

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté : Science de la nature et la vie

Département : Biologie



# THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT

Filière : Biologie

Spécialité : Génomique Microbienne

Par

**Lina TALHI**

Thème :

---

### **Caractérisation génétique et phénotypique des souches d'*Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien chez les rosacées**

---

Soutenue le 13/04/2026, devant le jury composé de :

Rachida ALLEM	Professeur	UHBC (Chlef)	Présidente
Mohammed SEBAIHIA	Professeur	UHBC (Chlef)	Rapporteur
El-Hadj Driche	Professeur	UHBC (Chlef)	Examineur
Ahmed Amine BEKKAR	Professeur	Université de Mascara	Examineur
Mohammed EL-Amine BENDAHA	MCA	Université de Mascara	Examineur

## Remerciement

Je remercie Allah, le Tout-Puissant, pour m'avoir accordé la force, la patience nécessaires à terminer ce travail.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à mon encadrant, **Pr Mohammed Sebahia** pour m'avoir permis de réaliser ce travail sous sa direction. Je le remercie sincèrement pour sa disponibilité, ses conseils, son aide et ses remarques, qui ont constitué un appui essentiel tout au long de ce travail, et je lui adresse ici toute ma reconnaissance et mon respect.

Je souhaite également exprimer ma gratitude et ma sincère reconnaissance à **Dr Ester Marco Noales**, directrice du laboratoire de bactériologie à l'Institut valencien de recherches agronomiques (IVIA) Valence-Espagne, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Son soutien, sa disponibilité et sa bienveillance ont été très appréciés durant mon séjour, et je lui adresse mes sincères remerciements.

Je remercie également **Dr Silvia Barbé** -laboratoire de bactériologie de l'IVIA- pour son aide précieuse, sa gentillesse et ses conseils.

Je remercie **Madame Rachida ALLEM**, Professeure à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury.

**Monsieur Benali SETTI**, Professeur à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef, je lui adresse mes remerciements pour sa disponibilité et pour avoir accepté de faire partie du jury.

**Monsieur Ahmed Amine BEKKAR**, Professeur à l'Université de Mascara, je le remercie sincèrement pour l'honneur qu'il m'a fait en participant à ce jury et pour le temps accordé à l'étude de ce travail.

**Monsieur Mohammed El-Amine BENDAHA**, Maître de Conférences A à l'Université de Mascara, je le remercie pour sa présence au sein du jury et pour sa disponibilité lors de l'évaluation de ce travail.

**Monsieur El-Hadj DRICHE**, professeur à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef, je lui exprime ma gratitude pour sa participation et pour l'attention qu'il a bien voulu accorder à ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les membres du laboratoire de bactériologie de l'IVIA, en particulier **Inma, Adela** et **Félix**, pour leur collaboration, leur disponibilité et leur gentillesse tout au long de mon stage.

Je tiens aussi à remercier **Monsieur Mkhang**, directeur du SRPV de Chlef, ainsi que **Madame Madani Nacera**, pour leur appui sur le terrain durant les campagnes de prélèvement. Mes sincères remerciements vont également aux ingénieurs de la DSA de Chlef : **Monsieur El Hachmi, Aïcha, Souad** et **Mokhtariya**, ainsi qu'aux membres de la DSA d'Aïn Defla, pour leur aide précieuse lors des prélèvements sur le terrain.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, en particulier les agriculteurs qui ont bien voulu collaborer à l'étude en autorisant la réalisation des prélèvements et en témoignant de leur confiance.

## Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, en témoignage de ma profonde reconnaissance pour leur amour inconditionnel, leur patience, leur soutien indéfectible, leurs innombrables sacrifices et la confiance qu'ils m'ont toujours accordée.

**À ma mère,**

Pour ton amour infini, ta bienveillance et ta présence constante. Tes prières m'ont accompagnée et protégée à chaque étape de mon parcours, même dans l'éloignement.

**À mon père,**

Pour ton soutien sans faille depuis le début de ce parcours, pour ta détermination à me voir réussir et pour l'aide précieuse que tu m'as apportée. Ton attachement à la science et ton sens du devoir ont été pour moi une source d'inspiration essentielle

À vous deux, j'adresse ma gratitude la plus profonde. Puisse Allah vous accorder une longue vie, empreinte de santé et de sérénité.

**À mes chères sœurs, Soumia, Lidia et Chaima,**

Merci d'avoir été à mes côtés, pour votre affection inestimable, vos sourires, votre bienveillance et votre présence toujours réconfortante.

**À mes deux frères** et, tout particulièrement, **à mon petit frère Ghaith,** ta joie, ta spontanéité et tes blagues ont été une source précieuse de réconfort et d'énergie. Qu'Allah vous protège tous, mes sœurs et frères, et vous accorde une vie emplies de sérénité, de santé, de bonheur et de réussites dans tout ce que vous entreprendrez.

**À mon amie précieuse, Nerdjes,**

Avec qui j'ai partagé la chambre à la résidence universitaire, les longs trajets et des souvenirs inoubliables, dans les bons comme dans les moments difficiles. Ta patience, ton soutien et ton énergie positive m'ont souvent aidée à garder courage et à avancer, même dans les périodes de grand découragement. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de belles réussites dans ta vie.

**À mon amie Hind,**

Merci pour ton amitié, ton amour et ta fidélité.

**À la mémoire de mon oncle Rachid,**

Qui a toujours attendu avec impatience que j'achève ce travail. Qu'Allah lui fasse miséricorde et lui accorde le Paradis

**À mes oncles Mohamed et Azouz,**

Pour leur présence et leurs encouragements.

*Lina*

## Résumé

La bactérie Gram-négative *Erwinia amylovora* est l'agent responsable du feu bactérien, l'une des maladies les plus dangereuses affectant les plantes de la famille des Rosacées. Depuis sa première détection en Algérie en 2010, la maladie s'est propagée dans plusieurs régions du pays et a causé d'importants dégâts. Le but de cette étude était de caractériser, sur les plans phénotypique et génotypique, les souches d'*E. amylovora* associées au feu bactérien en Algérie.

Durant la période entre 2016 et 2021, des échantillons ont été prélevés dans des vergers situés dans différentes wilayas : Chlef, Aïn Defla, Tipaza, Blida, Sétif, Mila et Constantine. Au total, 18 isolats bactériens ont été confirmés comme étant *E. amylovora* par PCR conventionnelle et PCR en temps réel. Elles ont ensuite été soumises à plusieurs tests pour une caractérisation phénotypique : analyse des profils d'acides gras, tests de virulence, caractérisation biochimique et analyse de la cinétique de croissance. Pour la caractérisation génotypique, une PCR duplex a été réalisée pour détecter la présence du plasmide ubiquitaire pEA29 et le plasmide pEI70, ainsi qu'une analyse VNTR, une analyse MLST suivie d'une analyse phylogénétique à partir des séquences concaténées des gènes ciblés. Un génotypage CRISPR a également été effectué sur la base des séquences de trois régions CRISPR.

Les 18 souches analysées ont montré quelques différences phénotypiques, notamment au niveau de la cinétique de croissance. Selon leur virulence sur des poires immatures, elles ont été réparties en trois groupes. L'analyse des profils d'acides gras a permis de distinguer également trois groupes, probablement liés à leur origine d'isolement. L'analyse globale des données phénotypiques (Analyse Factorielle Multiple) a permis d'identifier cinq groupes distincts.

L'analyse génétique a montré qu'une seule souche ne possède pas le plasmide pEA29 ; il s'agit de la souche la moins virulente, et aucune ne contient le plasmide pEI70. Les analyses MLST et VNTR ont montré une forte homogénéité entre les souches, ce qui n'a pas permis de les différencier efficacement. L'arbre phylogénétique a regroupé les souches algériennes au sein du clade largement prévalent à l'échelle mondiale. Le génotypage CRISPR a révélé trois génotypes : un déjà connu (4-24-38/Aα), présent chez la majorité des souches, et deux nouveaux, l'un correspondant à la souche EA55 (4-29-38/Aα), et l'autre à la souche EA54 (NP-24-38/naα). Un nouveau motif CR1 a également été détecté.

En conclusion, il s'agit de la première étude en Algérie qui combine une analyse phénotypique, génétique et phylogénétique des souches d'*E. amylovora*. Elle permet de proposer une voie possible d'introduction d'*E. amylovora* dans le nord du pays. Les résultats indiquent que les souches partagent un ancêtre commun, probablement originaire du Nord de l'Italie, et qu'elles ont été introduites en Algérie à la suite d'un ou de plusieurs événements d'introduction, avant de se disperser dans différentes régions.

**Mots clés :** *Erwinia amylovora*, feu bactérien, virulence, plasmides, MLST, CRISPR, acides gras.

## Abstract

The Gram-negative bacterium *Erwinia amylovora* is the causal agent of fire blight, one of the most serious diseases affecting plants of the *Rosaceae* family. Since its first detection in Algeria in 2010, the disease has spread across several regions of the country, causing significant damage. The aim of this study was to characterize, at both phenotypic and genotypic levels, the strains of *E. amylovora* associated with fire blight in Algeria.

Between 2016 and 2021, samples were collected from orchards in various regions: Chlef, Aïn Defla, Tipaza, Blida, Sétif, Mila, and Constantine. In total, 18 bacterial isolates were identified as *E. amylovora* using conventional and real-time PCR. The strains were subjected to several tests for phenotypic characterization: fatty acid profile analysis, virulence assays, biochemical characterization, and growth curve analysis. For genotypic characterization, duplex PCR was conducted to detect the presence of the ubiquitous plasmid pEA29 and the plasmid pEI70, as well as VNTR analysis, MLST followed by phylogenetic analysis based on concatenated sequences of target genes. CRISPR genotyping was also carried out by analyzing the sequences of three CRISPR regions.

The 18 analyzed strains showed some phenotypic differences, particularly in their growth kinetics. The analysis of fatty acid profiles also allowed the distinction of three groups, probably related to their isolation origin. Based on their virulence on immature pear fruits, they were also grouped into three clusters. The global analysis of phenotypic data (Multiple Factor Analysis, MFA) identified five distinct groups.

Genetic analysis showed that only one strain lacked the pEA29 plasmid; this strain was also the least virulent, and none of the strains carried the pEI70 plasmid. The MLST and VNTR analyses revealed a high level of homogeneity among the strains, which limited their ability to differentiate them. The phylogenetic tree grouped the Algerian strains within the widely prevalent clade. CRISPR genotyping revealed three genotypes: one previously known (4-24-38/Aαα), found in the majority of the strains, and two newly identified genotypes, one corresponding to strain EA55 (4-29-38/Aεα) and the other to strain EA54 (NP-24-38/naα). A new CR1 pattern was also detected.

In conclusion, this is the first study in Algeria to combine phenotypic, genetic, and phylogenetic analyses of *E. amylovora* strains. It provides evidence suggesting a possible route of introduction of the fire blight pathogen into northern Algeria. The results indicate that the strains share a common ancestor, likely originating from northern Italy, and that they were introduced into Algeria through one or more introduction events before spreading across various regions.

**Keywords:** *Erwinia amylovora*, fire blight, virulence, plasmids, MLST, CRISPR, fatty acids.

## ملخص

تُعد البكتيريا سالبة الغرام *Erwinia amylovora* العامل المسبب لمرض اللفحة النارية، وهو من أخطر الأمراض التي تصيب النباتات من فصيلة الورديات (*Rosaceae*). ومنذ اكتشافه لأول مرة في الجزائر سنة 2010، انتشر هذا المرض في عدة مناطق من البلاد متسبباً في أضرار كبيرة.

كان الهدف من هذه الدراسة توصيف ظاهري وجيني لعزلات *E. amylovora* المرتبطة بمرض اللفحة النارية في الجزائر. خلال الفترة الممتدة من 2016 إلى 2021، تم جمع عينات من بساتين واقعة في ولايات مختلفة: الشلف، عين الدفلى، تيبازة، البليدة، سطيف، ميلة وقسنطينة. بشكل إجمالي، تم تأكيد أن 18 عزلة بكتيرية تعود إلى *E. amylovora* باستخدام تقنية ال-PCR التقليدية وPCR في الزمن الحقيقي. بعد ذلك، خضعت هذه العزلات لعدة اختبارات من أجل التوصيف الظاهري، شملت تحليل أنماط الأحماض الدهنية، اختبارات الضراوة، التحاليل البيوكيميائية ودراسة سرعة النمو.

أما بالنسبة للتوصيف الجيني، فقد تم إجراء اختبار للكشف عن وجود البلازميد الشائع pEA29 والبلازميد pEI70، بالإضافة إلى تحليل VNTR، وتحليل MLST متبوعاً بتحليل تطوري باستخدام تسلسلات الجينات المجمعّة المستهدفة. كما تم إجراء توصيف جيني باستخدام نظام CRISPR اعتماداً على تسلسل ثلاث مناطق CRISPR.

أظهرت العزلات الثمانية عشر المدروسة بعض الفروقات الظاهرية، خصوصاً في معدل النمو. وتم تصنيفها إلى ثلاث مجموعات حسب ضراوتها على ثمار الإجاص غير الناضجة. كما سمح تحليل أنماط الأحماض الدهنية بتمييز ثلاث مجموعات أخرى، يُحتمل أن تكون مرتبطة بأصلها الجيوغرافي. أما التحليل الشامل للبيانات الظاهرية باستخدام تحليل المكونات المتعددة (MFA) فقد مكن من تحديد خمس مجموعات متميزة.

أظهر التحليل الجيني أن عزلة واحدة فقط لا تحتوي على البلازميد pEA29، وهي الأقل ضراوة، بينما لم تُظهر أي عزلة وجود البلازميد pEI70. أما تحاليل MLST وVNTR فقد أظهرت تجانساً كبيراً بين العزلات، مما حال دون تمييزها بشكل فعال. وقد صنّف الشجر التطوري العزلات الجزائرية ضمن السلالة العالمية واسعة الانتشار.

أما التوصيف باستخدام CRISPR فقد كشف عن ثلاثة أنماط جينية: نمط معروف سابقاً (4-24-38/Aaα) وهو الأكثر شيوعاً بين العزلات، ونمطين جديدين، أحدهما يعود للعزلة (4-29-38/Aeα) EA55، والآخر يعود للعزلة EA54 (NP-24-38/naα). كما تم الكشف عن نمط جديد في منطقة CR1.

وفي الختام، تُعد هذه أول دراسة في الجزائر تجمع بين التحليل الظاهري، الجيني والتطوري لعزلات *E. amylovora*. وتسمح باقتراح مسار محتمل لدخول العامل المسبب لمرض اللفحة النارية إلى شمال البلاد. وتشير النتائج إلى أن العزلات تشترك في سلف مشترك، يُحتمل أن يكون من شمال إيطاليا، وأن دخولها إلى الجزائر تم من خلال حادثة واحدة أو عدة حوادث إدخال، قبل أن تنتشر في عدة مناطق.

**الكلمات المفتاحية:** *Erwinia amylovora*، اللفحة النارية، الضراوة، البلازميدات، MLST، CRISPR، الأحماض الدهنية.

# Table des matières

Remerciement.....	I
Dédicace .....	III
Résumé.....	IV
Abstract .....	V
ملخص.....	VI
Liste des abréviations .....	XII
Liste des figures.....	XVI
Liste des tableaux .....	XVIII
Introduction .....	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique .....	4
1 Le feu bactérien .....	4
1.1 Origine de la maladie.....	4
1.2 Plantes hôtes .....	5
1.2.1 Classification des Rosacées.....	5
1.2.2 Sous-familles des Rosacées et leurs principaux hôtes du feu bactérien .....	5
1.2.3 Importance économique des Rosacées .....	8
1.3 Symptômes .....	9
1.3.1 Brûlure des fleurs .....	10
1.3.2 Brûlure des pousses et des feuilles .....	10
1.3.3 Brûlure des fruits .....	11
1.3.4 Symptômes liés aux chancres .....	12
1.3.5 Symptômes du porte-greffe .....	13
1.4 Cycle de vie .....	13
1.4.1 Hivernage .....	13
1.4.2 Propagation de l'inoculum vers le site de l'infection .....	13
1.4.3 Phase épiphytique florale .....	14
1.4.4 Infection primaire dans les fleurs .....	14
1.4.5 Infection secondaire.....	15
1.5 Impacts économiques du feu bactérien.....	16
1.5.1 Impacts économiques directs sur les vergers.....	16
1.5.2 Impacts économiques à l'échelle mondiale .....	17
2 <i>Erwinia amylovora</i> .....	18
2.1 Taxonomie et caractéristiques générales .....	18

2.1.1	Genre <i>Erwinia</i> .....	18
2.1.2	Morphologie des cellules.....	19
2.1.3	Paramètres climatiques et physiologiques pour <i>E. amylovora</i> .....	20
2.2	Génome et plasmides .....	20
2.2.1	Plasmides.....	21
2.3	Mécanismes de résistance.....	24
2.3.1	Résistance déterminée par le chromosome.....	24
2.3.2	Résistance déterminée par des plasmides/transposons .....	24
2.4	Méthodes de détection .....	25
2.4.1	PCR .....	25
2.4.2	LAMP .....	25
2.4.3	Tests sérologiques .....	25
2.4.4	Autres techniques .....	26
2.5	Méthodes d'analyse de la diversité génétique .....	26
2.5.1	Rep-PCR.....	27
2.5.2	PCR ribotypage .....	27
2.5.3	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) .....	27
2.5.4	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	28
2.5.5	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) .....	28
2.5.6	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	28
2.5.7	Multiple- Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA).....	29
2.5.8	CRISPR .....	29
2.5.9	Séquençage complet du génome .....	29
2.6	Facteurs de virulence .....	30
2.6.1	Systèmes de sécrétion de type III (T3SS).....	30
2.6.2	Exopolysaccharides .....	31
2.6.3	Formation du biofilm.....	33
2.6.4	Métabolisme des sucres.....	34
2.6.5	Sidérophores .....	35
2.6.6	Flagelles.....	36
2.6.7	Lipopolysaccharides (LPS) .....	36
2.6.8	Système de sécrétion de type VI (T6SS).....	36
2.7	Régulation.....	37
2.7.1	Régulation du système de sécrétion de type III ( <i>T3SS</i> ).....	37
1.1.1	Régulation de la biosynthèse de l'amylovoran.....	39
1.1.2	Régulation de la formation du biofilm .....	40
3	La lutte.....	41

3.1	Pratiques culturales .....	41
3.2	Lutte chimique .....	42
3.2.1	Cuivre .....	42
3.2.2	Antibiotiques .....	43
3.3	Lutte biologique.....	44
3.3.1	Bactéries antagonistes .....	44
3.3.2	Bactériophages .....	45
3.4	Sélection pour la résistance au feu bactérien .....	46
Chapitre II : Matériel et Méthodes .....		47
1.	Matériel biologique et échantillonnage .....	47
1.1	Traitement des échantillons .....	50
1.2	Isolement des bactéries .....	50
2.	Identification du pathogène .....	50
2.1	Tests conventionnels.....	50
2.1.1	Test KOH .....	50
2.1.2	Test d'oxydase.....	51
2.1.3	Test de fluorescence .....	51
2.1.4	Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose .....	51
2.1.5	Test d'hypersensibilité.....	52
2.2	Identification moléculaire des isolats bactériens .....	52
2.2.1	PCR conventionnelle .....	52
2.2.2	PCR en temps réel .....	54
3.	Caractérisation phénotypique .....	54
3.1	Caractérisation biochimique .....	55
3.2	Test de résistance à la streptomycine .....	55
3.3	Analyse des profils d'acides gras .....	55
3.4	Analyse de la croissance bactérienne .....	55
3.5	Tests de virulence .....	56
3.6	Analyse statistique .....	56
4.	Caractérisation génotypique .....	57
4.1	Screening des plasmides .....	57
4.2	Caractérisation des loci VNTR.....	57
4.3	MLST.....	58
4.3.1	Amplification des gènes .....	58
4.3.2	Purification et séquençage.....	59
4.3.3	Analyse bioinformtique .....	59

4.3.4	Analyse phylogénétique .....	59
4.4	CRISPR .....	60
4.4.1	PCR amplification .....	60
4.4.2	Séquençage.....	60
4.4.3	Analyse des régions CRISPR .....	61
Chapitre III. Résultats.....		62
1.	Collecte des échantillons .....	62
2.	Isolement et identification des bactéries.....	62
2.1	Test de fluorescence .....	63
2.2	Test d'hypersensibilité.....	64
2.3	Identification du pathogène .....	65
2.3.1	Identification moléculaire par PCR conventionnelle.....	65
2.3.2	Identification moléculaire par PCR en temps réel.....	66
3.	Caractérisation phénotypique .....	67
3.1	Caractérisation biochimique .....	67
3.2	Test de sensibilité à la streptomycine .....	69
3.3	Analyses des acides gras.....	69
3.3.1	Analyse hiérarchique .....	73
3.4	Paramètres de croissance .....	74
3.4.1	Phase de latence.....	75
3.4.2	Taux de croissance maximal ( $\mu$ ).....	75
3.4.3	Aire sous la courbe (AUC).....	76
3.5	Test de virulence.....	77
3.6	Analyse statistique .....	78
3.6.1	Corrélations entre la virulence et les caractéristiques de croissance .....	78
3.6.2	Analyse factorielle multiple .....	79
4.	Caractérisation génotypique .....	80
4.1	Détection des plasmides .....	80
4.2	VNTR .....	81
4.3	MLST.....	81
4.3.1	Analyse phylogénétique .....	82
4.4	CRISPR .....	83
4.4.1	CRISPR 1 .....	84
4.4.2	CRISPR 2 .....	85
4.4.3	CRISPR 3 .....	86
4.4.4	Génotype .....	86

Chapitre IV. Discussion .....	89
Conclusion.....	97
Références bibliographiques .....	99
Annexes.....	120

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**°C** : Degré Celsius

**µl** : Microlitre

**µM** : micromolaire

**µm** : micromètre

**ADH** : Dihydrolase de l'arginine

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AFM** : Analyse en facteurs multiples

**AMY** : Fermentation ou hydrolyse de l'amygdaline

**ARA** : Fermentation ou utilisation de l'arabinose

**ARN** : Acide Ribonucléique

**AUD** : Dollar australien

**CCT** : Cristal violet, Cycloheximide, Thallium

**C-di-GMP** : Cyclic di-Guanosine Monophosphate

**CDS** : Séquences codantes

**CIT** : Utilisation du citrate comme seule source de carbone

**CR 1** : CRISPR 1

**CR 2** : CRISPR 2

**CR 3** : CRISPR 3

**CRISPR**: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences

**CsrA** : Régulateur de stockage du carbone

**DASI-ELISA**: ELISA en sandwich à double anticorps

**DFO-E**: Desferrioxamine E

**dNTPs** : Désoxyribonucléotides triphosphates

**DO** : Densité optique

**DR** : répétitions directes

**ECF** : Facteur sigma alternatif extra-cytoplasmique

**EDCs**: Enzymes diguanylate cyclases

**ELISA**: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**EPPO** : European and Mediterranean Plant Protection Organization

**EPS**: Exopolysaccharides

**FAOSTAT**: The Statistics division of FAO

**FliC** : Filament flagellaire

**GEL** : Hydrolyse de la gélatine

**GLU** : Fermentation ou utilisation du glucose

**H<sub>2</sub>S** : Production de sulfure d'hydrogène

**HR** : Réponse hypersensible

**Hrp** : Harpins

**ICE** : Élément Conjugatif Intégrant

**IHF** : Facteur hôte d'intégration

**IND** : Production d'indole à partir du tryptophane

**INO** : Fermentation ou utilisation de l'inositol

**IVIA**: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

**kpb** : Kilo paire de bases

**KB** : Milieu King B

**KOH** : Hydroxyde de potassium.

**Ktt** : Kilotonnes

**l** : Litre

**LAMP** : Amplification isotherme par boucle

**LB** : Luria Bertani

**LDH** : Décarboxylase de la lysine

**LPS** : Lipopolysaccharides

**MALDI-TOF** : Spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice

**MAN** : Fermentation ou utilisation du mannitol

**MPb** : Méga paire de bases

**MEL** : Fermentation ou utilisation de la mélibiose

**MLST**: Multilocus Sequence Typing

**MLVA**: Multiple- Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis

**NP** : New pattern (nouveau motif)

**ODC** : Décarboxylase de l'ornithine

**ONPG** : Test de la  $\beta$ -galactosidase

**ORF** : Cadre de lecture ouvert

**pb** : Paire de base

**PBS**: Phosphate buffer saline

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PFGE**: Pulsed-Field Gel Electrophoresis

**pH** : Potentiel d'hydrogène

**ppGpp** : Guanosine tétraphosphate

**ppm**: Partie par million

**pppGpp** : Messagères secondaires guanosine pentaphosphate

**qPCR** : quantitative PCR

**Rep-PCR** : Repetitive Extragenic Palindromic PCR

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism

**RHA** : Fermentation ou utilisation du rhamnose

**rpm**: rotation par minute

**SNP**: Single nucleotide polymorphism

**SOR** : Fermentation ou utilisation du sorbitol

**SUC** : Fermentation ou utilisation du saccharose

**T3SS** : Systèmes de sécrétion de type III

**T4SS** : Système de sécrétion de type IV

**T6SS** : Système de sécrétion de type VI

**TAE** : Tris acetate EDTA

**TDA** : Déaminase du tryptophane

**TSA** : Agar soja tryptique

**UFC** : Unité Formant Colonie

**URE**: Urease – Activité uréasique

**USDA**: United States Department of Agriculture

**UV** : Ultraviolet

**V** : Volt

**VNTR** : Variable Number Tandem Repeats

**VP** : Test de Voges-Proskauer – Production d'acétoïne

$\lambda$  : Lag phase

$\mu$  : Taux de croissance maximal

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Évolution de la production de pommes en Algérie de 1961 à 2024.....	8
<b>Figure 2.</b> Évolution de la production de poires en Algérie de 1961 à 2024 .....	9
<b>Figure 3.</b> Symptômes du feu bactérien sur les fleurs.....	10
<b>Figure 4.</b> Symptômes du feu bactérien sur les pousses et les feuilles. ....	11
<b>Figure 5.</b> Fruits immatures desséchés.....	12
<b>Figure 6.</b> Chancre hivernant sur un poirier.....	12
<b>Figure 7.</b> Symptômes du chancre du porte-greffe, avec des zones infectées présentant une accumulation d'eau sous l'écorce.....	13
<b>Figure 8.</b> Des exsudats émergents sur un arbre infecté par <i>E. amylovora</i> .....	14
<b>Figure 9 .</b> Étapes du cycle du feu bactérien.....	16
<b>Figure 10.</b> Souche CFBP 1430 d' <i>E. amylovora</i> , observée en microscopie électronique en transmission .....	20
<b>Figure 11.</b> Système de sécrétion de type III (T3SS) chez les bactéries phytopathogènes.....	30
<b>Figure 12.</b> Le processus de biosynthèse de l'amylovoran .....	32
<b>Figure 13.</b> Cartes génétiques de l'opéron <i>ams</i> .....	32
<b>Figure 14.</b> La voie de biosynthèse du levane par la lévansucrase .....	33
<b>Figure 15.</b> Cartes génétiques de l'opéron du sorbitol .....	35
<b>Figure 16.</b> Une représentation graphique des composants qui contribuent à la régulation du système de sécrétion de type III chez <i>E. amylovora</i> .....	38
<b>Figure 17.</b> Une représentation graphique des composants qui contribuent à la régulation de la biosynthèse de l'amylovoran chez <i>E. amylovora</i> .....	39
<b>Figure 18.</b> Une représentation schématique des composants qui contribuent à la régulation de la formation du biofilm chez <i>E. amylovora</i> .....	41
<b>Figure 19.</b> Les zones où des échantillons ont été prélevés dans cette étude.....	47
<b>Figure 20.</b> Les parties des arbres infectées par le feu bactérien .....	48
<b>Figure 21.</b> Symptômes du feu bactérien sur le tronc dans quelques vergers inspectés .....	49
<b>Figure 22.</b> Symptômes du feu bactérien sur des vergers infectés .....	49
<b>Figure 23.</b> Aspect des colonies d' <i>E. amylovora</i> sur le milieu levane.....	62
<b>Figure 24.</b> Aspect des colonies sur milieu KB. ....	63
<b>Figure 25.</b> Aspect des colonies sur milieu CCT :.....	63
<b>Figure 26.</b> Test de fluorescence sous UV des colonies d' <i>E. amylovora</i> (à gauche) et <i>Pseudomonas</i> (à droite) contrôle positif sur milieu KB. ....	64
<b>Figure 27.</b> Réaction d'hypersensibilité sur plante de géranium .....	64

<b>Figure 28.</b> Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR amplifiés avec les amorces EA71F et EA71R. 1.....	65
<b>Figure 29.</b> Profils d'amplification représentatifs obtenus avec les deux protocoles qPCR. ....	66
<b>Figure 30.</b> Test de sensibilité à la streptomycine montrant des zones d'inhibition des souches d' <i>E. amylovora</i> à des concentrations de 250 ppm et 100 ppm.....	69
<b>Figure 31.</b> Exemple de chromatogramme de l'analyse des acides gras de la souche <i>E. amylovora</i> EA22.....	70
<b>Figure 32.</b> Dendrogramme des souches d' <i>E. amylovora</i> basé sur la composition en acides gras. ....	73
<b>Figure 33.</b> Comparaison de la durée de la phase de latence ( $\lambda$ ) parmi les souches étudiées. ....	75
<b>Figure 34.</b> Comparaison du taux de croissance maximal ( $\mu$ ) parmi les souches étudiées. ....	76
<b>Figure 35.</b> Comparaison de l'aire sous la courbe (AUC) entre les différentes souches. ....	77
<b>Figure 36.</b> Symptômes causés par différentes souches d' <i>E. amylovora</i> sur des fruits de poire immatures après inoculation.....	78
<b>Figure 37.</b> Représentation graphique des associations entre les facteurs et les dimensions de l'AFM	79
<b>Figure 38.</b> Représentation des groupes de souches issus de l'analyse AFM.....	80
<b>Figure 39.</b> Profils électrophorétiques des produits de PCR multiplex avec les amorces AJ75/AJ76 et 1.7F-2/1.7R-2 pour la détection des plasmides pEA29 et pEI70 sur gel d'agarose à 1%. 81	81
<b>Figure 40.</b> Profils de PCR fingerprinting obtenus pour les souches algériennes d' <i>E. amylovora</i> .....	81
<b>Figure 41.</b> Arbre phylogénétique reconstruit par la méthode du neighbor-joining, basé sur les séquences concaténées des gènes <i>ams</i> , <i>recA</i> , <i>groEL</i> , <i>hrpN</i> et <i>rpoS</i> , des souches algériennes d' <i>E. amylovora</i> ainsi que d'autres souches. ....	83
<b>Figure 42.</b> Recherche des séquences DR et des espaceurs à l'aide du site CrisprCasFinder.. ....	84
<b>Figure 43.</b> Représentation des espaceurs de la région CRISPR1 des souches de notre collection, ainsi que des souches de référence ATCC49946.....	85
<b>Figure 44.</b> Représentation des espaceurs de la région CRISPR2 des souches étudiées, ainsi que des souches de référence ATCC49946.....	86
<b>Figure 45.</b> Représentation des espaceurs de la région CRISPR 3 des souches étudiées, ainsi que des souches de référence ATCC49946.....	86
<b>Figure 46.</b> Les génotypes CRISPR identifiés chez les souches algériennes d' <i>Erwinia amylovora</i> testées dans cette étude .....	88

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Pertes économiques causées par le feu bactérien dans l'agriculture des arbres fruitiers à l'échelle mondiale .....	17
<b>Tableau 2.</b> Liste des amorces utilisées dans cette étude.....	53
<b>Tableau 3.</b> Conditions de PCR pour l'amplification des gènes utilisés dans l'analyse MLST d' <i>E. amylovora</i> .....	59
<b>Tableau 4.</b> Origine des souches d' <i>E. amylovora</i> isolées au cours de cette étude.....	65
<b>Tableau 5.</b> Profil biochimique des souches isolées en Algérie et de la souche CFBP1430, basé sur les résultats du système API 20E (bioMérieux).....	68
<b>Tableau 6.</b> Profils en acides gras des souches d' <i>E. amylovora</i> testées dans cette étude, selon l'abondance en pourcentage de chaque acide gras. ....	72
<b>Tableau 7.</b> Comparaison de la composition en acides gras entre les clusters. ....	74

# INTRODUCTION GENERALE

## **Introduction**

Le feu bactérien est l'une des maladies les plus destructrices et les plus graves sur le plan économique qui affectent les plantes de la famille des Rosacées, en particulier les arbres fruitiers à pépins. Il représente une menace dangereuse pour le poirier (*Pyrus* spp.), le pommier (*Malus domestica*), le cognassier (*Cydonia oblonga*) et le néflier (*Eriobotrya japonica*) (Malnoy *et al.*, 2012 ; Sun *et al.*, 2023 ; van der Zwet et Beer, 1999 ; Vanneste, 2000 ; Wallis *et al.*, 2020).

La maladie est originaire d'Amérique du Nord. Elle a été signalée pour la première fois lors de l'épidémie survenue dans les vergers de la vallée de l'Hudson, à New York, en 1780 (Denning, 1794 ; Momol et Aldwinckle, 2000 ; van der Zwet *et al.*, 2011). Depuis, elle s'est propagée à plus de 50 pays, entraînant des pertes économiques significatives (EPPO, 2024).

En Algérie, les symptômes du feu bactérien ont été détectés pour la première fois en 2010, dans des vergers des wilayas de Blida, Alger, Tipaza et Boumerdes. La maladie avait toutefois été suspectée d'être présente avant cette date, et sa présence a été confirmée en 2011 (EPPO, 2011 ; Laala *et al.*, 2012). Depuis lors, et en raison du climat chaud et humide favorable, le pathogène s'est propagé, et de nombreuses épidémies ont affecté différentes régions du pays.

L'agent étiologique est la bactérie nécrogène *Erwinia amylovora*, qui appartient à la famille des *Erwiniaceae*, de l'ordre des *Enterobacterales* (Adeolu *et al.*, 2016 ; van der Zwet *et al.*, 2011 ; Vanneste, 2000). C'est la première bactérie démontrée comme étant responsable de maladies chez les plantes. Cette bactérie est hautement virulente et très infectieuse (Piqué *et al.*, 2015 ; Zhao et Qi, 2011).

*E. amylovora* envahit rapidement les tissus végétaux, entraînant ainsi une nécrose progressive. Cela provoque le flétrissement et le noircissement des fleurs et des jeunes pousses, donnant à l'arbre l'apparence d'avoir été brûlé par le feu. L'infection provoque la mort de jeunes arbres et même la destruction totale d'un verger en une seule saison, ce qui entraîne des pertes économiques importantes (Bonn et van der Zwet, 2000 ; Vanneste et Eden-Green, 2000).

Les États-Unis perdent chaque année environ 100 millions de dollars à cause du feu bactérien, tandis que les pertes mondiales étaient estimées à 800 millions de dollars en 2022. Elles pourraient dépasser 2,6 milliards de dollars dans les prochaines années (Norelli *et al.*, 2003 ; Parcey, 2022 ; Sălceanu *et al.*, 2023 ; Wallis *et al.*, 2020).

Les épidémies de feu bactérien se développent souvent de manière explosive, rendant la lutte difficile une fois que la maladie est établie et que les symptômes apparaissent. Même l'application de pratiques culturales, de traitements à base de cuivre ou de méthodes biologiques se révèlent souvent insuffisante (**Harshman et al., 2017 ; Puławska et al., 2023 ; van der Zwet et al., 2011**).

L'utilisation des antibiotiques, en particulier la streptomycine, reste la méthode la moins chère et la plus performante pour prévenir l'infection pendant la floraison (**Norelli et al., 2003 ; Wimmer et al., 2022**) ; cependant, elle est interdite dans la plupart des pays en raison du risque de développement de souches résistantes à la streptomycine (**Gusberti et al., 2015 ; Tancos et Cox, 2016**).

En raison de la gravité de la maladie et de l'absence de traitement efficace, *E. amylovora* a été incluse dans la liste A2 de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (EPPO), des espèces phytopathogènes soumises à quarantaine (**EPPO, 2024 ; Mendes et al., 2024**).

De nombreuses études épidémiologiques ont utilisé différentes techniques pour évaluer la diversité génétique des souches d'*E. amylovora* et mieux comprendre leur dissémination, leurs voies de contamination, ainsi que leur évolution, afin de mettre en place les stratégies les plus efficaces pour contenir la maladie. Cependant, ces techniques ont révélé une forte homogénéité génétique parmi les souches d'*E. amylovora* (**Hannou et al., 2013 ; Jock et al., 2002 ; Mann et al., 2013 ; McManus et Jones, 1995 ; Momol et al., 1997 ; Parcey et al., 2020 ; Rico et al., 2008**).

L'approche CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) est largement utilisée pour la caractérisation des souches locales issues de différents pays et associées à de nouveaux foyers épidémiques, en raison de sa capacité à discriminer finement les variants génétiques. Elle permet ainsi d'identifier et de différencier des souches spécifiques au sein d'une population, en fonction de leur origine géographique..(**Doolotkeldieva et al., 2019 ; Förster et al., 2015 ; Gaganidze et al., 2021 ; McGhee et Sundin, 2012 ; Mendes et al., 2021 ; Öztürk et Kayaaslan, 2024 ; Parcey et al., 2022 ; Rezzonico et al., 2011 ; Rezzonico et al., 2024a**).

De plus, l'intégration de CRISPR avec le MLST (Multilocus Sequence Typing) pourrait offrir des informations supplémentaires sur les voies évolutives et écologiques de ces isolats

(**Bühlmann et al., 2014**), tandis que la caractérisation phénotypique pourrait révéler des détails supplémentaires concernant l'évolution du pathogène et son adaptation environnementale (**Mendes et al., 2022 ; Zeng et al., 2018**).

Cependant, les données disponibles sur le feu bactérien et son agent causal en Algérie sont limitées. Il n'existe que deux études : celle de **Laala et al. (2012)** qui s'est principalement concentrée sur l'identification et le diagnostic de base, tandis que l'étude de **Tafifet et al. (2020)** se concentre sur la région du Centre. Peu d'informations sont disponibles sur les souches provenant d'autres régions, leur phylogénie ou leurs caractéristiques phénotypiques.

L'objectif principal de cette étude était d'analyser et de mieux comprendre la population d'*E. amylovora* en Algérie par la réalisation d'une caractérisation génotypique et phénotypique des souches collectées dans des vergers touchés par le feu bactérien à travers le pays. Pour cela, des approches phénotypiques et génomiques avancées ont été utilisées, notamment le MLST et l'analyse CRISPR.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

1. D'isoler des souches locales à partir des vergers situés dans différentes régions du pays.
2. D'identifier et d'étudier leurs caractéristiques phénotypiques.
3. De déterminer la diversité génétique et les relations phylogénétiques des souches isolées.
4. De comparer ces souches avec des isolats mondiaux afin de déterminer la possible source d'introduction du pathogène en Algérie.

CHAPITRE I  
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## **Chapitre I. Synthèse bibliographique**

### **1 Le feu bactérien**

Le feu bactérien, causé par la bactérie *E. amylovora*, est la maladie bactérienne la plus ancienne, la plus destructive et la plus grave affectant les arbres fruitiers à pépins (**Pedroncelli et Puopolo, 2023 ; van der Zwet et Keil, 1979**).

Comme son nom l'indique, le feu bactérien se reconnaît par l'apparition rapide de tissus noircis, comme s'ils avaient été brûlés par le feu (**Schroth et al., 1974**). Cette maladie peut endommager gravement les arbres sains, entraîner la mort de l'arbre, voire la destruction totale d'un verger en une seule saison (**Bonn et van der Zwet, 2000**).

#### **1.1 Origine du feu bactérien**

Cette maladie est indigène à l'Amérique du Nord, où elle infecte couramment des plantes locales, notamment le sorbier (*Sorbus*), les pommiers sauvages (*Malus*) et l'aubépine (*Crataegus*). Ces plantes présentent une sensibilité faible ou une résistance naturelle au feu bactérien (**Rezzonico et al., 2024b ; Thomson, 2000 ; Zeng et al., 2018**).

Selon **Thomson (2000)**, ces arbres pourraient même avoir bénéficié de l'infection, car une pousse ou une branche atteinte du feu bactérien remplirait la même fonction qu'un éclaircissage des fruits ou une taille. Cela donnerait à l'arbre une nouvelle vigueur et du bois producteur et augmenterait la production de fruits.

En revanche, lorsque les premiers colons européens apportèrent des cultivars de Rosacées beaucoup plus sensibles au feu bactérien, pendant la colonisation de l'Amérique du Nord au XVIIe siècle, la maladie commença à se propager, ce qui finalement conduisit à une épidémie parmi ces nouvelles cultures. Le feu bactérien fut documenté pour la première fois dans la vallée de l'Hudson, dans l'État de New York, au XVIIIe siècle, comme une maladie hautement infectieuse affectant les poiriers (**Thomson, 2000 ; van der Zwet et al., 2016 ; van der Zwet et Keil, 1979**).

En 1895, M.B. Waite mentionnait : « Il n'existe probablement aucune maladie des arbres fruitiers aussi destructrice que le feu bactérien. Aucune maladie n'a autant résisté à toutes les tentatives de trouver un traitement satisfaisant, malgré les grands progrès réalisés au cours des dix dernières années ». Il est intéressant de constater que cette affirmation reste toujours d'actualité, plus de 130 ans plus tard, puisque la maladie continue de se propager et d'affecter aujourd'hui plus de 50 pays à travers le monde.

## **1.2 Plantes hôtes**

Le feu bactérien affecte des arbres fruitiers et des plantes ornementales de la famille des Rosacées, avec une gamme d'environ 200 espèces hôtes réparties dans 40 genres. Certains de ces hôtes ont été observés dans des environnements naturels, tandis que d'autres sont basés sur des essais d'inoculation artificielle (**van der Zwet et Keil, 1979**).

### **1.2.1 Classification des Rosacées**

La classification la plus largement acceptée à ce jour, basée sur les types de fruits, divise la famille en quatre sous-familles : *Amygdaloideae* (ou *Prunoideae*), *Maloideae*, *Rosoideae* et *Spiraeoideae* (**Mahai et al., 2024**). Cependant, selon une analyse phylogénétique, les Rosacées ont été reclassées en trois sous-familles, à savoir *Dryadoideae*, *Rosoideae* et *Amygdaloideae*. Tous les genres précédemment assignés aux sous-familles *Amygdaloideae* et *Maloideae* sont désormais inclus dans *Amygdaloideae*, qui est parfois incorrectement désignée sous le nom de *Spiraeoideae* (**Potter et al., 2007**).

### **1.2.2 Sous-familles des Rosacées et leurs principaux hôtes du feu bactérien**

#### **1.2.2.1 *Maloideae* (*Pomoideae*)**

Cette sous-famille comprend une grande variété de plantes ornementales ainsi que des espèces fruitières comestibles importantes, collectivement appelées fruits à pépins (**Hummer et Janick, 2009**). Les impacts du feu bactérien sur les membres de cette sous-famille représentent la majeure partie de son importance économique à l'échelle mondiale (**Momol et Aldwinckle, 2000**). Ces plantes représentent les principaux hôtes du feu bactérien :

- **Pommier (*Malus domestica*)**

Les pommes, espèce majeure de cette famille, occupent la quatrième place parmi les fruits en termes d'importance (**Hummer et Janick, 2009 ; USDA, 2024a**). Néanmoins, la culture du pommier reste vulnérable au feu bactérien, qui provoque des dégâts considérables sur la production. À titre d'exemple, une seule épidémie survenue dans le Michigan a entraîné l'arrachage de 350 000 à 450 000 pommiers sur une superficie d'environ 620 à 930 hectares, avec des pertes estimées à plus de 40 millions de dollars américains en 2000 (**Sălceanu et al., 2023**).

- **Poirier (*Pyrus spp.*)**

Les poires occupent le cinquième rang parmi les espèces de fruits tempérés les plus importantes (**USDA, 2024b**). Toutefois, le feu bactérien demeure l'un des principaux facteurs limitant la productivité de cette espèce, mettant en péril la production mondiale. La culture des poiriers est plus gravement touchée par le feu bactérien que celle des pommiers, car la plupart des variétés de poires y sont particulièrement sensibles (**Bonn et van der Zwet, 2000**).

- **Cognassier (*Cydonia oblonga*)**

Le cognassier est considéré comme l'un des hôtes les plus sensibles au feu bactérien. Il est également largement utilisé comme porte-greffe pour le poirier et le néflier, ce qui augmente le risque de dissémination du pathogène (**Al-Zughbi et Krayem, 2022 ; Hummer et Janick, 2009 ; Postman, 2009**).

- **Néflier (*Eriobotrya japonica*)**

Le feu bactérien est considéré comme une menace pour cette espèce, de nombreuses épidémies ayant été signalées, en particulier dans la région méditerranéenne (**Momol et Aldwinckle, 2000**).

- **Autres plantes**

D'autres plantes hôtes, moins importantes d'un point de vue économique, mais couramment utilisées comme plantes ornementales ou brise-vent, certaines produisent des fruits comestibles et peuvent également servir de réservoirs pour le pathogène durant l'hiver. Parmi ces espèces figurent le sorbier (*Sorbus*), l'aubépine (*Crataegus*), le buisson ardent (*Pyracantha*), le

cotonéaster (*Cotoneaster*), le stranvaesia, et le photinia (*Photinia*) (EPPO, 2024 ; Momol et Aldwinckle, 2000).

### 1.2.2.2 *Amygdaloideae*

Les fruits de cette sous-famille, connus sous le nom de fruits à noyau, sont principalement représentés par des espèces du genre *Prunus*. Ceux-ci incluent des fruits populaires, tels que les nectarines, les pêches, les prunes, les cerises et les abricots, ainsi que les amandes (Hummer et Janick, 2009).

Bien que le feu bactérien soit généralement rare dans cette sous famille, *Prunus salicina* (prunier japonais) a été la première espèce signalée comme affectée. En 1996, une grave épidémie de feu bactérien a touché *Prunus salicina* dans l'Idaho, et des infections naturelles ont depuis été signalées dans plusieurs pays européens, affectant le prunier européen (*Prunus domestica*), l'abricotier (*Prunus armeniaca*) et le prunier-cerise (*Prunus cerasifera*) (Momol et Aldwinckle, 2000 ; Végh et Palkovics, 2016).

### 1.2.2.3 *Rosoideae*

La principale plante hôte de cette sous-famille pour le feu bactérien est le framboisier (*Rubus*). Les souches infectant cette plante sont spécifiques à cet hôte et ne semblent pas infecter d'autres espèces, comme le pommier ou le poirier. Ces souches sont uniquement présentes en Amérique du Nord (Momol et Aldwinckle, 2000).

Les roses montrent également des symptômes de très grande sensibilité dans les tests d'inoculation artificielle. Des infections naturelles ont été signalées chez l'églantier (*Rosa canina*) (Bastas *et al.*, 2013 ; Momol et Aldwinckle, 2000).

Des épidémies de feu bactérien ont aussi été signalées sur les fraisiers (*Fragaria x ananassa*) dans plusieurs pays européens (Öztürk et Soylu, 2022).

### 1.2.2.4 *Spiraeoideae*

La plupart des membres de cette sous-famille sont des plantes ornementales. Des infections naturelles ainsi qu'artificielles par le feu bactérien ont été signalées chez certains de ses membres. *Spiraea vanhouttei*, le physocarpe (*Physocarpus*), la barbe-de-bouc (*Aruncus*) et le

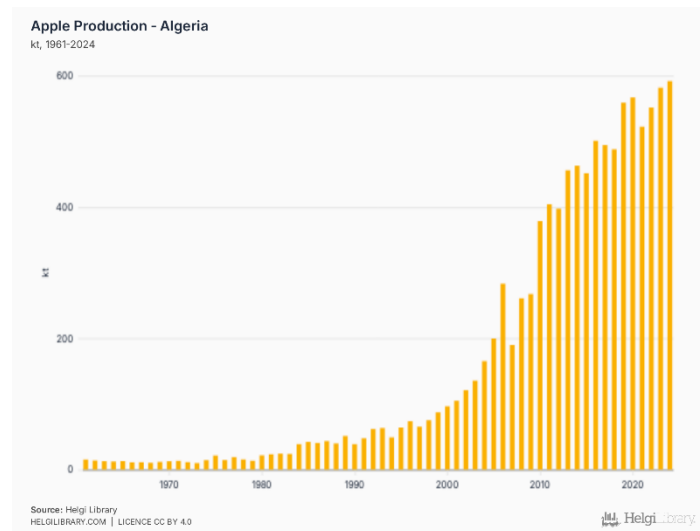
buisson de crème (*Holodiscus*) ont également été cités comme hôtes d'*E. amylovora* (Momol et Aldwinckle, 2000).

### 1.2.3 Importance économique des Rosacées

La famille des Rosacées comprend de nombreuses espèces d'importance économique, principalement connues pour leurs fruits des zones tempérées et les plantes ornementales, ainsi que pour certaines cultures forestières et médicinales. La production mondiale de fruits comestibles de cette famille était évaluée à environ 45 milliards de dollars à la sortie de la ferme, avec une valeur totale estimée du marché de consommation atteignant jusqu'à 180 milliards de dollars (Hummer et Janick, 2009).

#### 1.2.3.1 Importance du pommier en Algérie

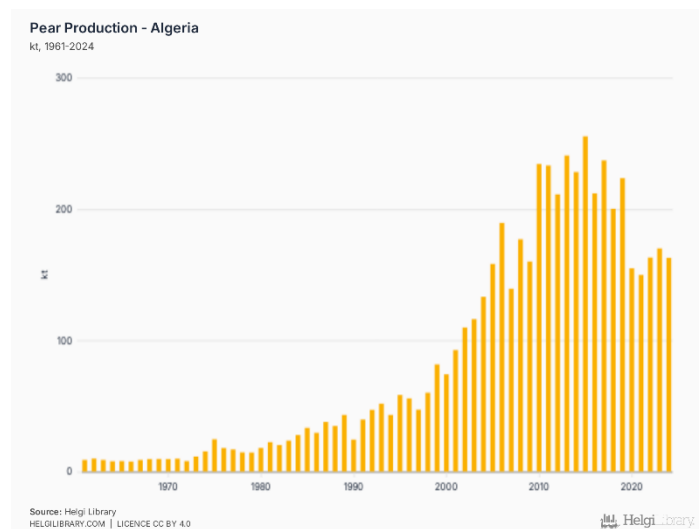
Le pommier est la première Rosacée à pépins plantée en Algérie, avec une superficie estimée à 46 000 hectares en 2016 (Agrichem, 2024). Selon le FAOSTAT, la production algérienne de pommes en 2024 a atteint 592 kilotonnes (kt) (Figure 1). L'Algérie est classée 22<sup>e</sup> parmi 93 pays producteurs de pommes (Helgi Library, 2026a).



**Figure 1.** Évolution de la production de pommes en Algérie de 1961 à 2024 (Helgi Library, 2026a).

### 1.2.3.2 Importance du poirier en Algérie

En Algérie, le poirier est la deuxième Rosacée à pépins la plus cultivée, après le pommier. La superficie totale dédiée à cette culture s'élève à 27 000 hectares, et la majorité du verger national est constituée d'une seule variété : la Santa Maria (**Agrichem, 2019**). En effet, en 2024, la production algérienne de poires a atteint 163 kt tonnes (**Figure 2**). Selon les données de la FAOSTAT, l'Algérie se classe au 14<sup>ème</sup> rang parmi les pays producteurs de poires (**Helgi Library, 2026b**).



**Figure 2.** Évolution de la production de poires en Algérie de 1961 à 2024 (**Helgi Library, 2026b**).

### 1.2.3.3 Importance du cognassier en Algérie

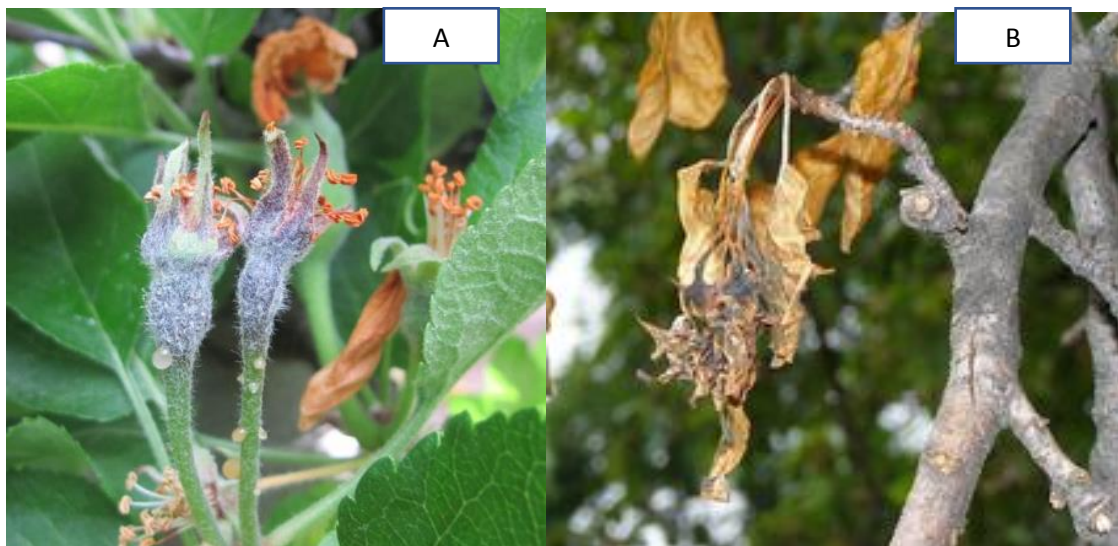
Selon les données de la FAOSTAT, la production nationale de coing a atteint 10,800 tonnes en 2024, ce qui place l'Algérie au huitième rang parmi les pays producteurs de coing (**Helgi Library, 2026c**).

