
LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **ACB** : Agents De Contrôle Biologique
- **ADN** : Acide Désoxyrybonucléique
- **API** : Appareillage et Procédé d'Identification
- **BET** : Bromure d'Ethidium
- **LB** : Lauria Broth
- **ml** : millilitre
- **mM** : milimole
- **OEPP** : Organisation Européenne De La Protection Des Plantes
- **pb** : paire de bases
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **TBE** : Tris Borate EDTA
- **UV** : Ultra Violet
- **µm** : micromètre
- **µl** : microlitre
- **PDA** : Potato Dextrose Agar

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Partie 1 : Revue bibliographique.....	2
Chapitre 1 : Généralités sur le feu bactérien	
1. Agent pathogène	3
2. Répartition géographique.....	3
3. Importance économique.....	5
4. Symptômes de la maladie.....	5
5. Cycle de la maladie.....	7
6. Facteurs favorables au développement de la maladie.....	9
7. Détection de la maladie.....	9
8. Plantes hôtes.....	10
9. Gestion de la maladie.....	10
Chapitre 2 : Lutte biologique contre <i>Erwinia amylovora</i>	
1. Principe de la lutte biologique.....	13
2. Agents de contrôle biologique.....	13
2.1. <i>Pantoea agglomerans</i>	13
2.2. <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.3. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	14
3. Autres agents de contrôle biologique.....	15
Partie 2 : Matériel et méthodes	
1. Matériel biologique.....	17
2. Méthodes.....	17
2.1. Confirmation de l'identité d' <i>E. amylovora</i> par PCR conventionnelle.....	17
2.2 Isolement des bactéries à partir du sol.....	20
2.2 .1 Prélèvement des échantillons.....	20
2.2 .2 Mise en suspension du sol.....	21
2.3 Mise en évidence des bactéries antagonistes par la méthode des cylindres d'agar.....	22
2.3.1 Repiquage des isolats.....	22
2.3.2 Détection de l'activité antimicrobienne.....	22

2.4. Conservation des isolats antagonistes.....	23
2.5. Caractéristiques et pré identification des isolats antagonistes.....	23
2.5.1. Etude morphologique.....	23
2.5.2. Etude microscopique.....	23
2.5.3. Identification biochimique des bactéries antagonistes par le système API 20 E.....	24
2.6. Test de pouvoir pathogène des bactéries antagonistes.....	26
Partie 3 : Résultats et discussions	
1. Confirmation de l'identité d' <i>E. amylovora</i> par PCR conventionnelle.....	29
2. Résultats d'isolement des bactéries à partir du sol.....	29
3. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	31
4. Caractéristiques et pré identification des isolats antagonistes	37
5 .Identification biochimique des bactéries antagonistes par le système API 20 E.....	42
6. Résultats du test de pouvoir pathogène.....	44
Conclusions et recommandations.....	46
Références bibliographiques.....	49
Annexes.....	55

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les rosacées à pépins occupent une place importante dans l'agriculture marocaine grâce d'une part à leur production et d'autre part en termes de création d'emploi. Le pommier, le cognassier et le poirier constituent actuellement les principales spéculations des rosacées à pépins au Maroc.

Comme toutes les cultures, les rosacées à pépins sont confrontées à plusieurs problèmes d'ordre entomologique, viral, cryptogamique et bactérien. Parmi les maladies bactériennes, c'est le feu bactérien des rosacées qui constitue un sérieux problème phytosanitaire.

Erwinia amylovora (agent causal du feu bactérien) est l'une des bactéries phytopathogènes les plus destructives causant d'importantes pertes économiques pour la production de poires, de cognasse et de pommes au niveau mondial (Vanneste et Eden-Green, 2000). Cette maladie a été signalée dans plus de 46 pays à travers le monde (Van der Zwet, 2002). Par conséquent, des mesures d'éradication et de techniques de détection ont été entamées pour réduire la diffusion de l'agent pathogène (Llop et al., 2000).

Le Feu Bactérien a été observé pour la première fois, en 1780 en Amérique du Nord au niveau de la vallée de l'Hudson, puis elle s'est propagée rapidement dans les régions les plus productrices de fruits à pépins. Au Maroc, des symptômes semblables à ceux du feu bactérien ont été observés pour la première fois en 2006 dans un verger de poirier situé dans la commune rurale d'Ain Orma à Meknès (Saoud et Mnai, 2010).

La gestion de cette maladie est difficile puisqu'elle n'est pas toujours contrôlée chimiquement et la plupart des variétés commerciales des rosacées à pépins sont sensibles à la maladie. Cette situation conduit à l'enregistrement des pertes économiques d'une saison à autre.

Nous avons effectué cette étude afin de contribuer à la recherche des méthodes alternatives pour la lutte contre cette maladie. Ainsi l'objectif de ce travail consiste à étudier l'effet antimicrobien de la microflore bactérienne isolée à partir du sol et les fleurs de poirier, de pommier et de cognassier sur la bactérie *E. amylovora*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS SUR LE FEU BACTÉRIEN

1. Agent pathogène

Le feu bactérien causé par la bactérie *E.amylovora*, est une maladie systémique qui affecte plusieurs espèces appartenant principalement à la sous-famille des *Maloideae*, famille des *Rosaceae*. Elle est sans doute la maladie la plus grave affectant le poirier, pommier, cognassier et d'autres arbres ornementaux dans de nombreux pays (Thomson, 2000).

C'est une maladie sporadique qui peut provoquer des dommages considérables, car elle est nécrogène et évolue très rapidement. L'impact économique est difficile à chiffrer parce qu'il dépend de l'intensité de l'épidémie et de ce que l'attaque de feu bactérien puisse avoir des répercussions sur plusieurs années.

2. Répartition géographique

Le Feu Bactérien a été observé pour la première fois, en 1780 en Amérique du Nord au niveau de la vallée de l'Hudson. Au début des années 1900, il a été signalé au Canada, de l'Ontario à la Colombie-Britannique, dans le nord du Mexique, et aux États-Unis. En Océanie, la maladie a été signalée en Nouvelle-Zélande en 1919. En Europe, elle a été introduite pendant les années 1975 à travers le Nord et l'Ouest, puis elle s'est propagée en Afrique à travers l'Egypte en 1964. En 1997, l'Australie a signalé la présence du feu bactérien dans les jardins botaniques d'Adélaïde et de Melbourne. L'Amérique latine et une grande partie de l'Asie sont apparemment exemptes de la maladie (Van der Zwet, 2002).

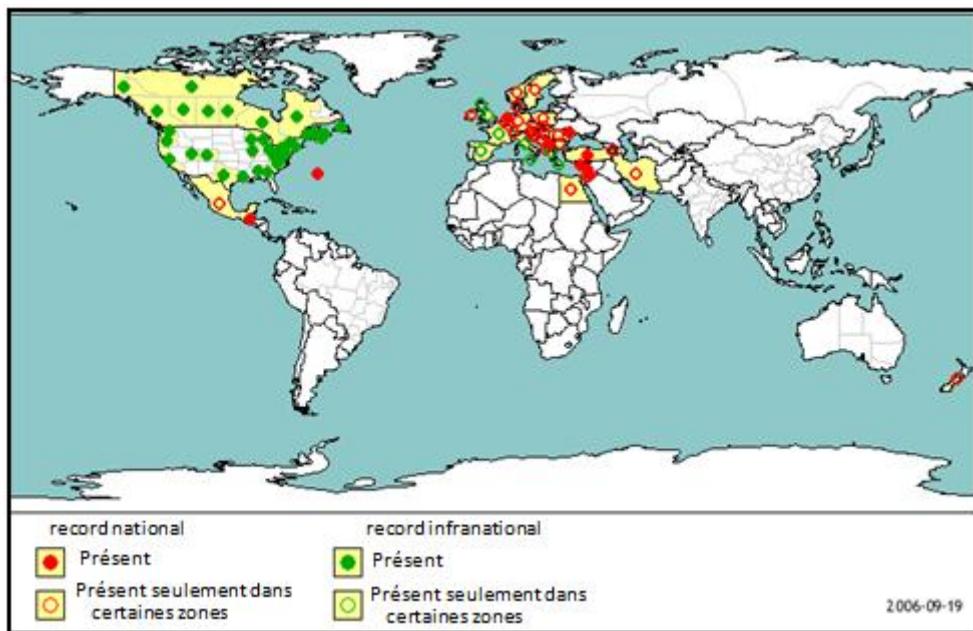


Figure 1: Répartition géographique du feu bactérien dans le monde (EPPO, 2006)

Au Maroc, des symptômes semblables à ceux du feu bactérien ont été observés pour la première fois en 2006 dans un verger de poirier (au stade de la floraison et au début de nouaison) situé dans la commune rurale d'Ain Orma à Meknès (Saoud et Mniai, 2010), puis la maladie s'est propagée rapidement dans les régions les plus productrices de fruits à pépins. Dans un effort d'éradiquer la maladie, 42 ha de poirier ont été déterrés et brûlés en Octobre 2006 (Fatmi et Bougsiba, 2008).

Tableau
Première
du feu
dans les
(EPPO,

Continents	Pays	Années
Amérique	USA	1780
Océanie	Nouvelle Zélande	1919
Europe	Royaume uni	1957
Afrique	Egypte	1964
Asie	Turquie	1988

1:
apparition
bactérien
continents
2006)

3. Perte économique

Le feu bactérien est la maladie la plus destructrice des rosacées à pépins. Elle provoque des dommages considérables sur les plantes hôtes en détruisant les rameaux floraux et induisant en conséquence la perte de la production en une saison (Van der Zwet & Keil, 1979). En présence des conditions favorables, la maladie peut entraîner la mort des arbres en une saison. De même la présence de la maladie dans un pays est une contrainte importante pour les exportations. Ceci fait que la maladie constitue une menace importante pour la filière de la poire et de la pomme ainsi que pour des plantes ornementales. Par ailleurs sa présence dans des zones qui réunissent les conditions climatiques favorables pour son développement (climat chaud et humide), augmente les risques phytosanitaires. C'est le cas des régions du pourtour méditerranéen, où le feu bactérien a causé d'importants dégâts (OEPP, 2006).

