

Liste des abréviations

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADN_r	:	acide désoxyribonucléique ribosomal
ADN_r16S	:	acide désoxyribonucléique de la sous unité ribosomale 16S
AG	:	acide galacturonique
AOS	:	espèces réactives d'oxygène
BET	:	bromure d'éthidium
Cat	:	catégorie
CI	:	Cité d'innovation
CMC	:	carboxy-méthyle-cellulose
Da	:	Dalton
DC	:	diamètre de la colonie
DH	:	diamètre de l'halo
DKI	:	5-Keto-4-deoxyronate
DKII	:	2,5-diketo-3-deoxy-gluconate
DNS	:	acide dinitrosalicylique
dNTPs	:	désoxyribonucléotides triphosphates
Do	:	densité optique
EDS	:	eau distillée stérile
EG	:	endoglucanases
ELISA	:	dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (enzyme-linked immunosorbent assay)
EP	:	enzymes pectinolytiques
EPS	:	exopolysaccharides
ha	:	hectare

I₂	:	Iode
IP	:	inhibiteurs de protéases
LB	:	Luria-Bertani
LPS	:	lipopolysaccharides
M	:	molaire
MC	:	milieu de culture
mg	:	milligramme
Mgcl₂	:	magnésium chloride
min	:	minute
mM	:	millimolaire
mm	:	millimètres
OGS	:	Oligogalacturonates
pb	:	paire de bases
P.ca	:	<i>Pectobacterium carotovora subsp atroseptica</i>
P.cc	:	<i>Pectobacterium carotovora subsp carotovora</i>
P.ch	:	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>
PCR	:	reaction de polymerization en chaine
pH	:	potentiel d'hydrogène
PE	:	pectines estérases
PGA	:	acide polygalacturonique
PGL	:	polygalacturonate lyase
PL	:	pectates lyases
PM	:	poids moléculaire
PME	:	pectines méthyl-estérases
PMGL	:	polyméthyl-galacturonate lyase
T	:	température
TAE	:	Tris-acétate EDTA

U : unité
UI : Unité internationale
UV : ultra-violet
V : voltes
µm : micromètre
µmole : micromole

Liste des figures

Revue bibliographique

Figure 1: Valeurs nutritionnelles pour 100 g de pomme de terre cuites avec leur peau et épluchées avant consommation (Base de données du Département de l'Agriculture des États-Unis sur les nutriments).....	6
Figure 2: Localisation des cultures de pomme de terre au Maroc (M.Terta et al, 2010).....	7
Figure 3: Aspect de la bactérie <i>E.chrysanthemi</i> sur milieu de culture solide (http://web2.mendelu.cz).....	12
Figure 4: Aspect de la bactérie <i>E.carotovora</i> subsp <i>carotovora</i> sur milieu de culture solide (http://web2.mendelu.cz).....	12
Figure 5 : Mode d'action des pectinases (Jayani et al, 2005).....	15
Figure 6: Schéma de la structure des deux sédérophores impliqués dans le transport du fer chez <i>D.dadantii</i> (Persmark et al, 1992).....	18
Figure 7: Schémas elucidant les différents facteurs du pouvoir pathogène d' <i>Erwinia chrysanthemi</i> (Aida Boughammoura, 2007).....	20
Figure 8: Représentation schématique du développement de la pourriture molle chez les tubercules de pomme de terre par <i>Dickeya</i> spp (David Gerardin et al, 2013).....	21

Matériel et méthodes

Figure 1: Isolement et purification des isolats.....	26
Figure 2 : Révélation de l'activité cellulase.....	27
Figure 3: Principe de révélation de l'activité amylase par le lugol (romain.ferry.pagesperso-orange.fr) (modifiée).....	27

Figure 4: Ensemencements des bactéries par spots sur gélose à base de PGA.....	28
Figure 5: Test de pathogénicité sur les tubercules de pommes de terre.....	29
Figure 6: Principe du dosage des sucres réducteurs par le DNS (http://www.takween.com/techniques/glucides-sucres-dosage.html).....	30
Figure 7 : Méthode du dosage des activités enzymatiques.....	31
Figure 8: Schéma explicatif du protocole suit pour l'extraction rapide de l'ADN par choc thermique.....	36
Figure 9 : Schémas explicatif du protocole de recherche des bactéries antagonistes de <i>D. solani</i> par la méthode de surcouche.....	39
Figure 10: Schémas explicatif du protocole de recherche des bactéries antagonistes contre <i>D. solani</i> par la méthode de stries.....	40

Résultats et discussion

Figure 1: Isolats cellulase ⁺ entourés d'halos orange clairs.....	42
Figure 2: Principe de révélation de l'activité amylase par le lugol.....	44
Figure 3: Résultats du test de pathogénicité sur tranches de pommes de terre.....	47
Figure 4: Cinétique de l'activité cellulase des isolats testés sur milieu CMC (0,5%).....	
Figure 5: Cinétique de l'activité amylase des isolats testés sur milieu à base d'amidon (0,5%)...	52
Figure 6: Cinétique de l'activité pectinase des isolats testés sur milieu à base de pectine (0,5%).....	54
Figure 7: Profil électrophorétique des produits d'amplification par PCR sur gel d'agarose 1%...	56
Figure 8: Image montrant l'action antagoniste des quatre bactéries contre <i>E.spp.</i>	57
Figure 9: Résultats du test d'antagonisme contre <i>E.spp.</i> (A) : isolats tests incubés avant ensemencement de la bactérie indicatrice. (B) : isolats ensemencés en même temps que la bactérie indicatrice.....	58

Liste des tableaux

Revue bibliographique

Tableau 1 : Effets des facteurs abiotiques sur la culture et le rendement de la pomme de terre (www.Fidafrique.net).....	9
Tableau 2 : Principales maladies bactériennes affectant la pomme de terre aux différents stades de production.....	11
Tableau 3: Propriétés et modes d'action des principaux groupes des enzymes pectinolytiques...	15

Matériel et méthodes

Tableau1: Origine des isolats testés au cours de cette étude.....	25
Tableau 2: Préparation de la gamme étalon du glucose (0,05%).....	32
Tableau 3 : Préparation de la gamme étalon du maltose (0,5%).....	33
Tableau4 : Préparation de la gamme étalon de l'acide galacturonique (0,5%).....	34
Tableau 5: Réactifs, concentrations et volumes utilisés pour la préparation de la PCR.....	37

Résultats et discussion

Tableau 1: <i>Liste des isolats Cellulase⁺ et Cellulase⁻</i>	42
Tableau 2: Estimation de l'activité cellulase.....	43
Tableau 3: Résultats du test de révélation de l'activité amylase.....	44
Tableau 4: Estimation de l'activité amylase.....	45
Tableau 5: Test de pathogénicité sur tubercules de pommes de terre.....	46

Tableau 6: Poids de la pourriture molle développée par les isolats pathogènes sur les tranches de
pommes de terre..... 48

Rapport-Gratuit.com

Liste des annexes

Annexe I : *Milieux de culture*

Annexe II : *Caractérisation biochimique*

Annexe III : *Identification moléculaire*

Sommaire

Introduction générale	1
Revue bibliographique	5
I)-Quelques notions sur la pomme de terre.....	6
1)- Production de la pomme de terre à l'échelle marocaine.....	6
2)-Pomme de terre et biotechnologie : Utilisations industrielles.....	7
3)- Facteurs influençant la production de la pomme de terre.....	8
4)- Principales maladies bactériennes de la pomme de terre.....	9
II)- Généralités sur les <i>Erwinia</i>	10
1)-Notions générales.....	10
1-1)- <i>Erwinia chrysanthemi</i>	10
1-2)- <i>Erwinia carotovora</i> (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)	12
2)-Phytopathogénicité d' <i>Erwinia</i>	13
2-1)-Enzymes dégradatives de la bactérie <i>E. chrysanthemi</i>	13
a)-Pectinases.....	13
b)-Cellulases.....	15
c)-Protéases.....	16
2-2)-Rôle des gènes "pel" dans le développement de la macération du tubercule des pommes de terre.....	16
2-3)-Autres déterminants du pouvoir pathogène d' <i>E. chrysanthemi</i>	17
a)-Rôle des composantes de la surface bactérienne.....	17
b)-Rôle de l'assimilation du fer par <i>E. chrysanthemi</i> dans la mise en œuvre et la progression de la phytopathogénicité.....	18
c)-Rôle de la mobilité et du chimiotactisme dans le développement de la phytopathogénicité d' <i>E. chrysanthemi</i>	19
d)-MsrA comme agent de défense contre le stress oxydatif.....	19
2-4)-Mécanisme du développement de la pourriture molle par <i>E.chr</i> chez les pommes de terre.....	20
III)- Moyens du contrôle de la pathogénicité de <i>Dickeya spp</i>	22



1)- Contrôle physique.....	22
2)-Contrôle chimique.....	22
3)-Contrôle biologique.....	23
Matériel et méthodes.....	24
I)-Origine des isolats faisant l’objet de l’étude.....	25
II)-Isolement, purification et identification des isolats.....	25
1)-Isolement et purification des isolats.....	25
2)-recherche et caractérisation biochimiques d’ <i>Erwinia chrysanthemi</i> et des isolats purifiés.....	26
2-1)-Révélation de l’activité cellulase.....	26
2-2)-Révélation de l’activité amylase.....	27
2-3)-Révélation de l’activité pectinase.....	28
2-4)-Test de pathogénicité des isolats sur les tubercules de pommes de terre.....	29
III)-Dosage des activités enzymatiques.....	30
1)-Dosage de l’activité cellulase.....	30
2)-Dosage de l’activité amylase.....	32
3)-Dosage de l’activité pectinase.....	33
IV)-Identification moléculaire des isolats: Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	35
1)- Principe de la PCR.....	35
2)- Protocole expérimental.....	36
2-1)-Extraction rapide de l’ADN par choc thermique.....	36
2-2)- Préparation du mixte de PCR.....	36
2-3)- Electrophorèse sur gel d’agarose.....	37
a)-Préparation du gel.....	37
b)-Dépôt des produits d’amplification.....	37
c)-Migration et visualisation du gel.....	38
V)-Recherche des bactéries antagonistes des <i>Erwinia chrysanthemi</i>	38
1)-Méthode de surcouche.....	38

2)-Méthode de stries.....	39
Résultats et discussion.....	41
I)-Caractérisation biochimique des isolats purifiés.....	42
1)-Révélation de l'activité cellulase.....	42
2)-Révélation de l'activité amylase.....	43
3)-Révélation de l'activité pectinase.....	44
II)-Test de pathogénicité des isolats sur les tubercules de pommes de terre.....	46
III)-Dosage des activités enzymatiques.....	50
1)-Croissance et activité cellulolytique des isolats.....	50
2)-Croissance et activité amylolytique des isolats.....	51
3)-Croissance et activité pectinolytique des isolats.....	53
IV)-Identification moléculaire des isolats: Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	56
V)-Recherche des bactéries antagonistes des <i>Erwinia chrysanthemi</i>	57
1)-Méthode de surcouche.....	57
2)-Méthode de stries.....	57
Conclusion et perspectives	60
Références bibliographiques.....	62
Annexe.....	71

Introduction générale

La pomme de terre, *Solanum tuberosum*, est une plante vivace herbacée qui appartient à la famille des *Solanacées* se caractérisant comme étant des plantes à fleurs, et qui partage le genre *Solanum* avec plus de 1000 autres espèces à citer la tomate et l'aubergine. Cette plante originaire de l'Amérique latine a été introduite au Maroc au XIX^{ème} siècle, et depuis lors la demande en cette culture s'est trouvée de plus en plus accrue en raison de son importance dans le régime alimentaire. Ce qui explique sa culture actuellement dans pratiquement toutes les régions du Maroc ainsi que dans le monde entier.

En fait, la culture de pomme de terre comme toutes les autres cultures, exige le savoir et le respect de plusieurs facteurs écologiques afin d'avoir un bon rendement et une bonne qualité. Parmi ces facteurs, les plus importants sont : la température influençant particulièrement le type de croissance puisque, par exemple, les hautes températures stimulent la croissance des tiges alors que les basses températures stimulent davantage celle du tubercule. Aussi, il est nécessaire de mentionner que les pommes de terre se cultivent et poussent surtout dans des climats tempérés ainsi que subtropicaux et tropicaux. Le développement du tubercule se voit fortement inhibé lorsque la température est inférieure à 10°C ou bien supérieure à 30°C, alors qu'un rendement optimal est atteint à des températures moyennes situées entre 18°C et 20°C. A côté de la température, il y a aussi le pH puisqu'un pH des sols légèrement acide (pH= 5,5-6) peut donner des meilleurs rendements par contre, un pH alcalin du sol semble influencer le développement du tubercule tout en lui causant la galle commune. Quant à la structure et la texture du sol, il semble que la plupart conviennent à la culture de cette plante mais à condition que ce sol soit bien drainé et pas trop pierreux. Les sols préférés sont donc ceux profonds, meubles et fertiles. Malheureusement, malgré le savoir et le respect de ces multiples facteurs écologiques, la culture de la pomme de terre reste soumise à plusieurs et différents maladies et ravageurs causant parfois des dégâts et des pertes très importants et redoutables que ce soit au niveau des champs ou au cours de la conservation.

Dans ce sens, les bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia*, notamment (*E. chrysanthemi* et *E. carotovora*), sont classées parmi les agents pathogènes les plus incidents économiquement pour la culture de la pomme de terre (**Helia, 2008**). Au cours de ces dernières années, une augmentation des maladies dues à ces bactéries dont ; des pourritures de tiges dites “**jambes noires**” et de tubercules nommées “**pourritures molles**” ; a pu être observée. En effet, les symptômes de la jambe noire varient d'une pourriture sèche à humide des tiges selon les conditions climatiques. Alors que la pourriture molle est considérée comme étant la plus importante maladie bactérienne affectant les tubercules de la pomme de terre en végétation et en conservation à l'échelle mondiale. (**Helias, 2008 ; Sharga et Lyon, 1998**). Pourtant, d'un autre côté, les symptômes originaires des sécrétions extracellulaires d'enzymes dégradatives ; pectinases, cellulases et amylases ; ne sont pas typiques et spécifiques de *E. chrysanthemi*, mais d'autres bactéries

pectinolytiques causent des symptômes similaires. Ce qui rend l'estimation de l'origine des pertes très difficile malgré le remaniement récemment effectué de la nomenclature des pathogènes causant ces symptômes et appartenant à deux genres à savoir : *Pectobacterium* (anciennement *E. carotovora*) et *Dickeya* (anciennement *E. chrysanthemi*) (Helias, 2008).

Au Maroc, la pourriture molle a été détectée pour la première fois dans la région de plaine du Gharb en 2001, et le genre *Erwinia* a été identifié comme agent causal de cette pourriture au centre technique des cultures sucrières via l'isolement sur milieu de culture et vérification de sa pathogénicité sur tranches de pomme de terre (Nadif et al., 2001). En outre, en 2005, les bactéries *E. carotovora subsp atroseptica* et *E. chrysanthemi* ont pu être identifiées via l'utilisation du test enzymologique rapide ELISA directe du type sandwich. (Snaiki J et al., 2005).

Vu les pertes importantes qui résultent de ces maladies phytopathogènes causées par le genre *Erwinia* ainsi que d'autres bactéries, l'agriculteur se trouve forcé de lutter contre ces bactéries redoutables via plusieurs méthodes de lutte surtout celle chimique qui malgré ses bons résultats, demeure limitée et non fiable à cause de la résistance croissante que développent ces bactéries tout au long du processus de son application. (Vidaver, 2002). Il faut aussi signaler les dangers graves résultants de cette lutte chimique que se soit sur l'environnement ou bien sur la santé humaine, sans oublier son coût très élevé (Thot et al., 2003). Pour ces raisons, la lutte biologique faisant intervenir les microorganismes peut être une meilleure alternative à utilisation efficace et attractive, assurant à la fois une protection des plantes et de l'environnement ainsi que de la santé humaine du fait, de la grande variété, la spécificité d'action, la dissémination facile, et la persistance dans l'environnement de ces microorganismes.

Les biotopes marocains sont des biotopes réputés pour leur biodiversité microbienne riche et prometteuse. Cette biodiversité doit être exploitée afin de la valoriser dans les différents domaines. Ainsi ce travail de recherche porte sur deux volets :

1- Isolement, caractérisation et identification à partir d'une collection bactérienne, du laboratoire de Biotechnologie des microorganismes obtenue des différents biotopes marocains, des bactéries caractérisée par :

- * la production d'enzymes hydrolytiques utiles pour l'industrie comme les cellulases, pectinases, amylases et les protéases
- * le pouvoir antagoniste contre la croissance des *Erwinia* spp.

2- Recherche et isolement de *Dickeya* sp. (ancienne appellation : *Erwinia chrysanthemi*) et *Pectobacterium carotovorum* (ancienne appellation : *E. carotovora*) à partir des champs de culture de pomme de terre des régions Guigo, Meknès et Moulay Bouselhame.

Il faut noter que depuis 2008, *E. chrysanthemi* est reclassifiée comme étant un ensemble d'espèces du genre *Dickeya*. C'est la raison pour laquelle la bibliographie avant 2008 parle d'*Erwinia chrysanthemi*, alors que depuis 2008, on cite le genre *Dickeya*. Dans ce mémoire, les deux nomenclatures seront utilisées selon les citations de la bibliographie.



Revue bibliographique

1)- Quelques notions sur la pomme de terre:

La pomme de terre est un aliment complet et polyvalent en raison de sa riche composition et haute valeur nutritives, le rendant actuellement une partie intégrante du système alimentaire. En fait, la pomme de terre est un aliment très riche en hydrates de carbone et en micronutriments, dont la vitamine C qui grâce à sa forte teneur favorise l'absorption de cette denrée alimentaire. Ainsi, cet aliment constitue une bonne source de sels minéraux tels ; le potassium, le phosphore et le magnésium ; et du fer. En plus, ce mystérieux aliment renferme aussi des antioxydants assurant la prévention des maladies liées au vieillissement, et des fibres alimentaires qui sont essentielles au métabolisme (FAO, 2008). Toutes ces qualités ainsi que d'autres, ont fait de la pomme de terre un aliment très populaire à l'échelle mondiale où elle est préparée et servie de différentes façons.

Alors les questions qui se posent et sur lesquelles on va essayer de répondre dans cette partie sont: **Qu'ils sont les différents usages biotechnologiques de la pomme de terre? Quelle place occupe la culture de cet aliment au Maroc ? Quels sont les divers facteurs pouvant l'influencer ? Et enfin, qu'elles sont les maladies notamment d'origine bactérienne la menaçant ?**

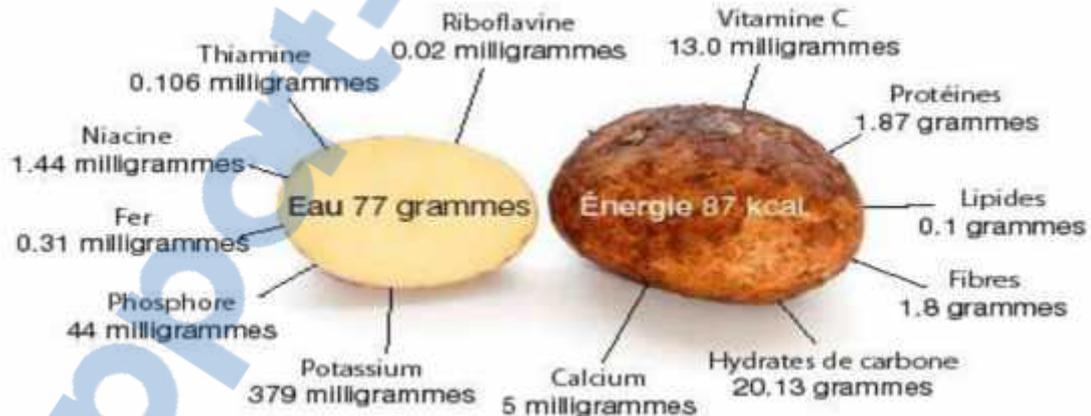
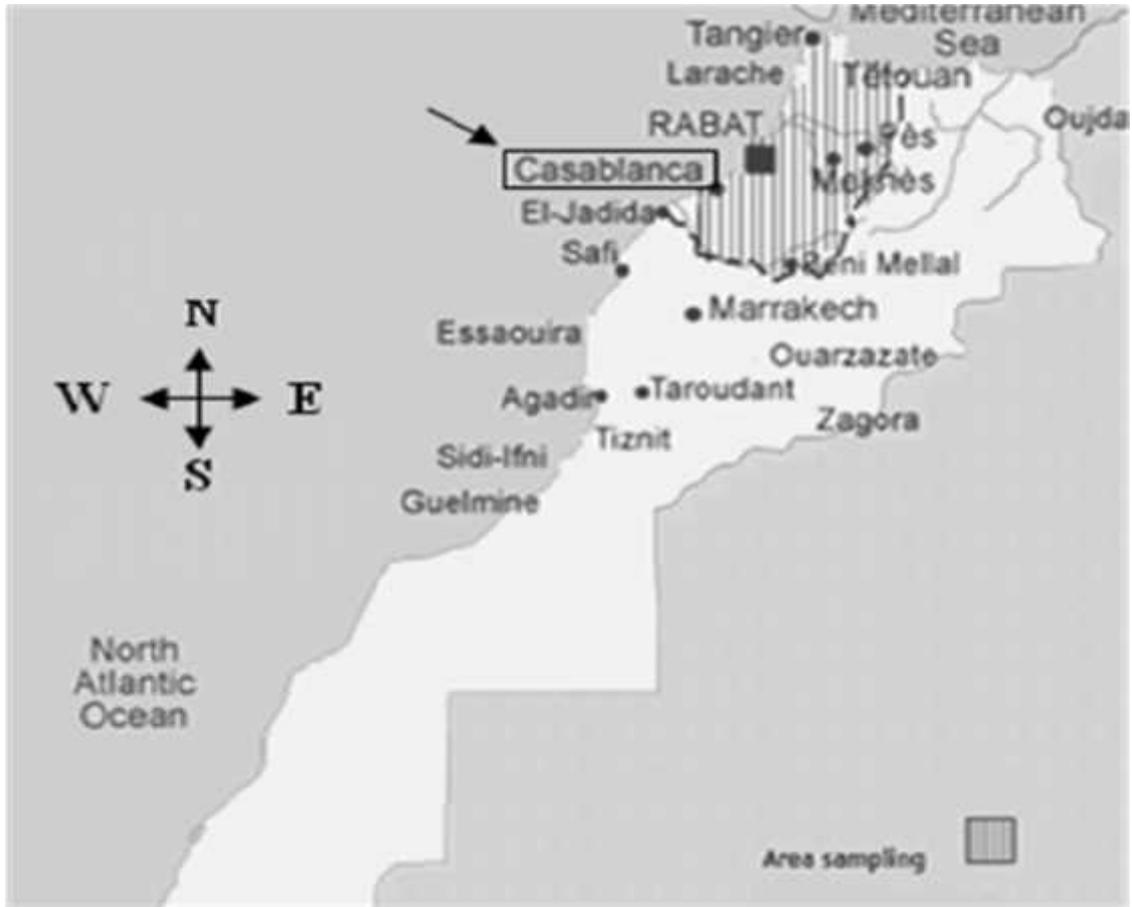


Figure 1 : Valeurs nutritionnelles pour 100 g de pomme de terre cuites avec leur peau et épluchées avant consommation. (Base de données du Département de l'Agriculture des États-Unis sur les nutriments)

1)- Production de la pomme de terre à l'échelle marocaine:

Au Maroc, la culture de la pomme de terre a connu un élan notable et singulier à la fois au niveau de la superficie cultivée comme au niveau de sa production et même des habitudes alimentaires. En effet, depuis son introduction dans notre pays au cours du XIX^{ème} siècle et plus précisément depuis l'indépendance en 1956, la production de cet aliment ; généralement localisé

tout au long de la côte atlantique, au nord et au sud de Casablanca ainsi que dans les régions montagneuses où le climat méditerranéen favorable favorise sa culture (Achbani E, 2010) ; a remarquablement augmentée passant de quelques 150 000 tonnes en 1961 jusqu'à 1.6 millions de tonnes en 2010. (FAOSTAT, 2012).



▨▨▨▨ Zones de cultures importantes de pomme de terre

Figure 2: Localisation des cultures de pomme de terre au Maroc. (M.Terta et al., 2010).

En outre, les cultures de pomme de terre au Maroc occuperaient environ 62 000 ha/an de la superficie des cultures maraîchères, ce qui vaut plus de 25% de la superficie maraîchère totale. Par conséquent, il apparaît normal que la pomme de terre soit classée première culture maraîchère de saison en considérant ses énormes superficie et taux de production. (Rousselle et al., 1996). La culture de cette denrée alimentaire prouve et impose alors son importance capitale pour l'agriculture nationale où elle semble jouer un rôle crucial dans l'économie marocaine. (Sedegui et al., 2000).

2)-Pomme de terre et biotechnologie : Utilisations industrielles

Vu la richesse nutritionnelle et chimique de la pomme de terre, cette denrée alimentaire s'est prouvée avec excellence aussi bien au niveau alimentaire ; dans nos divers plats ; qu'au niveau

industriel. Puisqu'elle a débuté depuis longtemps à alimenter les premières féculières industrielles à l'échelle mondiale.