## 1.3 Symptômes

Les symptômes du feu bactérien sont facilement distinguables de ceux des autres maladies des Rosacées, notamment chez le poirier et le pommier. Le feu bactérien est aussi désigné selon la partie de la plante touchée : brûlure des fleurs, brûlure des pousses ou des rameaux, brûlure des feuilles, etc. (van der Zwet et Beer, 1999).

### 1.3.1 Brûlure des fleurs

Généralement, c'est le premier symptôme de la maladie, observé au printemps, une à deux semaines après la chute des pétales. Les fleurs infectées apparaissent initialement gorgées d'eau et d'un gris-vert terne (Figure 3A). Elles se flétrissent ensuite, se dessèchent et deviennent brunes à noires (Figure 3B) (Berry *et al.*, 2009 ; EPPO, 2024 ; Johnson, 2000 ; Steiner, 2000 ; van der Zwet et Beer, 1999).



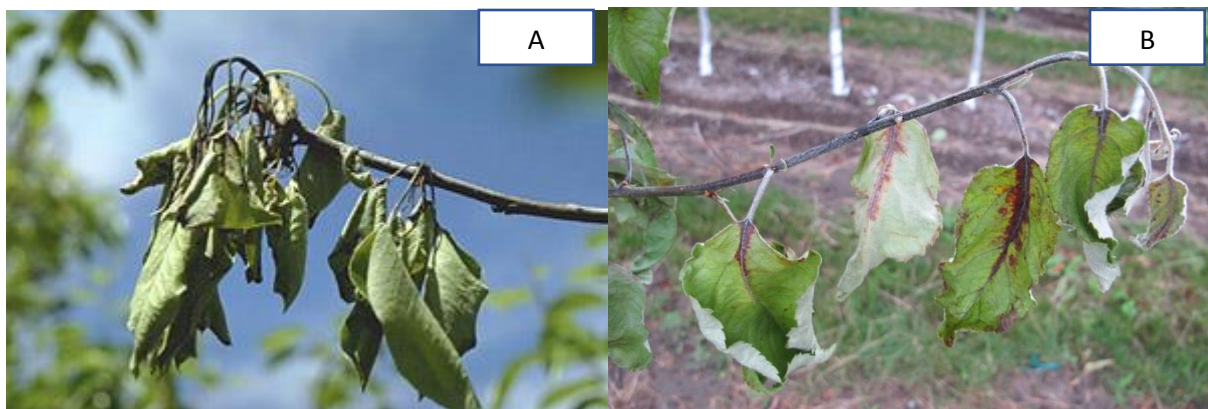
**Figure 3.** Symptômes du feu bactérien sur les fleurs : **A.** Fleur au début de l'infection (DuPont *et al.*, 2023b) ; **B.** Grappe totalement infectée (Koetter et Grabowski, 2024).

### 1.3.2 Brûlure des pousses et des feuilles

Le flétrissement des pousses ressemble à celui observé sur les fleurs, mais les symptômes des pousses se développent plus rapidement. Des exsudats bactériens peuvent apparaître dans des conditions humides, mais le symptôme le plus courant est le flétrissement des extrémités des

pousses, formant une «crosse de berger» (**Figure 4A**) (**DuPont *et al.*, 2023b** ; **EPPO, 2024** ; **van der Zwet et Beer, 1999**).

Les feuilles des pousses malades présentent un noircissement progressif le long de la nervure centrale et des nervures secondaires avant de devenir complètement nécrotiques (**Figure 4B**). Chez le poirier et le pommier, les feuilles, l'écorce et les pousses infectées virent généralement au brun clair, voire au noir, conférant à l'arbre un aspect brûlé. Après leur mort, les feuilles restent fermement accrochées à l'arbre hôte et persistent jusqu'à l'hiver (**DuPont *et al.*, 2023b** ; **van der Zwet et Beer, 1999**).



**Figure 4.** Symptômes du feu bactérien sur les pousses et les feuilles. **A.** Formation d'une crosse de berger (**Johnson, 2000**) ; **B.** Noircissement progressif des feuilles le long de la nervure centrale sur les pousses malades (**DuPont *et al.*, 2023b**).

### 1.3.3 Brûlure des fruits

Au début, des taches gris-vert ou des zones qui semblent imbibées d'eau apparaissent sur les fruits immatures infectés. Ensuite, ces zones s'agrandissent rapidement et virent du brun au noir. Parfois, des gouttelettes d'exsudat bactérien suintent des lenticelles. Vers la fin de la saison, les fruits infectés deviennent sombres, noirs et se dessèchent complètement. Ils restent généralement fixés à la branche jusqu'à la saison suivante (**Figure 5**) (**EPPO, 2024** ; **van der Zwet et Beer, 1999**).



**Figure 5.** Fruits immatures desséchés (EPPO, 2022).

#### **1.3.4 Symptômes liés aux chancres**

Le premier signe est l'apparition de petites taches rougeâtres dans le bois, juste à côté de la marge d'un chancre en développement, visibles lorsque l'écorce fraîche est coupée le long d'une lésion en expansion. Les chancres hivernants, de couleur noire, grise ou parfois légèrement violette, deviennent enfoncés et secs avec le temps (**Figure 6**) (DuPont *et al.*, 2023b ; van der Zwet et Beer, 1999).



**Figure 6.** Chancre hivernant sur un poirier (DuPont *et al.*, 2023b).

### 1.3.5 Symptômes du porte-greffe

Les porte-greffes infectés peuvent présenter des symptômes tels que des zones imbibées d'eau (**Figure 7**), une décoloration allant du violet au noir, des fissures et juste sous l'écorce, le cambium peut présenter des stries brun-rougeâtre (**Johnson, 2000**).



**Figure 7.** Symptômes du chancre du porte-greffe, avec des zones infectées présentant une accumulation d'eau sous l'écorce (**DuPont et al., 2023b**).

## 1.4 Cycle de vie

### 1.4.1 Hivernage

La principale source d'inoculum est constituée par les bactéries responsables du feu bactérien de l'année précédente, qui hivernent dans les chancres des rameaux, des branches ou des troncs des arbres hôtes (**Thomson, 2000**). Cependant, l'inoculum du feu bactérien pourrait également provenir des bactéries présentes dans les bourgeons sains (**Tancos et al., 2017**).

### 1.4.2 Propagation de l'inoculum vers le site de l'infection

Au printemps, pendant les périodes chaudes et humides, un petit pourcentage de chancres devient actif. À la surface de ces chancres apparaissent les exsudats (**Figure 8**), une substance visqueuse, collante, ou bien ils peuvent sécher pour former un vernis dur, lustré, de couleur ambrée (**Thomson, 2000**). Ces exsudats jouent le rôle d'un milieu de transport efficace, étant

constitués d'une concentration élevée de cellules d'*E. amylovora* ( $10^8$  UFC/ $\mu$ l) intégrées dans une matrice polysaccharidique hygroscopique, qui peut persister pendant plus d'un an dans des conditions de faible humidité relative, afin d'assurer un transport efficace (Slack *et al.*, 2017 ; Thomson, 2000).



**Figure 8.** Des exsudats émergents sur un arbre infecté par *E. amylovora* (Slack *et al.*, 2017).

Les insectes, particulièrement les pollinisateurs comme les abeilles, sont attirés par cette douceur et peuvent ramasser quelques microlitres de sécrétion contenant des populations bactériennes denses nécessaires pour un transport et une transmission réussis entre les chancres et les fleurs. L'eau éclaboussée par la pluie ou l'irrigation, ou les mains et les outils des jardiniers, peuvent également transmettre les bactéries aux stigmates des fleurs voisines (Slack *et al.*, 2017 ; Steiner, 2000 ; Thomson, 2000).

### **1.4.3 Phase épiphytique florale**

Après que les cellules d'*E. amylovora* se posent sur le site d'infection, elles commencent initialement à se développer de manière épiphyte à la surface des stigmates des fleurs pendant quelques semaines sans provoquer de symptômes pour établir une grande population nécessaire à l'infection (Zeng *et al.*, 2021).

### **1.4.4 Infection primaire dans les fleurs**

Les précipitations abondantes, comme la pluie ou la rosée, favorisent l'entrée des bactéries dans les tissus floraux. L'humidité crée un gradient nutritionnel dans les films d'eau, attirant les bactéries avec de flagelles vers les nectarhodes (les glandes nectarifères à la base de la fleur) où se produisent plus de 90 % des infections. Les bactéries perdent leur capacité à se déplacer

vers le gradient en dessous de 15,5°C, mais l'infection peut se produire en quelques minutes au-dessus de 15,5°C (**Malnoy et al., 2012 ; Steiner, 2000**).

Après avoir colonisé le site d'infection (infection endophytique), les bactéries se multiplient rapidement et se propagent dans les espaces intercellulaires, provoquant la mort des cellules voisines. Cette facilité d'infection s'explique par la grande susceptibilité du tissu hôte, notamment celui des fleurs, à *E. amylovora*. Ensuite *E. amylovora* peut se disséminer le long du pédicelle vers toutes les fleurs d'une grappe, ce qui induit l'apparition du premier signe visible des symptômes : une imprégnation d'eau, suivie de petites gouttelettes d'exsudat sur les pédoncules floraux, les exsudats servent ainsi de source d'inoculum secondaire (**Beer, 1979 ; Slack et al., 2017 ; Thomson, 2000 ; van der Zwet et Beer, 1999 ; Zeng et al., 2021**).

Une fois que les fleurs sont infectées, *E. amylovora* se multiplie rapidement dans le nectar des fleurs et se propagent aux éperons, aux nouvelles pousses et aux branches, ce qui peut entraîner la mort de toutes les fleurs, feuilles et fruits (**Thomson, 2000**).

#### **1.4.5 Infection secondaire**

De nouveau, les abeilles, la pluie et le vent deviennent des vecteurs efficaces des exsudats (inoculum secondaire). Cette propagation favorise la contamination des fleurs et des pousses des plantes saines, ce qui entraîne des infections secondaires. Ces infections sont fréquemment les plus graves, peuvent conduire à une perte d'arbre ultérieure elles peuvent survenir tout au long de la saison de croissance (**Solymár, 2005**).

L'invasion des pousses peut se produire pendant la phase de croissance, où elles sont les plus sensibles. Cela peut se faire à travers les ouvertures naturelles telles que les lenticelles et les stomates. Cependant, les infections surviennent généralement par des blessures causées par des insectes suceurs, le vent, le sable soufflé, la grêle ou du matériel de taille contaminé (**Billing, 2011a**).

Après l'infection des pousses, les cellules d'*E. amylovora* se déplacent de manière systémique à travers les tissus des feuilles et des tiges infectées jusqu'au tronc principal de l'arbre.

Plus tard dans la saison, qui s'étend jusqu'à la fin de l'été ou à l'automne, sous des conditions favorables, des cycles d'infection secondaires peuvent se développer sur les fleurs secondaires ou les « queues de rat » qui sont caractéristiques typiques des poires et de certains cultivars de pommes (**Beer, 1979 ; Solymár, 2005**). Les températures sont chaudes pendant cette période

et le risque de feu bactérien est généralement élevé pendant cette période (Biggs et Turechek, 2010). Par conséquent, la plupart des problèmes dans les vergers découlent de l'infection secondaire des fleurs de poirier (Billing, 2011b). Toutefois, dans les vergers où il n'y a pas un développement de queues-de-rat, les infections secondaires sont très rares (Shtienberg *et al.*, 2003).

À la fin de la saison de croissance, les infections diminuent et des chancres se forment dans l'écorce (Figure 9), au début avec des bordures enfoncées et mal définies, mais ils finissent par se fissurer et se séparer des tissus sains (Solymár, 2005).

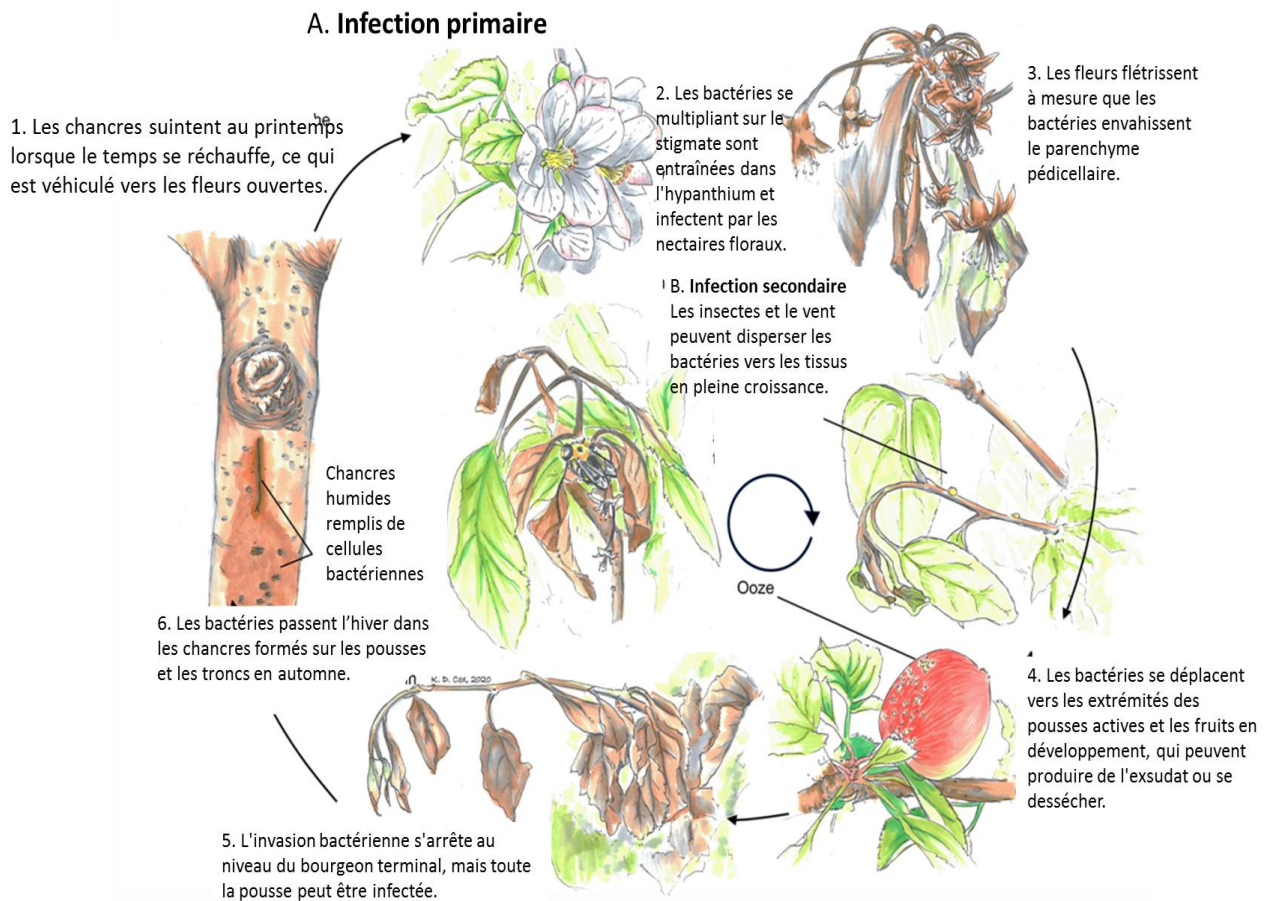


Figure 9 . Étapes du cycle du feu bactérien (Wallis *et al.*, 2020).

## 1.5 Impacts économiques du feu bactérien

### 1.5.1 Impacts économiques directs sur les vergers

Les coûts associés à l'élimination des arbres infectés par le feu bactérien varient entre 67 dollars américains et 2 134 dollars par hectare, tandis que les mesures préventives annuelles peuvent coûter entre 527 et 1 354 dollars par hectare (**Barlow, 2024**). Cependant, il est difficile d'estimer l'impact économique global du feu bactérien, car les pertes ne sont pas toujours documentées lorsqu'elles sont faibles. De plus, l'impact dépend de la gravité de l'épidémie, une épidémie pouvant avoir des effets pendant plusieurs années et entraîner des pertes de rendement dans les vergers infectés pouvant varier entre 60 % et 90 % (**Sălceanu et al., 2023 ; Vanneste, 2000**).

### **1.5.2 Impacts économiques à l'échelle mondiale**

Le feu bactérien a entraîné des pertes importantes à l'échelle mondiale ces dernières années, et son importance économique devrait augmenter chaque année, passant de 500 millions de dollars en 2018 à 800 millions de dollars en 2022 (**Tableau 1**). Aux États-Unis seulement, les pertes annuelles sont estimées à 100 millions de dollars. Ces pertes incluent des pertes directes dues à la diminution des rendements et de la qualité, ainsi que des pertes indirectes liées aux coûts de gestion et aux interruptions commerciales. Le commerce mondial des fruits à pépins est également considérablement impacté par le feu bactérien (**Norelli et al., 2003 ; Sălceanu et al., 2023**).

En Algérie, les données sur les pertes exactes causées par le feu bactérien ne sont pas encore quantifiées, mais les observations de terrain rapportent des dégâts considérables, notamment dans les principales zones de production. La culture du poirier a été particulièrement affectée.

**Tableau 1.** Pertes économiques causées par le feu bactérien dans l'agriculture des arbres fruitiers à l'échelle mondiale (**Sălceanu et al., 2023**).

<b>Année</b>	<b>Pertes mondiales totales (millions USD)</b>	<b>Nombre de pays affectés</b>	<b>Perte de rendement (%)</b>	<b>Coûts de gestion (millions USD)</b>	<b>Perturbations commerciales (millions USD)</b>
2018	500	25	30	150	50
2019	600	30	35	180	70
2020	700	35	40	210	100
2021	750	40	45	225	120
2022	800	45	50	240	150

## 2 *Erwinia amylovora*

*E. amylovora* est classée parmi les dix principales bactéries phytopathogènes. En 1882, Thomas Burrill a utilisé les postulats de Koch pour prouver que la maladie du feu bactérien était causée par une bactérie, qu'il a nommée *Micrococcus amylovorus*, sous l'hypothèse erronée que le pathogène hydrolyse l'amidon (*amylum*). Cette découverte a marqué la première description d'un pathogène bactérien des plantes. En 1889, Trevisan l'a reclassée en *Bacillus amylovorus*. Au début des années 1900, elle a été renommée *Erwinia amylovora* par Winslow *et al.* (Mansfield *et al.*, 2012 ; Zhao, 2014)

### 2.1 Taxonomie et caractéristiques générales

#### 2.1.1 Genre *Erwinia*

Le genre *Erwinia* (Domaine : *Bacteria* ; Phylum : *Pseudomonadota* ; Classe : *Gammaproteobacteria* ; Ordre : *Enterobacterales* ; Famille : *Erwiniaceae*), dont le nom rend hommage au phytopathologiste Erwin Frink Smith, a été initialement créé pour regrouper des bactéries Gram négative, non sporulées, en forme de bâtonnets, mobiles grâce à des flagelles péritriches, à croissance anaérobie facultative, oxydase négative, catalase positive et capables de produire de l'acide à partir du glucose, du fructose et du galactose. Ces bactéries sont écologiquement associées aux plantes en tant qu'épiphytes, saprophytes ou pathogènes. *E. amylovora* est l'espèce type de ce genre (Paulin, 2000 ; Zhao, 2014).

Cependant, cette définition originale présente certaines limitations évidentes et a conduit à un regroupement quelque peu artificiel de microorganismes qui ne sont pas nécessairement génétiquement ou phylogénétiquement proches. Les reclassifications sont principalement basées sur des normes taxonomiques telles que les caractéristiques microbiologiques, le taux d'hybridation ADN/ADN et les séquences d'ARNr 16S. Cette approche a entraîné le reclassement de nombreuses espèces, autrefois incluses dans le genre *Erwinia*, dans de nouveaux genres tels que *Brenneria*, *Pantoea*, *Dickeya* et *Pectobacterium* (Kube *et al.*, 2008).

Le genre *Pantoea* est le plus proche du genre *Erwinia*. En effet, *Erwinia* et *Pantoea* semblent partager un ancêtre commun, tandis que les genres *Brenneria*, *Pectobacterium* et *Dickeya*, ainsi

que d'autres genres d'entérobactéries, proviennent de lignées différentes de celles de *Pantoea* et *Erwinia* (Smits *et al.*, 2011).

Selon la base de données taxonomique LPSN (LPSN, 2026), le genre *Erwinia* comprend actuellement 22 espèces valides, bien que ce nombre puisse évoluer en fonction des révisions taxonomiques récentes, parmi lesquelles plusieurs sont signalées comme pathogènes des arbres fruitiers à pépins, telles que *Erwinia pyrifoliae* (Kim *et al.*, 1999), *Erwinia piriflorinigrans* (López *et al.*, 2011), *Erwinia uzenensis* (Matsuura *et al.*, 2012) et *Erwinia amylovora*, responsables de la nécrose des fleurs et du feu bactérien. En outre, *Erwinia billingiae* et *Erwinia tasmaniensis* sont des épiphytes généralement associées aux arbres fruitiers à pépins (Zhao, 2014). *Erwinia psidii*, quant à elle, est un phytopathogène du goyavier commun (*Psidium guajava*) de l'eucalyptus (Hermenegildo *et al.*, 2019).

Bien que les infections humaines causées par *Erwinia* soient rares, plusieurs cas ont été signalés. En 1998, *E. persicina* a été isolée de l'urine d'une femme âgée atteinte d'une infection des voies urinaires et du liquide biliaire d'un patient atteint d'un cholangiocarcinome périhilaire (Ceylan et Özden, 2022 ; O'Hara *et al.*, 1998). En 2008, *E. tasmaniensis* a été impliquée dans une lymphadénite cervicale et isolée de tissus gravement nécrosés (Shin *et al.*, 2008). Récemment, *E. billingiae* a été associée à des infections cutanées, à des bactériémies et à une arthrite septique, souvent en lien avec une exposition à des plantes sauvages (Bonnet *et al.*, 2019 ; Prod'homme *et al.*, 2017). Plus récemment, *E. wuhanensis* a été isolée du sang d'un patient souffrant d'insuffisance rénale chronique après hémodialyse (Zhang *et al.*, 2025).

### 2.1.2 Morphologie des cellules

Les cellules d'*E. amylovora* sont des bâtonnets Gram-négatifs mobiles dotés de flagelles péritriches (Figure 10). Certaines cellules sont entourées d'une capsule visible au microscope, qui peut être épaisse ou fine, et la plupart des cultures montrent un mélange de cellules capsulées et non capsulées. Elles mesurent environ 0,3 µm de largeur et de 1 à 3 µm de longueur, avec une taille variant selon les conditions de croissance. Deux types de cellules sont identifiés : les cellules normales 1,0-2,5 µm et les cellules filamenteuses 7,0-35,0 µm (Paulin, 2000). En conditions de carence en nutriments, certaines cellules deviennent rondes et réduisent leur taille, tandis que d'autres prennent une forme filamenteuse. Des vésicules en forme de flamme apparaissent sur la membrane externe des cellules en carence. La motilité des cellules diminue

en période de carence, bien que les flagelles restent présents (Santander *et al.*, 2014b ; Santander, 2016).



**Figure 10.** Souche CFBP 1430 d'*E. amylovora*, observée en microscopie électronique en transmission (Santander *et al.*, 2014b).

### 2.1.3 Paramètres climatiques et physiologiques pour *E. amylovora*

La température optimale pour la croissance d'*E. amylovora* est de 28 °C, mais elle peut également croître à des températures comprises entre 35 °C et 37 °C. Il a été démontré qu'*E. amylovora* peut être considérée comme un micro-organisme psychrotrophe, capable de se multiplier à des températures basses, autour de 3 °C à 4 °C. Cependant, des températures élevées, supérieures à 45 °C pendant 70 minutes ou 50 °C pendant 50 minutes, peuvent détruire les cellules bactériennes (Keck *et al.*, 1995 ; Santander, 2016 ; van der Zwet et Keil, 1979).

Le pH optimal pour la croissance d'*E. amylovora* se situe entre 6,0 et 7,5, avec une tolérance minimale entre 4,0 et 5,9 et une limite maximale entre 7,6 et 8,8. Par ailleurs, une humidité relative élevée, comprise entre 90 et 95 %, constitue une condition favorable à son développement (van der Zwet et Keil, 1979).

## 2.2 Génome et plasmides

*E. amylovora* possède un chromosome circulaire d'environ 3,81 Mpb, ce qui en fait l'un des plus petits génomes parmi les bactéries phytopathogènes séquencées (**Sebahia et al., 2010 ; Smits et al., 2010**). En comparaison, d'autres pathogènes comme *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (6,1 Mpb) et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* PC1 (4,9 Mpb) ont des génomes beaucoup plus grands (**Parcey et al., 2020**). Il est possible que cette petite taille de génome soit en partie responsable de l'absence d'enzymes de dégradation de la paroi cellulaire et de toxines de faible poids moléculaire, caractéristiques souvent présentes chez d'autres bactéries phytopathogènes (**Mansfield et al., 2012**). Ce génome est constitué à 86 % de séquences codantes et présente une teneur moyenne en G+C de 53,3 % à 53,6 % (**Mann et al., 2013**). Il comprend également des protéines hypothétiques conservées, des éléments mobiles, des pseudogènes, ainsi que des gènes impliqués dans l'enveloppe cellulaire et la transduction du signal (**Sebahia et al., 2010 ; Smits et al., 2010**).

### **2.2.1 Plasmides**

Les plasmides sont essentiels à la diversité génétique d'*E. amylovora*. La variation dans le pan-génome de cette bactérie est en grande partie due aux phénomènes de perte et d'acquisition de plasmides (**Llop et al., 2011 ; Llop et al., 2012**).

#### **2.2.1.1 pEA29**

Le plasmide pEA29 est un élément génétique largement répandu parmi les souches d'*E. amylovora*, à l'exception de quelques isolats provenant d'Égypte, d'Iran, d'Espagne et des États-Unis (**Llop et al., 2008 ; Mohammadi et al., 2009**). Sa distribution géographique correspond à celle d'*E. amylovora*. Sa taille varie entre 27,6 et 34,9 kb, avec une plus grande diversité observée chez les souches infectant les espèces de *Rubus*. La séquence complète de pEA29 dans la souche Ea88 mesure 28 185 pb et présente une teneur en G+C de 50,2 %. Cette variation de taille résulte de délétions et d'insertions. Le plasmide contient treize cadres de lecture ouverts (ORF) qui codent pour des protéines similaires à celles d'autres bactéries, ainsi que des gènes associés à diverses fonctions comme la biosynthèse de la thiamine, le transport de la choline et la chimioréception. Une origine de répllication de type thêta a également été identifiée (**McGhee et Jones, 2000**).

#### **2.2.1.2 pEL60**

Le plasmide pEL60 de 60 145 pb avec une teneur en G+C de 51,5 %, il a été identifié dans des souches d'*E. amylovora* isolées au Liban. Il partage une grande similarité avec le plasmide pCTX-M3 de *Citrobacter freundii*, bien que ce dernier soit plus grand en raison de gènes supplémentaires de résistance aux antibiotiques. pEL60 contient des gènes pour la réplication, le transfert conjuguatif, et un système de réparation de l'ADN de type *mucAB*, qui pourrait aider à la survie d'*E. amylovora* sur les plantes en conférant une tolérance aux radiations UV (**Foster et al., 2004 ; Llop et al., 2012**).

#### **2.2.1.3 pEU30**

Le plasmide pEU30 a une taille de 30 314 pb avec une teneur en G+C de 48,2 %. Il a été détecté dans 41 % des souches d'*E. amylovora* provenant de Washington, Utah et Oregon, aux États-Unis. Ce plasmide possède 25 ORFs principalement associés à la réplication, au maintien et au transfert conjuguatif, avec cinq ORFs codant pour des régulateurs transcriptionnels, une perméase de cytosine et une acétyltransférase. Bien que le contenu génétique de pEU30 soit comparable à celui d'autres plasmides de bactéries phytopathogènes, il ne comporte pas de gènes spécifiquement liés à la virulence ou au fitness (**Foster et al., 2004 ; Llop et al., 2012**).

#### **2.2.1.4 pEA72**

Le plasmide pEA72, d'une taille de 71,49 kpb, a été décrit pour la première fois par **Sebaihia et al. (2010)** et est l'un des plus courants dans les collections des États-Unis (**Parcey et al., 2020 ; Zeng et al., 2018**). Ce plasmide présente une similitude dans ses 5 500 premiers nucléotides avec le plasmide pEU30. Il renferme 87 séquences codantes (CDS), dont 41 % codent pour des gènes de transfert conjuguatif, similaires à ceux retrouvés chez d'autres entérobactéries. Environ 33 % des CDS sont des protéines hypothétiques sans fonction connue et sans correspondance dans les bases de données actuelles, tandis que 13 % sont impliquées dans des fonctions critiques telles que la réplication et la stabilité du plasmide. De plus, pEA72 inclut deux CDS mobiles ou liés à des phages, ainsi qu'un pseudogène, ce qui pourrait indiquer une origine évolutive complexe ou un potentiel de mobilité génétique (**Bocsanczy et al., 2008**). Il est également supposé contenir un système de sécrétion de type IV (T4SS) (**Parcey et al., 2020**).

#### **2.2.1.5 pEI70**

Détecté pour la première fois dans des souches espagnoles d'*E. amylovora*, ce plasmide conjugatif est répandu dans 11 pays européens, où il est présent dans 5 à 92 % des souches, selon la région. Il accélère de manière significative le développement des symptômes lorsqu'il est introduit dans des souches de faible virulence. L'analyse de séquence révèle une longueur totale de 65 840 paires de bases avec une teneur en G+C de 52,2 %, montrant plus de 98 % d'identité de séquence avec le plasmide pEB102 d'*E. billingiae*, en particulier pour la protéine RepA, suggérant une origine commune. Le plasmide contient également un élément conjugatif intégrant (ICE) qui semble rester extracromosomique, incapable de s'intégrer dans le chromosome d'*E. amylovora*. Le rôle précis de ce plasmide dans l'amélioration du fitness bactérienne n'est pas encore entièrement compris (Llop *et al.*, 2011 ; Llop *et al.*, 2012).

#### **2.2.1.6 pEA34**

Le plasmide pEA34, de 34 kb, joue un rôle clé dans la résistance à la streptomycine chez *E. amylovora*. Il est présumé avoir été transféré depuis *Pantoea agglomerans*. Ce plasmide, détecté exclusivement dans des souches du Michigan et de Californie, abrite le transposon Tn5393, qui code pour les gènes *strA* et *strB*, responsables de la résistance à la streptomycine. Il est supposé que Tn5393 était initialement intégré dans pEa34 avant d'être transféré au plasmide pEA29 (Chiou et Jones, 1993 ; Förster *et al.*, 2015 ; McGhee et Jones, 2000).

#### **2.2.1.7 pEA78**

Le plasmide pEA78 (78 740 pb) a été détecté pour la première fois dans la souche LA637 du Mexique, puis identifié dans CA3R isolé en Californie. Ce plasmide est supposé contenir un système de sécrétion de type IV (T4SS) (Parcey *et al.*, 2020 ; Smits *et al.*, 2014).

#### **2.2.1.8 pEA68**

Le plasmide pEA68 est un plasmide circulaire de 68 763 pb avec une teneur en G+C de 60,39 %, suggérant une origine étrangère. Il contient 79 CDS prédites, y compris un système de répllication de type IncFIIa- *repA*, une relaxase MobA de la famille MOB<sub>P13</sub>, ainsi qu'un système de sécrétion de type IV et des gènes *tra* pour le transfert conjugal. pEA68 ne contient aucun gène associé à la résistance aux antibiotiques ou à la virulence, et son élimination n'a pas d'impact physiologique (Ismail *et al.*, 2014).

### 2.2.1.9 Autres plasmides

Le plasmide pEA8.7, d'environ 9 kb, a été découvert lors d'une étude en Californie et contient les gènes de résistance *strA-strB*, similaires à ceux du plasmide pEA34. Cependant, il est étroitement associé au plasmide à large spectre d'hôte RSF1010. D'autres petits plasmides, tels que pEA1.7, ont été observés dans diverses souches d'*E. amylovora*, montrant des similarités partielles avec des plasmides connus, mais leur caractérisation est encore incomplète (**Llop et al., 2012**).

Quatre autres petits plasmides inédits ont été récemment découverts : pEA2.9, pEA4.0, pEA5.8 et pEA6.0, dont les fonctions restent principalement hypothétiques. Le plasmide pEA6.0 pourrait conférer une résistance aux bactériophages (**Parcey et al., 2020**). Par ailleurs, pEA2.8 a été identifié dans *E. amylovora* isolé de *Rubus* et contient un gène codant pour une  $\beta$ -lactamase, conférant une résistance à l'ampicilline (**Llop et al., 2012**). De nouvelles découvertes ont également révélé des plasmides tels que pEAR27, pEAR28 et pEAR35 dans les isolats de *Rubus*. Tous ces plasmides codent pour des protéines T4SS, bien que leur homologie avec les T4SS connus soit partielle (**Parcey et al., 2020**).

## 2.3 Mécanismes de résistance

Deux mécanismes de résistance à la streptomycine ont été décrits chez *E. amylovora*

### 2.3.1 Résistance déterminée par le chromosome

Une mutation spontanée du gène chromosomique *rpsL*, qui code pour une protéine ribosomique, constitue le mécanisme le plus courant et la forme de résistance la plus élevée à la streptomycine. Ce phénomène a été signalé aux États-Unis, au Moyen-Orient et en Nouvelle-Zélande. Cette mutation empêche la fixation de la streptomycine sur la sous-unité ribosomique 30S, ce qui rend la bactérie résistante à cet antibiotique (**Förster et al., 2015 ; Stockwell et Duffy, 2012**).

### 2.3.2 Résistance déterminée par des plasmides/transposons

La résistance acquise à la streptomycine chez *E. amylovora* est liée à des plasmides portant l'élément transposable de 6,7 kb, Tn5393, qui contient les gènes *strA-strB*. Ces gènes codent pour des phosphotransférases aminoglycosidiques capables de modifier la streptomycine en une

forme non toxique. Cette résistance intermédiaire est observée à une incidence relativement faible chez les isolats d'*E. amylovora* provenant des vergers de pommiers et de poiriers aux États-Unis (Förster *et al.*, 2015 ; Stockwell et Duffy, 2012).

Les gènes *strA-strB* et le transposon Tn5393 sont largement répartis parmi les bactéries pathogènes à Gram négatif qui affectent les humains, les animaux et les plantes, ainsi que parmi les bactéries environnementales. Les souches d'*E. amylovora* peuvent échanger du matériel génétique avec d'autres bactéries dans les environnements de vergers. Ces transposons peuvent s'insérer dans divers plasmides, notamment pEU30, pEA29 et pEA34, pEA8.7 ainsi que dans le chromosome bactérien (Förster *et al.*, 2015 ; Stockwell et Duffy, 2012).

## **2.4 Méthodes de détection**

Il existe plusieurs méthodes approuvées par l'EPPO pour la détection d'*E. amylovora* (EPPO, 2022). Pour valider l'identification, au moins deux protocoles doivent être utilisés. Si deux tests moléculaires sont réalisés, les séquences ciblées doivent être différentes.

### **2.4.1 PCR**

Parmi les protocoles de PCR conventionnelle utilisés pour la détection d'*E. amylovora*, celui développé par Taylor *et al.* (2001) s'est révélé être le plus adapté pour différencier *E. amylovora* de toutes les autres bactéries testées, tant dans le matériel végétal que pour l'identification d'*E. amylovora* dans des colonies bactériennes pures (EPPO, 2022 ; Powney *et al.*, 2011).

L'EPPO a également approuvé deux tests de PCR en temps réel publiés (Gottsberger, 2010 ; Pirc *et al.*, 2009).

### **2.4.2 LAMP**

La technique d'amplification isotherme par boucle (LAMP) est recommandée pour le diagnostic du feu bactérien sur site en raison de sa rapidité, de son exactitude et de son faible coût. De plus, elle ne nécessite pas de thermocycleur sur le terrain (Shin *et al.*, 2018).

### **2.4.3 Tests sérologiques**

#### **2.4.3.1 Agglutination**

L'agglutination est un test simple qui donne généralement des résultats satisfaisants. Les colonies suspectes d'*E. amylovora* peuvent être agglutinées sur une lame avec une goutte de tampon et un antisérum spécifique à *E. amylovora* (EPPO, 2022 ; Paulin, 2000).

#### **2.4.3.2 Test d'immunofluorescence**

L'immunofluorescence est une méthode courante pour identifier *E. amylovora* dans les cultures pures ou dans les extraits d'échantillons végétaux. Pour la détection d'*E. amylovora*, un microscope à épifluorescence est utilisé pour observer directement des cellules bactériennes spécifiquement marquées avec un anticorps conjugué contenant un colorant fluorescent (EPPO, 2009 ; EPPO, 2024).

#### **2.4.3.3 ELISA**

L'ELISA est une méthode très sensible et spécifique pour détecter *E. amylovora* dans des cultures pures ainsi que dans des matériaux végétaux naturellement infectés, et elle est particulièrement utile pour traiter un grand nombre d'échantillons à faible coût et sans équipement coûteux (Gorris *et al.*, 1996).

Pour éviter les réactions croisées, il est conseillé d'utiliser un kit commercial complet, spécifique et vérifié pour l'enrichissement DASI-ELISA, basé sur des anticorps polyclonaux et monoclonaux (3B + 5H IVIA), qui contient un tampon d'extraction et un milieu semi-sélectif (EPPO, 2024).

#### **2.4.4 Autres techniques**

La séquence du gène *recA* et l'analyse protéomique utilisant une spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF) sont également approuvées par l'EPPO. Cependant, il existe d'autres techniques connues pour l'identification d'*E. amylovora*, comme les tests biochimiques par le système API (BioMérieux), le système d'identification automatisé Biolog, et le profilage des acides gras (EPPO, 2024).

### **2.5 Méthodes d'analyse de la diversité génétique**

*E. amylovora* est une espèce génétiquement homogène par rapport à d'autres bactéries phytopathogènes telles que *Pseudomonas syringae* ou *Xanthomonas campestris*. Cependant,

les progrès des techniques moléculaires ont considérablement amélioré notre compréhension de la diversité génétique parmi les souches d'*E. amylovora* (Momol et Aldwinckle, 2000).

### **2.5.1 Rep-PCR**

Le principe de cette méthode repose sur l'amplification de l'ADN située entre des éléments répétitifs adjacents en utilisant des amorces visant des séquences répétitives conservées. Les souches isolées à partir de la sous-famille *Amygdaloideae* étaient génétiquement très similaires et 87 % d'entre elles avaient une empreinte génétique tout en ayant une similarité génétique située entre 96 et 99 %. Les souches des *Rubus* spp. révélaient plus de diversité génétique que les souches des autres arbres fruitiers avec des coefficients de similarité situés entre 89 et 97 %. Cela a permis de distinguer efficacement les souches qui infectent les *Amygdaloideae* des de celles des *Rubus* (McManus et Jones, 1995).

### **2.5.2 PCR ribotypage**

Cette technique permet la différenciation des souches d'*E. amylovora* sur la base des profils d'amplification de la région intergénique 16S-23S de l'opéron *rrn*. Elle a permis la distinction de quatre ribotypes. Le ribotype PCR était prédominant parmi les isolats d'arbres fruitiers de Nouvelle-Zélande, de l'Est et de l'Ouest de l'Amérique du Nord. Les ribotypes PCR 2 et 3 ont été trouvés dans les souches isolées à l'Ouest de l'Amérique du Nord, tandis que le ribotype PCR 4 a été détecté uniquement chez *Rubus* spp. (McManus et Jones, 1995).

### **2.5.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

La technique RFLP a permis de distinguer différentes souches d'*E. amylovora* en se basant sur des variations dans le gène *hrpN* et la région *dspA/E*. La digestion du gène *hrpN* avec l'enzyme *RsaI* a montré que les souches de *Rubus* spp. et d'*Amelanchier* sp. avaient un fragment d'ADN 60 pb plus court que celui des autres souches. Cela était dû à l'absence d'une séquence de 60 paires de bases dans la région non codante en aval du gène *hrpN*. D'autre part, La digestion d'un fragment de 613 pb de la région *dspA/E* avec *CfoI* a montré des motifs RFLP distincts, qui différencient les souches de *Rubus* spp. et d'*Amelanchier* sp. des autres (Giorgi et Scortichini, 2005).

#### **2.5.4 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**

L'analyse RAPD a utilisé six amorces, générant ainsi 98 fragments RAPD. L'analyse a révélé que les souches de la sous-famille *Pomoideae* constituaient un groupe, et celles de *Rubus* en formaient un autre, et un clade bien distinct regroupait les souches de poire asiatique de Hokkaido, au Japon. Des fragments RAPD spécifiques ont permis de différencier clairement les groupes selon l'hôte, la région de Hokkaido, ainsi que les groupes externes (**Momol et al., 1997**).

#### **2.5.5 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

L'AFLP a permis la découverte d'un nombre sans précédent de marqueurs génétiques chez *E. amylovora*. En utilisant quatre amorces, le profilage par PCR a révélé un polymorphisme limité, avec des schémas d'amplification identiques pour 17 souches. Les schémas AFLP combinés ont généré 78 bandes polymorphes (34 % du total des bandes), permettant de distinguer la plupart des souches testées. Cependant, le regroupement des souches dans le dendrogramme généré n'était pas corrélé avec l'hôte, l'année ou le pays d'isolement (**Rico et al., 2004**).

#### **2.5.6 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

La technique PFGE, basée sur la digestion de l'ADN génomique avec l'enzyme de restriction XbaI, suivie d'une électrophorèse en champ pulsé, a permis de séparer les souches européennes d'*E. amylovora* en six groupes génotypiques distincts, nommés Pt1 à Pt6. Cette méthode a aussi mis en lumière un lien entre la diversité génotypique et la distribution géographique des souches européennes, soulignant des différences génétiques entre celles provenant d'Europe de l'Ouest, centrale et du Sud (**Jock et al., 2002 ; Jock et al., 2013**).

L'analyse par PFGE a montré une propagation d'*E. amylovora* en Europe, avec au début une contamination de l'Europe centrale par les souches provenant des îles Britanniques, puis une dissémination indépendante en France, dans la Péninsule Ibérique et en Italie du Nord. D'autres routes claires et distinctes incluent la dissémination de la France occidentale vers le Nord-Est de l'Espagne. Par ailleurs, des voies de propagation de l'Égypte vers l'Asie Mineure et les Balkans ont également été identifiées (**Puławska et Sobiczewski, 2012**).

### 2.5.7 Multiple- Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

Variable Number Tandem Repeats (VNTRs) sont des répétitions en tandem de plus de cinq paires de bases. **Bühlmann et al. (2014)** ont sélectionné six paires d'amorces pour le développement de la MLVA spécifique à *E. amylovora*. Les amorces ciblaient deux loci sur le plasmide pEA29 et quatre loci sur l'ADN chromosomique. La MLVA a permis de différencier 227 haplotypes parmi une collection de 833 isolats provenant d'origines mondiales en utilisant l'électrophorèse capillaire. Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre les différences génétiques et l'origine géographique (**Bühlmann et al., 2014**).

### 2.5.8 CRISPR

Les séquences courtes palindromiques régulièrement espacées et groupées, ou CRISPR, sont des répétitions de 25 à 50 paires de bases, séparées par des espaces de séquences distinctes de longueur comparable (ou espaceurs), présentes dans les génomes des bactéries et des archées. L'exposition des bactéries à des séquences étrangères, qu'elles soient chromosomiques ou trouvées dans des éléments génétiques transmissibles comme les plasmides conjugatifs et les bactériophages, sont à l'origine des espaceurs CRISPR qui fournissent un système immunitaire adaptatif contre l'ADN envahissant (**Mojica et al., 2005**).

L'ajout de nouveaux espaceurs et la variation du nombre et du type d'unités CRISPR entre les souches fournissent un outil de typage précieux ainsi qu'un moyen pour tracer l'historique des expositions aux phages et plasmides au sein d'une espèce (**Rezzonico et al., 2011**). Le génome d'*E. amylovora* contient trois régions répétées CRISPR afin d'analyser ces régions **McGhee et Sundin (2012)** ainsi que **Rezzonico et al. (2011)** ont développé des amorces spécifiques pour amplifier et séquencer chaque région parmi les 3 régions CRISPR. Cette technique a fourni des informations sur la variation génétique des souches d'*E. amylovora* en fonction l'origine géographique de leur isolement, de leur gamme d'hôtes, de leur contenu plasmidique et de leur sensibilité/résistance à la streptomycine.

### 2.5.9 Séquençage complet du génome

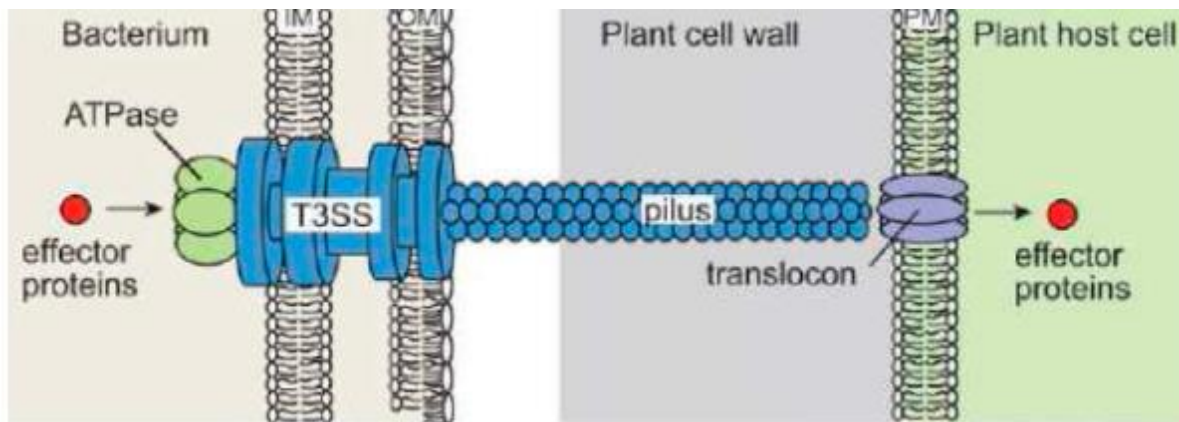
La première étude qui a employé le séquençage complet du génome a utilisé un nombre réduit de souches d'*E. amylovora* et a révélé qu'*E. amylovora* possède un core génome hautement conservé (**Mann et al., 2013**). Cependant, cinq ans plus tard, avec une collection plus large de souches, **Zeng et al. (2018)** ont constaté que la diversité génétique était 30 fois plus élevée que

celle estimée précédemment. De plus, ils ont pu diviser les souches infectant les *Amygdaloideae* en quatre clades distincts selon leur origine géographique.

## 2.6 Facteurs de virulence

### 2.6.1 Systèmes de sécrétion de type III (T3SS)

*E. amylovora*, comme de nombreuses bactéries Gram-négatives, utilise le système de sécrétion type III (T3SS) conservé au cours de l'évolution pour contourner et coloniser son organisme hôte respectifs, Le T3SS est méticuleusement construit de manière similaire à une nanomachine de forme cylindrique organisée en une série de structures en forme d'anneaux avec des anneaux intérieurs, des anneaux extérieurs et une structure de col (**Figure 11**). Il est intégré dans la membrane interne et externe de la bactérie, tout en s'étendant sur la membrane périplasmique et dans l'environnement extracellulaire avec un filament pilus (**McCann et Guttman, 2008 ; Piqué et al., 2015 ; Schraidt et Marlovits, 2011 ; Vrancken et al., 2013**).



**Figure 11.** Système de sécrétion de type III (T3SS) chez les bactéries phytopathogènes (**Piqué et al., 2015**).

Il injecte directement des protéines effectrices dans le cytosol des cellules hôtes, permettant la manipulation des activités cellulaires de l'hôte au profit du pathogène, ce qui favorise ainsi la colonisation, la multiplication et la virulence globale des agents pathogènes envahissants dans l'hôte (**Yuan et al., 2021a**).

Le T3SS d'*E. amylovora* sécrète diverses protéines, comprend cinq effecteurs principaux (DspA/E, Eop1, Eop3, Eop4 ou AvrRpt2Ea, et HopPtoCEa), ainsi que deux harpins (HrpN et HrpW) (Zhao *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2006).

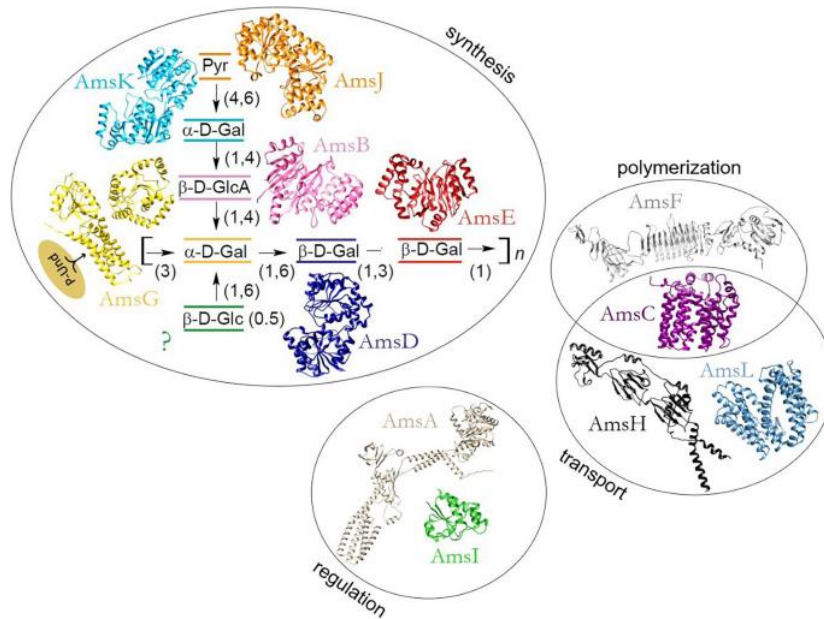
Ce système est codé par le groupe de gènes *hrp*, lequel est essentiel pour déclencher une réponse hypersensible (HR) chez les plantes non hôtes et pour provoquer des maladies chez les plantes hôtes sensibles (Oh et Beer, 2005).

## **2.6.2 Exopolysaccharides**

*E. amylovora* synthétise deux principaux exopolysaccharides (EPS) connus sous les noms d'amylovoran et de levane. Ces composés jouent un rôle important dans la manifestation des symptômes du feu bactérien et dans l'expression de la virulence (Piqué *et al.*, 2015). Leur importance réside dans leur capacité à éviter les mécanismes de défense des plantes hôtes en formant une capsule protectrice autour des cellules bactériennes. Cette enveloppe offre aussi une protection contre la perte d'eau et de nutriments dans des environnements arides (Langlotz *et al.*, 2011). Les EPS contribuent également à la formation de biofilms à l'intérieur de la plante et perturbent le xylème de l'hôte en provoquant des obstructions qui entravent le flux d'eau (Kharadi *et al.*, 2021 ; Koczan *et al.*, 2009).

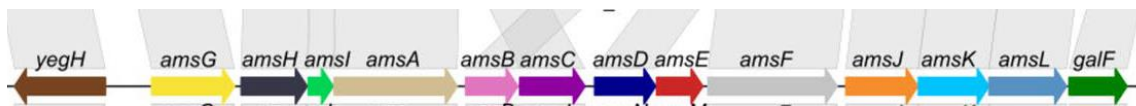
### **2.6.2.1 Amylovoran**

L'amylovoran est le principal constituant de l'ooze bactérien présent dans l'exsudat des plantes infectées, et il est strictement nécessaire à la virulence. En effet, les mutants d'*E. amylovora* qui ne produisent pas d'amylovoran sont non pathogènes (Maes *et al.*, 2001). Il est composé d'une longue répétition d'unités d'hétéropolysaccharides (Figure 12) comprenant des résidus de galactose, de glucose et de pyruvate (Nimtz *et al.*, 1996).



**Figure 12.** Le processus de biosynthèse de l’amylovoran (Carlini *et al.*, 2023).

La biosynthèse de l’amylovoran est régulée par l’opéron *ams*, composé de 12 gènes (Figure 13), d’*amsA* à *amsL* (Bugert et Geider, 1995).

