \pm 03^{\circ}\text{C}$. Les bactéries présentant une activité uréase font virer la couleur de l'indicateur au rouge violacé en 2 à 4 heures (test positif). Le test est négatif en l'absence de coloration (Freney *et al.*, 1992).

h. Test d'utilisation de l'indole

Une colonie bactérienne est ensemencée sur le milieu urée indole et incubé pendant 24 à 48 heures à $25 \pm 03^{\circ}\text{C}$. L'addition de quelques gouttes du réactif de Kovacs au milieu conduit soit à la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du milieu (test positif) soit à l'absence de coloration (test négatif) (Freney *et al.*, 1992).

i. Identification par le système API 20E

Le système API 20E (BioMérieux) est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques destinés à l'identification des Enterobaceiaceae (bactéries Gram négatif et anaérobies facultatives) dont font partie les *Erwinia*. Il regroupe 23 tests biochimiques. Des microtubes contiennent des substrats déshydratés, lesquels sont mis en solution par l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier. Une période d'incubation de 24 heures à 25°C permet à la bactérie de réagir avec les substrats. La compilation des résultats de l'utilisation des substrats par la bactérie à identifier permet de déterminer un code de 7 chiffres.

La galerie API 20E a été inoculée avec une suspension bactérienne ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml. Un volume de 150 μ l de cette suspension a été déposé dans chaque microtube, sauf pour les microtubes CIT (citrate), VP (piruvate de sodium) et GEL (gélatine) où le volume était de 300 μ l par puits. Les microtubes ADH (arginine déshydrolase), LDC (lysine déshydrolase), ODC (ornithine décarboxylase), H₂S (sulfure d'hydrogène) et URE (uréase) ont été recouvertes de l'huile de vaseline stérile. La galerie est incubée dans une chambre humide à 25° C pendant 18 à 24 heures.

3.3.3 Test d'hypersensibilité sur tabac (HST)

Une suspension bactérienne dense d'une culture jeune (de 24 à 48 heures) est injectée, à l'aide d'une seringue, entre l'épiderme et le parenchyme palissadique d'une jeune feuille de tabac. Le test est considéré positif s'il apparaît au bout de 24 heures une tache nécrotique correspondant à la zone infiltrée. Il est par contre négatif si aucune réaction n'est observée (Schaad *et al.*, 2001).

3.3.4 Identification moléculaire

a. Extraction de l'ADN chromosomique

L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide de la méthode de lyse de colonie décrite par Llop *et al.*, (1999). Plusieurs étapes sont nécessaires :

- 1 ml d'une culture bactérienne préalablement cultivée pendant 24 heures est prélevé et centrifugé, pendant 5 mn, à 13 000 rpm ;
- Elimination du surnageant et le culot est ressuspendu dans 1 ml de TE. Puis centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 mn ;
- Elimination du surnageant et le culot est de nouveau ressuspendu dans 500 μ l de TE. La suspension est chauffée à 95°C pendant 10 mn, puis placée dans la glace à -15°C pendant 10 mn. Cette étape (chauffage et refroidissement) peut être répétée plusieurs fois pour permettre l'éclatement des cellules bactériennes et la libération de l'ADN.

- La suspension est ensuite centrifugée à 13 000 rpm pendant 3 mn. Le surnageant obtenu, contenant de l'ADN, est transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Il servira pour l'amplification par PCR.

b. Le choix des amorces

Plusieurs amorces et protocoles de PCR pour la détection et l'identification d'*Erwinia amylovora* ont été décrits (Bereswill *et al.*, 1992 ; Bereswill *et al.*, 1995; Llop *et al.*, 2000; Maes *et al.*, 1996; McManus and Jones, 1994; Taylor *et al.*, 2001). Seulement, la plupart de ces protocoles se sont montrés non fiables (Powney *et al.*, 2011).

Lors de cette étude, nous avons utilisé deux protocoles différents de PCR, recommandés par Laala *et al.*, (2012) et Taylor *et al.*, (2001).

c. Amplification

- **Protocole PCR 1, décrit par Laala *et al.*, (2012)**

Ce protocole est basé sur l'amplification d'un fragment d'ADN (713 pb) du gène *reca* (accession No. JN812979) identifié d'*E. amylovora*.

Tableau V : Les séquences des amorces du protocole de Laala *et al.*, (2012).

reca2di	5' ATCTGGAATTCAGCCTG '3
reca2re	5' TCCATCATGCGCCTGGGTGAAGA'3

- **Mode opératoire** : La PCR est réalisée dans un thermocycleur de modèle BIORAD-C 1000. Les conditions de la réaction PCR sont comme suit : une première étape de dénaturation à 95 ° C pendant 3 mn (1 cycle), suivie d'une deuxième étape de 35 cycles à 94, 62 et 72 °C pendant 25 s, 25 s et 1 mn respectivement. Un dernier cycle d'extension finale de 5 min à 72 ° C.

Tableau VI : Composition du PCR mix selon Laala *et al.*, (2012).

Réactif	Concentration initiale	Volume
Eau	-	12.8µl
Tampon	5x	4 µl
MgCl ₂	25 mM	1.2 µl
dNTPs	2.5 mM	0.5 µl
Amorce reca2di	10 pmol/µl	0.25 µl
Amorce reca2re	10 pmol/µl	0.25 µl
Taq Polymérase	5 U/µl	0.05 µl
ADN	-	01 µl
Volume du mix	-	20 µl

- **Protocole PCR 2, décrit par Taylor *et al.*, (2001)**

Le protocole établi par Taylor *et al.*, (2001), est basé sur l'amplification d'un fragment d'ADN d'une longueur de 187 pb, d'origine chromosomique.

Tableau VII : Les séquences des amorces du protocole de Taylor *et al.*, (2001).

Ea71(1)	5' CCTGCATAAATCACCGCTGACAGCTCAATG '3
Ea71(2)	5' GCTACCACTGATCGCTCGAATCAAATCGGC '3

- **Mode opératoire :** Les conditions de la réaction PCR sont comme suit : une première étape de dénaturation à 95 ° C pendant 3 mn (1 cycle), suivie d'une deuxième étape de 35 cycles à 94, 60 et 72 °C pendant 20 s, 20 s et 1 mn respectivement. Un dernier cycle d'extension finale de 5 min à 72 ° C.

Tableau VIII : Composition du PCR mix selon Taylor *et al.* (2001).

Réactif	Concentration initiale	Volume
Eau	-	13 µl
Tampon	5x	06.5 µl
dNTPs	2.5 mM	01 µl
Amorce Ea71(1)	10 pmol/µl	01 µl
Amorce Ea71(2)	10 pmol/µl	01 µl
Taq Polymérase	5 U/µl	0.5 µl
ADN	-	02 µl
Volume du mix	-	25 µl

d. Electrophorèse de l'ADN sur gel

Les produits de l'amplification par PCR sont migrés sur un gel d'agarose à 0,8% w/v dans le tampon TAE (01 X). Le gel est ensuite incubé en présence de bromure d'éthidium (BET). L'ADN est visualisé sur un transilluminateur UV.

3.4 Test de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme)

A partir d'une culture pure d'*Erwinia amylovora* de 24 heures, une suspension bactérienne ayant une concentration de 10^8 bactéries/ml a été réalisée dans 2 ml d'eau physiologique stérile (NaCl à 0,85%). Par la suite, 100 µl de la suspension bactérienne est étalée sur le milieu Mueller Hinton à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

Quatre disques de papier contenant chacun une concentration prédéterminée d'un antibiotique donné, ont été déposés sur le milieu de culture. Les milieux sont alors incubés à 26° C pendant 24 heures. Après incubation, il y a notation de la présence ou de l'absence d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne à la périphérie des disques de papier. Au total huit (8) différents antibiotiques (Streptomycine, Gentamycine, Ampicilline, Tobramycine, Oxacilline, Pénicilline, Kanamycine et Spectinomycine) ont été testés pour chaque bactérie.

3.5 Caractérisation des souches d'*Erwinia amylovora* par l'utilisation de la random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD)

La technique de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), est utilisée pour différencier les souches au sein d'une même espèce. Cette technique est basée sur l'utilisation de courtes amorces aléatoires de 10 bases qui vont produire plusieurs bandes. Les profils des bandes obtenues avec plusieurs souches bactériennes peuvent être comparés et les relations entre ces souches peuvent être déterminées (Welsh et McClelland, 1990 ; Williams *et al.*, 1990 ; Berg *et al.*, 1994).

L'ADN des différentes souches d'*E. amylovora* a été extrait selon le protocole recommandé par Llop *et al.*, (1999). L'amplification par PCR, s'est faite avec deux amorces différentes (voir Tableau XI). Elle a été réalisée dans un volume de 25 µl, contenant 2 µl d'ADN génomique, 2,5 µl d'amorce de concentration de 100 µM, 0,2 µl de chaque dNTP (PROMEGA) de concentration 10 mM pour chacune d'elles, 0,5 µl de Taq d'ADN polymérase (PROMEGA) de concentration 5U/ µl et 6,5 µl de tampon Taq PROMEGA 5X.

Le programme d'amplification est comme suit : un cycle à 95°C pendant une minute, suivi de 45 cycles de 1 minute à 95°C, 1 minute à 29°C et 2 minutes à 72°C et enfin une extension finale de 7 minutes à 72°C (Echeverrigaray et Agostini, 2006).

Tableau IX: Liste des amorces RAPD utilisées lors de ce travail.

OPA-01	5' CAGGCCCTTC '3
OPA-03	5' AGTCAGCCAC '3

4. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Comme nous l'avons annoncé en introduction, le diagnostic des maladies et la détection des pathogènes sont des éléments très importants dans le cadre des mesures de lutte et de prévention contre les maladies infectieuses des plantes. L'objectif de la présente étude entre dans ce contexte. Il consiste à isoler et à identifier la bactérie *E. amylovora*, par des méthodes biochimiques et moléculaires, à partir de plusieurs arbres fruitiers (pommier, poirier et néflier) symptomatiques ou non de la maladie du feu bactérien et de différentes régions d'Algérie.

Pour procéder à une identification ou caractérisation d'un germe responsable d'une maladie donnée à partir d'isolat, nous avons pris l'habitude (démarche classique) de passer d'abord par la voie des tests biochimiques. Les tests moléculaires, venant en second lieu, sont appliqués pour confirmer ou infirmer les résultats des tests biochimiques préalablement obtenus.

C'est par les tests moléculaires (efficaces et rapides) que nous avons commencé cette étude en vue de mettre en évidence les isolats porteurs d'*Erwinia amylovora* de ceux qui ne le sont pas. Compte tenu du nombre important d'isolats analysés (70 en tout), il aurait été très fastidieux pour nous de les soumettre tous à des tests biochimiques. C'est surtout la non disponibilité de réactifs biochimiques en quantité suffisante qui nous a contraint à passer d'abord par les tests moléculaires puis de confirmer les résultats obtenus par les tests biochimiques. De cette façon, nous nous sommes limités à analyser par voie biochimique que les isolats soupçonnés être *Erwinia amylovora* par les tests moléculaires.

4.1 Collecte des échantillons

Les prélèvements des échantillons se sont effectués durant la période 2012-2013. En tout 70 échantillons ont été collectés à partir vergers (de Pommier, Poirier et Néflier) symptomatiques et non-symptomatiques de différentes régions du centre d'Algérie (Tableau XV-Annexe). De chaque verger, nous avons prélevé plusieurs rameaux (échantillon) d'environ 10 cm de long qui peuvent contenir des feuilles, fleurs ou fruits. Une fois prélevés, les échantillons sont mis dans des sacs en plastique hermétiquement fermés et étiquetés pour soit les traiter immédiatement au laboratoire soit les conserver à 4°C (pour quelques semaines).

4.2 Isolement d'*E. amylovora* sur milieux de culture sélectifs

La détection de la bactérie *E. amylovora* peut être se faire sur plusieurs milieux sélectifs et sur milieux différentiels (King *et al.*, 1954 ; Crosse et Goodman, 1973; Ishimaru et Klos, 1984; Bereswill *et al.*, 1998 ; Jones et Geider 2001; Miller et Schroth, 1972). Lors de cette étude, deux principaux milieux de culture sélectifs ont été testés : le milieu King B (KB) et le milieu MM2Cu.

Les milieux de culture sontensemencés à raison de 50 ul de plusieurs dilutions des macéras par boîte de Pétri. Ils sont ensuite incubés à 25°C pendant 24 à 48 heures.

L'observation des résultats après incubation montrent que les colonies d'*E. amylovora* qui se développent sur milieu KB sont de coloration blanchâtre. Elles prennent toujours un aspect bombé et brillant avec un anneau central dense (Figure 9 A). Quant au milieu MM2Cu, les colonies d'*E. amylovora* qui y poussent sont, dans la plupart des cas, de coloration jaunâtre et à aspect muqueux (Figure 9 B).

Les colonies ayant poussées sur milieu KB ou MM2Cu présentent toutes des caractères qui semblent être typique et spécifique à l'agent pathogène du feu bactérien. (Bereswill *et al.*, 1998). Les ions de cuivre, contenu dans le milieu MM2Cu forment un complexe avec l'amylovorane (un composant de surface de la bactérie) conférant aux colonies leurs colorations jaunâtres. Les ions de cuivre provoquent aussi un changement de morphologie cellulaire d'*Erwinia amylovora* (Bereswill *et al.*, 1998).

Les colonies présentant une morphologie typique sur les milieux KB et MM2Cu et suspectes d'être *E. amylovora* ont été sélectionnés et purifiées sur milieu KB agar. Cette opération s'est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de cultures pures. Au total 70 isolats soupçonnés être *E. amylovora* ont été sélectionnés et ont fait l'objet de plusieurs tests biochimiques et moléculaire (Tableau XV-Annexe).

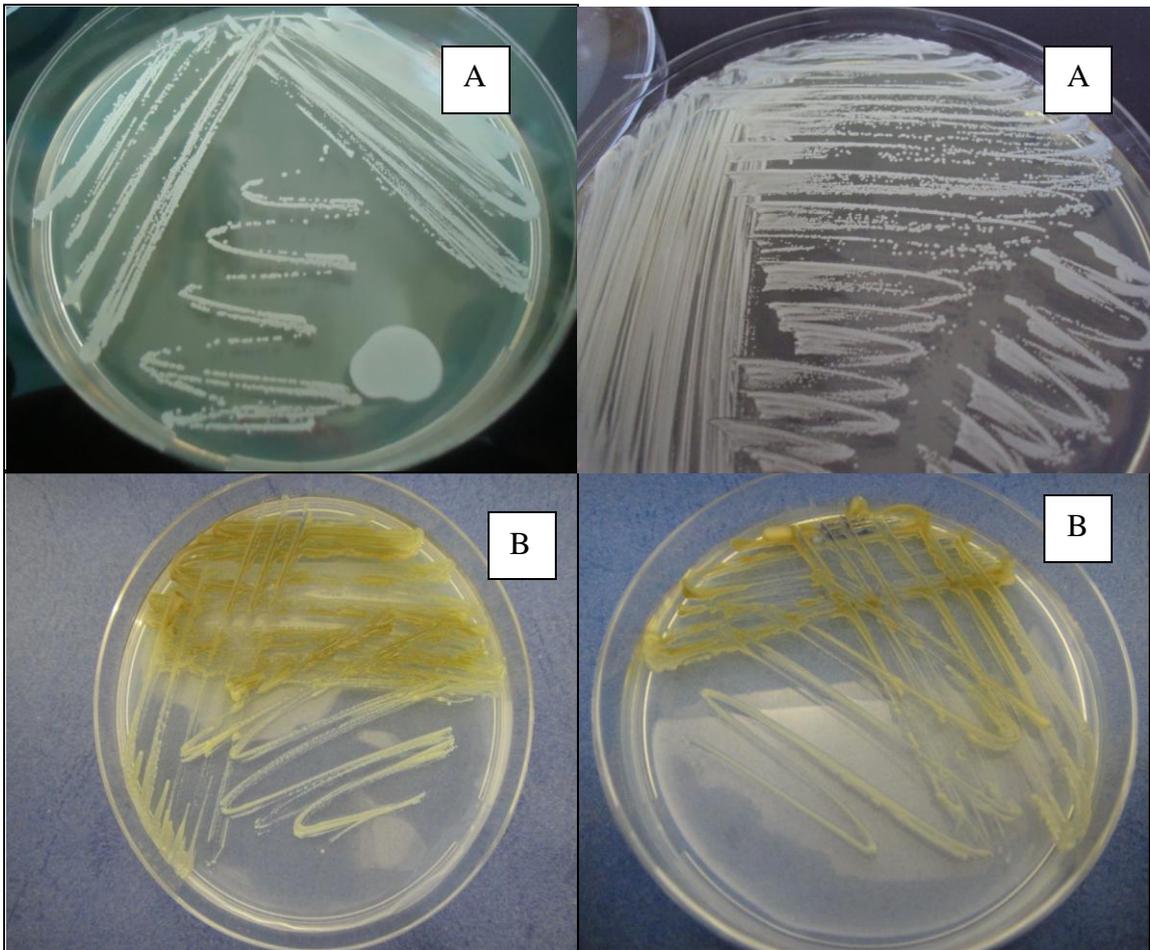


Figure 9 : Aspects des colonies d'*E. amylovora* développées sur les milieux KB (A) et MM2Cu (B).