Une grande partie des variétés sensibles au feu bactérien ont subi des pertes considérables et sont en voie de disparition (Psallidas, 1990). Peu d'études ont été réalisées pour estimer les pertes occasionnées par cette maladie. En effet, aux USA, les estimations réalisées en 1977 en Californie et 1991 au Michigan, ont démontré que ces pertes étaient respectivement de 14 et 3,8 millions de dollars. Les pertes annuelles dues au feu bactérien sont estimées à plus de 100 millions de dollars aux USA, et dans d'autres pays tels que la Nouvelle Zélande et l'Italie, elles sont très importantes (Vanneste, 2000).

4. Symptômes de la maladie

Les organes les plus susceptibles sont les fleurs et les jeunes pousses. Les premiers symptômes apparaissent habituellement sur les fleurs (figure 2a et b). Quand la maladie progresse, les exsudats peuvent être observés sur les différentes parties atteintes (figure 2e, f) et la fleur meurt par la suite (figure 2f). Sur les jeunes pousses, les symptômes sont caractérisés par l'observation des tissus fanés et nécrosés. Les pousses infectées manifestent souvent une ondulation typique à la fin, appelée une houlette de berger (Donat et al, 2005).

Selon l'espèce de l'hôte, les symptômes peuvent changer légèrement, telle que la couleur du tissu nécrosé (couleur brune, rouge etc...).

Les feuilles brûlées restent attachées à l'arbre durant la saison de dormance. Le fruit peut être aussi infecté, une couleur brune et les exsudats sont alors observés .Le fruit reste attaché à l'arbre durant tout l'hiver.

Des chancres bactériens peuvent être observés quand la maladie progresse dans le tissu boisé.

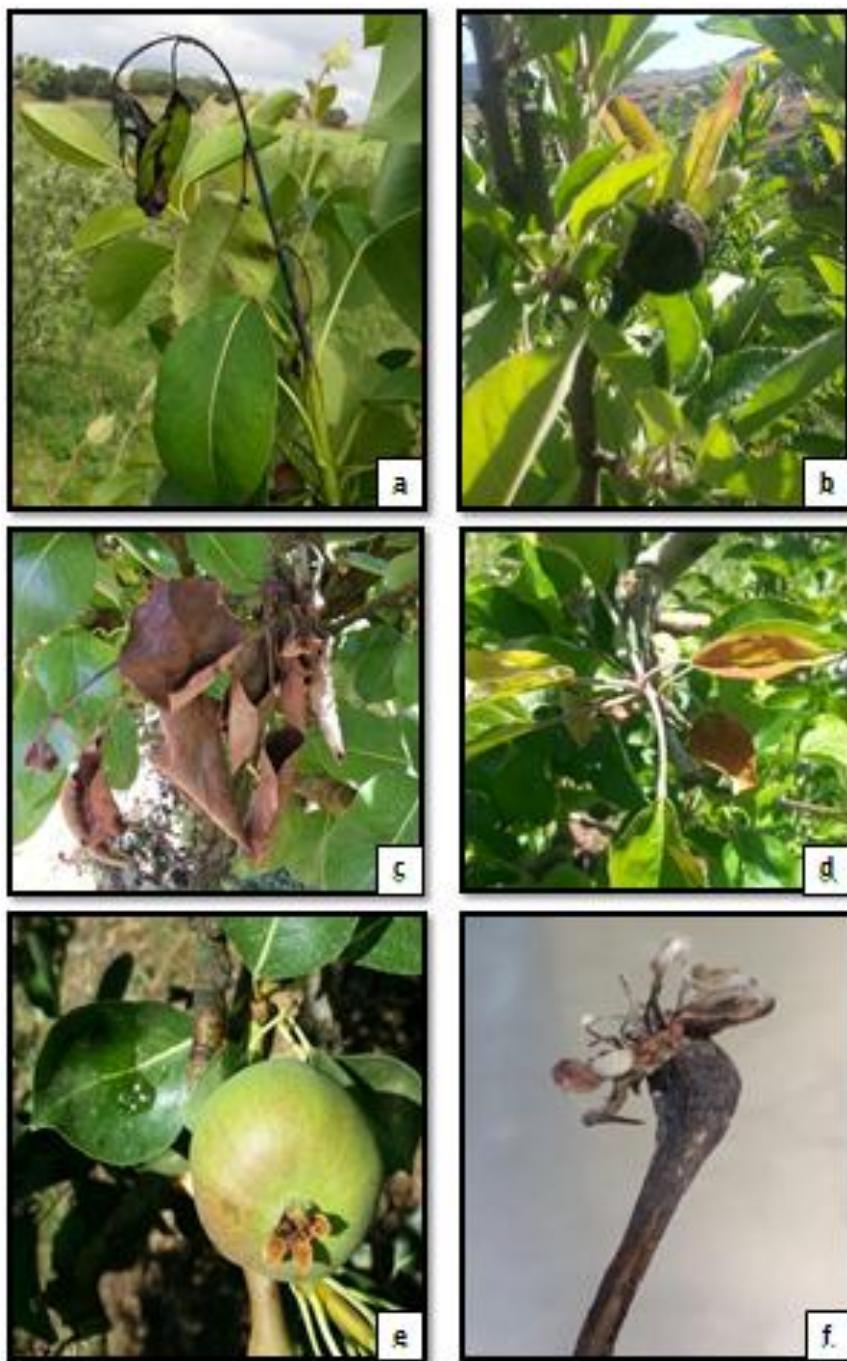


Figure 2: Symptômes du feu bactérien : Cross sur poirier (a). Fruits momifiés de pommier (b). Fleurs et feuilles brûlées de poirier (c) et de pommier (d). Production d'exsudats en

feuilles et fruits de poirier (e). Production d'exsudats en fleurs de poirier (f). (BOUKHARI et TAHIRI, 2013).

5. Cycle de la maladie

La bactérie *E. amylovora* peut se conserver dans le verger sur des tissus vivants limitant les chancres au niveau des rameaux, des charpentières et du tronc sous forme de gouttelettes mucilagineuses de couleur crème brunâtre (Blachinsky et al, 2003). Les fruits momifiés restant attachés à l'arbre peuvent aussi constituer une source d'inoculum primaire (Van der Zwet et Beer ,1995). Les bourgeons infectés l'année précédente constituaient une source potentielle d'inoculum dans les vergers où il n'y a pas les chancres dormants. Il peut aussi survivre de façon épiphyte et endophyte sur les tissus.

Au printemps, l'exsudat bactérien produit à l'extrémité des chancres est disséminé sous forme de filaments bactériens sur les fleurs ouvertes et les feuilles terminales par le vent et les pluies (Steiner, 1990), ou grâce aux insectes tels que les mouches et les fourmis qui transmettent la bactérie sur leur corps à partir des chancres aux jeunes pousses et fleurs. Les abeilles au moment de la pollinisation disséminent *E.amylovora* d'une fleur à une autre. Le matériel de travail peut aussi constituer un moyen de dissémination de la bactérie d'un arbre à un autre et d'un verger à un autre. Des infections sérieuses des rameaux peuvent aussi se produire sans l'infection des boutons floraux.

La bactérie pénètre dans les jeunes pousses et les jeunes feuilles par des voies multiples telles que les nectaires floraux, les stomates, les lenticelles, les hydathodes et les poils glandulaires brisés situés à la base des pétioles et des blessures. Dans les fleurs, la bactérie pénètre à travers le stigmate, les pétales et envahit rapidement le nectaire. L'infection florale est très fréquente chez le poirier car ses fleurs sont plus ouvertes que celles du pommier. Chez le pommier, les poils glandulaires et les lenticelles peuvent constituer une voie d'accès d'*Erwinia amylovora* au niveau des pousses feuillées. Les cellules bactériennes d'*Erwinia amylovora* se multiplient dans l'espace intercellulaire et induisent une dégradation des tissus de l'hôte. Au fur et à mesure que l'infection progresse, le tissu envahi devient d'abord décoloré et prend un aspect humide huileux avant de devenir brun puis noir. Ce processus est

fonction de plusieurs facteurs tels que la résistance relative des tissus de l'hôte et la température (Steiner, 2000).

E. amylovora se multiplie épiphytiquement sur la surface des stigmates au niveau des fleurs et sa population s'amplifie rapidement. Durant cette multiplication, le niveau de la population devient une source d'inoculum secondaire permettant la dissémination aux autres arbres. Le pathogène se déplace des surfaces stigmatiques aux nectaires, qui constituent la porte principale d'entrée aux tissus de la plante de l'hôte.

Une fois la bactérie est à l'intérieur de la plante, elle se multiplie dans les espaces intercellulaires et se déplace rapidement à travers le parenchyme cortical mais elle peut aussi atteindre les vaisseaux du xylème où elle se déplace contre le flux ascendant de sève. L'infection progresse dans les tissus boisés et produit des chancres permettant l'hivernation de la bactérie (Vanneste et Eden Green, 2000).