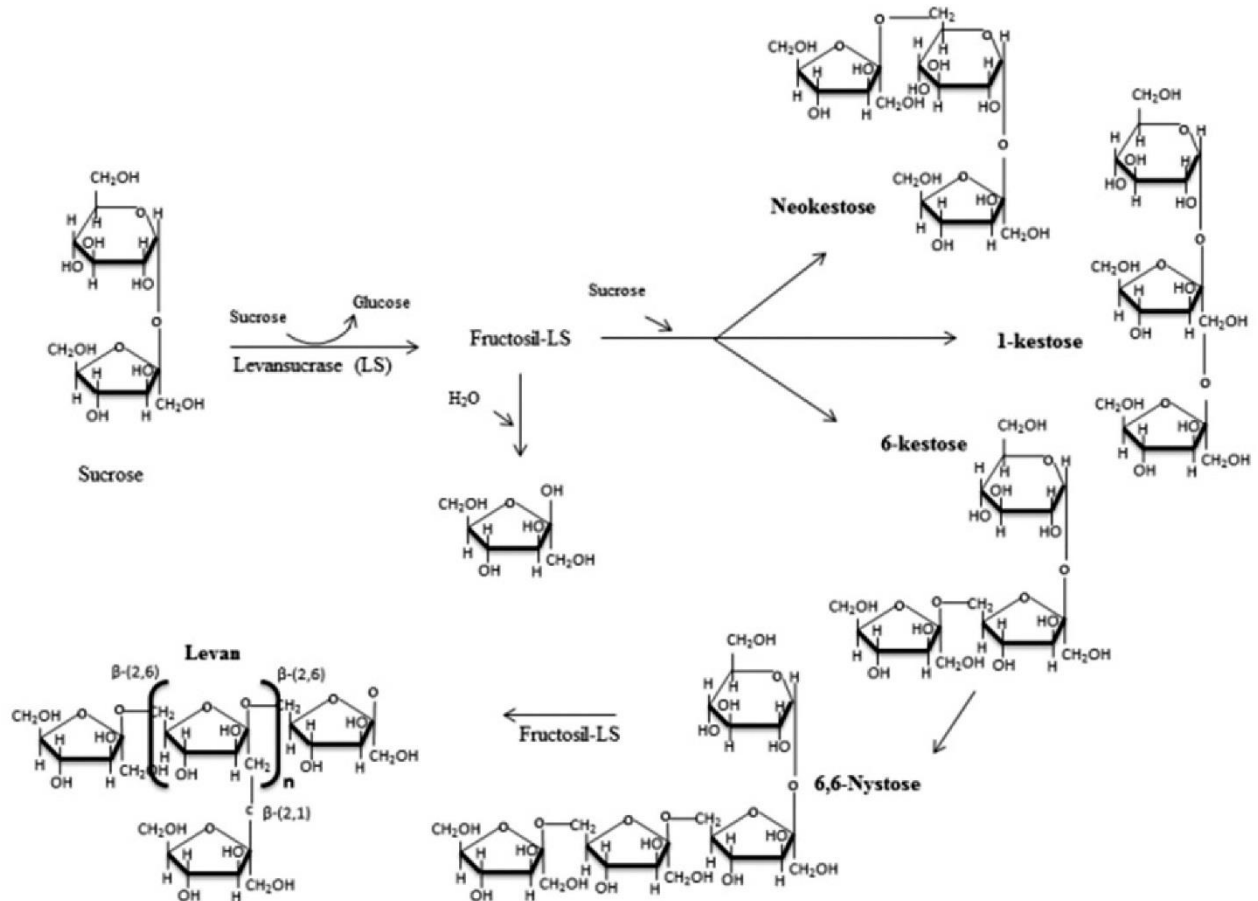


**Figure 13.** Cartes génétiques de l’opéron *ams* (Carlini *et al.*, 2023).

### 2.6.2.2 Levane

Le levane est un homopolymère simple de fructose qui peut être facilement synthétisé extracellulairement par l’enzyme lévansucrase, codée par le gène *lsc* (Figure 14). Cette enzyme polymérise les résidus de fructose issus du saccharose généré par les plantes hôtes (Geier et Geider, 1993). Étant donné que les plantes produisent des quantités significatives de saccharose pendant la photosynthèse et l’utilisent comme sucre de transport, *E. amylovora* peut facilement trouver un substrat pour la synthèse du levane (Geider, 2000). Le levane protège la bactérie contre les mécanismes de défense des plantes. Par conséquent, les mutants déficients en

production de levane présentent une réduction de la virulence (**Geier et Geider, 1993 ; Koczan et al., 2009**).



**Figure 14.** La voie de biosynthèse du levane par la lévansucrase (**Bersaneti et al., 2019**).

### 2.6.3 Formation du biofilm

La formation de biofilm est un facteur de virulence important contribuant à la colonisation réussie de l'hôte. Cependant, elle est un trait complexe régulé par plusieurs facteurs, notamment la synthèse d'exopolysaccharides, l'attachement et la motilité (**Koczan et al., 2011 ; Piqué et al., 2015 ; Schachterle, 2019**). Ces facteurs orchestrent une séquence d'actions régulatrices bien organisées, qui sont divisées en quatre étapes : invasion précoce du xylème, attachement aux vaisseaux du xylème, formation du biofilm et détachement pour la réinfection (**Kharadi et Sundin, 2021**).

Initialement, *E. amylovora* pénètre à travers des lésions des tissus, ce qui permet aux cellules bactériennes d'entrer directement dans le xylème. Par la suite, les bactéries traversent l'apoplaste et les tissus parenchymateux entourant le xylème (**Kharadi et Sundin, 2021**). Après l'entrée initiale des cellules d'*E. amylovora* dans le xylème, la détection de surface est assistée par des composants flagellaires spécifiques, ce qui aide à l'attachement aux parois des vaisseaux du xylème, principalement médié par les fimbriae de type I. De plus, les pili de type IV jouent également un rôle important dans le développement du biofilm en favorisant la maturation à l'intérieur du vaisseau du xylème (**Koczan et al., 2011**). Au fur et à mesure que le biofilm mûrit, il obstrue physiquement le flux de sève du xylème. Cet obstacle est crucial car la force mécanique générée par le flux à l'intérieur du vaisseau du xylème agit comme un signal sensoriel clé, favorisant le développement ultérieur du biofilm et facilitant ainsi une diffusion systémique étendue. Par la suite, les bactéries peuvent rapidement se propager et provoquer des symptômes. Cette propagation peut même conduire à l'infection du porte-greffe, entraînant ainsi une progression accrue de la maladie (**Kharadi et Sundin, 2021**).

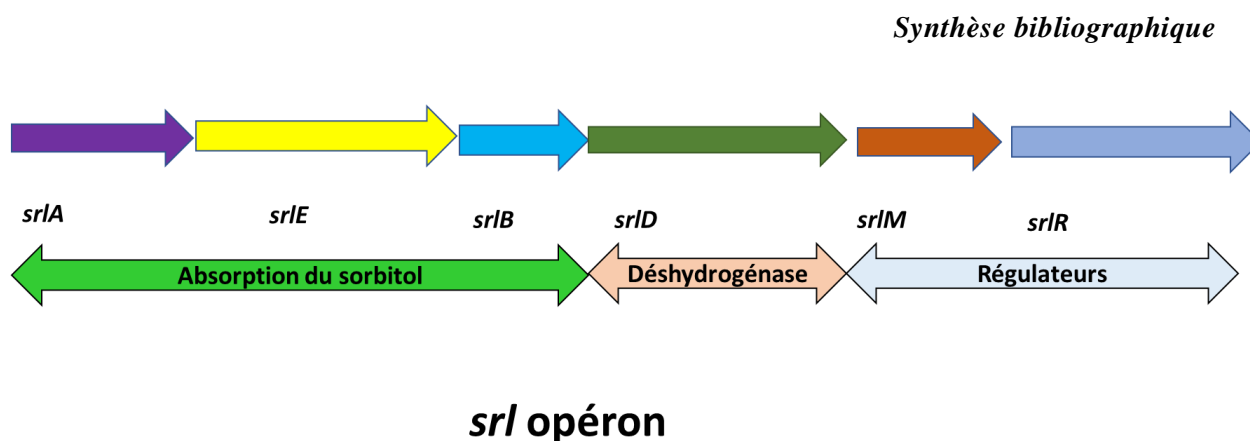
## **2.6.4 Métabolisme des sucres**

### **2.6.4.1 Métabolisme du Sorbitol**

Les Rosacées utilisent le sorbitol pour transporter et stocker les glucides. Ce composé est supposé être un facteur limitant le feu bactérien aux membres de la famille des Rosacées. Par ailleurs, le sorbitol constitue une source de carbone essentielle pour *E. amylovora* dans la synthèse de l'amylovoran (**Geider, 2000 ; Palacio-Bielsa et al., 2012**).

Il existe six gènes du métabolisme du sorbitol regroupés dans un opéron *srl* (**Figure 15**). Le gène *srlD* code pour la déshydrogénase, est nécessaire à la formation des symptômes sur les plantules de pommier, tandis que les gènes *srlA*, *srlB* et *srlE* sont requis pour l'absorption du sorbitol. Les deux autres gènes, *srlM* et *srlR*, ont un rôle régulateur. Chez des mutants *srl* d'*E. amylovora*, la perturbation de l'absorption du sorbitol entraîne une perte de pathogénicité chez les plantules de pommier (**Geider, 2000 ; Palacio-Bielsa et al., 2012**).

L'absence de l'opéron de sorbitol chez les souches qui infectent le *Rubus* a été proposée comme un trait clé distinguant ces souches de celles qui infectent les *Spiraeoideae* (**Borruso et al., 2017**).



**Figure 15.** Cartes génétiques de l'opéron du sorbitol (Geider, 2000).

#### 2.6.4.2 Métabolisme du saccharose

Les Rosacées, comme les autres plantes, utilisent le saccharose comme glucide de stockage et de transport. *E. amylovora* métabolise le saccharose grâce à l'enzyme levansucrase, qui polymérise le levane et libère du glucose à partir du saccharose. Le métabolisme du saccharose chez *E. amylovora* implique cinq ORF correspondant aux gènes *scrA*, *scrB*, *scrK*, *scrY*, et *scrR* regroupés dans un opéron *scr*. Les mutants d'*E. amylovora* présentant des altérations de l'opéron *scr* se révèlent non virulents (Geider et Bogs, 2000 ; Palacio-Bielsa *et al.*, 2012).

#### 2.6.5 Sidérophores

Les fonctions essentielles des sidérophores d'*E. amylovora* sont l'acquisition du fer et la protection des cellules bactériennes contre le stress oxydatif déclenchée par l'hôte lors de l'infection (Dellagi *et al.*, 1999). La nocardamine (desferrioxamine E, DFO-E) est le sidérophore principal produit par *E. amylovora* dans des conditions de carence en fer. DFO-E contribue à la virulence en favorisant la croissance d'*E. amylovora* sur les fleurs et les fruits pendant la phase épiphytique et en induisant une fuite d'électrolytes dans les cellules de l'hôte. De plus, le DFO libre sans fer a démontré la capacité de protéger la bactérie contre des doses létales de peroxyde d'hydrogène (Dellagi *et al.*, 1998 ; Müller *et al.*, 2022).

Le DFO-E est synthétisé à partir de la lysine par trois protéines DfoJ, DfoA et DfoC codées par le cluster de gènes *dfoJAC* (Polsinelli *et al.*, 2019 ; Salomone-Stagni *et al.*, 2018). Dellagi *et al.* (1998) ont révélé que les mutants *dfoA* présentaient une réduction de leur capacité à initier des symptômes nécrotiques et de leur croissance.

### 2.6.6 Flagelles

Pour qu'*E. amylovora* se propage du stigmate de la fleur ou des plaies des feuilles aux plantes et crée des infections, la motilité est essentielle aux premiers stades de l'infection. *E. amylovora* est mobile grâce à des flagelles péritriches. La motilité dépend de la température, du pH et d'autres facteurs environnementaux (**Raymundo et Ries, 1981**). La motilité flagellaire est un facteur de virulence ayant un rôle crucial en permettant aux cellules d'*E. amylovora* de nager à travers le nectar des fleurs pour atteindre les tissus hôtes (**Holtappels et al., 2015 ; Puławska et al., 2017**). Les flagelles peuvent aussi contribuer à la fixation d'*E. amylovora* aux surfaces et à la formation de biofilm (**Koczan et al., 2011**).

### 2.6.7 Lipopolysaccharides (LPS)

En raison de leur emplacement externe, les lipopolysaccharides sont importants pour l'interaction avec l'environnement ainsi qu'avec les hôtes. Les LPS servent de barrière physique qui contribue à la protection des bactéries en empêchant le contact des peptides dérivés de l'hôte avec la membrane phospholipidique (**Papo et Shai, 2005**). D'autres fonctions ont été décrites, notamment le développement de biofilms et la motilité bactérienne (**Beveridge et al., 1997 ; Lu et al., 2018**).

Les lipopolysaccharides peuvent être divisés en trois régions structurales : (i) le lipide A, qui lie le lipopolysaccharide à la membrane externe, (ii) le noyau attaché au lipide A, composé chez *E. amylovora* de glucose, d'heptose, de 3-désoxy-d-L'acide manno-oct-2-ulosonique, l'acide uronique, et les chaînes latérales de polysaccharides relativement courtes, et (iii) la dernière région est l'antigène O (**Raetz et Whitfield, 2002 ; Ray et al., 1986**).

Chez *E. amylovora*, la couche intacte de lipopolysaccharides est importante pour la virulence car elle assure à la fois des fonctions protectrices contre les substances antimicrobiennes produites par les plantes, notamment les espèces réactives de l'oxygène, et éventuellement des fonctions agressives au cours de la pathogenèse. Le mutant *waaL* dépourvu d'antigène O a présenté une virulence et motilité réduites et une augmentation de la sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et à l'antibiotique polymyxine B (**Berry et al., 2009**).

### 2.6.8 Système de sécrétion de type VI (T6SS)

Le génome d'*E. amylovora* contient trois clusters de gènes T6SS, dont T6SS-1 et T6SS-3 forment la machinerie T6SS complète, tandis que T6SS-2 présente une réduction du contenu génétique (Kamber *et al.*, 2017).

Le T6SS d'*E. amylovora* influence la virulence et la compétition bactérienne, probablement en affectant la production d'exopolysaccharides et la progression de la maladie. Il peut également contribuer à l'adaptation, à la formation et à la persistance du pathogène dans divers environnements hôtes (Kamber *et al.*, 2017 ; Tian *et al.*, 2017).

## 2.7 Régulation

### 2.7.1 Régulation du système de sécrétion de type III (T3SS)

Un ensemble d'éléments génétiques et de voies de signalisation régulent l'expression des gènes Hrp-T3SS chez *E. amylovora* (Figure 16), ces gènes sont induits par des conditions environnementales imitant des caractéristiques apoplastiques telles qu'une limitation en nutriments, un pH faible 5,5 et une température basse 18°C (Kharadi *et al.*, 2021 ; Wei *et al.*, 1992 ; Wei *et al.*, 2000).

Le gène *hrpL* est le régulateur clé, qui code pour un facteur sigma alternatif extra-cytoplasmique (ECF), également connu sous le nom de facteur  $\sigma$  HrpL, est au cœur de cette régulation. En se liant à la boîte *hrp* dans les régions promotrices des gènes structuraux et des effecteurs liés au système de sécrétion de type III (T3SS), HrpL stimule la transcription des gènes liés au T3SS (McNally *et al.*, 2012 ; Wei et Beer, 1995).

L'expression de HrpL est régulée à la fois par HrpX/HrpY, un système de transduction à deux composants encodé dans le cluster *hrp/dsp*, et par HrpS, un membre de la famille des protéines de liaison aux activateurs  $\sigma^{54}$ -dépendantes (Castiblanco Mosos, 2016 ; Wei *et al.*, 2000).

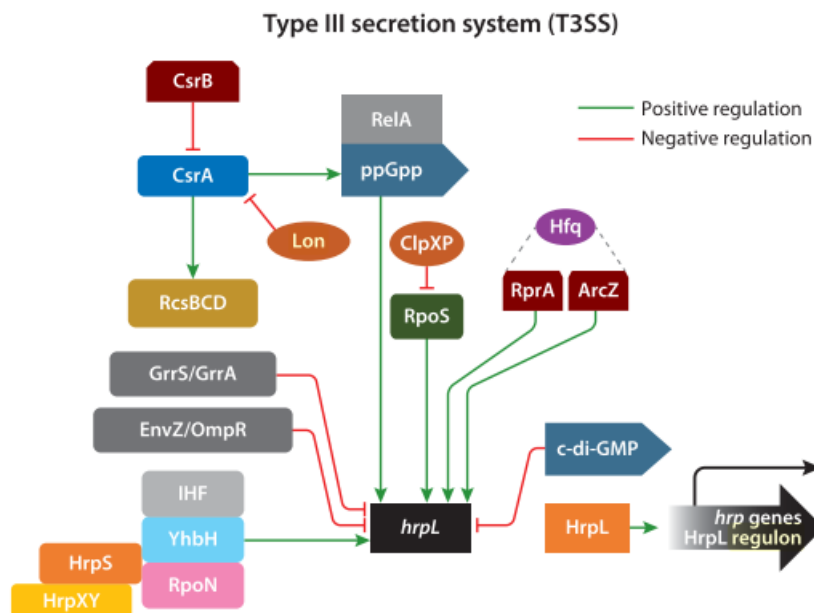
De plus, l'expression de *hrpL* est régulée par la protéine  $\sigma^{54}$  RpoN, son modulateur YhbH, et un facteur hôte d'intégration (IHF) qui permet l'interaction entre les activateurs de transcription RpoN et HrpS. La cascade des facteurs sigma alternatifs RpoN-HrpL est activée par les molécules messagères secondaires guanosine pentaphosphate (pppGpp) et guanosine tétraphosphate (ppGpp), ce qui augmente la production de T3SS et renforce la pathogénicité (Ancona *et al.*, 2015b ; Zhao et Sundin, 2017).

Le régulateur de stockage du carbone (CsrA), une protéine de liaison à l'ARN, régule également positivement l'expression du système de sécrétion de type III d'*E. amylovora* (Ancona *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2019).

La régulation post-transcriptionnelle de la virulence chez *E. amylovora* est également connue pour être régulée positivement par des ARNs tels que ArcZ, qui dépendent du chaperon global d'ARNs Hfq (Zeng *et al.*, 2013 ; Zeng et Sundin, 2014).

Inversement, les systèmes EnvZ/OmpR et GrrS/GrrA (GacS/GacA) agissent comme des régulateurs négatifs du T3SS chez *E. amylovora*. La régulation négative de la virulence médiée par GrrS/GrrA se produit via l'ARN régulateur non codant *csrB/rsmB* ARNs qui se lie à CsrA et neutralise son influence positive sur l'expression génique du T3SS (Ancona *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2014). De plus, la protéine CsrA est susceptible d'être dégradée par Lon, une protéase dépendante de l'ATP (Lee *et al.*, 2018).

De plus, des niveaux élevés de c-di-GMP intracellulaires réduisent considérablement l'expression du gène *hrpL*, soulignant le rôle du c-di-GMP en tant que régulateur négatif du T3SS chez *E. amylovora* (Figure 16) (Zhao et Sundin, 2017).



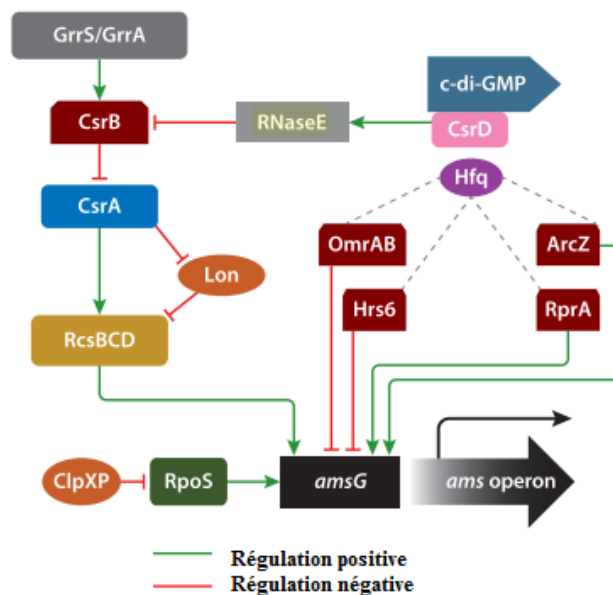
**Figure 16.** Une représentation graphique des composants qui contribuent à la régulation du système de sécrétion de type III chez *E. amylovora* (Kharadi *et al.*, 2021).

### 1.1.1 Régulation de la biosynthèse de l'amylovoran

L'un des régulateurs clés de l'opéron *ams* chez *E. amylovora* est le système à deux composants (TCS) Rcs phosphorelay. Il se compose d'une protéine auxiliaire, RcsA, et de trois protéines centrales, RcsBCD. Pour réguler l'expression des gènes *ams* l'homodimère de RcsB ou à l'hétérodimère RcsA/RcsB se lie à la boîte conservée RcsAB. (Ancona *et al.*, 2015a ; Ancona *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2012b).

Par ailleurs, C-di-GMP se lie à la protéine CsrD, ce qui augmente la dégradation de CsrB médiée par RNaseE et entraîne une transcription élevée d'*amsG*, qui code pour la première protéine de la voie de biosynthèse de l'amylovoran (Kharadi et Sundin, 2022). La transcription d'*amsG* est également positivement régulée par les petits ARN dépendants de Hfq, ArcZ /RprA, le régulateur de transcription de type AraC, YqhC, et CsrA (Ancona *et al.*, 2016 ; Sahebi *et al.*, 2022 ; Zeng et Sundin, 2014).

A l'inverse, les régulateurs négatifs connus de la production d'amylovoran comprennent GrrS/GrrA, EnvZ/OmpR, la protéase Lon ciblant RcsA, le régulateur global H-NS, sous-groupes d'ARNs régulés par Hfq OmrAB/Hrs6 et la protéine orpheline AmyR (YbjN) (Figure 17) (Li *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2012b ; Wang *et al.*, 2012a ; Zeng et Sundin, 2014 ; Zhao *et al.*, 2009).



**Figure 17.** Une représentation graphique des composants qui contribuent à la régulation de la biosynthèse de l'amylovoran chez *E. amylovora* (Kharadi *et al.*, 2021).

### **1.1.2 Régulation de la formation du biofilm**

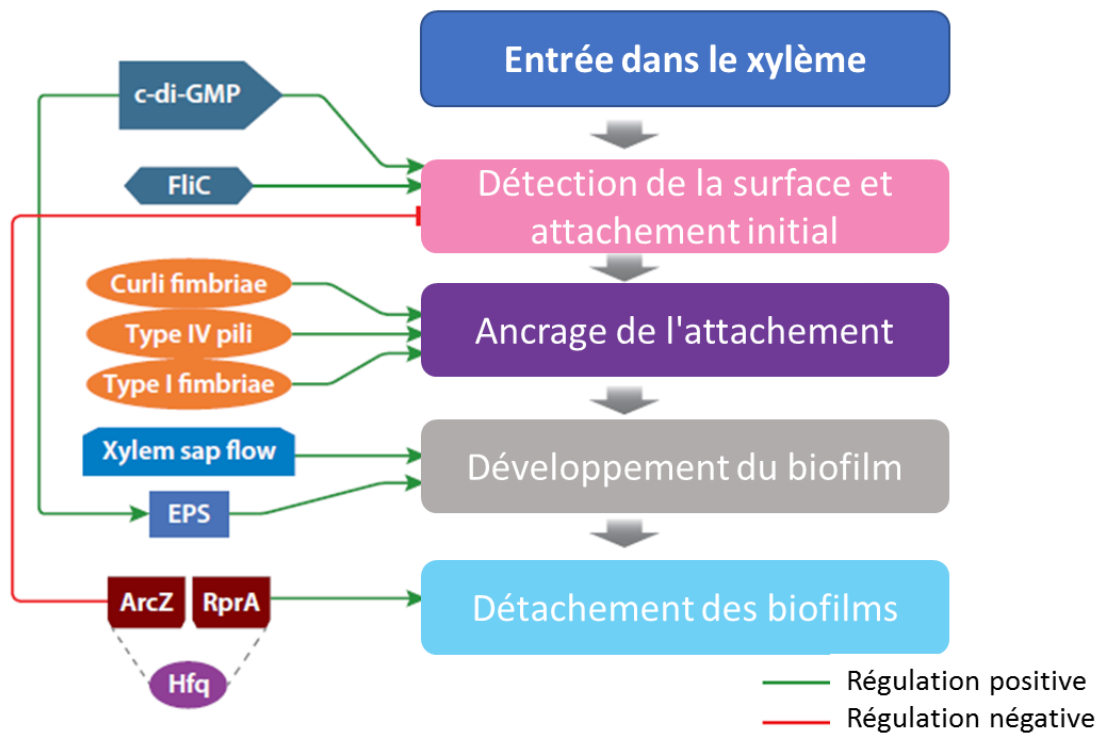
La synthèse de c-di-GMP par les enzymes diguanylate cyclases (EDCs) est essentielle à la formation des biofilms chez *E. amylovora*. Elle peut exercer un impact direct sur ce processus, notamment en ce qui concerne la colonisation du xylème de l'hôte et la détection de surface (**Kharadi et al., 2022a**).

De manière indirecte, des niveaux élevés de c-di-GMP intracellulaire sont associés à une augmentation de la production d'EPS tels que la cellulose et l'amylovoran. Ces composants sont indispensables pour le développement du biofilm tout en inhibant la motilité flagellaire (**Kharadi et al., 2019 ; Kharadi et al., 2022b**).

De plus, le c-di-GMP intracellulaire joue un rôle essentiel dans la biogenèse du pilus de type IV. Ce pilus est nécessaire pour établir le contact initial avec la surface et assurer son ancrage. Cependant, la détection de la surface est initialement assurée par le filament flagellaire (FliC) (**Kharadi et al., 2022a**)

Également, La protéine chaperonne Hfq joue un rôle clé dans la régulation du biofilm. Elle agit à deux niveaux : en contrôlant négativement l'attachement initial aux surfaces solides tout en régulant positivement l'agrégation cellulaire et la maturation du biofilm ( **Zeng et al., 2013**).

Ses ARN non codants dépendants (sARN) sont impliqués dans divers stades de formation du biofilm ( **Kharadi & Sundin, 2021**). Par exemple, ArcZ impacte la production d'exopolysaccharides et la formation de biofilm par son interaction avec la protéine régulatrice sensible à la leucine, Lrp (**Schachterle et Sundin, 2019**). De plus, RprA favorise la dispersion du biofilm en régulant positivement la dissociation des biofilms, réduisant ainsi la formation de biofilm (**Figure 18**) (**Peng et al., 2021**).



**Figure 18.** Une représentation schématique des composants qui contribuent à la régulation de la formation du biofilm chez *E. amylovora* (Kharadi *et al.*, 2021).

### 3 La lutte

#### 3.1 Pratiques culturales

Les premières mesures préventives dans les zones exemptes de feu bactérien consistent à renforcer les inspections et appliquer strictement les règlements phytosanitaires. La stratégie de quarantaine la plus efficace repose sur une application rigoureuse qui interdisant l'importation de fruits, de semences, de greffons et d'autres parties de plantes de la famille des Rosacées qui proviennent de tous pays où le feu bactérien est présent. Le matériel végétal suspect doit être détruit, et la plantation ou la conservation des espèces hôtes doit être interdite afin de prévenir l'établissement et la propagation de la maladie (Duffy *et al.*, 2005 ; van der Zwet et Beer, 1999 ; van der Zwet et Keil, 1979).

Les pratiques culturales jouent un rôle essentiel dans la lutte contre les infections au feu bactérien. Par exemple, éviter de la plantation de pommiers et de poiriers dans le même verger, ainsi que l'utilisation de porte-greffes résistants, contribue à la prévention des maladies des porte-greffes (DuPont *et al.*, 2023b ; van der Zwet et Keil, 1979).

Dans les régions où le feu bactérien vient d'apparaître, les premiers hôtes affectés sont souvent les plantes à croissance vigoureuse et à floraison tardive, comme *Cotoneaster salicifolius*, La destruction rapide de ces plantes peut prévenir de nouvelles infections (**Duffy et al., 2005**).

Lorsque les symptômes du feu bactérien sont visibles dans le verger, la maladie doit être éradiquée dès la saison en cours par l'élimination de tout tissu végétal infecté. Cela implique de couper les tiges à environ 35 cm sous les symptômes visibles. Les jeunes arbres infectés (de la première à la troisième année) doivent être arrachés et détruits (**DuPont et al., 2023b**).

En été, il est important d'éliminer rapidement et régulièrement les branches malades et les fleurs « queue de rat » pour éviter la progression du pathogène. Un bon élagage et la prévention de la floraison hors saison peuvent réduire considérablement l'impact du pathogène (**van der Zwet et Keil, 1979**).

Si le feu bactérien a été présent lors de la saison précédente, la gestion doit se concentrer sur la réduction de l'inoculum bactérien avant la floraison. Une taille approfondie des chancres anciens en hiver et l'application de composés de cuivre peuvent réduire les niveaux d'inoculum. Au printemps, l'irrigation doit être évitée pendant la floraison, et les fleurs dans les jeunes parcelles doivent être retirées pour limiter les points d'infection (**DuPont et al., 2023b**).

## **3.2 Lutte chimique**

### **3.2.1 Cuivre**

La bouillie bordelaise (Sulfate de cuivre) fut le premier composé antibactérien à base de cuivre utilisé en agriculture et reste couramment employée pour la lutte contre les bactéries phytopathogènes, y compris *E. amylovora*. Les composés à base de cuivre représentent un traitement peu coûteux et efficace contre le feu bactérien, en ciblant les bactéries responsables des chancres hivernants. Les ions de cuivre désactivent les protéines et enzymes essentielles, perturbant ainsi le métabolisme bactérien et entraînant la mort cellulaire (**DuPont et al., 2023b ; Lamichhane et al., 2018 ; Psallidas et Tsiantos, 2000**).

Cependant, en raison de sa phytotoxicité, le cuivre peut également endommager les fruits et le feuillage, ce qui limite son utilisation sur les plantes de la famille Rosacées après le stade de pointe verte. Les applications effectuées en période de dormance ou au début de la saison,

notamment au stade de pointe verte après l'éclatement des bourgeons, sont idéales, car elles réduisent les populations bactériennes et minimisent le risque de dommages liés à la rouille des fruits. Toutefois, une application trop précoce peut être inefficace, car les chancres du feu bactérien ne deviennent généralement actifs qu'à l'approche de la floraison (**DuPont et al., 2023a**).

### **3.2.2 Antibiotiques**

#### **3.2.2.1 La streptomycine**

La streptomycine a été le premier antibiotique utilisé en agriculture. Elle a été appliquée pour la première fois en 1955 pour contrôler et gérer le feu bactérien, et elle reste à ce jour l'un des antibiotiques les plus utilisés en agriculture. La streptomycine est largement utilisée dans des pays d'Amérique du nord et en Nouvelle-Zélande. Cependant, elle est interdite dans la plupart des pays européens, son utilisation est strictement réglementée et autorisée uniquement en cas d'urgence en Allemagne, en Autriche et en Suisse (**Stockwell et Duffy, 2012**).

La streptomycine a une action bactéricide, elle se lie de manière irréversible au ribosome bactérien, ciblant spécifiquement la sous-unité 30S. Elle bloque la traduction des ARN messagers, inhibant ainsi la synthèse des protéines (**McManus et al., 2002 ; Stockwell et Duffy, 2012**).

Grâce à son excellente efficacité prouvée à long terme, la streptomycine constitue l'option la plus économique pour lutter contre le feu bactérien. Cependant, l'utilisation de la streptomycine présente des inconvénients, notamment son potentiel à favoriser la sélection de pathogènes bactériens résistants aux antibiotiques dans l'environnement, ce qui peut avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Par ailleurs, deux mécanismes de résistance à la streptomycine ont été identifiés chez *E.amylovora*, posant des défis importants à son efficacité (**McManus et al., 2002 ; Stockwell et Duffy, 2012**).

#### **3.2.2.2 L'oxytétracycline**

L'oxytétracycline est une alternative à la streptomycine, car elle présente un faible risque de développement de résistance. Cependant, quelques isolats d'*E. amylovora* résistants à l'oxytétracycline ont été signalés récemment en Californie (**Stockwell et al., 2008 ; Sundin et al., 2023**).

L'oxytétracycline est bactériostatique, elle empêche la croissance des germes. Pour être efficace, elle doit être appliquée avant les pluies afin d'inhiber le développement d'*E.amylovora* sur les stigmates. De plus, l'oxytétracycline est vulnérable à la dégradation par les rayons UV, et la major partie de son efficacité est perdue un à deux jours après son application (**DuPont et al., 2023b**).

### **3.2.2.3 Kasugamycine**

La kasugamycine est un antibiotique récemment introduit qui cible le ribosome bactérien et offre une efficacité contre le feu bactérien comparable à celle de la streptomycine, ce qui en fait une excellente alternative à long terme, car aucune souche résistante n'a été signalée jusqu'à présent. De plus, cet antibiotique n'est pas utilisé dans les applications en médecine humaine ou vétérinaire. Cependant, Pour l'utilisation efficace de cet antibiotique, il est important de prendre en compte sa sensibilité à la lumière ultraviolette (UV). Une application nocturne et une réduction du pH peuvent contribuer à prolonger son activité résiduelle (**DuPont et al., 2023b ; McGhee et Sundin, 2011 ; Slack et al., 2021**).

## **3.3 Lutte biologique**

La lutte biologique peut être une stratégie viable contre le feu bactérien en tant qu'alternative aux approches chimiques, dans le cadre d'un intérêt croissant pour des méthodes nouvelles, efficaces, et respectueuses de l'environnement, particulièrement en raison du risque élevé de phytotoxicité associé aux traitements à base de cuivre ainsi que de la résistance croissante d'*E.amylovora* et des autres bactéries environnementales aux antibiotiques (**Vanneste, 2011**).

### **3.3.1 Bactéries antagonistes**

L'utilisation de bactéries antagonistes est considérée comme l'une des premières méthodes de lutte biologique contre le feu bactérien. Ces bactéries utilisent divers mécanismes pour réduire l'incidence de la maladie, tels que la compétition pour les nutriments et l'espace et la production d'antibiotiques tels que les pantocine A et B, ainsi que la phénazine (**Pujol et al., 2007 ; Sharifazizi et al., 2017 ; Wright et al., 2001 ; Zeller, 2006**).

Ces processus se déroulent principalement à la surface stigmatique, où la bactérie antagoniste s'établit et développe une population importante, empêchant ainsi l'établissement et la croissance épiphytique d'*E. amylovora*. En réduisant la croissance de la population d'*E. amylovora* sur les surfaces stigmatiques, le risque d'infection florale et de dissémination du pathogène vers les fleurs adjacentes est considérablement diminué (**Johnson et Stockwell, 2000**).

Plusieurs bactéries ont montré une activité antagoniste, telles que *Lactobacillus plantarum*, *Rahnella aquatilis*, *Pantoea vagans*, *Serratia* (**Abo-Elyousr et al., 2010 ; Bahadou et al., 2018 ; Puławska et al., 2023 ; Roselló et al., 2013**). Toutefois, la capacité de *Pseudomonas fluorescens* et *Pantoea agglomerans* à inhiber l'infection florale par *E. amylovora* a été largement étudiée (**Johnson et Stockwell, 2000**).

De nombreuses souches issues de ces espèces ont été développées, commercialisées et introduites dans la pratique. Parmi les exemples notables figurent BlossomBless (*Pantoea agglomerans* P10c), Bloomtime (*Pantoea agglomerans* E325), BlightBan C9-1 (*P. vagans* C9-1), BlightBan A506 (*Pseudomonas fluorescens* A506, USA) et Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) (**Aldwinckle et al., 2002 ; Puławska et al., 2023 ; Vanneste, 2000**). Ces souches ont montré des résultats prometteurs dans la lutte contre le feu bactérien, avec des performances comparables, voire supérieures, à celles de la streptomycine (**Puławska et al., 2023**).

### **3.3.2 Bactériophages**

L'utilisation des bactériophages représente une approche prometteuse pour la lutte contre le feu bactérien en raison de leur capacité à infecter et à lyser les cibles bactériennes, y compris les souches pathogènes résistantes aux antibiotiques ou aux composés cuivreux. Ils ont également la capacité de se déplacer à travers les tissus végétaux. Parce qu'ils n'infectent que les bactéries hôtes, les bactériophages présentent un avantage important par rapport aux traitements traditionnels pour prévenir les dysbioses graves. Ainsi, en préservant le microbiome naturel, l'utilisation des phages protège les organismes bénéfiques ; lorsqu'ils sont utilisés comme biopesticides, ils doivent être non transducteurs et extrêmement virulents. Les phages tempérés sont généralement exclus, car une cellule lysogénisée devient résistante à une superinfection par le même phage (**Gayder et al., 2023**).

Les phages ciblant *E. amylovora* peuvent être isolés à partir de plantes infectées, ainsi que du sol et de l'eau environnants. Certains phages ont pu réduire la gravité du feu bactérien jusqu'à 96 %, La majorité d'entre eux appartiennent aux familles *Myoviridae* et *Podoviridae*. Cependant, les phages *Myoviridae* ont montré une efficacité supérieure pour protéger les fleurs de pommier contre le feu bactérien par rapport aux phages *Podoviridae*. Ces phages sont hautement spécialisés dans le ciblage des hôtes qui produisent de grandes quantités du récepteur EPS ; cependant, en l'absence d'amylovoran, les cellules bactériennes deviennent résistantes aux phages (**Biosca et al., 2024 ; Puławska et al., 2023**).

L'infection d'*E. amylovora* par les phages commence par l'adsorption du phage à la surface bactérienne. Des structures de surface telles que le LPS, la cellulose bactérienne et l'amylovoran ont été identifiées comme des récepteurs principaux des phages. L'adsorption se fait via des fibres de queue ou des protéines de pointe de queue (**Gayder et al., 2023**).

Cependant, l'utilisation des phages sur le terrain est confrontée à plusieurs limites, notamment leur sensibilité aux facteurs de stress environnementaux tels que les fluctuations de température, l'humidité et les rayons UV, ainsi que leur difficulté à survivre sans leurs bactéries hôtes (**Biosca et al., 2024 ; Gayder et al., 2023**).

### **3.4 Sélection pour la résistance au feu bactérien**

L'objectif principal des programmes de sélection est d'améliorer la résistance des plantes afin de limiter les opportunités d'infection par *E. amylovora*. Cependant, l'amélioration de la résistance est un processus long et exigeant en ressources. Elle nécessite plusieurs générations de croisements pour obtenir des variétés résistantes tout en conservant une qualité de fruit commercialement viable. En plus, à cause de la forte sensibilité de la plupart des cultivars de pommiers commerciaux, les principales sources de résistance proviennent d'espèces sauvages aux fruits de faible qualité. Cependant, Ces espèces possèdent des génotypes hautement résistants qui peuvent être utilisés comme plantes parentales dans les programmes de sélection (**Kellerhals et al., 2017 ; Peil et al., 2009 ; Peil et al., 2021**).

## CHAPITRE II

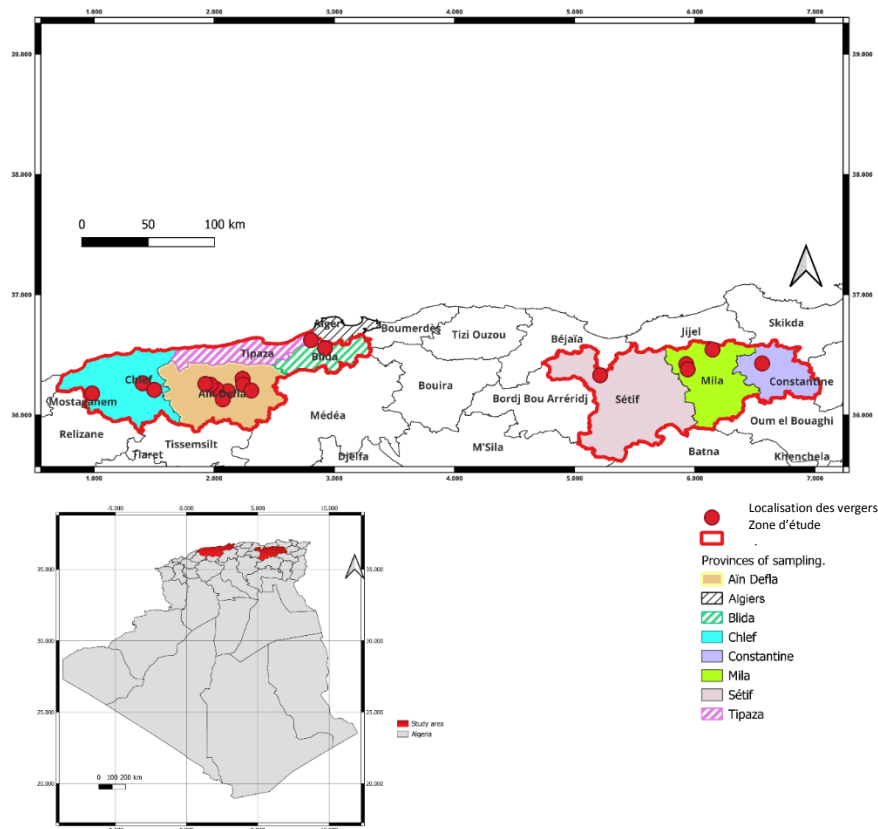
### MATERIEL ET METHODES

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

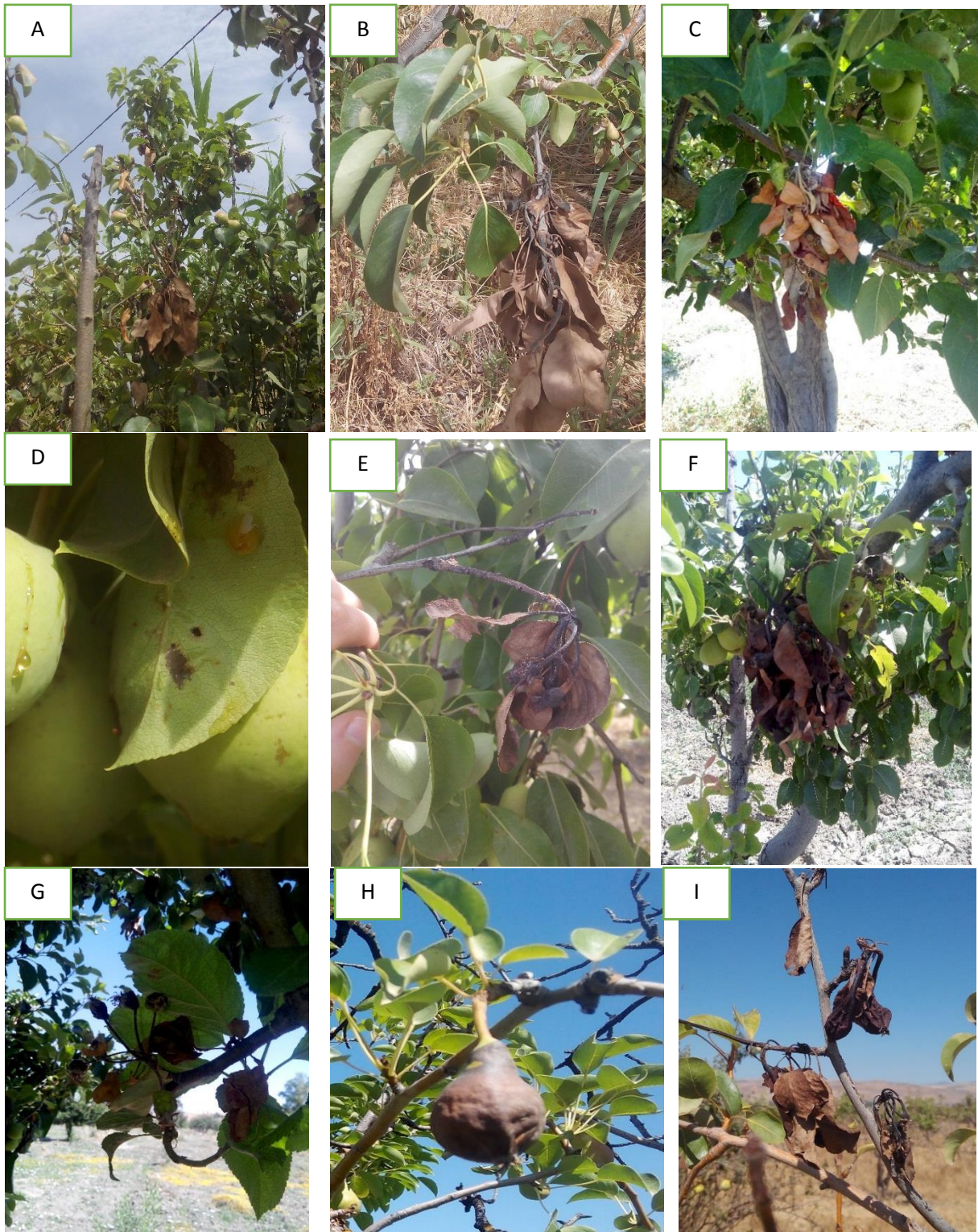
Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire, Génomique et Bioinformatique (LBMGB) du Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef (UHBC), ainsi qu'au laboratoire de bactériologie du Centre de Protection des Végétaux de l'Institut Valencien de Recherches Agronomiques (IVIA), Valence, Espagne.

### 1. Matériel biologique et échantillonnage

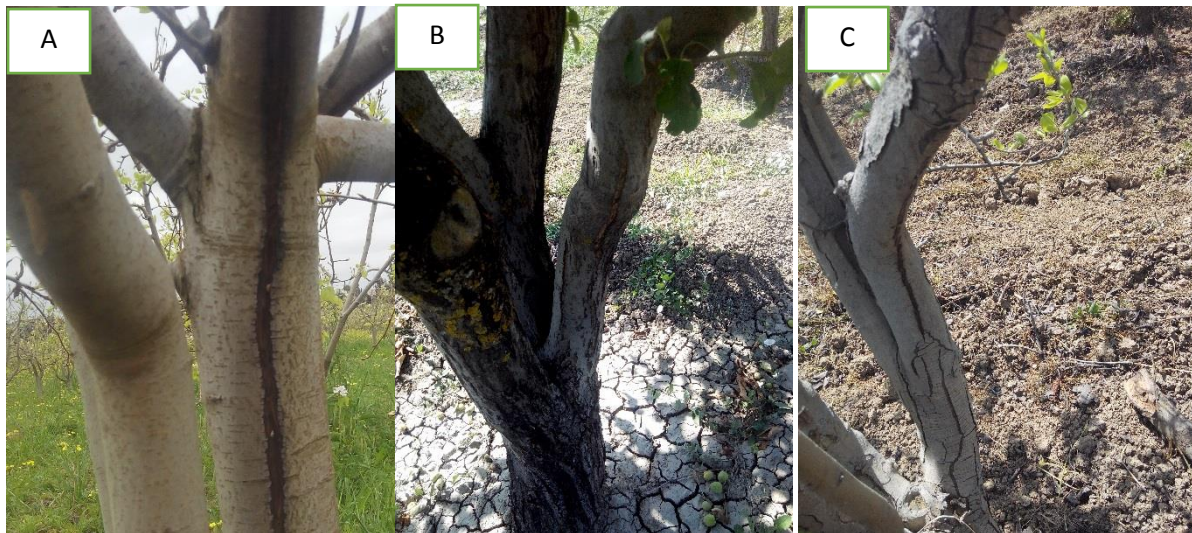
Durant la période 2016-2021, des échantillons ont été prélevés dans plusieurs régions d'Algérie, notamment Chlef, Aïn Defla, Blida, Tipaza, Sétif, Constantine et Mila (**Figure 19**). Les prélèvements ont été réalisés sur des rameaux, des feuilles et des fruits présentant différents symptômes caractéristiques du feu bactérien (**Figures 20-21**), dans des vergers touchés par la maladie (**Figure 22**).



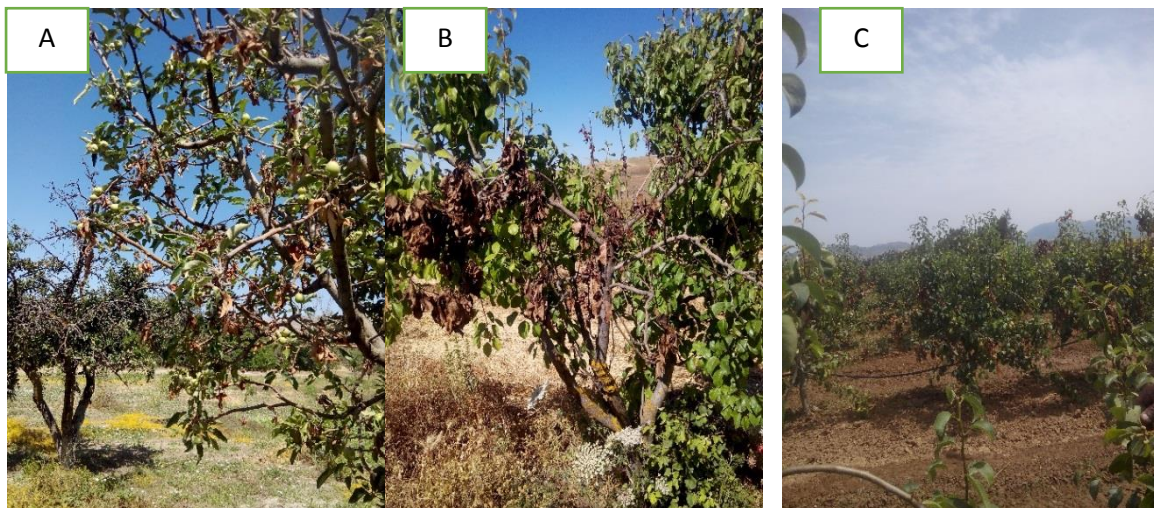
**Figure 19.** Les zones où des échantillons ont été prélevés dans cette étude.



**Figure 20.** Les parties des arbres infectées par le feu bactérien : **A** et **B**. Feuilles de poirier infecté ; **C**. Feuilles de pommier ; **D**. Exsudats sur une poire ; **E** et **F**. Grappes de fleurs infectées ; **G**. Pommes infectées ; **H**. Poire infectée ; **I**. Poire momifiée



**Figure 21.** Symptômes du feu bactérien sur le tronc dans quelques vergers inspectés : **A.** L'écorce présente une fissure sombre et verticale, et le bois de cœur est visible ; **B et C.** L'écorce du tronc affectée par des chancres apparaît enfoncée, sombre, fissurée.



**Figure 22.** Symptômes du feu bactérien sur des vergers infectés : **A,** verger de pommiers ; **B** et **C,** vergers de poiriers.

Les prélèvements ont été réalisés au printemps et en été, périodes favorables à l'expression des symptômes.

Cinq échantillons ont été collectés par verger, en coupant les rameaux de manière à inclure environ 10 cm de tissu sain autour de la zone infectée. Les prélèvements concernaient principalement des arbres fruitiers à pépins (pommier, poirier, cognassier, néflier), mais des échantillons ont également été prélevés sur des arbres à noyaux (amandier, pêcher, abricotier).

Les sécateurs ont été désinfectés après chaque utilisation, et des mesures ont été prises pour prévenir toute contamination croisée lors de la collecte, du transport et du traitement des échantillons.

Les échantillons ont été placés dans des sacs en papier, puis transportés au laboratoire pour analyse dans les plus brefs délais, ou conservés à 4 °C pendant une durée maximale d'une semaine avant l'analyse.

## **1.1 Traitement des échantillons**

Les échantillons de rameaux, de fleurs, de fruits, de feuilles et de pousses ont été rincés avec de l'eau distillée stérile, puis désinfectés superficiellement à l'aide du coton imbibé d'éthanol à 70 %.

Ensuite, de petits morceaux ont été prélevés à la frontière entre les tissus sains et nécrotiques, puis macérés dans une solution saline pendant 30 minutes à température ambiante.

## **1.2 Isolement des bactéries**

Des aliquotes de 50 µl de chaque macérat ont été étalées sur les milieux KB, CCT et levane (**Annexe I**) pour maximiser les chances de récupération d'*E. amylovora*, ensuite, les boîtes ont été incubées à 25 °C pendant 24 à 72 h. Les colonies sur KB ont été observées après 24-48 h ; pour les milieux levane et CCT, les colonies ont commencé à être observées après 48 h. Les colonies ont également été sélectionnées après 72 h et purifiées pour une caractérisation ultérieure. Tous les isolats sélectionnés ont été cryoconservés à -80 °C et cultivés de manière routinière sur le milieu KB pendant 48 h.

## **2. Identification du pathogène**

### **2.1 Tests conventionnels**

#### **2.1.1 Test KOH**

La méthode du test KOH 3 % est un test rapide et économique pouvant constituer une alternative à la coloration de Gram. La potasse dissout la paroi cellulaire des bactéries, facilitant ainsi l'extraction de l'ADN (Suslow *et al.*, 1982).