4.3 Identification des isolats d'*E. amylovora*

4.3.1 Identification moléculaire d'*Erwinia amylovora*

Les méthodes d'identification des bactéries basées sur la PCR ont des avantages sur les méthodes d'identification traditionnelles aux niveaux de la rapidité et de la sensibilité.

Dans une première expérience (expérience préliminaire), nous nous sommes servis d'un protocole pour analyser les 70 isolats (numéroté de 1 à 70), afin de tester l'efficacité du protocole vis-à-vis de l'identification d'*E. amylovora*. Le protocole en question est décrit par Laala *et al.*, (2012). Il utilise une paire d'amorce appelée (reca2di et reca2re) pour amplifier une séquence partielle de 713 pb du gène de la recombinaase. Lors de ces expériences deux souches d'*E. amylovora* de références (Ea1430 et Ea350) ont été utilisées comme témoin positif et l'eau comme témoin négatif.

Les résultats de l'amplification, obtenus par ce protocole (Laala *et al.*, 2012) sont présentés dans les Figure 10 A-D. Avec ce protocole plusieurs amplicons ont été générés. En tout, 14 isolats numérotés (3, 4, 6, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 25, 42, 48, 67 et 69), ont générés des bandes de tailles différentes qui ne correspondent pas toutes à la bande spécifique (713 pb) à *E. amylovora*. Le reste des isolats en nombre de 56, n'ont générés aucune bande.

L'observation des résultats montre que seuls les isolats 3, 4, 16, 18, 67 et 69 semblent générés un amplicon positif à 713 pb. Cependant, il y a lieu de signaler que parmi ces isolats que nous avons considérés positifs, certains particulièrement le 3 et 16, génèrent, en plus de l'amplicon spécifique, d'autres bandes de tailles différentes (Figure 10 A). L'apparition de plusieurs bandes rend l'interprétation confuse. Pour le reste des isolats (4, 18, 67 et 69), ils ne génèrent qu'une seule bande à la bonne taille (713 pb).

Pour les autres isolats à savoir (6, 7, 8, 9, 17, 25, 42, 48), ils sont considérés comme des faux positifs, puisqu'ils ont générés des bandes mais qui ne correspondent pas à la taille souhaitée. Certains de ces isolats n'ont générés qu'une seule bande (6, 7 et 8), d'autres produisent plusieurs (48) (Figure 10 A et C).

Les résultats de ces expériences préliminaires en biologie moléculaire pour détecter la présence ou pas d'*E. amylovora* dans les 70 isolats testés, étaient tellement confus et ambigus qu'ils nous ont amenés à se poser une question essentielle relative à la spécificité des amorces utilisées. Pourquoi une paire d'amorce (reca2di et reca2re) spécifique, sensé amplifier des segments précis (de 713 pb), entraîne l'amplification de plusieurs autres bandes de tailles différentes ? Pourquoi, chez un isolat donné plusieurs bandes sont générées y compris le bon amplicon alors que chez un autre, il n'y a qu'une seule bande amplifiée mais ne correspondant pas à la taille souhaitée ? Pour essayer de donner une explication à ces résultats, nous avons attribué cela à la

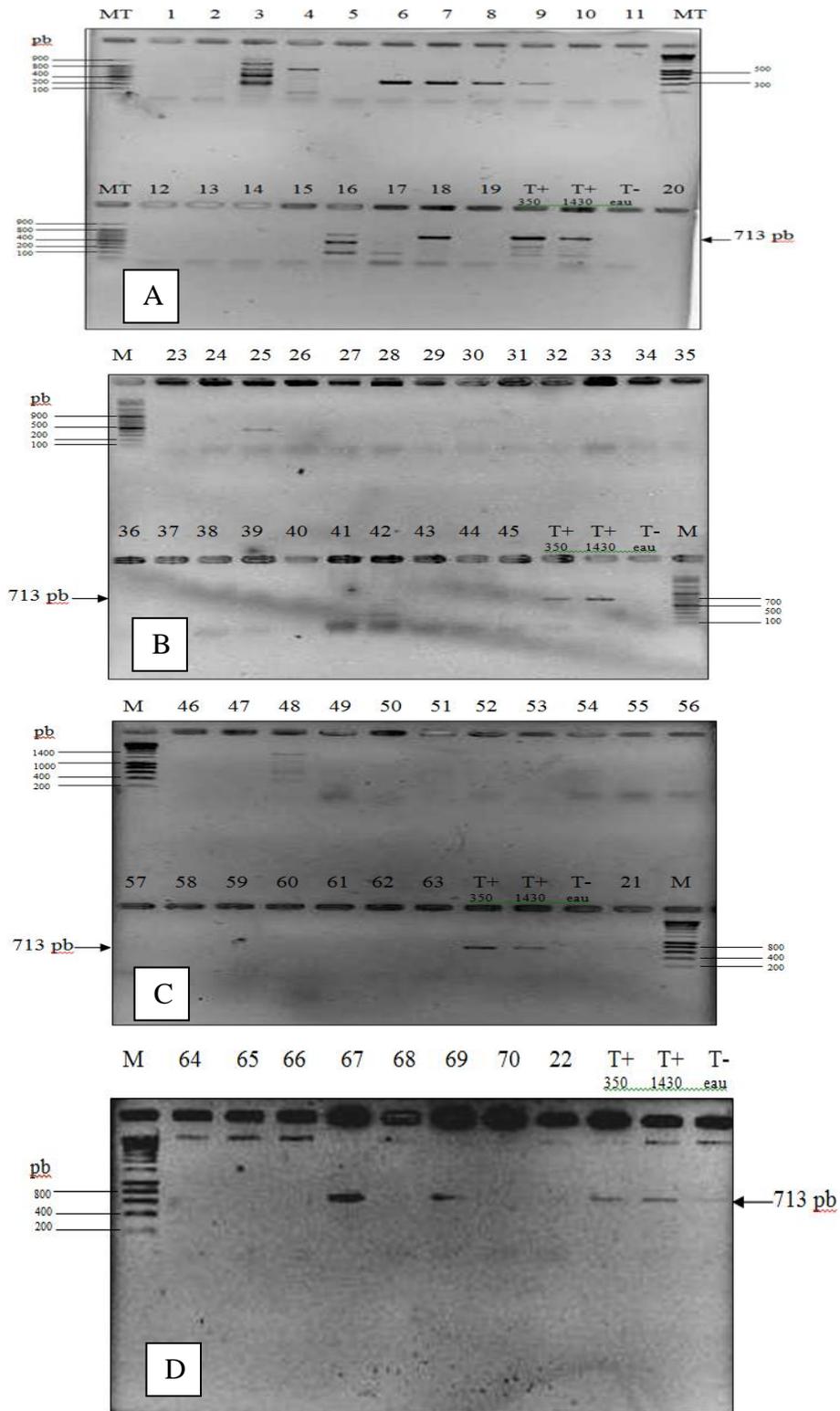


Figure 10 : Fragments obtenus après amplification selon le protocole de Laala *et al.*, (2012). (1-70) : souches de bactéries suspectes ; (T+350 et T+1430) : souches de références *E. amylovora* (témoins positifs) ; (T- eau) : Témoin négatif.

paire d'amorce, décrite par Laala *et al.*, (2012), avec laquelle l'amplification a été conduite, qui probablement ne semble pas être aussi spécifique comme on le pensait. Il est probable que cette paire d'amorce, elle ne peut être efficace qu'avec certaines souches et ne l'est pas avec d'autres.

Pour vérifier et confirmer, en même temps, si les résultats obtenus par le protocole de Laala *et al.*, (2012) sont réellement efficaces, nous avons testé, les 14 isolats, sur un autre protocole décrit par Taylor *et al.*, (2001). Cette méthode consiste à amplifier un fragment d'ADN chromosomique de 187 pb. Les cibles des amorces Ea71(1) et Ea71(2) est une hypothétique protéine (Llop *et al.*, 2000 ; Powney *et al.*, 2011).

Les résultats de l'amplification, selon le protocole Taylor *et al.*, (2001), montrent que les isolats testés génèrent tous des amplicons à 187 pb (Figure 11). A travers ces résultats, nous avons pu confirmer plusieurs choses à la fois. Il y a d'abord, les isolats ayant généré des faux positifs, avec le protocole Laala *et al.*, (2012), ils se sont révélés, avec le protocole Taylor *et al.*, (2001), des vrais positifs. Puis, pour les isolats ayant généré plusieurs bandes, ils se retrouvent, avec le protocole Taylor *et al.*, (2001), avec un seul amplicon à 187 pb (Figure 11).

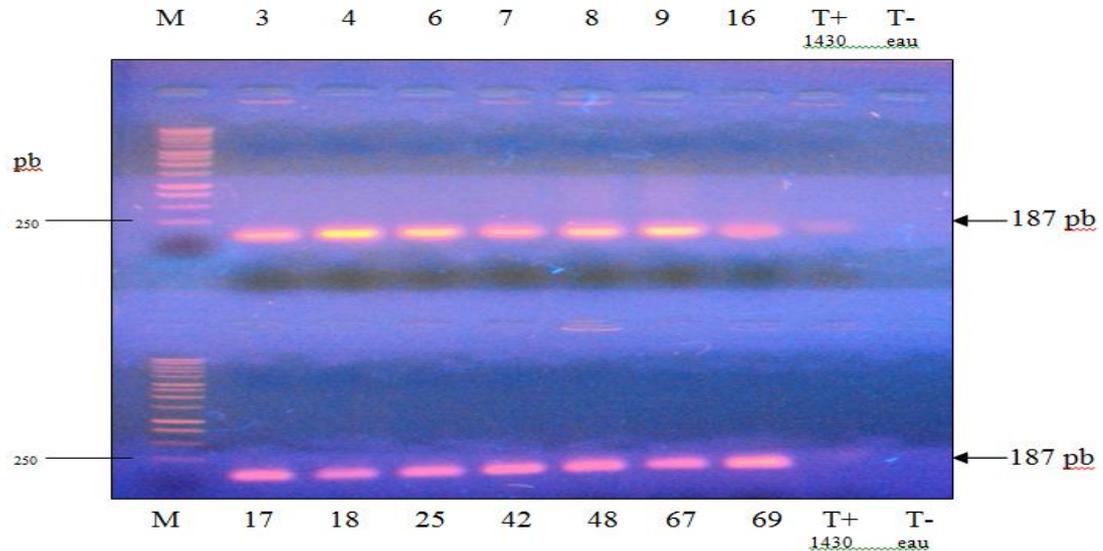


Figure 11 : Fragments obtenus après amplification (PCR) par le protocole de Taylor *et al.*, (2001). (3-69) : Bactéries suspectes ; (T+1430) : Souches de références *Erwinia amylovora* ; (T- eau) : Témoin négatif.

Le protocole Taylor *et al.*, (2001), même ancien, il semble être plus spécifique et plus efficace que celui recommandé par Laala *et al.*,(2011). Le protocole Laala *et al.*, (2012) a pu détecter seulement 04 isolats sur les 14 testés de façon catégorique. Quant au protocole Taylor *et al.*, (2001), il a pu détecter d '*E. amylovora* dans les 14 isolats. Compte tenu de ces résultats on peut se permettre de dire qu'il existe probablement au sein des isolats éliminés (les 56 jugés négatifs lors du premier essai), des isolats positifs qui n'ont pas pu être détectés par le protocole Laala *et al.*, (2011).

L'efficacité ou plutôt la spécificité du protocole PCR de Taylor *et al.*, (2001) pour identifier les souches n'est pas nouvelle puisqu'elle a été signalée par Powney *et al.*, (2011). Ce dernier a évalué 07 protocoles PCR publiés pour leur capacité à détecter *E. amylovora* et il s'est rendu compte que seul le protocole de Taylor *et al.*, (2001) avait la capacité de détecter la bactérie en question et Chez un grand nombre de souches (Powney *et al.*, 2011).

4.3.2 Tests phénotypiques

Comme nous l'avons constaté, les tests moléculaires nous ont permis d'identifier en tout 14 isolats bactériens faisant partie d'*E. amylovora*. La série des tests phénotypiques, biochimiques classiques et d'hypersensibilité sur tabac que nous avons employé lors de cette étude vont nous permettre de se renseigner un peu plus sur les profils des 14 bactéries isolées et sur certaines caractéristiques de leur métabolisme.

a. Test de fluorescence sur KB

Après ensemencement de boîte de Pétri contenant le milieu KB par des colonies jeunes de 24 heures des différents isolats et incubation pendant 48 heures à 25 °C, nous les exposons à la lumière UV pour vérifier si elles sont fluorescentes ou pas. Les résultats de cette expérience nous ont indiqué que nos bactéries ont toutes données des fluorescences (test positif) allant du vert au bleu sous lumière UV (Figure 12).

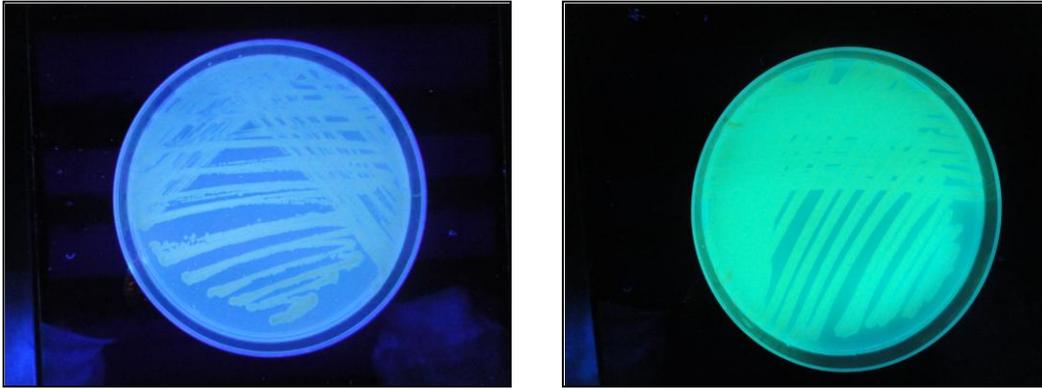


Figure 12 : Bactéries fluorescentes sous lumière UV. (A) : Bactérie émettant une fluorescence bleue ; (B) : Bactérie émettant une fluorescence verte.

b. Test de croissance à 39°C

L'ensemencement des 14 isolats sur le milieu liquide 523 et incubation à 39°C pendant après 24 heures nous a conduites à un résultat positif. En effet, dans l'ensemble des milieux ensemencés ont donné un aspect trouble indiquant une bonne croissance des bactéries (Figure 13).



Figure 13 : Test de croissance à 39°C ; résultat positif présence de trouble bactériens dans le tube.

4.3.3 Identification biochimique

A partir d'une culture pure de 24 heures, de chaque isolat, les tests à effectuer pour identifier les espèces d'*E. amylovora* sont : GRAM, oxydation/Fermentation, production du levain, utilisation de citrate, réduction de nitrate assimilation des glucides, activité uréase,

utilisation d'indole et identification par système API 20E. Ces propriétés phénotypiques sont universellement présentes ou absentes chez l'espèce *E. amylovora* (Paulin, 2000). Tous ces tests ont été effectués selon, le protocole décrit par Jones et Geider, (2001).

a. Test de potasse indicateur de GRAM

La détermination de type de gram d'une bactérie est essentielle dans l'identification et la classification des bactéries phytopathogènes (Suslow *et al.*, 1982). La détermination de type de Gram a été effectuée par l'utilisation du test KOH. Ce test peut servir comme une alternative à la coloration de Gram (Suslow *et al.*, 1982).