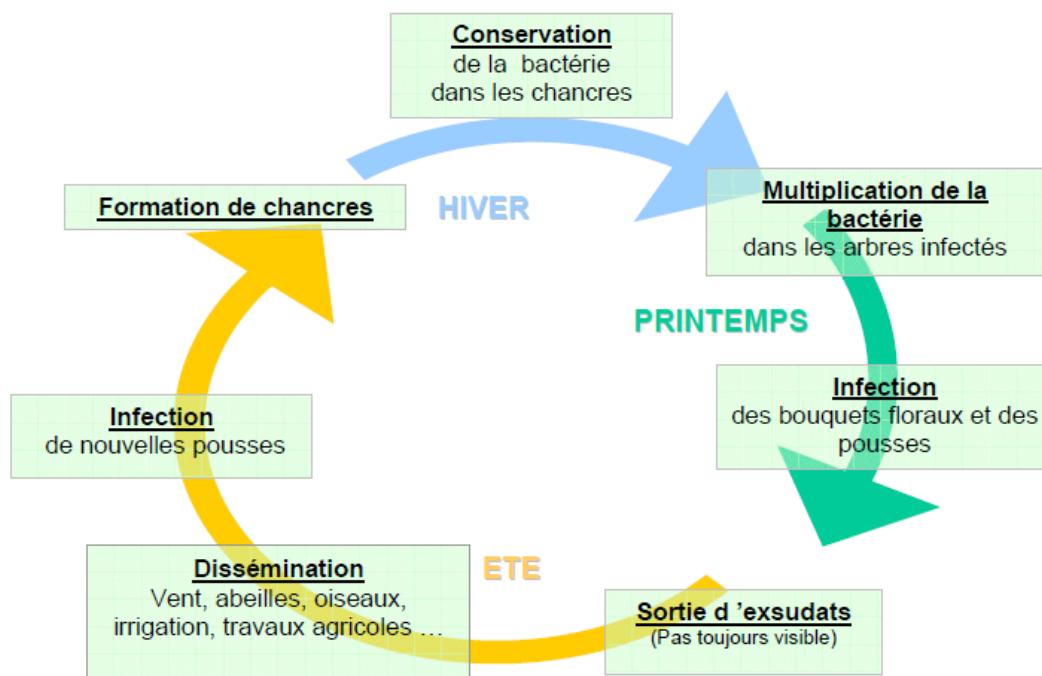


Figure 3: cycle de vie de la maladie du feu bactérien (OFAG, 2007)

6. Facteurs favorables au développement de la maladie

L'importance des hôtes sensibles, l'état physiologique du végétal, la concentration de l'inoculum, les agents de dissémination et les conditions climatiques jouent un rôle capital pour le développement du feu bactérien (Thomson, 2000).

Plus ces facteurs sont réunis, dangereuse et brutale sera la maladie. *E. amylovora* se multiplie sous un climat chaud et humide. La sévérité de la maladie et la rapidité de la progression de la nécrose sont maximales lorsque les tissus intracellulaires sont turgescents.

Mais, les valeurs seuils à partir desquelles la maladie présente un danger *in vivo* restent encore très difficiles à déterminer. L'infection théorique d'un organe réceptif est déterminée sur la base des valeurs de températures et de pluviométries utilisées soit séparément comme facteur limitant soit associées. Au printemps, pendant la floraison, la température est le facteur limitant. Des températures maximales journalières supérieures à 24° C, et des températures minimales journalières supérieures à 12° C, favorisent le développement de la maladie. Des pluies associées à ces jours chauds peuvent favoriser les infections. Cependant, les températures supérieures à 30°C sont nuisibles à la multiplication d'*E. amylovora* et par conséquent défavorisent le développement de la maladie.

En été, pendant la croissance des pousses, la pluie est le facteur limitant. Une pluviométrie supérieure à 2,5 mm est considérée comme nécessaire et suffisante. L'orage et la grêle susceptibles de causer des blessures sont également propices à l'infection.

En plus des conditions climatiques favorables, l'humidité et la chaleur, des techniques culturales telles que : le mauvais drainage des sols, une irrigation excessive ou irrégulière une taille sévère ; des apports déséquilibrés d'engrais, et une floraison secondaire abondante favorisent l'extension de la maladie.

7. Détection de la maladie

Pour une détection rapide et précoce d'*E. amylovora*, plusieurs méthodes biochimiques et moléculaires ont été développées, telles que la détection immunologique par la méthode ELISA (Gorris et al., 1996), les méthodes PCR basées sur les plasmides pEA29 (Bereswill et al., 1992), pEa13 hrp di et pEa14 hrp re (Donat, 2005), l'ADN chromosomique (Bereswill et al., 1995), la PCR nichée(Llop et al., 2000), Real-time PCR (Salm & Geider, 2004) et enfin les tests biochimiques (système API 20 E : Appareillage et Procédé d'identification).

De plus, d'autres méthodes moléculaires ont été développées pour caractériser la diversité génétique des souches de *E. amylovora* et pour étudier l'épidémiologie de la maladie, telles que la méthode PFGE (pulsed field gel electrophoresis), la méthode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Zhang et Geider, 1997) et l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

8. Plantes hôtes

Le feu bactérien touche de nombreuses plantes hôtes de la famille des Rosacées cultivées et sauvages, soient plus de 180 espèces appartenant à plus 39 genres. Selon la liste publiée par l'OEPP/ CABI en 1997, les principales plantes hôtes ayant une importance économique sont : le pommier (*Malus spp*), le poirier (*Pyrus spp*) et le cognassier (*Cydonia spp*).

Parmi les espèces ornementales : *Eriobotrya japonica*, *Cotonéaster spp*, *Pyracantha spp* (Buisson ardent), *Crataegus spp* (Aubepine), *Sorbus spp*, *Chaenomeles*, *Mespilus* et *Stranvaesia* sont les plus sensibles (Paulin et al., 1984).

9. Gestion de la maladie

Le feu bactérien est une maladie qui se développe en foyer, capable de se généraliser rapidement dans un verger si les conditions sont favorables. La lutte contre cette maladie doit rentrer dans un programme de lutte intégrée de respect des mesures phytosanitaires, lutte préventive, culturelle, biologique, génétique et chimique.

1. Lutte chimique

La lutte chimique contre le feu bactérien est très peu efficace et utilisée juste à titre préventif afin d'éviter la diffusion de la maladie à partir du premier foyer. Elle présente l'inconvénient

de provoquer le développement de la résistance chez la bactérie, ainsi qu'elle est peu respectueuse de l'environnement.

Des formulations ont été mises au point pour lutter contre le feu bactérien. Il s'agit des : antibiotiques, des produits à base de cuivre, des fongicides, des réducteurs de croissances, des désinfectants et autres formulations.

2. Lutte physique

Les méthodes de lutte physique sont basées sur l'utilisation de facteurs comme la température ou le rayonnement, afin de réduire ou d'éliminer l'inoculum. Dans le contrôle du feu bactérien, il est possible d'utiliser des méthodes physiques pour éviter la propagation de la maladie et de réduire la quantité d'inoculum.

Les plantes poussent normalement à une température allant de 1 à 40 °C et la plupart des espèces poussent mieux entre 15 et 30 °C. Les plantes vivaces et des organes dormants (semences et bulbes) de plantes annuelles peuvent survivre à des températures inférieures ou supérieures à la normale (Agrios, 1997). L'efficacité des méthodes de thermothérapie est basée sur le fait que le matériel végétal dormant peut supporter des températures élevées au cours desquelles l'agent pathogène ne survit pas. La résistance des bactéries *E. amylovora* à la haute température a été étudiée dans le but de proposer une technique pour obtenir du matériel végétal exempt de contaminants internes par traitement thermique (Aldwinckle et Gustafson, 1993; Keck et al., 1995). Il a été constaté que des températures de 45 ° C pendant 70 min ou 50 ° C pour 50 min ont suffi pour détruire la culture pure de la bactérie avec quelques variations entre les souches testées (Keck et al., 1995).

La solarisation est un autre procédé physique qui consiste à recouvrir un arbre ou une plante avec un film plastique pour augmenter la température. L'inactivation ou la réduction de l'inoculum pathogène dépend de l'espèce et la température de l'année. Dans de nombreux arbres solarisés pour le contrôle du feu bactérien, l'expansion des chancres a été arrêté ainsi aucune bactérie viables n'a été isolée à partir des chancres, tandis que les chancres des arbres non traités ont poursuivi leur développement (Thomson, 2000).

3. Lutte génétique

Chez le pommier et le poirier, un programme de création variétale par hybridation classique pour la résistance au feu bactérien a été entrepris depuis plusieurs années en France à l'INRA d'Angers et aux USA à l'Université Cornell (Geneva). Ces programmes de recherche s'étalent sur plusieurs années sur les espèces pérennes et ils sont lourds en investissements. L'utilisation de la transgénèse visant à introduire un gène d'intérêt dans un fond génétique connu peut être une alternative intéressante. Différentes approches sont explorées. Elle consiste à faire produire à la plante :

- Des substances antibactériennes (Mourgues *et al.*, 1998)
- Des substances inhibitrices de facteurs du pouvoir pathogène (Malnøy *et al.*, 2005)
- Des protéines-cibles d'effecteurs modifiées (Borejsza-Wysocka *et al.*, 2006).

Au-delà de l'acceptabilité sociétale du transgène, l'efficacité et la durabilité de la résistance conditionnent le succès de cette approche. C'est pourquoi il est important d'avoir une connaissance précise des mécanismes de l'interaction *E. amylovora*-plante hôte, qui conduisent à la résistance ou à la sensibilité. Aucune résistance monogénique n'a été identifiée à ce jour pour ce pathosystème. Les résistances seraient d'origine multigénique ou tout au moins oligogénique (Delaunay, 2009).