En fait, c'est la forte teneur du tubercule de cet aliment en amidon (16-20%) (FAO, 2008) constituant la fécule de la pomme de terre ; qui après extraction et traitement aboutit à l'obtention de multiples produits dérivés ; qui est à la base de la large utilisation de la pomme de terre dans l'industrie de la féculerie. Selon la FAO (2008), cette fécule possède un large éventail d'utilisation s'étendant de l'utilisation par les industries pharmaceutiques où l'amidon entre dans la composition de certains médicaments, au textile et papeteries où il joue un rôle d'adhésif, liant et mastic, arrivant même au niveau de la production de polymères plastiques comme la fabrication des assiettes et couverts jetables grâce au fait que ce constituant est à 100% biodégradable des polystyrènes et autres matières plastiques. En outre, même les pelures de la pomme de terre et les déchets "sans valeur" résultants de l'industrie de transformation de cette denrée sont très utiles dans la production de l'éthanol et de combustibles en raison de leur richesse en amidon susceptible de se liquéfier donnant ainsi de l'éthanol. A ce titre et selon la FAO (2008), une étude canadienne a prouvé qu'avec seulement 44 000 tonnes de déchets provenant de l'industrie de transformation de pomme de terre, on pourrait avoir 4 à 5 millions de litres d'éthanol.

Tout cela pousse les biotechnologistes à utiliser cet incroyable aliment à plusieurs autres fins qui seront sans doute très utiles.

3)- Facteurs influençant la production de la pomme de terre:

En dépit de l'énorme production de la pomme de terre et de son importance nutritionnelle et économique que ce soit au Maroc ou partout dans le monde entier, la culture de cette dernière reste telle toutes les autres cultures sujette aux effets de nombreux différents facteurs biotiques (ravageurs, bactéries, champignons...) et/ou abiotiques (climatiques, édaphiques...) susceptibles d'entraîner des pertes souvent très importantes. (Rensink et al., 2005).

❖ Facteurs abiotiques:

Les facteurs abiotiques se résument principalement dans ceux climatiques notamment les périodes de sécheresse prolongées et les fortes précipitations ainsi que, ceux édaphiques (Bettina Stäubli et al., 2008) ; autrement dit ; la structure, la nature et la composition du sol utilisé pour la culture. Le tableau suivant résume les principaux facteurs abiotiques pouvant affecter remarquablement la culture de la pomme de terre.

Tableau 1: Effets des facteurs abiotiques sur la culture et le rendement de la pomme de terre.

(www.Fidafrique.net).

<i>Facteur abiotique</i>	<i>Effets sur la production de pomme de terre</i>
Température	<ul style="list-style-type: none">- Des températures comprises entre 5 et 30°C favorisent la croissance et le développement des pommes de terre.- La température de tubérisation se situe entre 10 et 27°C.- Les sols à haute température pourrissent les semences et diminuent le taux de germination.
Altitude	<ul style="list-style-type: none">- Des altitudes supérieures à 1000m sont favorables voire nécessaires pour réussir mieux la culture.
pH	<ul style="list-style-type: none">- Un pH légèrement acide ; compris entre 5.5 et 6 ; est à la base des bons rendements en pomme de terre.- Une alcalinité excessive du sol peut engendrer des maladies sérieuses de pomme de terre comme par exemple la galle commune sur tubercule.
Sol	<ul style="list-style-type: none">- Les bons rendements exigent un sol léger, bien meuble et riche en matière organique.- Les sols lourds réduisent le taux de germination, la grosseur des tubercules et rendent les récoltes très difficiles.- Eviter les sols humides, mal drainés à l'origine de nombreuses maladies.

❖ **Facteurs biotiques:**

Ces facteurs biotiques sont les plus dangereux et sont principalement les microorganismes phytopathogènes comme les bactéries et les champignons..., qui peuvent affecter la pomme de terre (dans la partie aérienne ou souterraine) et causer des dégâts sérieux au niveau des champs ou au cours du stockage.

A ce terme, on tient à citer les ***Pectobacterium*** présentés par : *P. carotovora subsp carotovora* (*P. cc*), *P. carotovora subsp. Atroseptica* (*P. ca*) et *P. chrysanthemi* (*P. ch*) causant la pourriture molle de la pomme de terre, qui est très répandue dans les champs de cette denrée dans le monde entier, et favorisée par l'humidité et la température modérée. (Barras, F et al., 1994 ; Hanafi, A et al., 1995 ; Perombelon, M.C, 2002).

4)- Principales maladies bactériennes de la pomme de terre:

Les microorganismes et notamment les bactéries sont à l'origine de multiples graves maladies de la pomme de terre induisant ainsi des pertes énormes en cette denrée alimentaire se reflétant remarquablement sur l'économie du monde entier. Le tableau 2 en résume les principales.

La jambe noire et la pourriture molle causées par les bactéries pectinolytiques notamment les *Erwinia* faisant l'objet de notre étude, figurent parmi les maladies les plus graves pouvant affecter les cultures de pomme de terre aux différents stades de sa production. Donc, **Qu'ils sont les caractéristiques des *Erwinia* ? Surtout celles responsables de leur phytopathogénicité ?**

II)- Généralités sur les *Erwinia*:

1)-Notions générales:

Les *Erwinias* sont des bacilles à Gram⁻ d'une taille de l'ordre de 0,5-1µm par 1-3µm, anaérobies facultatifs, non sporogènes, mobiles via des flagelles péritriches. Sur milieu de culture, sont soit isolés, par paires ou parfois en courtes chainettes (**Dickey et al., 1984**), achevant une croissance optimale à des températures de 25-30°C selon les espèces (**Preombelon et Kelman, 1980**). Ces bactéries se propagent amplement dans l'environnement et sont fréquemment présentes dans les lacs, les ruisseaux et les eaux souterraines ainsi que dans le sol (**Chatterjee, A et Cui, S., 2002**). Ce genre regroupe nombreuses bactéries phytopathogènes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* dont on s'intéresse dans cette étude à deux espèces qui sont *Erwinia chrysanthemi* et *Erwinia carotovora* responsables de la pourriture molle chez les tubercules de pommes de terre. Depuis 2008, *E. chrysanthemi* est reclassifiée comme étant un ensemble d'espèces du genre *Dickeya*. C'est la raison pour laquelle *Erwinia chrysanthemi* est citée dans la bibliographie avant 2008 et au delà de 2008 c'est le genre *Dickeya* qui est mentionné.

1-1)-*Erwinia chrysanthemi*:

E. chrysanthemi est une entérobactérie phytopathogène se trouvant préférentiellement dans les régions tropicales et subtropicales à des températures assez élevées de l'ordre de 35-37°C, où est responsable de la pourriture molle chez une large gamme d'espèces végétales (**Perombelon et Kelman, 1980**). En effet, *E. chrysanthemi* est un complexe de différentes souches actuellement reclassifiées comme étant des espèces du genre *Dickeya*. Cependant, ce genre a été divisé ; en se basant sur des caractéristiques phénotypiques, sérologiques et moléculaires ; en sept espèces à citer : *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiaca*, *D. zea*, *D. dadantii* et *D. solani* (**Samson et al., 2005**). Signalant que la souche d'*E. chrysanthemi* 3937 fait partie de l'espèce *D. dadantii*. Cette nouvelle nomenclature de ces pathogènes les a distinguée des autres *Erwinia* causant la pourriture molle y compris *E. carotovora* et *E. atroseptica* (**British potato council, 2007**).

Tableau (2) : Principales maladies bactériennes affectant la pomme de terre aux différents stades de production

Maladies	Agent phytopathogène causal	Symptômes	Remarques	Références
Flétrissement bactérien	<i>Clavibacter michigenseusis</i> sp <i>Sepedonicus</i> : bactérie gram positif en bâtonnets, non mobile. Sa température optimale de croissance est comprise entre 18-25°C. Sur gélose, les colonies sont blanches, minces, translucide luisantes.	-Leur développement dépend des conditions générale de culture, et sont soit à peine visibles ou caractéristiques. -La pourriture des tissus de l'anneau vasculaire du tubercule est un symptôme de la présence de la maladie.	-Maladie très grave de la pomme de terre à la base de très sérieux dommages extrêmement infectieux. -En nature, la bactérie attaque seulement la pomme de terre mais, au laboratoire, infecte la tomate, l'aubergine et autres espèces de Solanum.	- (De Boer, S.H, et Cann, 1989) -(Hayward, et Waterston, 1964).
Gale commune	<i>Streptomyces scabies</i> : Actinomycète vivant dans le sol sous forme végétative ou de spores. C'est un p opportuniste qui disparaît l'apparition des symptômes.	- C'est une maladie se caractérisant par des lésions rondes, irrégulières et brunes mesurant moins de 1cm de diamètre et apparaissant à la surface des tubercules. L'infection peut se propager jusqu'à recouvrir le tubercule	-Maladie du tubercule de pomme de terre nuisant ses qualités culinaires, mais n'affectant ni le rendement ni la durée d'entreposage. -Le parasite est difficilement isoler des tissus malades.	- (Adams, M.J, et G.A.Hide, 1981). -(Faucher et al, 1993). -(Lapwood,D.H et M.J, Adams, 1975)
Jambe noire	<i>E. atroseptica</i> : bactérie gram négatif en bâtonnets, trouvée soit isolée, en paires ou en cha Mobile à flagelles péritrich anaérobie facultatif.	-Les 1 ^{ers} signes de la maladie apparaissent à la floraison, lorsque les tiges flétrissent soudainement.Ce flétrissement est particulièrement visible en temps très chaud et peut être accompagné d'un jaunissement des feuilles.	-Présente dans toutes les régions de culture de pomme de terre, souvent accompagnée de pourriture molle. -Sa gravité dépend de l'humidité et la température du sol lors de la plantation, des conditions de croissance et des sources extérieures de bactéries...	-(Bradbury, J.F, 1977). -(Molina, J.J, et M.D, Harrison, 1980).
Pourriture molle	<i>E. cc</i> , <i>E.ca</i> et <i>E .chr</i> : mêmes caractéristiques que <i>E.ca</i> . Les plus fréquentes sont <i>E.cc</i> et <i>E.ca</i> . Sur gélose nutritive la croissance d' <i>E. cc</i> s'arrête à des T 36°C.	-Seuls les tubercules montrent des symptômes, ils sont infectés par les lenticelles induisant un affaissement des tissus et une formation de lésions brunes et déprimées pouvant atteindre 1cm de diamètre.	-Dommages aux pommes de terre en champ et en entrepôt conduisant à des pertes importantes surtout en entrepôt -Ces bactéries s'attaquent à une vaste gamme de légumes. -En même temps que la jambe noire.	-(Bradbury,J.F, 1977). -(Elphinstone,J.G, et M.C.M, Pérombelon, 1986).



Figure 3: Aspect de la bactérie *E. chrysanthemi* sur milieu de culture solide (<http://web2.mendelu.cz>)

1-2)-*Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*):

L'entérobactérie *P. carotovorum* est une bactérie opportuniste possédant les mêmes caractéristiques qu'*E. chrysanthemi* et est apte à affecter un large éventail d'hôtes dans de très vastes aires géographiques, autant dans les zones tropicales que dans celles tempérées. Cette espèce est en fait divisée en deux sous-espèces qui sont:

→ ***Erwinia carotovora subsp carotovora (E.cc)***: Bactérie psychrotrophe se développant à des températures s'allongeant de 20-30°C (**Perombelon, 2002**). Pourtant sur gélose nutritive ou en bouillon nutritif, la croissance de cette bactérie s'arrête à des températures supérieures à 36°C (**Preombelon et Kelman, 1980**). Elle est fréquemment isolée à partir des pourritures humides des organismes de réserve et des pourritures aériennes des tiges (**Toth et al., 2003**).



Figure 4: Aspect de la bactérie *E.carotovora subsp carotovora* sur milieu de culture solide (<http://web2.mendelu.cz>)

→ *Erwinia carotovora subsp atroseptica (E.ca)*: Cette sous-espèce se trouve toujours en étroite liaison avec les symptômes de la jambe noire, principalement dans les zones tempérées à climat frais et humide (Helias et al., 1998 ; Toth et al., 2003).

Bien que ces deux bactéries appartiennent à la même espèce et pouvant causer la même maladie, *E. ca* possède des caractéristiques propres les distinguant des *E. cc*, telles son incapacité à croître à une température de l'ordre de 37°C, sa production de substances réductrices à partir du saccharose, des acides à partir du maltose et de l' -méthylglucoside (Bradbury, J.F, 1986).

2)-Phytopathogénicité d'*Erwinia chrysanthemi*:

Erwinia chrysanthemi est un phytopathogène induisant la pourriture molle tout en désorganisant, dégradant et brisant les organes végétaux tels les racines, les tubercules, les tiges, et les feuilles épaisses de multiples plantes en plus des pommes de terre, comme l'aubergine, le riz, le maïs, l'endive... En plus, notre pathogène vasculaire semble même capable de coloniser le xylème pour devenir systémique de ces plantes. Cette phytopathogénicité est en fait basée sur la macération des tissus, rendue possible via la capacité de cette bactérie à sécréter un ensemble d'enzymes extracellulaires, entre autres, les pectinases, les cellulases et les protéases. Ces exo-enzymes désorganisent la paroi des cellules végétales tout en dégradant les deux constituants principaux de cette dernière (pectine et cellulose), ce qui d'un côté fournit des nutriments nécessaires à la croissance et la survie de la bactérie et d'un autre côté favorise et garantit l'extension de la maladie.

Alors, plusieurs questions essentielles s'imposent ici: ***Comment ces exo-enzymes se trouvent capables de développer la maladie ? Qu'ils sont les autres facteurs favorisant son apparition ? Et dernièrement, qu'il est le mécanisme par lequel cette bactérie réussit le développement de cette pathogénie ?***

2-1)-Enzymes dégradatives de la bactérie *E. chrysanthemi*:

a)-Pectinaes:

Les enzymes pectinolytiques "pectinases" constituent un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine qui représentent le polysaccharide majeur de la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de la paroi végétale. Cette action se résume dans le scindement de l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique, ouvrant ainsi les liaisons glycosidiques, réduisant l'adhésion intracellulaire et la rigidité tissulaire (Tatiana da costa et Flevo, 2005 ; Fogarty et Kelly, 1983). Ce qui aboutit par conséquent à la dégradation

de la paroi cellulaire, l'éclatement des cellules, et donc, au symptôme de macération (**Bateman et Basham, 1976**).

En fait, ces enzymes présentent à elles seules environ un quart de la production des enzymes alimentaires dans le monde entier et sont classées parmi les enzymes les plus importantes dans le secteur industriel (**Kashyap, D.R et al., 2001**), en raison de leurs fréquentes et multiples utilisations. Comme titre d'exemple, on cite les pectinases acides utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruit (**Rombouts et Pilnik, 1986**) et les pectinases alcalines faisant l'objet d'une immense utilisation dans le dégommeage des fibres de ramie (**Cao et al., 1992**)... Pourtant en réponse à l'extrême usage biotechnologique de ces enzymes, ces dernières sont produites par plusieurs organismes comme les champignons (**Aguilar et Huitron, 1990**), les levures (**Gainvors et Belarbi, 1995**) ainsi que, les bactéries (**Horikoshi, 1972 ; Karbassi et Vaughn, 1980**) parmi lesquelles figurent nos bactéries phytopathogènes (*E. chr et E. cc*) chez lesquelles les pectinases présentent les principaux déterminants de la pourriture molle (**Collmer et Keen, 1986 ; Kotoujansky, 1987**).

D. dadantii produit divers types de pectinases, y compris : Les pectines méthylesterases, les pectines acétylsterases, les exo- et endopectates lyases, exopolygalacturonases, et une rhamnogalacturonate lyase (**Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996**). Ces enzymes sont en effet secrétées par la bactérie via un système de sécrétion du type II nommé "out", qui exporte spécifiquement la plupart des pectinases dans le milieu extérieur (**Kazemi-Pour et al., 2004**). Les produits de dégradation de la pectine sont les signaux majeurs permettant à *D. dadantii* de déclencher l'induction de la pectate lyase. En outre, les composants non caractérisés présents dans l'extrait de la plante sont aptes à augmenter l'induction des pectates lyases en agissant en synergie avec les produits cataboliques de la pectine (**Bourson et al., 1993 ; Nomura et al., 1998**).

Finalement, il est important de mentionner que les pectinases peuvent être classées en se basant sur la nature du substrat (pectine, acide pectique et oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Favela-Torres et al., 2006**) en deux groupes principaux d'enzymes dont les propriétés et le mode d'action sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3: Propriétés et modes d'action des principaux groupes des enzymes pectinolytiques:

Enzyme	Propriétés et mode d'action
Les pectines estérases (PE) Pectine-methylesterases (PME)	<ul style="list-style-type: none"> • Catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques adjacents à un groupe carboxyle libre des pectines, enlevant ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée. Le résultat est la libération du méthanol et la formation du PGA (Sakai et al, 1993). • Leur mode d'action reste toujours mal élucidé. Selon Jayani et al (2005), le mécanisme d'attaque des PE varie en fonction de leur origine. • L'activité des PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre des carboxyles libres, ou encore en utilisant un régulateur du pH puisque, l'ionisation du groupe carboxyle produit dans le milieu un proton causant une variation du pH (Jayani et al, 2005).
Dépolymérasés (polygalacturonases et lyases)	<ul style="list-style-type: none"> • Sont des hydrolases qui possèdent des activités endo- ou exo-galacturonases. • En fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, on distingue quatre catégories différentes : <ul style="list-style-type: none"> → Les PG et les PMG: qui agissent respectivement sur les pectates et les pectines par hydrolyse. → Les PGL et les PMGL: agissant par -élimination sur les pectates et les pectines respectivement. (Alkorta et al, 1998). • Suivant le mode d'attaque, la réaction peut se faire soit de manière aléatoire ou bien de l'extrémité de la chaîne. Ce qui permet la distinction des endo- et des exo-dépolymérasés (Jayani et al, 2005).

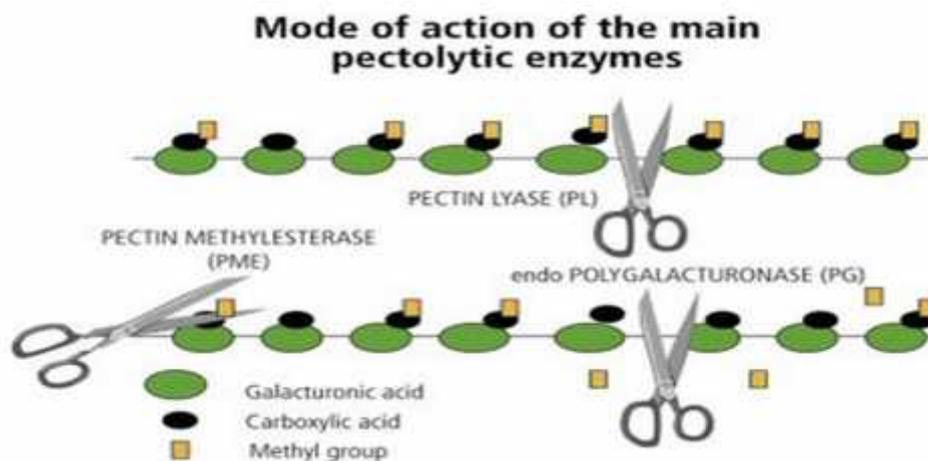


Figure 5 : Mode d'action des pectinases (Jayani et al, 2005).

b)-Cellulases:

La complexité structurale de la paroi cellulaire végétale exige une action concentrée de plusieurs enzymes dégradatives afin d'assurer une destruction complète et efficace. Pour cette raison, et en plus des pectinases, *E. chrysanthemi* notamment la souche 3937 synthétise deux

cellulases codées par les gènes *celZ* et *celY* contribuant à la dégradation des polysaccharides « cellulose » entrant dans la composition de la paroi (Delangle.A et al., 2007 ; Kazemi-Pour et al., 2004). En effet, le produit du gène *celZ* représente 97% de l'activité cellulase globale, tandis que la protéine *CelY* contribue seulement à 3% de cette activité (Barras et al., 1990).

Ces enzymes inductibles qui peuvent être produites par différents microorganismes ; aérobies, anaérobies, mésophiles ou/et thermophiles ; constituent une famille d'au moins trois groupes d'enzymes (Y.H.Percival Zhang et al., 2006 ; R.C.Kuhad et al., 1997) :

→ **Endo-1,4- -glucanases**: Ces endoglucanases (EG) attaquent au hasard les liaisons O-glycosidiques internes donnant ainsi des chaînes glucanes de différentes longueurs.

→ **Exo-1,4- -D-glucanases**: Agissent sur les extrémités de la chaîne de la cellulose et libèrent le -cellobiose comme produit final.

→ **-glucosidases**: Douées d'une action spécifique sur les disaccharides « -cellobiose » et produisent le glucose (E.A.Bayer et al., 1994 ; Singh, 1999).

En outre, les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentaient une cible pour les recherches académiques comme celles industrielles (Singh.A , 1999 ; Singh.A et al., 2007). Toutefois, des études fondamentales et appliquées portant sur ces enzymes cellulolytiques ont démontré leur potentiel biotechnologique dans diverses industries entre autres on cite, l'alimentation humaine et animale, le brassage et la vinification, l'agriculture, pâte et papier, le textile...etc.

c)-Protéases:

A côté des pectinases et des cellulases jouant un rôle majeur dans le développement de la pourriture molle par *E.chr*, cette bactérie produit au minimum une protéase exocellulaire qui accentue la virulence et la gravité de cette pathogenèse d'*E.chr* (Wandersman.C et al., 1985). Ainsi, les protéases sont responsables de la dégradation des protéines de l'hôte en liaison avec leur résistance (Wandersman.C et al., 1985), comme elles sont à la base de l'obtention des acides aminés fondant la biosynthèse des protéines microbiennes.

2-2)-Rôle des gènes « pel » dans le développement de la macération du tubercule des pommes de terre:

E. chrysanthemi produit un ensemble d'au moins sept endopectate lyases (**Pels**). Parmi elles, il y en a cinq dites majeures en raison de leur forte activité in vitro et qui sont : **Pel A, Pel B, Pel C, Pel D et Pel E** codées par les gènes *pel A, pel B, pel C, pel D et pel E*, respectivement. En plus de deux isoenzymes dites mineures (**Pel L et Pel Z**) codées par *pel L* et *pel Z* (Barras et al., 1994 ;

Lojkowska et al., 1995 ; Pissavin et al., 1996). Les gènes codant pour les isoenzymes majeures sont en effet organisés en deux clusters à savoir *pelADE* et *pelBC* dont les protéines A, D et E produites sont homologues comme le sont B et C (**Pissavin et al., 1996**). Pourtant, il semble que chaque gène *pel* est transcrit sous le contrôle de son propre promoteur, et aucun d'entre eux n'est indispensable à la virulence. D'ailleurs, la délétion de ces cinq gènes majeurs n'aboutit pas à l'élimination totale de la capacité du développement de la macération par *E.chr* (**Beaulieu et al., 1993**). Ce qui attire l'attention vers les autres gènes *pels* mineurs pouvant être responsables de la macération et codant pour des protéines appartenant à différentes familles à citer : PSL9 et PSL1 codées par *pelL* et *pelZ* respectivement (**Lojkowska et al., 1995 ; Pissavin et al., 1996**).

2-3)-Autres déterminants du pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi*:

La colonisation et l'attaque des plantes par *Erwinia* à la base de la pourriture molle est un processus multifactoriel nécessitant nombreux autres facteurs à côté des enzymes dégradatives extracellulaires. On cite parmi d'autres : l'assimilation du fer, les exopolysaccharides, la mobilité... (**Toth et al., 2003**).

a)-Rôle des composantes de la surface bactérienne:

Les composants de la surface bactérienne notamment les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) ainsi que les adhésines, peuvent être classés parmi les facteurs primordiaux initiant l'infection chez les plantes puisque, la première étape de l'interaction entre n'importe qu'elle bactérie et son hôte, est tout d'abord son adhésion qui exige la présence de ces trois principaux facteurs (**Schoone jans et al., 1987 ; Condemine et al., 1999 ; Rojas et al., 2002**).

Dans le but de mieux élucider le rôle de ces composants, plusieurs études sont réalisées. En effet, selon **Schoone jans et ses collaborateurs en 1987**, des mutations induites dans la structure du LPS réduisent voire éliminent la pathologie des bactéries sur saintpaulia même si ces bactéries restent aptes à produire les enzymes dégradatives de la paroi végétale. De plus, ces mutants s'avèrent capables d'induire les réactions de défense chez la plante hôte. Ce qui laisse penser que le LPS pourrait être impliqué dans les étapes précoces de l'infection. Ainsi, une autre étude effectuée en **1999** par **Condemine et ses collaborateurs**, a montré que les bactéries mutantes au niveau de la biosynthèse des EPS révèlent un retard dans l'apparition des symptômes sur saintpaulia. Plus, le stade de macération n'est jamais atteint. Enfin, une mutation réalisée au sein du gène *hec A* codant pour une adhésine tend à réduire considérablement le pouvoir pathogène d'*E.chr* (**Rojas et al., 2002**).