Les résultats de ce test montrent que tous les isolats (14) se sont montrés des Gram négatifs. Les bactéries prennent une forme de filament mucoïde sur une lame comme le confirme les observations faites par Suslow *et al.*, (1982). Ce dernier confirme que les bactéries à Gram négatif provoquent une augmentation de la viscosité du KOH et forme un filament mucoïde lorsqu'il est relevé à partir de la lame. Ce procédé utilise la destruction rapide de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-négatif dans une solution alcaline, libérant l'acide désoxyribonucléique, ce qui provoque la viscosité de la solution (Suslow *et al.*, 1982).

b. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose

La distinction pratique entre l'oxydation et la fermentation des hydrates de carbone repose sur le rôle joué par l'oxygène atmosphérique (Hugh et Leifson, 1953). Le degré d'acidité produit par le métabolisme oxydatif est généralement plus faible que celle produite par le métabolisme fermentatif. Comme la plupart des bactéries produisent des substances alcalines à partir du peptone, la petite quantité d'acide qui peut être produite par le métabolisme oxydatif peut être complètement neutralisée dans les milieux ordinaires peptone glucidiques. Ces difficultés peuvent être surmontées en utilisant un milieu avec une concentration relativement élevée de glucides, une concentration de peptone basse et des conditions d'aérobies (Hugh et Leifson, 1953).

Les résultats du test de mise en évidence du métabolisme oxydatif et fermentatif montrent que tous les tubes testés, des différents isolats, soumis aux conditions d'aérobioses et d'anaérobioses changent tous leurs couleurs vers le jaune. Ceci prouve que les tests sont tous positifs (Hugh et Leifson, 1953) et que nos bactéries sont toutes fermentatives (Figure 14).

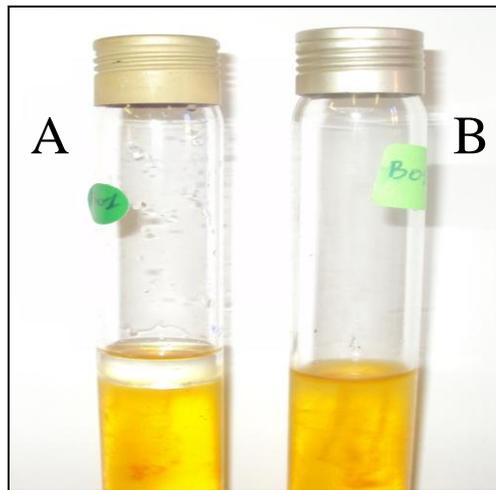


Figure 14 : Test positif, Virage au jaune pour les deux tubes

(A) : Tube anaérobique (présence d'une couche d'huile de vaseline) ;
(B) : Tube aérobique.

c. Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase

Le test levane sert à vérifier la polymérisation du fructose en polyfructose par la bactérie. Après ensemencement en strie des boîtes de Pétri contenant le milieu levane et incubation pendant 48 heures à 26 °C, certaines bactéries (pas toutes) ont laissé apparaître des colonies abondantes, bombées, blanches, brillantes et très muqueuses (Figure 15). Ces aspects indiquent la présence d'une activité levane sucrase causé par une enzyme du même nom qui catalyse le saccharose sur une chaîne de fructoses servant à la biosynthèse des levanes (Lelliott et Stead, 1987). Seuls les isolats 3, 48 et 69 ont pu développer ces aspects.

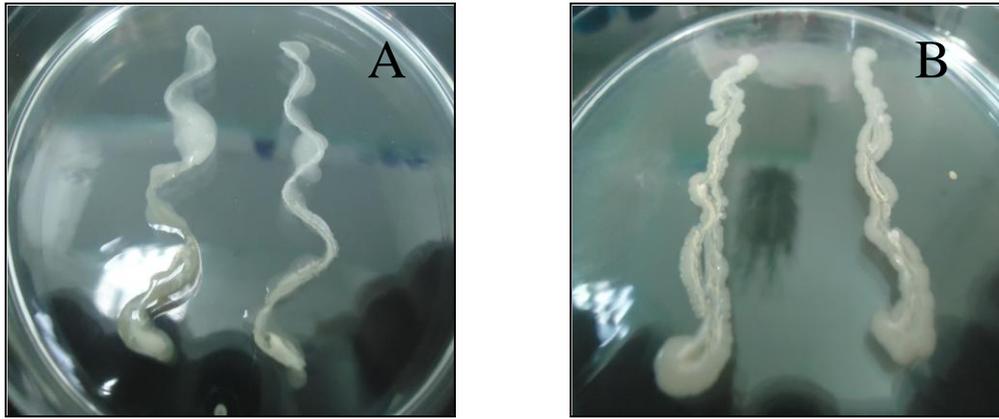


Figure 15 : Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase

(A) : stries partiellement saillantes et luisantes : Test positif ;

(B) : stries non luisantes : test négatif.

d. Test d'utilisation du citrate

Ce test est effectué sur le milieu de Simmons contenant une seule source de carbone : le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate perméase seront capables de se développer sur ce milieu (Schaad *et al.*, 2001). Une bactérie sera citrate positif si elle alcalinise le milieu en utilisant le citrate. Cette réaction est indiquée par le changement de couleur de l'indicateur de pH, le vert qui devient bleu (Figure 16).

Les résultats obtenus avec ce test montrent que la plupart des isolats ont développé des réactions négatives (test négatif). Seuls les isolats 9, 16 et 18 peuvent être considérés comme des bactéries citrate positives (Figure 16 A). Les bactéries citrate-positives poussent sur le milieu de Simmons en provoquant une alcalinisation du milieu (virage au bleu de la coloration du tube). Les bactéries citrate-négatives ne croissent pas sur ce milieu.

e. Test de mise en évidence de l'activité nitrate-réductase

Après ensemencement d'une colonie jeune de 24 heures sur le milieu mannitol mobilité et incubation pendant 24 à 72 heures à 25 °C, l'addition de quelques gouttes du réactif nitrate réductase I et II peut conduire soit à l'apparition d'une coloration rouge dans le milieu (test positif) soit à l'absence de coloration (test négatif) (Freney *et al.*, 1992).

Dans les isolats que nous avons testés, seuls 8 parmi les 14 ont manifesté une activité nitrate-réductase suite à l'apparition d'une coloration rougeâtre dans le milieu attestant la présence de la nitrate-réductase (test positif) (Figure 17). Les isolats ayant montré cette

capacité de réduire les nitrates en nitrites sont : 6, 7, 8, 9, 17, 48, 67 et 69. Cependant, aucune coloration rougeâtre n'a été décelée avec le reste des isolats.

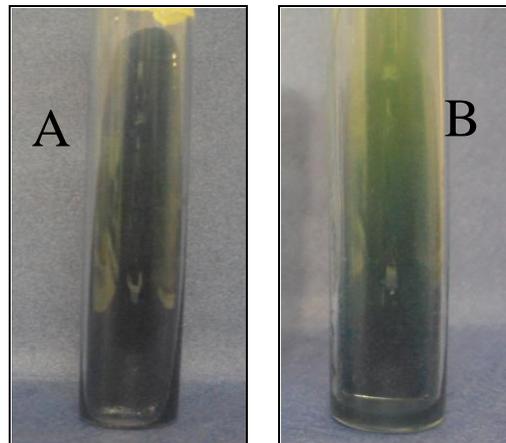


Figure 16 : résultat du test de citrate
(A) : Virage au bleu, citrate positif ; (B) : Citrate négatif.

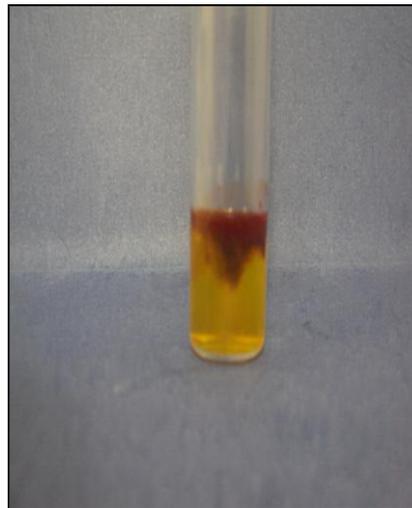


Figure 17 : Test de mise en évidence de l'activité nitrate réductase après addition du réactif de Griess (test positif).

f. Test d'assimilation des glucides

Ce test, utilisant le milieu KIA (Hadjna-Kligler-Roland), vise à mettre en évidence la présence, chez la bactérie, de quatre caractères fondamentaux qui sont : l'utilisation du glucose (fermentation) et du lactose (oxydation), la production du H₂S et de Gaz.

Les résultats de l'ensemencement des différents isolats sur milieu KIA, nous a permis de constater l'existence d'une pente jaune indiquant la présence de la β -galactosidase (Figure 18 A). Les milieux pourvus de bactéries ayant utilisé le lactose avec production d'acides organiques, virent vers le jaune (test positif). Cela a été observé chez les 14 isolats testés.

Nous constatons aussi, avec certains isolats notamment les : 3, 4, 6, 8, 9, 17, 18, 25, 42, 48, 67 et 69, qu'il y a formation d'un culot jaunâtre au niveau des tubes à essais (Figure 18). La formation de ce culot atteste que le glucose a été utilisé par les bactéries présentes dans le milieu.

Parmi les résultats obtenus, la production de gaz lors de l'utilisation des glucides en présence de certains isolats. Cette production est mise en évidence par le décollement de la gélose ou la formation des bulles au niveau des tubes à essais contenant les milieux de culture (Figure 18 B). Ce phénomène de dégagement des gaz a été observé seulement en présence des isolats 4, 16 et 18.

Notons par ailleurs, qu'en présences des isolats 3, 4, 6, 7, 8, 9, 16 et 18, il y a eu formation d'un culot (précipité) noir, attestant la production du sulfure d'hydrogène (H₂S) dans ces milieux.

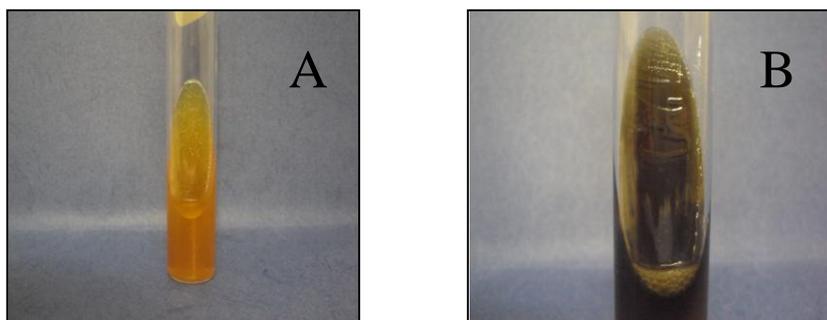


Figure 18 : Test d'assimilation des glucides sur milieu KIA. (A): Virage de la pente et du culot en jaune ; (B) : Virage du culot et de la pente au noir et production de Gaz.

g. Test de mise en évidence d'une activité uréase

L'uréase est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation de l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac. Cela provoque une réaction acidifiant le milieu qui fait virer l'indicateur coloré au rouge violacé. Les colonies jeunes (de 24 heures) des différents isolats, sont ensemencées sur milieu Urée-indole et incubées pendant 24 à 72 heures à 25 °C. Les résultats positifs de ce test ont été observés en présence de certains isolats seulement les : 3, 6, 7, 8, 9, 18 et 48 (Figure 19 A).

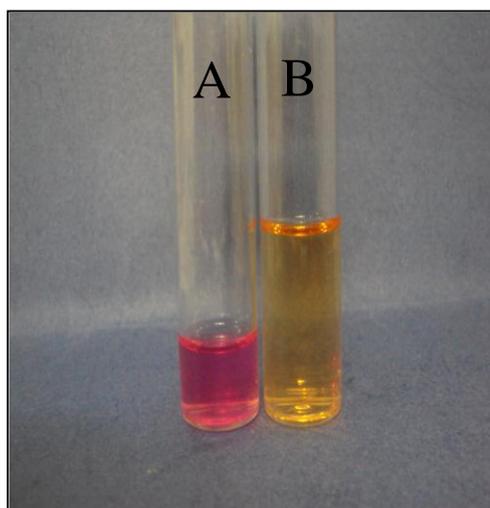


Figure 19 : Test de mise en évidence de l'activité uréase. (A): Test positif ; (B) : Test négatif.

h. Test d'utilisation de l'indole

Le test indole sert à déterminer si la bactérie produit de l'indole à partir de tryptophane (un acide aminé). L'indole est le produit de l'hydrolyse du tryptophane par une enzyme, la tryptophanase. Il est mis en évidence grâce à la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du milieu urée-indole, caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs (Figure 20). Les résultats de ce test étaient positifs sur les milieux contenant les isolats 3, 4, 8, 9, 16, 18 et 48.

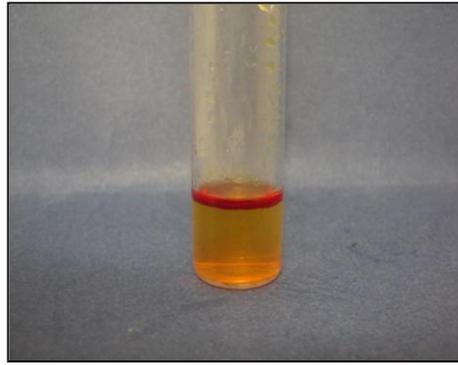


Figure 20 : Test de l'utilisation de l'indole montrant la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du milieu Urée-Indole (test positif).

i. Identification par le système API 20E

Les galeries API 20E sont des galeries de 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des Entérobacteriaceae. Les suspensions bactériennes des différents isolats ont été introduites dans les microtubes des galeries et incubées à 25°C pendant 24 heures. La lecture des différentes galeries, nous a conduits aux résultats suivants :

- La souche de référence a donné le code 2024000 ;
- Tous les isolats testés ont donné des codes différents par rapport au code de références mais aussi entre eux. Les codes obtenus par isolats sont comme suit : 0024000 pour les isolats 25, 42, 67 et 69 ; 0034000 pour les 6, 7, 8 et 9 ; 4326563 pour les 3 et 18 ; 4126563 pour les 4 et 48 ; 0420000 pour le 16 et 4024563 pour l'isolat 17.

Comme on peut le constater, le test par galerie API20E a produit 06 codes différents, au lieu d'un seul, pour les 14 isolats (voir Tableau X). Ce résultat n'est pas aussi surprenant puisque plusieurs auteurs ont rapporté que ce genre de test peut donner des résultats variables dans le cas d'*E. amylovora* (Mergaert et al., 1984 ; Vantomme et al., 1982). Notons par ailleurs que certains codes obtenus étaient communs à plusieurs isolats comme le 0024000 ou le 0034000.

Tableau X : Résultat du test des galeries API 20E.

Isolats	Numéro
SR	2024000
3	4326563
4	4126563
6	0034000
7	0034000
8	0034000
9	0034000
16	0420000
17	4024563
18	4326563
25	0024000
42	0024000
48	4126563
67	0024000
69	0024000

SR : souches de référence 1430.

4.3.4 Test d'hypersensibilité sur tabac

Erwinia amylovora provoque l'expression de la maladie chez les plantes hôtes ou sensibles, mais induit une réaction d'hypersensibilité (RH) chez les plantes non hôtes ou résistantes comme le tabac (Büttner et He, 2009 ; Lindgren *et al.*, 1986). La RH est une réaction rapide de défense de la plante induisant la mort programmée des cellules et la production de divers agents antimicrobiens bloquant ainsi la progression du pathogène (Klement, 1982 ; Hueck, 1998). Le test RH a été effectué sur des feuilles de tabac.