4. Lutte biologique

Durant les 25 dernières années, plusieurs études ont été réalisées pour le développement de stratégies de contrôle biologique fiables pour la gestion du feu bactérien. Ainsi, plusieurs souches antagonistes ont été sélectionnées et étudiées, grâce à leur capacité de prévenir ou de limiter la propagation de la maladie. Plusieurs préparations à base d'agents biologiques sont actuellement disponibles pour les arboriculteurs dans plusieurs pays (Abajo, 2006). Cette méthode de lutte est détaillée dans le Chapitre 2.

CHAPITRE 2 : LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE ERWINIA AMYLOVORA

1. Principe de la lutte biologique

Sur les surfaces aériennes des plantes, les communautés microbiennes sont diverses et comprennent de nombreux genres différents de bactéries, levures et champignons filamenteux qui affectent la santé des plantes, comme des agents pathogènes, des symbiotes, et des antagonistes des organismes de la maladie. Sur la surface des feuilles, les bactéries sont les plus abondantes, suivies par les levures, les champignons filamenteux sont considérés comme des habitants transitoires. De nombreux programmes de recherche sont dirigés vers la caractérisation des microorganismes qui vivent sur les plantes épiphytes, et qui peuvent être utilisés comme des agents de lutte biologique contre la maladie du feu bactérien (Pusey et al., 2009).

Une étude a été réalisée dans le centre de Washington sur les stigmates de fleurs de pommier, une diversité bactérienne a été détectée. Parmi les espèces bactériennes prédominantes étaient *Pseudomonas syringae* et *Pseudomonas fluorescens* appartenant au genre *Pseudomonas* et quelques espèces appartiennent au genre *Bacillus*. *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) a été représenté sur quelques fleurs. Les organismes de levure détectés sur les fleurs de pommier étaient représentés par quatre genres : *Aureobasidium* (*Aureobasidium pullulans*), *Cryptococcus*, *Rhodotorula* et *Starmerella* (Pusey et al., 2009).

2. Agents de contrôle biologique

Actuellement, plusieurs produits à base des organismes antagonistes sont disponibles ou en cours de développement pour la gestion de la maladie du feu bactérien, ils comprennent les souches de *P. agglomerans* et *Bacillus subtilis* et des levures comme *A. pullulans*, *Candida*

sake, et *Metschnikowia pulcherrima*. (Pusey et al., 2009). *P. fluorescens* est devenu le premier antagoniste disponible dans le commerce pour la gestion du feu bactérien (Vanneste, 1996).

2.1. *Pantoea agglomerans*

Cette souche antagoniste colonise les surfaces stigmatiques du poirier et de pommier et se multiplie pour empêcher la multiplication de l'agent pathogène (Vanneste, 2000). Le traitement avec l'antagoniste a diminué l'incidence du feu bactérien de 50 à 80% et peut atteindre le niveau de contrôle par la streptomycine.

Sur le terrain, la souche de *P. agglomerans* P10c était capable de survivre sur la pomme pour une période plus longue qu'*E. amylovora*, mais le pourcentage de la surface foliaire colonisée diminue rapidement après 48 heures.

2.2. *Bacillus subtilis*

B. subtilis est une bactérie gram positive, aérobiose, mésophile, elle se trouve dans les différentes niches écologiques, y compris le sol, l'eau et l'air. La bactérie peut produire un endospore qui permet à l'organisme de supporter les conditions environnementales extrêmes (chaleur, sécheresse, l'irradiation UV). Certaines souches de *B. subtilis* peuvent inhiber la croissance d'*E. amylovora*. comme la souche BsBD170 qui a montré une bonne efficacité sous les conditions naturelles (Kilian et al. 2000).

2.3. *Pseudomonas fluorescens*

Cette souche occupe les mêmes sites sur les stigmates colonisés par *E. amylovora* et utilise des nutriments indispensables pour la croissance de l'agent pathogène (Wilson et Lindow, 1993). Elle a même montré une réduction de l'incidence de la maladie de 40 à 60% dans plusieurs parcelles aux USA (Johnson & Stockwell, 2000).

Le mécanisme d'action majeur de cette souche pour contrôler le feu bactérien est basée sur la compétition avec le pathogène par l'épuisement des nutriments et la colonisation des sites. *E. amylovora* a les mêmes besoins nutritionnels, donc sous des conditions d'environnement limitées en éléments nutritifs, EPS62e peut rivaliser et exclure *E. amylovora* de son habitat. En outre, EP562e a un taux de croissance plus élevé qu'*E. amylovora* sur les poires immatures. Néanmoins, des essais préliminaires ont indiqué que l'interaction cellule-cellule peut également contribuer à l'efficacité du contrôle biologique par EPS62e, mais d'autres

études sont nécessaires pour comprendre ce type de mécanisme chez *P. fluorescens* EP562e. (Abajo, 2006).

3. Autres agents de contrôle biologique

Des levures épiphytes du pommier sont également des antagonistes d'*E. amylovora*, comme par exemple l'espèce *M. pulcherrima* qui a montré une suppression d'*E. amylovora* en utilisant le test de diffusion sur gélose, cette suppression est due à une diminution de pH dans le milieu et à la production d'un composé antimicrobien (Abajo, 2006).

Les bactériophages ou phages sont des virus qui infectent exclusivement les bactéries. L'attachement de ces bactériophages se fait à la surface de la bactérie. Ils commencent l'infection lytique par la fixation, l'injection de l'ADN à l'intérieur de la bactérie, l'expression, la réplication, l'assemblage des virions et leurs transmissions. Les bactériophages d'*E. amylovora* appartenant à l'ordre Caudovirales. Le virus possède une tête symétrique qui contient une seule molécule d'ADN attachée à une queue. En fonction de la morphologie de la queue, les phages sont regroupés en 3 familles : queues non contractiles (Siphoviridae), queues contractiles (Myoviridae) et queues courtes (Podoviridae) (Johnson & Stockwell, 2000).

PARTIE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel biologique

La bactérie phytopathogène (*E. amylovora*) a été isolée au laboratoire de phytopathologie de l'ENA partir d'un verger commercial de poirier dans la région de Meknès.

2. Méthodes

2.1. Confirmation de l'identité d'*E. amylovora* par PCR conventionnelle.

L'extraction de l'ADN a été effectuée à partir des suspensions bactériennes pour une éventuelle confirmation de l'identité des colonies isolées par PCR. Le protocole adopté est celui décrit par Llop et al, (1999). Ce protocole a été modifié en y ajoutant une étape qui consiste en la purification de l'ADN avec l'éthanol 70°. En effet, cette étape supplémentaire vise l'élimination des impurités qui peuvent inhiber la réaction PCR, notamment, la présence de traces de l'iso-propanol utilisé pour la précipitation de l'ADN. Ainsi, le protocole d'extraction d'ADN, préconisé par Llop et al.(1999) est comme suivant : Des aliquotes de 1 ml de la suspension bactérienne ont été préparées dans l'eau distillée stérile à partir des cultures pures des isolats obtenus ; ensuite les tubes ont été centrifugés à 13.000 rpm pendant 5 min à la température ambiante. Le surnageant a été éliminé, le culot est suspendu dans 500 µl du tampon d'extraction (annexe 1), les tubes ont été agités pendant 1h à température ambiante et centrifugés à 6500 rpm pendant 10 min. Le surnageant (450µl) est repris dans un nouveau tube Eppendorf auquel un volume équivalent en isopropanol est ajouté. Le contenu des tubes a été mélangé en les inversant et les laisser à la température ambiante pendant une heure, le surnageant a été retiré après une nouvelle centrifugation à 13.000 rpm pendant 5 min, et le culot a été suspendu dans 900µL d'éthanol 70°. Après centrifugation à 13.000 rpm pendant 3 min, le surnageant est retiré et le culot est séché à 60 °C pendant 10 à 20 min. Enfin, l'ADN est repris dans 200µl d'eau distillée stérile.

- Amplification

Les amorces qui seront utilisées pour l'amplification de l'ADN sont celles

décrivées par Bereswill *et al.* (1992). Ces amores permettent l'amplification d'un fragment de 900 Pb à partir du plasmide pEA29 qui est commun à toutes les populations virulentes représentatives d'*E. amylovora*.

Deux régions situées chacune à une extrémité du fragment pEA29 vont servir pour synthétiser les deux amores de 17 bases (Bereswill *et al.*, 1992). Les séquences d'amores sont les suivantes:

- Primer A : 5' CGG TTT TTA ACG CTG GG 3'
- Primer B : 5' GGG CAA ATA CTC GGA TT 3'

L'amplification a été réalisée selon le protocole adapté par l'OEPP (2006) et modifié par Aarbaoui (2008).

La composition du mélange réactionnel de la PCR avec les volumes et les concentrations des constituants est détaillée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2. Composition du mix réactionnel de la PCR conventionnelle

Réactif	Volume x1	Concentration initiale	Concentration finale
Tampon 10 x	2,5 µL	10 x	1 x
MgCl ₂	2,25 µL	50 mM	4,5 mM
dNTP	0,25 µL	10 mM	0,1 mM
Amorce PA	0,25 µL	10 µM	0,1 µM
Amorce PB	0,25 µL	10 µM	0,1 µM
Taq polymérase	0,2 µL	5 U/µL	1 U
ADN	2,5 µL	—	—
H ₂ O	15,8 µL	—	—
Formamide	1 µL	—	—

Afin de faire une économie des produits utilisés dans le mixt réactionnel, nous avons choisis la moitié du volume couramment utilisé (50 µl) pour effectuer le test. Des volumes de 22,5 µl du mix et 2,5µl d'ADN de notre échantillon à identifier ont été ajoutés dans des tubes PCR (de volume 200µl). Un témoin positif qui contient l'ADN d'*Erwinia amylovora* et un témoin négatif contenant seulement le mélange réactionnel et l'eau distillée stérile ont été réalisés.