Alors, on conclue que les bactéries mutantes au niveau du LPS, EPS et de l'adhésine sont incapables d'adhérer à la paroi végétale et par conséquent de réussir leur infection.

b)-Rôle de l'assimilation du fer par *E. chrysanthemi* dans la mise en œuvre et la progression de la phytopathogénicité:

Le fer joue un rôle clé dans l'adaptation des microorganismes au cours de leur cycle de vie car, il s'agit d'un cofacteur de nombreux processus et réactions cellulaires indispensables à leur survie et à leur croissance. Or, à la suite de son importance dans les réactions biochimiques et ses propriétés chimiques cet ion fait souvent l'objet d'une concurrence entre la bactérie et son hôte pour son acquisition. C'est en fait le résultat de cette compétition qui détermine la réussite de l'infection de l'hôte par la bactérie.

Les plantes stockent le fer dans leur apoplasme soit sous forme de citrate ferrique ou de malate. Aussi, ces hôtes produisent de très forts ligands du fer ; les polyphénols ; en réponse aux différents stress. Ce qui limite le développement des bactéries (Mila et al., 1996). Alors, au cours de l'infection, ces dernières se disséminent dans l'apoplasme et se trouvent confrontées à une très faible disponibilité en fer (Neema et al., 1993). C'est bien le cas d'*E. chrysanthemi* incapable d'utiliser directement le citrate ferrique comme source du fer.

Face à cette carence en fer et puisque les *Pectobacterium* exigent une concentration en fer d'au moins 10^{-6} M pour pouvoir survivre, *E.chr* a développé des mécanismes d'acquisition du fer à haute affinité dont le plus répandu est celui faisant intervenir deux systèmes du transport de cet ion, impliquant deux sédérophores de structures différentes à savoir : la chrysobactine et l'achromobactine. Ce sont des petites molécules organiques de faible PM allant de 500 Da dont les gènes responsables de leur biosynthèse et transport sont fortement induits lors d'une carence en fer et ayant une très forte affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+}) les rendant aptes à fixer le fer et le transporter jusqu'aux cellules en formant des complexes "fer-sédérophores" (Persmark et al., 1992).

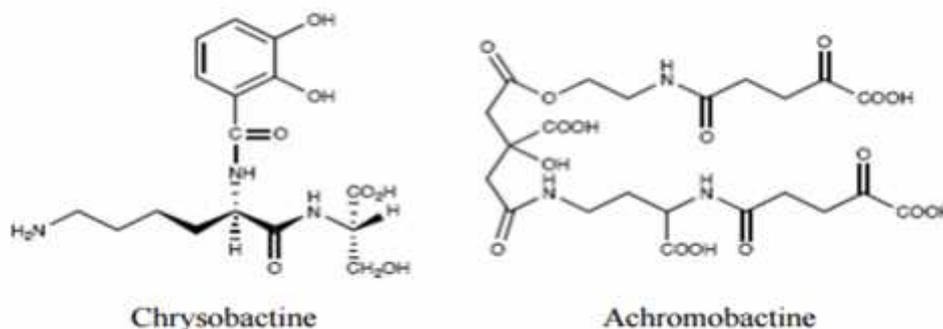


Figure 6: Schéma de la structure des deux sédérophores impliqués dans le transport du fer chez *D. dadantii* (Persmark et al., 1992).

En outre, une étude réalisée par Franza et son équipe en 2005 prouve que des espèces de *D. dadantii* mutées (ne produisent pas les deux sédérophores) s'avèrent très affectées dans leur

pouvoir pathogène. Or, l'expression des gènes *pel B*, *pel C*, *pel D* et *pel E* codant pour les PL chez cette bactérie est induite en cas d'une déficience en fer et réprimée en présence de ce dernier dans le milieu (Franza et al., 2002 ; Franza et al., 2005). La combinaison de ces deux facteurs primordiaux de la pathogénicité d'*E. chr.* Autrement dit, la production des enzymes pectinolytiques désorganisant la paroi végétale et l'acquisition du fer essentiel pour sa survie et sa croissance lui confère un avantage lors de l'invasion de la plante (Boughammoura et al., 2007 ; Dellagi et al., 2005). Chez laquelle un manque en fer serait à l'origine d'une diminution de la synthèse de la chlorophylle, un arrêt du cycle Calvin ainsi qu'un affaiblissement du système de défense de l'hôte (Klaus, 2001) donnant lieu à la propagation de la maladie.

c)-Rôle de la mobilité et du chimiotactisme dans le développement de la phytopathogénicité d'*E. chrysanthemi*

La mobilité est un facteur crucial de pathogénicité faisant de cette espèce un agent pathogène fructueux pouvant atteindre l'intérieur de la plante, afin d'y causer la maladie. Donc, c'est un critère indispensable de réussite de l'invasion et de l'infection des plantes et particulièrement des tubercules des pommes de terre. En outre, l'agencement de la mobilité et le chimiotactisme permet aux bactéries de mener une invasion spécifique, ciblée et reproductible de l'hôte. Puisque, ce dernier permet aux cellules bactériennes de se déplacer vers ou loin de certains stimuli (Lux et Shi, 2004). Dans le but de mieux élucider le rôle du couple « mobilité/chimiotactisme » dans la pathogénicité de la souche *E. chrysanthemi* 3937, une étude faite en 2008 par Maria Antunez-Lamas et ses collaborateurs consistait à muter les gènes impliqués dans le système de transduction du signal chimiotactique (*cheW*, *cheB*, *cheY* et *cheZ*) ainsi que celui jouant un rôle dans la structure du moteur flagellaire (*motA*) a pu montrer que la croissance et la sécrétion des enzymes pectinolytiques n'ont pas été affectées. Pourtant, la mobilité et la virulence ont été clairement réduites chez les souches mutantes. Pris ensemble, ces résultats prouvent que la mobilité joue un rôle crucial dans la pathogénicité de cette bactérie, et est rendue plus spécifique et reproductible en la combinant au chimiotactisme.

d)-*MsrA* comme agent de défense contre le stress oxydatif:

Afin de faire face à la pathogénicité des bactéries responsable de multiples maladies des plantes dont la pourriture molle des tubercules des pommes de terre, ces dernières se trouvent forcer à se défendre tout en produisant des espèces réactives d'oxygène (AOS) dans les cellules infectées. C'est ce qu'on appelle le « stress oxydatif ».

Donc pour réussir l'infection de la plante hôte, la résistance de ces bactéries pathogènes dont *E. chr* à ce stress est nécessaire. Dans ce sens, toute bactérie doit se prémunir contre les espèces actives d'oxygène qui sont à la base de très graves dommages cellulaires. Parmi ces AOS, on tient

à citer : l'anion peroxyde (O_2^-) qui oxyde les clusters [Fe-S] des enzymes libérant ainsi; dans le cytoplasme de la bactérie; du fer ferreux responsable de l'inactivation de ces enzymes (**Fridovich, 1995**). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) attaquant les clusters [4Fe-4S] ainsi que les atomes du soufre des acides aminés (méthionine et cystéine) (**Imlay, 2003**). En plus, l' H_2O_2 semble réagir avec le fer ferreux libre donnant comme résultat de cette réaction, des radicaux hydroxyles qui sont considérés comme étant les espèces actives d'oxygène les plus toxiques et les plus graves. Puisqu'elles sont responsables des cassures de l'ADN, de peroxydation des lipides et même de la carbonylation des protéines (**Imlay, 2003**).

Pour remédier à ces dommages, *E. chr* a pu développer des puissants systèmes de détoxification et de réparation. A titre d'exemple, l'enzyme **MsrA** codée par le gène *msrA*. Elle catalyse la réduction des résidus méthionine sulfoxydes en méthionine. Ce peptide méthionine sulfoxyde réductase répare les protéines oxydées et est présent dans la plupart des organismes vivants.

El Hassouni et ses collaborateurs ont mis en évidence en **1999**, le rôle clé joué par cette enzyme dans la défense contre le stress oxydatif chez cette bactérie. Puisque selon leur étude, la bactérie mutée (**MsrA⁻**) apparaît moins mobile et moins virulente mais, plus sensible au stress oxydatif en comparaison avec la souche sauvage.

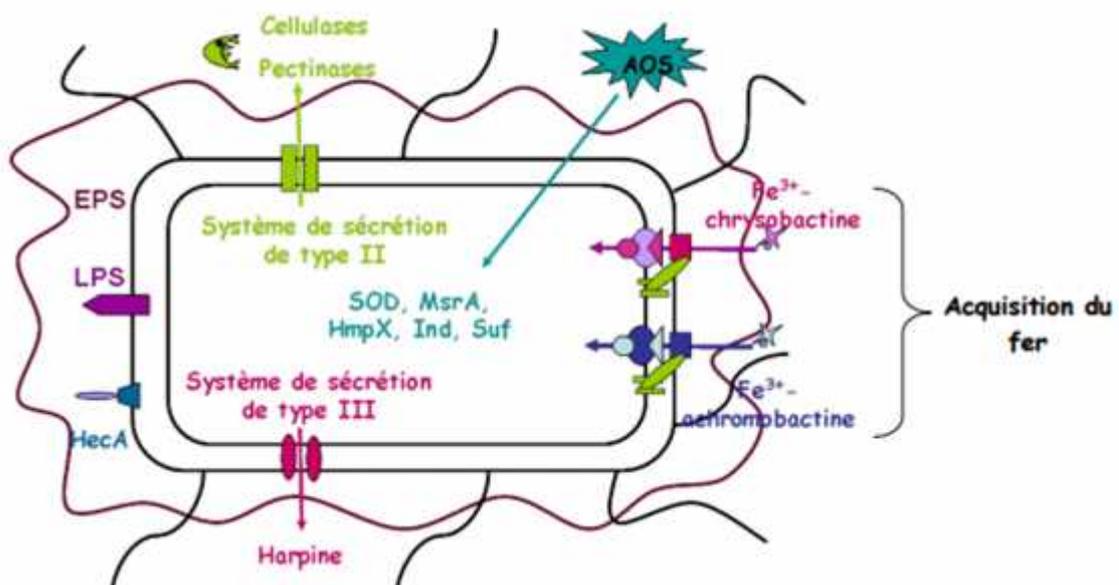


Figure 7: Schémas élucidant les différents facteurs du pouvoir pathogène d'*Erwinia chrysanthemi* (Aida Boughammoura, 2007)

2-4)-Mécanisme du développement de la pourriture molle par *E.chr* chez les pommes de terre:

Après avoir englobé les caractéristiques de cette bactérie phytopathogène ainsi que les facteurs qui l'aident à développer sa pathogénicité et à résister aux différents stress, il est maintenant temps de voir **par quel mécanisme arrive cette bactérie à mettre en œuvre la pourriture molle chez les plantes notamment les pommes de terre ?**

Tout d'abord, la bactérie synthétise plusieurs enzymes pectinolytiques (EP) dont les pectates lyases et les polygalacturonases (McMillan et al., 1993), qui tous les deux dépolymérisent la pectine faisant partie de la structure des parois cellulaires des tissus de pomme de terre en résultant ainsi des oligogalacturonates (OGS). Ces derniers sont absorbés par la bactérie qui à son tour les dégrade en 5-keto-4-deoxyronate (DKI), 2,5-diketo-3-deoxy-gluconate (DKII) en plus de l'acide galacturonique (AG), par le biais d'enzymes nommées "oligogalacturonique lyases". C'est l'action de ces composés de dégradation (DKI, DKII et AG) combinée à celle d'autres résultant de la dégradation des parois cellulaires qui aboutissent à une réaction en chaîne à l'origine d'une augmentation de production des EPs et de la virulence de la bactérie (Yang et al., 1992).

Notons que les OGS issus de la dégradation de la pectine via les EPs jouent un rôle dans l'induction des mécanismes de résistance de la plante hôte face à ces attaques comme par exemple, la production d'inhibiteurs des protéases (IP) et autres phytoalexines (Weber et al., 1996) comme il est schématisé dans la figure ci-dessous.

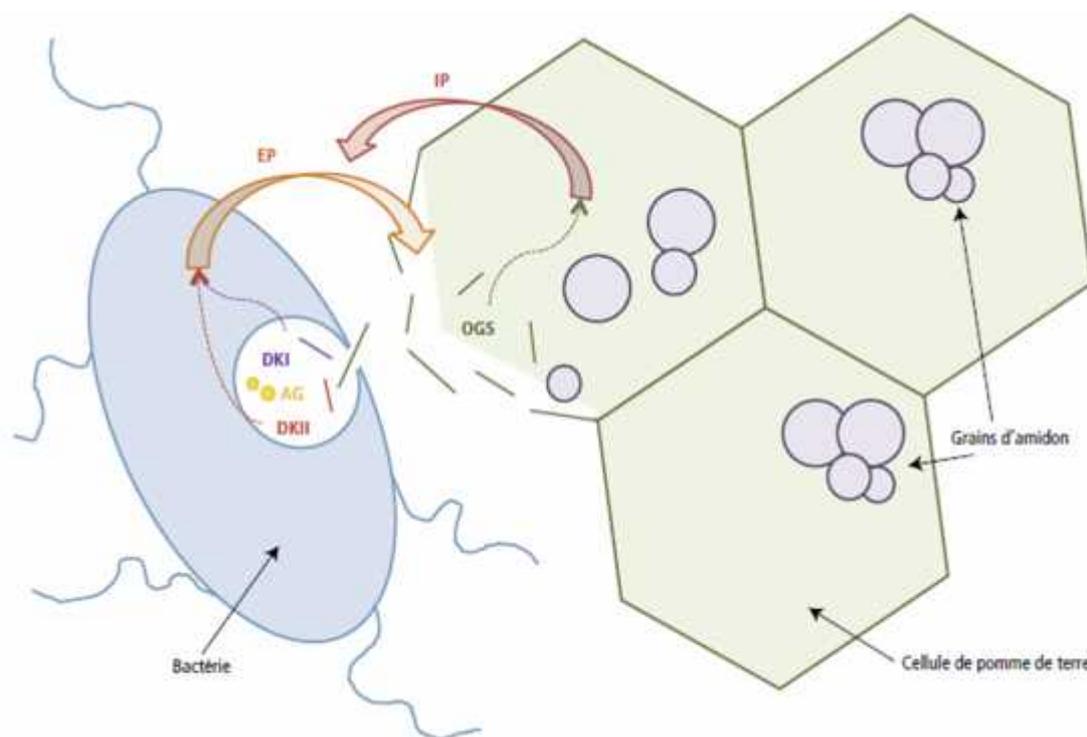


Figure 8: Représentation schématique du développement de la pourriture molle chez les tubercules de pomme de terre par *Dickeya* spp. (David Gerardin et al., 2013).

III)- Moyens du contrôle de la pathogénicité de *Dickeya spp.*

Etant donné que les maladies phytopathogènes sont à l'origine de graves pertes au sein des récoltes agricoles et par conséquent, des pertes économiques. On est alors tous ; de l'agriculteur jusqu'aux scientifiques ; sensés de s'intéresser aux moyens permettant de contrôler voire lutter contre ces maladies causées par multiples bactéries pathogènes dont *E. chr.* Actuellement, différentes stratégies de lutte contre les maladies bactériennes existent dont on cite celle physique, chimique et biologique.

1)- Contrôle physique:

Comme on a déjà cité, *E. chr* peut causer la pourriture molle chez les pommes de terre soit dans les champs ou au niveau de la phase du stockage. En fait, c'est principalement pendant le stockage que le contrôle physique s'établit. Puisque, un contrôle de température et d'humidité au cours de cette étape permet de limiter l'infection ainsi que la propagation de l'agent pathogène. Aussi, les agriculteurs peuvent limiter la pourriture molle rien que par éliminer les tubercules endommagés et malades. Permettant ainsi, de réduire la probabilité et le pourcentage de mise en œuvre de cette maladie. De plus, une manipulation soigneuse aussi bien pendant la récolte que pendant le stockage rend possible de diminuer les blessures et donc les possibilités d'infection par la bactérie pathogène (Czajkowski et al., 2011).

2)-Contrôle chimique:

Actuellement, aucune méthode curative et efficace n'existe pour protéger les pommes de terre contre les *Pectobacterium spp* (Latour. X et al., 2008). Or, certains produits chimiques ont montré une habilité à contrôler ces maladies bactériennes. Comme titre d'exemple, on tient à citer l'acétaldéhyde et le benzoate qui mélangés à la tourbe dont l'application post-récolte c'est-à-dire durant le stockage (pour enrober les tubercules de pommes de terre) permet de réduire la sévérité de la pourriture molle en conditions expérimentales (Wyatt et Lund, 1981). De même, les solutions salées du chlorure d'aluminium et de métabisulfite de sodium s'avèrent aptes à altérer l'intégrité cellulaire bactérienne et à inhiber la croissance des *Pectobacterium* (Yaganza et al., 2004). Les composés cuivreux sont à leur tour capable de diminuer voire limiter la propagation de ces agents pathogènes (Gracia-Garza et al., 2002).

Bien que ces composés chimiques sont très importants et plus ou moins prometteux vu leur large spectre d'hôtes mais, leur application reste limiter à cause des dommages environnementaux et des risques écologiques et sanitaires que peuvent engendrer. En plus, de la résistance que ces bactéries peuvent développer pour en faire face (Vidaver et al., 2002 ; Latour et al., 2008 ; Gulzar et al.,

2009). Ce qui pousse les biotechnologistes à trouver d'autres alternatives afin de remédier à ces problèmes.

3)-Contrôle biologique:

Puisque le pathogène envahit la partie interne des plantes, les produits chimiques conventionnels tels le cuivre peuvent ne pas offrir un contrôle adéquat et efficace de la maladie. Dans le but de résoudre ce problème, plusieurs chercheurs ont focalisé leur attention sur des solutions alternatives à condition que ces dernières n'ayant pas un effet nuisible sur l'environnement. Ceci est rendu possible par la mise en évidence de ce qu'on appelle le contrôle biologique des agricultures (**Yesim Aysan et al., 2003**). Cette lutte biologique se résume dans l'utilisation de différents agents biologiques (virus, bactéries, champignons, protozoaires...) pour lutter contre les organismes pathogènes et les ravageurs des plantes. Pour se faire, différents phénomènes d'antagonisme sont mis en œuvre à savoir: la compétition, le parasitisme et l'antibiose (**Compant et al., 2005**).

Dans ce volet, des chercheurs s'intéressant à l'étude de l'antagonisme des microorganismes contre les bactéries pathogènes ont pu réussir l'utilisation des levures, bactéries, et champignons pour contrôler les maladies bactériennes des plantes (**Alivizatos et Pantazis, 1992 ; Ozaktan et al, 1999**). Une autre étude réalisée en 2003, visant à contrôler *E. chr* sur les tomates a prouvé que l'effet antagoniste ne donne pas une concordance entre les expériences in vivo et in vitro. Puisque, un isolat qui n'est pas efficace in vitro peut l'être in vivo (**Yesim Aysan et al., 2003**). Toutefois, selon une autre étude, des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* qui sont très efficaces au laboratoire, leur efficacité n'a été jamais démontré au champ (**Duffy et al., 2003**).

Malgré cette non concordance, les résultats des études du contrôle biologique restent prometteux. Même si aucun agent de biocontrôle n'a été appliqué pour lutter contre la pourriture molle jusqu'à ce jour (**Yesim Aysan et al., 2003**).

Matériel et méthodes

I)-Origine des isolats faisant l'objet de l'étude:

Ce travail s'est basé sur le test de 300 isolats provenant de la collection bactérienne du laboratoire de Biotechnologie des Microorganismes répartis en quatre catégories selon le site de leur prélèvement comme le montre le tableau.

Tableau1: Origine des isolats testés au cours de cette étude :

Catégorie	Nombre d'isolats	Site du prélèvement
Cat (1/30)	30	Région de Guigou (Fès-Boulemane)
Cat (1/97)	97	Meknès
Cat(M)	30	Moulay Bousselham (Larache)
Cat (1/143)	143	Moulay Bousselham (Larache)

II)-Isolement, purification et identification des isolats:

1)-Isolement et purification des isolats:

Avant de pouvoir identifier ces isolats, la première étape est d'abord de s'assurer de la pureté des isolats. Pour ce faire, à partir du stock de la collection du laboratoire et pour chacun des 300 isolats, après homogénéisation un volume de 50µl est étalé stérilement sur boîte de pétri contenant le milieu LB. Puis, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48h à 72h. Dès que l'incubation est terminée, les colonies obtenues font l'objet d'une purification qui consiste à choisir une colonie bien isolée à partir de chaque boîte et de l'étaler par épuisement sur milieu LB solide afin d'avoir des colonies pures. L'incubation est de nouveau faite à 30°C pendant 48-72h.



Figure 1: Isolement et purification des isolats.

2)-Recherche et caractérisation biochimiques d'*Erwinia chrysanthemi* et des isolats purifiés:

Après purification des isolats à tester, leur caractérisation s'appuie sur plusieurs tests enzymatiques, microbiologiques et moléculaires afin de permettre l'identification de ces derniers. Dans ce contexte, et puisque notre bactérie cible (*E. chr*) est cellulase positive, pectinase positive et amylase négative (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996) et elle est capable de causer la macération des tubercules de pommes de terre. Donc, des tests de révélation des activités enzymatiques ainsi que de mise en évidence du pouvoir pathogène sur les tranches des tubercules de pommes de terre de ces isolats sont réalisés selon les méthodes détaillées ci-dessous.

2-1)-Révélation de l'activité cellulase:

Dans le but de mettre en œuvre l'activité cellulase des isolats, ces derniers sont ensemencés par spots à l'aide d'une anse de platine sur milieu à base du carboxyméthylcellulose (CMC) 0,5%. Sur une même boîte et pour chaque activité enzymatique, deux témoins; un négatif (ne possédant pas l'activité cellulase) et un positif (possédant l'activité); sont utilisés et sont *E.coli* et l'*isolat*₆, respectivement. Après 48h72h 'incubation à 30°C, la révélation de cette activité est réalisée via l'ajout d'une solution du rouge de Congo 1% qui se fixe sélectivement sur les polymères de la cellulose. Après 15 à 20min, les boîtes sont lavées plusieurs fois avec une solution NaCl 0,5M. L'apparition d'un halo clair autour des colonies témoigne de la dégradation du CMC présent dans le milieu par la cellulase secrétée via les isolats, et ces derniers sont dits alors « cellulase⁺ ».

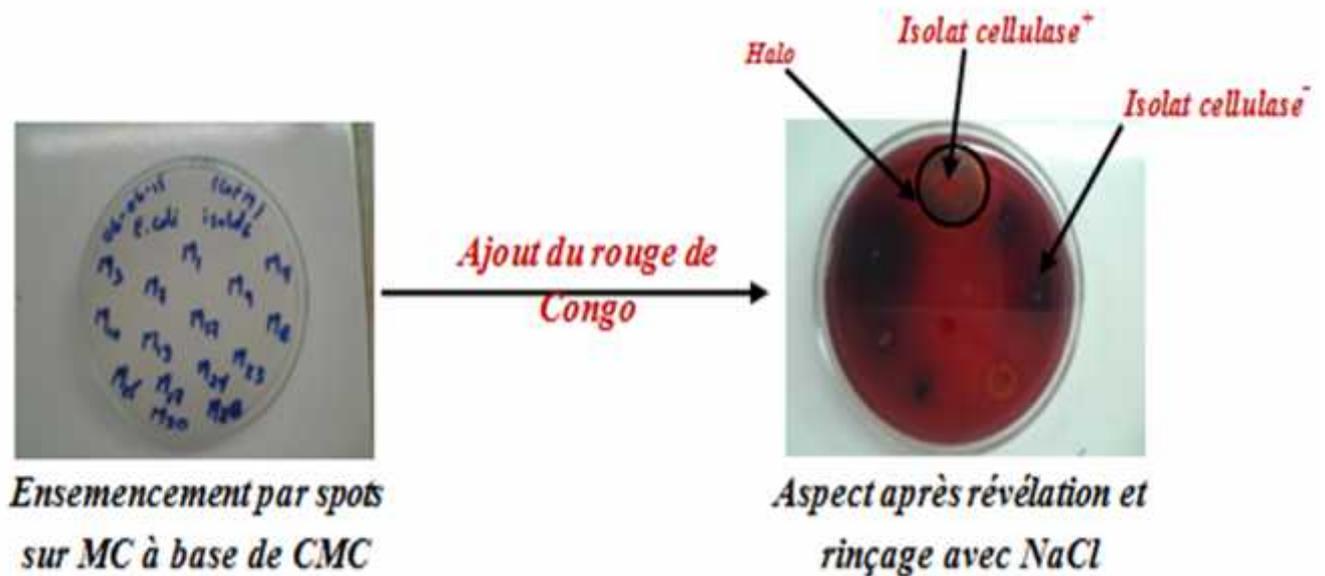


Figure 2 : Révélation de l'activité cellulase.

2-2)-Révélation de l'activité amylase:

Quant à la révélation de l'activité amylase, cette dernière est réalisée selon le même protocole et dans les mêmes conditions d'incubation que précédemment. Mais, l'ensemencement est fait sur milieu à base de l'amidon (0,5%). Les isolats possédant l'enzyme amylase sont capables de dégrader l'amidon présent dans la gélose, développant ainsi un halo clair autour des colonies ; preuve de la dégradation de l'amidon par l'enzyme sécrétée ; après ajout du lugol (contenant l'I₂ qui se complexe avec l'amidon pour former un précipité bleu sombre) et rinçage avec de l'eau distillée. Ces isolats sont alors dits « **amylase⁺** ».