Les résultats obtenus avec ce test diffèrent d'un isolat à un autre. Les inoculations faites avec les isolats 3, 7, 8, 17, 18, 25, 48 et 69 ont toutes été positives en provoquant la formation de taches nécrotiques sur le tabac (Figure 21). C'est en présence des isolats 7 et 25 que les plus grandes taches nécrotiques ont été observées. Quant aux inoculations conduites avec les isolats 4, 6, 9, 16, 42 et 67, elles n'ont provoqué aucune réaction visible. (Figure 21).

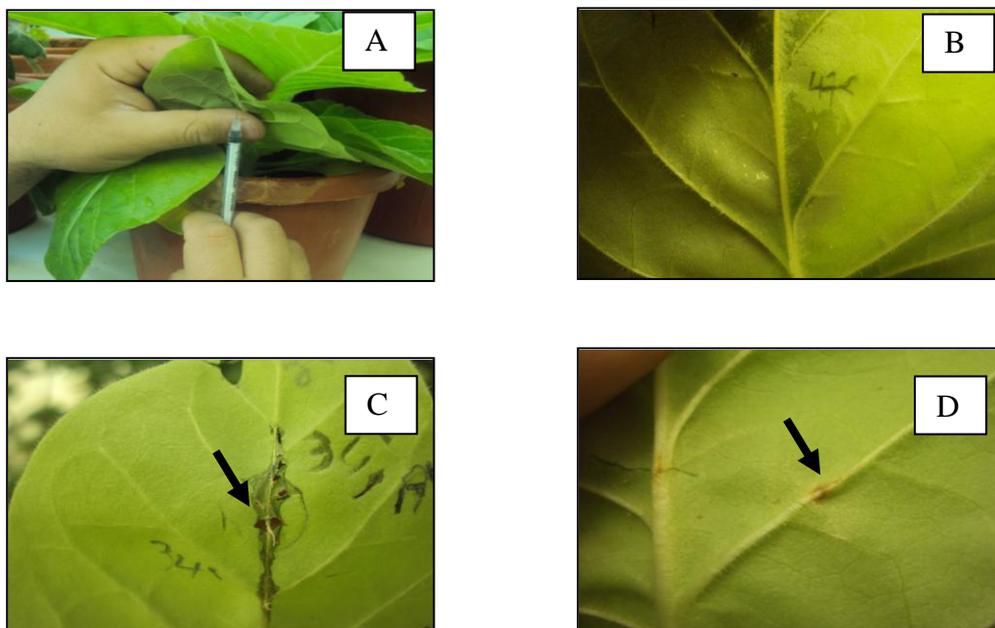


Figure 21: Inoculation sur jeunes feuilles (A et B) de tabac des différents isolats avec apparition de taches nécrotiques (C et D).

D'après les résultats du tableau XI, nous constatons que les réactions des isolats diffèrent selon la nature du test. Pour certains tests comme : GRAM, fluorescence sur KB, mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose et dégradation du Lactose, les réactions des 14 isolats étaient identiques. Alors que vis-à-vis des autres tests les réactions étaient variables. Même constat pour l'identification via le système API 20E ou nous avons pu distinguer plusieurs groupes (six numéros différents) pour les 14 isolats. Aucun de ces groupes ne correspond au numéro de la souche d'*Erwinia amylovora* de référence.

Tableau XI : Résultats obtenus sur les différents tests phénotypiques, biochimiques et d'hypersensibilité sur tabac pour les 14 isolats.

Tests Isolat	Gram	FL	HST	H&L	Levane	Citrate	NR	G		C	U	I
								a	b			
3	-	+	+	F	+	-	-	+	+	+	+	+
4	-	+	-	F	-	-	-	+	+	+	-	+
6	-	+	-	F	-	-	+	+	+	+	+	-
7	-	+	+	F	-	-	+	+	-	+	+	-
8	-	+	+	F	-	-	+	+	+	+	+	+
9	-	+	-	F	-	+	+	+	+	+	+	+
16	-	+	-	F	-	+	-	+	-	+	-	+
17	-	+	+	F	-	-	+	+	+	+	-	-
18	-	+	+	F	-	+	-	+	+	+	+	+
25	-	+	+	F	-	-	-	+	+	+	-	-
42	-	+	-	F	-	-	-	+	+	+	-	-
48	-	+	+	F	+	-	+	+	+	+	+	+
67	-	+	-	F	-	-	+	+	+	+	-	-
69	-	+	+	F	+	-	+	+	+	+	-	-
SR	-	+	-	F	+	-	+	+	+	+	-	-

(+) : Résultat positif ; (-) : Résultat négatif ; (Gram) : Test de Gram ; (FL) : Test de fluorescence sur KB ; (HST) : Test d'hypersensibilité sur tabac ; (H&L) : Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose ; (F) : Bactérie Fermentative ; (Levane) : Test de mise en évidence de l'activité levane sucrase ; (Citrate) : Test d'utilisation du citrate ; (NR) : Test de mise en évidence de l'activité nitrate-réductase ; (G) : Test d'assimilation des glucides ; (a) : test de dégradation du Lactose ; (b) : Test de dégradation du Glucose ; (C) : Test de croissance à 39°C ; (U) : Test de mise en évidence d'une activité uréase ; (I) : Test d'utilisation de l'indole ; (SR) : Souche de référence 1430.

L'obtention de réactions diverses des isolats vis-à-vis des différents tests biochimiques laisse entendre que nos souches sont différentes alors que l'analyse moléculaire affirme qu'il s'agit bel et bien de la même espèce. Sur ce point précis, certains auteurs trouvent que les isolats d'*Erwinia amylovora* constituent un groupe très homogène en termes de propriétés biochimiques et physiologiques (Dye, 1981; Holt *et al.*, 1994; Margaret *et al.*, 1984; Paulin, 2000). Par contre, d'autres auteurs, confirment l'existence d'une certaine hétérogénéité entre les différentes souches d'*Erwinia amylovora*. En effet, selon certains auteurs, il peut exister des différences entre les isolats d'*Erwinia amylovora*, concernant le métabolisme des sucres (comme source de carbone) (Pulawska et Sobiczewski, 2006, Atanasova *et al.*, 2007). Selon une étude réalisée par Atanasova *et al.*, (2007), 41 des 95 sources de carbone ont été utilisés différemment par les souches testées. Cela confirme bien qu'il peut y avoir des différences entre les souches d'*Erwinia amylovora* sur le plan biochimique. Cela nous amène aussi à dire que les tests biochimiques ne sont pas aussi efficaces et fiables pour identifier l'espèce. Même pour les tests API 20 E, qui n'ont pas été, dans notre cas, déterminant pour identifier nos isolats, leur efficacité semble être mise en cause par certains auteurs (Donat *et al.*, 2007). Plusieurs études sérologiques semblent confirmer la forte hétérogénéité des isolats d'*E. amylovora* (Vantomme *et al.*, 1982; Manulis *et al.*, 1998). Ceci explique en grande partie les différences constatées entre les isolats à l'égard des tests biochimiques.

Un diagnostic précis d'*Erwinia amylovora* est crucial pour les organismes de quarantaine pour faciliter la détection précoce et la gestion de l'agent pathogène. Les approches actuelles pour la détection et l'identification d'*Erwinia amylovora* comprennent des méthodes culturales, sérologiques et moléculaires. La bactérie peuvent être détectés sur plusieurs milieux semi-sélectif (Bereswill *et al.*, 1998; Crosse et Goodman, 1973; Ishimaru et Klos, 1984; Jones et Geider 2001; Miller et Schroth, 1972) et sur milieux différentielles (King *et al.*, 1954). Mais, il y a des limites dans l'utilisation de certaines de ces méthodes, par exemple, l'isolement de bactéries prend plusieurs jours et les résultats peuvent être ambiguës (Geider *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2000). Les techniques moléculaires comme la PCR sont couramment utilisés pour la détection d'*Erwinia amylovora* de préférence aux diagnostics sérologiques et culturels (Powney *et al.*, 2011).

4.4 Test d'antibiogramme

L'objectif de ce test est d'évaluer la résistance ou la sensibilité de nos isolats bactériens d'*Erwinia amylovora* à l'égard de huit (8) antibiotiques qui sont: Streptomycine, Gentamycine, Ampicilline, Tobramycine, Oxacillin, Pénicilline, Kanamycin et Spectinomycin.

Les résultats de ce test, rapportés dans le Tableau XII montrent que les réactions vis-à-vis des antibiotiques varient d'un isolat à un autre. La majorité des isolats semblent être résistants à la l'Ampicilline, à l'Oxacillin et à la Pénicilline à l'exception des isolats 8 et 67 (pour l'Ampicilline), 8, 18 et 67 (pour l'Oxacillin) et le 16 et 67 (pour la Pénicilline). A l'inverse, la majorité des isolats testés affichent une certaine sensibilité aux : Streptomycine, Gentamycine, Tobramycine, Kanamycin et Spectinomycin. Seuls les isolats 17, 42 et 69 (pour la Streptomycine et la Gentamycine), le 16, 17, 42 et 69 (pour la Tobramycine), le 9, 42 et 69 (Kanamycin et Spectinomycin).

L'observation des résultats montrent que seuls deux isolats (42 et 69) parmi les quatorze résistantes à l'ensemble des antibiotiques testés. Au contraire les isolats 67 et 8 semblent être sensibles aux l'ensemble des antibiotiques testés (exception pour la Pénicilline).

L'étude la plus complète sur la sensibilité ou la résistance de *E. amylovora* aux antibiotiques a été publiée par Vantomme *et al* (1986). Selon cette étude, parmi les 122 souches d'*E. amylovora* testées, la plupart se sont montrées sensibles à l'Ampicillin (10 µg), la Kanamycin (30 µg) et la Streptomycine (10 µg). Tandis que des réponses variables selon les souches ont été obtenues pour la Gentamicine (10 µg). La sensibilité des souches à la Kanamycin mais aussi à la Streptomycin semble être en accord avec nos résultats puisque la plupart des isolats testés étaient sensibles à cet antibiotique à l'exception de quelques-uns, comme nous l'avons signalé précédemment. Mais contrairement aux résultats publiés par Vantomme *et al* (1986), la plupart de nos isolats se sont montrés résistants à l'Ampicilline.

Lors de cette étude nous avons constaté que certains isolats 17, 42 et 69 développent une résistance à la streptomycine. Cette résistance peut avoir de multiples causes: une mutation ponctuelle dans le gène *rpsL* de la bactérie codant pour la protéine ribosomale S12 ou par acquisition de gènes associés à une résistance qui sont situés sur des éléments génétiques mobiles, tels que des plasmides ou des transposons (Pulawska et Sobiczewski, 2011).

Tableau XII : Représentation des résultats de l'antibiogramme (les diamètres des zones d'inhibitions sont calculés en centimètre).

Antibiotiques Isolat	S	GEN	A	TOB	OX	P	K	SH
3	03	02.9	R	03.1	R	R	03.5	02.9
4	03	03	R	03.1	R	R	02.5	02.7
6	02.5	03.3	R	03.2	R	R	02.4	02.1
7	02.7	03	R	03.4	R	R	02.5	01.5
8	02.5	03	01	03.5	01	R	03	01
9	02.5	02.8	R	03.1	R	R	R	R
16	02	02	R	R	R	0.5	0.5	0.9
17	R	R	R	R	R	R	02.9	03
18	02.7	03	R	03	0.5	R	02.4	02.5
25	02.3	03.4	R	03.5	R	R	02.7	01.6
42	R							
48	03.1	03	R	03.1	R	R	02.4	02.9
67	03.7	03.4	03.5	04.5	02.5	03.1	02.1	02
69	R							
SR	02.5	04	03	04	R	R	R	R

(S) : Streptomycine ; (GEN) : Gentamycine ; (A) : Ampicilline ; (TOB) : Tobramycine ; (OX) : Oxacillin ; (P) : Pénicilline ; (K) : Kanamycin ; (SH) : Spectinomycin ; (R) : bactérie résistante. (SR) : Souche de référence 1430.

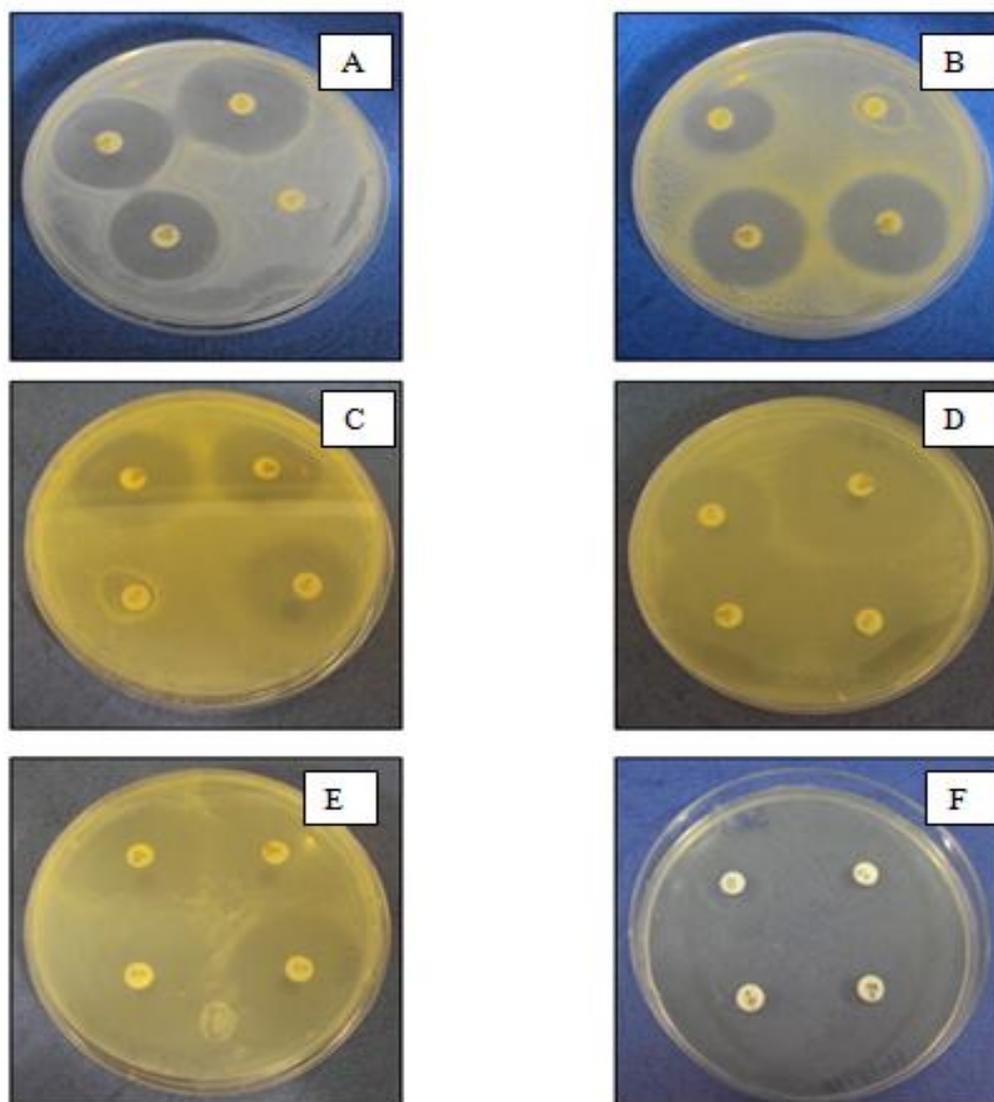


Figure 22 : Résultats du test d'antibiogramme pour quelques isolats, (A) : isolat 48 ; (B) : isolat 9 ; (C) : isolat 7 ; (D) : isolat 67 ; (E) : isolat 67 ; (F) : isolat de la souche de référence.

En 1952, seulement huit ans après sa découverte par Schatz *et al.*,(1944), la Streptomycine a été enregistrée aux Etats-Unis en tant que composé utilisé pour la protection des végétaux (Murneek, 1952). Son efficacité contre le feu bactérien a été confirmée dans de nombreuses études sur différents continents (Pulawska et Sobiczewski, 2011). Des souches d'*E. amylovora*, résistant à la streptomycine ont été détectées pour la première fois aux États-Unis. Le premier rapport sur ce sujet vient de Californie en 1971 (Miller et Schroth, 1972). Récemment, des souches de *E. amylovora* résistantes à cet antibiotique ont également été découverts à l'extérieur de l'Amérique du Nord, par exemple, en Egypte (El-Goorani *et al.*,

1989), Nouvelle-Zélande (Thomson *et al.*, 1993), Israël (Manulis *et al.*, 1996) et le Liban (Saad *et al.*, 2000).