Les tubes ont été placés ensuite dans le thermocycleur PTC-100 (MJ Research) qui

a été préalablement programmé comme suit : Un premier cycle consiste à dénaturer l'ADN: 93°C pendant 5 min Puis une série de 40 cycles, chaque cycle se déroule comme suit :

- Dénaturation : 93°C
- Hybridation : 52°C
- Elongation : 72°C

Enfin, un dernier cycle de 72°C pendant 10 minutes pourachever la réaction

Visualisation des bandes des produits d'amplification

Après l'étape de l'amplification, les amplicons obtenus ont été déposés sur un gel d'agarose à 2%. La migration de l'ADN s'effectue dans le tampon T.B.E (0.5x) (Annexe 1). Migration des produits PCR se réalise par électrophorèse en mélangeant 10 µl d'amplicon avec 2 à 3 µl du tampon de charge (loading buffer 6 x), sur un gel d'agarose à 2%. Un puit a été réservé au marqueur de poids moléculaire.

Après migration de 40 à 45 min à 100 volts, les bandes d'ADN ont été visualisées sur un transilluminateur UV après coloration des gels dans une solution de bromure d'éthidium (BET) (1µl/ml).

2.2 Isolement des bactéries à partir du sol

2.2 .1 Prélèvement des échantillons

Trois échantillons du sol ont été prélevés à partir de différents endroits de la région de Meknès durant le mois d'Avril 2015 (figure 5).

- Un sol prélevé à partir d'une parcelle dans la ferme pédagogique de l'Ecole Nationale d'Agriculture.
- L'humus prélevé d'une forêt dans la région d'Ifrane.
- Un sol prélevé à partir d'un champ irrigué par les eaux usées de la zone industriel sidi sliman moul al kifane.



- De plus un humus commercial obtenu par compostage (Hu) a été utilisé dans cette étude.

Figure 4: Vue générale sur les sites de prélèvements des échantillons : sol d'une forêt dans la région d'Ifrane (A), sol irrigué par les eaux usées de la zone industriel sidi sliman moul alkifan (B), sol d'une parcelle dans la ferme d'application de l'école nationale d'agriculture (C).

Les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol ont été écartés, on prélève alors dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 cm de profondeur) 100 à 150 g de terre. Les échantillons ont été mis dans un sac en plastique, après écartement des gros débris (pierres, racines, etc.). Les échantillons ont été transportés le plus rapidement au laboratoire pour l'analyse.

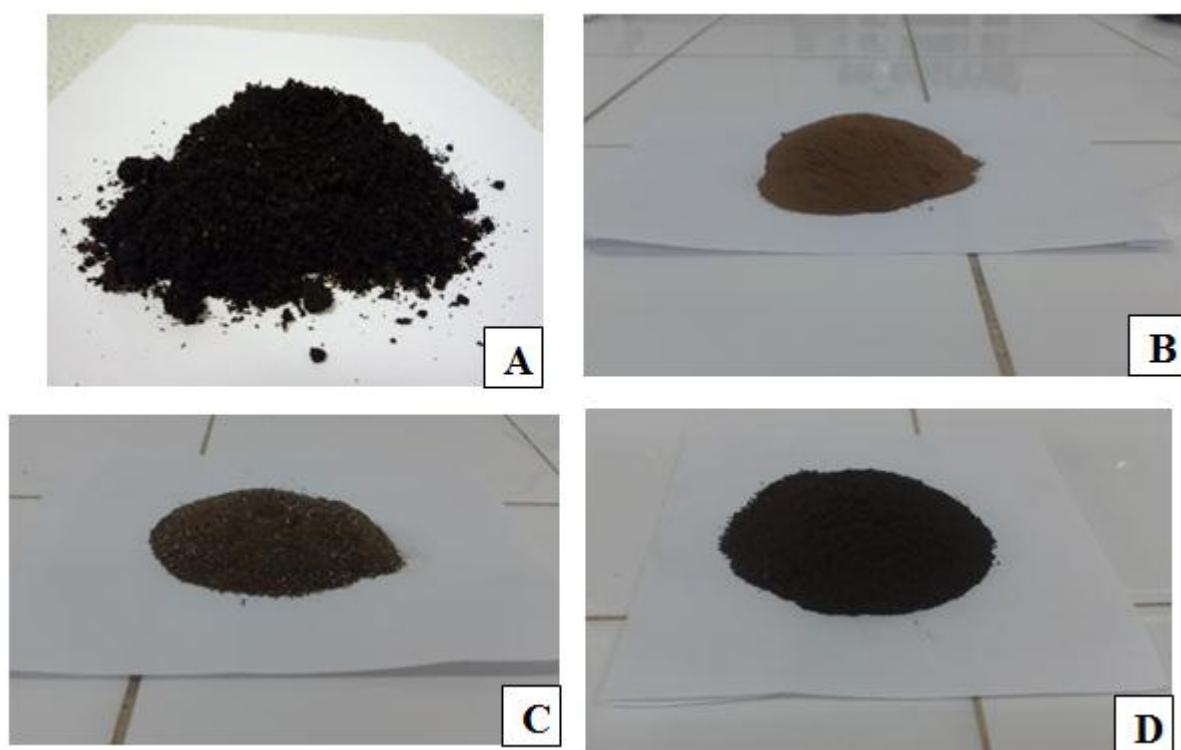


Figure 5 : Différents types de sols : l'humus (A), sol normal (B), sol pollué par les eaux usées (C), Humus de la forêt (D).

2.2 .2 Mise en suspension du sol

25g de chaque type de sol est mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée stérile et agité pendant 30min. A partir de cette suspension une série de dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} est préparée et 100 μ l de chaque dilution est étalée dans des boîtes contenant le milieu PDA (trois répétitions), puis les boîtes sont incubées à une température de 25°C pendant 48h.

2.3 Mise en évidence des bactéries antagonistes par la méthode des cylindres d'agar

2.3.1 Repiquage des isolats

Après 48h d'incubation, les colonies bactériennes de chaque aspect morphologique sont repiquées dans boites contenant le milieu PDA, puis incubées à 25°C pendant 48h.

2.3.2 Détection de l'activité antimicrobienne

Les isolats sont ensemencés en stries serrées à la surface du milieu LB et incubés à la température de 25 °C pendant 24h. Des cylindres de 9 mm de diamètre sont alors prélevés avec un emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Levane (trois boites pour chaque souche) préalablement ensemencé avec 100µl d'une culture en suspension *d'Erwinia amylovora*. Les boites sont ensuite incubées à 25°C pendant 24h. Les zones d'inhibition formées autour des cylindres sont alors mesurées et analysées statistiquement en utilisant le logiciel SPSS 20.

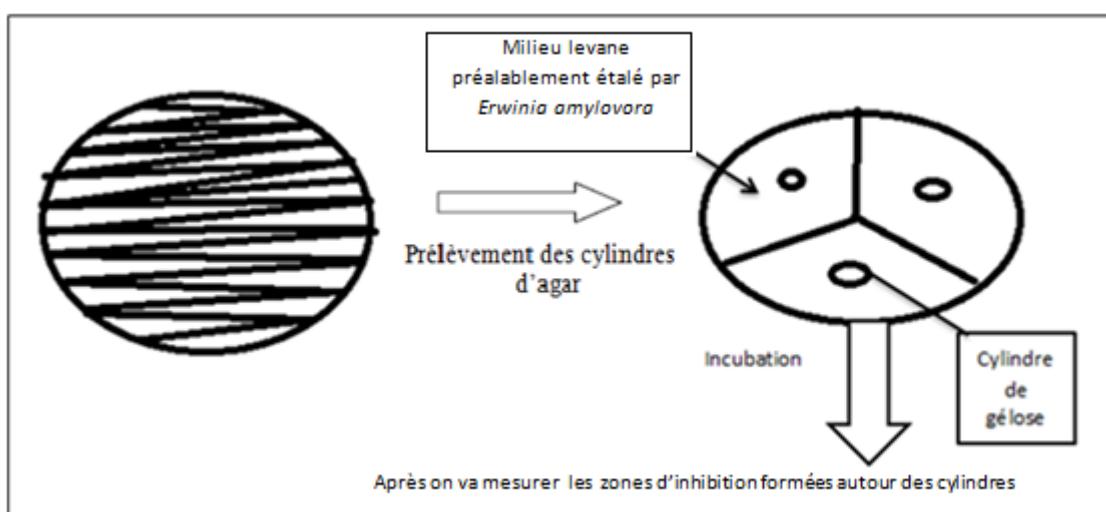


Figure 6 : Méthode des cylindres d'agar.

2.4. Conservation des isolats antagonistes

La conservation des isolats à courte durée a été effectuée à 4°C sur gélose inclinée en tubes à essai ou sur milieu LB à raison d'un repiquage toutes les 4 semaines. Pour la conservation à longue durée, il faut mettre 850 µl de la culture bactérienne dans un microtube et ajouter 150 µl de glycérol stérile d'une concentration de 15% (V/V), bien agiter le microtube et le centrifuger brièvement. Les microtubes sont immédiatement congelé à -80°C.

2.5. Caractéristiques et pré identification des isolats antagonistes

2.5.1. Etude morphologique

L'étude macroscopique nous a permis de relever la pigmentation et l'aspect des colonies. Alors que l'étude microscopique à l'aide de la coloration de Gram, nous a permis d'examiner la forme, le mode d'association et le résultat de la coloration de Gram des bactéries isolées.