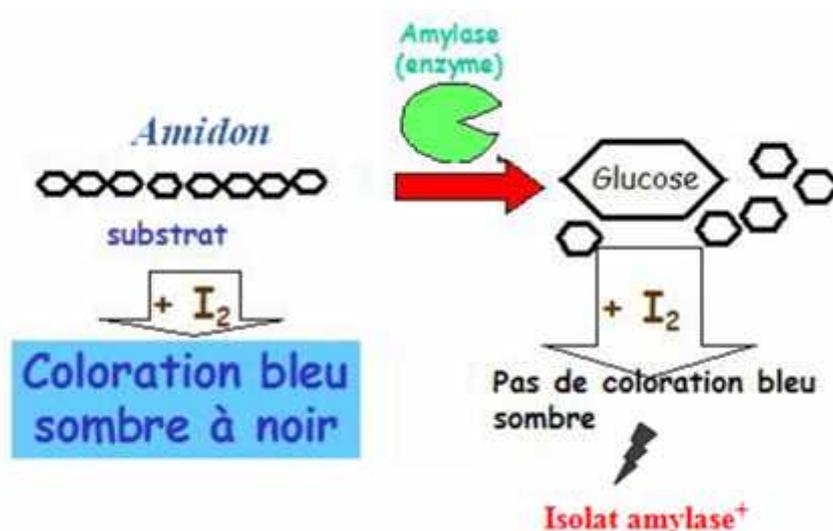


Figure 3: Principe de révélation de l'activité amylase par le lugol (romain.ferry.pagesperso-orange.fr) (Modifiée).

2-3)-Révélation de l'activité pectinase:

Puisque le pouvoir pathogène d'*E. chr* est dû principalement à ses enzymes pectinolytiques, la mise en évidence de cette activité pectinase est alors une étape clé pour son identification. Pour ce faire, nos isolats sont ensemencés en spots sur trois milieux de culture : un à base de PGA 0,5% (pH 7,5) et un autre à base de pectine de pomme 0,5% (pH 6,9) et le troisième à base de pectine (pH 7,2). Puis, ils sont incubés à 30°C pendant 48-72h. La révélation de la sécrétion des pectinases qui dégradent la pectine est faite par l'ajout d'une solution d'acétate du cuivre 7,5% (se fixant sélectivement sur les polymères de pectine) et rinçage successif des boîtes avec de l'eau distillée après 10-15min (K. A. Bhat et al., 2012). Les isolats « pectinase⁺ » sont caractérisés par la présence autour des colonies d'une auréole claire. Ce halo témoigne de l'hydrolyse complète du PGA ou pectine de pomme par les pectinases secrétés via les bactéries.



Figure 4: Ensemencements des bactéries par spots sur gélose à base de PGA

❖ Estimation de l'activité enzymatique:

Pour chacun des trois tests enzymatiques, la mesure du diamètre de la colonie (DC) ; reflétant la capacité de croissance de la bactérie sur le milieu en question ; et la mesure du diamètre de l'halo (DH) ; proportionnel à l'activité enzymatique, permet une estimation de cette activité pour chaque isolat testé selon la formule suivante:

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

2-4)-Test de pathogénicité des isolats sur les tubercules de pommes de terre:

Etant donné que notre bactérie cible (*E. chr*) est responsable de la pourriture molle chez les tubercules de pommes de terre, ce test est donc une étape cruciale et clé pour son identification. Il permet en fait de restreindre et limiter l'intervalle de recherche de cette espèce puisque, seules les bactéries causant ce symptôme sur les tranches des tubercules seront prises en considération pour effectuer les tests moléculaires.

Ce test consiste tout d'abord à bien laver les tubercules de pommes de terre avec de l'eau et à les désinfecter par l'eau de javel commerciale diluée pendant au moins 10min dans le but d'éliminer les bactéries se trouvant à la surface de ces tubercules. Dès que les 10min sont terminées, ces tubercules sont bien essuyés avec du papier absorbant stérile, découpés en tranches plus ou moins de même taille et mis dans des boîtes de pétri stériles contenant du papier absorbant stérile humide (imbibé d'EDS) pour favoriser le développement du symptôme (**figure 5**). Puis, un volume de 20 μ l d'une culture bactérienne (dans le milieu LB liquide) ($Do_{600nm} = 0,7$) de chaque isolat testé est déposé au niveau de petits puits formés à la surface des tranches de pomme de terre à l'aide d'un cône stérile. Le résultat obtenu est considéré positif lorsque le symptôme de pourriture molle apparaît sur les tranches après 48-72h d'incubation à 25°C (température optimale de croissance et de développement du symptôme par *E. chr*).

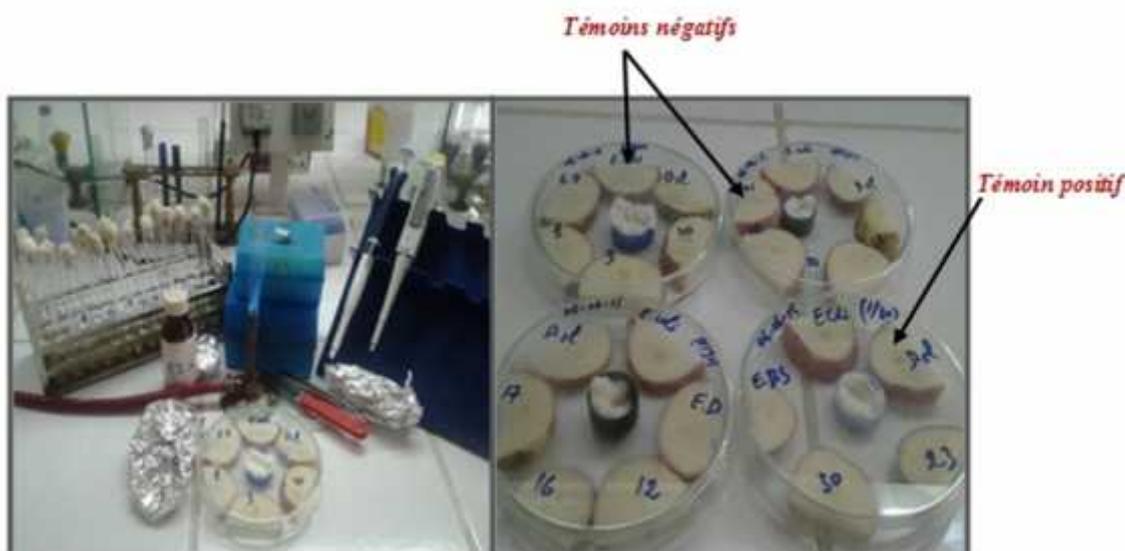


Figure 5: Test de pathogénicité sur les tubercules de pommes de terre.

N.B: *E.coli* et l'EDS sont utilisés comme témoins négatifs alors que *D. solani* est utilisée comme témoin positif.

III)-Dosage des activités enzymatiques:

Vu que les tests de révélation des activités enzymatiques sur milieux solides ne permettent qu'une étude qualitative des activités cellulase, amylase et pectinase des isolats testés, et dans le but de rendre notre étude plus représentative, significative et complète ; on a pensé alors à effectuer une étude quantitative visant à doser ces activités chez les isolats capables de produire et excréter ces enzymes. Pour ce faire, trois isolats (M₂₇ (cat M), 9 et 42 (cat 1/97)) considérés comme étant les plus performants ; puisqu'ils possèdent des DC et DH représentatifs sur les trois milieux de révélation ; sont choisis pour réaliser le dosage des trois activités enzymatiques. Le protocole suivi pour mettre au point ce dosage autrement dit, et cette cinétique de production d'enzymes par ces isolats sera bien détaillée en ce qui suit.

I)-Dosage de l'activité cellulase:

A partir d'une préculture; des 3 isolats choisis; en milieu minimum contenant le CMC (0,5%) comme seule source de carbone et d'énergie (même milieu utilisé pour la révélation mais sans glucose) et après mesure de la Do_{600nm} (Annexe), un volume de 500 μ l est ajouté à 50ml de milieu de culture (même milieu de préculture mais sans inoculum) pour débiter le dosage réalisé selon la méthode décrite par **Ghose (1987)** et **Miller (1959)**. Cette méthode se base sur l'utilisation de l'acide dinitrosalicylique (DNS) pour déterminer la quantité de sucres réducteurs libres présents dans l'échantillon à doser. Le principe de cette quantification est basé sur la réduction du DNS de couleur jaune ; à chaud et en milieu alcalin ; via le sucre réducteur notamment le glucose libéré suite à la dégradation du CMC par la cellulase secrétée par les bactéries en acide-3-amino-5-nitrosalicylique. Ce dernier est d'une couleur rouge brune dont la densité optique mesurée au moyen du spectrophotomètre à 540nm est proportionnelle à la concentration en glucose dans le milieu réactionnel à des conditions physicochimiques constantes.

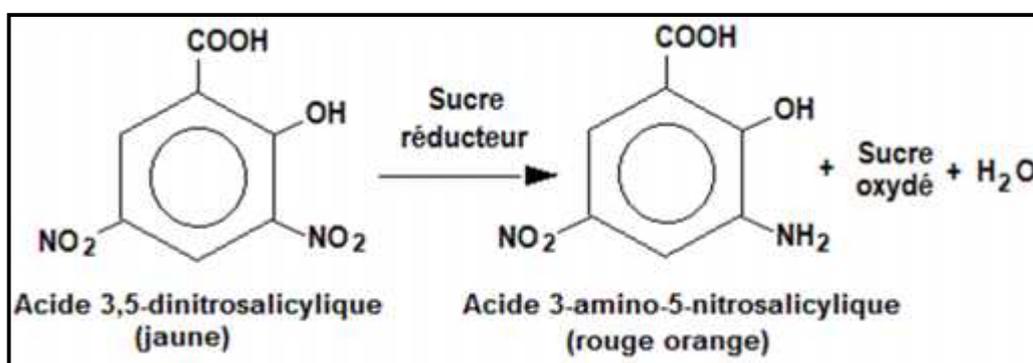


Figure 6: Principe du dosage des sucres réducteurs par le DNS
(<http://www.takween.com/techniques/glucides-sucres-dosage.html>)

La méthode suivie pour doser cette activité cellulase chez chacun des isolats est schématisée dans la figure ci-dessous.

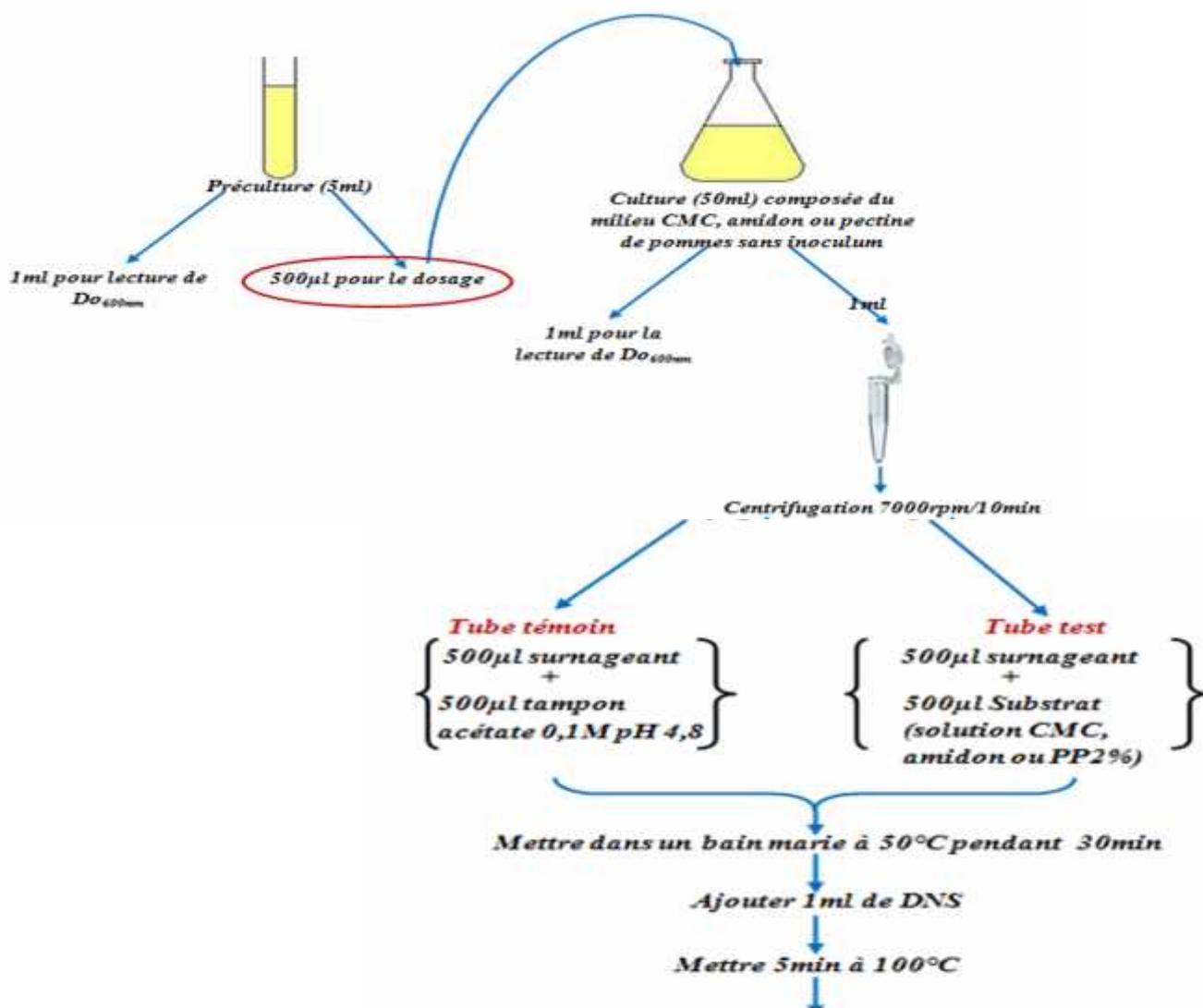


Figure 7: Méthode du dosage des activités enzymatiques

N.B: Le blanc (contenant 500µl du milieu sans inoculum et 500µl du tampon) ainsi que le témoin positif (*Dickeya solani*) subissent les mêmes étapes et sont traités de la même façon et dans les mêmes conditions que les 3 isolats testés.

❖ **Préparation de la gamme étalon du glucose:**

Afin de pouvoir déterminer la concentration du glucose libéré suite à la dégradation du CMC par la cellulase en fonction d'une absorbance mesurée à la longueur d'onde 540nm, une gamme d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions physicochimiques et en utilisant le même matériel que les essais (**tableau 2**).

Tableau 2 : préparation de la gamme étalon du glucose (0,05%)

Tubes	1	2	3	4	5
Concentration du glucose (mg /ml)	0	0,125	0,250	0,375	0,500
Volume en solution mère 0.05% (ml)	0	0,250	0,500	0,750	1
Volume d'eau (ml)	1	0,750	0,500	0,250	0
Volume du tampon acétate à 0.1 M, pH=4.8 (ml)	1	1	1	1	1
Volume du réactif DNS (ml)	2	2	2	2	2

❖ **Mesure de l'activité cellulase:**

L'unité internationale (UI) de cellulase peut être définie comme la quantité d'enzyme qui libère une micromole de glucose par ml pendant une minute (**Ghose, 1987**), et est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité cellulase en } \mu\text{mole/ml/min} = \frac{\frac{[\text{Glucose libéré}](\text{mg/ml})}{0,18\text{mg du glucose} \cdot \text{ml} / \mu\text{mole}}{0,5\text{ml d'enzyme} \times 30\text{min}}$$

Avec :

- 0,180 mg*ml/μmol : la masse molaire du glucose C₆H₁₂O₆
- 0,5ml : volume de surnageant utilisé pour le dosage
- 30 min : la durée de réaction.

2)-Dosage de l'activité amylase:

Le rôle de l'amylase se résume dans le brisement des liaisons (1-4) de l'amidon pour donner le maltose qui est un disaccharide composé de deux molécules -glucose.

Afin de pouvoir doser cette activité amylase et donc déterminer la quantité du maltose libre dans l'échantillon à doser, les trois isolats sélectionnés en plus de la bactérie *Dickeya solani* (anciennement *E. chr*); témoin positif ; sont cultivés en milieu minimum liquide contenant l'amidon (0,5%) comme seule source de carbone et d'énergie. Ce dosage est réalisé en suivant le même protocole que le dosage de l'activité cellulase, la seule différence entre les deux se voit au niveau de la gamme étalon où une solution mère du maltose à 0,5% est utilisée au lieu de celle du glucose 0,05%.

❖ Préparation de la gamme étalon du maltose:

Comme déjà cité, la gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère du maltose à 0,5% dans les mêmes conditions et en utilisant le même matériel que les essais selon le tableau ci-dessous:

Tableau 3: préparation de la gamme étalon du maltose (0,5%)

Tubes	1	2	3	4	5
Concentration du maltose (mg /ml)	0	0,250	0,500	0,750	1
Volume en solution mère 1% (ml)	0	0,050	0,100	0,150	0,200
Volume d'eau (ml)	1	0,950	0,900	0,850	0,800
Volume du tampon acétate à 0.1M, pH=4.8 (ml)	1	1	1	1	1
Volume du réactif DNS (ml)	2	2	2	2	2

❖ Mesure de l'activité amylase:

L'unité internationale d'amylase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère une micromole de maltose par ml pendant une minute. Elle est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité amylase en } \mu\text{mole/ml/min} = \frac{[\text{Maltose libéré}] (\text{mg/ml})}{\frac{0,342\text{mg de maltose} \cdot \text{ml} / \mu\text{mole}}{0,5\text{ml d'enzyme} \times 30\text{min}}}$$

Avec:

- 0,342 mg*ml/ μ mol : la masse molaire du maltose $C_{12}H_{22}O_{11}$
- 0,5ml : volume de surnageant utilisé pour le dosage.
- 30 min : la durée de réaction.

3)-Dosage de l'activité pectinase:

La pectine est un composant majeur de la paroi cellulaire végétale qui est dégradé ; par les bactéries phytopathogènes produisant les pectinases ; en PGA. En fait, le but de ce test est d'étudier quantitativement la production de pectinases par les trois isolats choisis en plus du témoin positif (*Dickeya solani*). Pour cette raison, deux milieux de culture liquides minimums (un à base de PGA 0,5% pH 7,4 et un autre à base de pectine de pomme 0,5% pH 7,2 comme seules sources de carbone et d'énergie) sont inoculés et le dosage est réalisé selon le même protocole suit pour le dosage des deux activités amylase et cellulase.

❖ Préparation de la gamme étalon de l'acide galacturonique:

Pour pouvoir quantifier le PGA libéré dans le milieu, une gamme étalon de l'acide galacturonique 0,5% est réalisée dans les mêmes conditions et par le même matériel que les échantillons à doser selon le tableau suivant :

Tableau 4: préparation de la gamme étalon de l'acide galacturonique (0,5%)

Tubes	1	2	3	4	5
Concentration d'acide galacturonique (mg /ml)	0	0,250	0,500	0,750	1
Volume en solution mère 0.5% ml)	0	0,050	0,100	0,150	0,200
Volume d'eau (ml)	1	0,950	0,900	0,850	0,800
Volume du tampon acétate à 0.1 M, pH=4.5 (ml)	1	1	1	1	1
Volume du réactif DNS (ml)	2	2	2	2	2

❖ **Mesure de l'activité pectinase:**

La quantité d'enzyme "pectinase" qui libère une micromole d'acide galacturonique par ml pendant une minute est connue sous le nom de l'unité internationale de pectinase et est calculée selon la formule ci-dessous:

$$\text{Activité pectinase en } \mu\text{mole/ml/min} = \frac{[\text{Acide galacturonique libéré}] \text{ (mg/ml)}}{0,194 \text{ mg de l'acide. galacturonique } * \text{ml}/\mu\text{mole}} \times \frac{1}{0,5\text{ml d'enzyme} \times 30\text{min}}$$

Avec:

- 0,194 mg*ml/μmol : la masse molaire de l'acide galacturonique C₆H₁₀O₇
- 0,5ml : volume de surnageant utilisé pour le dosage
- 30 min : la durée de réaction

IV)-Identification moléculaire des isolats: Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

La réaction de polymérisation en chaine (PCR) est une technique d'identification moléculaire permettant l'amplification; in vitro; d'une séquence d'ADN choisie. Elle permet d'obtenir à partir d'une quantité faible de bases nucléiques, un très grand nombre de copies de la séquence choisie. Cinq isolats sont sélectionnés pour la réalisation de cette identification moléculaire à savoir : Les trois isolats (M₂₇, 9 et 42) possédant les activités enzymatiques les plus intéressantes, l'isolat 80 (cat 1/143) qui est amylolytique-cellulolytique et pathogène ainsi que celui 75 causant la pourriture la plus importante sur les tranches de pommes de terre.

1)- Principe de la PCR:

La PCR comprend 35 cycles d'amplification de la séquence d'ADN choisie, et chaque cycle est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes :

- ❖ **Dénaturation:** Consiste en la séparation des deux brins de la double hélice de l'ADN suite à la rupture des liaisons faibles d'hydrogènes assurant sa cohésion, à une température de 94°C pendant 30 secondes.
- ❖ **Hybridation:** Dès que les deux brins de l'ADN sont séparés, les amorces universelles (Fd1 et Rs16) ; utilisées pour l'amplification du fragment de l'ADNr 16S (1500pb) des *Eubactéries* ; s'hybrident aux deux brins selon le principe d'appariement des bases complémentaires. Cette étape se fait pendant 30 secondes à une température de 55°C.

Séquences des deux amorces universelles {
fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3').
Rs16 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3').

- ❖ **Elongation:** L'hybridation des deux amorces aux brins de l'ADN est un point de départ de la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. Cette polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides (dNTPs) présents dans le mélange réactionnel, de telle façon à ce que chaque base nucléique ajoutée soit complémentaire à la base correspondante au niveau du brin matrice. Cette étape est faite via une enzyme nommée "Taq polymérase" qui synthétise l'ADN dans le sens 5'→3'. C'est une ADN polymérase thermorésistante extraites des bactéries vivant naturellement à de très hautes températures.

2)- Protocole expérimental:

2-1)-Extraction rapide de l'ADN par choc thermique:

A partir d'une préculture des isolats sélectionnés (Do_{600nm} 0,9), la lyse bactérienne est faite selon le schéma suivant:

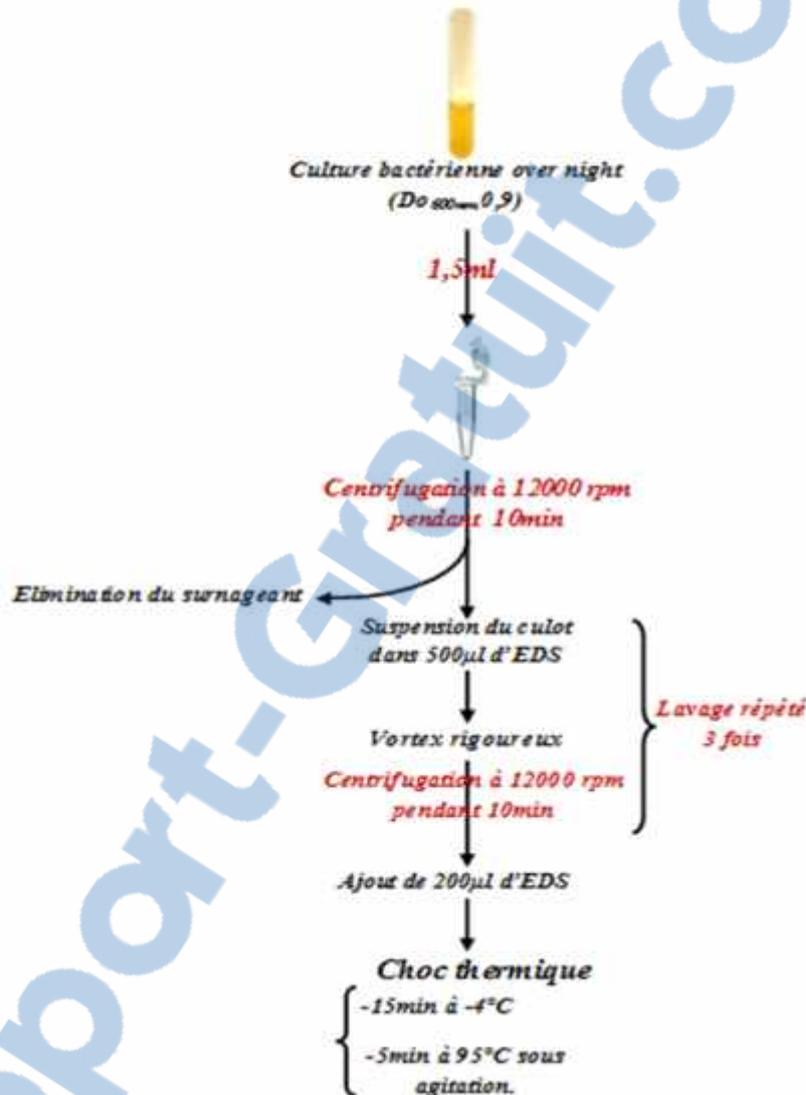


Figure 8: Schéma explicatif du protocole suivi pour l'extraction rapide de l'ADN par choc thermique

2-2)- Préparation du mixte de PCR:

A partir des réactifs cités dans le tableau(2), un tube mixte est préparé selon les volumes cités. Puis, le mélange est réparti en volumes égaux dans 7 tubes correspondant à ceux des 5 isolats choisis, en plus du témoin positif (chromosome de la souche *Erwinia pin 14*) et du témoin négatif (EDS). L'ensemble des tubes est par la suite mis dans le thermocycleur où s'effectuent les 35 cycles de PCR en une durée de 2h3min.