4.5 Caractérisation des souches d'*Erwinia amylovora* par l'utilisation de la Random Amplified Polymorphic DNA fragments (RAPD)

La technique RAPD est utilisée pour déterminer la diversité génétique (ou le polymorphisme) de nos isolats d'*E. amylovora*. Les marqueurs RAPD, qui sont dispersés dans les régions non codantes du génome, sont devenus des indicateurs de variations génétiques dans les études phylogénétiques.

Lors de cette étude, la technique de RAPD a été réalisée par deux amorces différentes qui sont : OPA-01 et OPA-03. L'analyse par RAPD a été conduite sur les 14 isolats (ou souches). Les résultats de cette analyse (Tableau XIII) nous ont permis de générer 114 fragments différents par les deux amorces : 36 fragments avec l'amorce OPA-01 (Figure 23) et 78 fragments par l'amorce OPA-03 (Figure 24).

L'analyse des profils nous a permis de constater que certains isolats génèrent des bandes identiques (monomorphes) selon l'amorce employée. C'est le cas par exemple (lorsque l'OPA-01 est utilisé) entre l'isolat 3 et 4 ou entre le 7, 8 et 9 ou encore entre 17, 18, 25 et 42 (Figure 23) (Tableau XIII). Alors que, les isolats 6, 16, 48, 67 et 69 forment des profils RAPD uniques et totalement polymorphiques par rapports aux autres isolats.

Aussi, l'autre amorce OPA-03 génère des bandes similaires entre les isolats 3 et 4, ou entre 7, 8 et 9 ou encore entre 25 et 42 (Figure 24) (Tableau XIII). Pour le reste des isolats, leurs profils RAPD sont uniques et donc polymorphiques.

Nous constatons aussi que les bandes générées avec certains isolats (7,8 et 9 par exemple) sont identiques (monomorphes) que ce soit avec l'OPA-1 ou l'OPA-3. Cela prouve que les deux souches sont identiques.

Les profils RAPD obtenus avec les deux amorces nous ont permis de conclure que les isolats testés représentent, en grande partie, des souches différentes appartenant à l'espèce *E. amylovora*. Cette différence est notée à la fois entre les isolats testés mais aussi entre les isolats et la souche de référence.

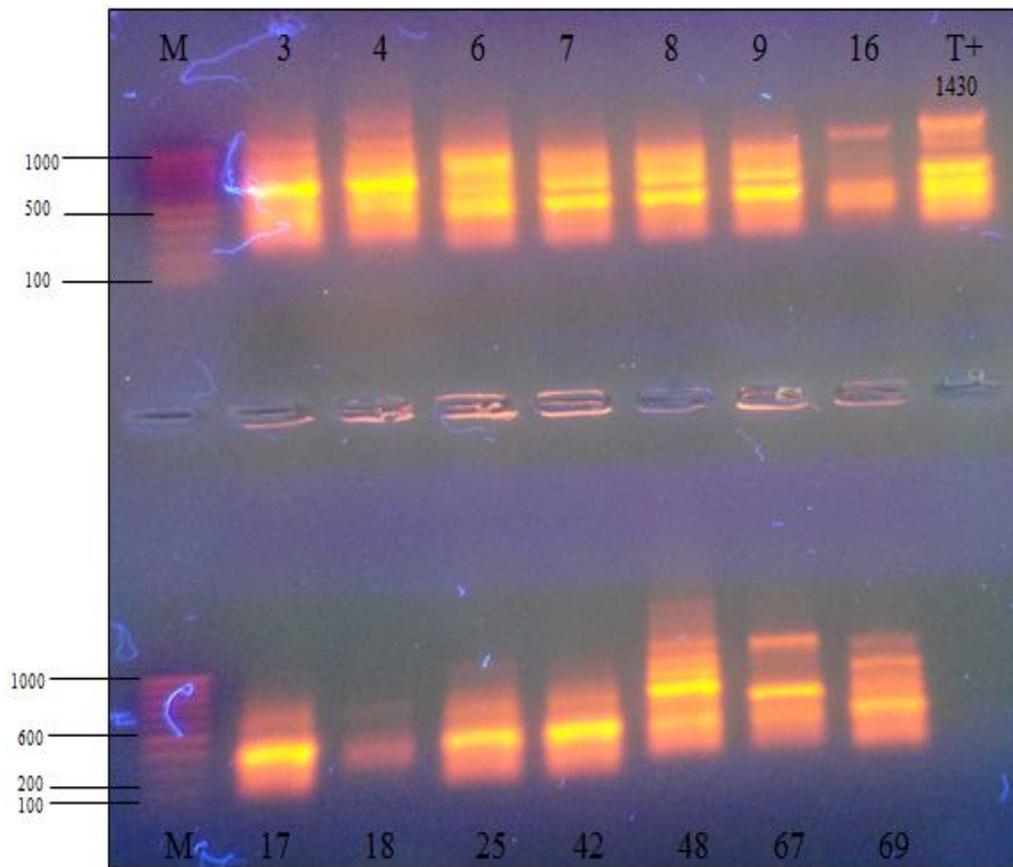


Figure 23 : Profil de RAPD des 14 souches d'*Erwinia amylovora* généré avec l'amorce OPA-01. ; (T+1430) : Souches de références *Erwinia amylovora* ; (M) : Marqueur de taille de 100 pb.

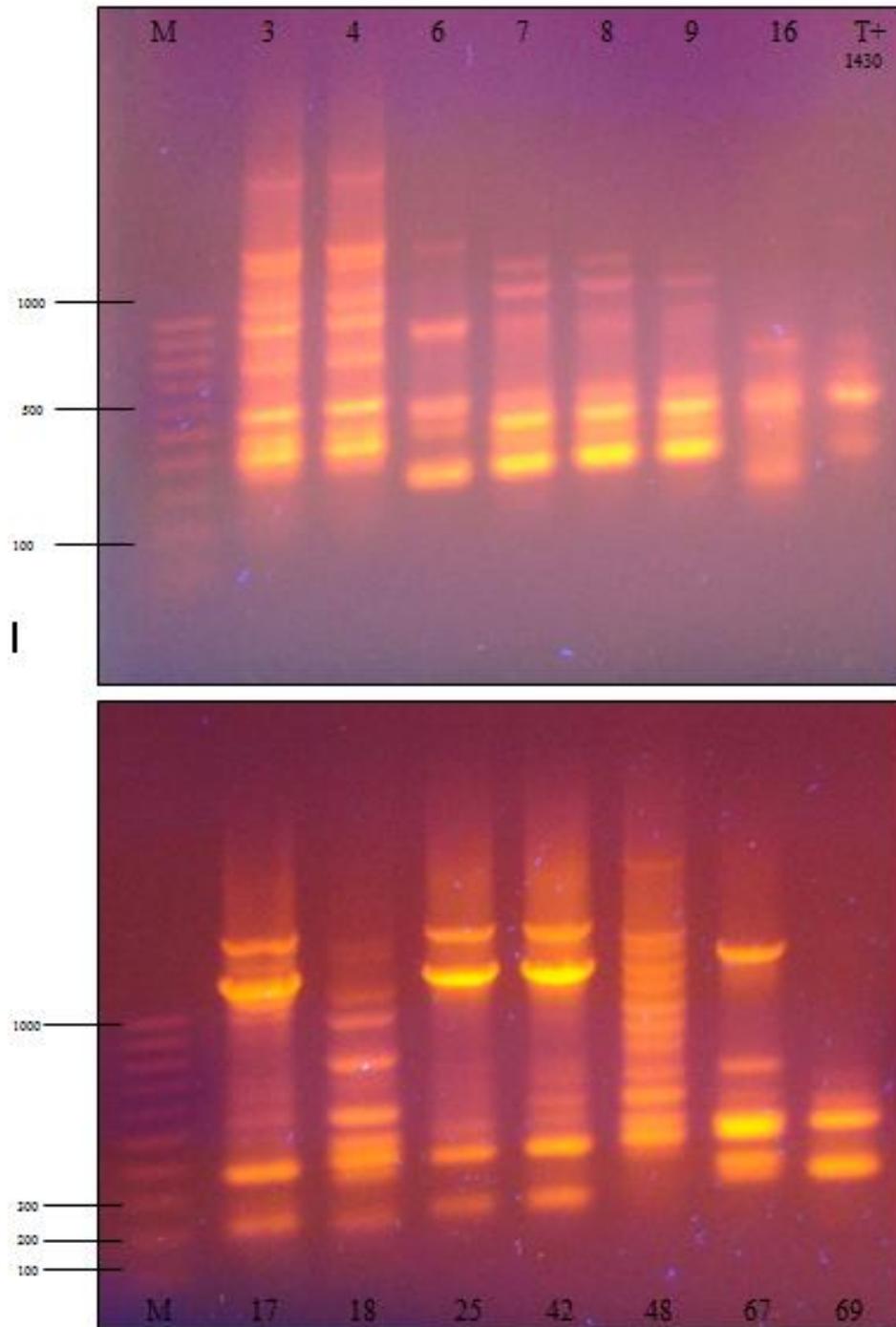


Figure 24 : Profil de RAPD des 14 souches d'*E. amylovora* généré avec l'amorce OPA-03. (T+1430) : Souches de références *E. amylovora* ; (M) : Marqueur de taille de 100 pb.

Tableau XIII : Représentation des amplicons issus de l'amplification par RAPD avec les amorces OPA-01 et OPA-03.

Isolats	OPA-01		OPA-03	
	Nombre de bande	Taille des bandes (pb)	Nombre de bande	Taille des bandes (pb)
3	5	400, 500, 600, 900 et 1000	9	400, 500, 600, 800, 900, 1000, +1000, +1000 et +1000
4	6	400, 500, 600, 900, 1000 et + 1000	9	400, 500, 600, 800, 900, 1000, +1000, +1000 et +1000
6	3	400, 500 et 800	5	300, 500, 600, 900 et +1000
7	2	400 et 500	4	300, 500, 1000 et +1000
8	2	400 et 500	4	300, 500, 1000 et +1000
9	2	400 et 500	4	300, 500, 1000 et +1000
16	2	400 et 1000	2	600 et 900
17	2	400 et 700	9	200, 400, 500, 600, 700, 1000, +1000, +1000 et +1000
18	2	400 et 700	9	200, 400, 500, 600, 800, 900, 1000, +1000 et +1000
25	2	400 et 700	5	300, 400, 500, +1000, +1000
42	2	400 et 700	7	300, 400, 500, 600, 700, +1000 et +1000
48	6	500, 800, 900, 1000, +1000 et +1000	11	500, 600, 700, 800, 900, 1000, +1000, +1000, +1000, +1000 et +1000
67	3	600, 700 et + 1000	6	300, 400, 500, 600, 700 et +1000
69	5	400, 600, 800, 900 et 1000	4	300, 500, 600 et 700
SR	4	500, 600, 900 et 1000	4	400, 600, 800 et +1000

(SR) : Souche de référence 1430 ; (+1000) : amplicons dont la taille est supérieure à 1000 pb.

Les profils d'amplification de tous les échantillons ont été comparés entre eux et la présence de la bande est représentée par "1" et son absence par "0" (Tableau XVI et XVII-Annexe). De cette façon, tous les profils amplifiés de toutes les amorces utilisées ont été marqués et intégrés ensemble pour former une matrice de données pour l'estimation de la distance génétique entre les différents isolats testés. L'analyse typologique a été effectuée sur la base du coefficient de similarité entre des échantillons fondés sur des données moléculaires à l'aide du logiciel Past (PAleontological STatistics), en utilisant l'indice de Jaccard.

Les similarités génétiques entre les souches ont été mesurées par l'analyse des données produites par les amorces RAPD dans les différents isolats, et ont été représentées sous forme de dendrogramme (Figure 25). Ce dernier sépare les isolats en quatre groupes principaux, cluster I (CI), cluster II (CII), cluster III (CIII) et cluster IV (CIV) avec un niveau de similarité d'environ 30%. Fait intéressant, les clusters I et II apparaissent séparément des deux autres clusters (CIII, CIV). Le cluster I regroupe cinq isolats (17, 18, 25, 42 et 67), le cluster II quatre (6, 7, 8 et 9), le cluster III un seul (16) et le cluster IV cinq (4, 3, 48, 67 et SR).

La lecture de la figure 42 montre que le cluster I est divisé en deux sub-cluster (SC1 et SC2), et montre un niveau élevé de diversité génétique. Le sub-cluster 1 (SC1) est composé de deux isolats (17 et 18), et le sub-cluster 2 (SC2) de trois isolats (25, 42 et 65). Quant au cluster II, il est subdivisé en sub-cluster (SC3) et (SC4). Le premier est formé des isolats (7, 8 et 9) (niveau de similitude est de 100%) et le second de l'isolat 6. Le cluster III comprend l'isolat 16. Le dernier cluster est composé de deux sub-cluster : le (SC5) comprenant trois isolats (3,4 et 48) et dont le niveau de similarité entre 3 et 4 est de 100% et le second (CS6) comprenant l'isolat (69).

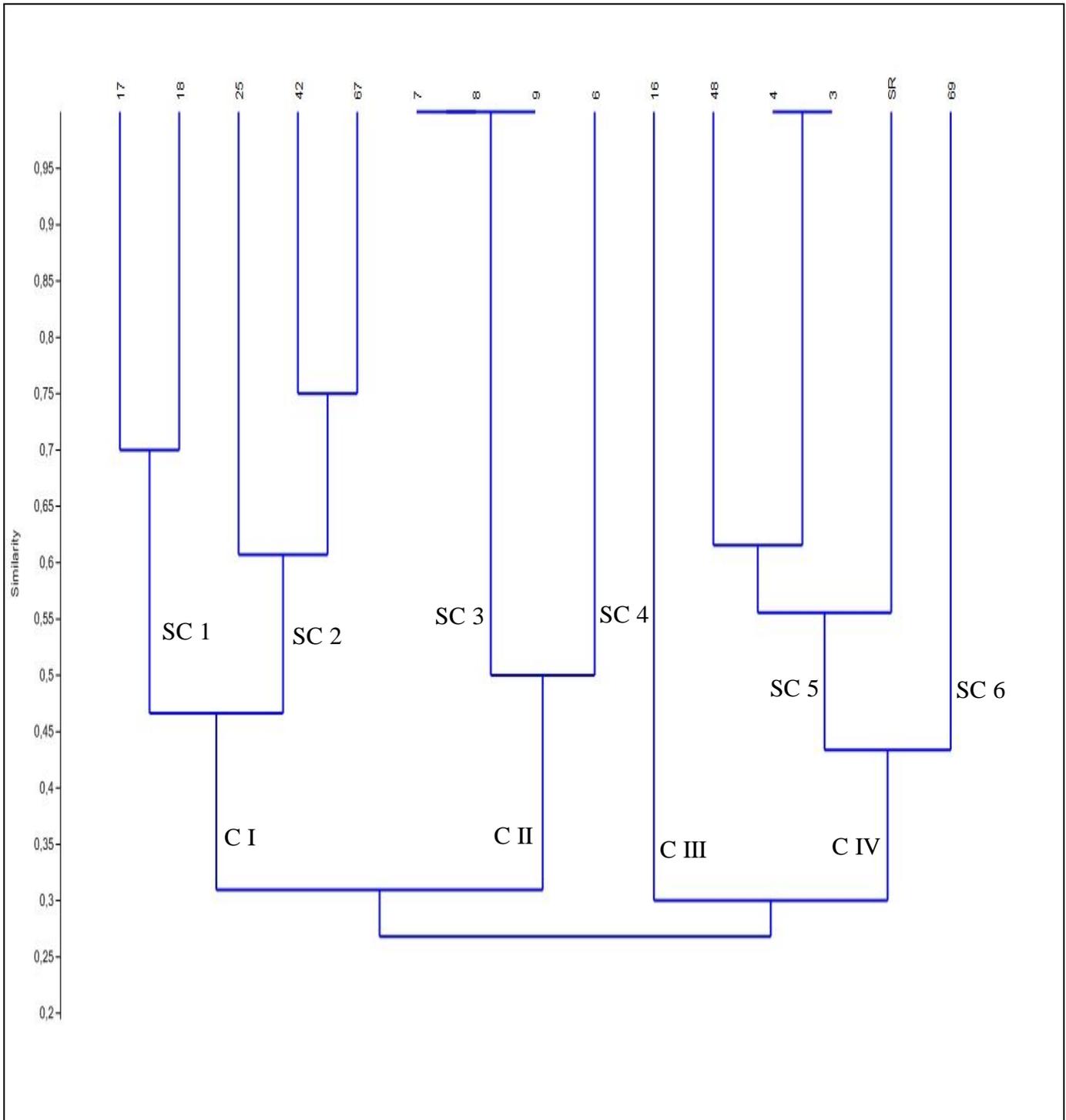


Figure 25 : Dendrogramme d'analyse typologique montrant la diversité morphologique parmi les échantillons d'*Erwinia amylovora*. (3-69) : Bactéries isolées d'*Erwinia amylovora* ; (SR) : Souches de références *Erwinia amylovora*.