Une goutte de KOH a été déposée sur une lame microscopique, puis mélangée avec une colonie âgée de 24 heures cultivée sur le milieu KB. Le test est considéré positif et indique une bactérie Gram-négative s'il y a formation d'un filament lors du soulèvement de l'anse. En revanche, le test est considéré négatif et indique une bactérie Gram-positive si aucun filament ne se forme.

### **2.1.2 Test d'oxydase**

Le disque d'oxydase est imbibé d'une goutte d'eau distillée, puis une colonie de la culture bactérienne âgée d'environ 24 heures est déposée sur ce disque. Une coloration rose-violette indique une bactérie oxydase positive, tandis que l'absence de coloration indique une bactérie oxydase négative.

### **2.1.3 Test de fluorescence**

Pour différencier *E. amylovora* des *Pseudomonas*, on a utilisé le test de fluorescence sous UV. Ce test repose sur la production de molécules hydrosolubles, comme la pyoverdine, sur le milieu KB. Ces molécules rendent les colonies fluorescentes sous les rayons UV (King *et al.*, 1954).

Pour réaliser ce test, une colonie suspecte d'être *E. amylovora* a étéensemencée sur le milieu KB, puis incubée pendant 24 heures. Ensuite, la boîte est exposée à une lampe UV :

- Si une fluorescence est observée, la colonie est considérée comme *Pseudomonas* (test positif).
- En l'absence de fluorescence, la colonie est suspectée d'être *E. amylovora* (test négatif).

### **2.1.4 Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose**

Des colonies bactériennes ont étéensemencées par piqûre centrale sur le milieu Hugh et Leifson (Annexe I). Un des deux tubes a été recouvert d'une couche d'huile de vaseline stérile et incubé pendant 24 à 27 heures.

La bactérie est considérée comme fermentative si les deux milieux virent vers le jaune. Elle est considérée comme oxydative si le milieu ne change pas de couleur en anaérobiose.

### **2.1.5 Test d'hypersensibilité**

Ce test a été effectué pour détecter l'activité de la bactérie et induire la réponse hypersensible (HR) sur une plante non-hôte. Une suspension bactérienne à  $10^8$  UFC/ml a été injectée dans des feuilles de géranium (*Pélargonium*), lesquelles ont ensuite été incubées dans une chambre humide à 28 °C. La réponse HR a été observée 24 heures après l'inoculation (**Bakhshi *et al.*, 2019**).

## **2.2 Identification moléculaire des isolats bactériens**

L'extraction de l'ADN a été réalisée par un simple choc thermique. Une suspension ajustée à une DO600 de 0,2 (soit environ  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) dans 2 ml de PBS a été chauffée à 100°C pendant 10 minutes, puis refroidie rapidement à 0°C pendant 10 minutes. La suspension a ensuite été centrifugée à 13 000 rpm pendant 10 minutes. Le culot a été éliminé et le surnageant contenant l'ADN utilisé pour l'amplification par PCR.

### **2.2.1 PCR conventionnelle**

L'identification moléculaire des souches isolées a été réalisée en utilisant les amorces EA71F et Ea71R (**Tableau 2**), désignées par **Taylor *et al.* (2001)**, qui ciblent une région chromosomique de 187 pb codant pour une protéine hypothétique. Le mélange de réaction pour la PCR classique avait un volume de 50 µl et contenait les composants suivants : 5 µl d'ADN, 1x de tampon de réaction Biotools, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 0,1 µM de chaque amorce et 1 U de Taq polymérase (Biotools).

Les conditions de PCR étaient les suivantes : une dénaturation initiale à 94°C pendant 4 minutes, suivie de 40 cycles composés de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes, et d'extension à 72°C pendant 1 minute. Enfin, une extension finale a été réalisée à 72°C pendant 10 minutes.

**Tableau 2.** Liste des amorces utilisées dans cette étude.

Amorce	Séquence 5'-3'	Référence
pEA71F	CCTGCATAAATCACCGCTGACAGCTCAATG	(Taylor <i>et al.</i> , 2001)
pEA71R	GCTACCACTGATCGCTCGAA TCAAATCGGC	
hpEaF	CCGTGGAGACCGATCTTTTA	(Gottsberger, 2010)
hpEaR	AAGTTTCTCCGCCCTACGAT	
hpEaP	FAM-TCGTCGAATGCTGCCTCTCT-TAMRA	
Ams116F	TCCCACATACTGTGAATCATCCA	(Pirc <i>et al.</i> , 2009)
Ams189R	GGGTATTTGCGCTAATTTTATTCG	
Ams141T	FAM-CCAGAATCTGGCCCGCGTATCCGTAMRA	
1.7F	CCCCGTGAACAACAGACCACC	(Llop <i>et al.</i> , 2011)
1.7R	AATCTGACAGCCGCAACCCG	
AJ75-F	CGTATTCACGGC TTCGCAGAT	McManus et Jones, 1995
AJ76-R	ACCCGCCAGGATAGTCGCATA	
VNTR4	CCCGGTGCTGC	(Hannou <i>et al.</i> , 2013)
VNTR5	GCGGCGGCATG	
RECA1	GGTAAAGGGTCTATCATGCG	(Waleron <i>et al.</i> , 2002)
RECA2	CCTTCACCATAACATAATTTGGA	
AJ245	AGCTGGCGGGCACTTCACT	(Jones et Geider, 2001)
AJ246	CCCCGCACCGTTCAGTTTT	
HRPN1	ATGAGTCTGAATACAAG	(Jock et Geider, 2004)
HRPN3c	GCTTGCCAAGTGCCATA	
groEL-A	GAAGTKGCCTCTAAAGCGAAYGA	
groEL-B	GCMACRCCACCACCAGCAACC	(McGhee <i>et al.</i> , 2002)
rpoS5'	ACCTTGCGGTTCTGCCTTG	(Santander <i>et al.</i> , 2014a)
rpoS3'	GTTCTTCGCGCTATCATTAC	
CR1-F1	CGCCGCCACGCTGCCATTT	(McGhee et Sundin, 2012)
C1-R0	TCCAGCGCCTGTAAAGCGGC	
CR1-F2	ATAAACCGCAAGCGATCAACCTGT	
CR1-F3	GCTTATACAACTGACAAAATCGTG	
CR1RevRpt	CGGTTTATCCCCGCTCACGC	
Cr2-F1	GCGGCCAACAGATGCGGAAAG	

Cr2-F2	GTCTGGCGCAAAAAGTGGAG	
Cr2-F3	CCGCCCTTCTGGTGTTTTGA	
Cr2-R2	ACACGTGGTTTCTGAGTCTGGA	
C2-R1	TGCGGGGAACACTCGACATCTAAT	
CR3-F1	TTTTCGCCGGGTAACAGG	
CR3-R1	ATGAGAAGCCCGTGAAGCAAAGTA	

### 2.2.1.1 Électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification obtenus ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % (p/v) dans un tampon 0,5× TAE, avec un marquage à l'aide de la solution Good View™ (SBS Genetech).

### 2.2.2 PCR en temps réel

Afin de confirmer les résultats obtenus par PCR classique, deux protocoles différents de PCR en temps réel (qPCR) ont été utilisés.

Le premier protocole qPCR ciblait le gène *amsC* en utilisant les amorces Ams116F, Ams189R et la sonde Ams141T TaqMan, (**Tableau 2**), comme décrit précédemment par **Pirc *et al.* (2009)**. Les réactions de qPCR ont été effectuées dans des volumes finaux de 25 µl contenant 5 µl de suspension bactérienne, 1x de Mastermix (Biotools Quantimix), 0,9 µM d'amorces et 0,2 µM de sonde.

Le second protocole qPCR, décrit par **Gottsberger (2010)**, ciblait un gène codant pour une protéine hypothétique en utilisant les amorces hpEaF, hpEaR et la sonde hpEaP (**Tableau 2**). La réaction a été effectuée dans un volume final de 20 µl contenant 2 µl d'ADN, 1 x de Mastermix (Biotools Quantimix), 0,25 µM de chaque amorce et 0,025 µM de sonde.

Les deux réactions ont été réalisées sur un LightCycler 480 sous les conditions thermiques suivantes : 10 min à 95 °C, suivies de 45 cycles de 15 s de dénaturation à 95 °C, d'hybridation et d'amplification pendant 1 min à 60 °C.

## 3. Caractérisation phénotypique

### **3.1 Caractérisation biochimique**

Des suspensions cellulaires à  $10^8$  UFC/mL ont été inoculées dans les bandelettes commerciales du système API 20 E (bioMérieux) selon les instructions du fabricant, puis incubées à 25 °C pendant 48 heures. L'activité catalase a également été évaluée par l'ajout de peroxyde d'hydrogène aux suspensions bactériennes.

### **3.2 Test de résistance à la streptomycine**

Une suspension bactérienne de  $10^8$  UFC a été préparée à partir d'une culture de 48 h. 100 µl de la suspension ont été étalés sur un milieu Luria Bertani (LB) (**Annexe 1**) et laissés sécher. Ensuite, sur ces cultures, des disques de papier filtre stérile ont été imprégnés de streptomycine à des concentrations de 0, 100 et 250 ppm. Le diamètre de chaque zone d'inhibition a été mesuré après incubation des plaques pendant 48 heures à 28 °C (**Parcey et al., 2020; Tancos et al., 2016 ; Vézina et Lacroix, 2007**).

### **3.3 Analyse des profils d'acides gras**

La composition des acides gras cellulaires des souches a été déterminée après leur culture sur de l'agar soja tryptique (TSA) (**Annexe I**) à 28 °C pendant 24 heures, jusqu'à obtention de la biomasse.

L'analyse des acides gras a été réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6850, couplé au Système d'Identification Microbienne MIDI, en suivant la méthode TSBA6 et le protocole recommandé (**MIDI, 2008 ; Sasser, 1990**).

Afin d'analyser les différences dans le profil des acides gras, un regroupement hiérarchique des souches a été effectué selon la méthode de Ward, aboutissant à la construction d'un dendrogramme.

### **3.4 Analyse de la croissance bactérienne**

Pour analyser la cinétique de croissance des souches, des suspensions bactériennes ont été préparées à partir de cultures de 48 h sur le milieu KB, suspendues dans du PBS et ajustées à 1

$\times 10^4$  UFC/ml. Des aliquotes de 20  $\mu$ l de chaque suspension ont été transférées dans des plaques à 96 puits contenant 180  $\mu$ L de milieu LB dilué au 1:10. Au moins trois réplicats ont été réalisés pour chaque souche.

Les plaques ont été incubées à 25 °C avec agitation pendant 90 h, et la  $DO_{600}$  a été mesurée toutes les heures à l'aide d'un lecteur de microplaques Multiskan FC (Thermo Scientific).

La cinétique de croissance a été déterminée à l'aide du package Python AMiGA (**Midani et al., 2021**).

### **3.5 Tests de virulence**

Pour évaluer la virulence des isolats, des poires immatures de la variété « Blanquilla », d'un diamètre d'environ 2 à 3 cm ont été sélectionnées. Après un lavage à l'eau courante, les fruits ont été désinfectés en les immergeant dans une solution d'eau de Javel à 15 % pendant 20 minutes. Ils ont ensuite été rincés trois fois à l'eau distillée stérile, puis séchés sur du papier filtre stérile. Quatre puits de 0,5 cm ont été réalisés sur chaque fruit à l'aide d'embouts stériles (**Cabrefiga et Montesinos, 2005**).

Ensuite, 10  $\mu$ l de suspensions bactériennes préparées dans un tampon phosphate salin (PBS) et ajustées à environ  $10^7$  UFC/ml ont été inoculées dans les puits, trois fruits étant inoculés par souche. Les fruits inoculés avec la souche CFBP1430, et ceux traités uniquement avec du PBS ont servi de contrôles positifs et négatifs, respectivement. Les fruits inoculés ont été placés dans des plateaux en polystyrène stérilisés, recouverts d'un film plastique pour maintenir une humidité élevée, puis incubés à 25 °C. Les symptômes de la maladie ont été observés et notés pendant une période de sept jours (**Barbé et al., 2013 ; Barbé et al., 2022**).

### **3.6 Analyse statistique**

Les différences dans les cinétiques de croissance ont été analysées en utilisant le test de Kruskal-Wallis, suivi d'une analyse post hoc avec des tests de comparaisons multiples étape par étape pour construire des sous-ensembles homogènes. Ce test a également été utilisé pour évaluer les différences entre les groupes basées sur l'analyse des acides gras, suivi de comparaisons par paires.

L'association potentielle entre les cinétiques de croissance et la virulence a été évaluée à l'aide d'un test de corrélation de Spearman.

Les différences dans tous les tests ont été considérées comme statistiquement significatives pour  $p \leq 0,05$ . Ces analyses statistiques ont été réalisées avec SPSS version 21.

Les variations du phénotype en fonction de la composition en acides gras, de la virulence, des cinétiques de croissance et des caractéristiques biochimiques déterminées par l'analyse API 20 ont été évaluées à l'aide de l'analyse en facteurs multiples (AFM), en utilisant le package R FactoMineR et R software version 4.3.2.

## **4. Caractérisation génotypique**

### **4.1 Screening des plasmides**

La PCR duplex a été utilisée pour détecter la présence de plasmide ubiquitaire pEA29 et du plasmide pEI70 en utilisant respectivement les amorces AJ75-AJ76 et 1.7F-1.7R (**Tableau 2**) (**Llop et al., 2011**).

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 25  $\mu$ l contenant : 2  $\mu$ l d'ADN, 1x de tampon de réaction, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 1,4  $\mu$ M des amorces AJ75-AJ76, 0,5  $\mu$ M des amorces 1.7F-1.7R, et 1 U de Taq polymérase (BioTools).

Les conditions d'amplification étaient les suivantes : dénaturation initiale à 94 °C pendant 3 minutes, suivie de 40 cycles comprenant : dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, hybridation à 60 °C pendant 40 secondes, et extension à 72 °C pendant 1 minute, avec une extension finale à 72 °C pendant 10 minutes.

Les produits d'amplification obtenus ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,2% (p/v), avec un marquage à l'aide de la solution Good View™ (SBS Genetech).

### **4.2 Caractérisation des loci VNTR**

Pour la caractérisation moléculaire des souches d'*E. amylovora*, l'analyse VNTR a été réalisée en utilisant les amorces VNTR4 et VNTR5 (**Tableau 2**), comme décrit précédemment par **Hannou et al. (2013)**.

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µl contenant : 2 µl d'ADN, 1x de tampon de réaction, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 0,2 µM d'une amorce VNTR, et 1 U de Taq polymérase.

Les conditions thermiques de PCR étaient les suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes, suivie de 40 cycles comprenant : dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, hybridation à 45 °C pendant 1 minute, extension à 65 °C pendant 8 minutes, et une extension finale à 65 °C pendant 16 minutes.

Les produits d'amplification ont été analysés sur un gel d'agarose à 1 %, coloré avec Good-View à 80 V, dans un tampon 0,5 X TAE. Les résultats ont ensuite été visualisés avec un transilluminateur UV et photographiés.

### **4.3 MLST**

Pour caractériser les isolats génétiquement et d'étudier leur potentiel pathogène, le MLST a été réalisé sur les isolats confirmés d'être *E. amylovora* par l'amplification de séquences partielles de cinq gènes (**Park et al., 2016 ; Refahi et al., 2017**)(**Tableau 2**) : *groEl*, *recA*, *rpoS*, *hrpN* et *ams*, qui codent respectivement pour la protéine de choc thermique GroEl, la protéine de recombinaison RecA, le facteur Sigma-38, une protéine sécrétée par le système T3 et une protéine impliquée dans la synthèse de l'amylovoran.

#### **4.3.1 Amplification des gènes**

Le mix de PCR a été préparé dans un volume final de 50 µL, contenant : 6 µL d'ADN, 1x tampon de réaction, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de chaque amorce (sens-antisens), 2 U de Taq polymérase. Ce mélange a été utilisé pour l'amplification des différents gènes.

Les conditions de PCR comprenaient une dénaturation initiale à 94 °C pendant 10 minutes, suivie de 35 cycles : dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, hybridation selon la température d'hybridation propre à chaque gène (**Tableau 3**), extension à 72 °C pendant 2 minutes, et une extension finale à 72 °C pendant 10 minutes.

Les conditions d'amplification par PCR utilisées pour chacun des gènes ciblés dans l'analyse MLST sont résumées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 3.** Conditions de PCR pour l'amplification des gènes utilisés dans l'analyse MLST d'*E. amylovora*.

Gène ciblé	Amorces utilisées (5'-3')	Température d'hybridation (°C)	Taille approximative attendue du fragment (pb)	Référence
<i>groEL</i>	groEL-A / groEL-B	60	~1000	(Mcghee <i>et al.</i> , 2002)
<i>recA</i>	RECA1 / RECA2	47	730	(Waleron <i>et al.</i> , 2002)
<i>rpoS</i>	rpoS5' / rpoS3'	58	1109	(Santander <i>et al.</i> , 2014a)
<i>hrpN</i>	HRPN1 / HRPN3c	55	1198	(Jock et Geider, 2004)
<i>ams</i>	AJ245 / AJ246	58	519	(Jones et Geider, 2001)

#### 4.3.2 Purification et séquençage

Les produits d'amplification ont ensuite été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % dans un tampon 0,5 x TAE. Après purification, 5 µL d'ADN purifié ont été mélangés à 5 µL de l'amorce directe ou reverse à 5 µM, puis séquencés par la méthode de Sanger.

#### 4.3.3 Analyse bioinformatique

Les séquences obtenues avec les amorces sens et antisens ont été alignées à l'aide du logiciel CodonCode Aligner et comparées aux séquences de la base de données GenBank via BLASTn, afin de confirmer l'identité des gènes amplifiés.

#### 4.3.4 Analyse phylogénétique

Les séquences des souches obtenues ont été concaténées, puis ces séquences ont été utilisées pour construire l'arbre phylogénétique. Des séquences provenant d'autres souches, issues de

différentes régions du monde (**Annexe 2**), ont été incluses dans l'analyse pour comparer les isolats.

L'analyse phylogénétique a été réalisée à l'aide de la méthode Neighbor-Joining basée sur le modèle à trois paramètres de Tamura (**Tamura *et al.*, 2021**). Le soutien des nœuds a été évalué par la méthode bootstrap avec 1000 répliqués, effectuée avec le logiciel MEGA 11

## **4.4 CRISPR**

### **4.4.1 PCR amplification**

L'analyse CRISPR a été effectuée comme décrit précédemment par **McGhee et Sundin (2012)**.

Les paires d'amorces CR1-F1/C1-R0, Cr2-F1/C2-R1 et CR3-F1/CR3-R1 (**Tableau 2**) ont été utilisées pour amplifier respectivement les arrays CRISPR 1, CRISPR 2 et CRISPR 3. Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µL. La réaction PCR comportait une concentration finale de 1X pour le tampon de réaction, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM pour chaque amorce, 2,5 U de Taq polymérase ainsi que 3 µL d'ADN ont été ajoutés pour chaque réaction.

Les cycles ont été réalisés selon le protocole suivant : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles comprenant : une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 58°C (pour CRISPR 1 et 2) ou à 55°C (pour CRISPR 3) pendant 30 secondes, et une extension à 72°C pendant 4 minutes pour CRISPR 1 et 2, ou 45 secondes pour CRISPR 3. Une extension finale a été effectuée à 72°C pendant 7 minutes.

### **4.4.2 Séquençage**

10 µL de produit PCR ont été soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%, puis purifiés à l'aide du mi-PCR Purification Kit (Metabion) selon les recommandations du fabricant. Les produits purifiés des amplifications de CRISPR 1, CRISPR 2 et CRISPR 3 ont été séquencés par la méthode de Sanger, en utilisant les amorces d'amplification ainsi que les amorces spécifiques CR1-F2, CR1-F3 et CR1RevRpt pour CRISPR 1, et Cr2-F2, Cr2-F3 et Cr2-R2 pour CRISPR 2.

#### **4.4.3 Analyse des régions CRISPR**

Les séquences obtenues ont été assemblées à l'aide du logiciel CodonCode Aligner (version 10.0.2). L'outil CRISPR Finder a été utilisé pour identifier les répétitions CRISPR et les espaceurs. Ensuite, une analyse BLASTn a été réalisée afin d'évaluer la similarité des répétitions directes (DR) avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank.

## CHAPITRE III

## RESULTATS

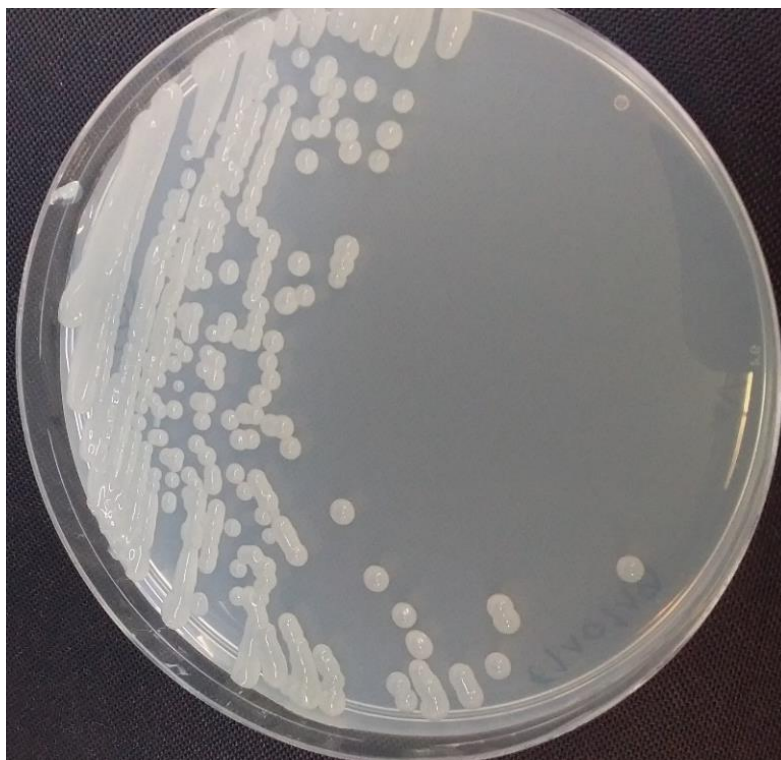
## Chapitre III. Résultats

### 1. Collecte des échantillons

Durant la période entre 2016 et 2021, 174 échantillons ont été collectés dans 7 wilayas : Chlef, Ain Defla, Tipaza, Blida, Sétif, Mila, et Constantine.

### 2. Isolement et identification des bactéries

Après 48 h, l'isolement primaire des souches d'*E. amylovora* a été effectué sur un milieu levane. Les colonies sont rondes, fortement bombées, blanchâtres, brillantes, lisses et muqueuses (**Figure 23**).



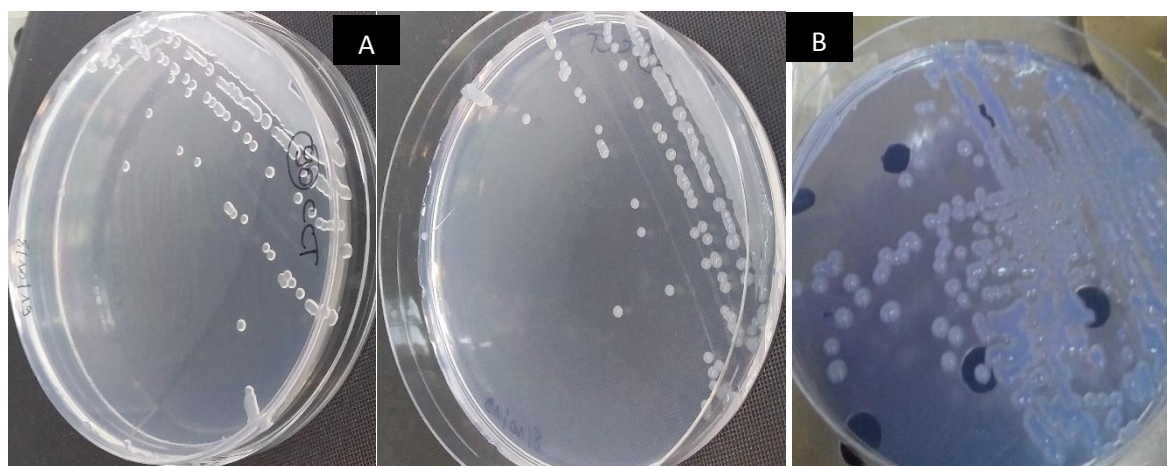
**Figure 23.** Aspect des colonies d'*E. amylovora* sur le milieu levane

Sur le milieu KB, les colonies apparaissent circulaires, de petite taille, blanchâtres à légèrement crémeuses et platies (**Figure 24A**), bien que certaines soient allongées ou légèrement bombées. Elles présentent également des signes de viscosité, avec une texture muqueuse (**Figure 24B**).



**Figure 24.** Aspect des colonies sur milieu KB.

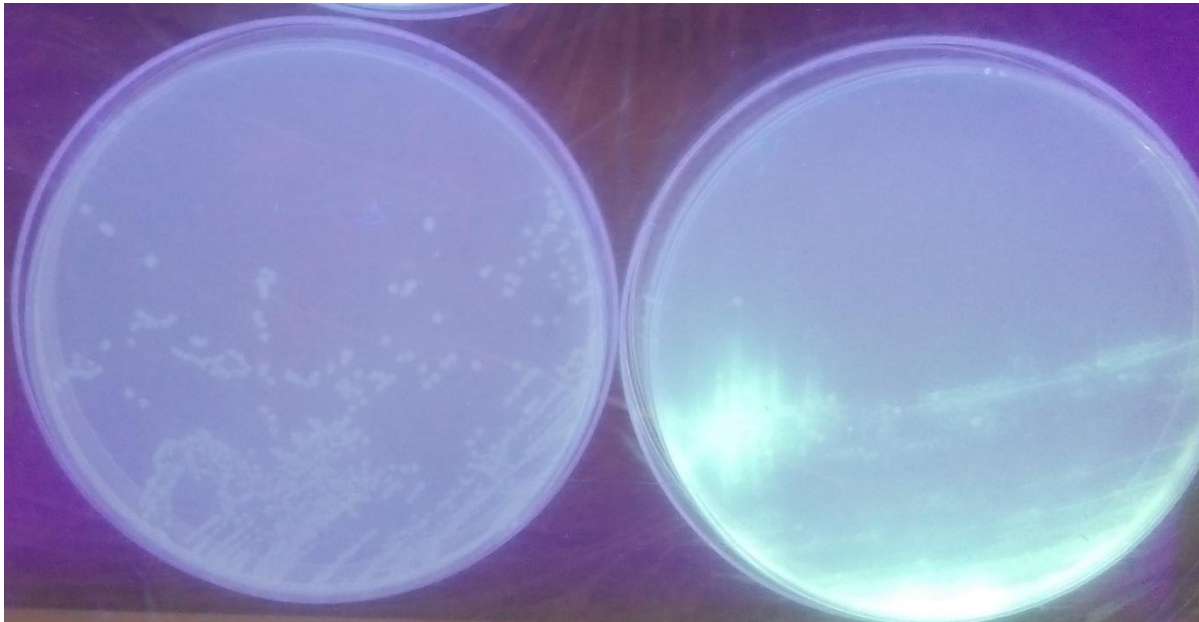
Sur le milieu CCT, les colonies apparaissent violettes, bombées, brillantes et petites après 48 h (**Figure 25 A**). Après 72 h, elles deviennent moyennes et muqueuses (**Figure 25B**).



**Figure 25.** Aspect des colonies sur milieu CCT : **A.** Aspect des colonies sur milieu CCT après 48 h ; **B.** Aspect des colonies sur CCT après 72 h.

## 2.1 Test de fluorescence

Les colonies apparaissent sous lumière UV sans fluorescence visible (**Figure 26**), ce qui confirme que les souches d'*E. amylovora* sont incapables de produire des pigments fluorescents sur le milieu KB. Cette caractéristique permet de différencier *E. amylovora* de certaines autres bactéries épiphytes, notamment *Pseudomonas*, qui produisent des pigments fluorescents, et fréquemment identifiées grâce à cette propriété sur milieu KB (**Figure 26**).



**Figure 26.** Test de fluorescence sous UV des colonies d'*E. amylovora* (à gauche) et *Pseudomonas* (à droite) contrôle positif sur milieu KB.

## 2.2 Test d'hypersensibilité

Ce test a été réalisé pour démontrer la présence des gènes *hrp*, associés au système de sécrétion de type III (T3SS), responsable de la pathogénicité d'*E. amylovora*. Il a permis d'observer la production d'une réaction rapide d'hypersensibilité. Après 24 heures, une plage nécrotique est apparue. Les souches suspectes ont induit une réaction d'hypersensibilité dans la zone infiltrée chez une plante non-hôte (**Figure 27**).



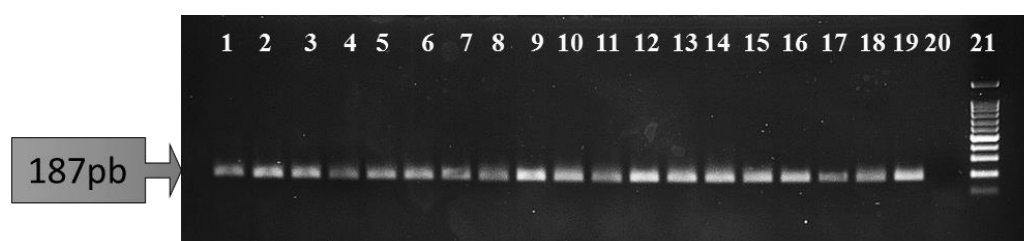
**Figure 27.** Réaction d'hypersensibilité sur plante de géranium : **A.** Contrôle négatif ; **B.** Réponse hypersensible observée après 24 heures autour de la zone injectée.

## 2.3 Identification du pathogène

Au total, 95 souches ont été isolées et purifiées par repiquage successif sur KB. Ces souches ont montré des caractéristiques classiques des *Erwiniaceae*. Toutes étaient Gram-négatives, catalase positives et oxydase négatives. L'analyse de leur métabolisme, qui a révélé un comportement oxydatif/fermentatif du glucose, a permis de sélectionner un groupe de souches à analyser plus en profondeur.

### 2.3.1 Identification moléculaire par PCR conventionnelle

Pour confirmer l'identité des souches isolées, des tests moléculaires ont été réalisés. Les souches détectées ont ensuite été soumises à des tests PCR. Un produit spécifique de 187 pb a été amplifié avec succès dans les réactions PCR des 18 souches, correspondant à une séquence de protéine hypothétique. Ces souches ont toutes été confirmées comme étant *E. amylovora* par PCR (**Figure 28, Tableau 4**).



**Figure 28.** Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR amplifiés avec les amorces EA71F et EA71R. 1 : souche de référence CFBP1430, 2-19 : souches EA16, EA22, EA46, EA52, EA53, EA54, EA55, EA57, EA58, EA59, EA61, EA68, EA66, EA63, EA90, EAF1, EAF2, EAPC, 20 : contrôle négatif, 21 : marqueur de taille 100 pb.

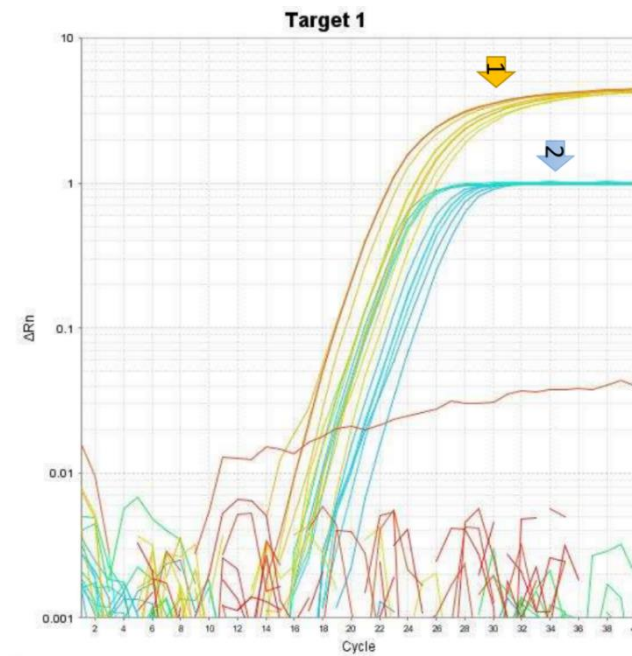
**Tableau 4.** Origine des souches d'*E. amylovora* isolées au cours de cette étude.

Souche	Hôte	Cultivar	Wilaya	Organe	Date de prélèvement
EA16	Poirier	Santa Maria	Mila	Fruit	2016
EA22	Poirier	Santa Maria	Sétif	Fruit	2016
EA46	Pommier	/	Tipaza	Rameau	2018
EA52	Pommier	Golden delicious	Chlef	Rameau	2018
EA53	Poirier	Santa Maria	Chlef	Rameau	2018
EA54	Poirier	Santa Maria	Ain Defla	Rameau	2019
EA55	Poirier	Santa Maria	Ain Defla	Rameau	2019
EA57	Poirier	Santa Maria	Ain Defla	Exsudat	2019

EA58	Poirier	Santa Maria	Ain Defla	Rameau	2019
EA59	Poirier	Santa Maria	Chlef	Rameau	2019
EA61	Poirier	Santa Maria	Ain Defla	Rameau	2019
EA68	Poirier	Santa Maria	Ain Defla	Rameau	2019
EA66	Pommier	Anna	Ain Defla	Rameau	2019
EA63	Poirier	Santa Maria	Ain Defla	Fruit	2019
EA90	Poirier	Santa Maria	Blida	Fruit	2019
EAF1	Poirier	Santa Maria	Mila	Rameau	2021
EAF2	Poirier	Santa Maria	Mila	Rameau	2021
EAPC	Poirier	Santa Maria	Constantine	Rameau	2021

### 2.3.2 Identification moléculaire par PCR en temps réel

Les résultats obtenus par PCR conventionnelle ont été confirmés par deux protocoles de PCR en temps réel, ciblant la région *amsC* ainsi que d'autres régions associées à une protéine hypothétiques (**Figure 29**).



**Figure 29.** Profils d'amplification représentatifs obtenus avec les deux protocoles qPCR. 1 : Profil obtenu avec les amorces Ams116F, Ams189R, Ams141T. 2 : Profil obtenu avec les amorces hpEaF, hpEaR, hpEaP.

### 3. Caractérisation phénotypique

#### 3.1 Caractérisation biochimique

L'analyse biochimique des souches, réalisée à l'aide du système API 20E, a permis de caractériser leur profil métabolique. Les résultats ont montré une activité positive pour le test de Voges-Proskauer, ainsi que la fermentation du glucose, du mannose, du sorbitol, du sucrose et d'arabinose.

En revanche, aucune activité n'a été détectée pour l'arginine dihydrolase, la lysine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase, le citrate, l'acétoïne, l'hydrogène sulfuré, l'uréase, la tryptophan déaminase et la gélatinase. De plus, aucune souche n'a montré de capacité à fermenter ni le rhamnose ni l'amygdaline.

Toutefois, une diversité métabolique a été observée dans le métabolisme de certains composés, notamment l'inositol (33 % des souches positives), le mélibiose (6 %) et la  $\beta$ -galactosidase (44 %).

Ces variations métaboliques ont permis d'obtenir 5 profils biochimiques distincts, associés à des codes spécifiques.

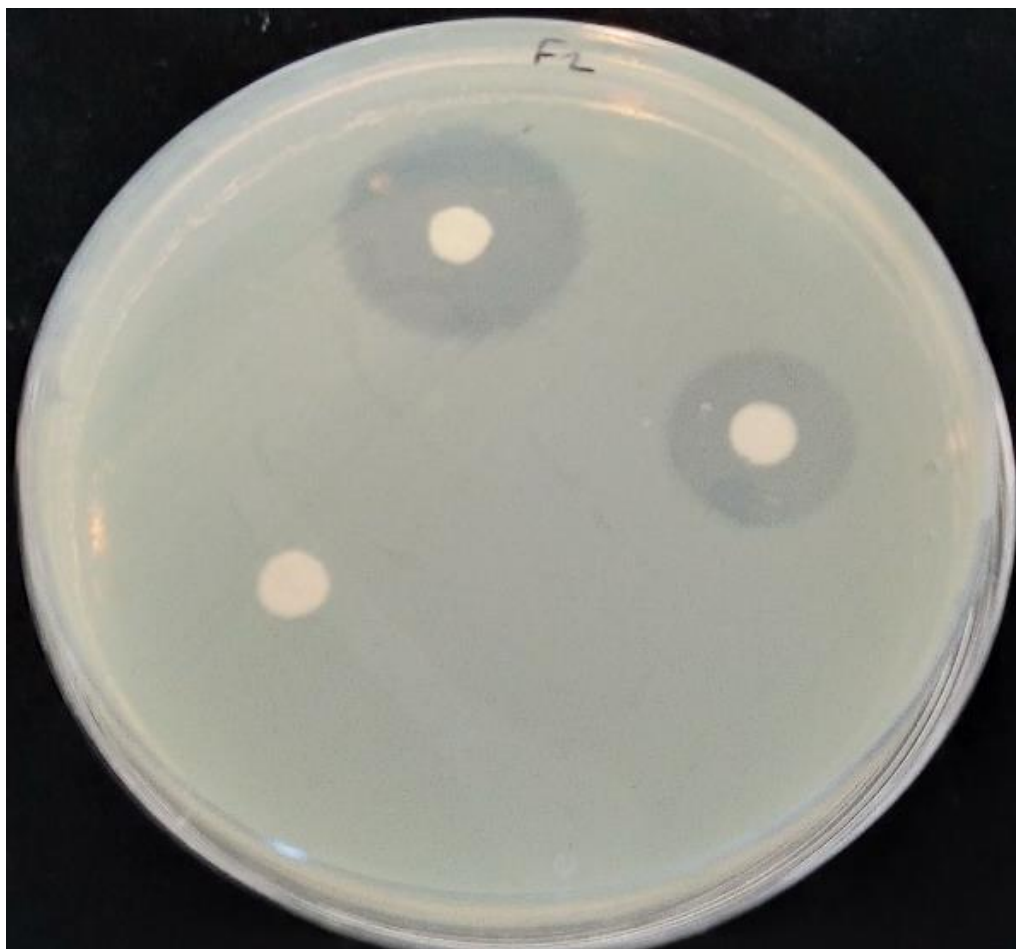
Le code 0005522 a été le plus fréquemment observé avec 38.89 % des souches. Ensuite, le code 1005522 a été attribué à 33.33 % des souches, suivi du code 0005722 avec 22.22 %, 1005722 avec 11.11 %, et enfin 1005762 avec 5.56 % (**Tableau 5**).

**Tableau 5.** Profil biochimique des souches isolées en Algérie et de la souche CFBP1430, basé sur les résultats du système API 20E (bioMérieux).

Code	Souche	Test																			
		ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SUC	MEL	AMY	ARA
1005522	CFBP 1430	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
1005522	EA16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
0005722	EA22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
0005522	EA46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
1005522	EA52	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
0005522	EA53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
1005522	EA54	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
1005522	EA55	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
0005722	EA57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
0005522	EA58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
0005522	EA59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
0005722	EA61	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
1005762	EA63	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
0005522	EA66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
0005522	EA68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
0005722	EA90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
1005722	EAF1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
0005522	EAF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
1005722	EAPC	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+

### 3.2 Test de sensibilité à la streptomycine

Toutes les souches ont montré une zone d'inhibition à la streptomycine, à la fois à la concentration de 250 ppm et de 100 ppm, ce qui indique que les souches sont sensibles à cet antibiotique (**Figure 30**). Aucune souche résistante n'a été détectée dans cette étude.

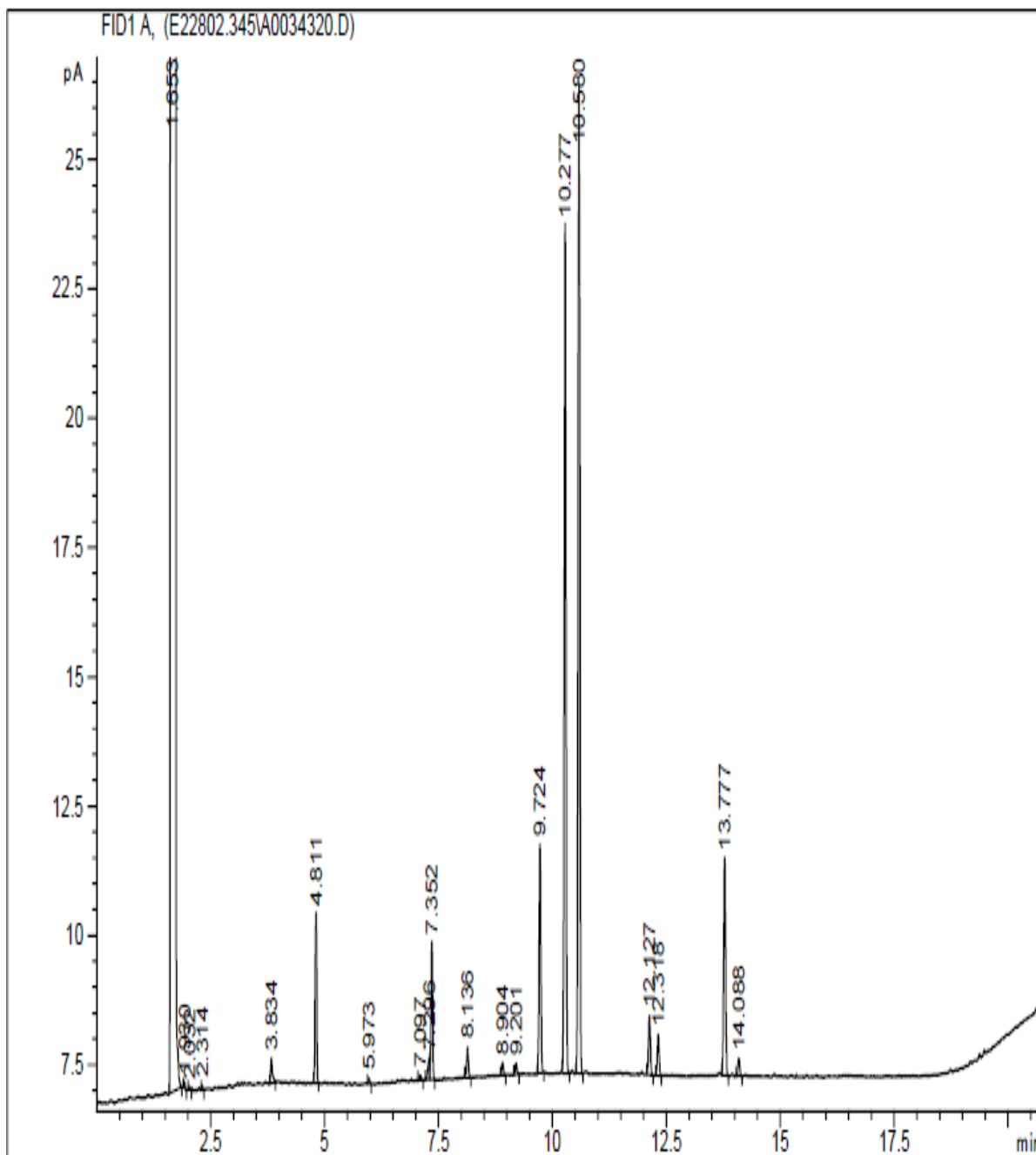


**Figure 30.** Test de sensibilité à la streptomycine montrant des zones d'inhibition des souches d'*E. amylovora* à des concentrations de 250 ppm et 100 ppm.

### 3.3 Analyses des acides gras

La séparation des acides gras présents dans chaque souche, en fonction de leur temps de rétention, obtenue grâce à la chromatographie en phase gazeuse (**Figure 31**). Elle a permis de caractériser

plus précisément leur profil lipidique. L'analyse a confirmé que toutes les souches examinées appartiennent à l'espèce *E. amylovora*, avec une distance euclidienne inférieure à 7.



**Figure 31.** Exemple de chromatogramme de l'analyse des acides gras de la souche *E. amylovora* EA22.

Dix acides gras communs ont été identifiés dans l'ensemble des souches testées, à savoir : l'acide laurique (C12 :0), l'acide myristique (C14 :0), l'acide palmitique (C16:0), l'acide margaric (C17:0), l'acide cis-9,10-méthylènehexadécanoïque (C17:0 cyclo) et l'acide stéarique (C18:0).

Plusieurs acides gras ont été regroupés sous des caractéristiques spécifiques, telles que la caractéristique regroupée 2 (acide  $\beta$ -hydroxymyristique/acide isopalmitique [14 :0 3OH/16:1 iso I]), la caractéristique regroupée 3 (acide palmitoléique [16:1 w7c/16:1 w6c]) et la caractéristique regroupée 8 (acide oléique [18:1 w7c/18:1 w6c]), ainsi qu'un acide gras encore non identifié 10.928.

L'acide palmitique (C16 :0) était le plus abondant dans toutes les souches testées, avec une moyenne de 35,98 %, suivi par l'acide palmitoléique (16:1 w7c/16:1 w6c) regroupé sous la caractéristique 3, représentant 29,1 %.

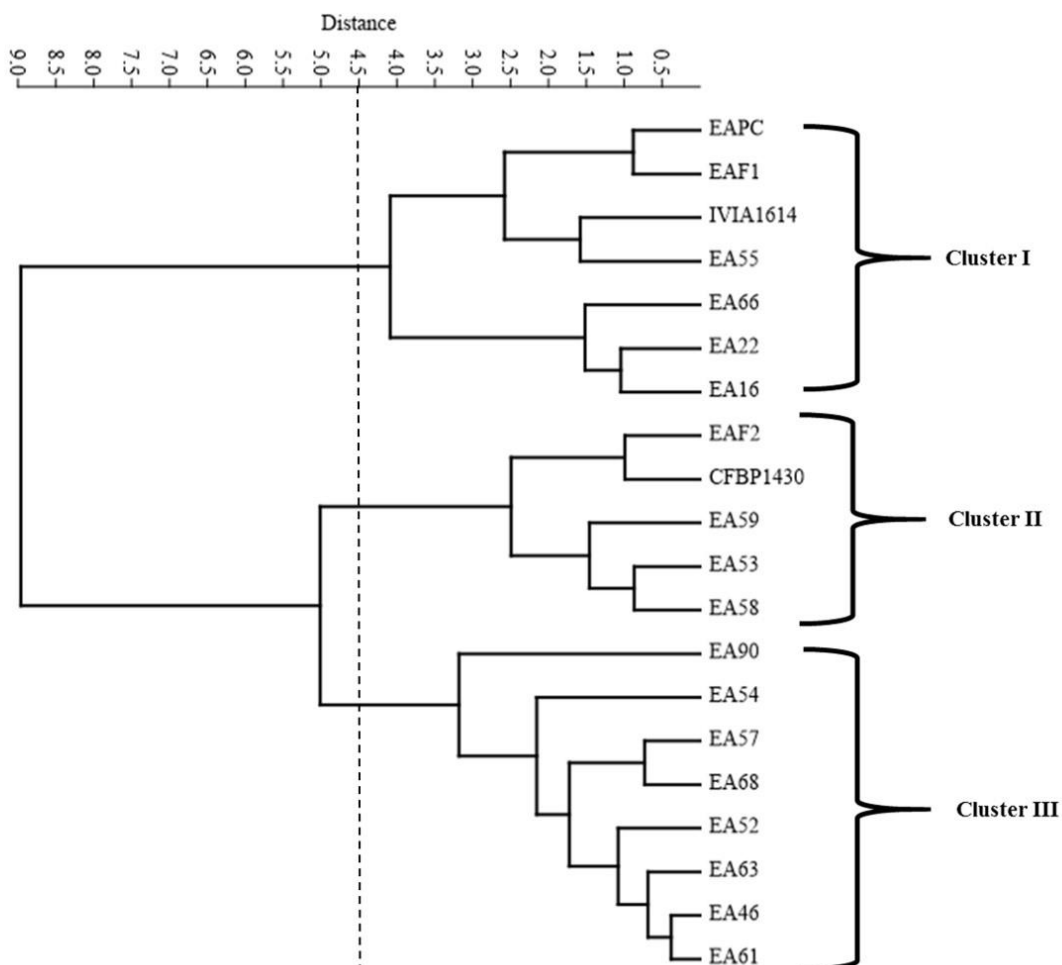
De faibles quantités d'acide tridécanoïque (C13 :0) ont été détectées uniquement dans les souches EA22 (0,17 %) et EAF2 (0,09 %). Par ailleurs, l'acide caprique (C10 :0) (0,1 %) et la caractéristique 7 (18.846/19 :0 cyclo w10c/19w6c) ont été retrouvés exclusivement dans la souche EA53 (**Tableau 6**).

**Tableau 6.** Profils en acides gras des souches d'*E. amylovora* testées dans cette étude, selon l'abondance en pourcentage de chaque acide gras. Code couleur en fonction de l'abondance des acides gras : blanc, 0 < valeur < 1 ; jaune pâle, 1 < valeur < 5 ; orange pâle, 5 < valeur < 8 ; orange, 8 < valeur < 10 ; orange foncé, 10 < valeur < 12 ; rouge pâle, 12 < valeur < 27 ; rouge, 27 < valeur < 31 ; rouge foncé, 31 ≥ valeur.

Souche	Acide gras													
	Cluster	(C10:0)	Caractéristique regroupée 7: 18:846/19:0 cyclo w10c/19w6c	C13:0	1C8:00	C17:0	Inconnu 10.928	C17:0 cyclo	C14:0	C12:0 )	Caractéristique regroupée 2 : (14:03OH/16:1 iso I)	Caractéristique regroupée 8; d (18:1 w7c/18:1 w6c)	Caractéristique regroupée 3:16:1 w7c/16:1 w6c	C16:0
EA53	II	0.1	0.2	0	0.44	0.72	0.84	4.82	4.17	5.15	8.7	9.3	29.59	35.97
EA58	II	0	0	0	0.31	0.73	0.87	5.88	4.42	5.12	8.39	9.17	29.49	35.62
EA59	II	0	0	0	0.44	0.54	0.9	4.56	5.14	5.32	8.22	9.02	29.4	36.48
EA52	III	0	0	0	0.57	0.68	1.42	4.83	5.49	5.81	7.58	9.99	27.97	35.67
EA57	III	0	0	0	0.66	0.7	1.1	4.62	5.31	5.38	8	10.23	27.4	36.59
EA68	III	0	0	0	0.75	0.58	1.14	4.52	4.45	5.62	8.44	10.4	27.52	36.58
EA54	III	0	0	0	0.57	0.75	0.89	5.72	5.24	5.41	8.08	9.87	27.1	36.36
EA90	III	0	0	0	0.54	0.71	1.22	5.46	5.52	6.75	8.39	8.95	27.78	34.68

### 3.3.1 Analyse hiérarchique

L'analyse hiérarchique des isolats, réalisée à l'aide de l'algorithme de Ward (**Figure 32**), a permis d'identifier trois clusters distincts basés sur les différences quantitatives des acides gras.



**Figure 32.** Dendrogramme des souches d'*E. amylovora* basé sur la composition en acides gras.

La séparation des souches repose principalement sur une différence statistiquement significative dans la quantité de l'acide gras correspondant à la caractéristique 3 ( $p < 0,001$ ) (**Tableau 7**).

Toutefois, les clusters II et III sont plus proches l'un de l'autre que du cluster I, ce dernier présentant une teneur relativement plus faible en C17:0 cyclo (3,65) par rapport aux clusters II (4,98) et III (4,725).

Par ailleurs, des différences significatives ont été observées entre les clusters II et III concernant les concentrations d'acide laurique (C12:0), d'acide myristique (C14:0) et d'acide stéarique (C18:0).

**Tableau 7.** Comparaison de la composition en acides gras entre les clusters.

Acides gras	Composition en acides gras (%) <sup>a</sup>			
	Cluster I (n=7)	Cluster II (n=5)	Cluster III (n=8)	Significativité
<b>Inconnu 10.928</b>	1.06(0.77,1.115)	0.87(0.77,0.94)	1.07(0.918; 1.2)	0.104
<b>C12:0</b>	5.49(5.2800, 5.5700) <sup>AB</sup>	5.24(5.1350, 5.4250) <sup>A</sup>	5.52(5.428; 5.763) <sup>B</sup>	<b>0.042</b>
<b>C14:0</b>	4.89(4.250; 5.320) <sup>AB</sup>	4.42(4.220; 4.825) <sup>A</sup>	5.255(5.125; 5.445) <sup>B</sup>	<b>0.047</b>
<b>14:0 3OH/16:1 iso I</b>	8.26(7.85, 8.41)	8.39(7.73, 8.575)	8.04(7.83; 8.323)	0.463
<b>16:1 w7c/16:1 w6c</b>	30.96(30; 31.22) <sup>A</sup>	29.4(28.475; 29.54) <sup>B</sup>	27.825(27.43; 28) <sup>C</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>C16:0</b>	35.84(35.030; 36.240)	36.37(35.795; 36.540)	36.24(35.780; 36.525)	0.296
<b>C17:0 cyclo</b>	3.65(2.620; 4.100) <sup>A</sup>	4.98(4.690; 5.570) <sup>B</sup>	4.725(4.537 ;5.320) <sup>B</sup>	<b>0.004</b>
<b>C17:0</b>	0.76(0.49; 0.86)	0.73(0.63; 0.835)	0.665(0.595; 0.708)	0.485
<b>18:1 w7c/18:1 w6c</b>	9.09(8.97; 10.07)	9.3(9.095; 10.095)	10.125(9.9; 10.358)	0.301
<b>C18:00</b>	0.5(0.39; 0.68) <sup>AB</sup>	0.44(0.375; 0.48) <sup>A</sup>	0.595(0.57; 0.658) <sup>B</sup>	<b>0.014</b>

Les valeurs de chaque acide gras sont présentées en médianes (Q1 ; Q3). Les valeurs d'une même ligne suivies de lettres différentes indiquent une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ). Les différences significatives sont indiquées en gras.