Tableau 5: Réactifs, concentrations et volumes utilisés pour la préparation de la PCR

Réactifs	Concentration finale	Volume (µl)	Volume*7 (mixe)
Tampon Go Taq	X1	2µl	14µl
Mgcl ₂	1,5mM	0,6µl	4,2µl
dNTPs	0,2mM	4µl	28µl
Amorce 1	0,5µM	2µl	14µl
Amorce 2	0,5µM	2µl	14µl
Taq polymérase	0,01U/µl	0,2µl	1,4µl
ADN matrice	—	2µl	14µl
H ₂ O	—	7,2µl	50,4µl

N.B: Le volume final dans chaque tube est de 20µl.

2-3)- Electrophorèse sur gel d'agarose:

Dès que les 35 cycles de PCR sont terminés, l'ADN des isolats amplifié est récupéré et une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée dans le but de s'assurer de la qualité et de la spécificité de l'amplification.

a)-Préparation du gel:

Le gel d'agarose est préparé en ajoutant 0,6g d'agarose à 60ml du tampon TAE obtenu en diluant une solution mère concentrée 50x. La solution TAE-agarose (1%) est chauffée sous agitation jusqu'à dissolution complète puis, le gel est refroidi pendant 10-15min. Un volume de 2µl de BET est ajouté ensuite au gel, pour la simple raison que ce dernier est un transilluminateur s'intercalant entre les bases de l'ADN pour permettre la visualisation des bandes caractéristiques de l'amplification sous les rayons UV. Le gel ainsi préparé est coulé dans une cuve menée d'un peigne de 10 cupules, solidifié puis immergé dans une solution TAE (1x) (la même utilisée pour la préparation du gel).

b)-Dépôt des produits d'amplification:

Afin de suivre la migration de l'ADN amplifié dans le gel d'électrophorèse, 5µl de chaque produit de PCR est mélangé à 5µl de solution de charge qui augmente le densité de l'ADN ; grâce à sa teneur en glycérol ; pour qu'il ne se disperse pas dans le gel.

Notons qu'en plus du glycérol (allourdisseur), la solution de charge contient deux colorants à savoir:

-Le xylène cyanol (de couleur jaune) qui migre avec une vitesse supérieur à celle des amorces, à niveau inférieur à 50 pb.

-Le bleu de bromophénol (de couleur bleue) migrant à 3-5Kb.

c)-Migration et visualisation du gel:

Après dépôt de l'ADN mélangé au tampon de charge, la migration est faite via un générateur du courant électrique sous un voltage de 80V. Vu que l'ADN est chargé négativement, il migre alors du pôle négatif (cathode) au pôle positif (anode). La migration est considérée terminée dès que le bleu de bromophénol dépasse les $\frac{3}{4}$ du gel. Ce dernier est visualisé par le biais d'un transilluminateur à rayons UV.

V)-Recherche des bactéries antagonistes de *Dickeya sp.*:

Inspiré des travaux prometteux de la lutte biologique qui ont vu le jour récemment, ce travail vise dans son dernier volet à étudier ou plutôt rechercher des bactéries douées d'un pouvoir antagoniste contre notre bactérie phytopathogène cible "*Dickeya solani*" (Institut des sciences de végétal, CNRSn Paris)

Dans ce sens, les isolats qui ne s'avéraient pas capables d'induire le symptôme de pourriture molle sur les tranches des tubercules de pomme de terre ont fait l'objet de cette recherche. Alors, 159 isolats non pathogènes sont testés contre *D. solani* selon deux méthodes distinctes à savoir : la méthode de surcouche et celle de stries dont le protocole suit sera décrit ci-dessous.

1)-Méthode de surcouche:

Pour mettre en évidence le pouvoir antagoniste des 159 isolats non pathogènes sélectionnés, on a procédé d'abord par la méthode de surcouche ; décrite par **Tagg et al** en **1979** avec modification ; qui est une méthode rapide et moins couteuse, permettant de cribler dans une même boîte de pétri plusieurs isolats.

Comme le montre le schéma ci-dessous, les bactéries testées sont d'abordensemencées en spots sur milieu général (LB) solide et incubées pendant 12-24 à 30°C. Dès que la période d'incubation est terminée, les boîtes sont recouvertes par une surcouche (milieu gélosé ; à 0,4% de gélose ; maintenu en surfusion à 45°C) inoculée par 100µl de préculture fraîche (DO_{600nm} 0,8) de notre bactérie cible indicatrice "*D. solani*". Après solidification, les boîtes sont incubées à la température optimale de croissance de *D. solani* (28°C) pendant 48-72h. Le résultat est considéré positif autrement dit, une bactérie telle est antagoniste si elle est entourée d'une auréole d'inhibition de croissance de la bactérie indicatrice.

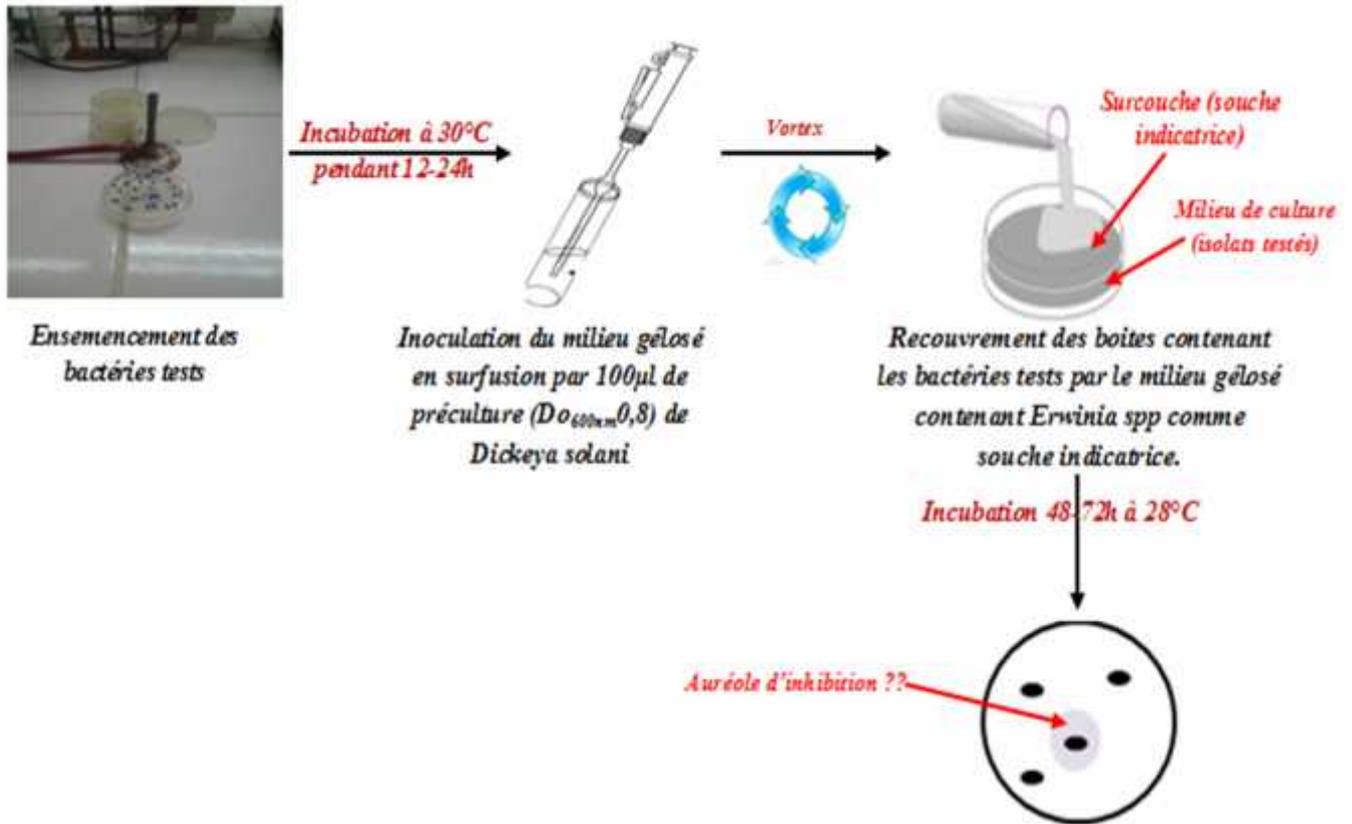


Figure9 : Schémas explicatif du protocole de recherche des bactéries antagonistes de *D. solani* par la méthode de surcouche

N.B: Au cours de cette méthode, le milieu gélosé a été utilisé à une concentration en agar de 0,4% pour ne pas empêcher l'accès de l'air aux isolats testés en cas d'utilisation de la concentration décrite par **Tagg et al (1979)** et qui est de 1,5%.

2)-Méthode de stries:

En plus de la méthode de surcouche, les isolats non pathogènes sont testés également via la méthode de stries dont le but est le même que celui de la méthode précédente pourtant le protocole diffère. Cette méthode permettant d'étudier le pouvoir pathogène des bactéries tests contre *D. solani*, consiste dans un premier lieu en l'étalement par stries ; au milieu des boîtes de pétri contenant du milieu LB ; des isolats à tester. Après incubation des boîtesensemencées pendant un temps suffisant à la croissance des bactéries et leur production et sécrétion de la substance bioactive qui diffusera dans la gélose (12-24h), les isolats sontensemencés par stries parallèles à côté et à distance (témoins) des bactéries tests. Puis, les boîtes sont de nouveau incubées pour permettre la croissance pendant 48h à 28°C. Une bactérie est considérée antagoniste si notre souche cible ne présente aucune croissance à côté d'elle.

Des boîtes sont ensemencées par *D. solani* via stries perpendiculaires à celles des bactéries tests. Ainsi, d'un autre côté et parallèlement le même test est réalisé mais dont *D. solani* ainsi que les isolats tests sont ensemencés en même temps.

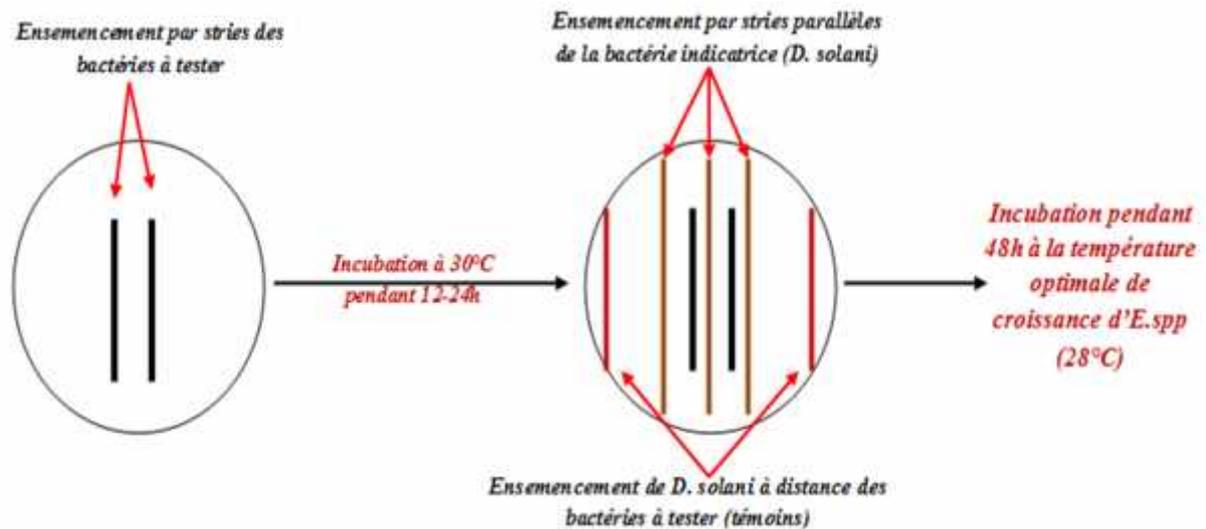


Figure 10: Schémas explicatif du protocole de recherche des bactéries antagonistes contre *D. solani* par la méthode des stries.

Résultats et discussion

I)-Caractérisation biochimique des isolats purifiés:

I)-Révélation de l'activité cellulase:

Le test de révélation de l'activité CMCase permet de sélectionner les isolats « cellulase⁺ » qui sont entourés par un halo de couleur orange claire témoignant de la dégradation du CMC (**figure 1**),

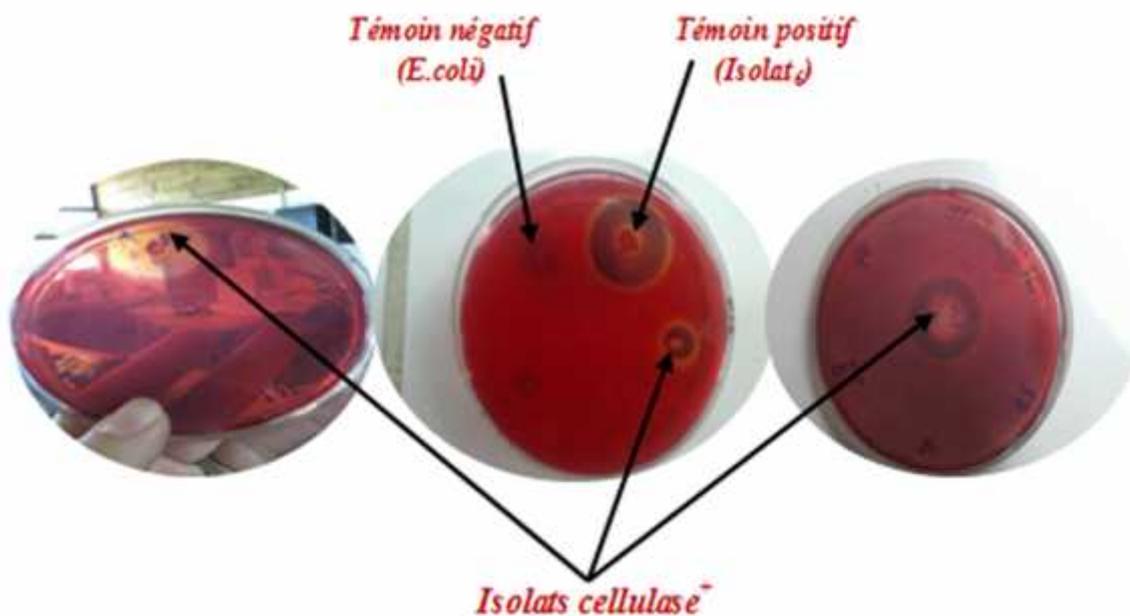


Figure 1: Isolats cellulase⁺ entourés d'halos orange clairs

L'ensemble des résultats obtenus pour ce test est résumé dans les deux tableaux suivants :

Tableau 1: Liste des isolats Cellulase⁺ et Cellulase⁻

Catégorie	Isolats cellulase ⁺	Isolats cellulase ⁻
Cat (1/30)	—	L'ensemble des 29 isolats
Cat(M)	M ₁₇ ; M ₂₄ ; M ₂₇ ; M ₃₀	Tous les 23 autres isolats
Cat (1/97)	9 ; 24 ; 42 ; 45 ; 47	88 isolats
Cat (1/143)	80 ; 85 ; 100 ; 105 ; 108 ; 111 ; 129	122 isolats

Tableau 2: Estimation de l'activité cellulase

Catégorie	Isolat cellulase ⁺	Diamètre de colonie (DC) en mm	Diamètre de l'halo (DH) en mm	Activité cellulase
Cat (M)	M ₁₇	11	25	1,27
	M ₂₄	3	13	3,33
	M ₂₇	4	20	4
	M ₃₀	5	12	1,4
Cat (1/97)	9	4	25	5,25
	24	4	10	1,5
	42	6	32	4,33
	45	3	11	2,66
	47	5	15	2
Cat (1/143)	80	4	10	1,5
	85	5	10	1
	100	5	25	4
	105	4	32	7
	108	5	25	4
	111	3	17	4,66
	129	3	10	2,33
	Témoin positif (Isolat₀)	7	30	3,28

Les résultats montrent que sur un total de 278 isolats testés sur milieu CMC, 16 isolats prélevés de différentes régions marocaines se sont avérés capables de dégrader le CMC via leur enzyme cellulase (ce qui représente un pourcentage de 5,75%). L'activité cellulase estimée de certains isolats est élevée (7 chez l'isolat 105 et 5.25 pour l'isolat 9) et dépassant même celle du témoin positif utilisé (3,28).

2-2)-Révélation de l'activité amylase:

Cette manipulation possède comme but principal d'éliminer les isolats amylase⁺ de l'intervalle de recherche de Dickeya (ancienne appellation *E. chrysanthemi*) puisque cette dernière est amylase⁻.

Après les 72h d'incubation et traitement par le lugol, les isolats amylase⁺ se trouvent entourer d'un halo clair reflétant l'absence de l'amidon et par conséquent la production de l'amylase par les isolats testés (**figure 2**).



Figure 2: principe de révélation de l'activité amylase par le lugol

Le tableau suivant résume les résultats obtenus pour l'ensemble des isolats testés.

Tableau 3 : Estimation de l'activité amylase

Catégorie	Isolat amylase ⁺	Diamètre de colonie (DC) en mm	Diamètre de l'halo (DH) en mm	Activité amylase
Cat (M)	M ₂₇	9	21	1,33
Cat (1/97)	9	9	22	1,44
	42	6	15	1,5
	80	7	25	2,57
Cat (1/143)	80	6	15	1,5
	139	3	11	2,66
	Témoin positif (Isolat₆)	7	20	1,85

Les tests de révélation de l'activité amylase révèlent la présence de six isolats; sur un total de 278; aptes à dégrader l'amidon via l'enzyme "amylase" qu'ils produisent et excrètent. Ce qui équivaut à 2,15% des isolats amylolytiques éliminés de l'intervalle de recherche de notre bactérie cible (*Dickeya*). L'activité amylase de ces isolats atteint des valeurs de 2,57 et 2,66 chez les isolats 80 (cat 1/97) et 139 (cat 1/143) respectivement. Quant au témoin positif, ce dernier est doué d'une activité modérée (1,85) en comparaison avec les autres isolats amylase⁺.

3)-Révélation de l'activité pectinase:

Au cours de cette manipulation, des difficultés ont été rencontrées lors de la révélation de l'activité pectinase via l'ajout de l'acétate du cuivre 7,5%. Ces dernières se manifestent dans le

fait que les halos prouvant la dégradation de la pectine par les pectinases sont à peine visibles sur les trois milieux même si le test est répété plusieurs fois tout en variant le pH dans un intervalle de (pH 7-8). Seul le milieu à base de pectine de pomme nous a permis de conclure les résultats figurant dans le tableau 4.

Tableau 4: Estimation de l'activité pectinase

Catégorie	Isolat pectinase ⁺	Diamètre de colonie (DC) en mm	Diamètre de l'halo (DH) en mm	Activité pectinase
Cat (M)	M ₂₇	9	21	1,33
Cat (1/97)	9	7	23	2,28
	42	9	19	1,11
	Témoin positif (Isolat₆)	6	22	2,66

Le tableau 4 montre que seulement trois isolats ; deux prélevés de Meknès et un de Moulay Bouselhame ; sont doués d'une activité pectinase faible à modérée. Alors, le pourcentage des bactéries pectinolytiques n'est que de 1,07%. Ce qui limite considérablement la possibilité d'identification de notre bactérie cible (*E. chr*). Mais, ce test ne constitue aucun obstacle devant notre étude puisque d'autres tests ultérieurs peuvent être plus significatifs.



Pris ensemble, ces résultats de révélation des activités enzymatiques des isolats testés nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

- Trois isolats M₂₇, 42 et 9 possèdent les trois activités cellulase, pectinase et amylase. Ce qui d'un côté fait d'eux des excellents candidats pour la quantification de ces activités, et d'un autre côté, prouve qu'ils n'appartiennent pas au genre *Erwinia*.
- Toutes les bactéries testées sont soit cellulolytiques-amylolytiques, soit cellulolytiques-amylolytiques et pectinolytiques ou bien cellulolytiques seulement. Ce travail nous a permis de détecter des isolats ayant des activités enzymatiques intéressantes que nous avons jugé important de les étudier quantitativement pour les comparer à celles d'*E. chr*.

II)-Test de pathogénicité des isolats sur les tubercules de pommes

de terre:

Les 278 isolats faisant l'objet de notre étude sont tous testés sur les tranches des tubercules de pommes de terre pour évaluer leur pathogénicité vis-à-vis de cette denrée alimentaire. Après incubation, les boîtes contenant les tranches inoculées par les différents isolats à tester sont examinées et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant:

Tableau 5: Test de pathogénicité sur tubercules de pommes de terre

Catégorie	Nombre des isolats pathogènes (pourriture molle)	Nombre des isolats pathogènes (pourriture sèche)	Nombre des isolats non pathogènes
Cat (1/30)	6	0	23
Cat (M)	2	4	21
Cat (1/97)	5	1	87
Cat (1/143)	37	3	89

D'après ce tableau, on conclue que sur l'ensemble des isolats testés sur les tranches de pommes de terre 58 isolats sont avérés pathogènes c'est-à-dire 20,86%. Parmi eux, 2,87% isolats sont responsables de l'apparition d'une pourriture sèche alors que 17,98% causent une pourriture molle sur les tranches de pommes de terre. Par contre, 220 bactéries représentant un pourcentage élevé de l'ordre de 79,14% sont incapables de causer la pourriture des tubercules et sont donc jugées "non pathogènes".

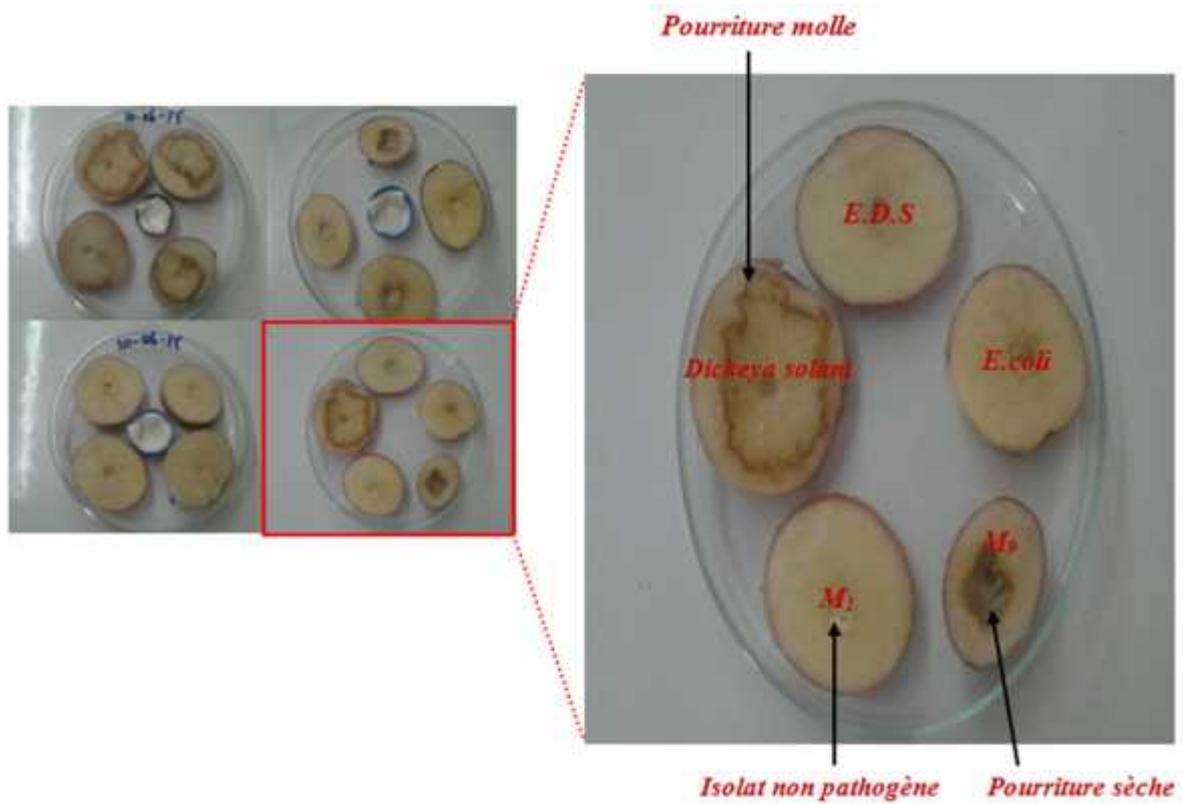


Figure 3: Résultats du test de pathogénicité sur tranches de pommes de terre

Après détermination des pourcentages des isolats pathogènes et non pathogènes, ceux doués d'une pathogénicité (pourriture molle) sont retestés plusieurs fois afin de pouvoir déterminer le poids de la pourriture molle (par différence du poids) causée par ces bactéries. La moyenne des résultats obtenus est donnée dans le tableau 6.