2.5.2. Etude microscopique

Dans le but d'effectuer une étude microscopique de ces micro-organismes, ces derniers ont été tout d'abord ensemencés par étalement sur des lames stériles. Après séchage près de la flamme, la coloration de Gram est effectuée selon les étapes suivantes :

Le frottis est coloré pendant 1 min avec une solution de crystal violet, il est ensuite rincé sous un filet d'eau, une solution iodo-iodurée de lugol est ajoutée et le frottis est maintenu dans ce milieu pendant 1 min, après lavage à l'eau, on verse goutte à goutte sur la lame inclinée un mélange alcool-acétone (pendant 20 secondes), dès que le solvant s'écoule claire, il faut sans tarder arrêter son action par un grand lavage à l'eau et bien égoutter, le frottis et alors soumis à une coloration de contraste en le traitant avec une solution de fushine pendant 30s, rincer soigneusement à l'eau claire et séché à l'air libre ou délicatement entre deux feuilles de papier buvard, ensuite on passe à l'observation du frottis coloré au microscope (40× puis 100×), les bactéries non décolorées par l'alcool sont dites à Gram positif, elles apparaissent en violet tandis que les bactéries à Gram négatif, décolorées par le colorant et recolorées par le colorant de contraste, apparaissent en rose.

2.5.3. Identification biochimique des bactéries antagonistes par le système API 20 E

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés.

Une galerie se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés pour réaliser les 20 tests biochimiques miniaturisés. Les microtubes sont inoculés avec la suspension bactérienne à identifier. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture (tableau 3) et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Au-delà des notions de classification, l'identification repose sur le profil biochimique de la bactérie.

Au niveau du laboratoire les étapes suivantes ont été suivies :

- Préparation de la galerie :**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- Préparation de l'inoculum :**

A partir d'une culture pure jeune de 18 à 24 heures, préparer une suspension bactérienne ayant une concentration de 5×10^8 UFC/ml (standard McFarland N°5) dans 5 ml d'eau distillée stérile, il faut bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5-10 secondes pour l'homogénéiser, cette suspension doit être utilisée extemporanément.

- Inoculation de la galerie :**

Déposer soigneusement 150 µl de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile, ajouter de nouveau 150 µl de la suspension bactérienne aux cupules (citrate), VP (pyruvate de sodium) et GEL (gélatine) afin d'obtenir un volume final de 300 µl par puits, après l'inoculation, recouvrir les cupules ADH (arginine déshydrolase), LDC (lysine déshydrolase), ODC (ornithine décarboxylase), H₂S (sulfure d'hydrogène) et URE

(uréase) d'huile végétale (huile de paraffine) afin créer une anaérobiose, la galerie est incubée dans une chambre humide à 30°C pour 18 à 24 heures. Après la durée d'incubation, la lecture de la galerie a été faite pour l'ensemble des micro-tubes sauf pour les micro-tubes VP, TDA (tryptophane désaminase) et IND (indole) dont la lecture n'a été faite qu'après l'addition des réactifs nécessaires de la façon suivante :

- VP : une goutte d'hydroxyde de potassium (40%) et une goutte d'alpha-naphtol (6%) ont été ajoutées (il faut attendre 10 minutes avant de faire la lecture de la réaction).
- TDA : une goutte de chlorure ferrique (10%) a été additionnée. La lecture de la réaction se fait immédiatement.
- IND : la lecture de la réaction se fait aussi immédiatement après l'ajout d'une goutte du réactif de James.

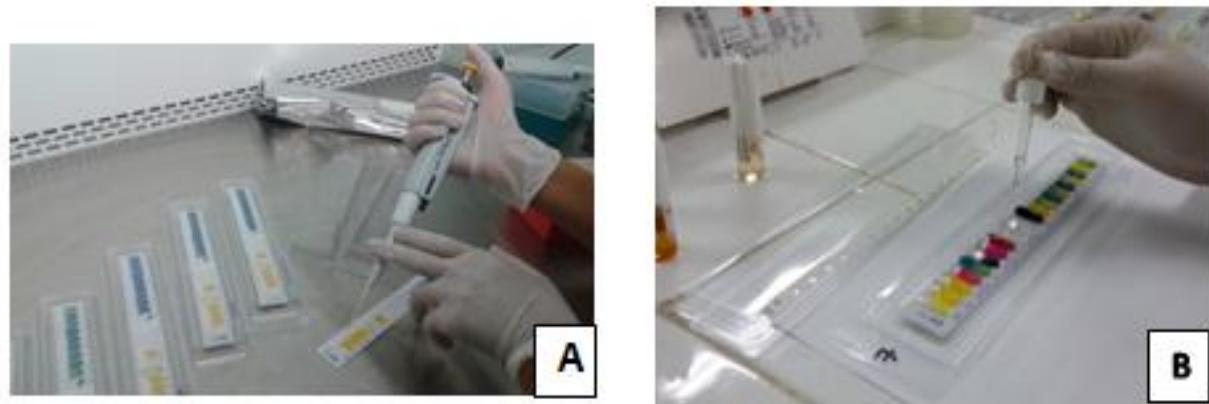


Figure 7 : Identification des isolats par la galerie API 20^E : Inoculation de la galerie (A), Ajout des réactifs (B).

La couleur obtenue, après incubation, est comparée avec le tableau de lecture (Tableau 3). Pour chaque cupule le résultat est inscrit sur la fiche de résultats (Annexe 2). Pour déterminer le code de 7 chiffres, les résultats des réactions ont été additionnés par ensemble de trois microtubes : une réaction négative donne 0 point tandis qu'une réaction positive donne 1, 2 ou 4 points.

Tableau 3: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20^E.

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -napthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU a ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

2.6. Test de pouvoir pathogène des bactéries antagonistes

Le test de pouvoir pathogène des antagonistes a été évalué sur les fleurs d'une plante indicatrice de phytopathogénicité, il s'agit du Geranum. Les antagonistes ont été préparés en prélevant des colonies à partir des cultures bactériennes dans 9 ml d'eau distillée stérile. *E.amylovora* est utilisée comme un témoin positif. L'application des antagonistes sur les fleurs a été effectuée à l'aide d'une seringue tout en injectant la suspension bactérienne à l'intérieur des nervures.

La plante a été placée dans une chambre de culture dont les conditions sont une température de 24°C avec une humidité de 90±10 %. La lecture des résultats a été faite après 24h d'incubation.



A



B

Figure 8 : Test de pouvoir pathogène : injection des antagonistes (A), incubation de la plante dans la chambre humide (B).

PARTIE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Confirmation de l'identité d'*E. amylovora* par PCR conventionnelle

La détection d'*E. amylovora* a été réalisée moyennant la technique moléculaire PCR conventionnelle. Ainsi, un échantillon est considéré positif s'il produit un fragment d'ADN ayant un poids moléculaire de 1000 pb, la taille attendue de ce fragment d'ADN est de 900 pb. Mais cette valeur peut varier entre 900 et 1100 pb à cause de la répétition d'une séquence de 8 pb qui se trouve au niveau du fragment amplifié.

Après amplification une bande d'environ 1000 pb a été obtenue pour les trois répétitions. (figure 10).

Les résultats du test PCR confirment que la bactérie manipulée correspond bien à l'espèce



E.amylovora.

Figure 9 : Profil d'amplification de l'ADN de *E. amylovora* (1,2 et 3 : échantillons amplifiés; M: Marqueur du poids moléculaire; T-: témoin négatif ; T+ : témoin positif).

2. Résultats d'isolement des bactéries à partir du sol

La littérature rapporte de nombreux travaux sur l'isolement des bactéries antagonistes contre *Erwinia amylovora* à partir des fleurs et des fruits (Cabrefiga et al, 2007, Pusey et al, 2009, Paternoster et al, 2010,. Pusey et al, 2011) et ne cessent de continuer jusqu'à ce jour. En revanche, les travaux d'isolement des bactéries antagonistes à partir du sol sont relativement très rares (Kabeil et al, 2010).

Dans la présente étude, des échantillons de sol prélevés de différentes régions ont été explorés dans le cadre de la recherche des bactéries antagonistes.

Les colonies bactériennes apparaissent après 2 jours d'incubation sur le milieu PDA, elles sont repiquées dans le même milieu d'isolement.

L'aspect macroscopique des isolats est différent : Taille (grande, moyenne et petite) et forme (colonies bombées, aplatie, poudreuse...etc).

Le tableau 4 présente le nombre d'isolats obtenus à partir de différents échantillons correspondants aux différents sols rhizosphériques. Au total 49 isolats ont été sélectionnés en fonction de leur aspect morphologique, et cela probablement sous l'influence des différents facteurs environnementales tel que (le pH du sol, la température, les éléments nutritives, ainsi que la texture du sol). Selon (**lynch et whipps, 1990**) la végétation peut influencer sur la variation de la densité microbienne et sur l'activité antibiotique. La présence de la matière organique ainsi que les exsudats racinaires peut également influencer les populations microbiennes du sol.

Tableau 4 : Nombre et codes d'isolats obtenus à partir de différents sols rhizosphériques.