A la lumière de ces résultats on peut donc déduire que les isolats d'*Erwinia amylovora*, ayant fait l'objet de cette étude, présentent une grande variabilité génétique entre eux. En se basant sur les profils RAPD, nous avons classé les isolats en différentes souches. Pour les isolats présentant les mêmes profils (identiques) comme les souches 3 et 4 ou les souches 7, 8 et 9, nous les avons baptisés respectivement (*EaDZ1*) et (*EaDZ3*) (Tableau XIV). Le reste des isolats qui présentent des profils RAPD différents (6, 16, 17,18, 25, 42, 48, 67 et 69) nous leurs avons attribués respectivement les codes suivants : *EaDZ2*, *EaDZ4*, *EaDZ5*, *EaDZ6*, *EaDZ7*, *EaDZ8*, *EaDZ9*, *EaDZ10* et *EaDZ11* (Tableau XIV).

Nous constatons à travers les résultats du tableau XIX que les isolats ayant généré des profils identiques proviennent d'un même endroit et d'une plante bien déterminée. C'est le cas par exemple des isolats (*EaDZ1*) qui ont été échantillonnés à Sobha (Chlef) et sur des Néfliers. De même pour les isolats (*EaDZ3*) qui proviennent toujours de Sobha (Chlef) et du Néflier comme plante hôte. Par ailleurs, nous relevons aussi que l'échantillonnage effectué sur un même endroit et sur la même plante hôte peut conduire à l'obtention des isolats différents et c'est le cas des groupes (*EaDZ1*) et (*EaDZ2*).

Tableau XIV : Représentation des souches d'*Erwinia amylovora*, caractérisées par la méthode de RAPD, par rapport à leurs lieux d'échantillonnage.

Isolats	Hôte	Origine	Date de prélèvement	Souche
3	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012	<i>EaDZ1</i>
4	Néflier	Chlef (Sobha)	26-05-2012	
6	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012	<i>EaDZ2</i>
7	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012	<i>EaDZ3</i>
8	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012	
9	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012	
16	Néflier	Tipasa (Kolea)	17-05-2012	<i>EaDZ4</i>
18	Néflier	Tipasa (Kolea)	17-05-2012	<i>EaDZ5</i>
17	Néflier	Tipasa (Kolea)	17-05-2012	<i>EaDZ6</i>
25	Poirier	Ain Defla (Djelida)	25-05-2012	<i>EaDZ7</i>
42	Pommier	Chlef (Sobha)	14-05-2012	<i>EaDZ8</i>
48	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012	<i>EaDZ9</i>
67	poirier	Chlef (Medjaja)	15-06-2012	<i>EaDZ10</i>
69	Poirier	Tipasa (Kolea)	17-06-2012	<i>EaDZ11</i>

CONCLUSION

Comme nous l'avons annoncé en introduction, le feu bactérien représente l'une des maladies les plus dangereuses des arbres fruitiers particulièrement les poiriers, pommiers, cognassiers, néfliers et quelques autres espèces de Maloideae comme l'aubépine. L'agent causal de cette maladie est la bactérie *Erwinia amylovora*. Les premiers et grands dégâts ont été enregistrés dans les grands pays producteurs de pommes et de poires (Europe et Amérique). L'Algérie a été longtemps épargnée par ce fléau, avant d'être rattrapé à la fin des années 2000.

L'identification et la caractérisation exacte de la maladie est essentielle pour assurer une protection efficace et durable de nos vergers. Pour cela, il faut développer des outils efficaces de diagnostic. La présente étude vise à caractériser et à identifier, la bactérie *Erwinia amylovora*, en se servant de plusieurs méthodes : biochimiques, morphologiques et moléculaires.

Lors de cette étude, les échantillons ont été récoltés à partir de 53 vergers (pommiers, poiriers et néfliers), symptomatiques ou pas, répartis sur 4 wilayates. Au total, 70 isolats ou bactéries suspectes d'être *Erwinia amylovora* ont été isolés.

C'est par la méthode de biologie moléculaire que nous avons commencé notre étude de diagnostic. En se servant d'amorces spécifiques (reca2di et reca2re) (Protocole de Laala et al., 2012) pour amplifier une séquence partielle de 713 bp du gène de la recombinase, 14 isolats parmi les 70 suspects ont généré des bandes (des amplicons), seules 6 isolats semble montré la taille désirée (713 pb).

Toujours par le biais des techniques moléculaires, ces 14 souches ont été confirmées étant *Erwinia amylovora* par l'emploi d'un protocole recommandé par Taylor et al., (2001).

Les tests biochimiques sont les deuxièmes méthodes de diagnostic que nous avons expérimenté lors de cette étude. Les expériences ont été conduites sur les 14 isolats précédemment identifiés comme *Erwinia amylovora*. Les résultats obtenus, nous ont permis de constater que les réactions des isolats diffèrent selon la nature du test. Pour certains tests comme : GRAM, fluorescence sur KB, mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose et dégradation du Lactose, les réactions des 14 isolats étaient identiques. Alors que vis-à-vis des autres tests les réactions étaient variables. Même constat

pour l'identification via le système API 20E ou nous avons pu distinguer plusieurs groupes (sept numéros différents) pour les 14 isolats. Aucun de ces groupes ne correspond au numéro de la souche d'*Erwinia amylovora* de référence.

Globalement, les résultats des tests biochimiques n'étaient assez concluants et catégoriques pour identifier et confirmer les souches d'*E. amylovora* puisque beaucoup de contradictions ont été relevées. Cela peut être dû à la forte hétérogénéité qui existe entre les différentes souches d'*E. amylovora* comme le confirment certaines études.

Le test d'antibiogramme nous a démontré l'existence de 02 supers bactéries d'*E. amylovora*, les isolats 42 et 69 résistant aux totalités des antibiotiques testés. La technique RAPD nous a prouvé la présence de plusieurs souches de la bactérie en Algérie et sa pour la premier fois en utilisant des techniques moléculaires.

Erwinia amylovora est une bactérie aussi bien fascinante que dangereuse. D'un point de vue historique, elle est reconnue comme étant la toute première bactérie phytopathogène observée, elle possède une très large gamme d'hôte et plusieurs plasmides, en plus d'être l'une des bactéries les plus répandues au monde car elle est présente dans les quatre coins du globe. Dans un futur proche nous visons à étudier le pouvoir pathogène de cette bactérie et aussi d'essayer de séquencer le plasmide d'une pure souche algérienne et pourquoi pas séquencer son génome entièrement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelguerfi A (2003) Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Projet ALG/97/g31.
- Aldwinckle H S, Beer S V(1979) Fire blight and its control. *Hortic Rev* 1:423-474.
- Aldwinckle H S, Norelli JL (2000) Transgenic pomaceous fruit with fire blight resistance. U S Patent 6,100,453.
- Anonyme (2004) Diagnostic protocole for regulated pests. *Erwinia amylovora*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34, 159-171.
- Anonyme (2011) Sidi Bel Abbès : 40 hectares ravagés par le feu bactérien. *Journale L'Horizons* du 06 Juillet 2011.
- Atanasova I, Stefanova K, Kabadjova P, Tishkov S, Dimitrov Z, Bogatzevska N, Moncheva P (2007) Phenotypic diversity of *Erwinia amylovora* in Bulgaria. *Z Naturforsch C* 62:857–868.
- AWP (2007) Angiosperm Phylogeny Website Version 7 May 2006. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> managed by Stevens, P. F. Accessed June 2012.
- Ayers SH, Rupp P, Johnson WT (1919) A study of the alkali forming bacteria in milk. United states Department of Agriculture. Bulletin 782. Washington (US).
- Bami R (2010) Le Feu bactérien s'attaque aux rosacées à pépins dans plusieurs régions du pays. *Journale Le Matain* du 29 Septembre 2010.
- Barionovi D, Giorgi S, Stoeger AR, Ruppitsch W, Scortichini M (2006) Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. *J Appl Microbiol* 100:1084-1094.
- Barney MA (1995) *Erwinia amylovora* hrpN mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *Eur J Plant Pathol* 101:333-340.

- Bayot RG, Ries SM (1986) Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology* 76:441-445.
- Bellemann P, Bereswill S, Berger S, Geider K (1994) Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *International journal of Biologie Macromolecules* 16:290-296.
- Bereswill S, Bugert P, Bruchmuller I, Geider K (1995) Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 61:2636–2642.
- Bereswill S, Jock S, Bellemann P, Geider K (1998) Identification of *Erwinia amylovora* by Growth Morphology on Agar Containing Copper Sulfate and by Capsule Staining with Lectin. *Plant Disease* 82:158-164.
- Bereswill S, Pahl A, Bellemann P, Zeller W, Geider K (1992) Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl Environ Microbiol* 58:3522–3526.
- Berg DE, Akopyants NS, Kersulyte D (1994) Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Methods in molecular and cellular biology* 5, 13-24.
- Bernhard F, Coplin DL, Geider K (1993) A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to cps genes in *Erwinia stewartii*. *Mol Gen Genet* 239:158-168.
- Billings E (1999) Fire blight risk assessment: Billing's integrated system (BIS) and its evaluation. *Acta Hort* 489:399-405.
- Blair DF (1995) How bacteria sense and swim. *Annu Rev Microbiol* 49:489-522.
- Boccaro M, Schwartz W, Guiot E, Vidal G, De Paepe R, Dubois A et Boccaro AC, 2007. Early chloroplastic alterations analysed by optical coherence tomography during a harpin-induced hypersensitive response. *Plant J* 55:338 - 346.
- Bogdanove AJ, Bauer DW, Beer SV (1998) *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. *J Bacteriol* 180:2244-2247.
- Bogdanove AJ, Wei ZM, Zhao L, Beer SV (1996) *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homolog of yopN of *Yersinia sp.* *J Bacteriol* 178:1720-1730.

- Bogs J, Richter K, Kim WS, Jock S, Geider K (2004) Alternative methods to describe virulence of *Erwinia amylovora* and host plant resistance against fire blight. *Plant Pathol* 53:80-89.
- Bogs J, Bruchmüller I, Erbar C, Geider K (1998) Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology* 88:416-421.
- Boureau T, ElMaarouf-Bouteau H, Garnier A, Brisset MN, Perino C, Pucheu I, Barny M A (2006) DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and non host tobacco plants. *Mol Plant Microbe Interact* 19:16-24.
- Bugert P and Geider K (1995) Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol Microbiol* 15:917-933.
- Büttner D, He SY (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology* 150: 1656-1664.
- Challice J S (1974) Rosaceae chemotaxonomy and the origins of the Pomoideae. *Bot J Linn Soc* 69:239–259.
- Challice J S (1981) Chemotaxonomic studies in the Rosaceae and the evolutionary origins of the subfamily Maloideae. *Preslia* 53:289–304.
- Chaouia A (2003) Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture Cas des plantations arboricoles. Projet ALG/97/G31 PNUD, Alger, Hôtel Hilton, 22-23/01/2003, 60 P.
- Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology* 4: 811-825.
- Crepet W L, Friis E M, Gandolfo M A (2004) Fossil evidence and phylogeny: The age of major angiosperm clades based on mesofossil and macrofossil evidence from Cretaceous deposits. *American J Bot* 91: 1666–1682.
- Crosse JE, Goodman RN (1973) A selective medium for and a definitive colony characteristic of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 63:1425–1426.
- Da Cunha L, Sreerekha MV, Mackey D (2007) Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 349-357.

- DebRoy S , Thilmony R , Kwack YB, Nomura K, He SY (2004) A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid -mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc Natl Acad Sci* 101 :9927 -9932.
- Dellagi A, Reis D, Vian B, Expert D (1999) Expression of the desferrioxamine receptor gene of *Erwinia amylovora* CFBP1430 during pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact* 12:436 - 466.
- Dellagi A, Brisset MN, Paulin JP, Expert D (1998) Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 8:734-742.
- Denny TP (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual Review of phytopathology* 33: 173-197.
- Dickinson T A, Evans R C, Campbell C S (2002) Rosaceae classification and phylogeny: introduction and overview. <http://www.botany2002.org./sympos13/abstracts/5.shtml> accessed January 2012.
- Donat V, Bosca EG, Penalver J, Lopez MM (2007) Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *J Appl Microbiol* 103:1639-1649.
- Dow JM, Osbourn AE, Wilson TJG, Daniels MJ (1995) A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Plant-Microbe Interact* 8:768-777.
- Dye DW (1981) A numerical taxonomic study of the genus *Erwinia*. *N Z J Agric Res* 24:223–229.
- Echeverrigaray S, Agostini G (2006) Les relation génétiques entre les cultivars commerciaux et adhésions brésiliens de *Salvia officinalis* L basées sur des marqueurs RAPD. *Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul Brasil. Soc* 145 : Pp 366- 367.
- Eden-Green SJ, Billing E (1974) Fireblight. *Rev Plant Pathol* 53:353-365.
- El-Goorani MA, El-Kasheir HMA, Shoeib AA, Hassanein FM (1989) Distribution of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora* in Egypt during 1988. *J Phytopathol* 127:69–74.
- Expert D, Dellagi A, Kachadourian R (2000) Iron and fire blight:role in pathogenicity of desferrioxamineE, the main siderophore of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste J (ed) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp179-195.

- Faize M, Brisset MN, Paulin JP, Tharaud M (1999) Secretion and regulation *hrp* mutants of *Erwinia amylovora* trigger different responses in apple. FEMS Microbiol Lett 171:173-178.
- Faize M, Brisset MN, Perino C, Vian B, Barny MA, Paulin JP, Tharaud M (2006) Protection of apple against fire blight induced by an *hrpL* mutant of *Erwinia amylovora*. Biol Plantarum 50:667-674.
- FAO (2007) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.faostat.fao.org>. Accessed 2013.
- Feistner GJ, Stahl DC, Gabrik AH (1993) Proferrioxamine siderophores of *Erwinia amylovora*. A capillary liquid chromatographic/electrospray tandem mass spectrometry study. Org Mass Spectrom 28:163-175.
- Ffrench-Constant RH, Waterfield N, Burland V, Perna NT, Daborn PJ, Bowen D, Blattner FR (2000) A genomic sample sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potential implications for virulence. Appl Environ Microbiol 66:3310-3329.
- Foster GC, McGhee GC, Jones AL, Sundin GW (2004) Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*. Appl Environ Microbiol 70:7539-7544.
- Fouts DE, Abramovitch RB, Alfano JR, Baldo AM, Buell CR, Cartinhour S, Chatterjee AK, D'Ascenzo M, Gwinn ML, Lazarowitz SG, Lin NC, Martin GB, Rehm AH, Schneider DJ, Van Dijk K, tang X, Collmer A (2002) Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. Proc Natl Acad Sci USA 99:2275-2280.
- Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C (1992) Manuel de bacteriologie Clinique ELSEVIER Collection Option Bio. Volume 1, 79-143.
- Galán J.E, Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science 284: 1322-1328.
- Gaudriault S, Brisset MN, Barny MA (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. FEBS Lett 428:224-228.
- Gaudriault S, Malandrin L, Paulin JP, Barny MA (1997) DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. Mol Microbiol 26:1057-1069.