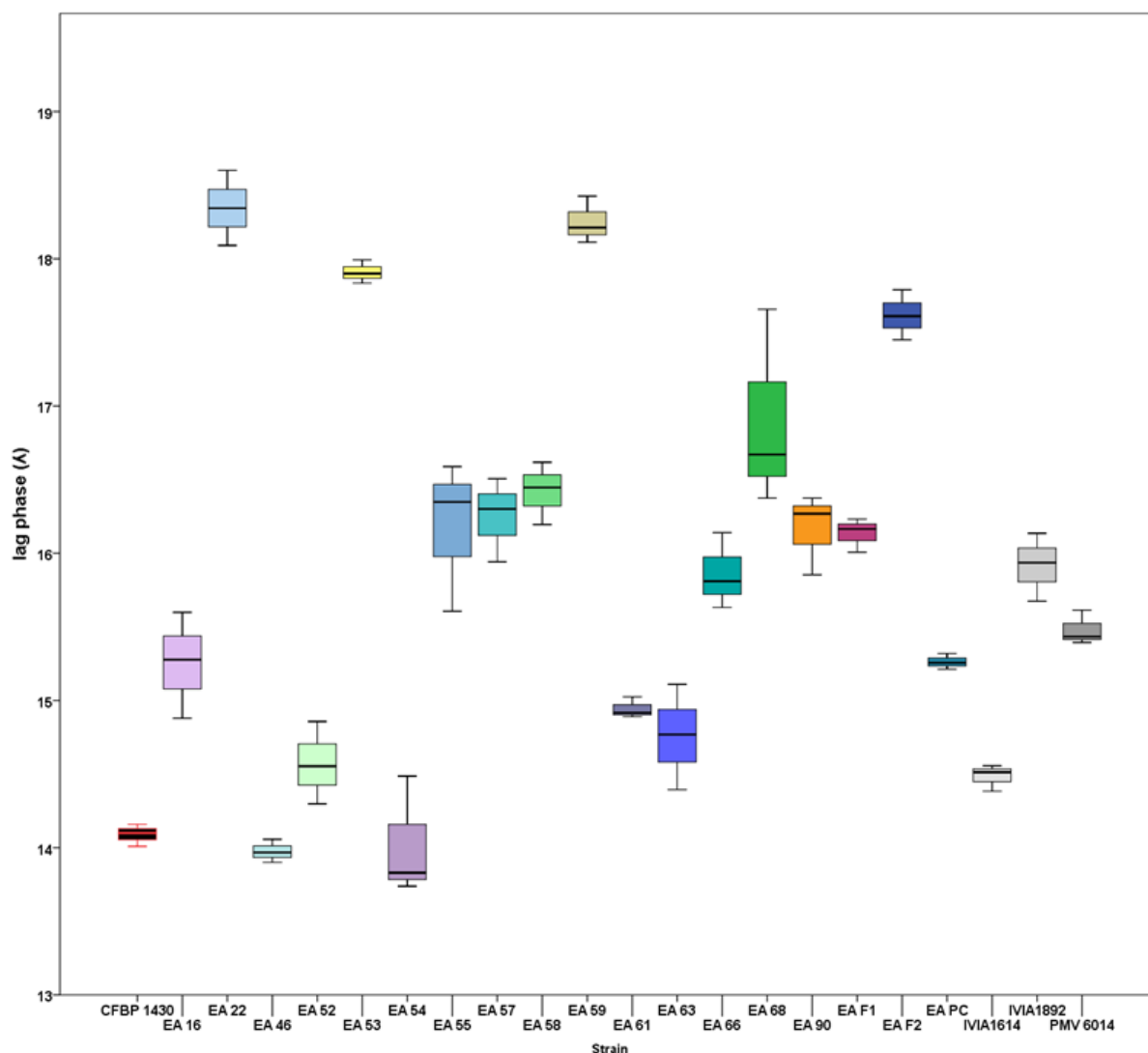
### 3.4 Paramètres de croissance

Les courbes de croissance ont été analysées pour déterminer les paramètres de croissance de chaque souche, de suivre l'évolution de la densité cellulaire au fil du temps et d'évaluer la cinétique de croissance des souches.

Des différences statistiquement significatives ont été observées dans trois paramètres clés : la phase de latence ( $\lambda$ ), le taux de croissance maximal ( $\mu$ ) et l'aire sous la courbe (AUC) ( $p < 0,001$ ).

### 3.4.1 Phase de latence

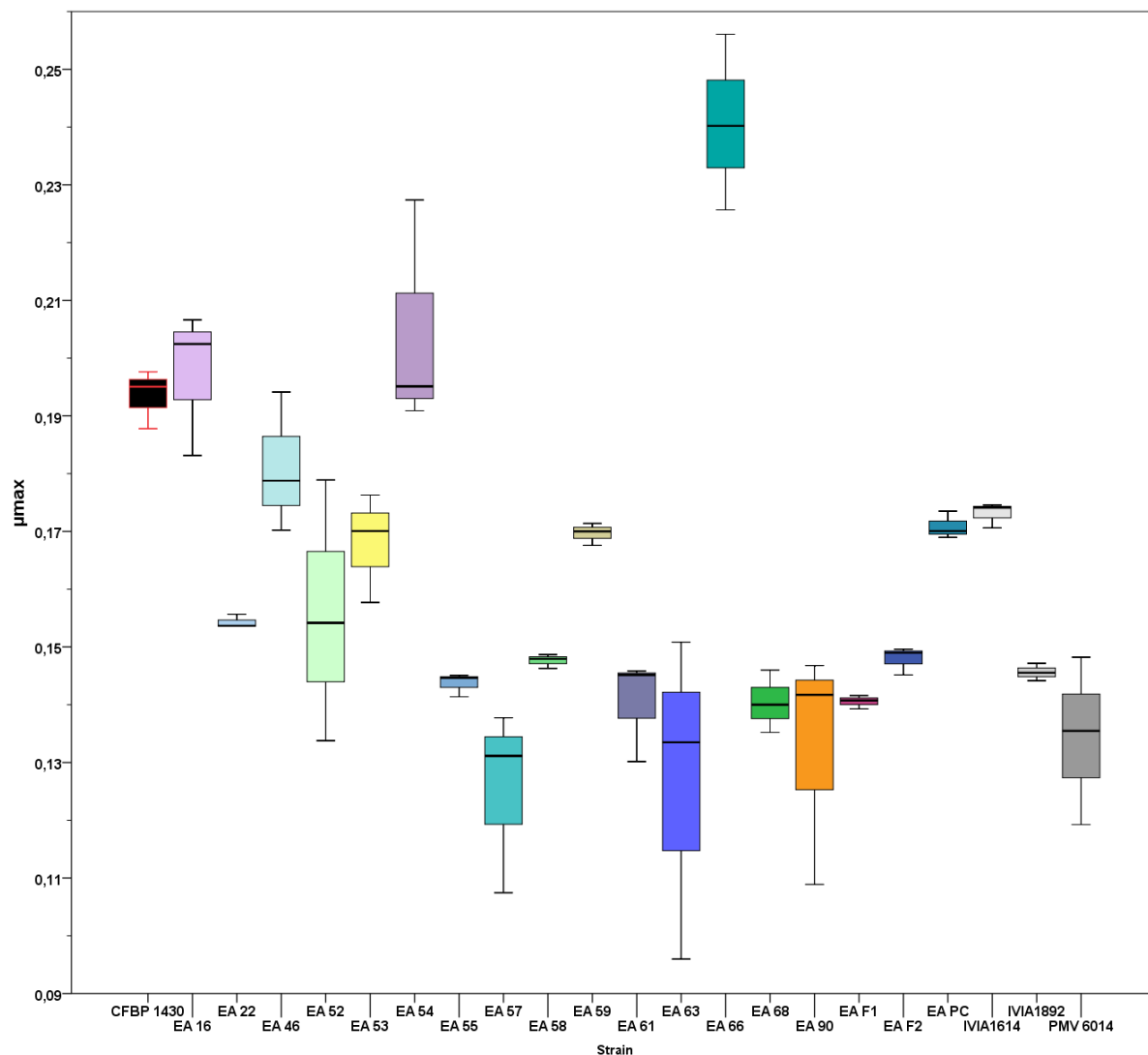
La phase de latence correspond à la période d'adaptation avant que la souche ne commence la croissance exponentielle. La souche EA54 a la phase de latence la plus courte, avec un temps médian de 13,83 heures, tandis que la souche EA22 a la phase de latence la plus longue, avec un temps médian de 18,34 heures (**Figure 33**).



**Figure 33.** Comparaison de la durée de la phase de latence ( $\lambda$ ) parmi les souches étudiées.

### 3.4.2 Taux de croissance maximal ( $\mu$ )

$\mu$  Représente la vitesse maximale de croissance pendant la phase exponentielle cela reflète la rapidité de prolifération. Les taux de croissance maximaux variaient de  $0,24 \text{ h}^{-1}$  pour la souche EA66 à  $0,13 \text{ h}^{-1}$  pour la souche EA57 (**Figure 34**).



**Figure 34.** Comparaison du taux de croissance maximal ( $\mu$ ) parmi les souches étudiées.

### 3.4.3 Aire sous la courbe (AUC)

Ce paramètre représente le potentiel de croissance total d'une souche. L'AUC varie significativement entre les souches, avec EA22 et EAF2 ayant les valeurs les plus faibles (32,76

et 33,31), tandis que la souche EA54 présente le potentiel de croissance le plus élevé, avec une valeur de 46,2 (Figure 35).

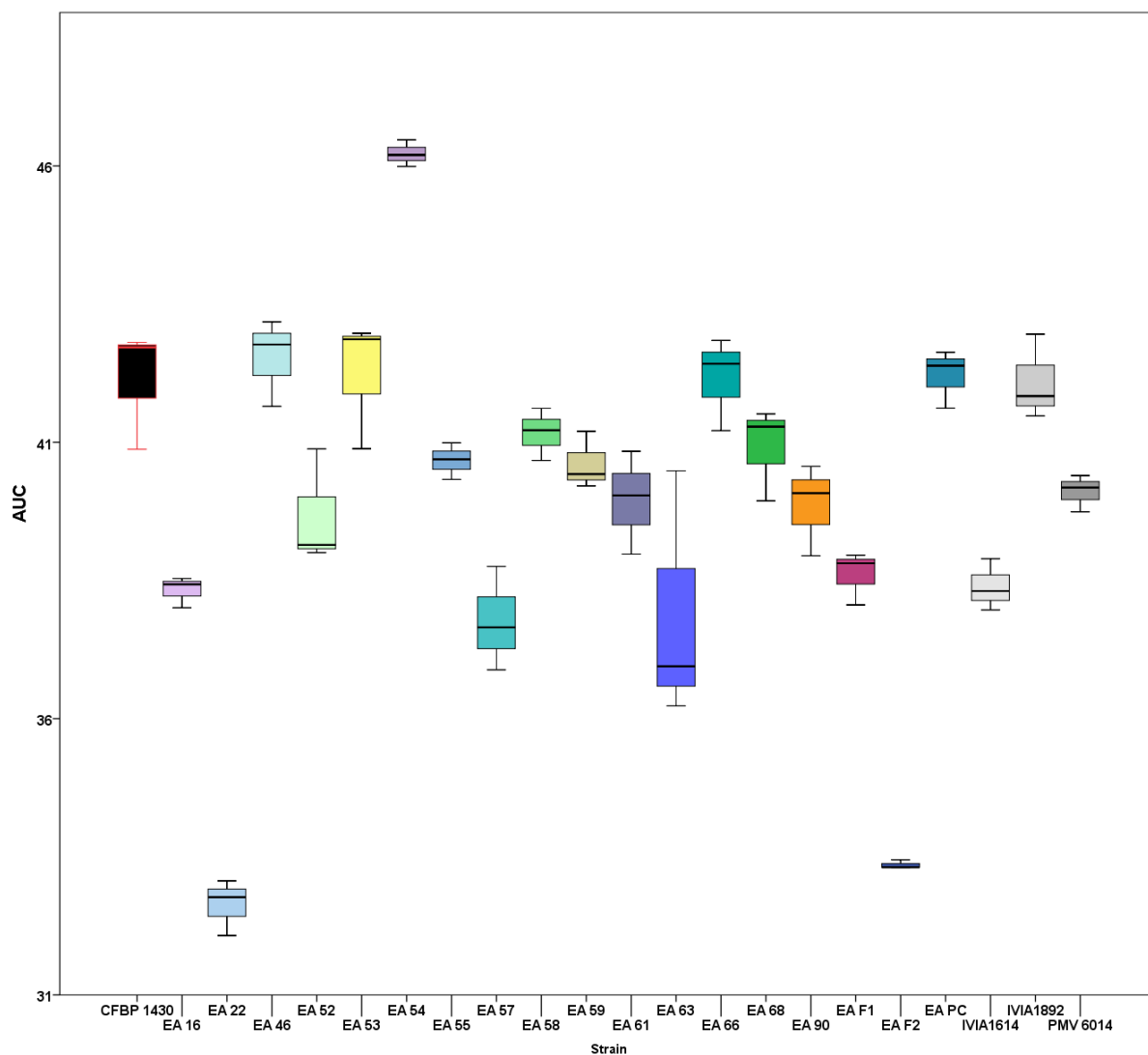
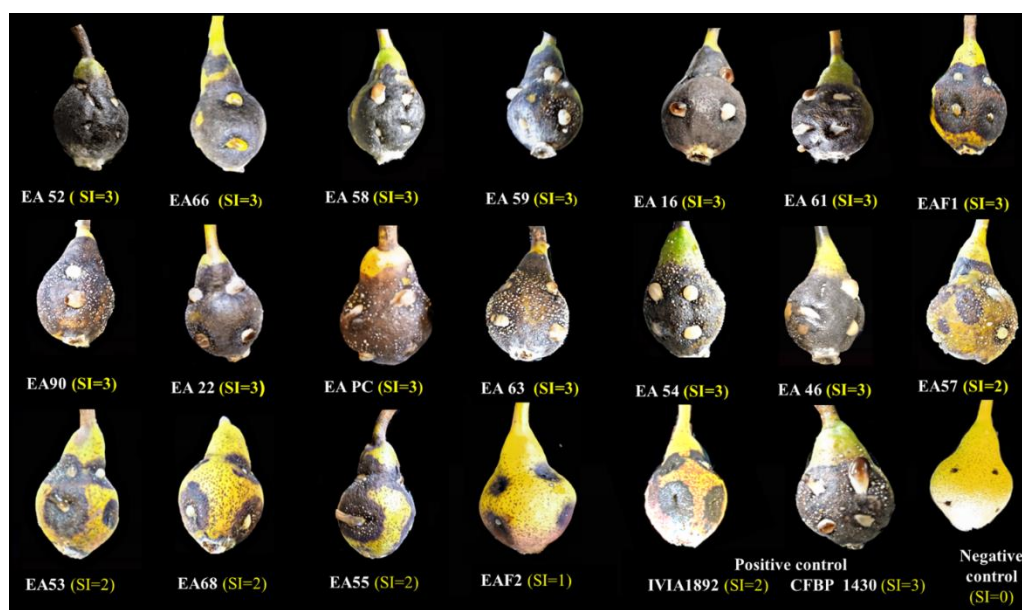


Figure 35. Comparaison de l'aire sous la courbe (AUC) entre les différentes souches.

### 3.5 Test de virulence

L'analyse de virulence réalisée sur des poires immatures a montré que toutes les souches algériennes d'*E. amylovora* ont provoqué de la nécrose et / ou l'exsudation dans un délai de 7 jours après l'inoculation (Figure 36). Cependant, ces souches présentent des niveaux de virulence variables et ont été classées en trois catégories en fonction de l'étendue de la nécrose :

- **Virulence élevée (SI = 3).** 72,22 % des souches, soit 13 souches (EA16, EA22, EA46, EA52, EA54, EA58, EA59, EA61, EA63, EA66, EA90, EAF1 et EAPC) ont provoqué une nécrose qui a progressé depuis le site d'inoculation et a envahi presque tout le tissu du fruit.
- **Virulence moyenne (SI = 2).** 22,22 % des souches : quatre souches (EA53, EA55, EA57 et EA68) ont induit une nécrose plus limitée.
- **Virulence faible (SI = 1).** 5,56 % des souches : La souche EAF2 a été la moins virulente, la nécrose est restée limitée au site d'inoculation.



**Figure 36.** Symptômes causés par différentes souches d'*E. amylovora* sur des fruits de poire immatures après inoculation.

### 3.6 Analyse statistique

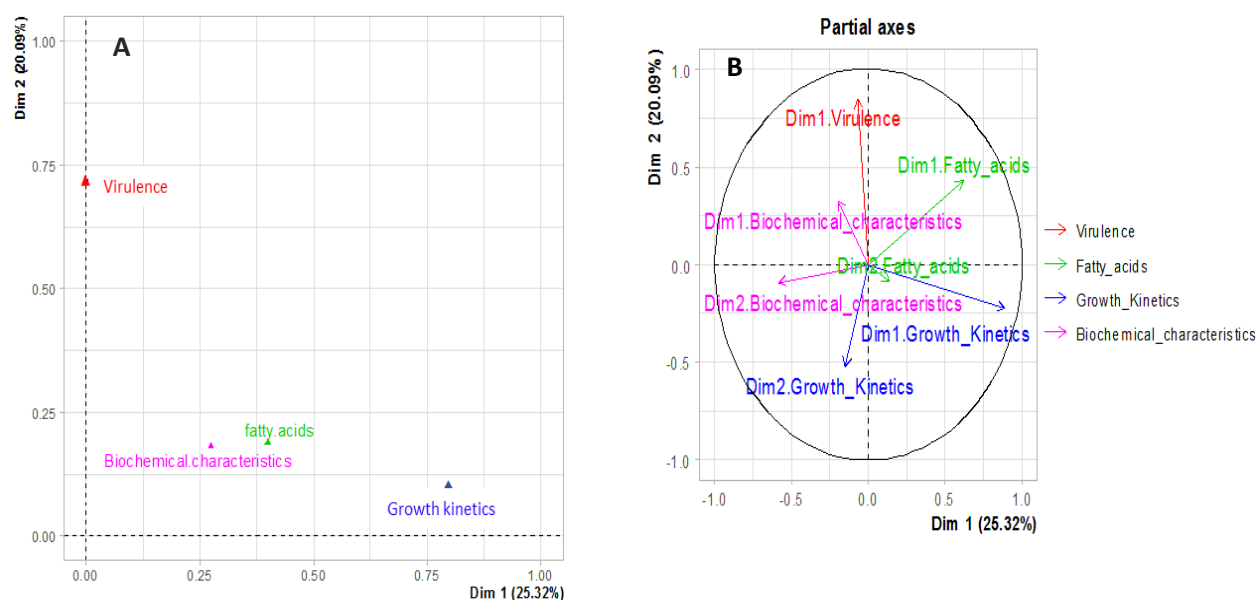
#### 3.6.1 Corrélations entre la virulence et les caractéristiques de croissance

L'analyse statistique a révélé une relation entre la virulence et la cinétique de croissance, ce qui suggère que les souches les plus virulentes ont tendance à croître plus rapidement, avec une corrélation positive significative ( $r = 0,336$ ,  $p = 0,006$ ) entre la virulence et le taux de croissance. Une corrélation négative significative ( $r = -0,397$ ,  $p = 0,001$ ) a également été observée entre la virulence et la durée de la phase de latence, ce qui suggère que les souches virulentes ont tendance à avoir une phase de latence plus courte.

### 3.6.2 Analyse factorielle multiple

Pour analyser le phénotype global des souches, une AFM a été réalisée.

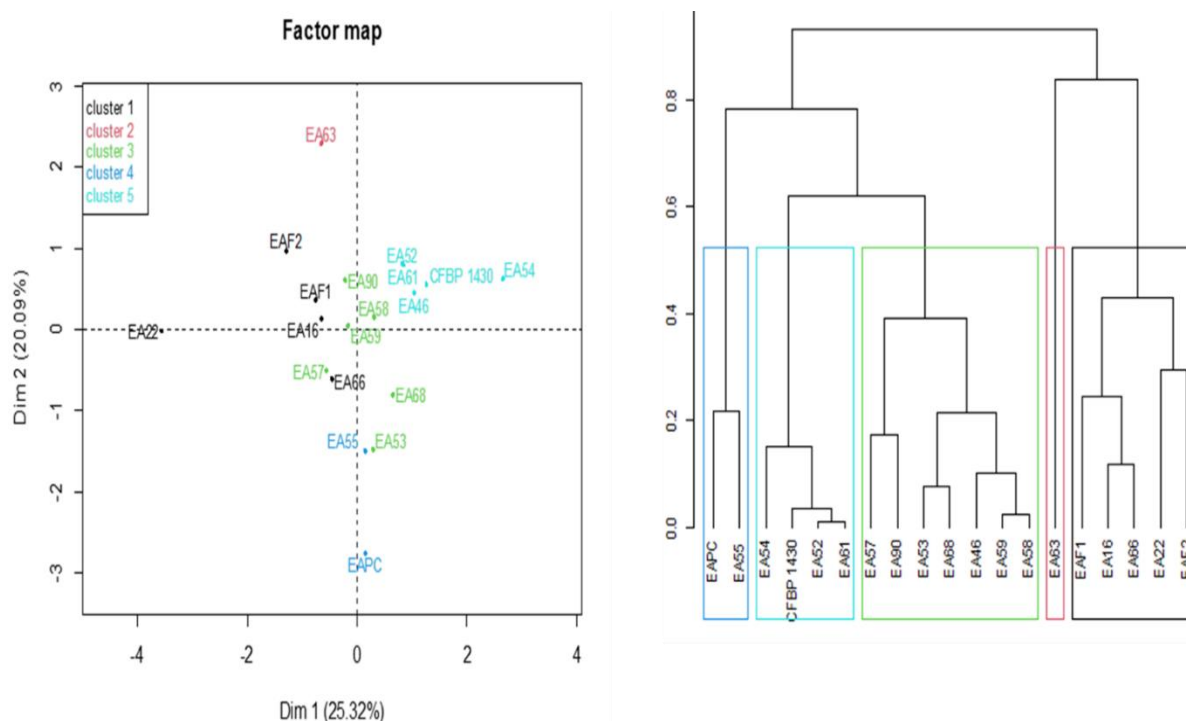
La première dimension, qui explique 25,32 % de la variabilité totale, montre une corrélation positive notable avec la cinétique de croissance, ainsi qu'une corrélation faible avec la composition en acides gras et les traits biochimiques. La deuxième dimension, qui explique 20,09 % de la variabilité, est principalement corrélée avec les caractéristiques de virulence, avec une association plus faible pour les paramètres liés aux acides gras et aux traits biochimiques (**Figure 37**).



**Figure 37.** Représentation graphique des associations entre les facteurs et les dimensions de l'AFM : **A.** Projection des facteurs sur les deux premières dimensions, **B.** Cercle de corrélation.

L'analyse hiérarchique a permis d'identifier cinq phénotypes distincts (**Figure 38**). Le premier groupe comprend les souches EAF1, EAF2, EA16, isolées des vergers de la wilaya de Mila, ainsi la souche EA22, isolée d'un verger à Sétif. La majorité de ces souches (80 %) provient de l'est de l'Algérie. La souche EA63 forme un groupe à part. Le groupe 3 regroupe les souches EA53, EA57, EA58, EA59, EA68 et EA90. Le quatrième groupe regroupe les souches EA46, EA52, EA54, EA61 ainsi que la souche de référence CFBP1430. Les groupes 3 et 4

comprennent des souches isolées des régions centre-ouest de l'Algérie. Le groupe 5 contient uniquement les 2 souches EA55 et EAPC.



**Figure 38.** Représentation des groupes de souches issus de l'analyse AFM : **A.** La carte factorielle illustre la répartition des différents groupes de souches sur les deux premières dimensions ; **B.** Le dendrogramme représente les groupes.

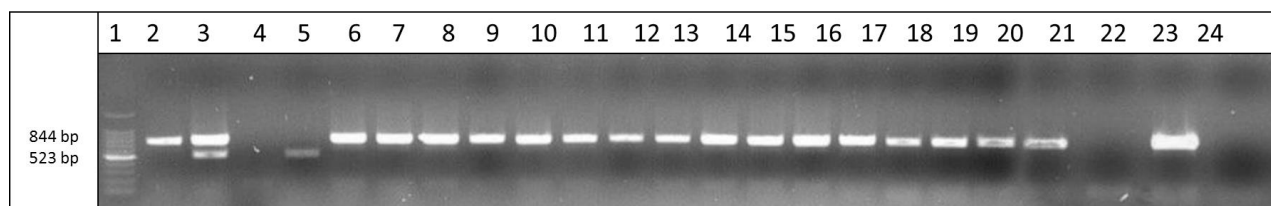
## 4. Caractérisation génotypique

### 4.1 Détection des plasmides

Afin de détecter la présence des plasmides pEA29 et pEI70, la souche CFBP1430 a été utilisée comme contrôle positif pour le plasmide pEA29, tandis que la souche IVIA1892 a été utilisée pour les deux plasmides. La souche 1614 a servi de contrôle positif pour pEI70, et la souche 6014 a été utilisée comme contrôle négatif pour les deux plasmides.

L'analyse par électrophorèse des produits PCR a montré que toutes les souches algériennes ont généré une bande de 844 pb, ce qui confirme la présence du plasmide pEA29, à l'exception de la souche EAF2, qui n'a produit aucune bande, indiquant qu'elle ne possède pas ce plasmide.

Aucune souche algérienne n'a montré la bande de 523 pb attendue pour le plasmide pEI70, ce qui confirme qu'aucune souche de notre collection ne possède ce plasmide (**Figure 39**).



**Figure 39.** Profils électrophorétiques des produits de PCR multiplex avec les amorces AJ75/AJ76 et 1.7F-2/1.7R-2 pour la détection des plasmides pEA29 et pEI70 sur gel d'agarose à 1%. 1 : marqueur de taille 100 pb, 2 : souche de référence CFBP1430, 3 : IVIA1892, 4 : PMV6014, 5 : IVIA1614, 6-23 : souches EA16, EA22, EA46, EA52, EA53, EA54, EA55, EA57, EA58, EA59, EA61, EA68, EA66, EA63, EA90, EAF1, EAF2, EAPC, 24 : contrôle négatif.

## 4.2 VNTR

L'analyse VNTR n'a montré aucun polymorphisme entre les souches isolées dans cette étude, ce qui suggère une homogénéité génétique entre elles (**Figure 40**).



**Figure 40.** Profils de PCR fingerprinting obtenus pour les souches algériennes d'*E. amylovora*.

## 4.3 MLST

Les séquences partielles des gènes *recA*, *groEL*, *rpoS*, *hrpN* et *ams* ont été amplifiées et séquencées avec succès pour toutes les souches (**Annexe III**).

Les séquences de chaque gène étaient identiques pour toutes les souches, et aucune mutation n'a été détectée, ce qui confirme ainsi l'homogénéité démontrée par l'analyse VNTR.

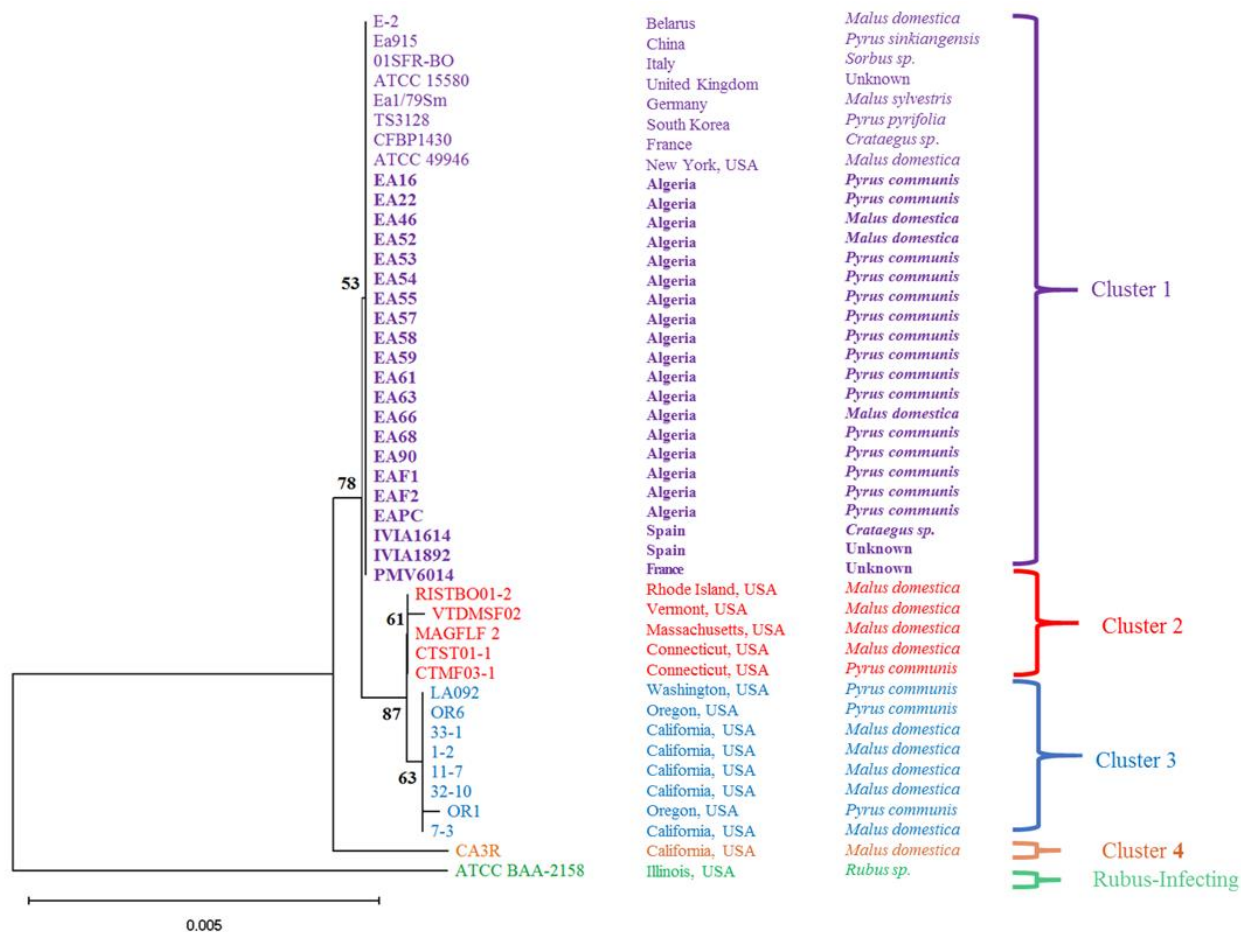
La comparaison de ces gènes avec la base de données GenBank a confirmé que toutes les souches appartiennent à *E. amylovora*, avec une identité de 100 % par rapport aux souches de référence CFBP1430 et ATCC49946, et des identités comprises entre 95,63 % et 100 % par rapport aux autres séquences déposées dans la base de données GenBank de NCBI.

#### **4.3.1 Analyse phylogénétique**

L'arbre phylogénétique construit à partir des fragments concaténés de 4311 pb des cinq gènes de chaque souche (**Figure 41**), inclue également des séquences d'autres souches déposées dans GenBank NCBI, a montré que les souches infectant *Amygdaloideae* sont réparties en quatre groupes. Les souches algériennes étaient toutes regroupées dans un seul cluster, avec des souches originaires de différents pays et continents : Biélorussie, Chine, Italie, France, Allemagne, Corée du Sud, Espagne, Royaume-Uni et États-Unis.

Les autres souches américaines ont été réparties dans les trois autres clusters selon leur origine géographique, avec celles de l'est du pays regroupées dans le cluster 2 et celles de l'ouest dans le cluster 3. La souche CA3R se distinguait des autres et formait son propre cluster.

La souche infectant *Rubus* a été utilisée comme outgroup pour enraciner l'arbre et s'est révélée éloignée des autres groupes.



**Figure 41.** Arbre phylogénétique reconstruit par la méthode du neighbor-joining, basé sur les séquences concaténées des gènes *ams*, *recA*, *groEL*, *hrpN* et *rpoS*, des souches algériennes d'*E. amylovora* ainsi que d'autres souches.

#### 4.4 CRISPR

Les trois régions CRISPR ont été amplifiées et séquencées avec succès. Après l'assemblage, les séquences ont été visualisées sur le site [CrisprCasFinder](https://crisprcasfinder.com/) afin de déterminer les séquences répétitives et les espaceurs (**Figure 42**). Un espaceur est considéré comme différent d'un autre s'il présente une différence de plus de 5 nucléotides.

L'analyse a révélé la présence de 74 espaceurs (**Annexe IV**) au sein des trois régions CRISPR présents chez les 18 souches d'*E. amylovora*.

	<input checked="" type="checkbox"/> Search DR in database	<input checked="" type="checkbox"/> Search Spacers in database
1	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	TTATTTCATGAGCCTTTTTATCTTCGCGGCATG
62	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	GTAAATAGCAAAATGATAAATAATTTATCAAT
123	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	CTATGCAGAAGCGGAGGGCGCGAGTGATGGA
184	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	AGCATCTCGGAACTGTGTTTTTGTATAAAA
245	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	AAGATGCTTTGACATTAATTATCTCCATAAAA
306	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	CAAGCGATCAACCTGTTTTTCAGTAGGTTTAA
367	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	GATTGCGCATGAGCACTGAAATTTGTTACAGC
428	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	GATTGCGCATGAGCACTGAAATTTGTTACAGC
489	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	ACAAAAGACAACACCCCCCTTACCCCCCACG
550	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	CAGGTATTTCCGGTAGCCGGTGTCTCGGCGG
611	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	ACTGAAATTTAAAATCACCGCTAACCCGCCAG
672	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	GGCGATGAGGGAGTACGCGGAGCGGCAGGTA
733	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	AAAAGCCAACCGCCGCCCTAATAAACCTGA
794	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	GTTGCAGAGACTTAAAGATCGTCTGCTAGTTA
855	GTGTTCTCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	TAAATGGTTGTCGGTCTTTGGCGCAGACGGCT
916	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	TAAAGGAGCATGCTTATACAACGACAAAATC
977	GTGTTCCCCGCGATGAGCGGGGATAAACCG	AGATTTGGCGGAAATGTCGGCGGAGATGCCCC
1038	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	AAATGTCCGTGGCTCGGCCCGATGCTGCAAT
1099	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	GAGATCATTCTCATCCCTCATGTTTTCCAGGA
1160	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	ATTGTAATACTCTCCGCCAAATTTGATTAC
1221	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	AAACTCTCGCATACATGGACGGAAATTAACGA
1282	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	ACGATTTGCCTGAAACCTCAACGAAGTTCGAC
1343	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	CTGATGGCGTCACGAGCCATACGGAAATGTGAC
1404	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	CAAAAATTTGCGCATGTCATCTATCTTTTTTT
1465	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	CCCTCGGGGAGGGCTTTGCGTTGTTACTCAGA
1526	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	GTTACGTTGAATGTATCGTTGGATGTGATTA
1587	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	TACATCGAACAATGCCAATTTGTTGACGTTCTT
1648	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	CCGCGAAAATCCGCACTGAGCTGGCAATGAGC
1709	GTGTTCCCCGCGTTAGCGGGGATAAACCG	GCTGTCTATCTGGGCTGCCTATCCAGCAAT
1770	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	ACTTCGGTGAGAATGTCGAATGCCACCAGAT
1831	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	TTGAATCAGAGTCTTTACGGGACGATGTTTTT
1892	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	TGAAGCAGCCAGAATCCCATCCGGCCTTTATC
1953	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	GCTTTTGTACCCCTTACAGTCAACGTAAGTCT
2014	GTGTTCCCCGCGTGAGCGGGGATAAACCG	AGATTGAGATCTTATCAACGGACTCTGACGCC

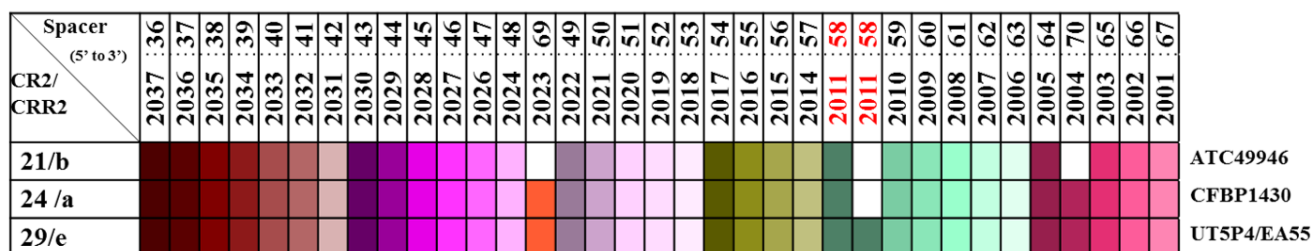
**Figure 42.** Recherche des séquences DR et des espaceurs à l'aide du site [CrisprCasFinder](https://crisprcasfinder.com/). Les séquences DR sont représentées en jaune et les espaceurs sont affichés en différentes couleurs.

#### 4.4.1 CRISPR 1

L'analyse de la région CRISPR 1 a révélé la présence de régions répétitives DR de 29 pb (GTG TTC CCC GCG TGA GCG GGG ATA AAC CG), conservées à 95,78 %. Cependant, toutes les souches algériennes présentent une mutation à la 15<sup>ème</sup> séquence répétitive où une substitution C→T a été observée (GTG TTC **TCC** GCG TGA GCG GGG ATA AAC CG), cette mutation est absente chez les souches espagnoles IVIA1614, IVIA1892 ainsi que la souche PMV6014 et la souche de référence CFBP 1430 utilisées pour la comparaison.

L'analyse BLAST de cette région a révélé que seules des souches italiennes présentent cette mutation.





**Figure 44.** Représentation des espaceurs de la région CRISPR2 des souches étudiées, ainsi que des souches de référence ATCC49946.

### 4.4.3 CRISPR 3

La région CRISPR 3 est plus courte que les régions CRISPR 1 et CRISPR 2. Sa région répétitive est constituée de séquences de 28 pb (GTT CAC TGC CGT ACA GGC AGC TTA GAA A), conservées à 77,19 % elle comprend cinq espaceurs. L'analyse de cette région n'a révélé aucune différence entre les souches, toutes présentant le motif 38/  $\alpha$  (**Figure 45**).



**Figure 45.** Représentation des espaceurs de la région CRISPR 3 des souches étudiées, ainsi que des souches de référence ATCC49946.

### 4.4.4 Génotype

La combinaison des trois génotypes a révélé qu'au total, trois génotypes ont été détectés (**Figure 46**), avec la majorité des souches présentant le génotype CRISPR (4-24-38/A-a- $\alpha$ ). Cependant, les souches EA54 et EA55 ont montré de nouveaux génotypes qui n'avaient pas été détectés précédemment : (NP-24-38/N-a- $\alpha$ ) et (4-29-38/A-e- $\alpha$ ), respectivement. Malgré ces variations, toutes les souches appartiennent au groupe I.



**Figure 46.** Les génotypes CRISPR identifiés chez les souches algériennes d'*Erwinia amylovora* testées dans cette étude (A-C), comparés aux souches ATCC49946, Ea1/79Sm et TS3128 (D-F).

**A.** Le génotype le plus courant (4-24-38/A-a- $\alpha$ ) identifié dans cette étude, également présent dans la souche CFBP1430 ; **B.** Le nouveau génotype (NP-24-38/N-a- $\alpha$ ) identifié dans la souche EA54 ; **C.** Le nouveau génotype (4-29-38/A-e- $\alpha$ ) identifié dans la souche EA55 ; **D.** Le génotype (1-21-38/B-b- $\alpha$ ) identifié dans la souche ATCC49946 ; **E.** Le génotype (5-24-38/D- $\alpha$ - $\alpha$ ) précédemment trouvé dans la souche Ea1/79Sm ; **F.** Le génotype (2-22-38) identifié dans la souche Coréenne TS3128.

CHAPITRE IV  
DISCUSSION

## Chapitre IV. Discussion

Le feu bactérien est la maladie la plus destructrice des arbres fruitiers à pépins. Il a été détecté pour la première fois en Algérie en 2010 (**Laala et al., 2012**), depuis lors, il n'a cessé de se propager dans différentes régions. Plusieurs épidémies ont touché le pays, ce qui représente une réelle préoccupation pour les arboriculteurs.

Il n'existe que deux études réalisées en Algérie sur *E. amylovora*. L'étude de **Tafifet et al. (2020)** a analysé une collection de souches isolées à partir de vergers situés au centre de l'Algérie, mais elle reste limitée en termes de couverture géographique et de résolution. Ainsi, la diversité et l'origine de *E. amylovora* en Algérie restent encore à étudier.

Par conséquent, cette étude a été menée afin d'examiner l'épidémiologie, la diversité génotypique et phénotypique de ce pathogène. En effet, dix-huit souches ont été isolées entre 2016 et 2021 à partir de vergers situés dans les wilayas de Chlef, Aïn Defla, Tipaza, Blida, Sétif, Constantine et Mila. Ces souches fournissent des informations supplémentaires sur l'évolution et la dissémination du pathogène sur un territoire couvrant 500 km.

La plupart des souches (15/18) ont été isolées du poirier, plus précisément de la variété Santa Maria. Ces résultats étaient attendus, car le poirier est plus sensible au feu bactérien que le pommier et les autres hôtes (**Evans et al., 2008**), en particulier la variété Santa Maria, qui est classée parmi les variétés les plus sensibles à cette maladie (**Evrenosoğlu et al., 2011 ; Ristevski et Ristevska, 1996**). En outre, souches ont été isolées des vergers d'Aïn Defla, qui est considérée parmi les principales zones de production de poiriers en Algérie (**Agrichem, 2019**).

L'analyse du profil biochimique a révélé une homogénéité avec quelques variations entre les souches en termes de dégradation du mélibiose et de l'inositol, ainsi que d'activité  $\beta$ -galactosidase. Cela est cohérent avec le profil biochimique d' *E. amylovora* (**EPPO, 2022**). Des variations dans le métabolisme de ces composants ont déjà été détectées (**Donat et al., 2005 ; Végh et al., 2017**). Le profil 0005522, qui était le plus fréquemment observé, a déjà été documenté comme étant le profil dominant dans des études précédentes (**Paulin et Samson,**

1973 ; Verdonck *et al.*, 1987). Le deuxième profil identifié, 1005522, était également le plus fréquent parmi les souches espagnoles (Donat *et al.*, 2005).

L'analyse de la composition en acides gras représente un critère taxonomique fondamental (Dickstein *et al.*, 2001). Elle a déjà prouvé son utilité comme outil d'identification et de distinction des souches d'*E. amylovora* par rapport à d'autres bactéries phytopathogènes (Geider *et al.*, 2006 ; López *et al.*, 2011). En effet, elle confirme que de toutes les souches appartiennent à *E. amylovora*, notamment en raison de la présence de l'acide gras 14:0 3OH dans chacune d'elles, cet acide est caractéristique du groupe *amylovora* (Ivanović *et al.*, 2012). Cependant, des différences qualitatives ont été observées entre les souches, notamment par la présence des acides C13:0, C10:0 et C19:0, détectés uniquement avec des quantités minimales dans la composition de trois souches. Cette présence a déjà été signalée dans des études précédentes (Casano *et al.*, 1988 ; Geider *et al.*, 2006 ; Ivanović *et al.*, 2012).

Toutefois, les profils en acides gras ont permis de classer les souches en trois groupes. Les souches isolées de l'est du pays (Constantine, Mila et Sétif) ont été groupées dans le cluster I, même si certaines ont été isolées à cinq ans d'intervalle, sauf la souche EAF2 qui a été classée en cluster II. De leur côté, le cluster III, regroupe uniquement des souches provenant des régions du centre-ouest de l'Algérie (Ain Defla, Blida, Chlef et Tipaza). Ainsi, cette analyse a démontré une capacité de différenciation des souches selon leur origine géographique, ce qui suggère l'influence de l'origine d'isolement sur le métabolisme lipidique. Ces résultats sont comparables à ceux observés dans l'étude d'Ivanović *et al.* (2012) sur les souches serbes, qui ont également été classées selon leur origine géographique.

Une autre caractéristique phénotypique essentielle permettant une différenciation rapide des souches est la croissance bactérienne (Mendes *et al.*, 2022). Les différences observées dans la cinétique de croissance entre les souches indiquent qu'elles pourraient avoir des capacités d'adaptation et de pathogénicité variables lors de l'interaction avec la plante hôte. Cette hypothèse est soutenue par la corrélation que nous avons trouvée entre la cinétique de croissance et la virulence, en accord avec des études antérieures montrant que les souches bactériennes à croissance rapide et à phase de latence plus courte tendent à être plus virulentes et plus adaptées (Arends *et al.*, 2022 ; Lee *et al.*, 2010 ; West et Buckling, 2003). Cela pourrait être lié à une production accrue de sidérophores, considérée comme un facteur de virulence, associée à des taux de croissance élevés (West et Buckling, 2003).

Nos souches ont montré de légères variations de virulence, ce qui est cohérent avec plusieurs études qui ont rapporté des différences dans des collections de souches d'*E. amylovora* (**Gong et al., 2025 ; Mann et al., 2013 ; Mendes et al., 2021**). Ces variations pourraient être liées à des différences génétiques, telles que la présence ou l'absence de certains plasmides, notamment pEA29 (**Llop et al., 2012 ; Singh et Khan, 2019**). Ainsi, l'absence de ce plasmide explique la faible virulence observée chez la souche EAF2.

De plus, des mutations qui affectent le régulateur global Hfq ou l'effecteur AvrRpt2 ont également été identifiées comme responsables d'une diminution de la virulence (**Zeng et al., 2018 ; Zhao et al., 2006**).

Cependant, malgré ces variations génétiques, il a été suggéré que les souches d'*E. amylovora* génétiquement homogènes pourraient ajuster l'expression des gènes de virulence ou leur capacité à provoquer la maladie pour s'adapter à divers hôtes végétaux (**Gong et al., 2025 ; Mann et al., 2013 ; Wang et al., 2010**).

Bien que l'analyse génétique révèle une certaine homogénéité génétique entre nos souches, l'analyse phénotypique globale a révélé des différences significatives, ceci est en accord avec les résultats rapportés par **Mendes et al. (2022)**. Plusieurs études ont bien documenté que des variations phénotypiques peuvent exister au sein des populations génétiquement homogènes (**Ackermann, 2015 ; Calabrese et al., 2019 ; Spratt et Lane, 2022**).

L'AFM a suggéré une possible association entre le phénotype et la région d'isolement, cela pourrait être attribué, l'adaptation aux pressions environnementales évolutives locales qui peuvent entraîner des fluctuations dans l'expression des gènes, influencées par des phénomènes aléatoires ou des régulations complexes (**Raj et al., 2010 ; Weigel et Dersch, 2018**).

L'absence de résistance à la streptomycine chez toutes les souches testées indique qu'elles ne possèdent ni mutation chromosomique du gène *rpsL*, ni les gènes *strA-strB* (**McGhee et Sundin, 2011**). Ce résultat est en accord avec des données précédentes indiquant que la résistance à cet antibiotique n'a pas été signalée dans des pays voisins comme le Portugal et l'Espagne (**Donat et al., 2005 ; Mendes et al., 2022**). Elle n'a été rapportée que dans certains pays, les États-Unis, Canada, le Mexique et la Nouvelle-Zélande (**Förster et al., 2015 ; McGhee**

*et al.*, 2010; McGhee et Sundin, 2011). Ainsi, l'origine de ces souches pourrait provenir de zones où *E. amylovora* n'a pas développé de résistance à la streptomycine.

La présence de plasmides est l'un des facteurs déterminant la diversité génétique, la virulence et l'adaptation d'*E. amylovora* (Llop *et al.*, 2012). Parmi eux, pEA29 est considéré comme le plus important, car il est presque ubiquitaire. Il a été détecté chez toutes les souches étudiées, à l'exception de EAF2, il participe à l'infection et à la colonisation des plantes, grâce à des gènes impliqués dans le métabolisme de la thiamine, qui favorise la synthèse de l'amylovoran et la formation du biofilm, deux facteurs importants de la virulence (Yuan *et al.*, 2021b).

L'absence du plasmide chez cette souche, associée à un profil lipidique différent de celui des autres souches de la même région, pourrait indiquer une origine ou une introduction indépendante.

Notre étude est la première en Algérie qui signale l'absence de ce plasmide. Cependant, des souches dépourvues de ce plasmide ont déjà été détectées en Égypte, en Iran, en Espagne et en Allemagne (Mohammadi *et al.*, 2009).

De plus, le plasmide pEI70 peut être impliqué dans l'agressivité des souches. Cependant, notre étude n'a pas détecté sa présence en Algérie, ce qui s'aligne avec d'autres études indiquant qu'il est principalement présent en Europe (Llop *et al.*, 2011). Ces résultats contribuent ainsi à une meilleure compréhension de la distribution mondiale de ces plasmides.

La caractérisation génétique par MLST et VNTR a révélé une forte homogénéité entre nos souches, ceci n'est pas surprenant puisqu'il est largement connu qu'*E. amylovora* est une bactérie génétiquement homogène (Mann *et al.*, 2013 ; Zeng *et al.*, 2018 ; Zhao et Qi, 2011). D'ailleurs, dans de nombreuses études à travers le monde, notamment au Maroc (Hannou *et al.*, 2013), en Tunisie (Dardouri *et al.*, 2017), en Iran (Refahi *et al.*, 2017), en Kirghizistan (Doolotkeldieva *et al.*, 2019), en Serbie (Popović *et al.*, 2020), en Corée (Song *et al.*, 2021) et au Portugal (Mendes *et al.*, 2021 ; Mendes *et al.*, 2022), ont également rapporté la présence de populations très homogènes, quel que soit le type d'approche utilisé notamment l'analyse VNTR, l'analyse de séquences multilocus ou le séquençage du génome complet.

Il est important de noter que ces souches ont été isolées à partir de poiriers et de pommiers, à la sous-famille des *Amygdaloideae*, où les souches d'*E. amylovora* qui les infectent sont génétiquement plus homogènes que celles qui infectent les *Rubus* (Bühlmann *et al.*, 2014 ;

**Mann et al., 2013 ; McGhee et Sundin, 2012 ; Parcey et al., 2020 ; Piqué et al., 2015**). Cette différence peut être liée à l'environnement des framboisiers, étant plus proches du sol, ils sont exposés aux micro-organismes et aux phages, ce qui entraîne une plus grande variabilité génétique parmi les souches qui les infectent (**Parcey et al., 2022**).

D'autre part, l'effet de goulot d'étranglement causé par la culture intensive des pommiers et des poiriers en Amérique dans les années 1700 est un autre facteur qui peut expliquer cette homogénéité, puisqu'il a entraîné une réduction de la taille des populations (**McGhee et Sundin, 2012 ; Zeng et al., 2018**). De plus, la petite taille relative du génome par rapport à celle d'autres bactéries phytopathogènes, ainsi que son noyau hautement conservé, contribuent à cette homogénéité (**Mann et al., 2013 ; Sebaihia et al., 2010**).

Néanmoins, l'utilisation de MLST avec les marqueurs *groEl*, *recA*, *ams*, *rpoS* et *hrpN* pour la première fois permet une identification taxonomique précise des souches d'*E. amylovora*. Elle s'est également révélée être un outil efficace pour différencier les souches en fonction de leur origine géographique. À cet égard, la typologie de l'arbre phylogénétique obtenu est très comparable à celles produites par la comparaison des séquences de pEA29 et du génome entier, révélant quatre groupes bien définis : largement prévalent, Est des États-Unis, Ouest des États-Unis 1 et Ouest des États-Unis 2 (**Parcey et al., 2020 ; Zeng et al., 2018**).

Toutes les souches algériennes appartenaient au cluster 1, ou le groupe largement prévalent, qui regroupe de nombreuses souches d'*E. amylovora* étroitement liées isolées dans différentes régions du monde. Toutefois, au sein de ce clade, le taux de mutation est très faible, les différences entre les souches étant soutenues par seulement 4 à 259 SNP (**Zeng et al., 2018**). Cela est probablement dû au nombre limité d'événements de dissémination et à la période relativement courte de moins de 200 ans depuis l'introduction du feu bactérien des États-Unis vers d'autres régions du monde, y compris son introduction récente en Algérie, ainsi qu'une faible pression de sélection exercée par le nouvel environnement (**Parcey et al., 2020 ; Rezzonico et al., 2024b**).