Tableau 6: Poids de la pourriture molle développée par les isolats pathogènes sur les tranches de pommes de terre

Catégorie	Code de l'isolat pathogène	Poids de la pourriture molle (g)
Cat (1/30)	3	0,77
	10	3,97
	12	1,17
	18	1,77
	22	1,01
	23	1,12
Cat (M)	M ₁₉	0,61
	M ₂₅	0,39
Cat (1/97)	9	0,25
	44	2,93
	80	5,03
	85	0,2
	86a	0,72
Cat (1/143)	26	0,12
	28	3,72
	35	1,77
	39	3,3
	41	3,48
	43	1,4
	56	0,56
	58	3,44
	63	3,07
	65	1,56
	67	2,52
	68	1,38
	70	3,56
	71	2,04
	72	1,13
	73	5,77
	74	1,29
	75	9,05
	76	0,71
	77	4,91
	78	3,28
	80	4,68
	81	0,41
	82	3,01
	83	1,85
	84	3,66
	87	2,95
	88	2,4
	89	1,26
	90	2,81
97	2,82	
98	1,85	
100	0,86	
102	2,1	
104	0,18	
106	1,9	
108	0,32	
	Témoin positif (Erwinia spp)	6,26

 Ces résultats nous permettent de conclure que:

- Au sein de notre collection de 278 isolats prélevés de différentes régions du Maroc, le pourcentage des isolats non pathogènes (79,14%) est presque quatre fois celui des bactéries pathogènes (20,86%).
- La pathogénicité causée par ces isolats sur les tranches de pommes de terre est très importante et considérable atteignant un poids de 9,05g pour l'isolat **75** prélevé de la région de Moulay Bousselhame (Larache). Poids même supérieur à celui de la pourriture causée par le témoin positif (*D. solani*) qui est de 6,26g.
- Pour les isolats M₂₇, 9 et 42 (cat (1/97)) doués des trois activités enzymatiques ; cellulase, amylase et pectinase, les isolats M₂₇ et 9 se sont avérés en plus, pathogènes sur les tubercules de pomme de terre. L'isolat 9 est à la base d'une pourriture molle (0,25g) alors que l'isolat M₂₇ est responsable d'une pourriture sèche sur les tranches de pommes de terre.

A ce terme, plusieurs recherches visant l'étude de la pourriture molle causée par *Dickeya* ont été reportées. Parmi lesquelles, une réalisée en Suisse (**David Gerardin et al, 2013**), dont le but est d'étudier la sensibilité des pommes de terre à la pourriture molle causée par *D.spp*. Cette étude a pu dévoiler que l'espèce *D. solani* est plus virulente que *D. dianthicola* sur les tranches de pomme de terre. Ainsi, cette virulence des espèces s'est avérée différente entre les répétitions de l'essai. La même chose est remarquée lors du test de notre témoin positif (*D. solani*) sur les tranches de pommes de terre puisque, le poids de pourriture molle développée sur ces dernières est différent d'une répétition à une autre (5,25g ; 6,26g et 7,27g pour les essais 1, 2 et 3 respectivement). Ce résultat nous laisse penser alors que cette différence pourrait être due à la variation de sensibilité de la pomme de terre vis-à-vis les isolats. Cette hypothèse est bel et bien prouvée dans la même étude réalisée par David et ses collaborateurs, puisqu'ils ont démontré que la variété Agria est la plus sensible avec une perte du poids moyenne de 5,61g suivie de Victoria (4,78g) et puis enfin d'Annabelle avec une perte moyenne de 2,59g.

Ces résultats obtenus doivent être pris en compte pour aboutir à l'optimisation du stockage des pommes de terre, tout en prenant en considération la sensibilité variétale et la virulence des espèces bactériennes présentes, et afin de pouvoir diminuer, voire limiter la propagation et les impacts de cette pathologie au cours du stockage et par conséquent diminuer les énormes pertes économiques résultantes.

III)-Dosage des activités enzymatiques:

Vu que les isolats M₂₇, 9 et 42 possèdent (selon les résultats des tests de révélation des activités enzymatiques) les activités cellulase, amylase et pectinase les plus intéressantes, ces bactéries sont par conséquent sélectionnées pour effectuer l'étude quantitative de ces trois activités. Notons que pour les trois activités, *Erwinia spp* est utilisée comme témoin positif.

1)-Croissance et activité cellulolytique des isolats:

La quantification de la cellulase produite par les isolats dans un milieu minimum contenant le CMC comme seule source de carbone et d'énergie a fait l'objet d'une cinétique de 60h, tout en prenant des échantillons à doser chaque 2h. Les résultats obtenus sont reportés dans les courbes représentées dans la figure suivante:

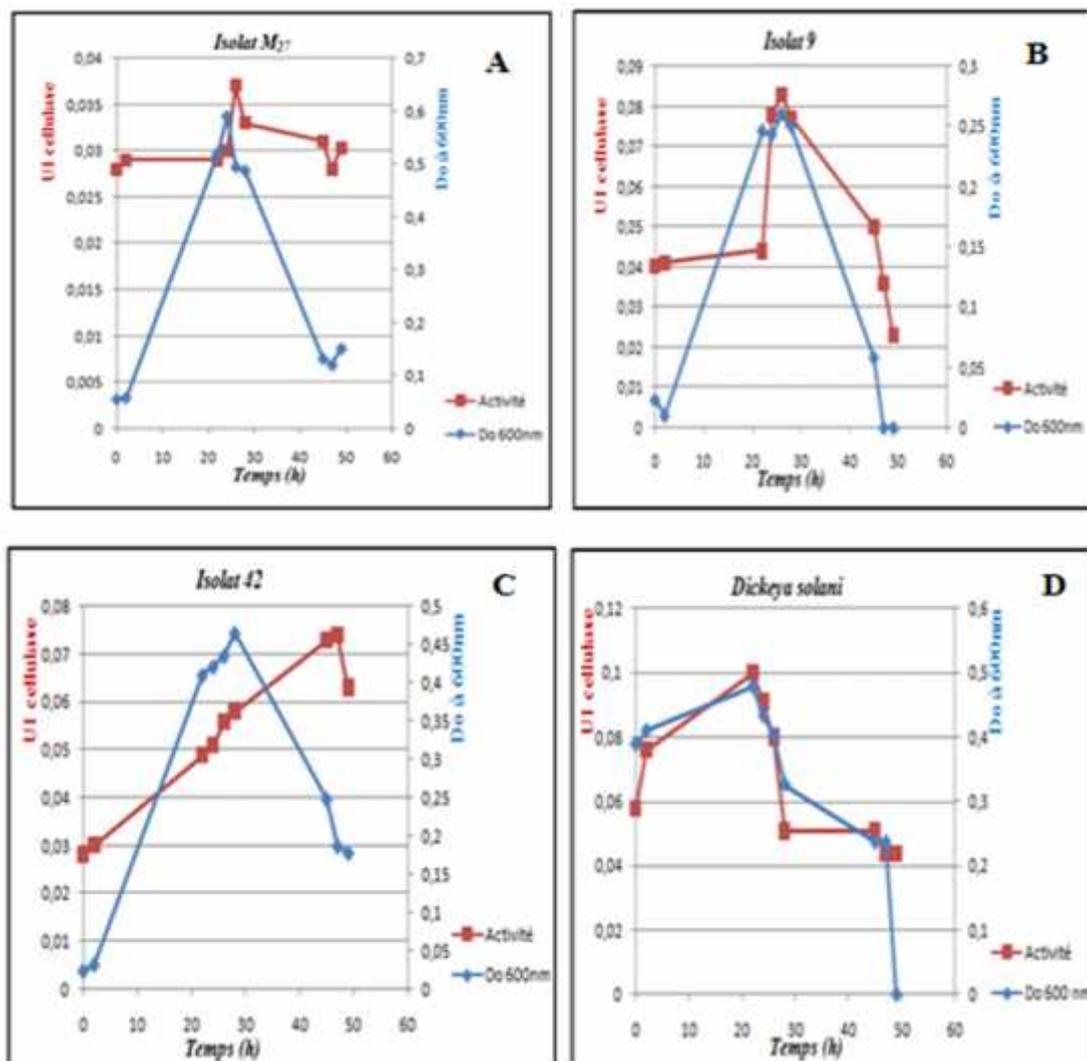


Figure 4: Cinétique de l'activité cellulase des isolats testés sur milieu CMC (0,5%)

D'après la courbe (A) représentant la cinétique de croissance et d'activité cellulase de l'isolat M₂₇, on remarque que ce dernier possède une activité cellulase trop faible voire nulle du fait que son pic maximum d'activité n'est pas assez représentatif ; (0,037UI) au bout de 26h d'incubation. Par

contre, l'isolat pousse bien dans le milieu et sa croissance et en augmentation continue dès le début du dosage et est optimale après 24h d'incubation. Mais, elle commence à diminuer légèrement pour chuter brusquement après 28h. En effet, la croissance bactérienne continue accompagnée de la faible activité cellulolytique peuvent être expliquées par le fait que le glucose libéré est peut être utilisé par la bactérie pour pouvoir croître. Après 28h d'incubation, la chute de croissance pourrait être due à l'épuisement du substrat et l'accumulation des substances toxiques dans le milieu ou bien par le fait que les molécules de glucose sont consommées par les bactéries présentes dans le milieu.

Quant à l'*isolat 9* (courbe B), on note une activité enzymatique vers la fin de la phase exponentielle (22h) qui augmente remarquablement pour atteindre une valeur maximale (0,077UI) coïncidant avec le maximum de croissance vers 26h après incubation. Puis, à la fois la croissance et l'activité commencent à diminuer. Cette constatation est logique puisque, au début d'incubation les bactéries nécessitent un certain temps pour s'adapter au milieu. Ce qui explique la faible production de l'enzyme. Ainsi, la chute de la croissance peut résulter de l'épuisement du substrat ou de l'accumulation des substances toxiques. Alors que la diminution de l'activité cellulase peut s'expliquer par une répression catabolique du CMC suite à l'abondance des molécules de glucose dans le milieu.

Pour l'*isolat 42* (courbe C) qui s'adapte bien au milieu et commence à produire l'enzyme cellulase dès le début de la croissance. Aussi, on remarque que même si la croissance bactérienne commence à diminuer après 28h, l'activité cellulase ne cesse d'augmenter jusqu'à 47h. Ce résultat est tout à fait acceptable et en faveur de fait que l'expression et la production d'enzyme subisse un type de régulation qui diffère d'une bactérie à l'autre.

Concernant le positif (*D. solani*), la production de l'enzyme cellulase est réalisée dès le début de la croissance et a un profil identique à celui de la croissance.

2)-Croissance et activité amylolytique des isolats:

La détermination de l'activité amylase dans un milieu minimum contenant l'amidon comme seule source de carbone et d'énergie, était réalisée en suivant la production de cette enzyme par les isolats testés pendant un intervalle du temps de 47h avec prise des échantillons à doser chaque 2h. La figure (5) représente l'ensemble des résultats obtenus pour ce dosage.

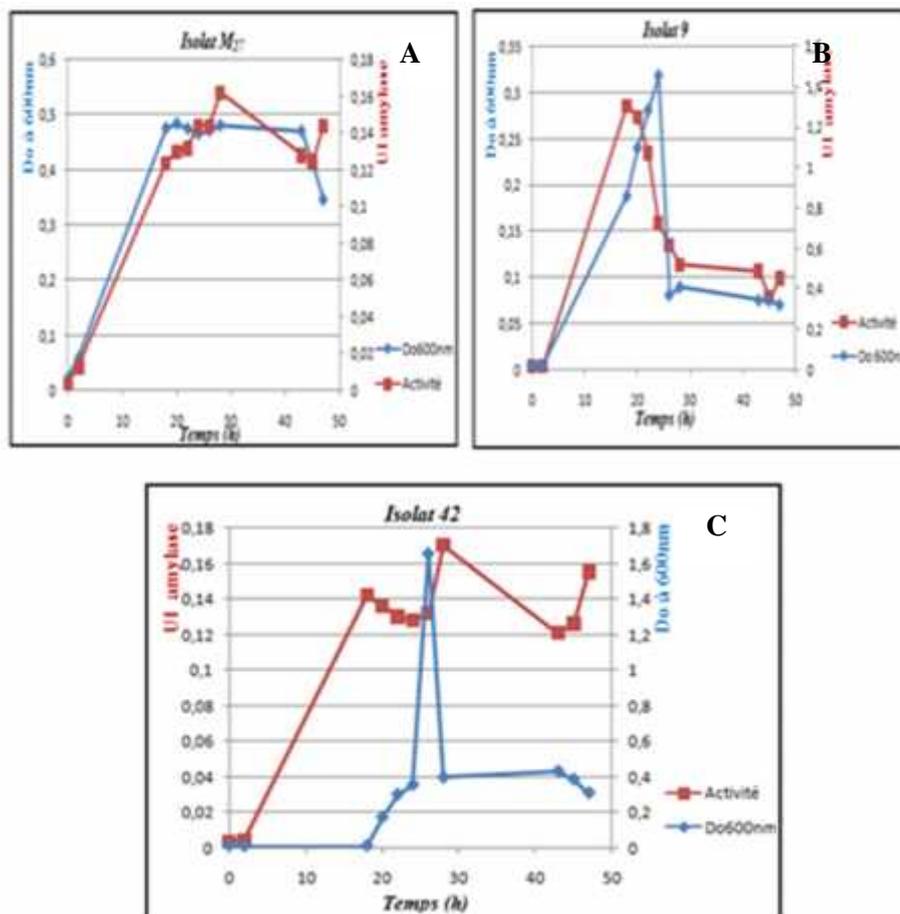


Figure 5: Cinétique de l'activité amylase des isolats testés sur milieu à base d'amidon (0,5%)

Les résultats montrent que l'adaptation des deux isolats (M_{27} et 9) au milieu de culture est rapide puisque leur croissance ne cesse pas d'augmenter dès le début de l'incubation. C'est pourquoi la production de l'enzyme s'est rapidement remarquée. D'après la courbe (A), on constate que l'isolat M_{27} est en croissance continue jusqu'à 20h de croissance. Dès lors, elle reste presque stable (phase stationnaire de croissance) pour diminuer vers la 45^{ème} heure d'incubation (phase de déclin). Toutefois, sa production de l'amylase continue toujours à augmenter jusqu'à la 28^{ème} h du dosage ; c'est-à-dire ; 8h après l'arrêt d'augmentation de la croissance ; puisque l'amylase déjà excrétée dans le milieu continue à dégrader l'amidon en maltose. Puis, cette activité amylolytique diminue légèrement à partir de la phase stationnaire du fait que le maltose libéré est consommé par la biomasse.

Quant à l'isolat 9, on remarque que sa croissance ainsi que son activité sont presque nulles durant les deux premières heures d'incubation au cours desquelles, cette bactérie s'adapte au milieu (phase de latence) ce qui explique la très faible activité enzymatique remarquée. Après ces 2h, on note une hausse remarquable de l'activité qui atteint son pic maximum (0,286 UI) après 18h d'incubation correspondant ainsi à la phase exponentielle de la croissance bactérienne qui continue à augmenter jusqu'à la 24^{ème} h (μ_{max}).

Arrivant à l'*isolat 42* (courbe C), ce dernier possède une phase de latence très lente (18h) durant laquelle l'activité amylase est nulle pendant les premières heures d'incubation. Puis, cette activité augmente remarquablement pour atteindre une valeur de 0,142 UI vers 18h de croissance qui correspond au début de la phase exponentielle. L'activité enzymatique est maximale (0,17 UI), après 26h d'incubation puis, elle chute brusquement pour rester presque stable jusqu'à la fin du dosage.

Après 18h, la biomasse bactérienne commence à augmenter légèrement jusqu'à la 24^{ème} heure d'incubation. Il faut noter que la dégradation de l'amidon génère d'autres substrats notamment le maltose qui est utilisé également pour la croissance. Du fait que *D. solani* est privée d'activité amylase, elle était alors exclue de ce test.

3)-Croissance et activité pectinolytique des isolats:

Pour chacun des isolats testés, le nombre d'activité internationale de pectinase est déterminé en inoculant un milieu minimum à base de pectine de pomme comme seule source de carbone et d'énergie. La quantification de la production de pectinase est suivie pendant une durée de 43h tout en prélevant des échantillons à doser toutes les 4h. La mesure de la croissance bactérienne à 600nm et celle de la production d'enzyme à 540nm a permis de tracer les quatre courbes représentées dans la figure 6.

En observant l'allure des quatre courbes obtenues, on remarque que les trois isolats testés tel le témoin positif sont tous bien adaptés au milieu de culture. Puisque, après une phase de latence de 4h pendant laquelle les trois bactéries (M₂₇, 9 et 42) s'adaptent au milieu, la biomasse bactérienne augmente fortement pour atteindre un taux maximum de croissance (μ_{max}) vers la 39^{ème} heure pour l'isolat M₂₇ et la 20^{ème} heure pour les isolats 9 et 42. Cette croissance rapide des isolats explique leur forte activité enzymatique qui demeure en croissance continue depuis le début d'incubation et atteint son pic maximum : (0,291 UI) pour M₂₇, (0,236 UI) et (0,134 UI) pour les bactéries 9 et 42 respectivement, après 24h d'incubation. Puis, cette activité enzymatique diminue légèrement chez les trois espèces et reste ainsi jusqu'à la fin du dosage.

En ce qui concerne notre bactérie témoin "*Dickeya solani*", son profil est semblable à ceux des autres isolats tests. Toutefois, sa production maximale d'enzyme se détecte plus rapidement ; après 16h d'incubation seulement ; témoignant ainsi de ses fortes adaptation au MC et production de pectinases.

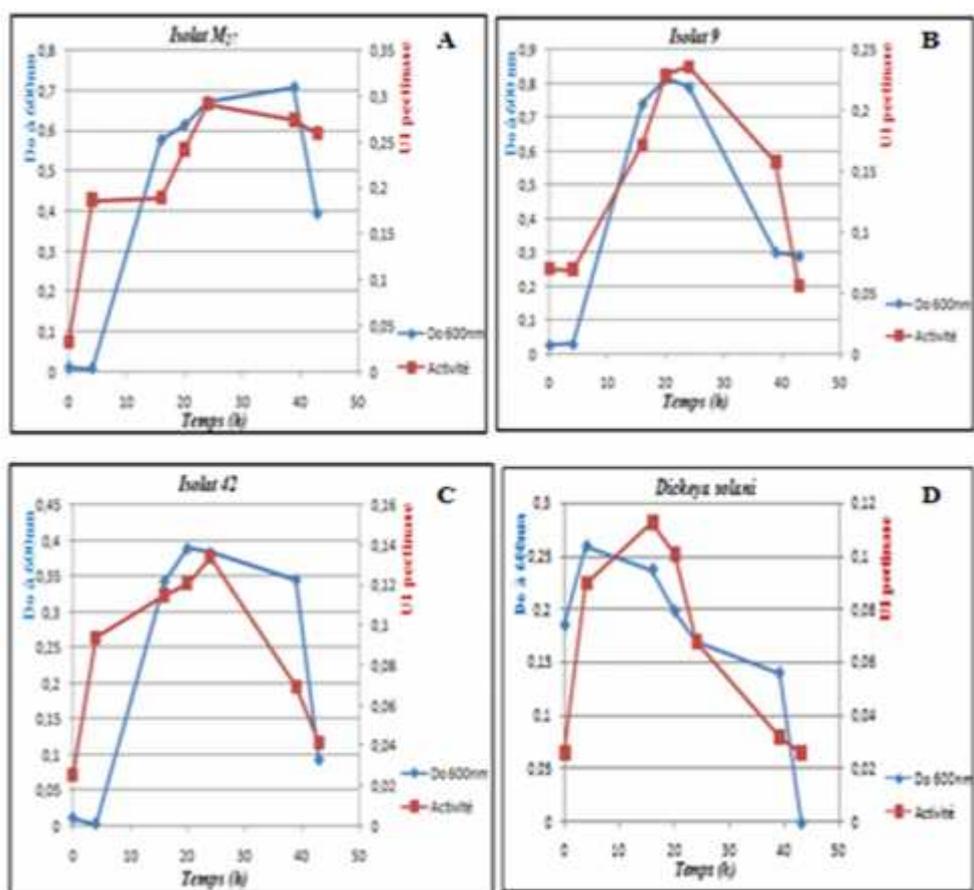


Figure 6: Cinétique de l'activité pectinase des isolats testés sur milieu à base de pectine (0,5%)

La quantification de production de l'enzyme pectinase par ces isolats était évaluée sur deux milieux de cultures minimums. Le premier contenant le PGA (0,5%) comme seule source de carbone et d'énergie à pH 7,4 et le deuxième contenant la pectine de pomme (0,5%) comme seule source de carbone et d'énergie à pH 7,2. Les bactéries testées se sont avérées capables de pousser sur les deux milieux de culture mais, des meilleurs résultats (représentés dans la figure 6) sont obtenus dans le milieu à base de pectine de pomme.



L'ensemble des résultats de cette partie concernant la quantification des trois activités enzymatiques étudiées nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

- Le dosage de l'activité cellulase montre que l'isolat 9 possède l'activité la plus intéressante (0,077 UI) suivi de l'isolat 42 (0,074 UI) puis enfin de l'isolat M₂₇ (0,037UI). Ces résultats sont en forte concordance avec ceux de révélation

qualitative des activités où l'estimation de l'activité cellulolytiques des isolats, permet de tirer la même conclusion. Quant à *Dickeya solani*, son activité cellulase est faible en comparaison avec celles des isolats tests.

- La quantification de l'activité amylase nous permet de conclure que de nouveau l'*isolat 9* possède l'activité la plus élevée (0,286 UI) suivi de l'*isolat 42* (0,17 UI) puis de celui *M₂₇* (0,162 UI). Pourtant, l'étude qualitative a montré que les trois bactéries possèdent presque la même activité. Ainsi, comme attendu, *E.spp* ne possède pas d'activité amylase.
- Durant le dosage de l'activité pectinase, on remarque que c'est l'*isolat M₂₇* cette fois qui possède l'activité la plus importante (0,291 UI) suivi de l'*isolat 9* (0,236 UI) puis dernièrement de la bactérie *42* (0,134 UI). En outre, en comparant l'activité de notre bactérie témoin avec celle des bactéries tests, on remarque que ces dernières sont douées d'une activité pectinase supérieure à celle d'*Erwinia spp.*
- L'*isolat 9* prélevé de Meknès est très intéressant, puisqu'il possède les activités enzymatiques les plus intéressantes. Ainsi, son activité amylase est plus forte que celle pectinase qui à son tour plus importante que celle cellulase.
- Aussi, l'*isolat 42* appartenant à la même catégorie que celui *9* possède des activités amylase et pectinase plus intéressantes que celle cellulase.
- En ce qui concerne l'*isolat M₂₇* prélevé de Guigo, il possède l'activité pectinase la plus importante mais son activité cellulolytique est très faible.

En fait, l'étude qualitative et quantitative des activités enzymatiques a fait l'objet de plusieurs recherches chez plusieurs microorganismes. Les plus étudiées sont l'activité amylase (**Osfar.S et Tri.A, 2011**), l'activité pectinase et l'activité cellulase (**Bashir.A et al., 2013**). A titre d'exemple, **Bashir.A** et ses collaborateurs ont pu en **2013** identifier 15 bactéries représentant une activité cellulase (estimée) significative entre 2,5-5,5. Ce qui est bien le cas dans notre travail puisque, l'activité cellulase de notre trois bactéries qualifiées comme étant les plus performantes se situe entre 4 et 5,25. Ainsi, les résultats de l'étude quantitative de ces 15 bactéries montrent que la valeur minimale d'activité est de 0,0038UI et celle maximale est de 0,251. Intervalle dans lequel se situent les valeurs obtenues lors de la quantification de la production de cette enzyme par nos isolats. Ce qui prouve que les résultats de notre travail sont en forte concordance avec ceux eus par cette étude. Ainsi, Une autre étude reportée par **Krootdilganandh** en **2000** montre que parmi 77 bactéries thermotolérantes poussant sur milieu CMC solide, un isolat donnant la plus grande activité enzymatique lors du dosage, représente la plus faible auréole claire lors de l'analyse qualitative. Ce qui est bien le cas de nos isolats lors de l'évaluation de leurs activités amylase et pectinase. Toutefois, Ce résultat peut être dû selon **Lynd** et son équipe (**2002**) aux fluctuations des paramètres expérimentaux notamment le pH et la température qui varient au cours de

l'incubation et par conséquent la bactérie se trouve incapable de sécréter l'enzyme convenablement.

IV)-Identification moléculaire des isolats: Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La migration des produits de l'amplification du fragment de l'ADN_r16S des cinq isolats choisis via les deux amorces universelles Fd1 et Rs16 a donné le profil électrophorétique suivant:



Figure 7: Profil électrophorétique des produits d'amplification par PCR sur gel d'agarose 1%.

1' : marqueur de taille, 2' : témoin négatif (EDS) et 3' : témoin positif (chromosome 14 de la souche *E.chrysanthemi pin14*).

D'après le profil électrophorétique on remarque que parmi les cinq isolats choisis, seulement l'ADN de l'isolat 9 (Cat 1/97) a pu être amplifié. Ce résultat prouve que la PCR a bien marché puisque, le fragment 1500pb de l'isolat 9 est obtenu. Ainsi, concernant le chromosome pin 14 (témoin positif) une faible bande de même taille (1500pb) est à peine remarquée ce qui peut être dû à la faible concentration de l'ADN prise pour réaliser la PCR. Toutefois, l'absence des bandes des autres isolats peut être expliquée par l'absence de leur ADN correspondant qui à son tour peut être due à la non efficacité du choc thermique pour ces bactéries. Puisque, ce dernier dépend étroitement des souches bactériennes et de la nature de leur paroi bactérienne.

L'ADN de l'isolat 9 est envoyé au centre d'innovation (CI) pour que sa séquence amplifiée soit séquencée.