Nature du sol	Nombre et codes d'isolats	total
Sol normal de la ferme	SF1,SF2,SF3,SF4,SF5,SF6,SF7,S8 SF9,SF10,SF11,SF12,SF13,SF14 SF15,SF16	16
Humus obtenu par compostage	HC1, HC2, HC3, HC4, HC5, HC6	6
Sol pollué par les eaux usées	SP1,SP2,SP3,SP4,SP5,SP6,SP7,SP8 SP9,SP10,SP11,SP12,SP13,SP14 SP15,SP16, SP17,SP18,SP19	19
Humus de la forêt	HF1, HF2, HF3, HF4, HF5, HF6, HF7,HF8	8

3. Activité antimicrobienne

Nous avons testé l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar des isolats obtenus à partir des différents types de sols en plus de 8 isolats qui ont été déjà isolés au laboratoire de phytopathologie et protection des plantes à partir des fleurs de poirier , de pommier et de Cognassier. La confrontation directe des 57 isolats avec *E. amylovora*, nous a permis de sélectionner 21 isolats produisant des substances antimicrobiennes. Le **tableau 5** montre les résultats de l'activité antimicrobienne des isolats manipulés.

Tableau 5 : Résultats de l'activité antimicrobienne (en mm) des isolats obtenus à partir des sols et des fleurs.

type du biotope	code d'isolats	moyennes des zones d'inhibition (mm)
Humus de la forêt	HF6	0,66
Sol pollué	SP13	3
	SP9	3.83
	SP18	4.1
Sol de la ferme	SF13	8.33
	SF3	7.33
	SF14	0.33
	SF4	7.33
	SF15	7
	SF10	11

	SF7	10
	SF16	9.33
humus obtenu par compostage	HC4	3.55
Fleurs de poirier, pommier et cognassier	ACB/C Pa1	5
	ACB/P2	5.33
	ACB JAUNE BOUNOUAL	5.33
	ACB LOUAMRA	5.33
	ACB/P1	2.16
	ACBC2	1
	ACBC1	4.66
	ACB/C Pa2	7
	<i>Bacillus subtilis</i>	2.13
Témoins positifs	Streptomycine (50mg/ml)	3.4

Avant la mise en œuvre d'une stratégie de lutte biologique contre le feu bactérien à l'aide des antagonistes, il est nécessaire de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interactions avec le pathogène, c'est pourquoi des tests d'activité antagoniste ont été réalisés et qui ont pour but de sélectionner les isolats performants.

Une étude qui a été menée par Gerami et al, (2009), sur l'activité antagoniste des bactéries isolées à partir des fleurs et des fruits de poirier et de pommier a montré que 14 isolats présentaient des zones d'inhibition inférieure à 5 mm, 15 isolats entre 5 mm et 10 mm et 21 isolats présentaient des zones d'inhibition supérieure à 10 mm

Le résultat du criblage effectué sur 57 isolats obtenus à partir des sols de différentes régions et à partir des fleurs de poirier, pommier et cognassier montrent que seulement 38 % des souches présentent une activité antimicrobienne contre *E.amylovora*. Ce pourcentage des isolats antagonistes varie selon les régions ; le pourcentage le plus élevé est celui observé chez les isolats du sol de la ferme de l'ENA avec un pourcentage de 50%, suivi par le sol pollué avec un pourcentage de 33% et finalement l'humus du compostage et l'humus de la forêt qui ont des pourcentages respectivement 16% et 12%. Par ailleurs, les isolats obtenus à partir des fleurs de poirier, pommier et cognassier, présentent tous une activité antimicrobienne contre *E.amylovora*. La moyenne des zones d'inhibition varie d'un isolat à un autre, la plus grande zone d'inhibition est celle obtenue pour l'isolat SF10 avec 11 mm. Par contre la plus petite zone d'inhibition est observée chez l'isolat SF14 avec 0,33 mm de diamètre. Les témoins positifs utilisés, la streptomycine et *Bacillus subtilis* ont donné des zones d'inhibition qui sont 3.4 mm et 2.13 mm respectivement.

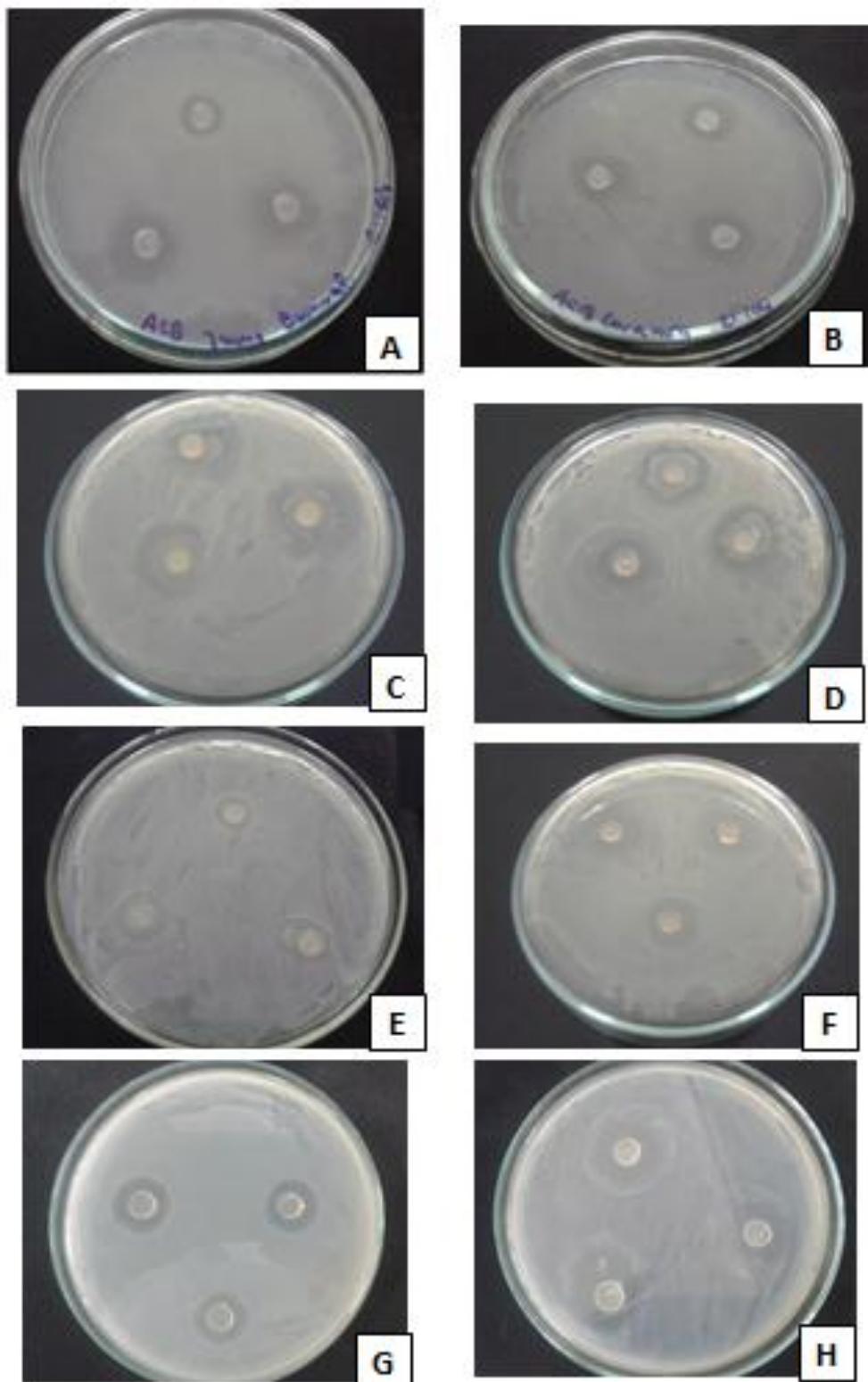


Figure 10: Test d'activité antimicrobienne de quelques isolats : ACB JAUNE
BOUNOUAL(A),ACB LOUAMARA(B),SF14(C),SF10(D),ACBC1(E),SF13(F),
Streptomycine (G), *Bacillus subtilis* (H).

Afin de savoir si l'activité antimicrobienne de ces isolats présente une différence statistiquement significative nous avons effectué une analyse de la variance (tableau 6).

Tableau 6 : Analyse de la variance des moyennes des zones d'inhibition.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Sig.
isolats	580,879	22	26,404	6,163	,000

Nous remarquons un effet hautement significatif entre les différents isolats.

Le test de comparaison de Student-Newmen-Keuls ($p<0,05$) montre la présence de sept groupes homogènes comme il est présenté sur le tableau suivant.

Tableau 7 : Test de comparaison de moyennes (SNK) des zones d'inhibition.

isolats	N	Sous-ensemble pour alpha = 0,05						
		1	2	3	4	5	6	7
SF14	3	0,3333						
HF6	3	0,6667						
ACBC2	3	1,0000	1,0000					
<i>Bacillus subtilus</i>	3	2,1333	2,1333	2,1333				
ACB/P1	3	2,1667	2,1667	2,1667				
SP13	3	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000			
STREPTOMYCINE	3	3,4000	3,4000	3,4000	3,4000	3,4000		
HC4	3	3,5533	3,5533	3,5533	3,5533	3,5533		
SP9	3	3,8333	3,8333	3,8333	3,8333	3,8333		
SP18	3	4,1067	4,1067	4,1067	4,1067	4,1067	4,1067	
ACBC1	3	4,6667	4,6667	4,6667	4,6667	4,6667	4,6667	
ACB/C Pa1	3	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	
ACB JAUNE BOUNOUAL	3	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333
ACB LOUAMRA	3	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333
ACB/P2	3	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333
ACB/C Pa2	3		7,0000	7,0000	7,0000	7,0000	7,0000	7,0000
SF15	3		7,0000	7,0000	7,0000	7,0000	7,0000	7,0000
SF3	3			7,3333	7,3333	7,3333	7,3333	7,3333
SF4	3			7,3333	7,3333	7,3333	7,3333	7,3333
SF13	3				8,3333	8,3333	8,3333	8,3333
SF16	3					9,3333	9,3333	9,3333
SF7	3						10,0000	10,0000
SF10	3							11,0000
Sig.		0,209	0,054	0,179	0,138	0,060	0,051	0,054

Parmi ces sept groupes celui qui regroupe des isolats qui ont un effet antagoniste le plus performant est le groupe 7, il s'agit de ACB JAUNE BOUNOUAL, ACB LOUAMRA, ACB/P2, ACB/CPa2, SF15, SF3, SF4, SF13, SF16, SF7, SF10.