L'analyse CRISPR a révélé une certaine variabilité génétique entre les souches. Parmi les trois génotypes identifiés, le plus fréquent était (4-24-38/A-a- $\alpha$ ), ce qui confirme l'homogénéité des souches détectée par MLST et VNTR.

Ce génotype a déjà été observé chez des souches isolées dans plusieurs régions méditerranéennes, notamment en Égypte, ainsi qu'en France, Italie, Espagne et Liban, mais aussi en Suisse, Allemagne, Pays-Bas, Royaume-Uni et Nouvelle-Zélande (**McGhee et Sundin, 2012 ; Rezzonico et al., 2011**).

Il se distingue des génotypes identifiés chez d'autres souches du cluster 1 (largement prévalent) : (1-21-38) pour ATCC49946 des États-Unis (**Figure 45d**), (5-24-38) pour E-2 de Biélorussie et Ea1/79Sm d'Allemagne (**Figure 45e**), (2-22-38) pour TS3128 de Corée du Sud (**Figure 45f**) (**Ham et Park, 2023**), ainsi que d'autres génotypes trouvés au Portugal (**Mendes et al., 2021**), au Kirghizistan (**Doolotkeldieva et al., 2021**) et en Géorgie (**Gaganidze et al., 2021**).

Deux nouveaux génotypes, jusqu'alors jamais décrits, ont été identifiés. La souche EA54 présente une suppression de l'espaceur 22/1014, ce qui a permis de détecter un motif CR1 inconnu jusqu'à présent et d'identifier un nouveau génotype CRISPR jusque-là non répertorié (**Doolotkeldieva et al., 2019 ; McGhee et Sundin, 2012 ; Mendes et al., 2021 ; Rezzonico et al., 2011 ; Tancos et Cox, 2016 ; Wallis et al., 2021**).

De son côté, la souche EA55 se distingue par un génotype unique (4-29-38), différent du génotype connu (4-24-38/A-a- $\alpha$ ), en raison de la duplication de l'espaceur 58/2011 dans le locus CR2. Certaines souches isolées dans l'Utah (États-Unis), comme UTRJ2, UT5P4 et UTFer3, présentent un motif CR2 29/e identique à celui de EA55, mais avec un motif CR1 différent, modifié par la suppression de plusieurs espaceurs (**McGhee et Sundin, 2012 ; Rezzonico et al., 2011**). Fait notable, le motif 29 observé chez EA55 n'avait encore jamais été signalé en dehors de l'Amérique du Nord.

Étant donné que les souches EA54 et EA55 ont été isolées de la même zone géographique et de la même période, il est probable que les changements observés dans leurs CR1 et CR2 soient une réponse adaptative à la pression sélective exercée par leur environnement. En effet, le mécanisme de suppression et de duplication des espaceurs protège la bactérie contre les phages et les plasmides. Ainsi, le système CRISPR fonctionne comme un système immunitaire adaptatif qui favorise la survie des populations bactériennes dans divers environnements, et renforce leur capacité d'adaptation (**Jiang et al., 2013 ; Lopez-Sanchez et al., 2012 ; Stout et al., 2018**).

L'analyse de la région CRISPR3 n'a révélé aucune variabilité entre les souches algériennes, toutes présentant le motif 38/ $\alpha$ , caractéristique de toutes les souches infectant les *Amygdaloideae* rapportées dans la littérature (McGhee et Sundin, 2012 ; Mendes *et al.*, 2021 ; Rezzonico *et al.*, 2011 ; Tancos et Cox, 2016 ; Wallis *et al.*, 2021). Ce résultat indique que la région CRISPR3 est généralement conservée.

Kurz *et al.* (2021) ont utilisé la duplication de l'espaceur CR1 1029 comme un marqueur pour retracer l'origine des souches d'*E. amylovora* à l'une des deux populations présentes en Europe. Comme les souches algériennes dérivent du génotype ancestral en raison de la présence de l'espaceur 1029 dupliqué dans le locus CR1, on peut en déduire qu'elles proviennent de la première épidémie qui a touché l'Europe en 1958 et s'est ensuite propagée en Angleterre, en Espagne et en France.

De manière notable, toutes les souches algériennes analysées dans cette étude présentent une mutation constante au niveau du 15<sup>e</sup> DR de l'ensemble CR1, indépendamment de l'année ou du lieu d'isolement. Également, les souches EA54 et EA55 possèdent cette mutation, malgré leurs génotypes différents. Étant donné la forte conservation des DR (Smits *et al.*, 2017), cela pourrait indiquer un ancêtre commun aux souches algériennes, qui se seraient ensuite propagées dans différentes régions du pays à la suite d'un ou plusieurs événements d'introduction.

L'analyse des séquences DR-CR1 à l'aide de la base de données NCBI BLAST a montré que les souches de Trente (Italie) et d'Algérie possèdent la même mutation DR, ce qui indique une relation étroite entre elles. Cela est en accord avec des recherches précédentes démontrant un lien entre les souches italiennes et nord-africaines (Albanese *et al.*, 2022 ; Alnaasan *et al.*, 2017).

En effet, les souches marocaines se sont révélées plus proches des souches italiennes que des autres souches européennes (Albanese *et al.*, 2022). De plus, Tafifet *et al.* (2020) ont rapporté une similarité (haplotype) entre les souches algériennes et slovènes, ces dernières étant rapportées comme d'origine italienne (Jock *et al.*, 2013). De plus, une autre étude a suggéré un ancêtre commun entre les souches algériennes et italiennes (Alnaasan *et al.*, 2017).

De plus, nos résultats suggèrent que le feu bactérien pourrait avoir été introduit en Algérie depuis le sud de l'Europe, très probablement par l'Italie. Il est particulièrement significatif que l'Algérie soit devenue la principale destination d'exportation de fruits en provenance de la

région italienne de Trente (**Knowles, 2013**), où des souches présentant la même mutation que celles de cette étude ont été découvertes, et ce, durant les premières années où le feu bactérien a commencé à apparaître en Algérie.

Le feu bactérien peut également être introduit en Algérie depuis l'Europe du Sud ou des pays tiers par le commerce de plants de pépinière et d'autres tissus végétaux. Ce facteur joue un rôle majeur dans la propagation à longue distance de la maladie (**EPPO, 2024 ; Jock *et al.*, 2002**). *E. amylovora* peut persister dans les tissus internes en tant que bactérie endophyte, sans présenter de symptôme et passant ainsi inaperçue lors des inspections visuelles. Les aérosols et les oiseaux peuvent également favoriser la dispersion à longue distance des bactéries dans les pays méditerranéens (**Beer, 1979 ; EPPO, 2024**).

## CONCLUSION

## **Conclusion**

Cette étude constitue la première analyse phénotypique, génétique et phylogénétique des souches d'*E. amylovora* en Algérie, isolées sur une période de cinq ans et dans des régions géographiques couvrant un rayon de 500 km. Elle fournit des informations essentielles sur la structure, l'épidémiologie et l'évolution d'*E. amylovora*, qui affecte la culture des Rosacées en Algérie.

La caractérisation phénotypique a révélé une possible corrélation entre l'origine géographique et le profil phénotypique, ainsi que des différences de virulence entre les souches. D'autre part, la caractérisation génétique a mis en évidence une population homogène. De plus, l'analyse phylogénétique a indiqué que ces souches appartiennent au groupe mondialement distribué d'*E. amylovora*.

Malgré cette faible diversité génomique, cette étude a également révélé l'absence du plasmide pEA29 chez une souche, ce qui constitue une première en Algérie. Par ailleurs, l'analyse CRISPR a identifié trois géotypes, dont deux nouveaux, ainsi qu'un nouveau motif CR1.

Ces résultats suggèrent que les souches algériennes ont un ancêtre commun, introduit récemment probablement depuis l'Europe du Sud, plus précisément l'Italie. Cette introduction serait liée à un ou plusieurs événements d'introduction à partir de matériel végétal importé. La bactérie s'est ensuite propagée dans différentes régions du pays, où les souches ont progressivement développé certaines variations en réponse aux pressions sélectives exercées par leur environnement.

Nos résultats peuvent contribuer à anticiper de nouvelles introductions du feu bactérien ou d'autres maladies des plantes et à réduire les risques de futures épidémies. Pour y parvenir, il est essentiel de renforcer le contrôle aux frontières du pays et de faire des inspections ciblées des plantes importées. Également, une surveillance continue du feu bactérien, basée sur des stratégies de détection rapide, précise et précoce avec un accompagnement des producteurs sur les mesures de prévention, de lutte et sur les modes de propagation de cette maladie, est importante.

Comme perspective de cette étude, il serait pertinent de :

- i. Élargir la zone d'étude et le nombre des souches étudiées.
- ii. Utiliser des méthodes de séquençage complet du génome et faire une analyse comparative avec des souches des pays voisins en Europe et en Afrique pour déterminer avec précision l'origine de ces souches et confirmer l'hypothèse de cette étude.
- iii. Utiliser le transcriptome et des approches génomiques avancées pour identifier les facteurs régulateurs de la virulence afin de mieux comprendre les différences de pathogénicité observées entre les souches.
- iv. L'exploitation des souches de cette collection pour développer des stratégies de lutte biologique, basées sur l'utilisation des bactériophages et des bactéries antagonistes.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

- Abo-Elyousr, A. M. K., Sallam, M. A. A. et Zeller, W. (2010). Effect of Acibenzolar-S-methyl and *Rahnella aquatilis* (Ra39) on fire blight of apple plants. Dans *XII International Workshop on Fire Blight 896* (p. 511-517).
- Ackermann, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 497-508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S. et S. Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., Morgane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575-5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Agrichem. (2019). *Poirier*. Agrichem. <https://agrichem.dz/culture/28/porier/>
- Agrichem. (2024). *Pommier*. Agrichem. <https://agrichem.dz/culture/29/pommier/>
- Al-Zughbi, I. et Krayem, M. (2022). Quince fruit *Cydonia oblonga* Mill nutritional composition, antioxidative properties, health benefits and consumers preferences towards some industrial quince products: A review. *Food Chemistry*, 393, 133362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133362>
- Albanese, D., Cainelli, C., Gualandri, V., Larger, S., Pindo, M. et Donati, C. (2022). Genome sequencing provides new insights on the distribution of *Erwinia amylovora* lineages in northern Italy. *Environmental Microbiology Reports*, 14(4), 584-590. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13074>
- Aldwinckle, H. S., Bhaskara Reddy, M. V. et Norelli, J. L. (2002). Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with sar inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Horticulturae*, (590), 325-331. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.590.48>
- Alnaasan, Y., Valentini, F., Balestra, G. M., Mazzaglia, A., D’Onghia, A. M. et Varvaro, L. (2017). Modification of a multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing isolates of *Erwinia amylovora*. *Plant Pathology*, 66(7), 1075-1080. <https://doi.org/10.1111/ppa.12660>
- Ancona, V., Chatnaparat, T. et Zhao, Y. (2015a). Conserved aspartate and lysine residues of RcsB are required for amylovoran biosynthesis, virulence, and DNA binding in *Erwinia amylovora*. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(4), 1265-1276. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-0988-8>
- Ancona, V., Lee, J. H., Chatnaparat, T., Oh, J., Hong, J. I. et Zhao, Y. (2015b). The bacterial alarmone (p)ppGpp activates the type III secretion system in *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology*, 197(8), 1433-1443. <https://doi.org/10.1128/JB.02551-14>
- Ancona, V., Lee, J. H. et Zhao, Y. (2016). The RNA-binding protein CsrA plays a central role

- in positively regulating virulence factors in *Erwinia amylovora*. *Scientific Reports*, 6(October), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep37195>
- Arends, D. W., Alkema, W., Hapsari Putri, I., van der Gaast-de Jongh, C. E., Eleveld, M., Langereis, J. D., de Mast, Q., Meis, J. F., de Jonge, M. I. et Cremers, A. J. H. (2022). Differential *Pneumococcal* growth features in severe invasive disease manifestations. *Microbiology Spectrum*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00050-22>
- Bahadou, S. A., Oujija, A., Karfach, A., Tahiri, A. et Lahlali, R. (2018). New potential bacterial antagonists for the biocontrol of Fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. *Microbial Pathogenesis*, 117, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.011>
- Bakhshi, M., Mackay, S. J. et Rahimian, H. (2019). Identification and characterization of bacterial strains associated with diseased oak trees in Northern Iran. *forest pathology*, 782368(November), 1-11. <https://doi.org/10.1111/efp.12571>
- Barbé, S., Figàs-Segura, À., Benada, M., Navarro-Herrero, I., Sampaio, T. M., Biosca, E. G. et Marco-Noales, E. (2022). Plant-associated microbiota as a source of antagonistic bacteria against the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Environmental Microbiology Reports*, 14(4), 559-569. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13064>
- Barbé, S., Llop, P., Blom, J., Cabrefiga, J., Goesmann, A., Duffy, B., Montesinos, E., Smits, T. H. M. et López, M. M. (2013). Complete sequence of *Erwinia piriflorinigrans* plasmids p EPIR 37 and p EPIR 5 and role of p EPIR 37 in pathogen virulence. *Plant Pathology*, 62(4), 786-798. <https://doi.org/10.1111/ppa.12002>
- Barlow, M. (2024). Virginia Tech secures \$5.7 million USDA grant to combat fire blight. *VIRGINIA TACH*. <https://news.vt.edu/articles/2024/02/cals-fire-blight-acimovic.html>
- Bastas, K. K., Sahin, F. et Atasagun, R. (2013). First Report of Fire Blight Caused by *Erwinia amylovora* on Rosehip ( *Rosa canina* ) in Turkey. *Plant Disease*, 97(12), 1652-1652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0273-PDN>
- Beer, S. V. (1979). Fire blight Inoculum : Sources and Dissemination. *EPPO Bulletin*, 9(1), 13-25.
- Berry, M. C., Mcghee, G. C., Zhao, Y. et Sundin, G. W. (2009). Effect of a waaL mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Letters*, 291(1), 80-87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01438.x>
- Bersaneti, G. T., Baldo, C. et Colabone Celligoi, M. A. P. (2019). Immobilization of levansucrase: strategies and biotechnological applications. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 64(1), 4377-4381. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072019000104377>
- Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L. et Li, Z. (1997). Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4), 291-303. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00012-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00012-0)
- Biggs, A. R. et Turechek, W. W. (2010). Fire blight of apples and pears: epidemiological concepts comprising the maryblyt forecasting program. *Plant Health Progress*, 11(1). <https://doi.org/10.1094/php-2010-0315-01-rs>
- Billing, E. (2011a). Fire blight. Why do views on host invasion by *Erwinia amylovora* differ? *Plant Pathology*, 60(2), 178-189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02382.x>

- Billing, E. (2011b). Reflections on fire blight and questions. *Acta Horticulturae*, 896, 33-38. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.896.1>
- Biosca, E. G., Delgado Santander, R., Morán, F., Figàs-Segura, À., Vázquez, R., Català-Senent, J. F. et Álvarez, B. (2024). First European *Erwinia amylovora* Lytic Bacteriophage Cocktails Effective in the Host: Characterization and Prospects for Fire Blight Biocontrol. *Biology*, 13(3), 176. <https://doi.org/10.3390/biology13030176>
- Bocsanczy, A. M., Beer, S. V., Perna, N. T., Biehl, B., Glasner, J. D., Cartinhour, S. W., Schneider, D. J., DeClerck, G. A., Sebahia, M., Parkhill, J. et Bentley, S. (2008). Contributions of the genome sequence of *Erwinia amylovora* to the fire blight community. *Acta Horticulturae*, 793(May 2014), 163-170. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.793.21>
- Bonn, W. G. et van der Zwet, T. (2000). Distribution and Economic Importance of Fire Blight. Dans J. L. Vanneste (dir.), *Fire Blight, The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (chap. 3). CABI Publishing.
- Bonnet, I., Bozzi, B., Fourniols, E., Mitrovic, S., Soulier-Escrihuela, O., Brossier, F., Sougakoff, W., Robert, J., Jauréguiberry, S. et Aubry, A. (2019). *Erwinia billingiae* as unusual cause of septic arthritis, France, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 25(8), 1587-1589. <https://doi.org/10.3201/eid2508.181073>
- Borruso, L., Salomone-Stagni, M., Polsinelli, I., Schmitt, A. O. et Benini, S. (2017). Conservation of *Erwinia amylovora* pathogenicity-relevant genes among *Erwinia* genomes. *Archives of Microbiology*, 199(10), 1335-1344. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1409-7>
- Bugert, P. et Geider, K. (1995). Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Molecular Biology*, 15(5), 917-933.
- Bühlmann, A., Dreo, T., Rezzonico, F., Pothier, J. F., Smits, T. H. M., Ravnkar, M., Frey, J. E. et Duffy, B. (2014). Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2112-2125. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12289>
- Cabrefiga, J. et Montesinos, E. (2005). Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology*®, 95(12), 1430-1437. <https://doi.org/10.1094/PHTO-95-1430>
- Calabrese, F., Voloshynovska, I., Musat, F., Thullner, M., Schlömann, M., Richnow, H. H., Lambrecht, J., Müller, S., Wick, L. Y., Musat, N. et Stryhanyuk, H. (2019). Quantitation and comparison of phenotypic heterogeneity among single cells of monoclonal microbial populations. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02814>
- Carlini, L., Esposito, A., Ambrosino, L., Bharti, S., Invernizzi, L. M., Piazza, S. et Benini, S. (2023). The *ams* proteins and the amylovoran biosynthetic pathway: an extensive bioinformatic study. *Journal of Plant Pathology*, 106(3), 997-1010. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01532-9>
- Casano, F., Wells, J. et van der Zwet, T. (1988). Fatty acid profiles of *Erwinia amylovora* as influenced by growth medium, physiological age and experimental conditions. *Journal of Phytopathology*, 121(3), 267-274. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1988.tb04453.x>

- Castiblanco Mosos, L. F. (2016). cyclic di-GMP dependent regulation in the plant pathogenic bacterium *Erwinia amylovora*. *Michigan State University*.
- Ceylan, A. N. et Özden, İ. (2022). A rare bacterial pathogen in a patient with perihilar cholangiocarcinoma: *Erwinia persicina*; First Case From Turkey. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 56(3), 574-579. <https://doi.org/10.5578/mb.20229716>
- Chiou, C. S. et Jones, A. L. (1993). Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 175(3), 732-740. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.732-740.1993>
- Dardouri, S., Chehimi, S., Murillo, J. et Hajlaoui, M. R. (2017). Molecular characterization of Tunisian strains of *Erwinia amylovora*. *Journal of Plant Pathology*, 99(2), 331-337.
- Dellagi, A., Brisset, M. N., Paulin, J. P. et Expert, D. (1998). Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(8), 734-742. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.8.734>
- Dellagi, A., Reis, D., Vian, B. et Expert, D. (1999). Expression of the ferrioxamine receptor gene of *Erwinia amylovora* CFBP 1430 during pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(5), 463-466. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.5.463>
- Denning, W. (1794). On the decay of apple trees. *New York Society for the Promotion of Agricultural Arts and Manufacturers Transaction*, 2, 219-222.
- Dickstein, E. R., Jones, J. B. et Stead, D. E. (2001). Automated Techniques. Dans N. W. Schaad, J. B. Jones et W. Chun (dir.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition*. APS Press.
- Donat, V., Biosca, E. G., Rico, A., Penalver, J., Borrueal, M., Berra, D., Basterretxea, T., Murillo, J. et Lopez, M. M. (2005). *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics. *Annals of Applied Biology*, 146(1), 105-114. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.04079.x>
- Doolotkeldieva, T., Bobushova, S., Carnal, S. et Rezzonico, F. (2021). Genetic characterization of *Erwinia amylovora* isolates detected in the wild walnut - fruit forest of South Kyrgyzstan. *Journal of Plant Pathology*, 103, 109-120. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00752-1>
- Doolotkeldieva, T., Bobushova, S., Schuster, C., Konurbaeva, M. et Leclerque, A. (2019). Isolation and genetic characterization of *Erwinia amylovora* bacteria from Kyrgyzstan. *European Journal of Plant Pathology*, 155(2), 677-686. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01790-3>
- Duffy, B., Klay, A. et Holliger, E. (2005). Regulatory measures against *Erwinia amylovora* in Switzerland. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 35, 239-244.
- DuPont, S. T., Cox, K., Johnson, K., Peter, K., Smith, T., Munir, M. et Baro, A. (2023a). Evaluation of biopesticides for the control of *Erwinia amylovora* in apple and pear. *Journal of Plant Pathology*, 106(3), 889-901. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01372-7>
- DuPont, T., Smith, T., Johnson, K. et Zhao, Y. (2023b). Fire Blight of Apple and Pear. *Washington State University Tree Fruit*. <https://treefruit.wsu.edu/crop-protection/disease->

[management/fire-blight/](#)

- EPPO. (2009). PM 7/97 (1): Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. *EPPO Bulletin*, 39(3), 413-416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2009.02344.x>
- EPPO. (2011). Premier signalement d'*Erwinia amylovora* en Algérie. 2011/129 *EPPO Information Service*. <https://gd.eppo.int/reporting/article-1698>
- EPPO. (2022). PM 7/20 (3) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*, 52(2), 198-224. <https://doi.org/10.1111/epp.12826>
- EPPO. (2024). EPPO Datasheet: *Erwinia amylovora*. [https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/download/datasheet\\_pdf](https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/download/datasheet_pdf)
- Evans, K., Frank, E., Beddes, T., Pace, M., Shao, M., et Moulton, A. . *Fire blight: Utah pest factsheet PLP-009*. Utah State University Extension; Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory. <https://extension.usu.edu/files-ou/publications/factsheet/fire-blight-08.pdf>
- Evrenosoğlu, Y., Misirli, A., Saygili, H., Bilen, E., Boztepe, Ö. et Acarsoy, N. (2011). Evaluation of susceptibility of different pear hybrid populations to fire blight (*Erwinia amylovora*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1), 226. <https://doi.org/10.15835/nbha3915619>
- Förster, H., McGhee, G. C., Sundin, G. W. et Adaskaveg, J. E. (2015). Characterization of streptomycin resistance in isolates of *Erwinia amylovora* in California. *Phytopathology*®, 105(10), 1302-1310. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-15-0078-R>
- Foster, G. C., McGhee, G. C., Jones, A. L. et Sundin, G. W. (2004). Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7539-7544. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7539-7544.2004>
- Gaganidze, D., Sadunishvili, T., Aznarashvili, M., Abashidze, E., Gurielidze, M., Carnal, S., Rezzonico, F. et Zubadalashvili, M. (2021). Fire blight distribution in Georgia and characterization of selected *Erwinia amylovora* isolates. *Journal of Plant Pathology*, 103(S1), 121-129. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00700-5>
- Gayder, S., Kammerecker, S. et Fieseler, L. (2023). Biological control of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* using bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*, 106(3), 853-869. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01478-y>
- Geider, K. (2000). Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. Dans J. L. Vanneste (dir.), *Fire Blight* (p. 117-140). CAB International.
- Geider, K., Auling, G., Du, Z., Jakovljevic, V., Jock, S. et Völksch, B. (2006). *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(12), 2937-2943. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64032-0>
- Geider, K. et Bogs, J. (2000). molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. *Journal of Bacteriology*, 182(19), 5351-5358. <https://doi.org/doi/10.1128/jb.182.19.5351-5358.2000>
- Geier, G. et Geider, K. (1993). Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant*

- Pathology*, 42, 387–404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pmpp.1993.1029>
- Giorgi, S. et Scortichini, M. (2005). Molecular characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants through RFLP analysis and sequencing of *hrp N* and *dsp A/E* genes. *Plant Pathology*, 54(6), 789-798. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01247.x>
- Gong, P., Sun, W., Yi, J., Han, J., Liu, M., Han, C., Ming, L., Wang, B., Luo, M., Zhao, Y. et Liu, F. (2025). Comparative genomic analysis of Chinese *Erwinia amylovora* strains reveals genetic variations, plasmid diversity, and potential common ancestor. *iMetaOmics*, 2(1), 1-8. <https://doi.org/10.1002/imo2.44>
- Gorris, M. T., Cambra, M., Llop, P., López, M. M., Lecomte, P., Chartier, R. et Paulin, J.-P. (1996). A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 411(411), 41-46. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.411.10>
- Gottsberger, R. (2010). Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2010), 285–292. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02892.x>
- Gusberti, M., Klemm, U., Meier, M., Maurhofer, M. et Hunger-Glaser, I. (2015). Fire blight control: the struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(9), 11422-11447. <https://doi.org/10.3390/ijerph120911422>
- Ham, H. et Park, D. S. (2023). Novel approach toward the understanding of genetic diversity based on the two types of amino acid repeats in *Erwinia amylovora*. *Scientific Reports*, 13(1), 17876. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44558-w>
- Hannou, N., Llop, P., Faure, D., López, M. M. et Moumni, M. (2013). Characterization of *Erwinia amylovora* strains from Middle Atlas Mountains in Morocco by PCR based on tandem repeat sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 665-674. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0197-4>
- Harshman, J. M., Evans, K. M., Allen, H., Potts, R., Flamenco, J., Aldwinckle, H. S., Wisniewski, M. E. et Norelli, J. L. (2017). Fire blight resistance in wild accessions of *Malus sieversii*. *Plant Disease*, 101(10), 1738-1745. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0077-RE>
- Helgi Library. (2026a). *Apple production in Algeria*. Helgi Library. <https://www.helgilibrary.com/indicators/apple-production/algeria/>
- Helgi Library. (2026b). *Pear production in Algeria*. Helgi Library. <https://www.helgilibrary.com/indicators/pear-production/algeria/>
- Helgi Library. (2026c). *Quince production in Algeria*. Helgi Library. <https://www.helgilibrary.com/indicators/quince-production/algeria/>
- Hermenegildo, P. da S., Santos, S. A., Guimarães, L. M. S., Pereira, I. C., Vidigal, P. M. P., Badel, J. L., Alfenas-Zerbini, P., Mafia, R. G., Ferreira, M. A. S. V et Alfenas, A. C. (2019). Draft genome sequence of *Erwinia psidii*, causal agent of bacterial blight of guava (*Psidium guava*) and dieback of eucalypt (*Eucalyptus* spp.). *Microbiology Resource Announcements*, 8(5), 30-32. <https://doi.org/10.1128/MRA.01598-18>

- Holtappels, M., Vrancken, K., Schoofs, H., Deckers, T., Remans, T., Noben, J. P. et Valcke, R. (2015). A comparative proteome analysis reveals flagellin, chemotaxis regulated proteins and amylovoran to be involved in virulence differences between *Erwinia amylovora* strains. *Journal of Proteomics*, 123, 54-69. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.036>
- Hummer, K. E. et Janick, J. (2009). *Genetics and Genomics of Rosaceae*. *Genetics and Genomics of Rosaceae*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77491-6>
- Ismail, E., Blom, J., Bultreys, A., Ivanović, M., Obradović, A., van Doorn, J., Bergsma-Vlami, M., Maes, M., Willems, A., Duffy, B., Stockwell, V. O., Smits, T. H. M. et Puławska, J. (2014). A novel plasmid pEA68 of *Erwinia amylovora* and the description of a new family of plasmids. *Archives of Microbiology*, 196(12), 891-899. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1028-5>
- Ivanović, M., Obradović, A., Gašić, K., Minsavage, G. V., Dickstein, E. R. et Jones, J. B. (2012). Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. *European Journal of Plant Pathology*, 133(3), 545-557. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9926-8>
- Jiang, W., Maniv, I., Arain, F., Wang, Y., Levin, B. R. et Marraffini, L. A. (2013). Dealing with the evolutionary downside of CRISPR immunity: bacteria and beneficial plasmids. *PLoS Genetics*, 9(9), e1003844. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003844>
- Jock, S., Donat, V., López, M. M., Bazzi, C. et Geider, K. (2002). Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology*, 4(2), 106-114. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00277.x>
- Jock, S. et Geider, K. (2004). Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from North America and of two Asian pear pathogens by analyses of PFGE patterns and hrpN genes. *Environmental Microbiology*, 6(5), 480-490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00583.x>
- Jock, S., Wensing, A., Pulawska, J., Drenova, N., Dreo, T. et Geider, K. (2013). Molecular analyses of *Erwinia amylovora* strains isolated in Russia, Poland, Slovenia and Austria describing further spread of fire blight in Europe. *Microbiological Research*, 168(7), 447-454. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.01.008>
- Johnson, K. B. (2000). Fire blight of apple and pear. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2000-0726-01>
- Johnson, K. B. et Stockwell, V. O. (2000). Biological control of fire blight. Dans J. L. Vanneste (dir.), *Fire blight – The disease and its causative agent, Erwinia amylovora* (p. 319–337). CAB International.
- Jones, A. . et Geider, K. (2001). Gram-negative bacteria: *Erwinia amylovora* group. Dans S. NW, J. JB et C. W (dir.), *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press, The American Phytopathological Society.
- Kamber, T., Pothier, J. F., Pelludat, C., Rezzonico, F., Duffy, B. et Smits, T. H. M. (2017). Role of the type VI secretion systems during disease interactions of *Erwinia amylovora* with its plant host. *BMC Genomics*, 18(1), 628. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4010-1>
- Keck, M., Chartier, R., Zislavsky, W., Lecomte, P. et Paulin, J. P. (1995). Heat treatment of plant propagation material for the control of fire blight. *Plant Pathology*, 44(1), 124-129.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02724.x>

- Kellerhals, M., Schütz, S. et Patocchi, A. (2017). Breeding for host resistance to fire blight. *Journal of Plant Pathology*, 99(Special issue), 37-43. <https://www.jstor.org/stable/45156717>
- Kharadi, R. R., Castiblanco, L. F., Waters, C. M. et Sundin, G. W. (2019). Phosphodiesterase genes regulate amylovoran production, biofilm formation, and virulence in *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1), 1-15.
- Kharadi, R. R., Schachterle, J. K., Yuan, X., Castiblanco, L. F., Peng, J., Slack, S. M., Zeng, Q. et Sundin, G. W. (2021). Genetic dissection of the *Erwinia amylovora* disease cycle. *Annual Review of Phytopathology*, 59, 191-212. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-095540>
- Kharadi, R. R., Selbmann, K. et Sundin, G. W. (2022a). A complete twelve-gene deletion null mutant reveals that cyclic di-GMP is a global regulator of phase-transition and host colonization in *Erwinia amylovora*. *PLOS Pathogens*, 18(8), e1010737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010737>
- Kharadi, R. R., Selbmann, K. et Sundin, G. W. (2022b). The cyclic di-GMP network is a global regulator of phase-transition and attachment-dependent host colonization in *Erwinia amylovora*. *PLoS pathogens*, 1-28. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1010737>
- Kharadi, R. R. et Sundin, G. W. (2021). Dissecting the process of xylem colonization through biofilm formation in *Erwinia amylovora*. *Journal of Plant Pathology*, 103(August 2020), 41-49. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00635-x>
- Kharadi, R. R. et Sundin, G. W. (2022). CsrD regulates amylovoran biosynthesis and virulence in *Erwinia amylovora* in a novel cyclic-di-GMP dependent manner. *Molecular Plant Pathology*, 23(8), 1154-1169. <https://doi.org/10.1111/mpp.13217>
- Kim, W., Gardan, L., Rhim, S. et Geider, K. (1999). *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 899-906. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-899>
- King, E. O., Ward, M. K. et Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:002221435490222X>
- Knowles, M. (2013). *Algeria emerges as major apple market*. <https://www.fruitnet.com/eurofruit/algeria-emerges-as-major-apple-market/158845.article>
- Koczan, J. M., Lenneman, B. R., McGrath, M. J. et Sundin, G. W. (2011). Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 7031-7039. <https://doi.org/10.1128/AEM.05138-11>
- Koczan, J. M., McGrath, M. J., Zhao, Y. et Sundin, G. W. (2009). Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation : implications in pathogenicity. *Phytopathology*, 99(11), 1237-1244.
- Koetter, R. et Grabowski, M. (2024). *Fire blight*. University of Minnesota. <https://extension.umn.edu/plant-diseases/fire-blight>

- Kube, M., Migdoll, A. M., Müller, I., Kuhl, H., Beck, A., Reinhardt, R. et Geider, K. (2008). The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2211-2222. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01639.x>
- Kurz, M., Carnal, S., Dafny-Yelin, M., Mairesse, O., Gottsberger, R. A., Ivanović, M., Grahovac, M., Lagonenko, A. L., Drenova, N., Zharmukhamedova, G., Doolotkeldieva, T., Smits, T. H. M. et Rezzonico, F. (2021). Tracking the dissemination of *Erwinia amylovora* in the Eurasian continent using a PCR targeted on the duplication of a single CRISPR spacer. *Phytopathology Research*, 3(18), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00096-9>
- Laala, S., Manceau, C., Valentini, F., Kerkoud, M. et Kheddami, M. (2012). Fire blight survey and first characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Algeria. *Journal of Plant Pathology*, 94(3), 693-696. <https://www.jstor.org/stable/45156299>
- Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B. et Aubertot, J.-N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(3), 28. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- Langlotz, C., Schollmeyer, M., Coplin, D. L., Nimtz, M. et Geider, K. (2011). physiological and molecular plant pathology biosynthesis of the repeating units of the exopolysaccharides amylovoran from *Erwinia amylovora* and stewartan from *Pantoea stewartii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75(4), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2011.04.001>
- Lee, J. H., Ancona, V., Chatnaparat, T., Yang, H. wen et Zhao, Y. (2019). The RNA-binding protein CsrA controls virulence in *Erwinia amylovora* by regulating relA, RcsB, and FlhD at the posttranscriptional level. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(10), 1448-1459. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-19-0077-R>
- Lee, J. H., Ancona, V. et Zhao, Y. (2018). Lon protease modulates virulence traits in *Erwinia amylovora* by direct monitoring of major regulators and indirectly through the Rcs and Gac-Csr regulatory systems. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 827-840. <https://doi.org/10.1111/mpp.12566>
- Lee, S. A., Ngugi, H. K., Halbrecht, N. O., O'Keefe, G., Lehman, B., Travis, J. W., Sinn, J. P. et McNellis, T. W. (2010). Virulence characteristics accounting for fire blight disease severity in apple trees and seedlings. *Phytopathology*, 100(6), 539-550. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-6-0539>
- Li, W., Ancona, V. et Zhao, Y. (2014). Co-regulation of polysaccharide production, motility, and expression of type III secretion genes by EnvZ/OmpR and GrrS/GrrA systems in *Erwinia amylovora*. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(1), 63-75. <https://doi.org/10.1007/s00438-013-0790-4>
- Llop, P., Barbé, S. et López, M. M. (2012). Functions and origin of plasmids in *Erwinia* species that are pathogenic to or epiphytically associated with pome fruit trees. *Trees*, 26(1), 31-46. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0630-2>
- Llop, P., Cabrefiga, J., Smits, T. H. M., Dreo, T., Barbé, S., Pulawska, J., Bultreys, A., Blom, J., Duffy, B., Montesinos, E. et López, M. M. (2011). *Erwinia amylovora* novel plasmid pEI70: complete sequence, biogeography, and role in aggressiveness in the fire blight

- phytopathogen. *PLoS ONE*, 6(12), e28651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028651>
- Llop, P., López, M. M., Cabrefiga, J., Ruz, L. et Montesinos, E. (2008). Study of the virulence in wild-type strains of *Erwinia amylovora* devoid of the plasmid pEA29. *Acta Horticulturae*, 793, 145-148. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.793.18>
- Lopez-Sanchez, M., Sauvage, E., Da Cunha, V., Clermont, D., Ratsima Hariniaina, E., Gonzalez-Zorn, B., Poyart, C., Rosinski-Chupin, I. et Glaser, P. (2012). The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Molecular Microbiology*, 85(6), 1057-1071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08172.x>
- López, M. M., Roselló, M., Llop, P., Ferrer, S., Christen, R. et Gardan, L. (2011). *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(3), 561-567. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020479-0>
- Bakhshi, M., Mackay, S. J. et Rahimian, H. (2019). Identification and characterization of bacterial strains associated with diseased oak trees in Northern Iran. *forest pathology*, 782368(November), 1-11. <https://doi.org/10.1111/efp.12571>
- Lu, S., Bi, W., Du, Q., Sinha, S., Wu, X., Subrata, A., Bhattacharjya, S., Xing, B. et Yeow, E. K. L. (2018). Lipopolysaccharide-affinity copolymer senses the rapid motility of swarmer bacteria to trigger antimicrobial drug release. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06729-6>
- Maes, M., Orye, K., Bobev, S., Devreese, B., Beeumen, J. Van et Bruyn, D. (2001). Influence of amylovoran production on virulence of *Erwinia amylovora* and a different amylovoran structure in *E. amylovora* isolates from *Rubus*. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1996), 839-844 .
- Mahai, R., Liu, R., Du, X., Mu, Z., Wang, X. et Yuan, J. (2024). Comparative and phylogenetic analysis of the complete chloroplast genomes of 19 species in *Rosaceae* family. *Phyton*, 93(6), 1203-1219. <https://doi.org/10.32604/phyton.2024.051559>
- Malnoy, M., Martens, S., Norelli, J. L., Barny, M. A., Sundin, G. W., Smits, T. H. M. et Duffy, B. (2012). Fire blight: Applied genomic insights of the pathogen and host. *Annual Review of Phytopathology*, 50(June), 475-494. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172931>
- Mann, R. A., Smits, T. H. M., Bühlmann, A., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J. E., Plummer, K. M., Beer, S. V., Luck, J., Duffy, B. et Rodoni, B. (2013). Comparative genomics of 12 strains of *Erwinia amylovora* identifies a pan-genome with a large conserved core. *PLoS ONE*, 8(2), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055644>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G. et Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Matsuura, T., Mizuno, A., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Saito, N., Sato, S., Kikuchi, S., Uzuki, T., Azegami, K. et Sawada, H. (2012). *Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology*, 62(Pt\_8), 1799-1803. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032011-0>
- McCann, H. C. et Guttman, D. S. (2008). Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant – microbe interactions. *New Phytologist*, 177, 33-47.
- McGhee, G. C., Guasco, J., Bellomo, L. M., Blumer-Schuette, S. E., Shane, W. W., Irish-Brown, A. et Sundin, G. W. (2011). Genetic analysis of streptomycin-resistant (Sm R ) Strains of *Erwinia amylovora* suggests that dissemination of two genotypes is responsible for the current distribution of Sm R *E. amylovora* in Michigan. *Phytopathology*®, 101(2), 182-191. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0127>
- McGhee, G. C. et Jones, A. L. (2000). Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: Gene organization and intraspecies variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4897-4907. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4897-4907.2000>
- McGhee, G. C., Schnabel, E. L., Maxson-stein, K., Jones, B., Stromberg, V. K., Lacy, G. H. et Jones, A. L. (2002). Relatedness of chromosomal and plasmid DNAs of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6182-6192. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6182>
- McGhee, G. C. et Sundin, G. W. (2011). Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*®, 101(2), 192-204. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0128>
- McGhee, G. C. et Sundin, G. W. (2012). *Erwinia amylovora* CRISPR elements provide new tools for evaluating strain diversity and for microbial source tracking. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041706>
- McManus, P. S. et Jones, A. L. (1995). Genetic Fingerprinting of *Erwinia amylovora* Strains Isolated from Tree-Fruit Crops and *Rubus* spp. *Phytopathology*, 85(12), 1547. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1547>
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W. et Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40(18), 443-465. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927>
- McNally, R. R., Toth, I. K., Cock, P. J. A., Pritchard, L., Hedley, P. E., Morris, J. A., Zhao, Y. et Sundin, G. W. (2012). Genetic characterization of the HrpL regulon of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* reveals novel virulence factors. *Molecular Plant Pathology*, 13(2), 160-173. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00738.x>
- Mendes, R. J., Amaro, C., Luz, J. P., Tavares, F. et Santos, C. (2022). Variability within a clonal population of *Erwinia amylovora* disclosed by phenotypic analysis. *PeerJ*, 10, e13695. <https://doi.org/10.7717/peerj.13695>
- Mendes, R. J., João, P. L., Santos, C. et Tavares, F. (2021). CRISPR genotyping as complementary tool for epidemiological surveillance of *Erwinia amylovora* outbreaks. *PLoS ONE*, 16(4), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250280>
- Mendes, R. J., Regalado, L., Rezzonico, F., Tavares, F. et Santos, C. (2024). Deciphering fire blight: from *Erwinia amylovora* ecology to genomics and sustainable control. *Horticulturae*, 10(11), 1178. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10111178>
- Midani, F. S., Collins, J. et Britton, R. A. (2021). AMiGA: Software for automated analysis of

- microbial growth assays. *mSystems*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00508-21>
- MIDI. (2008). *Sherlock Microbial Identification System Operating Manual* (version 6.). MIDI Inc.
- Mohammadi, M., Moltmann, E., Zeller, W. et Geider, K. (2009). Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 124(2), 293-302. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9417-8>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. et Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-82. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Momol, M. T. et Aldwinckle, H. S. (2000). Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. Dans *Fire Blight The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (chap. 4).
- Momol, M. T., Momol, E. A., Lamboy, W. F., Norelli, J. L., Beer, S. V et Aldwinckle, H. S. (1997). Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments ( RAPDs ). *Journal of Applied Microbiology*, 82(1995), 389-398. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672>
- Müller, L., Müller, D. C., Kammerecker, S., Fluri, M., Neutsch, L., Emsermann, M. R. et Pelludat, C. (2022). Priority effects in the apple flower determine if the siderophore desferrioxamine is a virulence factor for *Erwinia amylovora* CFBP1430. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(7). <https://doi.org/10.1128/aem.02433-21>
- Nimtz, M., Mort, A., Domke, T., Zhang, Y., Qiu, F., Coplin, D. et Geider, K. (1996). Structure of amylovoran , the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydrate Research*, 287, 59-76.
- Norelli, J. L., Jones, A. L. et Aldwinckle, H. S. (2003). Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, 87(7), 756-765. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.7.756>
- O'Hara, C. M., Steigerwalt, A. G., Hill, B. C., Miller, J. M. et Brenner, D. J. (1998). First report of a human isolate of *Erwinia persicinus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 248-250. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.248-250.1998>
- Oh, C. et Beer, S. V. (2005). *Molecular genetics of Erwinia amylovora involved in the development of fire blight*, 253, 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.051>
- Öztürk, M. et Kayaaslan, Z. (2024). Investigation of the genetic diversity of *Erwinia amylovora* strains originating from pome fruits in Turkey. *Applied Fruit Science*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10341-023-01026-z>
- Öztürk, M. et Soylu, S. (2022). A new disease of strawberry, bacterial blight caused by *Erwinia amylovora* in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 104(1), 269-280. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00994-z>
- Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Llop, P. et López, M. M. (2012). *Erwinia* spp. from pome fruit trees: Similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species. *Trees - Structure and Function*, 26(1), 13-29. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0644-9>

- Papo, N. et Shai, Y. (2005). A molecular mechanism for lipopolysaccharide protection of gram-negative bacteria from antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10378-10387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412865200>
- Parcey, M., Gayder, S., Castle, A. J. et Svircev, A. M. (2022). Function and application of the CRISPR-Cas system in the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(7), 1-13. <https://doi.org/10.1128/aem.02513-21>
- Parcey, M., Gayder, S., Morley-Senkler, V., Bakkeren, G., Úrbez-Torres, J. R., Ali, S., Castle, A. J. et Svircev, A. M. (2020). Comparative genomic analysis of *Erwinia amylovora* reveals novel insights in phylogenetic arrangement, plasmid diversity, and streptomycin resistance. *Genomics*, 112(5), 3762-3772. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.001>
- Parcey, M. J. (2022). *The Role of CRISPR-Mediated Phage Resistance in the Development of Phage-Based Biocontrol for Erwinia amylovora* [Brock University].
- Park, D. H., Yu, J.-G., Oh, E.-J., Han, K.-S., Yea, M. C., Lee, S. J., Myung, I.-S., Shim, H. S. et Oh, C.-S. (2016). First report of fire blight disease on asian pear caused by *Erwinia amylovora* in Korea. *Plant Disease*, 100(9), 1946-1946. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1364-PDN>
- Paulin, J. P. (2000). *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. Dans J. L. Vanneste (dir.), *The Disease and its Causative Agent Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford. CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851992945.0000>
- Paulin, J. P. et Samson, R. (1973). Le feu bactérien en France. *Annales de Phytopathologie*, 5, 389–397.
- Pedroncelli, A. et Puopolo, G. (2023). This tree is on fire: a review on the ecology of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01397-y>
- Peil, A., Bus, V. G. M., Geider, K., Richter, K., Flachowsky, H. et Hanke, M.-V. (2009). Improvement of fire blight resistance in apple and pear. *International Journal of Plant Breeding*, 3(1), 1-27.
- Peil, A., Emeriewen, O. F., Khan, A., Kostick, S. et Malnoy, M. (2021). Status of fire blight resistance breeding in *Malus*. *Journal of Plant Pathology*, 103(S1), 3-12. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00581-8>
- Peng, J., Schachterle, J. K. et Sundin, G. W. (2021). Orchestration of virulence factor expression and modulation of biofilm dispersal in *Erwinia amylovora* through activation of the Hfq-dependent small RNA RprA. *Molecular Plant Pathology*, 22(2), 255-270. <https://doi.org/10.1111/mpp.13024>
- Piqué, N., Miñana-Galbis, D., Merino, S. et Tomás, J. (2015). Virulence factors of *Erwinia amylovora*: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12836-12854. <https://doi.org/10.3390/ijms160612836>
- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. et Dreo, T. (2009). Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58, 872-881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02083.x>
- Polsinelli, I., Borruso, L., Caliandro, R., Triboli, L., Esposito, A. et Benini, S. (2019). A genome-wide analysis of desferrioxamine mediated iron uptake in *Erwinia* spp. reveals genes exclusive of the Rosaceae infecting strains. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39787-x>

- Popović, T., Jelušić, A., Živković, L., Živković, N., Iličić, R., Stanisavljević, R. et Stanković, S. (2020). Identification, genetic characterization and virulence of Serbian *Erwinia amylovora* isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 157(4), 857-872. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02046-1>
- Postman, J. (2009). *Relative Susceptibility of Quince, Pear, and Apple Cultivars to Fire Blight Following Greenhouse Inoculation*. USDA. <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=242446>
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E. E., Morgan, D. R., Kerr, M., Robertson, K. R., Arsenault, M., Dickinson, T. A. et Campbell, C. S. (2007). Phylogeny and classification of *Rosaceae*. *Plant Systematics and Evolution*, 266(1-2), 5-43. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0539-9>
- Powney, R., Beer, S. V., Plummer, K., Luck, J. et Rodoni, B. (2011). The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australasian Plant Pathology*, 40(1), 87-97. <https://doi.org/10.1007/s13313-010-0017-7>
- Prod'homme, M., Micol, L. A., Weitsch, S., Gassend, J.-L., Martinet, O. et Bellini, C. (2017). Cutaneous infection and bacteraemia caused by *Erwinia billingiae*: a case report. *New Microbes and New Infections*, 19, 134-136. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.07.006>
- Psallidas, P. G. et Tsiantos, J. (2000). Chemical Control of Fire. Dans J. L. Vanneste (dir.), *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. (p. 199-234). CABI Publishing.
- Pujol, M., Badosa, E. et Montesinos, E. (2007). Epiphytic fitness of a biological control agent of fire blight in apple and pear orchards under Mediterranean weather conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(1), 186-193. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00227.x>
- Puławska, J., Kałużna, M., Warabieda, W. et Mikiciński, A. (2017). Comparative transcriptome analysis of a lowly virulent strain of *Erwinia amylovora* in shoots of two apple cultivars - susceptible and resistant to fire blight. *BMC Genomics*, 18(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4251-z>
- Puławska, J., Mikiciński, A. et Sobiczewski, P. (2023). The history of fire blight biocontrol with Gram-negative bacteria and bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*, 106(3), 839-851. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01554-3>
- Puławska, J. et Sobiczewski, P. (2012). Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia amylovora*: the causal agent of fire blight. *Trees*, 26(1), 3-12. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0643-x>
- Raetz, C. R. H. et Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Raj, A., Rifkin, S. A., Andersen, E. et van Oudenaarden, A. (2010). Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature*, 463(7283), 913-918. <https://doi.org/10.1038/nature08781>
- Ray, T. C., Smith, A. R. W., Carter, K. J. et Hignett, R. C. (1986). Composition of lipopolysaccharides from four strains of *Erwinia amylovora*. *Journal of General Microbiology*, 132(11), 3159-3167. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-11-3159>

- Raymundo, A. et Ries, S. (1981). Motility of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 71, 45–49.
- Refahi, M., Baghaee-Ravari, S. et Mahdikhani-Moghaddam, E. (2017). Exploring possible variation among Iranian *Erwinia amylovora* strains using multilocus typing and tandem repeat analysis. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19, 745-754.
- Rezzonico, F., Bobushova, S., Gaganidze, D., Konurbaeva, M., Mukhanov, S., Jordan, S., Sadunishvili, T., Drenova, N., Smits, T. H. M. et Doolotkeldieva, T. (2024a). Epidemiological description of fire blight introduction patterns to Central Asia and the Caucasus region based on CRISPR spacer typing and genome analysis. *Phytopathology Research*, 6(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s42483-024-00283-4>
- Rezzonico, F., Emeriewen, O. F., Zeng, Q., Peil, A., Smits, T. H. M. et Sundin, G. W. (2024b). Burning questions for fire blight research: I. Genomics and evolution of *Erwinia amylovora* and analyses of host-pathogen interactions. *Journal of Plant Pathology*, 106(3), 797-810. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01581-0>
- Rezzonico, F., Smits, T. H. M. et Duffy, B. (2011). Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3819-3829. <https://doi.org/10.1128/AEM.00177-11>
- Rico, A., Führer, M. E., Ortiz-Barredo, A. et Murillo, J. (2008). Polymerase chain reaction fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a limited phylogenetic value but allows the design of highly specific molecular markers. *Phytopathology*, 98(3), 260-269. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-3-0260>
- Rico, A., Ortiz-Barredo, A., Ritter, E. et Murillo, J. (2004). Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2), 302-310. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02156.x>
- Ristevski, B. P. et Ristevska, A. B. (1996). Resistance of pear varieties to fire blight in The Republic of Macedonia. *Acta Horticulturae*, (411), 393-394. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.411.79>
- Roselló, G., Bonaterra, A., Francés, J., Montesinos, L., Badosa, E. et Montesinos, E. (2013). Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. *European Journal of Plant Pathology*, 137(3), 621-633. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0275-7>
- Sahebi, M., Tarighi, S. et Taheri, P. (2022). The Arac-like transcriptional regulator YqhC is involved in pathogenicity of *Erwinia amylovora*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 1319–1329. <https://doi.org/doi.org/10.1111/jam.15286>
- Sălceanu, C., Paraschivu, M., Cotuna, O., Sărățeanu, V., Olaru, A. L. et Păunescu, R. A. (2023). Economic importance and phytosanitary monitoring of fire blight. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, 23(3).
- Salomone-Stagni, M., Bartho, J. D., Polsinelli, I., Bellini, D., Walsh, M. A., Demitri, N. et Benini, S. (2018). A complete structural characterization of the desferrioxamine E biosynthetic pathway from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Journal of Structural Biology*, 202(3), 236-249. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.02.002>
- Santander, R. D. (2016). *Biology of the fire blight pathogen Erwinia amylovora in oligotrophic*

*environments: survival responses and virulence* [la Universitat de València].