- Gautier M (1988) La culture fruitière, volume 2, les productions fruitières, Paris, Lavoisier, P 156.
- Geider K, Auling G, Du Z, Jakovljevic V, Jock S, Volksch B (2006) *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-pathogenic bacterium from apple and pear trees. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2937–2943.
- Geier G, Geider K (1993) Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* 42:387-404.
- Goodman RN, White JA (1981) Xylem parenchyma plasmolysis and vessel wall disorientation caused by *Erwinia amylovora*. *Phytopathol* 71:844 -852.
- Hacker J and Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641-679.
- Heyens K, Valcke R (2004) Fluorescence imaging of the infection pattern of apple leaves with *Erwinia amylovora*. *Acta Hort* 704 :69 -74.
- Heywood V H (2007) Flowering plants of the world. Mayflower Books. Elsevier Publisher NewYork NY pp 141–144.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edn Williams & Wilkins, Baltimore.
- Huang PY, Goodman RN (1976) Ultrastructural modifications in apple stems induced by *Erwinia amylovora* and the fire blight toxin. *Phytopathol* 66:269 -276.
- Hueck C (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379-433.
- Hugh R, Leifson E (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of bacteriology* 66, 24-26.
- Hummer KH, Janick J (2009) Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In: Foltá KM, Gardiner (eds) Genetics and genomics of Rosaceae. Series plant Genetics and Genomics: Crops and models, vol 6, Springer, New York, pp 1-17.
- Hutchinson J (1964) The genera of flowering plants Vol 1 Dicotyledons Clarendon, Oxford. Janick, J 2005 The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant Breed Rev* 25:255–320.

- Innes RW, Bent AF, Kunkel BN, Bisgrove SR, Staskawicz BJ (1993) Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J Bacteriol* 175:4859-4869.
- Ishimaru C, Klos EJ (1984) A new medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* 74:1342-1345.
- Janick J (2005) The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant Breed Rev* 25: 255-320.
- Jin Q, Hu W, Brown I, McGhee G, Hart P, Jones AL, He SY (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* 40:1129-1139.
- Jones AL, Geider K (2001) Gram negative bacteria, *Erwinia amylovora* group. In: Schaad NW, Jones JB, Chun W (eds) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS, St Paul, pp 40-55.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1999) *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer Associates Inc Sunderland MA. 290-306.
- Kachadourian R, Dellagi A, Laurent J, Bricard L, Kunesch G, Expert D (1996) Desferrioxamine-dependent iron transport in *Erwinia amylovora* CFBP1430: cloning of the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR. *Biometals* 9:143-150.
- Khelil A (1980) *Le néflier du Japon*. Office des publications universitaire.
- Kim JF, Beer SV (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J Bacteriol* 180:5203-5210.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44:301-307.
- Kingsley MT, Gabriel DW, Marlow GC, Roberts PD (1993) The *opsX* locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *J Bacteriol* 175:5839- 5850.
- Kiraly Z, El-Zahaby HM, Klement Z (1997) Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cell to reactive oxygen species. *Journal of Phytopathology* 145: 59-68.
- Kjemtrup S, Nimchuk Z, Dangl JL (2000) Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion in Microbiology* 3: 73-78.

- Klement Z (1982) Hypersensitivity Dans "Phytopathogenic prokaryotes", vol. 2, Mount, M.S. et Lacy, G.H. (Eds). Academic Press, Inc, New York, Etats-unis, p. 149-177.
- Kobra J, Sillerova J (2010) First occurrence of fire blight native infection on apricot (*Prunus armeniaca*) in the Czech Republic. In: Abstracts of the 12th international workshop on fire blight Warsaw, Poland, p 107.
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science 280:602-605.
- Laala S, Manceau C, Valentini F, Kerkoud M, Kheddami M (2012) Fireblight survey and first characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Algeria. Journal of plant pathology 10.4454/JPP.FA.2012.068.
- Larbi H, (2011) Une bactérie détruit les vergers. Journal Le Soir d'Algérie du 25 Septembre 2011. Page 8.
- Leigh JA, Coplin DL (1992) Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. Annual Review of Microbiology 46: 307-346.
- Lelliott RA, Stead DE (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific publications Volume 2. Oxford (GB).
- Li CM, Brown I, Mansfield J, Stevens C, Boureau T, Romantschuk M, Taira S (2002) The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. EMBO J 21:1909-1915.
- Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv "phaseolicola" controls pathogenicity of beans plants and hypersensitivity on non host plants. Journal of Bacteriology 168: 512-522.
- Llop P, Barbé S, Lopez MM (2011) Function and origin of plasmids in *Erwinia* species that are pathogenic to or epiphytically associated with pome fruit trees. Trees 10.1007/s00468-011-0630-2.
- Llop P, Bonaterra A, Penalver J, Lopez MM (2000) Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Appl Environ Microbiol 66:2071-2078.
- Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C, Lopez MM (1999) A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. J. Microbiol. Meth. 37: 23-31.

- Llop P, Donat V, Rodriguez M, Cabrefiga J, Ruz L, Palomo JL, Montesinos E, Lopez MM (2006) An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEa29. *Phytopathology* 96:900-907.
- Llop P, Gonzalez R, Pulawska J, Bultreys A, Dreo T, Lopez MM (2008) The new plasmid pEI70 is present in *Erwinia amylovora* European strains. *Acta Hort* 793:131–136.
- Lonetto M, Gribskov M, Gross CA (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174:3843-3849.
- Mabberley D J (1987) *The Plant-Book*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.pp. 506–507.
- MacManus PS, Jones AL (1994) Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology* 84:627-633.
- Maes M, Garbeva P, Crepel C (1996) Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathol* 45:1139–1149.
- Maes M, Orye K, Bobev S, Devreese B, Van Beeumen J, De Bruyn A, Busson R, Herdewijn P, morreel K, Messens E (2001) Influence of amylovorane production on virulence of *Erwinia amylovora* and a different amylovoran structure in *E.amylovora* isolates from *Rubus*. *European Journal of Pathology* 107:839-844.
- Manulis S, Kleitman F, Dror O, Davis I, Zutra D (1998) Characterization of *Erwinia amylovora* population in Israel. *Phytoparasitica* 26:39–46.
- Manulis S, Zutra D, Ga'ash D, Kleitman F, Dror O, Elisha S, David I, Rav-David D, Zilberstaine M, Herzog Z, Shabi E (1996) Streptomycin resistance of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. *Phytoparasitica* 24:161.
- Maxson-Stein K, He SY, Hammerschmidt R, Jones A (2002) Effect of treating apple trees with acibenzolar-Smethyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Dis* 86:785-790.
- Maxson-Stein K, McGhee GC, Smith JJ, Jones AL, Sudin GW (2003) Genetic analysis of a pathogenic *Erwinia sp.* isolated from pear in Japan. *Phytopathology* 93:1393–1399.
- Mergaret J, Verdonock L, Kersters K, Swings J, Boeufgras J-M, de Lay J (1984) Numerical taxonomy of *Erwinia amylovora* species using API systems. *J Gen Microbiol* 130:1893–1910.

- Miller TD, Schroth MN (1972) Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology* 62:1175–1182.
- Mohammadi M (2010) Enhanced colonization and pathogenicity of *Erwinia amylovora* strains transformed with the near-ubiquitous pEA29 plasmid on pear and apple. *Plant Pathol* 59:252–261.
- Momol, Aldwinckle (2000) Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste J (ed) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon pp55-72.
- Morgan D R, Soltis D E, Robertson K R (1994) Systematic and evolutionary implications of rbcL sequence variation in rosaceae. *Am J Bot* 81: 890–903.
- Mudgett MB (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 56: 509-31.
- Murneek AE (1952) Thiolutin as a possible inhibitor of fire blight. *Phytopathology* 42:57.
- Nimtz M, Mort A, Domke T, Wray V, Zhang Y, Qiu F, Coplin D, Geider K (1996) Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydrate Research* 287:59-76.
- Nissinen RM, Ytterberg AJ, Bogdanove AJ, Van Wijk KJ, Beer SV (2007) Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels. *Mol Plant Pathol* 8:55-67.
- Norelli JL, Aldwinckle HS, Beer SV (1984) Differential host pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 74:136–139.
- Norelli JL, Jones AL, Aldwinckle HS (2003) Fire blight management in the twenty-first century, Using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Dis* 87:756-765.
- OEPP (1990) Fiche informative sur les organismes de quarantaine : *Erwinia amylovora*. Bulletin 90/399003.
- OEPP (2011) Premier signalement d'*Erwinia amylovora* en Algérie. No 6 Paris 01 Juin 2011.
- Oh CS, Beer (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiol Lett* 253:185-192.

- Oh CS, Kim JF, Beer SV (2005) The hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection. *Molec Plant Pathol* 6:125-138.
- Palacio-Bielsa A, Cambra MA, Lopez MM, ordax M, penalver J, Gorris MT, Cambra M, Marco-Noales E, Liop p, Biosca EG, Rosello M, Montesinos E, Liorente I, Badosa E, Cabrefiga J, bonaterra A, Ruz L, Moragrega C, Frances J, Diaz C (2009) El fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*). Ministerio de Medio ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, Spain.
- Palacio-Bielsa A, Rosello M, Liop P, Lopez MM (2011) *Erwinia* spp. From fruit trees: similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species. *Trees* 10.1007/s00468-011-0644-9.
- Parkhill J , Sebahia M , Preston A , Murphy LD, Thomson N , Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeño-Tárraga AM , Temple L, James K , Harris B, Quail MA, Achtman M , Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A , Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H , Holroyd S, Jagels K , Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E , Rutter S, Sanders M, Saunders D , Seeger K , Sharp S, Simmonds M, Skelton J , Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 35:32-40.
- Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, Sebahia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeño-Tárraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis* , the causative agent of plague. *Nature* 413:523-527.
- Paulin JP (1996) Control of fire blight in European pome fruits. *Outlook Agricu* 25:49-55.
- Paulin JP (2000) *Erwinia amylovora*: general characteristics. In: Vanneste JL (ed) Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, pp 87–115.

- Paulin JP, Samson R (1973) le feu becterien en france II- caractères des souches d'*Erwinia amylovora* (Burril) Winslow *et al.*, 1920, isolée du foyer franco-belge. Ann phytopathol 5: 389-397.
- Powney R, Smits THM, Sawbridge T, Frey B, Blom J, Frey JE, plummer KM, Beer SV, Lick J, Duffy B, Rodoni B, (2011) Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to Rubus plants. J Bacteriol 193:785-786.
- Pulawska J, Kielak K, Sobiczewski P (2006) Phenotypic and genetic diversity of selected Polish *Erwinia amylovora* strains. Acta Horti 704:439–444.
- Pulawska J, Sobiczewski P (2006) Phenotypic and genetic diversity of selected Polish *Erwinia amylovora* strains. Acta Horti 704:439–444.
- Pulawska J, Sobiczewski P (2011) Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia amylovora*: the causal agent of fire blight. Tree 10.1007/s00468-011-0643-x.
- Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem 71:635-700.
- Ray TC, Smith AR, Wait R, Hignett RC (1987) Structure of the sidechain of lipopolysaccharide from *Erwinia amylovora* T. Eur J Biochem 170:357-361.
- Raymundo K, Ries SM (1980) Chemotaxis of *Erwinia amylovora*. Phytopathology 70:1066-1069.
- Raymundo K, Ries SM (1981) Motility of *Erwinia amylovora*. Phytopathology 71:45-49.
- Ries SM, Otterbacher AG (1977) Occurrence of fire blight on thornless blackberry in Illinois. Plant Dis Rep 61:232-235.
- Roine E, Wei W, Yuan J, Nurmiäho-Lassila EL, Kalkkinen N, Romantschuk M, He SY (1997) Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc Natl Acad Sci USA 94:3459-3464.
- Saad AT, Hana L, Choueiri E (2000) Evaluation of streptomycin and oxytetracycline resistance of *Erwinia amylovora* populations in Lebanon. Phytopathology 90:S68.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for Identification of plant Pathogenic Bacteria. APS Press. Third edition 373p.st Paul, Minnesota (US).
- Schatz A, Bugie E, Waksman SA (1944) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gramnegative bacteria. Proc Soc Exp Biol Med 55:66–69.

- Schroth MN, Thomson SV, Hildebrand DC, Moller WJ (1974) Epidemiology and control of fire blight. *Annu Rev Phytopathol* 12:389-412.
- Sebahia M, Bocsanczy AM, Biehl BS, Quail MA, Perna NT, Glasner JD, Declerck GA, Cartinjour S, Schneider DJ, Bentley SD, Parkhill J, Beer SV (2010) Complete genome of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 499446. *J Bacteriol* 192:2020-2021.
- Smith TJ (1999) Report on the development of and use of Cougarblight 98c- A situation specific fire blight risk assessment model for apple and pear. *Acta Hort* 489:429-436.
- Smits THM, Rezzonico F, Kamber T, Blom J, Goesmann A, Frey JE, Duffy B (2010) complete genome sequences of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Mol plant Microbe Interact* 23:384-393.
- Sobiczewski P, Deckers T, pulawska J (1997) Fire blight (*Erwinia amylovora*): some aspects of epidemiology and control. Research institute of pomology and Floriculture, skierniewice.
- Sorg I, Cornelis GR (2009) The type III secretion system. Dans "Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis", Wooldridge, K. (Eds). Caister Academic Press, Norfolk, Royaume-Uni, p. 93-116.
- Starr MP, Cardona C, Folsom D (1951) Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology* 41: 915-919.
- Steiner PW (1990) Predicting apple blossom infections by *Erwinia amylovora* using the Maryblyt model. *Acta Hort* 273:139-148.
- Suhayda CG, Goodman RN (1981b) Early proliferation and migration and subsequent xylem occlusion by *Erwinia amylovora* and the fate of its extracellular (EPS) in apple shoots. *Phytopathology* 71:697 -707.
- Suhayda CG, Goodman RN (1981a) Infection courts and systemic movement of ³²P-labeled *Erwinia amylovora* in apple petioles and stems. *Phytopathol* 71:656-60.
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M (1982) Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72, 917-918.
- Taira S, Tuimala J, Roine E, Nurmiaho-Lassila EL, Savilahti H, Romantschuk M (1999) Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol Microbiol* 34:737-744.

- Takhtajan A (1997) Diversity and Classification of Flowering Plants. Columbia University Press New York.
- Tampakaki AP, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ, Kokkinidis M (2004) Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology* 6: 805-816.
- Tang X, Xiao Y, Zhou JM (2006) Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 19:1159-1166.
- Taylor RK, Guilford PJ, Clark RG, Hale CN, Forster RL (2001) Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *NZ J Crop Horticultural Sci* 29:35–43.
- Tharaud M, Laurent J, Faize M, Paulin JP (1997) Fire blight protection with avirulent mutants of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 143:625-632.
- Thomson SV (2000) Epidemiology of fire blight. In: Vanneste JL (ed) Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford, pp 9-36.
- Thomson SV, Gouk SC, Vanneste JL, Hale CN, Clark RG (1993) The presence of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora* in New Zealand. *Acta Hort* 338:223–230.
- Van der Zwet T, Beer SV (1995) Fire blight: its nature, prevention and control: a practical guide to integrated disease management, 2nd edn. United States Department of Agriculture Bulletin 631, Washington.
- Van der Zwet T, Keil HL (1979) Fire blight, a bacterial disease of rosaceous plants. USDA Agriculture Handbook 510, Sciences and Administration USDA, Washington.
- Vanneste JL (2000) What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? Epidemiology of fire blight. In: Vanneste JL (ed) Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford, pp 1-6.
- Vanneste JL, Lex S, Vermeulen M, Berger F (2002) Isolation of *Erwinia amylovora* from blighted plums (*Prunus demestica*) and potato roses (*Rosa rugosa*). *Acta Hort* 590:89-94.
- Vantomme R, Rijckaert C, Swings J, De Ley J (1986) Characterization of further *Erwinia amylovora* strains and the application of the API 20E system in diagnosis. *Journal of Phytopathology* 117, 34–4.
- Vantomme R, Swings J, Goor M, Kersters K, De Ley J (1982) Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoresis characterisation of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. *Phytopathology* 103:349–360.