V)-Recherche des bactéries antagonistes des *Erwinia chrysanthemi*:

1)-Méthode de surcouche:

La recherche des bactéries antagonistes d'*E. chr* est réalisée tout en testant l'ensemble des isolats non pathogènes via deux méthodes différentes. La méthode de surcouche a permis de détecter quatre isolats appartenant à la catégorie (1/30) doués d'une activité antimicrobienne contre notre bactérie test (*D. solani*), puisqu'ils sont entourés de petites auréoles d'inhibition de croissance de cette dernière. Les diamètres des auréoles obtenues étaient de l'ordre de 15 mm, 8 mm, 9 mm et 10 mm pour les isolats 7, 9, 11 et 13 respectivement.

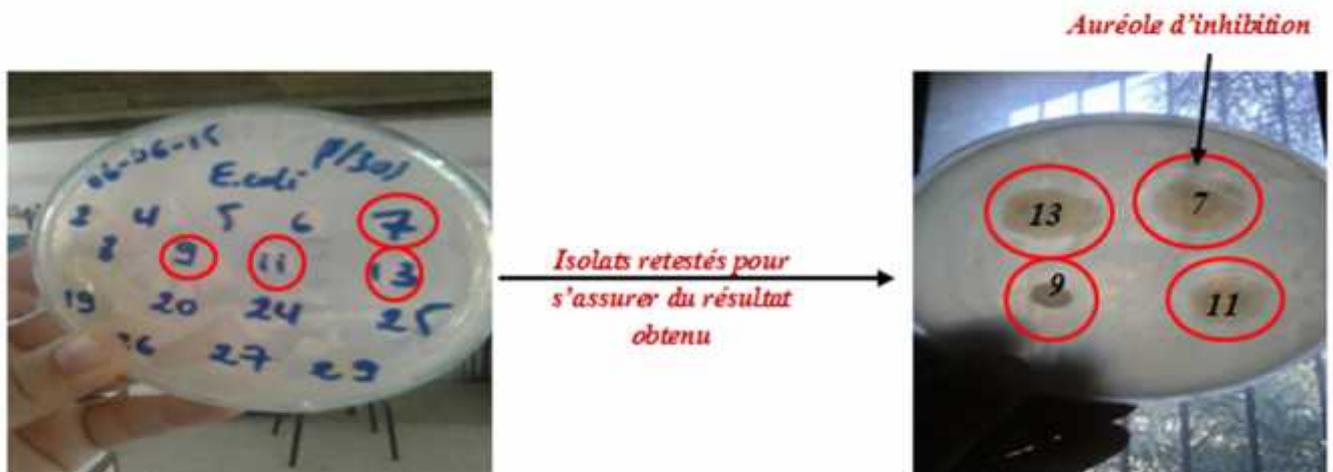


Figure 8: Image montrant l'action antagoniste des quatre bactéries contre *E.spp.*

Il est à noter que notre souche indicatrice va coloniser tout le milieu alors que la molécule antimicrobienne produite par les quatre isolats tests va diffuser dans la surcouche afin d'inhiber la croissance de la bactérie indicatrice.

2)-Méthode de stries:

Pour s'assurer des résultats obtenus, les quatre isolats entourés des halos d'inhibition sont retestés via la méthode de stries (parallèles et perpendiculaires). D'un autre côté, les quatre isolats sontensemencés en même temps que la bactérie cible et incubés pendant 24-48h à 28°C. Les résultats obtenus (**figure 10**) montrent que :

→ Pour les boîtes où les isolats tests sontensemencés en même temps que *D. solani*, on remarque que la croissance de cette dernière n'est pas inhibée et que la bactérie pousse normalement sur le milieu. Alors, ces isolats tests n'ont pas pu empêcher sa croissance.

→ Pour le cas où les isolats tests sontensemencés et incubés pendant 12-24h avant l'ensemencement de *D. solani*, on révèle clairement l'inhibition de croissance de notre bactérie

par les isolats tests. Puisque les stries distantes de ces derniers ont montré une croissance normale alors que, celles adjacentes aux isolats n'ont pas pu croître. Ce qui met au clair l'action antagoniste de ces quatre bactéries prélevées de Guigo sur notre bactérie indicatrice.

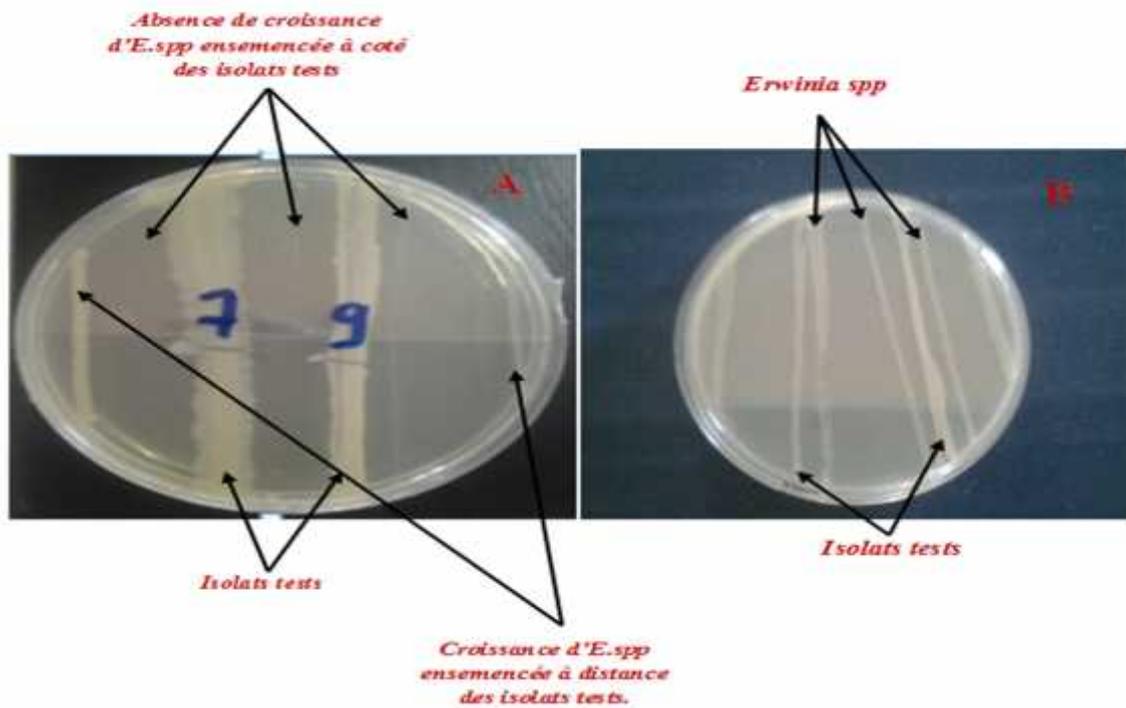


Figure 9 : Résultats du test d'antagonisme contre E.spp. (A) : isolats tests incubés avant ensemencement de la bactérie indicatrice. (B) : isolats ensemencés en même temps que la bactérie indicatrice.

En fait, la différence du pouvoir de croissance de notre bactérie (*D. solani*) entre le premier cas et le deuxième test peut être expliquée par le fait que dans le premier cas (ensemencement instantané des isolats tests et la bactérie indicatrice), les bactéries antagonistes n'ont pas eu assez de temps pour pouvoir sécréter la substance antimicrobienne qui sera par la suite diffusée dans la surcouche afin d'inhiber la croissance de *D. solani*. Par conséquent, cette dernière a pu croître normalement sur le milieu de culture. Pourtant, dans le deuxième cas, les isolats sont incubés pendant un temps largement suffisant pour la production et la sécrétion de la substance bioactive qui, diffusée dans la surcouche inhibe la croissance de *D. solani*. Donc, on conclue que les quatre isolats ; 7, 9, 11 et 13 ; sont bien des antagonistes d'*Erwinia chrysanthemi* produisant une ou des substance(s) antimicrobiennes pouvant être d'une extrême importance et remplaçant les produits chimiques néfastes pour l'environnement et la santé humaine.

Dans ce sens, multiples études sont réalisées afin de mettre en œuvre l'action antagoniste des bactéries envers *E. chr* donc remédier aux énormes pertes résultantes de sa pathogénicité et pouvoir offrir aux agriculteurs une alternative des produits chimiques à la fois efficace et bénéfique. Parmi ces études, on tient à citer une réalisée en 2002 en Turquie (Yesim Aysan et al, 2002) qui avait pour but le contrôle biologique des *E. chr* à l'origine de pourriture molle des

tomates en Turquie. Parmi 78 candidats antagonistes d'*E. chr*, 14 bactéries sont avérées douées d'une activité antagoniste de cette bactérie phytopathogène avec des auréoles d'inhibition comprises entre 6 et 50 mm. Plus, ces chercheurs ont testé l'action de ces bactéries antagonistes sur les tranches de pommes de terre infectées par *E. chr* et ils ont remarqué une réduction de la maladie jusqu'à 89%. Ce résultat encourageant leur a poussé à tester ces bactéries sur les plantes des tomates dans des chambres où les conditions sont similaires à celles des champs. De même, une réduction du symptôme jusqu'à 67% était révélée. Pourtant, une corrélation négative s'est avérée entre les résultats des expériences *in vitro* et *in vivo* pour certaines bactéries. Ce qui peut être dû aux conditions environnementales (Température ; pH, nature et texture du sol...) ainsi qu'à l'existence dans le biotope d'autres bactéries pouvant réduire l'action de ces espèces antagonistes. En effet, il est clair et net que le test *in vivo* est plus significatif et plus fiable que celui *in vitro*, et peut mettre au point des substances bioactives très importantes pouvant être offerte comme alternative aux agriculteurs dans le futur après validation par des tests dans le champ.

Conclusion et perspectives

La culture des pommes de terre "*Solanum tuberosum*" comme la plupart des autres cultures est soumise à plusieurs attaques par différentes bactéries pathogènes ; que cela soit au niveau des champs ou au sein du stockage ; aboutissant ainsi à des pertes énormes se reflétant négativement sur l'état économique mondial. Parmi ces phytopathologies, la "pourriture molle" causée par *E. chr* ; une entérobactérie phytopathogène par excellence mobile, à gram⁻, qui dans certaines conditions (climat tropical, température entre 10-25°C et humidité) s'avère capable d'induire la maladie sur les tubercules de pommes de terre. Elle est la plus redoutable à laquelle un contrôle biologique étroit remplaçant celui clinique néfaste pour l'environnement et la santé humaine, doit être mis au point. Au terme de ce travail dont le but est d'abord d'isoler et identifier cette espèce pathogène puis, de trouver des bactéries antagonistes pouvant limiter sa propagation a montré l'absence remarquable de cette bactérie dans la collection bactérienne étudiée, ce qui pourrait être un signe de la rareté de cette maladie dans les champs faisant l'objet de cette étude. Cette rareté peut être due entre autre à l'application des produits phytosanitaires chimiques inhibant la croissance des bactéries pathogènes dans ces régions de culture. Certes, ces produits limitent clairement la propagation et même le développement de ces phytopathologies mais, ils ont plusieurs effets environnementaux et sanitaires néfastes. Ce qui nous pousse tous à trouver des alternatives moins chères, plus efficaces et sans aucun impact négatif. Dans ce sens, on s'est intéressé à la recherche des bactéries antagonistes envers *D. solani* via deux méthodes (de surcouche et de stries). Comme résultat, on a pu isoler quatre bactéries antagonistes qui après identification, leur substance antimicrobienne pourrait être extraite, purifiée, produite et étudiée pour sa potentialité d'être efficace à l'échelle du champ et par la suite proposée comme alternative aux antibactériens chimiques et offerte aux agriculteurs dans le futur en cas de résultats efficaces et efficaces.

Au cours de ce travail, on s'est aussi intéressé à l'étude qualitative et quantitative des activités enzymatiques des bactéries isolées, et on est arrivé à caractériser trois isolats producteurs de trois enzymes principales (cellulase, amylase et pectinase). Les isolats ayant montré une activité enzymatique importante seront étudiés ultérieurement pour la recherche des bactéries performantes en production de ces enzymes qui sont demandées de plus en plus en industrie.

Références bibliographiques

- **Achbani.E**, M. terta, A. El karkouri, R. Ait m'hand, M. Barakate, M. Amdan, B. Annajar, M. El hassouni, F. Val, F. Bouteau and M. M. Ennaji., **2010**. Occurrence of *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in Morocco. *Cellular and Molecular Biology* TM 56, OL1324-OL1333. DOI 10.1170/151.
- **Adams, MJ**, et **G.A. Hide.**, **1981**. Effects of common scab (*Streptomyces scabies*) on potatoes. *Ann. Appl. Biol.* 98:211-216.
- **Aguillar, G.** & Huitron, C., **1990**. Constitutive exopectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnology Letters* 12, 655±660.
- **Alivizatos, A.S.**, Pantazis, S., **1992**. Preliminary studies on biological control of potato common scab caused by streptomyces sp. In: Tjamos, E.C., Papavizas, G.C., Cook, R.J. (Eds.), *Biological Control of Plant Diseases Progress and Challenges for the Future*, NATO ASI Series, Vol. 230. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 85–93.
- **Alkorta, I.**, Garbisu, C., Llama, M.J., Serra, J.L., **1998**. Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Proc. Biochem.* 33 (1), 21-28.
- **Antunez-Lamas. M**, Cabrera-Ordonez. E, Lopez-Solanilla. E, Raposo. R, Trelles-Salazar. O, Rodriguez-Moreno. A, and Rodriguez-Palenzuela. P., **2009**. Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology* (2009), 155, 434–442.
- **Barras, F.**, Dahler.G S, and Keen.N T, **1990**. Cloning of genes encoding extracellular metalloproteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J Bacteriol.* 1990 Oct; 172(10): 5803–5815.
- **Barras, F.**, Van Gijsegem, F., Chatterjee, A., **1994**. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft rot *Erwinia*. *Phytopathology* 32:201-234.
- **Bashir.A**, Sahar Nigar, S. Sadaf Ali Shah, Shumaila Bashir, Javid Ali, Saeeda Yousaf and Javid Abbas Bangash., **2013**. Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Municipal Waste and Their Screening for Potential Antimicrobial Activity. *World Applied Sciences Journal* 27 (11): 1420-1426.
- **Bateman, D.F.**, and **Basham, H.G.**, **1976**. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. In *Encyclopedia of plant physiology*, Vol. 4. *Edited by* R. Heitefuss and P.H. Williams. Springer Verlag, Berlin.

- **Bayer. E.A.**, Morag. F, and Lamed. R., **1994**.The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology, Trends in Biotechnology,vol. 12, no. 9, pp. 379–386.
- **Beaulieu, C.**, M. Boccara, and F. Van Gijsegem., **1993**. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:197–202.
- **Bettina Stäubli**, R.W., Susanne Wymann von Dach., **2008**. Pommes de terre et changement climatique, Info resources. Focus 1:08.
- **Bhat. K. A**, Bhat. N. A, Mohiddin. F. A, Sheikh. P. A and Wani. A. H, **2012**. Studies on pectinase activities of isolates of *Erwinia carotovora* and *Rhizopus sp.* causing soft rot in cabbage (*Brassica oleracea var capitata* L.). African Journal of Agricultural Research Vol. 7(45), pp. 6062-6067, 27 November, 2012.
- **Boughammoura.A**, Matzanke BF, Böttger L, Reverchon S, Lesuisse E, Expert D, Franza T., **2007**.Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. J Bacteriol. 2008 Mar; 190(5):1518-30. doi: 10.1128/JB.01640-07. Epub 2007 Dec 28.
- **Bourson, C**, Favey, S., Reverchon, S., and Robert-Baudouy, J., **1993**. Regulation of the expression of a pelAv.uidA fusion in *Erwinia chrysanthemi* and demonstration of synergistic action of plant extract with polygalacturonate on pectate lyase synthesis. J Gen Microbiol 139: 1-9.
- **Bradbury JF.**, **1986**. Guide to plant pathogenic bacteria. Wallingford, UK: CAB International.
- **Bradbury, J.F.**, **1977**. *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonw. Mycol. Inst., Kew. Surrey, Angleterre. 2 pp.
- **Cao, J.**, Zheng, L., Chen, S., **1992**. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of rammie. Enz. Microbiol. Technol. 14, 1013-1016.
- **Chatterjee, A.**, Cui, Y., and Chatterjee, A.K., **2002**. Regulation of *Erwinia carotovora* hrpL_{Ecc} (sigma-L_{Ecc}), which encodes an extracytoplasmic function subfamily of sigma factor required for expression of the HRP regulon. Mol. Plant-Microbe Interact. 15:971-80.
- **Collmer (A.)**, **Keen (N.T.)**, **1986**. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol., 24, 383-409.
- **Compant Stéphane**, Brion Duffy, Jerzy Nowak, Christophe Clément, and Essaïd Ait Barka., **2005**. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Appl Environ Microbiol. 2005 Sep; 71(9): 4951–4959.

- **Condemine, G.,** A. Castillo, Passeri F., and C. Enard., **1999.** The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:45–52.
- **Czajkowski, R.,** Perombelon, M.C.M., van Veen, J.A., and van der Wolf, J.M., **2011.** Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* 60:999-1013.
- **De Boel S.H., et M. McCann., 1989.** Determination of population densities of *Corynebacterium sepe-donicum* in potato stems during the growing season. *Phytopathology* 79:946-951.
- **Delangle, A.,** A.-F. Prouvost, V. Coge-z, J.-P. Bohin, J.-M. Lacroix, and N. Hugouvieux Cotte-Pattat. **2007.** Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* gan locus involved in galactan catabolism. *J. Bacteriol.* 189:7053–7061.
- **Dellagi, A.,** Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J.F., Gaymard, F. and Expert, D.**2005.**Siderophore-mediated upregulation of *A. thaliana* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J.*43, 262–272.
- **Dickey, R.S.,** H.Z., C., and K.U., J.**1984.** *Erwinia chrysanthemi*: Serological relationships among strain from several hosts. *Phytopathology*, 11-1388-1394.
- **Duffy, B.,** Schouten, A., and Raaijmakers, J.M.**2003.** Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41:501-538.
- **El Hassouni, M.,** Chambost, J. P., Expert, D., Van Gijsegem, F. and Barras, F.**1999.** The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:887-892.
- **Elphinstone. J.G., et M.C.M. Perombelon., 1986.** Contamination of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading. *Plant Pathol.* 35:25-33.
- **FAO.2008.** New light on a hidden treasure, pp 144 Gnanamanickam S, Charkowski A (2006) The soft rot *Erwinia*. *Plant-associated bacteria*. Springer, The Netherlands, pp 423–505.
- **FAOSTAT.2012.** Food And Agriculture Organization Of The United Nations, <http://faostat.fao.org>.
- **Faucher. E.,** Otrysko. B., Paradis. E., Hodge. N.C., Stail. R.E, et Beaulieu. C., **1993.** Characterization of streptomycetes causing russet scab in Québec. *Plant Dis.* 77:1217-1220.
- **Favela-Torres E.,** Volke-Sepúlveda T. & Vniegra-Gonzalez G.**2006.** Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 221-227.

- **Fogarty, M.V. & Kelly, C.T.1983.** In *Microbial Enzymes and Biotechnology*. ed. Fogarty, M.W. pp. 131-182. London & New-York: Elsevier Applied Science Publishers. ISBN 1-85166486-6.
- **Franza, T.,** Michaud-Soret, I., Piquerel, P., and Expert, D.**2002.** Coupling of iron assimilation and pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:1181-1191.
- **Franza, T.,** Mahé, B., and Expert, D. **2005.** *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology* 55:261-275.
- **Fridovich I.1995.**Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* vol.64, p.97-112.
- **Gainvors, A. & Belarbi, A.,1995.** Detection methods for polygalacturonase producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1311-1319.
- **Gerardin. D,** Rouffiange. J, Kellenberger. I, Schaerer. S, et Dupuis. B., **2013.** Sensibilité de la pomme de terre à la pourriture molle provoquée par *Dickeya* spp. *Recherche Agronomique Suisse* 4 (6): 288–295.
- **Gracia-Garza. J.A,** Blom. T.J, Brown. W., Allen.W., **2002.** Pre- and post plant applications of copper-based compounds to control *Erwinia* soft rot of calla lilies, *Can. J. Plant Pathol.* 24 274-280.
- **Ghose, T.K., 1987.** Measurement of cellulases activities. *International union of pure and applied Chemistry*, 59(2): 257-268.
- **Gulzar M,** Croguennec T, Julien J, Michel P, Saïd B.,**2009.** Copper modulates the heat-induced sulfhydryl/disulfide interchange reactions of b-Lactoglobulin. *Food Chem* 116:884–891.
- **Hanafi, A.,** Radcliffe, E.B. and Ragsdale, D.W., **1995.** Spread and control of potato leafroll virus in the souss valley of Morocco. *Crop. Prot.*14: 145-153.
- **Hayward, A.C., et J.M. Waterston., 1964.***Corynebacterium sepedonicum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 14. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, Angleterre. 2 pp.
- **Helias, V.,** Le Roux, A.C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J.P., and Jouan, B., **1998.** Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European journal of plant pathology / European Foundation for Plant Pathology* 104:685-699.

- **Hélia, V., 2008.** Pectobacterium spp. et Dickeya spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour Erwinia spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie, C.Agricultures, 4:349-354.
- **Horikoshi, K., 1972.** Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms Part III. Alkaline pectinase of Bacillus No P-4-N. Agricultural and Biological Chemistry 36, 285-293.
- **Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W. et Reverchon S., 1996.** Regulation of pectinolysis in Erwinia chrysanthemi. Annu. Rev. Microbiol., vol. 50, p. 213-257.
- **Imlay J.A., 2003.** Pathways of oxidative damage. Annu. Rev. Microbiol., vol. 57, p. 395-418.
- **Jayani R.S., Saxena S. & Gupta R., 2005.** Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochem., 40, 2931-2944.
- **John Elphinstone, et Ian Toth., 2007.** Erwinia chrysanthemi (Dickeya spp.) – The Facts. British potato council.
- **Karbassi, A. & Vaughn, R.H., 1980.** Purification and properties of polygalacturonic acid trans-eliminase from Bacillus stearothermo-philus. Canadian Journal of Microbiology 26, 377-384.
- **Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S. & Tewari R., 2001.** Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresour. Technol., 77, 215-227.
- **Kazemi-Pour, N.; Condemine, G. & Cotte-Pattat, N. H., 2004.** The secretome of the plant pathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi. Proteomics 4(10), 3177--3186.
- **Klaus, H., 2001.** Iron and metal regulation in bacteria. Current Opinion in Microbiology 4:172-177.
- **Kotoujansky. A., 1987.** Molecular pathogenesis by soft-rot Erwinias. Annu Rev Phytopathot 2S: 405-430.
- **Krootdilaganandh, J., 2000.** Isolation and selection of thermo tolerant bacteria capable of producing cellulase. Chiang Mai University Press, Chiang Mai, pp: 20-21.
- **Kuhad. R. C, Singh. A, and Eriksson. K. E., 1997.** Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls, Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, vol. 57, pp. 45–125.
- **Lapwood, D.H, et M.J. Adams., 1975.** Mechanisms of control of common scab by irrigation. Pages 123-129 dans G.W. Bruehl, ed, Biology and control of Soil-borne Plant Pathogens. APS Press St. Paul, Minnesota. 216pp.