- Santander, R. D., Monte-Serrano, M., Rodríguez-Herva, J. J., López-Solanilla, E., Rodríguez-Palenzuela, P. et Biosca, E. G. (2014a). Exploring new roles for the *rpoS* gene in the survival and virulence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(3), 895-907. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12444>
- Santander, R. D., Oliver, J. D. et Biosca, E. G. (2014b). Cellular, physiological, and molecular adaptive responses of *Erwinia amylovora* to starvation. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(2), 258-271. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12290>
- Sasser, M. (1990). Tracking a strain using the microbial identification system. *MIDI technical note*, 102, 1-4.
- Schachterle, J. K. (2019). *Roles of Hfq-dependent RNAs in E. amylovora regulation of virulence* [Michigan State University].
- Schachterle, J. K. et Sundin, G. W. (2019). The leucine-responsive regulatory protein Lrp participates in virulence regulation downstream of small RNA ArcZ in *Erwinia amylovora*. *mBio*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00757-19>
- Schraidt, O. et Marlovits, T. C. (2011). Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science*, 331(2011), 1192-1195. <https://doi.org/10.1126/science.1199358>
- Schroth, M. N., Thomson, S. V., Hildebrand, D. C. et Moller, W. J. (1974). Epidemiology and control of fire blight. *Annual Review of Phytopathology*, 12(1), 389-412. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.002133>
- Sebahia, M., Bocsanczy, A. M., Biehl, B. S., Quail, M. A., Perna, N. T., Glasner, J. D., DeClerck, G. A., Cartinhour, S., Schneider, D. J., Bentley, S. D., Parkhill, J. et Beer, S. V. (2010). Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *Journal of Bacteriology*, 192(7), 2020-2021. <https://doi.org/10.1128/JB.00022-10>
- Sharifazizi, M., Harighi, B. et Sadeghi, A. (2017). Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria. *Biological Control*, 104, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.007>
- Shin, D.-S., Heo, G.-I., Son, S.-H., Oh, C.-S., Lee, Y.-K. et Cha, J.-S. (2018). Development of an improved loop-mediated isothermal amplification assay for on-site diagnosis of fire blight in apple and pear. *The Plant Pathology Journal*, 34(3), 191-198. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.03.2018.0055>
- Shin, S. Y., Lee, M. Y., Song, J.-H. et Ko, K. S. (2008). New *Erwinia* -like organism causing cervical lymphadenitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), 3156-3158. <https://doi.org/10.1128/JCM.00716-08>
- Shtienberg, D., Zilberstaine, M., Oppenheim, D., Levi, S., Shwartz, H. et Kritzman, G. (2003). New considerations for pruning in management of fire blight in pears. *Plant Disease*, 1083-1088.
- Singh, J. et Khan, A. (2019). Distinct patterns of natural selection determine sub-population structure in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Scientific Reports*, 9(1), 14017. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50589-z>

- Slack, S. M., Walters, K. J., Outwater, C. A. et Sundin, G. W. (2021). Effect of kasugamycin, oxytetracycline, and streptomycin on in-orchard population dynamics of *Erwinia amylovora* on Apple Flower Stigmas. *Plant Disease*, 105(6), 1843-1850. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-20-1469-RE>
- Slack, S. M., Zeng, Q., Outwater, C. A. et Sundin, G. W. (2017). Microbiological examination of *Erwinia amylovora* exopolysaccharide ooze. *Phytopathology*, 107(4), 403-411.
- Smits, T. H. M., Duffy, B., Sundin, G. W., Zhao, Y. F. et Rezzonico, F. (2017). *Erwinia amylovora* in the genomics era: from genomes to pathogen virulence, regulation, and disease control strategies. *Journal of Plant Pathology*, 99, 7-23.
- Smits, T. H. M., Guerrero-Prieto, V. M., Hernández-Escarcega, G., Blom, J., Goesmann, A., Rezzonico, F., Duffy, B. et Stockwell, V. O. (2014). Whole-genome sequencing of *Erwinia amylovora* strains from Mexico detects single nucleotide polymorphisms in rpsL conferring streptomycin resistance and in the avrRpt2 effector altering host interactions. *Genome Announcements*, 2(1), 793096-793097. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01229-13>
- Smits, T. H. M., Rezzonico, F. et Duffy, B. (2011). Evolutionary insights from *Erwinia amylovora* genomics. *Journal of Biotechnology*, 155(1), 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.075>
- Smits, T. H. M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J. E. et Duffy, B. (2010). Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and Comparison to Other *Erwinia* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 23(4), 384-393. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-4-0384>
- Solymár, B. (2005). *Fire Blight , An Economically Important Disease of Apple and Pear : A Review of the Pathogen ( Erwinia amylovora ) , Disease Occurrence , Biology and Management.* [https://publications.gc.ca/collections/collection\\_2009/agr/A52-158-2005E.pdf](https://publications.gc.ca/collections/collection_2009/agr/A52-158-2005E.pdf)
- Song, J. Y., Yun, Y. H., Kim, G.-D., Kim, S. H., Lee, S.-J. et Kim, J. F. (2021). genome analysis of *Erwinia amylovora* strains responsible for a fire blight outbreak in Korea. *Plant Disease*, 105(4), 1143-1152. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1329-RE>
- Spratt, M. R. et Lane, K. (2022). Navigating Environmental Transitions: the Role of phenotypic variation in bacterial responses. *mBio*, 13(6), 1-16. <https://doi.org/10.1128/mbio.02212-22>
- Steiner, P. W. (2000). *The Biology and Epidemiology of Fire Blight.* Vegetable and Fruit Crops Pathology, University of Illinois. <http://veg-fruit.cropsci.illinois.edu/Diseases/Fruit/Apple/Fire-Blight/Biology.pdf>
- Stockwell, V. O. et Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture Fire blight : the primary use of antibiotics on plants activity and mechanisms of resistance in *Erwinia amylovora*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 31(1), 199-210.
- Stockwell, V. O., Temple, T. N., Johnson, K. B. et Loper, J. E. (2008). Integrated control of fire blight with antagonists and oxytetracycline. *Acta Horticulturae*, 793, 383-390. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.793.57>
- Stout, E. A., Sanozky-Dawes, R., Goh, Y. J., Crawley, A. B., Klaenhammer, T. R. et Barrangou, R. (2018). Deletion-based escape of CRISPR-Cas9 targeting in *Lactobacillus gasseri*. *Microbiology*, 164(9), 1098-1111. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000689>

- Sun, W., Gong, P., Zhao, Y., Ming, L., Zeng, Q. et Liu, F. (2023). Current situation of fire blight in China. *Phytopathology*®, 113(12), 2143-2151. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-23-0170-RVW>
- Sundin, G. W., Peng, J., Brown, L. E., Zeng, Q., Förster, H. et Adaskaveg, J. E. (2023). A novel IncX plasmid mediates high-level oxytetracycline and streptomycin resistance in *Erwinia amylovora* from commercial pear orchards in California. *Phytopathology*®, 113(12), 2165-2173. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-23-0190-SA>
- Suslow, T. V., Schroth, M. N. et Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*®, 72, 917–918.
- Tafifet, L., Raio, A., Holeva, M. C., Dikhai, R., Kouskoussa, C. O., Cesbron, S. et Krimi, Z. (2020). Molecular characterization of Algerian *Erwinia amylovora* strains by VNTR analysis and biocontrol efficacy of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum* antagonists. *European Journal of Plant Pathology*, 156(3), 867-883. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01938-6>
- Tamura, K., Stecher, G. et Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tancos, K. A., Borejsza-Wysocka, E., Kuehne, S., Breth, D. et Cox, K. D. (2017). Fire blight symptomatic shoots and the presence of *Erwinia amylovora* in asymptomatic apple budwood. *Plant Disease*, 101(1), 186-191. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0892-RE>
- Tancos, K. A. et Cox, K. D. (2016). Exploring diversity and origins of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* isolates in New York through CRISPR spacer arrays. *Plant Disease*, 100(7), 1307-1313. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0088-RE>
- Tancos, K. A., Villani, S., Kuehne, S., Borejsza-Wysocka, E., Breth, D., Carol, J., Aldwinckle, H. S. et Cox, K. D. (2016). Prevalence of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* in New York apple orchards. *Plant Disease*, 100(4), 802-809. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-0960-RE>
- Taylor, R. K., Guilford, P. J., Clark, R. G., Hale, C. N. et Forster, R. L. S. (2001). Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction ( PCR ) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29, 35-43. <https://doi.org/10.1080/01140671.2001.9514158>
- Thomson, S. V. (2000). Epidemiology of Fire Blight. Dans J. L. Vanneste (dir.), *Fire blight The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (chap. 2). CABI Publishing. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.41918>
- Tian, Y., Zhao, Y., Shi, L., Cui, Z., Hu, B. et Zhao, Y. (2017). Type VI secretion systems of *Erwinia amylovora* contribute to bacterial competition, virulence, and exopolysaccharide production. *Phytopathology*, 107(6), 654-661. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-16-0393-R>
- USDA. (2024a). *Production - Apples*. The Foreign Agricultural Service US Department of Agriculture. <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0574000>
- USDA. (2024b). *Production - Pears*. The Foreign Agricultural Service US Department of Agriculture. <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0579220>

- van der Zwet, T. et Beer, S. V. (1999). Fire Blight — Its Nature, Prevention, and Control: A Practical Guide to Integrated Disease Management. *Agricultural research service*, 18.
- van der Zwet, T. et Keil, H. L. (1979). *Fire blight a bacterial disease of rosaceous plants*. United States Department of Agriculture.
- van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N. et Zeller, W. (2011). *Fire Blight: History, Biology, and Management*. The American Phytopathological Society.
- van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N. et Zeller, W. (2016). Chapter 1: early theories and discoveries regarding fire blight. Dans *Fire Blight: History, Biology, and Management* (p. 3-14). The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544839.002>
- Vanneste, J. L. (2000). What is Fire Blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to Control It? Dans J. L. Vanneste (dir.), *Fire Blight The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (chap. 1). CABI Publishing. <http://sherekashmir.informaticspublishing.com/329/1/9780851992945.pdf#page=49>
- Vanneste, J. L. (2011). Biological control agents of fire blight: successes and challenges. *Acta Horticulturae*, 896(896), 409-416. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.896.58>
- Vanneste, J. L. et Eden-Green, S. (2000). Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. Dans J. L. Vanneste (dir.), *Fire Blight The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (chap. 5). CABI Publishing.
- Végh, A., Hevesi, M., Pájtli, É. et Palkovics, L. (2017). Characterization of *Erwinia amylovora* strains from Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 147(2), 455-461. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1001-z>
- Végh, A. et Palkovics, L. (2016). First occurrence of fire blight (*Erwinia amylovora*) on *Prunus* species in Hungary. *Acta Horticulturae*, 1149(1149), 31-36. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1149.6>
- Verdonck, L., Mergaert, J., Rijckaert, C., Swings, J., Kersters, K. et De Ley, J. (1987). Genus *Erwinia*: numerical analysis of phenotypic features. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1), 4-18. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-4>
- Vézina, L. et Lacroix, M. (2007). Un test pour la détection de la résistance de à la streptomycine. *Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ*. <https://www.agrireseau.net/lab/documents/streptomycine.pdf>
- Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T. et Valcke, R. (2013). Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in *Rosaceae*: State of the art. *Microbiology*, 159(Pt\_5), 823-832. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>
- Waleron, M., Waleron, K., Podhajaska, A. J. et Lojkowska, E. (2002). Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology*, 148(2), 583-595. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-583>
- Wallis, A., Carroll, J. et Cox, K. (2020). Fire Blight. *Cornell University Library eCommons*. <https://ecommons.cornell.edu/bitstreams/7328c0ad-20e2-477e-ba9b-ac867437896c/download>
- Wallis, A., Yannuzzi, I. M., Choi, M., Spafford, J., Fenn, M., Ramachandran, P., Timme, R., Pettengill, J. B., Cagle, R., Ottesen, A. et Cox, K. D. (2021). Investigating the distribution

- of strains of *Erwinia amylovora* and streptomycin resistance in apple orchards in New York using clustered regularly interspaced short palindromic repeat profiles: a 6-year follow-up. *Plant Disease*, 105(11), 3554-3563. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2585-RE>
- Wang, D., Korban, S. S., Pusey, P. L. et Zhao, Y. (2012a). AmyR Is a Novel negative regulator of amylovoran production in *Erwinia amylovora*. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045038>
- Wang, D., Korban, S. S. et Zhao, Y. (2009). The Rcs phosphorelay system is essential for pathogenicity in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant Pathology*, 10(2), 277-290. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00531.x>
- Wang, D., Korban, S. S. et Zhao, Y. (2010). Molecular signature of differential virulence in natural isolates of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*®, 100(2), 192-198. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0192>
- Wang, D., Qi, M., Calla, B., Korban, S. S., Clough, S. J., Cock, P. J. A., Sundin, G. W., Toth, I. et Zhao, Y. (2012b). Genome-wide identification of genes regulated by the rcs phosphorelay system in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 6-17. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0207>
- Wei, Z., Kim, J. F. et Beer, S. V. (2000). Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(11), 1251-1262. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1251>
- Wei, Z., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Colimer, A. et Beer, S. V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257, 85-88.
- Wei, Z. M. et Beer, S. V. (1995). *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of  $\sigma$  factors. *Journal of Bacteriology*, 177(21), 6201-6210. <https://doi.org/10.1128/jb.177.21.6201-6210.1995>
- Weigel, W. A. et Dersch, P. (2018). Phenotypic heterogeneity: a bacterial virulence strategy. *Microbes and Infection*, 20(9-10), 570-577. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.008>
- West, S. A. et Buckling, A. (2003). Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1510), 37-44. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2209>
- Wimmer, A., Glueck, M., Ckurshumova, W., Liu, J., Fefer, M. et Plaetzer, K. (2022). Breaking the Rebellion: Photodynamic inactivation against *Erwinia amylovora* resistant to streptomycin. *Antibiotics*, 11(5), 544. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050544>
- Wright, S. A. I., Zumoff, C. H., Schneider, L. et Beer, S. V. (2001). *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 284-292. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.284-292.2001>
- Yuan, X., Hulin, M. T. et Sundin, G. W. (2021a). Effectors, chaperones, and harpins of the Type III secretion system in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*: a review. *Journal of Plant Pathology*, 103(Thomson 2000), 25-39. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00623-1>

- Yuan, X., McGhee, G. C., Slack, S. M. et Sundin, G. W. (2021b). A novel signaling pathway connects thiamine biosynthesis, bacterial respiration, and production of the exopolysaccharide amylovoran in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 34(10), 1193-1208. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-21-0095-R>
- Zeller, W. (2006). Status of biocontrol methods against fire blight. *Phytopathol. Pol.*, 39, 71-78.
- Zeng, Q., Cui, Z., Wang, J., Childs, K. L., Sundin, G. W., Cooley, D. R., Yang, C., Garofalo, E., Eaton, A., Huntley, R. B., Yuan, X. et Schultes, N. P. (2018). Comparative genomics of *Spiraeoideae*-infecting *Erwinia amylovora* strains provides novel insight to genetic diversity and identifies the genetic basis of a low-virulence strain. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1652-1666. <https://doi.org/10.1111/mpp.12647>
- Zeng, Q., McNally, R. R. et Sundin, G. W. (2013). Global small RNA chaperone Hfq and regulatory small RNAs are important virulence regulators in *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology*, 195(8), 1706-1717. <https://doi.org/10.1128/JB.02056-12>
- Zeng, Q., Puławska, J. et Schachterle, J. (2021). Early events in fire blight infection and pathogenesis of *Erwinia amylovora*. *Journal of Plant Pathology*, 103(S1), 13-24. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00675-3>
- Zeng, Q. et Sundin, G. W. (2014). Genome-wide identification of Hfq-regulated small RNAs in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* discovered small RNAs with virulence regulatory function. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-414>
- Zhang, Y., Zhan, Y., Yang, J. et Lu, Z. (2025). *Erwinia wuhanensis* sp. nov. isolated from human blood. *Frontiers in Microbiology*, 16(September), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1675452>
- Zhao, Y. (2014). Genomics of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* species associated with pome fruit trees. Dans D. C. Gross, A. Lichens-Park et C. Kole (dir.), *Genomics of Plant-Associated Bacteria* (p. 1-36). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3_1)
- Zhao, Y., Blumer, S. E. et Sundin, G. W. (2005). Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 8088-8103. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8088-8103.2005>
- Zhao, Y., He, S. et Sundin, G. W. (2006). The *Erwinia amylovora* *avrRpt2* EA gene contributes to virulence on pear and AvrRpt2 EA is recognized by *Arabidopsis* RPS2 when expressed in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 19(6), 644-654. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0644>
- Zhao, Y. et Qi, M. (2011). Comparative Genomics of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* species—what do we learn? *Genes*, 2(3), 627-639. <https://doi.org/10.3390/genes2030627>
- Zhao, Y. et Sundin, G. W. (2017). Exploring linear and cyclic (di)-nucleotides as messengers for regulation of T3SS and biofilm formation in *Erwinia amylovora*. *Journal of Plant Pathology*, 99, 25-35. <https://www.jstor.org/stable/45156716>
- Zhao, Y., Wang, D., Nakka, S., Sundin, G. W. et Korban, S. S. (2009). Systems level analysis of two-component signal transduction systems in *Erwinia amylovora*: Role in virulence, regulation of amylovoran biosynthesis and swarming motility. *BMC Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-245>

# ANNEXES

## Annexes

### Annexe I. Milieux de cultures et tampons utilisés

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage pendant 20 minutes à 121 °C

#### 1. Milieu King B

Composition	Quantité
Peptone n°3	20 g
Glycérol	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	1l

#### 2. Milieu Levane

Composition	Quantité
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Saccharose	50 g
NaCl	1,5 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	1l

#### 3. Milieu CCT

Composition	Quantité
<b>1ère partie</b>	
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Saccharose	100 g
NaCl	1,5 g
Agar	15 g
Sorbitol	10 g
Niaproof	1,2 ml
Cristal violet	2 ml (solvant éthanol 0,1 %)
H <sub>2</sub> O	1l
Le milieu est autoclavé, puis refroidi à 40 °C avant l'ajout de la deuxième partie, préalablement stérilisée par filtration	
<b>2 -ème partie</b>	

cycloheximide	0,05 g
nitrate de thallium	2 ml (1 % m/v)

#### 4. Milieu de Hugh et leifson

Composition	Quantité
Tryptone	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
NaCl	5 g
Bleu de bromothymol	0,03 g
Glucose	10 g
Agar	3g
H <sub>2</sub> O	1l

#### 5. Milieu TSA

Composition	Quantité
Peptone tryptique	15 g
Peptone de soja	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	1l

#### 6. Milieu Luria Bertani

Composition	Quantité
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	1l

#### 7. Tampon PBS

Composition	Quantité
NaCl	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,4 g
H <sub>2</sub> O	1l

**8. Tampon TAE**

<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>
Tris base	242 g
Acide acétique glacial	57,1 ml
EDTA	100 ml
H <sub>2</sub> O	1l

## Annexe II. Souches utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique.

Souche	Pays	Année d'isolement	Hôte	BioSample ID	Numéro d'accession
E-2	Biélorussie	2007	<i>Malus sp</i>	SAMN08056115	GCA_002803865.1
EA915	Chine	2021	<i>Pyrus sinkiangensis</i>	SAMN26865293	<u>GCA_025987825.1</u>
TS3238	Corée du Sud	2015	<i>Pyrus pyrifolia</i>	SAMN10465495	GCA_013375015.1
Ea1/79Sm	Allemagne	1979	<i>Malus sylvestris</i>	SAMN16790584	GCA_015650045.1
01SFR-BO	Italie	1991	<i>Sorbus sp.</i>	SAMEA2272727	GCA_000367605.1
ATCC 15580	Royaume-Uni	2020	Unknown	<u>SAMN17141014</u>	<u>GCA_017161565.1</u>
CFBP1430	France	1972	<i>Crataegus sp</i>	SAMEA3138297	GCA_000091565.1
ATCC49946	New York, USA	1973	<i>Malus domestica</i>	SAMEA2272701	GCA_000027205.1
RISTBO01-2	Rhode Island, USA	2015	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN07461455</u>	GCA_002732365.1
VTDMSF02	Vermont, USA	2015	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN07461456</u>	GCA_002732125.1
MAGFLF-2	Massachusetts, USA	2015	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN07461454</u>	GCA_002732175.1
CTST01-1	Connecticut, USA	2016	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN07461445</u>	GCA_002732295.1
CTMF03-1	Connecticut, USA	2016	<i>Pyrus communis</i>	<u>SAMN07461444</u>	GCA_002732315.1
LA092	Washington, USA	1988	<i>Pyrus communis</i>	<u>SAMN07461447</u>	GCA_002732285.1
OR6	Oregon, USA	Unknown	<i>Pyrus communis</i>	<u>SAMN07461461</u>	GCA_002732425.1
33-1	Californie, USA	2019	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN16550000</u>	<u>GCA_022811485.1</u>
1-2	Californie, USA	2019	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN16550002</u>	<u>SAMN16550002.1</u>
11-7	Californie, USA	2019	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN16550004</u>	<u>GCA_020546585.1</u>
32-10	Californie, USA	2019	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN16550003</u>	<u>GCA_020546605.1</u>
OR1	Oregon, USA	Unknown	<i>Pyrus communis</i>	SAMN07461460	GCA_002732445.1
7-3	Californie, USA	2019	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN16550001</u>	<u>GCA_020544325.1</u>
CAR3	Californie, USA	1995	<i>Malus domestica</i>	<u>SAMN07461443</u>	GCA_002732335.1
ATCC BAA-2158	USA, Illinois	1972	<i>Rubus sp</i>	SAMN14229426	PRJEA52823

**Annexe III.** Numéros d'accèsion GenBank des séquences partielles des gènes *recA*, *groEL*, *rpoS*, *ams* et *hrpN* ainsi que des séquences des régions CRISPR CR1, CR2 et CR3 pour les souches de *E. amylovora* utilisées dans cette étude.

Souche	MLST					CRISPR		
	<i>recA</i>	<i>groEL</i>	<i>rpoS</i>	<i>ams</i>	<i>hrpN</i>	CRISPR1	CRISPR2	CRISPR3
<b>EA16</b>	PP841738	PP841759	PP841801	PP841822	PP841780	PP841885	PP841864	PP841843
<b>EA22</b>	PP841739	PP841760	PP841802	PP841823	PP841781	PP841886	PP841865	PP841844
<b>EA46</b>	PP841740	PP841761	PP841803	PP841824	PP841782	PP841887	PP841866	PP841845
<b>EA52</b>	PP841741	PP841762	PP841804	PP841825	PP841783	PP841888	PP841867	PP841846
<b>EA53</b>	PP841742	PP841763	PP841805	PP841826	PP841784	PP841889	PP841868	PP841847
<b>EA54</b>	PP841743	PP841764	PP841806	PP841827	PP841785	PP841890	PP841869	PP841848
<b>EA55</b>	PP841744	PP841765	PP841807	PP841828	PP841786	PP841891	PP841870	PP841849
<b>EA57</b>	PP841745	PP841766	PP841808	PP841829	PP841787	PP841892	PP841871	PP841850
<b>EA58</b>	PP841746	PP841767	PP841809	PP841830	PP841788	PP841893	PP841872	PP841851
<b>EA59</b>	PP841747	PP841768	PP841810	PP841831	PP841789	PP841894	PP841873	PP841852
<b>EA90</b>	PP841748	PP841769	PP841811	PP841836	PP841790	PP841895	PP841874	PP841853
<b>EA61</b>	PP841749	PP841770	PP841812	PP841832	PP841791	PP841896	PP841875	PP841854
<b>EA63</b>	PP841750	PP841771	PP841813	PP841833	PP841792	PP841897	PP841876	PP841855
<b>EA66</b>	PP841751	PP841772	PP841814	PP841834	PP841793	PP841898	PP841877	PP841856
<b>EA68</b>	PP841752	PP841773	PP841815	PP841835	PP841794	PP841899	PP841878	PP841857
<b>EAf1</b>	PP841753	PP841774	PP841816	PP841837	PP841795	PP841900	PP841879	PP841858
<b>EAf2</b>	PP841754	PP841775	PP841817	PP841838	PP841796	PP841901	PP841880	PP841859
<b>EAPC</b>	PP841755	PP841776	PP841818	PP841839	PP841797	PP841902	PP841881	PP841860
<b>IVIA1614</b>	PP841756	PP841777	PP841819	PP841840	PP841798	PP841903	PP841882	PP841861
<b>IVIA1892</b>	PP841757	PP841778	PP841820	PP841841	PP841799	PP841904	PP841883	PP841862
<b>PMV6014</b>	PP841758	PP841779	PP841821	PP841842	PP841800	PP841905	PP841884	PP841863

**Annexe VI.** Séquences des espaceurs CRISPR orientées de l'extrémité 5' vers 3', identifiés au dans cette étude.

Numéro de l'espaceur selon (McGhee et Sundin, 2012)	Numero de l'espaceur selon (Rezzonico et al., 2011)	Sequence (5' – 3')
1	1035	TTATTCATGAGCCTTTTATCTTCGCGGCATG
2	1034	GTAAATAGCAAAATGATAAATAATTTATCAAT
3	1033	CTATGCAGAAGCGGAGGGCGGCGAGTGATGGA
4	1032	AGCATCTCGGGAAGTGTGTTTTTGTATAAAA
5	1031	AAGATGCTTTGACATTAATTATCTCCATAAAA
6	1030	CAAGCGATCAACCTGTTTTTCAGTAGGTTTAA
7	1029	GATTGCGCATGAGCACTGAAATGTTCACAGC
9	1028	ACAAAAGACAACACCCCCCTTACCCCCCAGC
10	1027	CAGGTATTTCCGATAGCCGTTGTCTCGGCGG
11	1026	ACTGAAATTTAAAATCACCGCTAACCCGCCAG
12	1025	GGCGATGAGGGAGTACGCGGAGCGGCAGGGTA
13	1024	AAAAGCCAACCGCCCGCCGTAATAAACCTGA
14	1023	GTTGCAGAGACTTAAAGATCGTCTGCTAGTTA
15	1021	TAAAGGAGCATGCTTATACAACTGACAAAATC
16	1020	AGATTTGGCGGAAATGTCGGCGGAGATGCCCC
17	1019	AAATGTCCTGTGGCTCGGCCGATGCTGCAAT
18	1018	GAGATCATTCTCATCCCTCATGTTTTCCAGGA
19	1017	ATTGTAATAATCCTCTCCGCCAAATTTGATTAC
20	1016	AAACTCTCGCATAACATGGACGGAATTAACGA
21	1015	ACGATTTGCCTGAAACCTCAACGAAGTTCGAC
22	1014	CTGATGGCGTCACGAGCCATACGGAATGTGAC
23	1013	CAAAAATTTGCGCATGTCATCTATCTTTTTTT
24	1012	CCCTCGGGGAGGGCTTTGCGTTGTTACTCAGA
25	1011	GTTACGTTGAATGTATCGTTGGATGTGATTAA
26	1010	TACATCGAACAATGCCAATTGTTGACGTTCTT
27	1009	CCGCGAAAATCCGCAGTGAGCTGGCAATGAGC
28	1008	GCTGTCTATCTGGGCTGCCTCTATCCAGCAAT
29	1007	ACTTCGGTGAGAATGTCGAATTGCCACCAGAT
30	1006	TTGAATCAGAGTCTTTCAGGGACGATGTTTTC
31	1005	TGAAGCAGCCAGAATCCCATCCGCGCCTTATC
32	1004	GCTTTTGTACCCTTTACAGTCAACGTACTGCT
33	1003	AGATTGAGATCTTATCAACGGACTCTGACGCC
34	1002	TTCTTACACACAACGGTGAGGGCATTGTCT
35	1001	TGATAAAGTAACGTTCCGAATGGCGCGTGATG
36	2037	CCATTTTATGACAGTCTGGCGCAAAAACCTGGA
37	2036	GAGATGCACTGGATATAACCGACTCCTCACTGA
38	2035	GCTCGGGGGGACATGAGCTTGACAAAACAGC
39	2034	TTTTTAGCAGCGTGACAGTTATGGAGCCGCTC
40	2033	ATTATAAGGATCACTTGCTAGGGCATTATATA
41	2032	ACTTGACTGTTTATGCAGTGGTTGTATTTCTT
42	2031	ATCGGAACGACTTAGATTAGCGTCCTTGACAT
43	2030	TAACCGCAACCATCGCCGCGATAAATCCACTG

44	2029	GTTGATACGGCTGATTACAATAAAATGTCACT
45	2028	TAAAAAATGCCGCCATCGAATCAGCAAAATCG
46	2027	CTGCGGAGCGTCAAACGGGCGTTAACTCTCGA
47	2026	CCCTTCTGGTGTTTTGATTCTCCTAGGTGATT
48	2024	AATGGACGAGATTTACAGAAAATATCTGTTC
49	2022	CAGATGAGGCTGCAAAATCCAGGCACTTTTA
50	2021	GATGGTCGTACCGATGTTTGCGAAAGATTCGC
51	2020	ACGGTCAGATGGTGGCGCTGGTTGCGCTGGCA
52	2019	CTGTTTATGAAAAATGCCAACAAAACAGGAAGC
53	2018	ATTTTTCAGGAACGGGCCGACACGAAAATTTAT
54	2017	ATATTTACTAGCATTTCCTCCATGCTGTATCAC
55	2016	CTGGAGCATGAGACGAAATCGGGGGTAGTGCT
56	2015	CCGGTTCAGGTTTGATAGGTTCTGCCTAACTC
57	2014	TTCGCATACGACAATCTCCCGGCACTGATTAA
58	2011	AGGGTGACGCAACGATTGTTGCAATTCCTAAC
59	2010	CACCAGTGTGTACATTCCAGACTCAGAAACCAC
60	2009	CCTCGAGGTGTTCTAAGCACTCCGGGGCTTTT
61	2008	GACGCTCAAATCAGTGGCGGCGAAACCCGACA
62	2007	CCAGAGGGGATTTAGCAAACGTCATTCTGAC
63	2006	TCATCTGCGGGTCGGGTAGGCTGCTTACGGGT
64	2005	CAGCTATTCCCCGCATCGGTCAGTACTGCGCT
65	2003	GCCAATGGATTTCAGGATTGGAGCCAGAATTTA
66	2002	AAAAAAAAGCCTAAAGCTCGAAAGAATAAAAAAT
67	2001	ATGATGGCGCTGATAGTTTTATTAGATGTCGA
68	1028	TAAATGGTTGTCCGTTCTTGGCGCAGACGGCT
69	2023	GCTACTACGTGTACGCACAGCCGCTGGCCAGT
70	2004	TGGCCACAATGGTAAAACCGGCGGCTTTCCA
306	4006	TTTACGTTTGCGTTAACAGTAAGCTCTGCAAC
307	4004	ATCGCACCCCACTGATTGAAGAGCAGCACACT
308	4003	TAGCAATAAATTCGATAGACGCTGATTTGCGT
309	4002	TGGCTTCAATTGCGGTCGGGTGTGATGCATCA
310	4001	GCCAACGTTCACTGTCATTTAGCCACGCTTCCG

## RESEARCH

## Open Access



# Intraspecific diversity of *Erwinia amylovora* strains from northern Algeria

Lina Talhi<sup>1</sup>, Silvia Barbé<sup>2</sup>, Inmaculada Navarro-Herrero<sup>2</sup>, Mohammed Sebahia<sup>1\*</sup> and Ester Marco-Noales<sup>2\*</sup>**Abstract**

**Background** Fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, is the most destructive bacterial disease affecting plants in the *Rosaceae* family, leading to significant economic losses. In Algeria, this disease has been reported since 2010. This study aimed to investigate the origin of fire blight in Algeria, in order to increase knowledge of the epidemiology of this serious disease and contribute to its management. A comprehensive characterization of 18 *E. amylovora* isolates recovered from northern Algeria between 2016 and 2021 to evaluate their phenotypical and genotypical diversity was conducted.

**Results** Phenotypic differences, particularly in growth kinetics, virulence, and fatty acid profiles, allowed differentiation of strains into five groups, possibly indicating distinct introduction events. Genetic characterization revealed that only one strain lacked the ubiquitous plasmid pEA29, which is correlated with reduced virulence, while none harbored the pEI70 plasmid. Phylogenetic analysis using concatenated sequences of the *recA*, *groEL*, *rpoS*, *ams*, and *hrpN* genes grouped Algerian strains with those from a broadly prevalent clade. CRISPR genotyping identified a novel CR1 pattern and three genotypes, two of them previously unreported.

**Conclusions** This study represents the first phenotypic, genetic, and phylogenetic investigation of *E. amylovora* strains in the region, and provides valuable information on the possible pathways of the introduction of this fire blight pathogen in northern Africa. The findings suggest one or more introduction events from a common ancestor, likely originating in northern Italy, followed by dispersal in various regions of Algeria.

**Keywords** *Erwinia amylovora*, Fire blight, Diversity, Growth kinetics, Virulence, Fatty acid profile, Plasmids, MLST, CRISPR

**Background**

*Erwinia amylovora* is a gram-negative bacterium that belongs to the *Erwiniaceae* family. It is the causative agent of fire blight, the most destructive disease affecting pome fruit trees such as apple, pear, quince or loquat and other ornamental and wild plants within the *Rosaceae* family [1–3]. It is the first bacterium known to cause phytopathogenic disease; it was first reported in the Hudson Valley of New York in 1793 [4] and has since spread to many regions around the world [5].

In Africa, the first country affected by fire blight was Egypt, where it was initially detected in 1964 [6],

\*Correspondence:  
Mohammed Sebahia  
m.sebahia@univ-chlef.dz  
Ester Marco-Noales  
marco\_est@gva.es

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Hassiba Benbouali of Chlef, Chlef, Algeria

<sup>2</sup>Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315 km 10.7, Moncada, Valencia 46113, Spain



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

followed by Morocco in 2006 [7], Algeria in 2010 [8], and Tunisia in 2012 [9]. The incidence of fire blight was limited to North Africa and did not affect other parts of the continent.

*E. amylovora* preferentially enters the host plant through the nectarthodes present in the nectarial cup, although it can also enter through wounds or natural openings [10]. When environmental conditions are favorable, the bacterium moves rapidly from the flower to the pedicel and then to the twig, the main branch, and even down the trunk, rapidly invading the plant tissues and leading to blockage of water flow and ooze production, resulting in progressive necrosis from the upper parts of the tree to the rootstocks, which can result in the death of the tree [10]. The disease can spread by various means, including insects, wind, rain, or infected material, which can cause the destruction of an orchard in one season. As a consequence, significant economic losses can occur; in 2007, the Swiss government reported that the economic damage from fire blight cost \$27.5 million [11], while in the United States, the costs are estimated annually to be over \$100 million [12].

Determining *E. amylovora* diversity is critical for understanding the spread and evolution of the pathogen, as well as developing and implementing effective control measures. For this purpose, many approaches have been developed, such as rep-PCR fingerprinting [13], random amplified polymorphic DNA fragment (RAPD) [14], amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis [15], pulsed field gel electrophoresis (PFGE) [16], clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) [17, 18], variable number of tandem repeats (VNTR) analysis [19] and comparative genome analysis [20–22]. In recent years, numerous studies have adopted the CRISPR genotyping method to analyze the population structure of *E. amylovora* across various countries [3, 23–27], and this technique has been proven to be an efficient tool for evaluating the genetic diversity of this bacterium. Additionally, a combination of CRISPR and multilocus sequence typing (MLST) may provide further insights into the evolutionary and ecological pathways of these isolates [19], while phenotypic characterization may reveal more information about the evolution and adaptation of the pathogen to its environment [21, 28].

In Algeria, fire blight symptoms were first identified in many pear orchards across many provinces located in the north-central region (Algiers, Blida, Tipaza and Boumerdes), where the disease affected 284 commercial orchards in 2010 [8]. The presence of *E. amylovora* was confirmed in 2011 [29], although it is suspected that the disease may have been present earlier and that favorable weather conditions contributed to its occurrence [8]. Today, the disease has spread throughout the country

and affects many apple- and pear-growing regions, which has become a major threat to the agricultural sector.

The aim of this research was to examine the genetic and phenotypic diversity of a collection of *E. amylovora* strains isolated between 2016 and 2021 from several provinces in the northwestern, northeastern, and north-central regions of Algeria. In addition, the relationship between these strains and other strains has been investigated to determine the possible origin of their introduction.

## Results

### Isolates

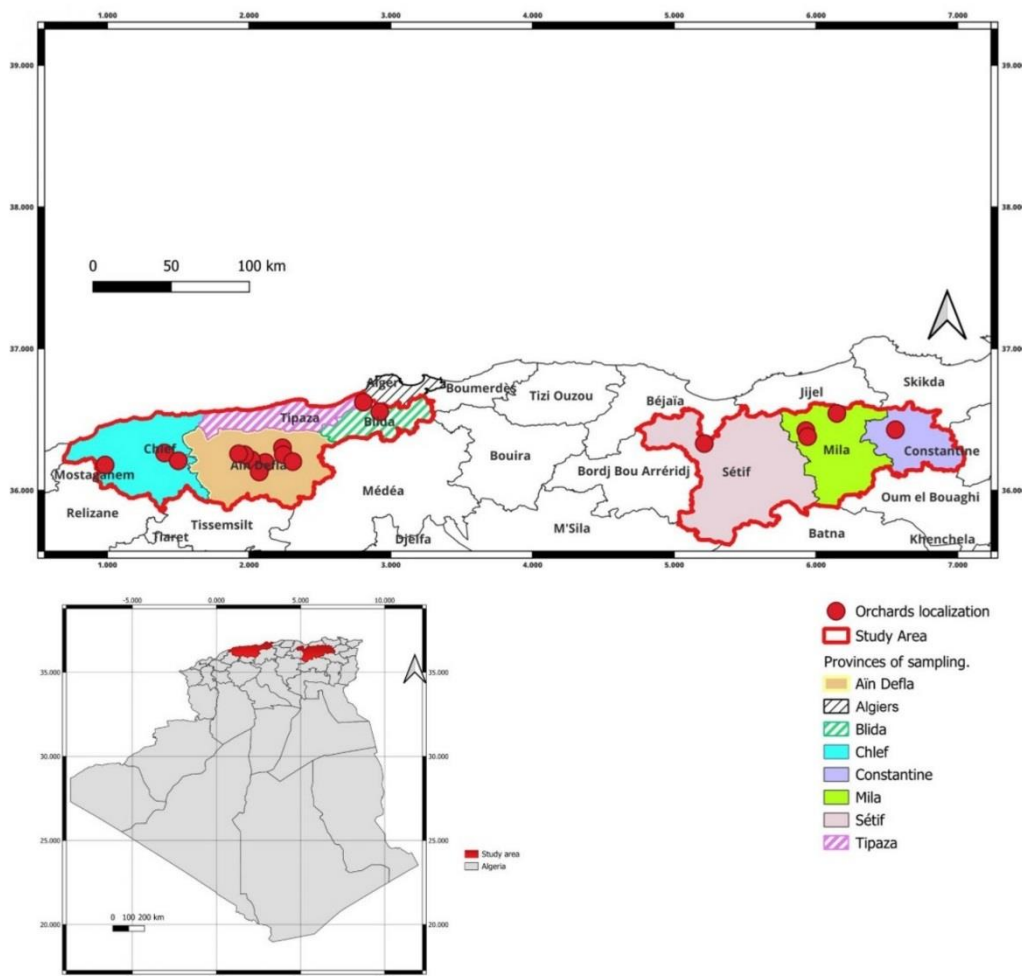
Colonies with a morphology similar to that of *E. amylovora* were isolated from seven provinces (Chlef, Ain Defla, Tipaza, Blida, Sétif, Mila and Constantine) where pear and apple plants with symptoms compatible with the fire blight of *Rosaceae* have been reported (Fig. 1).

The disease was reported for the first time in five of these seven locations (Chlef, Ain Defla, Sétif, Mila and Constantine). Then, 18 colonies were selected from the three culture media tested, which were representative of the different locations and host plants. All of them, listed in Table 1, were identified as *E. amylovora* by conventional [30] and real-time PCR [31, 32].

### Characterization of phenotypic traits

The biochemical characterization revealed that all the strains were: positive for catalase and Voges-Proskauer activity, glucose, mannose, sorbitol, sucrose, and arabinose fermentation; and negative for arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate, acetoin and hydrogen sulfide production, urease, tryptophan deaminase and gelatinase. None of them were able to ferment rhamnose or amygdalin, but they differed in the metabolism of inositol (33% positive), melibiose (6%) and  $\beta$ -galactosidase (44%) (Additional file 1).

Analysis of the cellular fatty acid composition revealed that all strains examined were identified as *E. amylovora*, with percentages ranging between 98.41 and 99.77%. These analyses revealed that ten different fatty acids were present in all the strains tested (lauric acid C12:0, myristic acid C14:0, palmitic acid C16:0, margaric acid C17:0, cis-9,10-methylenehexadecanoic acid C17:0 cyclo, stearic acid C18:0, and “summed feature 2”, consisting of  $\beta$ -hydroxymyristic acid/isopalmitic acid [14:0 3OH/16:1 iso I]; “summed feature 3”, consisting of palmitoleic acid [16:1 w7c/16:1 w6c]; “summed feature 8”, consisting of oleic acid [18:1 w7c/18:1 w6c]; and the unknown fatty acid 10.928). The most abundant fatty acid in all the tested strains was palmitic acid C16:0 (at an average percentage of 35.98%), followed by “Summed Feature 3”, which consists of 16:1 w7c/16:1 w6c palmitoleic acid (29.1%). On the other hand, traces of 0.17 and 0.09%



**Fig. 1** Locations of the orchards of pear and apple trees in different provinces of Algeria from which the 18 *Erwinia amylovora* strains used in this study were isolated. Dashed areas denote locations where fire blight was previously (prior to this study) reported. The map was edited using QGIS

tridecanoic acid C13:0 were found only in strains EA22 and EAF2, respectively, and 0.1% of capric acid C10:0 and the “Summed Feature 7”, consisting of 18.846/19:0 cyclo w10c/19w6c, were found only in strain EA53 (Table 2).

The dendrogram of relatedness between the isolates determined by applying cluster analysis using Ward’s algorithm (Fig. 2) led to the identification of three distinct clusters based on quantitative fatty acid differences (Table 3). A significant difference in the amount of the fatty acid “summed feature 3” ( $P < 0.001$ ) among the three groups was the main reason for separating the strains into clusters. For the 10 fatty acids as a whole, there was

a greater difference (in 40% of the acids) between clusters II and III than between each of these clusters and cluster I (20%), with significant differences also in the content of lauric acid C12:0, myristic acid C14:0 and stearic acid C18:0. In fact, cluster I was similar to cluster II and cluster III by 80% in both cases, the difference between them being, in addition to the already mentioned acid that justifies the division into three groups, the lower content of *cis*-9,10-methylenehexadecanoic acid C17:0 cyclo (3.65).

The growth curves were used to calculate the growth parameters for each strain (Additional file 2). Significantly different values were observed for the lag phase

**Table 1** *Erwinia amylovora* strains isolated from apple and pear trees in different Algerian locations, and the reference strains used in this study

Strain	Host	Cultivar	Location	Plant organ	Date of sampling
EA16	Pear	Santa Maria	Mila	Fruit	2016
EA22	Pear	Santa Maria	Sétif	Fruit	2016
EA46	Apple	Unknown	Tipaza	Twig	2018
EA52	Apple	Golden delicious	Chlef	Twig	2018
EA53	Pear	Santa Maria	Chlef	Twig	2018
EA54	Pear	Santa Maria	Ain Defla	Twig	2019
EA55	Pear	Santa Maria	Ain Defla	Twig	2019
EA57	Pear	Santa Maria	Ain Defla	Exudate	2019
EA58	Pear	Santa Maria	Ain Defla	Twig	2019
EA59	Pear	Santa Maria	Chlef	Twig	2019
EA61	Pear	Santa Maria	Ain Defla	Twig	2019
EA68	Pear	Santa Maria	Ain Defla	Twig	2019
EA66	Apple	Anna	Ain Defla	Twig	2019
EA63	Pear	Santa Maria	Ain Defla	Fruit	2019
EA90	Pear	Santa Maria	Blida	Fruit	2019
EAF1	Pear	Santa Maria	Mila	Twig	2021
EAF2	Pear	Santa Maria	Mila	Twig	2021
EAPC	Pear	Santa Maria	Constantine	Twig	2021
CFBP1430	<i>Crataegus</i> sp.	-	France/Lille	-	1972
IVA1614	<i>Crataegus</i> sp.	-	Spain/Segovia	-	1996
IVA1892	Pear	-	Spain/Guadalajara	-	1998
PMV6014	<i>Crataegus</i> sp.	-	France/Lille	-	-

( $\lambda$ ), maximum growth rate ( $\mu$ ), and area under the curve (AUC) ( $P < 0.001$ ). A thorough breakdown of these findings from the homogeneous subset analysis is available in Additional file 3.

For the length of the lag phase ( $\lambda$ ), strain EA54 entered the exponential phase the earliest, with a median time of 13.83 h, while strain EA22 entered the exponential phase the latest, with a median time of 18.344 h (Fig. 3a). The maximum growth rates exhibited notable variations, ranging from 0.240 h<sup>-1</sup> for strain EA66 to 0.131 h<sup>-1</sup> for strain EA57 (Fig. 3b). The growth potentials (AUCs) of strains EA22 and EAF2 were the lowest at 32.769 and 33.311, respectively, whereas that of strain EA54 was the highest at 46.2 (Fig. 3c).

#### Pathogenicity assays

Pathogenicity tests revealed that all the Algerian *E. amylovora* strains were able to induce necrosis and ooze on inoculated immature pear fruits no later than 7 days after inoculation (Fig. 4). No symptoms were observed in the negative control fruits inoculated with sterile buffer. Interestingly, the isolates showed different degrees of severity [33]. Strains EA16, EA22, EA46, EA52, EA54, EA58, EA59, EA61, EA63, EA66, EA90, EAF1, and EAPC were the most virulent, with an SI of 3, showing necrosis extending from the point of inoculation through almost all the fruit tissue, while strains EA53, EA55, EA57, and EA68 showed medium virulence (SI=2) with a lesser extent of necrosis. Strain EAF2 was the least aggressive

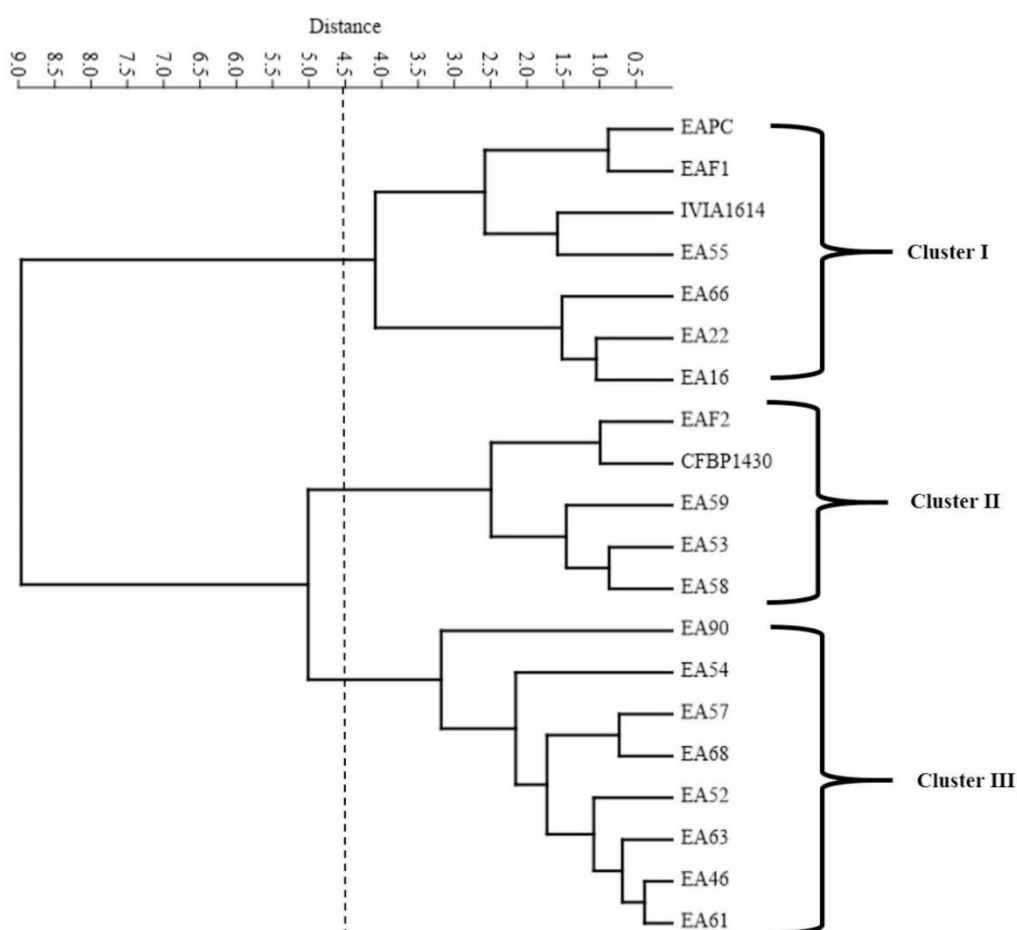
(SI=1), as necrosis did not extend beyond the inoculation site.

A comprehensive multifactorial analysis (MFA) was conducted to explore the overall phenotype of strains based on fatty acids, growth kinetics, biochemical traits, and virulence (Fig. 5). In terms of strain clustering (Fig. 5a), five distinct groups emerged from hierarchical clustering analysis. The first phenotype cluster, indicated in black, consisted of strains EAF1, EAF2, EA22, EA16, and EA66, with a majority (80%) isolated from the eastern region of Algeria. Notably, strain EA22 appeared relatively distant from the other individuals of this cluster. The second cluster included only one strain, EA63. Cluster 3 comprised strains EA53, EA57, EA58, EA59, EA68, and EA90. Cluster 4, in blue, featured the reference strain CFBP1430 alongside EA46, EA52, EA54, and EA61. Clusters 3 and 4 contained only strains from the central-western regions of Algeria. The final cluster comprised two strains, EA55 and EAPC. The first dimension, explaining 25.32% of the total variability, demonstrated a notable positive correlation with growth kinetics, with a comparatively weaker association observed with fatty acid composition and biochemical traits. In contrast, the second dimension (20.09% variability) was primarily defined by virulence traits, while fatty acid and biochemical characteristics exhibited less explanatory power (Fig. 5b-c).

Statistical analysis revealed a significant positive correlation ( $r = 0.336$ ,  $P = 0.006$ ) between virulence and growth rate and a significant negative correlation ( $r = -0.397$ ,

**Table 2** Fatty acid profiles of the *Erwinia amylovora* strains tested in this study, according to the percentage abundance of each fatty acid

Strain	Fatty acid													
	Cluster	Capric acid (C10:0)	Summed in feature 7: 18.846/19:0 cyclo 10c/19w6c	Tridecanoic acid (C13:0)	Stearic acid (18:00)	Margaric acid (C17:0)	Unknown 10.928	Cis-9:10-methylene-hexadecanoic acid (C17:0 cyclo)	Myristic acid (C14:0)	Lauric acid (C12:0)	Summed in feature 2: $\beta$ -hydroxymyristic acid/14-methylpentadecenoic acid (14:03OH/16:1 Iso I)	Summed in feature 8: Oleic acid (18:1 w7c/18:1 w6c)	Summed in feature 3: Palmitoleic acid(16:1 w7c/16:1 w6c)	Palmitic acid (C16:0)
EAPC	I	0	0	0	0.51	0.76	0.77	3.82	5.09	5.37	7.85	9.99	30	35.84
EAF1	I	0	0	0	0.47	0.57	0.75	4.1	4.25	5.28	8.26	10.68	25.74	35.9
FA55	I	0	0	0	0.39	0.49	1.13	4.69	5.32	5.49	7.69	8.97	30.96	34.88
EA22	I	0	0	0.17	0.68	1.54	1.06	2.33	4.67	5.19	8.34	8.6	31.17	36.24
EA66	I	0	0	0	0.5	0.8	1.21	2.62	5.42	5.57	7.88	9.09	31.22	35.67
EA16	I	0	0	0	0.72	0.86	1.15	2.63	4.89	5.65	8.41	9.03	30.14	36.52
MA11614	I	0	0	0	0.35	0.37	0.99	3.65	4.05	5.54	8.63	10.07	31.33	35.03
EA53	II	0.1	0.2	0	0.44	0.72	0.84	4.82	4.17	5.15	8.7	9.3	29.59	35.97
EA58	II	0	0	0	0.31	0.73	0.87	5.88	4.42	5.12	8.39	9.17	29.49	35.62
EA59	II	0	0	0	0.44	0.54	0.9	4.56	5.14	5.32	8.22	9.02	29.4	36.48
EA52	II	0	0	0.09	0.51	0.78	0.7	5.26	4.27	5.24	8.45	9.96	28.36	36.37
EA57	II	0	0	0	0.45	0.89	0.98	4.98	4.51	5.53	7.24	10.23	28.59	36.6
CFBP1400	II	0	0	0	0.65	0.65	1.04	4.53	5.27	5.54	7.82	10.22	28.01	36.29
EA46	III	0	0	0	0.61	0.57	1	4.56	5.12	5.48	8.12	10.55	27.87	36.11
EA63	III	0	0	0	0.58	0.64	0.82	4.9	5.14	5.5	7.85	10.03	28.36	36.19
EA52	III	0	0	0	0.57	0.68	1.42	4.83	5.49	5.81	7.58	9.99	27.97	35.67
EA57	III	0	0	0	0.66	0.7	1.1	4.62	5.31	5.38	8	10.23	27.4	36.59
EA68	III	0	0	0	0.75	0.58	1.14	4.52	4.45	5.62	8.44	10.4	27.52	36.58
EA54	III	0	0	0	0.57	0.75	0.89	5.72	5.24	5.41	8.08	9.87	27.1	36.36
EA90	III	0	0	0	0.54	0.71	1.22	5.46	5.52	6.75	8.39	8.95	27.78	34.68



**Fig. 2** Dendrogram of cluster analysis of fatty acid compositions of the Algerian *Erwinia amylovora* strains assayed in this study using Ward's method

$P=0.001$ ) between virulence and the length of the lag phase  $\lambda$ .

#### Genotypic characterization

Regarding the plasmid content, all the Algerian strains, except for strain EAF2, were carriers of the plasmid pEA29. In contrast, the plasmid pEI70 was not detected in any of the strains. With respect to the VNTR analysis the Algerian strains exhibited the same pattern as the reference strain CFBP1430.