- Wang D, Korban SS, Zhao Y (2009) Molecular signature of differential virulence in natural isolates of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 100:192–198.
- Wei ZM, Beer SV (1995) HrpL activates *Erwinia amylovora* hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol* 177:6201-6210.
- Wei ZM, Sneath BJ, Beer SV (1992) Expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol* 174:1875-1882.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218.
- Wikstrom N, Savolainen V, Chase M W (2001) Evolution of the angiosperms: Calibrating the family tree. *Proc Roy Soc London B* 268: 2211–2220.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 22: Pp 6531- 6535.
- Willis DK, Rich JJ, Hrabak EM (1991) *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 4:132-138.
- Wilson M, Lindow SE (1993) Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology* 83:117-123.
- Wodzinski RS, Paulin JP (1994) Frequency and diversity of antibiotic production by putative *Erwinia herbicola* strains. *J Appl Microbiol* 76:603-607.
- Zhang Y, Jock S, Geider K (2000) Genes of *Erwinia amylovora* involved in yellow color formation and release of a low-molecular-weight compound during growth in the presence of copper ions. *Mol Gen Genet* 264:233–240.
- Zhao Y, Blumer SE, Sundin GW (2005) Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J Bacteriol* 187:8088-8103.
- Ziad A (2011) Algérie: Le feu bactérien a affecté des centaines d'hectares. *Journale La Tribune* du 29 Août, 2011.

ANNEXE

Les milieux seront coulés en boîtes de pétri stériles. Et doivent être utilisés dans un délai d'un mois si le milieu contient des antibiotiques et deux mois maximum s'il n'en contient pas. Les milieux doivent être stockés dans un endroit sec à $05^{\circ}\text{C} \pm 04^{\circ}\text{C}$.

Les compositions sont données pour un litre $\pm 05\%$ de milieu à réaliser avec de l'eau distillé. A l'exception du milieu urée-indole pour lequel elles sont données pour 100 ml.

Milieu King B (King et al., 1954)

Peptone: 20 g

Glycérol: 10 g

Phosphate de potassium dipasique: 01.50 g

Sulfate de magnésium heptahydraté : 01.50 g

Agar bactériologique : 15 g

Après autoclavage à une température \geq à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir être coulé en boîtes Pétri.

Milieu levane

Extrait de levure : 02 g

Bactopeptone : 05 g

Saccharose : 50 g

Chlorure de sodium : 05 g

Agar bactériologique : 20 g

On ajuste le pH à 07.2. Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Pétri.

Milieu de Hugh et leifson (Hugh et leifson, 1953)

Bacto tryptone : 02 g

Phosphate de potassium dibasique : 0.3 g

Chlorure de sodium : 05 g

Bleu de bromothymol : 0.03 g

D glucose : 10 g

Agar bactériologique : 3 g

Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

Milieu citrate de simmons (Schaad et al., 2001)

Dihydrogénophosphate d'ammonium : 01 g

Phosphate de potassium dibasique : 01 g

Chlorure de sodium : 05 g

Bleu de bromothymol : 0.08 g

Citrate de sodium : 2.0 g

Sulfate de magnésium : 0.2 g

Agar bactériologique : 20 g

Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

Milieu urée-indole (Freney et al., 1992)

L tryptophane : 0.3 g

Dihydrogénophosphate de dipotassium : 0.1 g

Hydrogénophosphate de dipotassium : 01 g

Chlorure de sodium : 0.5 g

Urée : 02 g

Rouge de phénol : 02 g

Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

Milieu liquide 523 (Schaad et al., 2001)

Saccharose : 10 g

Caséine : 08 g

Extrait de levure : 04 g

Phosphate de potassium dibasique : 02 g

Sulfate de magnésium heptahydraté : 0.3 g

On dissout séparément le Sulfate de magnésium heptahydraté dans 50 ml d'eau distillée et on l'ajoute préalablement à l'autoclavage. Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

Milieu mannitol mobilité (Freney et al., 1992)

Hydrolysate trypsique de caséine : 10,0 g

Mannitol : 07.5 g

Rouge de phénol : 0.4 mg

Nitrate de potassium : 01.0 g

Agar bactériologique : 03.5 g

On ajuste le pH à 07.6. Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

Milieu de Kligler-Hajna (KIA) (Ayers et al., 1919)

Tryptone : 20 g

Extrait autolytique de levure : 03 g

Extrait de viande : 03 g

Glucose : 01 g

Lactose : 10 g

Chlorure de sodium : 05 g
Thiosulfate de sodium : 0.5 g
Citrate ferrique ammoniacal : 0.5 g
Rouge de phénol : 25.0 mg
Agar bactériologique : 15 g

On ajuste le pH à 07.4. Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

Milieu MM2Cu (Bereswill et al., 1998)

L-asparagine: 04 g
Phosphate de potassium dibasique : 02 g
Sulfate de magnésium heptahydraté : 0,2 g
Chlorure de sodium : 03 g
Acide nicotinique: 0.2 g
Thiamin hydrochloride: 0.2 g
Sorbitol: 10 g
CuSO4: 02 mM
Agar bactériologique : 15 g

Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes. L'acide nicotinique et la Thiamine sont stérilisés et additionné par filtration, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boites de Pétri.

Tampon TAE 50X (Tris acétate EDTA 50X)

Tris base : 242 g
Acide acétique glacial : 57,1 ml
EDTA : 100 ml (0,5M, pH 8)

On complet a 1000 ml avec de l'eau distille stérile.

Tampon PBS Tween de 10 mM (0,01M)

Na₂HPO₄ : 02,9 g

KH₂PO₄ : 0,2 g

NaCl : 08 g

KCl : 0,2 g

Tween : 20 ml

On ajuste le pH à 7,2 et on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée stérile

Logiciel Past

« PAST » signifie « PAleontological STatistics », c'est à dire « Statistiques pour la paléontologie ». C'est un logiciel scientifique dont l'auteur principal est Øyvind Hammer, du Museum d'Histoire Naturelle de l'Université d'Oslo (Norvège). On peut le télécharger sur le site <http://folk.uio.no/ohammer/past>.

Past est un logiciel gratuit, facile à utiliser et en plus, il regroupe des fonctions de tests statistiques classiques et de visualisation de données qu'on ne trouve en général que dans des logiciels spécialisés.

Tableau XV : Présentations de l'ensemble des bactéries isolées.

Isolat	Plante hôte	Lieu d'échantillonnages	Date d'échantillonnage
01	Poirier	Chlef (Sobha)	14-05-2012
02	Poirier	Chlef (Sobha)	14-05-2012
03	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012
04	Néflier	Chlef (Sobha)	16-05-2012
05	Poirier	Chlef (Sobha)	14-05-2012
06	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012
07	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-20121
08	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-20121
09	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-20121
10	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-20121
11	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-20121
12	Poirier	Chlef (Medjaja)	28-04-2012
13	Poirier	Chlef (Medjaja)	28-04-2012
14	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
15	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
16	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
17	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
18	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
19	Poirier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
20	Poirier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
21	Poirier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
22	Poirier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012

23	Pommier	Blida (Boufarik)	18-05-2012
24	Pommier	Blida (Boufarik)	18-05-2012
25	poirier	Ain Defla (Djelida)	25-05-2012
26	Poirier	Blida (Boufarik)	18-05-2012
27	Poirier	Blida (Boufarik)	18-05-2012
28	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
29	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
30	Poirier	Ain Dafla (Djelida)	25-05-2012
31	Poirier	Blida (Boufarik)	22-05-2012
32	Poirier	Ain Defla (Djelida)	25-05-2012
33	Poirier	Ain Defla (Djelida)	25-05-2012
34	poirier	Blida (Boufarik)	22-06-2012
35	Poirier	Blida (Boufarik)	22-06-2012
36	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-05-2012
37	Pommier	Chlef (Sobha)	14-05-2012
38	Pommier	Chlef (Sobha)	14-05-2012
39	Poirier	Chlef (Sobha)	16-05-2012
40	Poirier	Chlef (Chega)	18-04-2012
41	Poirier	Chlef (Chega)	18-04-2012
42	Pommier	Chlef (Sobha)	14-05-2012
43	Poirier	Chlef (Chega)	16-05-2012
44	Néflier	Chlef (Chega)	16-05-2012
45	Néflier	Chlef (Chega)	16-05-2012
46	Pommier	Chlef (Chega)	14-05-2012
47	Poirier	Chlef (Chega)	18-04-2012
48	Néflier	Chlef (Sobha)	26-04-2012

49	Poirier	Chlef (Chega)	26-04-2012
50	Néflier	Chlef (Oued Sly)	16-05-2012
51	Poirier	Chlef (Oued Sly)	19-05-2012
52	Poirier	Chlef (Oued Sly)	14-05-2012
53	Poirier	Chlef (Oued Sly)	14-05-2012
54	Néflier	Chlef (Oued Sly)	14-05-2012
55	Néflier	Chlef (Oued Sly)	14-05-2012
56	Néflier	Chlef (Oued Sly)	14-05-2012
57	Néflier	Chlef (Oued Sly)	14-05-2012
58	Néflier	Chlef (Oued Sly)	14-05-2012
59	Néflier	Chlef (Oued Sly)	14-05-2012
60	Pommier	Chlef (Oued Sly)	16-05-2012
61	Pommier	Chlef (Oued Sly)	16-05-2012
62	Pommier	Chlef (Oued Sly)	16-05-2012
63	Poirier	Chlef (Oued Sly)	15-06-2012
64	Poirier	Chlef (Oued Sly)	15-06-2012
65	Poirier	Chlef (Oued Sly)	15-06-2012
66	Poirier	Chlef (Medjaja)	15-06-2012
67	Poirier	Chlef (Medjaja)	15-06-2012
68	Poirier	Blida (Boufarik)	22-06-2012
69	Poirier	Tipaza (Kolea)	17-06-2012
70	Néflier	Tipaza (Kolea)	17-06-2012

Tableau XVI : Analyse RAPD des 14 isolats d'*Erwinia amylovora* généré par l'amorce OPA-01.

Isolats	Taille des bandes (pb)									
	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
3	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
4	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
6	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
7	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
8	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
9	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
16	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
17	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
18	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
25	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
42	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
48	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
67	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
69	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
SR	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
Nombre de bandes monomorphique					00 / 07					
Nombre de bandes polymorphique					07 / 07					
% de polymorphisme					100%					

(SR) : Souche de référence 1430 ; (0) : Absence de la bande ; (1) : Présence de la bande.

Tableau XVII : Analyse RAPD des 14 isolats d'*Erwinia amylovora* généré par l'amorce OPA-03.

Isolats	Taille des bandes (pb)									
	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
3	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
4	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
6	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
7	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
8	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
9	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
16	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
17	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
18	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
25	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
42	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
48	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
67	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
69	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
SR	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
Nombre de bandes monomorphique					00 / 09					
Nombre de bandes polymorphique					09 / 09					
% de polymorphisme					100%					

(SR) : Souche de référence 1430 ; (0) : Absence de la bande ; (1) : Présence de la bande.

Résumé

Le Feu bactérien, causé par la bactérie *Erwinia amylovora*, est une maladie très grave car elle est nécrogène et évolue très rapidement. Elle affecte les Maloïdées, une sous-famille des Rosacées, comprenant des arbres fruitiers à pépins (pommier, poirier...). L'Algérie, a été longtemps épargnée par le feu bactérien, mais des symptômes similaires à cette maladie ont été détectés dans plusieurs vergers du pays, la présence de la bactérie en Algérie a été confirmée en 2011. L'objectif de cette étude est l'isolement et la caractérisation biochimique et moléculaire d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien.

Nous avons pu isoler 70 isolats bactériens présumé *E. amylovora*, ayant toutes une colonie blanche sur le milieu King B et jaunes sur le milieu MM2Cu, à partir d'un matériel végétal collecté de différentes wilayas (Chlef, Ain Defla, Blida et Tipaza). Vu le nombre élevé d'isolats nous avons opté pour l'identification moléculaire ou par PCR (Polymerase Chain Reaction). Notre choix s'est porté sur deux protocoles celui de Laala *et al.*, (2012) et Taylor *et al.*, (2001) basé sur l'amplification d'un fragment d'ADN d'une longueur de 713 et 187 pb respectivement.

Quatorze (14) isolats d'*Erwinia amylovora* ont été identifiés, c'est le protocole de Taylor *et al.*, (2001) qui s'est avéré le plus efficace et le plus spécifique. D'un autre côté les tests biochimiques se sont montrés totalement inefficaces dans le diagnostic de cette bactérie phytopathogène.

Le test d'antibiogramme nous a dévoilé l'existence de 02 supers bactéries d'*E. amylovora*, et la technique RAPD nous a prouvé l'existence de plusieurs souches en Algérie et ceci pour la première fois en utilisant des techniques moléculaires.

Mots clés : Rosacées, *Erwinia amylovora*, feu bactérien, identification moléculaire et biochimique, caractérisation des souches, RAPD.

Summary

Fire blight, caused by the bacteria *Erwinia amylovora*, is a very serious disease because it is necrotic and evolving rapidly. It affects Maloideae, a sub-family of Rosaceae, including pome fruits (apple, pear ...). Algeria has long been spared by the fire blight, but similar symptoms to the disease were detected in several orchards in the country, the presence of the bacteria in Algeria was confirmed in 2011. The objective of this study is the isolation, biochemical and molecular characterization of *Erwinia amylovora*, fire blight pathogen.

We could isolate 70 bacterial isolates suspected *E. Amylovora*, all with a white colony on King B medium and yellow on MM2Cu, from plant material collected from different wilayas (Chlef, Ain Defla, Blida and Tipaza). Given the high number of isolates we have opted for the molecular identification or by PCR (Polymerase Chain Reaction). Our choice fell on two protocols that of Laala *et al.*, (2012) and Taylor *et al.*, (2001) based on the amplification of a length of 713 and 187 bp DNA fragment respectively.

Fourteen (14) isolates of *Erwinia amylovora* were identified, the protocol of Taylor *et al.*, (2001) which was the most effective and the most specific. On the other hand biochemical tests have proved totally ineffective in the diagnosis of this phytopathogenic bacteria.

The susceptibility test showed us the existence of 02 super bacteria *E. Amylovora*, and RAPD technique showed us the existence of several strains in Algeria and this for the first time using molecular techniques.

Keywords: Rosaceae, *Erwinia amylovora*, fire blight, Molecular and biochemical identification, characterization of strains, RAPD.

الملخص

اللفحة النارية هو مرض خطير جدا تسببه ببكتيريا (الاروينيا اميلوفورا) يصيب فصيلة من عائلة الزهريات , التي تحتوي على أشجار مثمرة ذات نواة (تفاح , أجاص....). الجزائر كانت و إلى وقت قريب خالية من هذا المرض , و لكن إغراض مشابهة له شوهدت بمختلف حقول الوطن , و في 2011 تؤكد وجود هذا المرض بصفة رسمية. الهدف من هذا العمل هو العزل و التشخيص البيوكيميائي و الجزئي للبكتيريا المسببة للفة النارية.

عزلنا 70 بكتيريا مشبوهة , كلها تكون أشكالا بيضاء على الوسط (ا) وأشكالا صفراء على الوسط (ب). و هذا من نباتات جمعت من عدة ولايات (شلف , عين الدفلى , بليدة و تيبازة), نظرا للعدد الهائل للبكتيريا ارتأينا أن نبدأ عملنا بالتحديد الجزئي . و قد اخترنا بروتوكولين للعمل, اللذان يشكلان قطعة طولها 713 زوج قاعدي للأول و 187 زوج قاعدي للثاني.

14 بكتيريا تم تحديدها عن طريق البروتوكول الثاني و الذي اثبت انه الأجدر و الأكثر فاعلية , من جهة أخرى أثبتنا أن الاختبارات البيوكيميائية غير نافعة من اجل التحديد الجيد للبكتيريا .

اختبار الحساسية برهن لنا وجود بكتيرتين مقاومتين لكل أنواع المضادات الحيوية , و تقنية التضخيم العشوائي المتعددة الأشكال للحمض النووي أثبتت لنا وجود عدة سلالات للبكتيريا في الجزائر و هذا لأول مرة.

الكلمات الدالة: الزهريات , الفة النارية , التشخيص البيوكيميائي و الجزئي , تحديد السلالات .