- **Latour, X.**, Faure D, Diallo S, Cirou A, Smadjia B, Dessaux Y, Orange N., **2008**. Control of bacterial diseases of potato caused by *Pectobacterium* spp. (*E. carotovora*). *Cahiers Agric* 17:355–360.
- **Lojkowska, E.**, Masclaux, C., Boccara, M., Robertbaudouy, J., and Hugouvieuxcottepattat, N., **1995**. Characterization of the *pelL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* 16:1183-1195.
- **Lux, R. & Shi, W.**, **2004**. Chemotaxis-guided movements in bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 207–220.
- **Lynd, L.R.**, P.J. Weimer, W.H. Van Zyl and I.S. Pretorius., **2002**. *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology*. American Society for Microbiology, 66(3): 506-577.
- **McMillan G. P.**, Hedley D., Fyffe L. & Perombelon M. C. M., **1993**. Potato resistance to soft rot *Erwinias* is related to cell-wall pectin esterification. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42 (4), 279–289.
- **Mila I.**, SCALBERT A., and EXPERT D., **1996**. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*, vol. 42, n°6, p. 1551-1556.
- **Miller, L.G.**, **1959**. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31,426-428.
- **Molina, J.J.**, et **M.D. Harrison.**, **1980**. The role of *Erwinia carotovora* in the epidemiology of potato blackleg. II. The effect of soil temperature on disease severity. *Am. Potato* 1. 57:351-363.
- **Nadif A.**, Lakbidi C., Boulif M., Ouhssine M., **2001**. Détection d'une bactérie responsable de la pourriture molle sur la betterave à sucre dans la plaine du Gharb. - Proc. 65e Congr. IIRB, Marrakech, 21-23 Mai 2001, 2002.
- **Neema, C.**, Laulhère, J.-P., and Expert, D., **1993**. Iron deficiency induced by chrysobactin in *Saintpaulia ionantha* leaves inoculated with *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiol.* 102:967-973.
- **Nomura, K.**, W. Nasser, H. Kawagishi, and S. Tsuyumu., **1998**. The *pir* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 regulates hyperinduction of pectate lyase virulence genes in response to plant signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:14034–14039.
- **Osfar Sjöfjan**, and **Tri Ardyati.**, **2011**. Extracellular Amylase Activity of Amyolytic Bacteria Isolated from Quail's (*Coturnix japonica*) Intestinal Tract in Corn Flour Medium. *International Journal of Poultry Science* 10 (5): 411-415.
- **Ozaktan, H.**, Bora, T., Vardar-Sukan, F., Sukan, S., Sargin, S., **1999**. Studies on determination on antagonistic potential and biopreparation of some bacteria against the

- fire blight pathogen. Proceedings of the International Workshop on Fire Blight. Acta Hort. 489, 663–668.
- **Percival Zhang. Y. H**, Himmel. M. E, and Mielenz. J. R., **2006**. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, vol. 24, no. 5, pp. 452–481.
 - **Perombelon, M.C.M.**, and **Kelman, A.**, **1980**. Ecology of the Soft Rot Erwinias. *Annual Review of Phytopathology* 18:361-387.
 - **Perombelon, M.C.M.**, **2002**. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12.
 - **Persmark M.**, et **Neilands J.B.**, **1992**. Iron (III) complexes of chrysobactin, the siderophore of *Erwinia chrysanthemi*. *Biometals*, , Spring, vol. 5, n°1, p. 29-36.
 - **Pissavin C.**, Robert-Baudouy J., et Hugouvieux-Cotte-Pattat N., **1996**. Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bact.*, vol. 178, n°24, p. 7187-7196.
 - **Rensink, W.**, Hart, A., Liu, J., Ouyang, S., Zismann, V., and Buell, C.R., **2005**. Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. *Genome* 48:598-605.
 - **Rojas C.M.**, Hyun Ham J., Deng W.L., Doyle J.J. et CollmerA., **2002**. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *PNAS*, vol. 99, n° 20, p. 13142-13147.
 - **Rombouts, F.M. & Pilnik, W.**, **1986**. Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. *Symbiosis* 2, 79-89.
 - **Rousselle, P.**, Robert, Y., and Crosnier, J.-C., **1996**. La pomme de terre. coll. « Mieux comprendre » Paris, ebook, INRA, ISBN 2-7380-0676-0.
 - **Sakai T**, Sakamoto T, Hallaert E, Vandamme EJ., **1993**. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39:213–294.
 - **Samson, R.**; Legendre, J. B.; Christen, R.; Saux, M. F.-L.; Achouak, W. & Gardan, L., **2005**. 'Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov.', *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 4), 1415--1427.

- **Schoone Jans E.**, Expert D. et Toussaint A., **1987**. Characterization and Virulence Properties of *Erwinia chrysanthemi* Lipopolysaccharide-Defective, pEC2-Resistant Mutants. *J. Bact.*p.4011-4017.
- **Sedegui, M.**, Carroll, R.B., Morehart, A.L., Evans, T.A., Kim, S.H., Lakhdar, R., and Arifi, A., **2000**. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. *Plant Disease* 84:173-176.
- **Sharga BM, Lyon GD., 1998**. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Can J Microbiol* 44:777–783.
- **Singh.A., 1999**. Engineering enzyme properties, *Indian Journal of Microbiology*, vol. 39, no. 2, pp. 65–77.
- **Singh.A,** R. C. Kuhad, and O. P. Ward., **2007**. Industrial application of microbial cellulases, in *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, R. C. Kuhad and A. Singh, Eds., pp. 345–358, I.K.International Publishing House, New Delhi, India.
- **Snaiki, J.**, Nadif, A., and Ouhssine, M., **2005**. Détection de deux pathotypes d'*Erwinia* causant la maladie de la pourriture molle sur la betterave à sucre dans la plaine du Gharb au Maroc. *EPPO Bulletin* 35:537-540.
- **Tagg JR, Bannister LV., 1979**. Fingerprinting beta-haemolytic streptococci by their production of and sensitivity to bacteriocine-like inhibitors. *J Med Microbiol.* Nov;12(4):397–411.
- **Tatiana da Costa RP, and Flevo F., 2005**. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorriza* Bancroft). *Food Chem.* 89:85-92.
- **Terta. M,** EL Karkouri. A, Ait M'hand. R, Achbani. E, Barakate. M, Amda. M, Annajar. B, El Hassouni. M, Val. F, Bouteau. F, and Ennaji. M. M., **2010**. Occurrence of *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in Morocco. *Cell. Mol. BiolTM* 56, OL1324-OL1333. DOI 10.1170/151.
- **Toth, I.K.,** Kenneth S. Bell, Maria C. Holeva and Paul R. J. Birch., **2003**. Soft rot *erwiniae*: from genes to genomes. *Mol. Plant. Pathol*, 4 (1): 17-30.
- **Torimiro N. and Okonji, R. E., 2013**. Comparative study of pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology.* 12(46), pp.6498-6503.
- **Vidaver A.K., 2002**. Uses of Antimicrobials in Plant Agriculture. *Clinical Infectious Diseases*.3: 107-110.
- **Wandersman.C,** Thierry Andro, and Yves Bertheau., **1985**. Extracellular Proteases in *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of General Microbiology* (1986), 132, 899-906.
- **Weber J.,** Olsen O., Wegener C., Von Wettstein D., **1996**. Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48, 389–401.

- **Wyatt G.M., Lund B.M., 1981.** The effect of antibacterial products on bacterial soft rot of potatoes. *Potato Res.* 24:315-329.
- **Yaganza, E.S., Rioux, D., Simard, M., Arul, J., and Tweddell, R.J., 2004.** Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6800-6808.
- **Yang Z., Cramer C. L., Lacy G. H., 1992.** *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* pectic enzymes-inplanta gene activation and roles in soft-rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5, 104–12.
- **Yesim Aysan, Ali Karatas, Ozden Cinar., 2003.** Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Protection* 22 (2003) 807–811.

Documents électroniques (sites web):

- Base de données du département de l'agriculture des Etats Unis sur les nutriments (<http://www.ibm.com>).
- www.romain.ferry.pagesperso-orange.fr.
- <http://www.takween.com/techniques/glucides-sucres-dosage.html>.
- www.Fidafrique.net.
- <http://web2.mendelu.cz>.
- <http://www.futura-sciences.com>

Annexe I: Milieux de culture

Milieu LB (Luria-Bertani)

Extrait de levure	5g
Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	10g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH 7.0	

Milieu CMCCase

CMC.....	5g
NaNO ₃	1g
K ₂ HPO ₄	2g
Kcl.....	1g
MgSO ₄	0,5g
Extrait de levure.....	0,5g
Glucose.....	1g
Nacl.....	10g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Milieu amylase

Amidon.....	5g
NaNO ₃	1g
K ₂ HPO ₄	2g
Kcl.....	1g
MgSO ₄	0,5g
Extrait de levure.....	0,5g

Glucose..... 1g
Nacl......10g
Agar.....20g
Eau distillée.....1000ml

Milieu pectinase

PGA.....5g
NaNO₃.....1g
K₂HPO₄.....2g
Kcl......1g
MgSO₄..... 0,5g
Extrait de levure..... 0,5g
Glucose..... 1g
Nacl......10g
Agar.....20g
Eau distillée.....1000ml

Annexe II: Caractérisation Biochimique

Activité CMCase

Tableau (1) : Mesures de la densité optique des précultures utilisées pour la quantification de la CMCase

Isolats	Blanc	M ₂₇	9	42	D. solani
Do _{600nm}	0	0,693	1,046	0,511	0,4

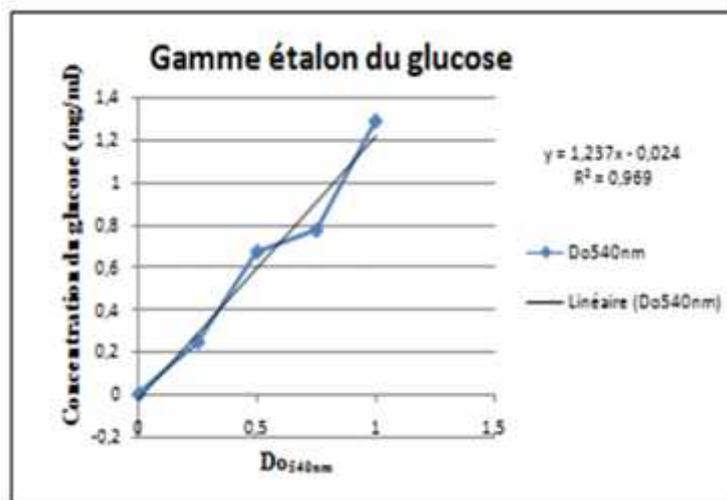


Figure (1): Gamme étalon du glucose.

Tableau (2): Cinétique de production du glucose via CMCase pour D. solani

Temps (h)	0	2	22	24	26	28	45	47	49
Do 600 nm	0,389	0,41	0,479	0,434	0,403	0,327	0,237	0,237	0
Do540nm	0,134	0,213	0,32	0,281	0,231	0,104	0,103	0,074	0,072
Glibéré (mg/ml)	0,158	0,206	0,272	0,248	0,217	0,139	0,139	0,121	0,12
Activité (UI)	0,058	0,076	0,1	0,091	0,08	0,051	0,051	0,044	0,044

Tableau (3): Cinétique de production du glucose via CMCase pour l'isolat 42

Temps (h)	0	2	22	24	26	28	45	47	49
Do 600nm	0,024	0,032	0,41	0,421	0,435	0,465	0,248	0,187	0,178
Do 540nm	0	0,01	0,075	0,101	0,124	0,132	0,201	0,202	0,157
Glc libéré (mg/ml)	0,076	0,082	0,122	0,138	0,152	0,157	0,199	0,2	0,172
Activité	0,028	0,03	0,049	0,051	0,056	0,058	0,073	0,074	0,063

Tableau (4): Cinétique de production du glucose via CMCase pour l'isolat 9

Temps (h)	0	2	22	24	26	28	45	47	49
Do 600nm	0,023	0,01	0,246	0,243	0,26	0,25	0,058	0	0
Do 540 nm	0,105	0,107	0,12	0,231	0,25	0,228	0,137	0,093	0,048
Glc libéré (mg/ml)	0,1088	0,1104	0,1210	0,2107	0,2261	0,2083	0,1347	0,0991	0,0628
	8278	996	0889	4212	0186	169	5182	8189	0356
Activité (UI)	0,0403	0,0409	0,0448	0,0780	0,0837	0,0771	0,0499	0,0367	0,0232
	2696	2578	1811	5264	4143	5441	0808	3403	6058

Tableau (5): Cinétique de production du glucose via CMCase pour l'isolat M₂₇

Temps (h)	0	2	22	24	26	28	45	47	49
Do 600nm	0,056	0,059	0,521	0,591	0,495	0,488	0,133	0,121	0,152
Do 540nm	0	0,007	0,007	0,009	0,043	0,025	0,017	0,003	0,011
Glc libéré (mg/ml)	0,076	0,08	0,08	0,081	0,102	0,091	0,086	0,077	0,082
Activité (UI)	0,028	0,029	0,029	0,03	0,037	0,033	0,031	0,028	0,0303

Activité amylase

Tableau (6) : Mesures de la densité optique des précultures utilisées pour la quantification de l'amylase

Isolats	Blanc	M ₂₇	9	42
Do _{600nm}	0	0,724	1,319	0,523

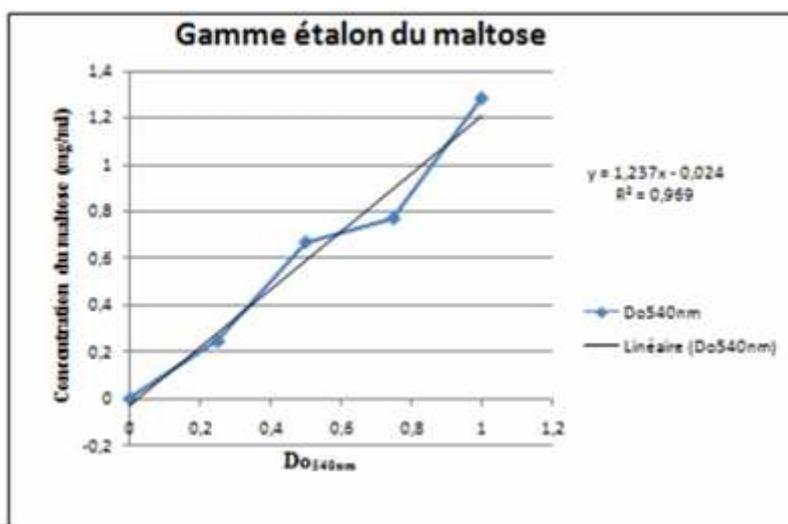


Figure (2) : Gamme étalon du maltose

Tableau (7): Cinétique de production du maltose via l'amylase pour l'isolat M₂₇

Temps (h)	0	2	18	20	22	24	26	28	43	45	47
Do600nm	0,024	0,061	0,475	0,483	0,474	0,465	0,471	0,48	0,47	0,409	0,346
Do540nm	0	0,054	0,762	0,796	0,81	0,886	0,889	1	0,788	0,767	0,886
maltose libéré (mg/ml)	0,024	0,067	0,64	0,667	0,678	0,74	0,742	0,832	0,661	0,644	0,74
Activité (UI)	0,004	0,013	0,124	0,13	0,132	0,144	0,144	0,162	0,128	0,125	0,144

Tableau (8): Cinétique de production du maltose via l'amylase pour l'isolat 9

Temps (h)	0	2	18	20	22	24	26	28	43	45	47
Do 600nm	0,019	0,02	0,86	1,097	1,284	1,456	0,37	0,409	0,344	0,342	0,321
Do540	0	0	1,796	1,721	1,469	0,983	0,833	0,697	0,652	0,652	0,6
Maltose libéré (mg/ml)	0,024	0,024	1,47	1,41	1,21	0,818	0,697	0,587	0,551	0,408	0,509
Activité (UI)	0,004	0,004	0,286	0,274	0,235	0,159	0,135	0,114	0,107	0,079	0,099

Tableau (9): Cinétique de production du maltose via l'amylase pour l'isolat 42.

Temps (h)	0	2	18	20	22	24	26	28	43	45	47
Do600nm	0,016	0,012	0,014	0,174	0,302	0,358	1,658	0,399	0,433	0,388	0,312
Do540nm	0	0,001	0,873	0,839	0,796	0,785	0,81	1,051	0,742	0,775	0,955
Maltose libéré (mg/ml)	0,024	0,0248	0,729	0,702	0,667	0,658	0,678	0,873	0,623	0,65	0,796
Activité (UI)	0,004	0,0048	0,142	0,136	0,13	0,128	0,132	0,17	0,121	0,126	0,155

Activité pectinase

Tableau (10) : Mesures de la densité optique des précultures utilisées pour la quantification de la pectinase

Isolats	Blanc	M ₂₇	9	42	D. solani
Do _{600nm}	0	0,74	0,8	0,213	0,5

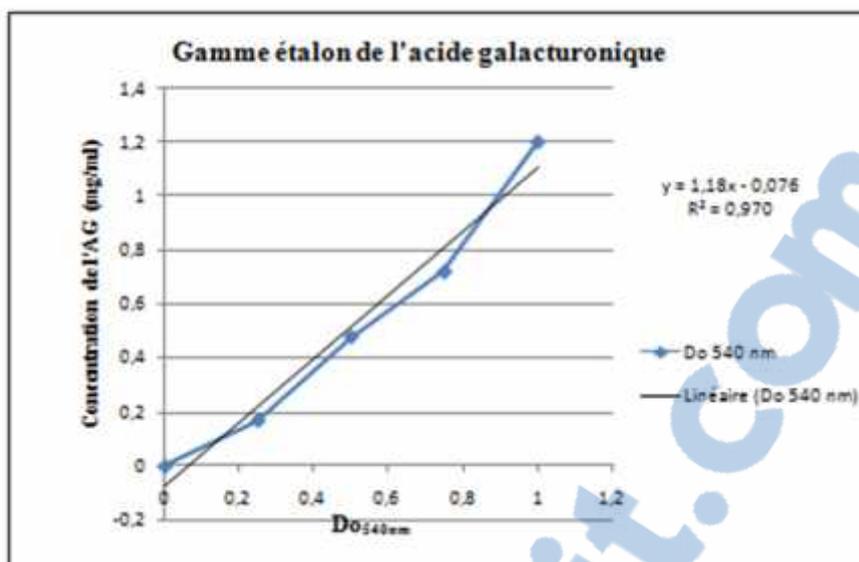


Figure (3) : Gamme étalon de l'acide galacturonique

Tableau (11): Cinétique de production de l'acide galacturonique via la pectinase pour l'isolat M₂₇.

Temps (h)	0	4	16	20	24	39	43
Do 600nm	0,011	0,009	0,578	0,614	0,672	0,708	0,394
Do 540nm	0,023	0,554	0,559	0,74	0,91	0,85	0,8
Ac galac libéré (mg/ml)	0,095	0,545	0,55	0,703	0,8472	0,796	0,754
Activité (UI)	0,033	0,187	0,189	0,242	0,2911	0,274	0,259

Tableau (12): Cinétique de production de l'acide galacturonique via la pectinase pour l'isolat 42

Temps (h)	0	4	16	20	24	39	43
Do 600nm	0,011	0,003	0,343	0,389	0,383	0,345	0,093
Do 540nm	0	0,36	0,47	0,501	0,57	0,23	0,087
Ac.galac libéré (mg/ml)	0,076	0,27489503	0,33566851	0,35279558	0,39091713	0,20307182	0,1240663
Activité (UI)	0,02611684	0,09446565	0,11535	0,12123559	0,13433578	0,06978413	0,04263447

Tableau (13): Cinétique de production de l'acide galacturonique via la pectinase pour l'isolat 9

Temps (h)	0	4	16	20	24	39	43
Do 600nm	0,027	0,03	0,74	0,814	0,79	0,301	0,29
Do 540nm	0,15	0,149	0,501	0,698	0,721	0,453	0,105
Ac.galac libéré (mg/ml)	0,20311864	0,20227119	0,50057627	0,66752542	0,68701695	0,45989831	0,16498305
Activité (UI)	0,06980022	0,069509	0,17201934	0,22939018	0,2360883	0,15804065	0,05669521

Tableau (14): Cinétique de production de l'acide galacturonique via la pectinase pour D. solani

Temps (h)	0	4	16	20	24	39	43
Do 600nm	0,186	0,26	0,238	0,199	0,171	0,141	0
Do 540nm	0	0,22	0,301	0,26	0,145	0,023	0
Ac.galac libéré (mg/ml)	0,076	0,262440 68	0,331084 75	0,296338 98	0,198881 36	0,095491 53	0,076
Activité (UI)	0,026116 84	0,090185 8	0,113774 83	0,101834 7	0,068344 11	0,032814 96	0,026116 84

Tampon acetate

Acétate de sodium à 0,1M.....1,6g

Eau distillée 100ml

pH 4,8 (ajusté avec l'acide acétique)

Solution DNS

Tartrate sodium potassium..... 75g

Hydroxyde de sodium.....4g

Acide 3,5-dinitrosalicylique.....2,5g

Eau distillée.....250ml

Annexe III: Identification moléculaire

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) pour un volume final de 1 litre :

Tris à 400mM.....48,46g/l

Acide acétique.....12,01g/l

EDTA à 10mM.....3,72g/l

Dissoudre les différents composés chimiques dans 1 litre d'eau distillée. La solution est 10 fois concentrée (10X).

Solution de charge des produits PCR pour électrophorèse:

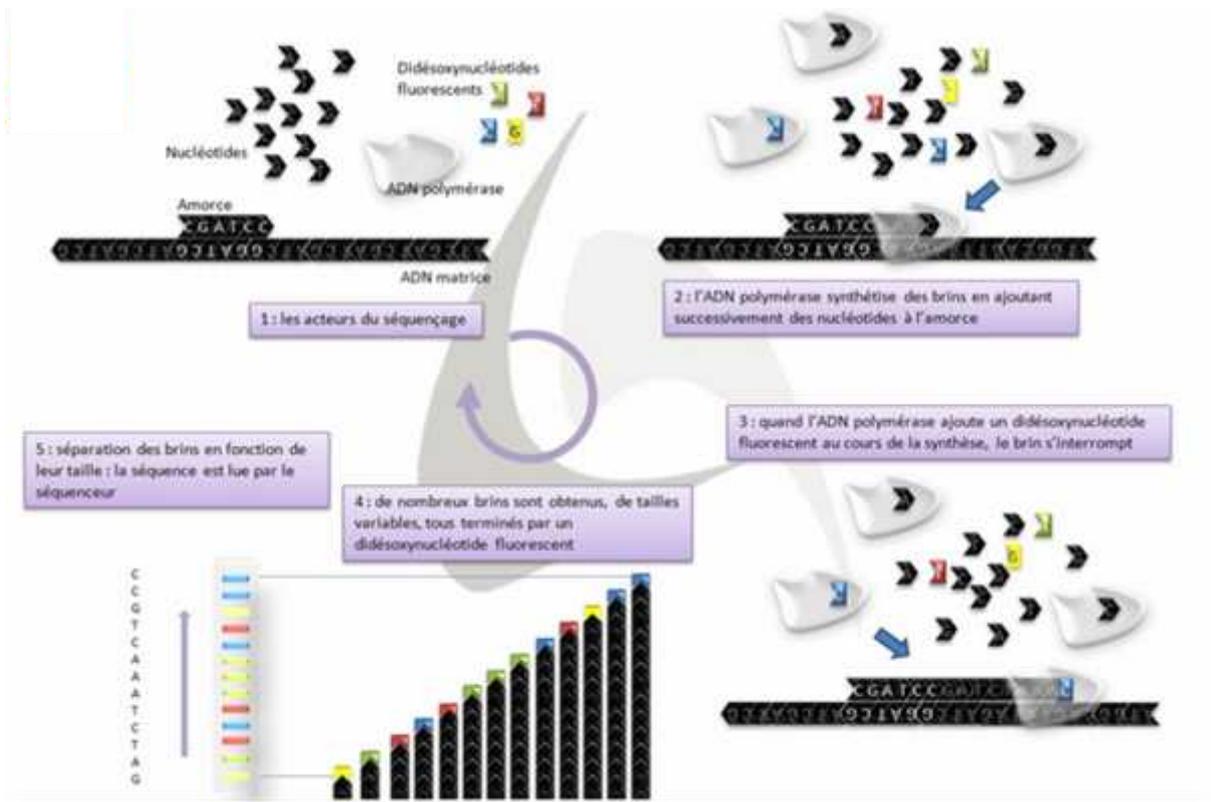
Bleu de bromophénol.....0,25%

Saccharose dans l'eau.....40%

Séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste en la détermination de la succession des nucléotides le composant. C'est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie grâce à sa rapidité et son prix moins cher. En fait, cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

Pour le séquençage des nucléotides légèrement différents sont utilisés: les didésoxyribonucléotides (**ddNTP**) en plus des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP). Ces derniers diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite (du fait de l'impossibilité d'établir une liaison phosphodiester entre le ddNTP et le nucléotide qui le suit) : la synthèse du brin d'ADN s'arrête ce qui permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné. Notons que pour le séquençage et à la différence de la PCR on n'utilise qu'une seule amorce qui va synthétiser un seul brin, à partir duquel on déduit le second brin.



Principe du séquençage de l'ADN (<http://www.futura-sciences.com>)



Résumé

Erwinia chrysanthemi (*E.chr*) et *Erwinia carotovora* (*E.cc*) sont classées parmi les entérobactéries phytopathogènes les plus importantes, suite à leur sécrétion d'une large gamme d'enzymes dégradatives de la paroi cellulaire notamment, la cellulase et la pectinase qui sont à la base du développement de la pourriture molle et la jambe noire par *E.chr* et *E.cc*, respectivement. En effet, les biotopes marocains sont caractérisés par une biodiversité et par conséquent constituent un réservoir de bactéries à exploiter pour rechercher des bactéries performantes en terme de production de molécules à activité biologique (cellulase, pectinase, amylase, molécules à effet antibactérien).

Au cours de ce travail, et en se basant sur une collection bactérienne obtenue à partir de trois régions marocaines (Guigo, Meknès et Moulay Bousselhame) notre intérêt a porté d'une part sur la recherche et sur l'identification microbiologique et moléculaire de la bactérie phytopathogène (*E.chr*) et d'autre part sur la recherche des bactéries productrices d'enzymes hydrolytiques cités ci-dessus et/ou présentant un effet antagoniste contre *Erwinia* permettant de contrôler biologiquement la croissance et la propagation de cette bactérie. Les résultats obtenus ont mis au clair la rareté de cette bactérie phytopathogène dans les champs de pommes de terre prospectés puisque, sur un ensemble de 278 bactéries testées, aucune n'est identifiée comme étant une espèce appartenant au genre *Erwinia*. Alors, ces deux maladies ne sont jamais pour l'instant alarmantes au Maroc. L'étude enzymatique a permis de révéler trois isolats originaires de Meknès et Moulay Bousselhame capables de produire significativement trois enzymes à savoir: la cellulase, la pectinase et l'amylase. Concernant le test d'antagonisme, les résultats ont mis en œuvre quatre isolats doués d'activité antimicrobienne envers *E. spp*, dont la molécule bioactive pourrait être offerte aux agriculteurs, après des études supplémentaires et poussées, comme alternative des produits chimiques néfastes utilisés actuellement.

Mots clés: *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora*, bactéries pectinolytiques, pourriture molle, jambe noire, activité enzymatique, antagonisme.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

☒ B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

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