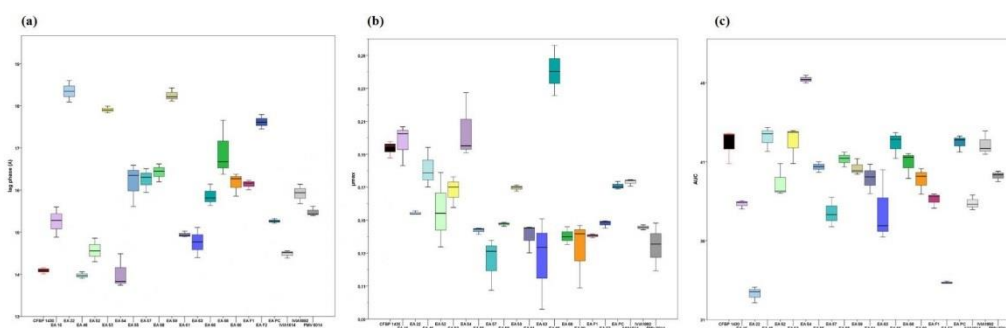
For MLST, the 4311 bp fragments of each isolate resulting from the concatenation of the five housekeeping genes (*recA*, *ams*, *groEL*, *hrpN* and *rpoS*) showed identical sequences between all of them, with 100% similarity to CFBP1430 and ATCC49946 (Additional file 4).

The phylogenetic tree constructed from the concatenated sequences of the strains analyzed in this study and the sequences of other strains deposited in the NCBI database (Additional file 5, Fig. 6) indicated that the Spirochaetae-infecting *E. amylovora* strains could be divided into four separate clusters. According to this tree, the Algerian strains are related to those of different origins: Belarus, China, Italy, France, Germany, South Korea, Spain, and the United Kingdom. Only one USA strain was grouped into cluster 1, while all other USA strains were grouped into the other clusters, with those from the eastern part of the country grouped on one side (cluster 2) and those from the western part grouped on the other (cluster 3). The CA3R strain differed from the others and formed its own cluster.

**Table 3** Differences in fatty acid composition between the clusters

Fatty acids	Fatty acids composition (%) <sup>a</sup>			Significance
	Cluster I (n=7)	Cluster II (n=5)	Cluster III (n=8)	
Unknown 10.928	1.06 (0.77; 1.115)	0.87 (0.77; 0.94)	1.07 (0.918; 1.2)	0.104
Lauric acid (C12:0)	5.49 (5.2800; 5.5700) <sup>AB</sup>	5.24 (5.1350; 5.4250) <sup>A</sup>	5.52 (5.428; 5.763) <sup>B</sup>	<b>0.042</b>
Myristic acid (C14:0)	4.89 (4.250; 5.320) <sup>AB</sup>	4.42 (4.220; 4.825) <sup>A</sup>	5.255 (5.125; 5.445) <sup>B</sup>	<b>0.047</b>
Summed in feature 2: $\beta$ -hydroxymyristic acid/14-methylpentadecenoic acid (14:0 3OH/16:1 iso I)	8.26 (7.85; 8.41)	8.39 (7.73; 8.575)	8.04 (7.83; 8.323)	0.463
Summed in feature 3: Palmitoleic acid (16:1 w7c/16:1 w6c)	30.96 (30; 31.22) <sup>A</sup>	29.4 (28.475; 29.54) <sup>B</sup>	27.825 (27.43; 28) <sup>C</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
Palmitic acid (C16:0)	35.84 (35.030; 36.240)	36.37 (35.795; 36.540)	36.24 (35.780; 36.525)	0.296
cis-9,10-methylenehexadecanoic acid (C17:0 cyclo)	3.65 (2.620; 4.100) <sup>A</sup>	4.98 (4.690; 5.570) <sup>B</sup>	4.725 (4.537; 5.320) <sup>B</sup>	<b>0.004</b>
Margaric acid (C17:0)	0.76 (0.49; 0.86)	0.73 (0.63; 0.835)	0.665 (0.595; 0.708)	0.485
Summed in feature 8: Oleic acid (18:1 w7c/18:1 w6c)	9.09 (8.97; 10.07)	9.3 (9.095; 10.095)	10.125 (9.9; 10.358)	0.301
Stearic acid (C18:0)	0.5 (0.39; 0.68) <sup>AB</sup>	0.44 (0.375; 0.48) <sup>A</sup>	0.595 (0.57; 0.658) <sup>B</sup>	<b>0.014</b>

<sup>a</sup> The value of each fatty acid is the median (Q1; Q3). Values in the same row followed by different letters are significantly different ( $P \leq 0.05$ ). Significant differences are highlighted in bold



**Fig. 3** Kinetic parameters obtained from the growth curves of the *Erwinia amylovora* strains tested in this study: **(a)** latency phase ( $\lambda$ ); **(b)** maximum growth rate ( $\mu$ ) estimated for the exponential period; and **(c)** growth potential obtained by calculating the area under each curve (AUC)

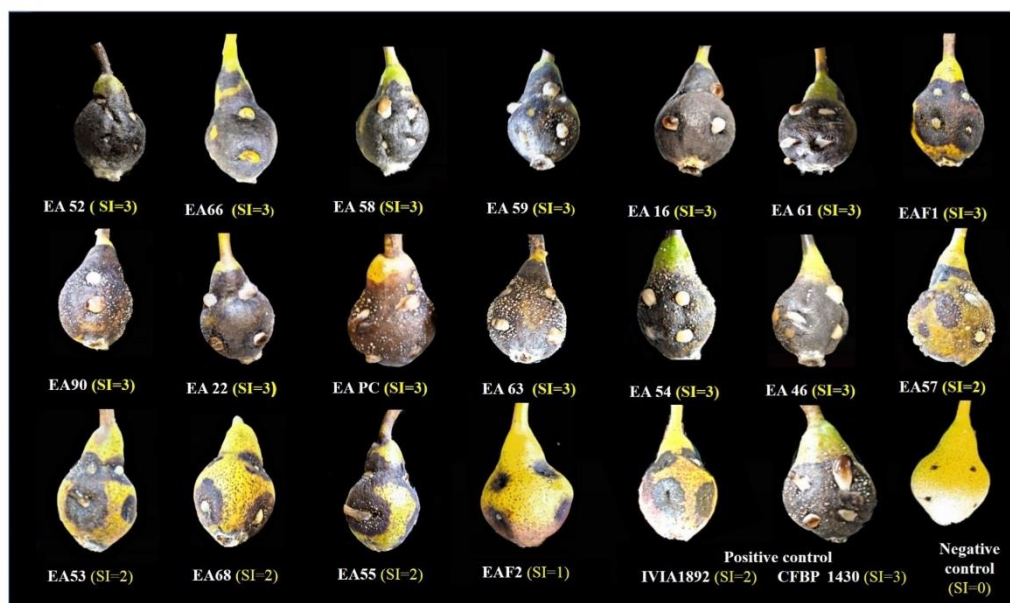
A total of 74 individual spacers were identified among the 18 strains analyzed in this work within the three CRISPR arrays present in *E. amylovora* (Additional file 6), with distinct spacers being considered when the changes were greater than 5 nucleotides. These distinctive CRISPR spacers were numbered consecutively in a 3'-to-5' orientation with four digits, where the first digit denotes the affiliation to the equivalent CRR. Analysis of the three CRISPR regions of the *E. amylovora* strains isolated from Algeria revealed that the CRISPR 1 and CRISPR 2 arrays have 29 nt long direct repeat regions (DRs), similar to those present in CFBP1430. However, all Algerian strains had one single nucleotide in the 15th DR of the CR1 locus, with one inversion from C to T (GTG TTC TCC GCG TGA GCG GGG ATA AAC CG), which was not present in the reference strains used for comparison in the study (IVIA1614, PMV6014, IVIA1892).

With respect to the CRISPR results, the analysis of the CRISPR 1 sequences revealed that all the Algerian strains displayed 36 spacers corresponding to CRR1 A or pattern 4 [17, 18], except for strain EA54, which showed a new pattern (NP) due to the absence of the 22/1014 spacer

(CTG ATG GCG TCA CGA GCC ATA CGG AAT GTG AC). For the CRISPR 2 sequences of the different Algerian strains, all but one (EA55) had 35 spacers matching the 24/a pattern. However, strain EA55 had a different pattern, known as pattern 29/e, resulting from the duplication of spacer 58/2011. CRISPR 3 sequencing revealed no distinction between the strains, as all of them exhibited this pattern (38/a). A total of three genotypes were found (Fig. 7). While most strains belonged to genotype 4, 24, 38/A  $\alpha$  (Fig. 7a), two new genotypes have been identified: (NP, 24, 38/n  $\alpha$ ) for strain EA54 (Fig. 7b) and (4, 29, 38/A  $\alpha$ ) for EA55 (Fig. 7c), although all strains belonged to group I [17].

## Discussion

Algeria experienced a severe outbreak of fire blight in 2010 in Blida province, where it affected 400 ha of orchards throughout 2011 [8]. Despite the implementation of phytosanitary quarantine measures, which have led to the eradication of infected trees [29], the disease continues to spread and affect the main pome fruit-producing regions. In fact, numerous outbreaks have



**Fig. 4** Symptoms induced by the Algerian tested *Erwinia amylovora* strains on immature pear fruits of cv. Blanquilla 7 days after inoculation. The severity index (SI) scale is shown in brackets [78]

occurred, which have become a real concern for producers. Moreover, the epidemiology of the pathogen in these areas remains poorly understood, making outbreak management difficult.

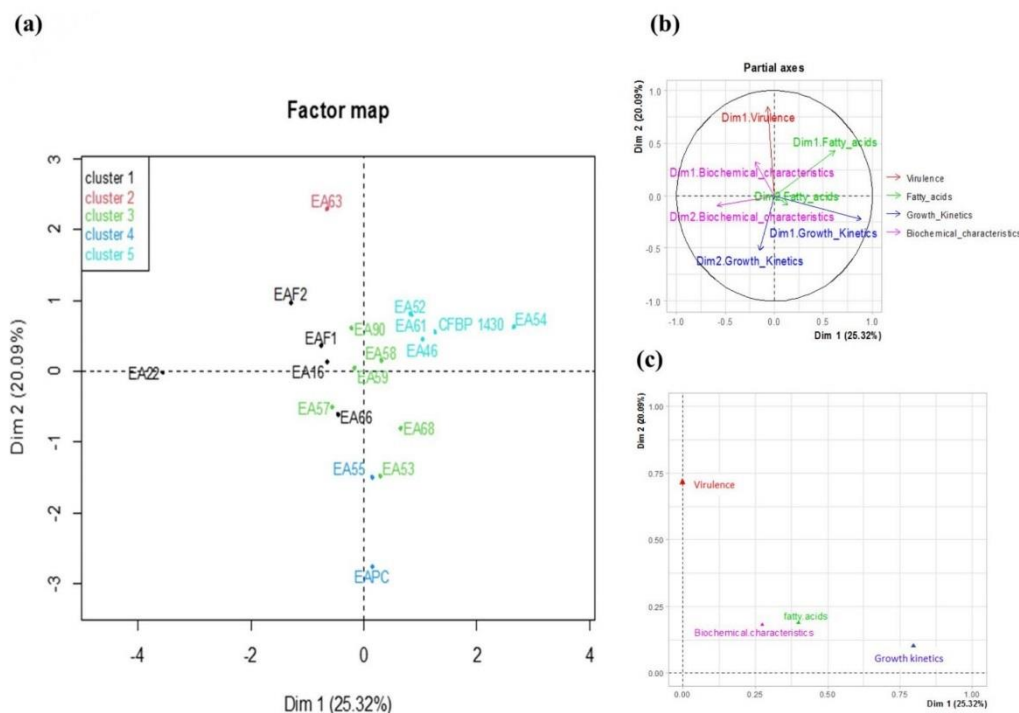
Previous information available on the *E. amylovora* populations in Algeria is limited to the small region where the disease first occurred, and little is known about the extent and distribution of the pathogen in other areas of the country [8, 33]. To understand the epidemiology of fire blight in Algeria, in the present study, we performed a phenotypic and genotypic characterization of strains of *E. amylovora* isolated from apple and pear tree samples collected between 2016 and 2021 in the northern growing regions of the country within a radius of approximately 500 km.

Eighteen strains of *E. amylovora* were isolated from Chlef, Ain Defla, Tipaza, Blida, Sétif, Mila, and Constantine. Notably, Tipaza and Blida, which are located in the center of the country's northern production area, serve as the primary epicenters for the dissemination of fire blight to other regions. However, fire blight has expanded to the western region, including Chlef. The areas located in the easternmost northern zone, Constantine, Mila and Sétif, are the areas where the disease has most recently been detected. This strain selection may provide more insight into the dissemination and evolution of the pathogen across a wide geographic region.

The biochemical characterization of the 18 selected strains was consistent with that described for *E. amylovora* [34]. Only some variability was observed in the metabolism of inositol, melibiose and  $\beta$ -galactosidase. This confirms the high degree of homogeneity of this species, which has already been revealed in previous studies [35].

Fatty acid analysis revealed that this method is a valuable tool for identifying *E. amylovora* strains and distinguishing them from other bacterial species, as indicated in previous work [36, 37]. The majority of fatty acids detected in Algerian strains were similar to those found in strains from other countries [37–39]. Nevertheless, significant variations in the fatty acid profiles allowed the strains to be classified into three clusters. The most abundant profile was that of cluster 3, which, however, was found only in strains from the central-western areas (Ain Defla, Blida, Chlef and Tipaza). Although cluster 3 was the most abundant cluster, strains from the eastern area (Constantine, Mila and Sétif), except for EAF2, were grouped in cluster 1, even strains that were isolated 5 years apart. These results, comparable to those obtained with Serbian strains [39], suggest possible geographical differentiation, which could even be related to independent events of pathogen introduction in Algeria.

Differences in the growth kinetics of some of the strains may reflect a greater or lesser advantage in space and



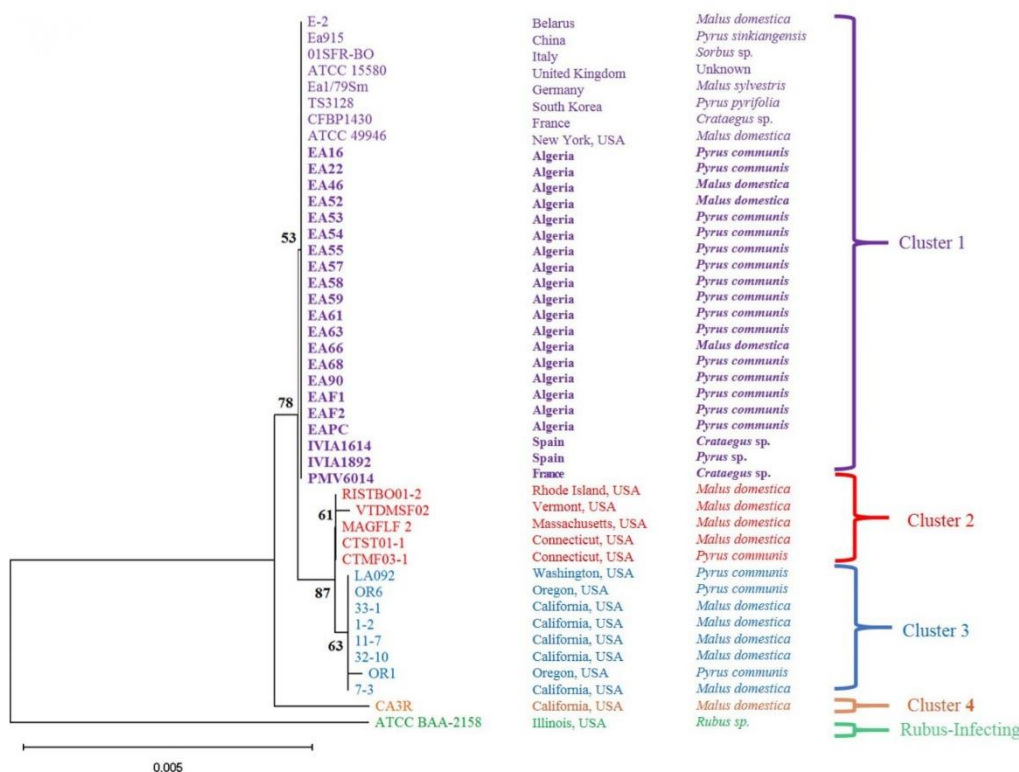
**Fig. 5** MFA analysis based on fatty acid content, virulence, growth kinetics, and biochemical characteristics of the studied Algerian strains of *Erwinia amylovora*. **(a)** Factor map illustrating the distribution of strains on the 1st and 2nd dimensions, with distinct colors representing different clusters. **(b)** Correlation circle plot showing the associations between the groups and the MFA dimensions. **(c)** Projection of the studied groups of parameters onto the first two dimensions of the MFA

resource utilization, which may translate into differential aggressiveness in their interaction with the host plant. In fact, we found a correlation between growth kinetics and the severity index, in line with previous studies showing that bacterial strains with higher growth rates and shorter latency phases tend to be more virulent and adaptable [40–42].

As previously observed in different strains of *E. amylovora* belonging to the Spiraeoideae-infecting group [20, 27, 43], the isolates in this study also exhibited slight differences in virulence. Genetic variations, such as differences in plasmid or nucleotide content within a single plasmid [44, 45] or mutations in certain genes [21, 46], have been reported to lead to differences in virulence. In this sense, genotypic characterization of plasmid content in *E. amylovora* is important because plasmids are related to virulence as well as diversity and fitness [44]. The plasmid pEA29 plays a role in the pathogenesis and colonization of host tissues because it carries genes encoding thiamine metabolism, which is required for amylovan production and biofilm formation and is considered an

essential virulence factor [47]. The only Algerian strain lacking this plasmid is EAF2, which has the lowest virulence. The presence of natural strains lacking this plasmid is unusual and has been described in Egypt, Iran, Spain and Germany [48]. Therefore, this is the first time that an *E. amylovora* strain without the pEA29 plasmid has been described in Algeria, which could also be an indication related to independent introduction of the pathogen. This same strain, EAF2, has a fatty acid profile different from that of the other strains from the same geographical area. None of the Algerian strains have the pEI70 plasmid, which, although it seems to play a role in aggressiveness, is currently limited to a few European strains [49].

The MFA revealed differences between the phenotypes of the strains, a finding that has been confirmed in other studies with strains from other countries [28]. Indeed, phenotypic heterogeneity within genetically homogeneous populations is widely recognized [50–52]. The MFA showed a possible association between the phenotype and the region of isolation, which could be due to



**Fig. 6** Phylogenetic tree of Algerian tested *Erwinia amylovora* strains (in bold) according to the concatenated sequences of the *recA*, *ams*, *groEL*, *hrpN*, and *rpoS* genes by using neighbor-joining reconstruction based on a Tamura 3-parameter model and bootstrap analysis (1000 replicates)

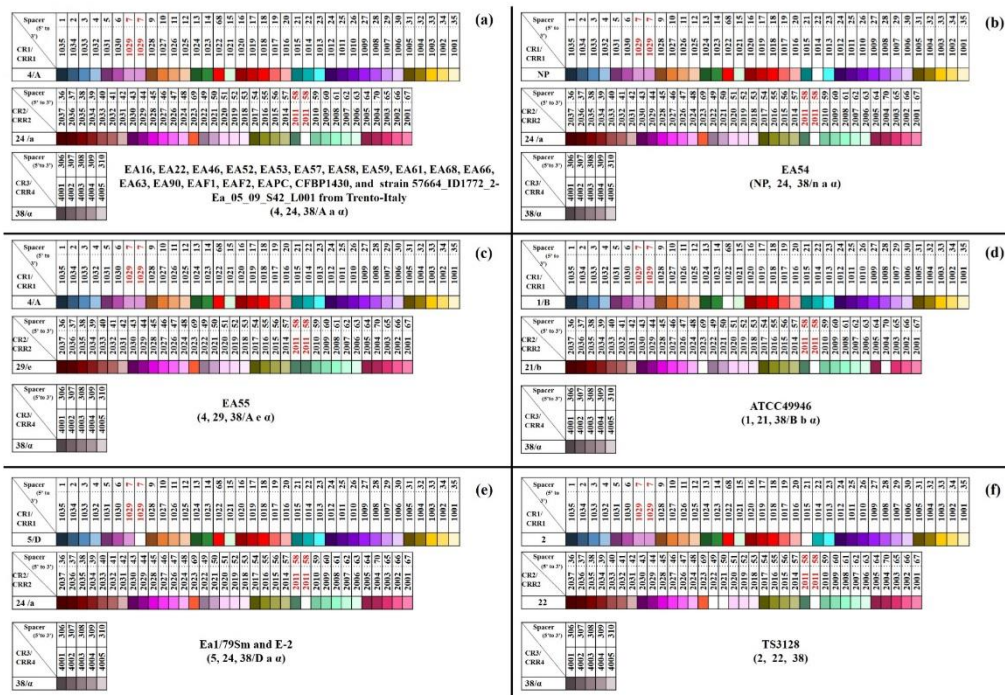
various introduction events and/or adaptations due to evolutionary pressure from the environment [53].

The high homogeneity of Algerian strains according to VNTR and MLST is not surprising, as it is a common feature in the genetic characterization of *E. amylovora* populations. Indeed, studies conducted in other countries such as Morocco [54], Tunisia [55], Iran [56], Serbia [57], Korea [58] and Portugal [28], using various techniques such as VNTR, multi locus sequence analysis, and whole-genome sequencing, also reveal strongly homogeneous populations, a fact attributed to the bottleneck event due to intensive cultivation of apple and pear trees in America in 1700s that led to the reduction of population size [18], and the relatively small genome comparing to other phytopathogenic bacteria with a highly conserved core [20, 59].

Nevertheless, the use of the MLST scheme with *groEL*, *recA*, *ams*, *rpoS*, and *hrpN* markers not only allows accurate taxonomic identification of *E. amylovora* strains but is also a good tool for differentiating strains according to

their geographical origin. In this regard, the typology of the resulting phylogenetic tree was very similar to those produced by comparison of pEA29 sequences and the whole genome [21, 22], with four well-defined clusters: broad prevalence, eastern US, western US 1, and western US 2. All Algerian strains were part of the widely prevalent clade 1, which is composed of many closely related *E. amylovora* strains isolated from different parts of the world. However, within this clade, differences between strains are supported by only 4-259 SNPs [21], indicating a very low mutation rate, probably due to the limited time frame of less than 200 years of introduction of fire blight from the USA to other parts of the world and the low selective pressure exerted by the new environment [22].

CRISPR analysis was the most discriminatory, as it revealed some genetic diversity among the strains. Three genotypes were identified, with (4, 24, 38/Aαα) being the most abundant (Fig. 7a). This genotype was previously reported for strains isolated from other areas of



**Fig. 7** Patterns/genotypes from CRISPR arrays CRISPR 1, CRISPR 2, and CRISPR 3 found in the Algerian *Erwinia amylovora* strains tested in this study (a–c), compared to the reference strain ATCC49946, Ea1/795Sm, and TS3128 (d–f)

(a) The most common genotype (4, 24, 38/A a) found in this study, also present in strain CFBP1430; (b) The new genotype (NP, 24, 38/naa) identified in strain EA54; (c) The new genotype (4, 29, 38/Aea) identified in strain EA55; (d) genotype (1, 21, 38/Bba) found in strain ATCC49946; (e) genotype (5, 24, 38/D a) previously found in strain Ea1/795Sm; (f) genotype (2, 22, 38) found in the Korean strain TS3128

CRISPR spacers are represented by boxes, with the spacer positions numbered at the top of the columns. Spacers that differed from others by more than 5 nucleotides were given a specific color, while white boxes indicate the absence of the spacer within the pattern/genotype. The spacers were numbered, and the patterns or genotypes were named according to the nomenclature presented by [17, 18]

the Mediterranean region, such as Egypt, France, Italy, Spain and Lebanon [17, 18]. Within the widely prevalent cluster 1, this genotype differs from those reported for other strains in the clade: (1, 21, 38) for ATCC49946 USA (Fig. 7d), (5, 24, 38) for E-2 from Belarus and Ea1/795Sm from Germany (Fig. 7e); (2, 22, 38) for TS3128 from South Korea (Fig. 7f); [60]; and others for strains from Portugal [27], Kyrgyzstan [3] and Georgia [61].

Notably, two new previously undescribed genotypes have been identified. On the one hand, that of the strain EA54 on the CR1 array was due to the deletion of the 22/1014 spacer [17, 18, 23, 27, 62, 63]. On the other hand, that of strain EA55 on the CR2 array (4, 29, 38/Aea) differed from the previously identified genotype (4, 24, 38/Aaα). In this case, the difference was due to the duplication of the 58/2011 spacer. The UTRJ2, UT5P4, and UTRF3 strains isolated from Utah (USA) share a similar 29/e pattern with our strain named EA55 [17, 18], and, in

fact, pattern 29 has not previously been reported outside the USA. The two strains EA54 and EA55 were isolated in the same area and the same year, together with others in the largest group of isolates. Within this group, there is some heterogeneity in the fatty acid profile. Differences between strains in this group could be the result of selective pressure on isolates competing for the same niche, since pressure can lead to misalignment during DNA replication [64]. Spontaneous mutations in the CRISPR system may be an adaptive mechanism for bacterial population survival under a wide variety of conditions, allowing a subpopulation to acquire beneficial plasmids or other genetic elements that increase their fitness [65].

The presence of the duplicate CRISPR spacer 1029 has been used as a marker to trace the origin of *E. amylovora* strains [24]. Since all Algerian strains are derived from the ancestral genotype due to the presence of the duplicated spacer 1029 within the CR1 array, it can be

concluded that the strains present in Algeria could be linked back to the first outbreak that affected Europe in 1958 and spread to several countries, including England, Spain, Italy and France [19]. Interestingly, all Algerian strains examined in this study had a consistent mutation in the 15th DR of the CR1 array, regardless of year or place of isolation. Despite their different genotypes, strains EA54 and EA55 also exhibited this mutation. Given that the DRs are highly conserved [66], this could indicate a common ancestor to the Algerian strains, which, through one or more introduction events, would have since spread to different areas of the country. Comparison of the CR1 sequences with those deposited in the NCBI database revealed that strains from Trento (Italy) share the same DR mutation as Algerian strains, suggesting a close relationship between them, in line with previous studies showing a relationship between Italian and North African strains [67, 68]. A recent study using whole genome sequencing placed strains from Morocco and Italy in the same clade, separated from European strains [67]. Another study reported similar haplotypes between strains from Algeria and Slovenian strains originating from Italy [33, 69]. A shared ancestor between the Algerian and Italian strains has been suggested previously [68]. Our results also seem to indicate that fire blight could have been introduced into Algeria from southern Europe, most likely via Italy. It is noteworthy that Algeria has emerged as Italy's largest export market for fruit from the Italian province of Trento [70], the site where strains with the same mutation as the strains in this study were isolated. The trade of nursery stock and other plant tissues, where *E. amylovora* may stay as an endophytic bacterium in internal tissues, remaining asymptomatic and thus undetectable during visual inspections, plays a key role in the dissemination of the disease over long distances. In Mediterranean countries, aerosols may help carry the bacteria over long distances [16, 71]. Birds also may contribute to the spread as well, by carrying the pathogen on their feet for up to 8 days, which can introduce it to new regions [72].

### Conclusions

In conclusion, this study provides the first phenotypic, genetic and phylogenetic analysis of *E. amylovora* strains from Algeria. The results indicate that the *E. amylovora* strains from northern Algeria have a homogeneous structure despite being isolated over a 5-year time period and from distant geographical regions. Nevertheless, phenotypic and genotypic analysis revealed some heterogeneity between strains, which provides insight into the diversity, epidemiology and possible evolution of this pathogen. MLST and CRISPR analysis revealed the presence of two new genotypes derived from an ancestral genotype, suggesting that Italy could be the source of introduction

of the fire blight pathogen in Algeria. This knowledge can help to predict and prevent future outbreaks and to improve quarantine measures by applying stricter border controls and inspections for the import of plants, especially asymptomatic ones, in a more targeted manner, resulting in more accurate disease management.

### Methods

#### Sampling and strain isolation

From April 2016 to July 2021, samples of twigs, leaves, and fruits with incipient symptoms of fire blight were collected from pears and apple trees in orchards located in different geographical regions of Algeria. Small pieces were cut from the margin between healthy and necrotic tissues, crushed in sterile bags with phosphate-buffered saline (PBS: 0.36% NaCl, 0.018%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.12%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  12  $\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM, pH 7.2) at a ratio of 0.1 g in 4.5 ml, and macerated for 30 min at room temperature [34]. Aliquots of 50  $\mu\text{l}$  of each macerate were plated on King's B (KB), CCT and nutrient agar sucrose (NSA) media and incubated at 25 °C for 24–72 h [34]. Colonies on KB were observed under UV radiation, and nonfluorescent, creamy white, circular, and domed colonies were selected and purified. Smooth and mucous colonies on NSA and CCT media were also selected after 72 h and purified for further characterization. All the isolates selected were cryo-conserved at -80 °C and routinely grown on KB media for 48 h.

#### Identification of bacterial isolates

Colonies with the appearance of *E. amylovora* were identified by several real-time and conventional PCR protocols with different chromosomal targets [30–32]. To prepare the DNA template, a suspension adjusted to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.2 (approximately  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) in 2 ml of PBS was heated to 100 °C for 10 min. Conventional PCR, which amplifies a chromosomal region of 187 bp from a gene that encodes a hypothetical protein from *E. amylovora* [30], was carried out on a Veriti Dx Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). The amplification products obtained were visualized through 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis in 0.5× TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH 8/HOAc) with Good View™ staining (SBS Genetech). The real-time PCR protocols targeting a hypothetical protein-coding gene and the *amsC* gene [31, 32] were performed on a Lightcycler 480 II thermocycler (Roche). In all tests, the *E. amylovora* strain CFBP1430 was used as a positive control, and sterile water was used as a negative control.

#### Phenotypic characterization

Biochemical tests were performed by inoculating commercial strips of the API system 20E (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions, with cell

suspensions adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.2. The incubation temperature was 25 °C, and the results were registered after 48 h. The catalase activity was also tested by the addition of hydrogen peroxide to the bacterial suspensions.

The composition of the cellular fatty acids of the strains was determined at the facility of the CECT, University of Valencia (Valencia, Spain), following the protocol recommended by the MIDI Microbial Identification System [73]. The cellular content of fatty acids was obtained using an Agilent 6850 gas chromatograph with the MIDI Microbial Identification System using the TSBA6 method. The strains were cultured on tryptic soy agar (TSA) at 28 °C for 24 h until the biomass was obtained [74]. A dendrogram based on differences in the fatty acid profiles was generated by hierarchical clustering using Ward's method.

To analyze the growth kinetics of the strains, 20 µl aliquots of each fresh bacterial suspension adjusted to 1 × 10<sup>4</sup> CFU/mL in PBS were transferred to 96-well plates containing 180 µL of 1:10 LB medium. The plates were incubated at 25 °C with shaking for 90 h, and the OD<sub>600</sub> was measured every 1 h on a Multiskan FC microplate photometer reader (Thermo Scientific). At least three replicates per strain were performed. Growth kinetics were determined using the AMiGA cross-platform Python package [75].

#### Pathogenicity assays

To confirm the pathogenicity of all the isolates, immature pear fruits, cv. Blanquilla, approximately 2–3 cm in diameter were used [76]. They were subsequently washed with tap water, superficially sterilized by immersing them in a 15% sodium hypochlorite solution for 20 min, rinsed 3 times with sterile distilled water and subsequently dried on sterile filter paper. Four 0.5 mm wounds were made on each disinfected immature fruit with sterile tips (three pears per strain). Then, 10 µl of bacterial suspensions in PBS adjusted to approximately 10<sup>7</sup> CFU/ml were deposited in the wounds [77]. The inoculated fruits were placed in previously disinfected polystyrene trays, covered with plastic bags to maintain high humidity, and incubated at 25 °C. The development of disease symptoms was observed and evaluated until the seventh day [78]. Immature fruits inoculated with strain CFBP1430 and inoculated only with PBS were used as positive and negative controls, respectively.

#### Genotypic characterization

The presence of the ubiquitous plasmid pEA29 and plasmid pEI70 was screened by multiplex PCR with the primers AJ75-AJ76 and 1.7F-1.7R, respectively [49]. The amplification products obtained were visualized by 1.2% (w/v) agarose gel electrophoresis in 0.5× TAE

buffer using a 1 kb DNA ladder as a weight marker (New England Biolabs) after staining with GoodView nucleic acid stain (SBS Genetech) and visualization with a UV transilluminator.

For further molecular characterization, the VNTR technique was performed using the primers VNTR 4 and VNTR 5 [54]. The PCR products were analyzed on a 1% agarose gel and visualized under the same conditions as those described above. Additionally, MLST analysis of all *E. amylovora* isolates was performed by the amplification of partial sequences from five housekeeping genes [56, 79], namely, *groEL* [80], *recA* [81], *rpoS* [82], *hrpN* [83] and *ams* [84], which encode the GroEl heat shock protein, RecA recombination protein, Sigma factor-38, T3-secreted proteins and proteins involved in the synthesis of amylovoran, respectively. PCR was performed by adjusting the amplification conditions to 50 µl of master mix containing 2 U of Taq DNA polymerase (Biotools), 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.4 µM of each primer. The mixed samples were subjected to an initial denaturation step at 94 °C for 10 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 60 °C for 30 s (*groEL*), 47 °C for 1 min (*recA*), 58 °C for 30 s (*rpoS*), 55 °C for 30 s (*hrpN*), and 58 °C for 45 s (*ams*), extension at 72 °C for 2 min, and a final extension step consisting of 72 °C for 10 min. The amplification products obtained were visualized by 1% (w/v) agarose gel electrophoresis in 0.5× TAE buffer. Then, the PCR products were purified and sequenced using the Sanger sequencing procedure. The sequences generated were compared against those in GenBank using BLASTn. The phylogenetic analyses with all concatenated sequences were performed using the neighbor-joining method based on the Tamura 3-parameter model, and the support for the nodes was evaluated through 1000 bootstrap replicates using MEGA 11 [85].

Moreover, amplification of the CRISPR arrays was performed using the primers and PCR protocol described previously [18]. Briefly, the primer pairs CR1-F1/C1-R0, Cr2-F1/C2-R1, and CR3-F1/CR3-R1 were used to amplify the CRISPR 1, CRISPR 2, and CRISPR 3 arrays, respectively. All PCR products were purified using a mi-PCR Purification Kit (Metabion) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products for CRISPR 1 and CRISPR 2 were sequenced using the additional primers CR1-F2, CR1-F3, and CR1RevRpt and Cr2-F2, Cr2-F3, and Cr2-R2, respectively, in combination with the amplification forward and reverse primers. The sequences generated were assembled and aligned using the Codon Code Aligner software V10.0.2, and CRISPR repeats and spacers were searched by the CRISPR Finder tool [86].

### Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test was used to analyze the differences in growth kinetics, followed by post hoc analysis using stepwise step-down multiple comparison tests to construct homogeneous subsets. This test was also used to evaluate the differences between groups based on fatty acid analysis followed by pairwise comparison.

A Spearman correlation test was applied to assess the potential association between growth kinetics and virulence. Differences in all tests were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

Multiple factor analysis (MFA) was employed to assess variations in the phenotype based on fatty acid composition, virulence, growth kinetics, and biochemical characteristics (as determined by API 20 analysis) using the R package FactoMineR [87].

The statistical analyses were performed using SPSS v 21 [88] and R software v 4.3.2 [89].

### Abbreviations

$\lambda$	Lag phase
$\mu$	Maximum growth rate
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AUC	Area under the curve
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DR	Direct repeat region
KB	King B
MFA	Multifactorial analysis
MLST	Multilocus sequence typing
NP	New pattern
NSA	Nutrient sucrose agar
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
TSA	Tryptic soy agar
VNTR	Variable number of tandem repeats

### Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03555-3>.

Supplementary Material 1  
Supplementary Material 2  
Supplementary Material 3  
Supplementary Material 4  
Supplementary Material 5  
Supplementary Material 6

### Acknowledgements

We thank Nassira Madani and all of the staff members of the Regional Station of Plant Protection (Chlef, Algeria) for their technical assistance.

### Author contributions

L.T., S.B., M.S., and E.M.-N. conceived and designed the experiments. L.T., S.B., and I.N.-H. performed the experiments. L.T., S.B., and E.M.-N. performed the data analysis. L.T., S.B., and E.M.-N. wrote the manuscript. All the authors have read and approved the final manuscript.

### Funding

This study was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (DGRSDT/MESRS) and by the project IMA-GVA 52202D from

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (project susceptible to being co-financed by the European Union through the ERDF Program 2021–2027 Comunitat Valenciana).

### Data availability

The sequences generated in this study were deposited in the NCBI database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> under accession numbers PP841738–PP841905. Detailed information on the GenBank accession numbers can be found in additional File 4.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 24 July 2024 / Accepted: 27 September 2024

Published online: 07 October 2024

### References

- Marco-Noales E, Peñalver J, Navarro I, Gorris MT, Morente MC, Balguerías C, et al. Iberian wild pear (*Pyrus bourgaeana*) is a new host of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Plant Dis.* 2017;101:502.
- Vanneste JL. What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? In: Vanneste JL, editor. Fire blight the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. New York: CABI Publishing; 2000.
- Doolotkeldieva T, Bobushova S, Carnal S, Rezzonico F. Genetic characterization of *Erwinia amylovora* isolates detected in the wild walnut fruit forest of South Kyrgyzstan. *J Plant Pathol.* 2021;103:109–20.
- Denning W. On the decay of apple trees. *New York Soc Promot Agric Arts Manuf Trans.* 1794;2:219–22.
- Pedroncelli A, Puopolo G. This tree is on fire: a review on the ecology of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease. *J Plant Pathol.* 2023. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01397-y>
- El-Helaly AF, Abo-el-Dahab MK, El-Goorani M. The occurrence of the fire blight disease of pear in Egypt. *Phytopathol Mediterr.* 1964;33:156–63.
- Fatmi M, Bougsiba M, Saoud H. First report of fire blight caused by *Erwinia amylovora* on pear, apple, and quince in Morocco. *Plant Dis.* 2008;92:314–314.
- Laala S, Manceau C, Valentini F, Kerkoud M, Kheddami M. Fire blight survey and first characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Algeria. *J Plant Pathol.* 2012;94:693–6.
- Rhouma A, Helali F, Chettaoui M, Hajjouji M, Hajaoui MR. First report of fire blight caused by *Erwinia amylovora* on pear in Tunisia. *Plant Dis.* 2014;98:158–158.
- Vanneste JL, Eden-Green S. Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. In: Vanneste JL, editor. Fire blight the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing; 2000.
- van der Zwet T, Orolaza-Halbrecht N, Zeller W. Fire blight: history, biology, and management. *The American Phytopathological Society*; 2011.
- Wallis AE, Cox KD. Management of fire blight using prebloom application of prohexadione-calcium. *Plant Dis.* 2020;104:1048–54.
- McManus PS, Jones AL. Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopathology.* 1995;85:1547–53.
- Momol MT, Momol EA, Lamboy WF, Norelli JL, Beer SV, Aldwinckle HS. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *J Appl Microbiol.* 1997;82:389–98.
- Rico A, Führer ME, Ortiz-Barredo A, Murillo J. Polymerase chain reaction fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a limited phylogenetic value but allows the design of highly specific molecular markers. *Phytopathology.* 2008;98:260–9.
- Jock S, Donat V, López MM, Bazzi C, Geider K. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environ Microbiol.* 2002;4:106–14.

17. Rezzonico F, Smits THM, Duffy B. Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:3819–29.
18. McGhee GC, Sundin GW. *Erwinia amylovora* CRISPR elements provide new tools for evaluating strain diversity and for microbial source tracking. *PLoS ONE*. 2012;7.
19. Bühlmann A, Dreo T, Rezzonico F, Pothier JF, Smits THM, Ravnkar M, et al. Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environ Microbiol*. 2014;16:2112–25.
20. Mann RA, Smits THM, Bühlmann A, Blom J, Goesmann A, Frey JE, et al. Comparative genomics of 12 strains of *Erwinia amylovora* identifies a pangenome with a large conserved core. *PLoS ONE*. 2013;8:1–11.
21. Zeng Q, Cui Z, Wang J, Childs KL, Sundin GW, Cooley DR, et al. Comparative genomics of Spiroaeidae-infecting *Erwinia amylovora* strains provides novel insight to genetic diversity and identifies the genetic basis of a low-virulence strain. *Mol Plant Pathol*. 2018;19:1652–66.
22. Parcey M, Gayder S, Morley-Senkler V, Bakkeren G, Úrbey-Torres JR, Ali S, et al. Comparative genomic analysis of *Erwinia amylovora* reveals novel insights in phylogenetic arrangement, plasmid diversity, and streptomycin resistance. *Genomics*. 2020;112:3762–72.
23. Tancos KA, Cox KD. Exploring diversity and origins of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* isolates in New York through CRISPR spacer arrays. *Plant Dis*. 2016;100:1307–13.
24. Kurz M, Carnal S, Dafny-Yelin M, Malresse O, Gottsberger RA, Ivanović M, et al. Tracking the dissemination of *Erwinia amylovora* in the eurasian continent using a PCR targeted on the duplication of a single CRISPR spacer. *Phytopathol Res*. 2021;3:1–15.
25. Parcey M, Gayder S, Castle AJ, Svircev AM. Function and application of the CRISPR–Cas system in the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol*. 2022;88:1–13.
26. Förster H, McGhee GC, Sundin GW, Adaskaveg JE. Characterization of streptomycin resistance in isolates of *Erwinia amylovora* in California. *Phytopathology*. 2015;105:1302–10.
27. Mendes RJ, João PL, Santos C, Tavares F. CRISPR genotyping as complementary tool for epidemiological surveillance of *Erwinia amylovora* outbreaks. *PLoS ONE*. 2021;16:1–18.
28. Mendes RJ, Amaro C, Luz JP, Tavares F, Santos C. Variability within a clonal population of *Erwinia amylovora* disclosed by phenotypic analysis. *PeerJ*. 2022;10:e13695.
29. Anonymous. Premier signalement d'*Erwinia amylovora* en Algérie. 2011.
30. Taylor RK, Guilford PJ, Clark RG, Hale CN, Forster RLS. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zeal J Crop Hortic Sci*. 2001;29:35–43.
31. Gottsberger R. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Lett Appl Microbiol*. 2010;51:285–92.
32. Pirč M, Ravnkar M, Tomlinson J, Dreo T. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathol*. 2009;58:872–81.
33. Taffet L, Raio A, Holeva MC, Dikhai R, Kouskoussa CO, Cesbron S, et al. Molecular characterization of Algerian *Erwinia amylovora* strains by VNTR analysis and biocontrol efficacy of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum* antagonists. *Eur J Plant Pathol*. 2020;156:867–83.
34. EPPO. PM 7/20. *Erwinia amylovora*. EPPO Bull. 2022;52(3):198–224.
35. Végh A, Hevesi M, Pájtli É, Palkovics L. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from Hungary. *Eur J Plant Pathol*. 2017;147:455–61.
36. López MM, Roselló M, Llop P, Ferrer S, Christen R, Gardan L. *Erwinia piniflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011;61:561–7.
37. Geider K, Auling G, Du Z, Jakovljević V, Jock S, Völksch B. *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56:2937–43.
38. Casano F, Wells J, van der Zwet T. Fatty acid profiles of *Erwinia amylovora* as influenced by growth medium, physiological age and experimental conditions. *J Phytopathol*. 1988;121:267–74.
39. Ivanović M, Obradović A, Gašić K, Minsavage GV, Dickstein ER, Jones JB. Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. *Eur J Plant Pathol*. 2012;133:545–57.
40. West SA, Buckling A. Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci*. 2003;270:37–44.
41. Lee SA, Ngugi HK, Halbrecht NO, O'Keefe G, Lehman B, Travis JW, et al. Virulence characteristics accounting for fire blight disease severity in apple trees and seedlings. *Phytopathology*. 2010;100:539–50.
42. Arends DW, Alkema W, Hapsari Putri I, van der Gaast CE, Eleveld M, Langereis JD et al. Differential pneumococcal growth features in severe invasive disease manifestations. *Microbiol Spectr*. 2022;10.
43. Wang D, Korban SS, Zhao Y. Molecular signature of differential virulence in natural isolates of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. 2010;100:192–8.
44. Llop P, Barbé S, López MM. Functions and origin of plasmids in *Erwinia* species that are pathogenic to or epiphytically associated with pome fruit trees. *Trees*. 2012;26:31–46.
45. Singh J, Khan A. Distinct patterns of natural selection determine sub-population structure in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Sci Rep*. 2019;9:14017.
46. Zhao Y, He S, Sundin GW. The *Erwinia amylovora* *avrRpt2<sub>EA</sub>* gene contributes to virulence on pear and *AvrRpt2<sub>EA</sub>* is recognized by *Arabidopsis* RPS2 when expressed in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant–Microbe Interact*. 2006;19:644–54.
47. Yuan X, McGhee GC, Slack SM, Sundin GW. A novel signaling pathway connects thiamine biosynthesis, bacterial respiration, and production of the exopolysaccharide amylovanan in *Erwinia amylovora*. *Mol Plant–Microbe Interact*. 2021;34:1193–208.
48. Mohammadi M, Moltmann E, Zeller W, Geider K. Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with real-time PCR. *Eur J Plant Pathol*. 2009;124:293–302.
49. Llop P, Cabrefiga J, Smits THM, Dreo T, Barbé S, Pulavská J, et al. *Erwinia amylovora* novel plasmid pEI70: complete sequence, biogeography, and role in aggressiveness in the fire blight phytopathogen. *PLoS ONE*. 2011;6:e28651.
50. Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13:497–508.
51. Calabrese F, Voloshynovska I, Musat F, Thullner M, Schlömann M, Richnow HH, et al. Quantitation and comparison of phenotypic heterogeneity among single cells of monoclonal microbial populations. *Front Microbiol*. 2019;10:1–23.
52. Spratt MR, Lane K. Navigating environmental transitions: the role of phenotypic variation in bacterial responses. *MBio*. 2022;13:1–16.
53. Weigel WA, Dersch P. Phenotypic heterogeneity: a bacterial virulence strategy. *Microbes Infect*. 2018;20:570–7.
54. Hannou N, Llop P, Faure D, López MM, Mounmi M. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from Middle Atlas Mountains in Morocco by PCR based on tandem repeat sequences. *Eur J Plant Pathol*. 2013;136:665–74.
55. Dardouri S, Chehimi S, Murillo J, Hajlaoui MR. Molecular characterization of Tunisian strains of *Erwinia amylovora*. *J Plant Pathol*. 2017;99:331–7.
56. Refahi M, Baghaee-Ravari S, Mahdikhani-Moghaddam E. Exploring possible variation among Iranian *Erwinia amylovora* strains using multilocus typing and tandem repeat analysis. *J Agric Sci Technol*. 2017;19:745–54.
57. Popović T, Jelušić A, Živković L, Živković N, Iličić R, Stanisavljević R, et al. Identification, genetic characterization and virulence of Serbian *Erwinia amylovora* isolates. *Eur J Plant Pathol*. 2020;157:857–72.
58. Song JY, Yun YH, Kim G-D, Kim SH, Lee S-J, Kim JF. Genome analysis of *Erwinia amylovora* strains responsible for a fire blight outbreak in Korea. *Plant Dis*. 2021;105:1143–52.
59. Sebahia M, Bocsanczy AM, Biehl BS, Quail MA, Perna NT, Glasner JD, et al. Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *J Bacteriol*. 2010;192:2020–1.
60. Ham H, Park DS. Novel approach toward the understanding of genetic diversity based on the two types of amino acid repeats in *Erwinia amylovora*. *Sci Rep*. 2023;13:17876.
61. Gaganidze D, Sadunishvili T, Aznarashvili M, Abashidze E, Guriedidze M, Carnal S, et al. Fire blight distribution in Georgia and characterization of selected *Erwinia amylovora* isolates. *J Plant Pathol*. 2021;103:121–9.
62. Wallis A, Yannuzzi IM, Choi M, Spafford J, Fenn M, Ramachandran P, et al. Investigating the distribution of strains of *Erwinia amylovora* and streptomycin resistance in apple orchards in New York using clustered regularly interspaced short palindromic repeat profiles: a 6-year follow-up. *Plant Dis*. 2021;105:3554–63.
63. Doolotkeldieva T, Bobushova S, Schuster C, Konurbaeva M, Leclercque A. Isolation and genetic characterization of *Erwinia amylovora* bacteria from Kyrgyzstan. *Eur J Plant Pathol*. 2019;155:677–86.
64. Lopez-Sanchez M, Sauvage E, Da Cunha V, Clermont D, Ratsima Harinaina E, Gonzalez-Zorn B, et al. The highly dynamic CRISPR1 system of

- Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. Mol Microbiol. 2012;85:1057–71.
65. Jiang W, Maniv I, Arain F, Wang Y, Levin BR, Marraffini LA. Dealing with the evolutionary downside of CRISPR immunity: bacteria and beneficial plasmids. PLoS Genet. 2013;9:e1003844.
  66. Smits THM, Duffy B, Sundin GW, Zhao YF, Rezzonico F. *Erwinia amylovora* in the genomics era: from genomes to pathogen virulence, regulation, and disease control strategies. J Plant Pathol. 2017;99:7–23.
  67. Albanese D, Cainelli C, Gualandri V, Langer S, Pindo M, Donati C. Genome sequencing provides new insights on the distribution of *Erwinia amylovora* lineages in northern Italy. Environ Microbiol Rep. 2022;14:584–90.
  68. Alnaasan Y, Valentini F, Balestra GM, Mazzaglia A, D'Onghia AM, Varvaro L. Modification of a multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing isolates of *Erwinia amylovora*. Plant Pathol. 2017;66:1075–80.
  69. Jock S, Wensing A, Pulawska J, Drenova N, Dreo T, Geider K. Molecular analyses of *Erwinia amylovora* strains isolated in Russia, Poland, Slovenia and Austria describing further spread of fire blight in Europe. Microbiol Res. 2013;168:447–54.
  70. Knowles M. Algeria emerges as major apple market. 2013. <https://www.fruitnet.com/eurofruit/algeria-emerges-as-major-apple-market/158845>.article. Accessed 2 Mai 2024.
  71. EPPO, Datasheet EPPO. *Erwinia amylovora*. 2022.
  72. Beer SV. Fire blight inoculum: sources and dissemination. EPPO Bull. 1979;9:13–25.
  73. Sasser M. Tracking a strain using the microbial identification system. MIDI Tech note. 1990;102:1–4.
  74. MIDI. Sherlock microbial identification system operating manual. Version 6. Newark, DE: MIDI Inc; 2008.
  75. Midani FS, Collins J, Britton RA. AMIGA: Software for automated analysis of microbial growth assays. mSystems. 2021;6.
  76. Cabrefiga J, Montesinos E. Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. Phytopathology. 2005;95:1430–7.
  77. Barbé S, Llop P, Blom J, Cabrefiga J, Goesmann A, Duffy B, et al. Complete sequence of *Erwinia piriitorinigrans* plasmids pEPIR 37 and pEPIR 5 and role of pEPIR 37 in pathogen virulence. Plant Pathol. 2013;62:786–98.
  78. Barbé S, Figàs-Segura A, Benada M, Navarro-Herrero I, Sampaio TM, Biosca EG, et al. Plant-associated microbiota as a source of antagonistic bacteria against the phytopathogen *Erwinia amylovora*. Environ Microbiol Rep. 2022;14:559–69.
  79. Park DH, Yu J-G, Oh E-J, Han K-S, Yea MC, Lee SJ, et al. First report of fire blight disease on Asian pear caused by *Erwinia amylovora* in Korea. Plant Dis. 2016;100:1946–1946.
  80. Mcghee GC, Schnabel EL, Maxson-stein K, Jones B, Stromberg VK, Lacy GH, et al. Relatedness of chromosomal and plasmid DNAs of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. Appl Environ Microbiol. 2002;68:6182–92.
  81. Waleron M, Waleron K, Podhajaska AJ, Lojkowska E. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. Microbiology. 2002;148:583–95.
  82. Santander RD, Monte-Serrano M, Rodríguez-Herva JJ, López-Solanilla E, Rodríguez-Palenzuela P, Biosca EG. Exploring new roles for the *rpoS* gene in the survival and virulence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. FEMS Microbiol Ecol. 2014;90:895–907.
  83. Jock S, Geider K. Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from North America and of two Asian pear pathogens by analyses of PFGE patterns and *hrpN* genes. Environ Microbiol. 2004;6:480–90.
  84. Jones A, Geider K. Gram-negative bacteria: *Erwinia amylovora* group. In: NW S, JB J, W C, editors. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Minnesota, USA: APS Press, The American Phytopathological Society; 2001.
  85. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Mol Biol Evol. 2021;38:3022–7.
  86. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Nucleic Acids Res. 2007;35(Web Server):W52–7.
  87. Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. J Stat Softw. 2008;25:1–18.
  88. Brosius F. SPSS 21. mitp, bhv. Heidelb [ua]. 2013.
  89. Core Team R. R: a language and environment for statistical computing [computer software]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2021.

#### Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.