4. Caractéristiques et pré identification des isolats antagonistes

4.1. Etude morphologique

L'aspect macroscopique des isolats est très diversifié. Certaines colonies ont une grande taille, d'autres de tailles moyennes et d'autres forment des colonies de petites tailles. La forme des colonies était différente aussi : colonies demi-bombées, plate, circulaire...etc.

Le tableau ci-dessous représente l'aspect morphologique des différents isolats sur le milieu PDA.

Tableau 8 : Caractéristiques macroscopique et microscopique des isolats.

Code d'isolats	La taille (mm)	La forme	La couleur	La surface	La consistance	Opacité	Forme microscopique	Type de Gram
HF6	1	circulaire	blanche	Lisse et brillante	visqueuse	opaque	cocci	négatif
SP13	1	circulaire	jaune	Lisse et mate	visqueuse	opaque	Cocci en amas	négatif
SP9	2	irrégulière	blanche	lisse	visqueuse	transparente	bacille	négatif
SP18	10	filamenteuse	blanche	rugueuse	granulaire	opaque	Bacille incurvé	négatif
SF13	5	irrégulière	brune	plane	granulaire	opaque	bacille	négatif
SF3	4	circulaire	blanche	plane	visqueuse	opaque	bacille	négatif
SF14	2	irrégulière	blanche	convexe	visqueuse	opaque	Cocci en amas	négatif
SF4	4	irrégulière	jaune	rugueuse	visqueuse	opaque	bacille	négatif
SF15	4	irrégulière	blanche	Convexe	visqueuse	opaque	bacille	négatif
SF10	6	irrégulière	blanche	plane	visqueuse	opaque	bacille	négatif
SF7	3	irrégulière	blanche	Convexe	visqueuse	opaque	bacille	négatif
SF16	5	irrégulière	blanche	bossue	visqueuse	opaque	bacille	négatif
HC4	3	circulaire	blanche	Demi-	visqueuse	opaque	Cocci en amas	négatif

				bombée				
ACB/C Pa1	9	irrégulière	blanche	Convexe	visqueuse	opaque	bacille	négatif
ACB/P2	5	circulaire	jaune	Demi- bombée	visqueuse	opaque	bacille	positif
ACB JAUNE BOUNOU AL	6	irrégulière	blanche	plate	visqueuse	transparente	bacille	positif
ACB LOUAMR A	6	irrégulière	blanche	plate	visqueuse	opaque	bacille	négatif
ACB/P1	4	circulaire	jaune	Demi- bombée	visqueuse	opaque	bacille	négatif
ACBC2	4	circulaire	jaune	Demi- bombée	visqueuse	opaque	bacille	négatif
ACBC1	5	circulaire	brune	Demi- bombée	visqueuse	opaque	bacille	négatif
ACB/C Pa2	6	irrégulière	blanche	plate	visqueuse	opaque	bacille	négatif

5. Identification biochimique des bactéries antagonistes par le système API 20 E

Des tests biochimiques API 20E ont été effectués sur les 21 isolats obtenus à partir les fleurs de poirier, de cognassier et de pommier et à partir de différents sols.

Après inoculation des galeries par les suspensions bactériennes et après incubation durant 24 heures à 30°C, la lecture des réactions produites a été réalisée à l'aide du tableau de lecture (tableau 3, page 26). L'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique.

La compilation des résultats de l'utilisation des substrats par la bactérie à identifier permet de déterminer un code de 7 chiffres.

Le tableau 9 résume les codes obtenus après la compilation des résultats des 21 isolats testés.

Tableau 9 : Résultats d'identification des isolats par la galerie API 20E

Isolat	Réaction sur galeries API 20 E	Codes obtenus
ACBC2		1205533
ACB LOUAMRA		0203000
ACB/C Pa2		0203000
ACBC1		0205523
ACB/P1		1205533
ACB/P2		1205533
ACB/C Pa1		0203000
SF4		0203000
SF3		0203000
SF15		0203000
SP9		2216040
SF16		0203000
SF10		0203000
SF7		0203000
SP13		0005000
SF13		0203000

Les résultats du test biochimique montrent que les trois isolats ACBC2, ACB/P1, ACB/P2 correspondent aux codes habituellement attribués à *Pantoea spp 2 et Rahnella aquatillis*, avec des pourcentages d'identification (%id) de 54,5 et 41,5 respectivement.

Les isolats ACB LOUAMRA, ACB/CPa2, ACB/CPa1, SF4, SF3, SF13, SF7,SF16, SF10, SF15, SP13 peuvent être attribués à *Ps.oryzihabitans* avec un pourcentage d'identification (%id) de 64,1, l'isolat SP13 peut aussi être attribué à *Ps.oryzihabitans* avec un pourcentage d'identification (%id) de 50. Par ailleurs, l'isolat ACBC1 peut être attribué à *Seratia plymuthica*, *Pantoea spp1* et *Pantoea spp2* avec des pourcentages d'identification (%id) de 37,6, 36,6, 18,1 respectivement.

L'isolat SP9 correspond au code attribué à *Pseudomonas aeruginosa* avec un pourcentage d'identification (%id) de 99,9.

A l'exception l'isolat SP9, les pourcentages d'identification obtenus chez les différents isolats sont relativement faibles. Par ailleurs, cinq isolats n'ont pas pu être identifiés par la galerie Api20E parce-qu'ils n'appartiennent pas à la famille des entérobactéries. Pour ces raisons il serait indispensable d'utiliser les techniques moléculaires pour l'identification de ces agents antagonistes.

6. Résultat du test de pouvoir pathogène

Le test de pouvoir pathogène nous a permis de repérer les bactéries qui sont phytopathogènes. Sur 21 isolats testés, deux isolats ont montré une activité phytopathogène sur les feuilles de la plante indicatrice : il s'agit de SP9 et SF16. Le témoin positif (*E. amylovora*) a induit également l'apparition des symptômes sur les feuilles de la plante test.

Les deux isolats SP9 et SF16 ne peuvent pas être proposés comme agents de lutte biologique à cause de leur pouvoir phytopathogène.

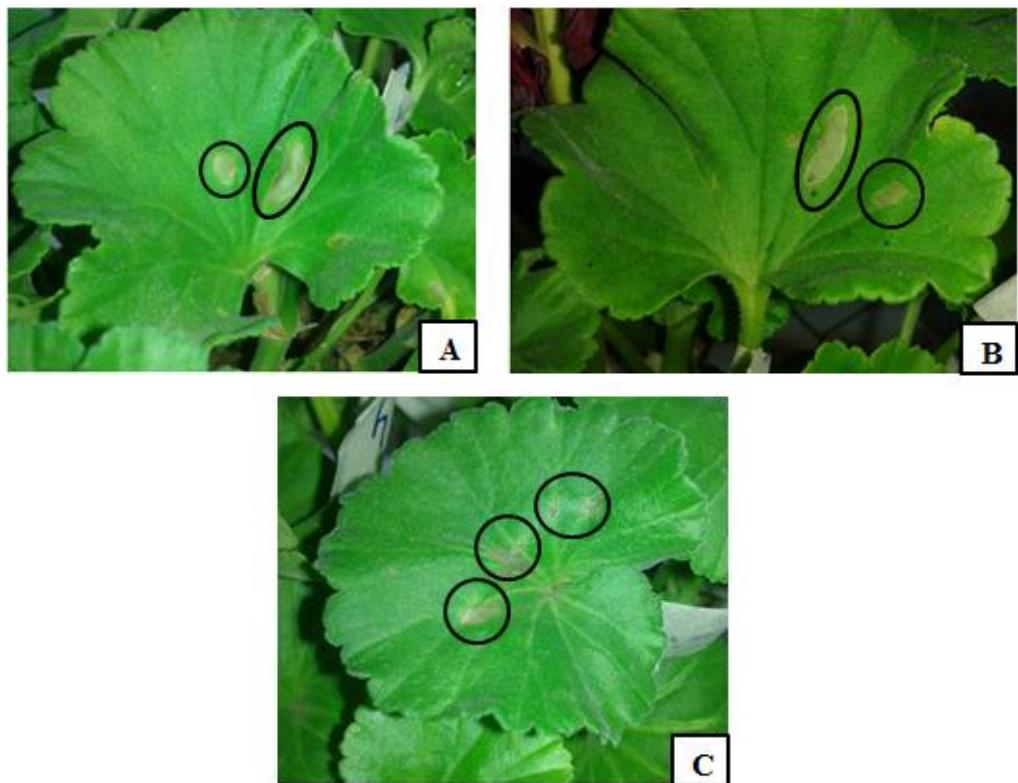


Figure 11: Symptômes des bactéries phytopathogènes sur les feuilles du Geranuim : SF16(A), SP9 (B), *Erwinia amylovora* (C).

Rapport-Gratuit.Com

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La mauvaise gestion des techniques culturales, le non-respect des règles d'hygiène, les conditions climatiques favorables (Grêle et T° élevée), l'absence de traitements chimiques et des méthodes de lutte efficaces, rendent la lutte contre la maladie causée par *E.amylovora* très difficile et conduisent à l'augmentation des pertes économiques qu'elle engendre. La recherche de nouvelles méthodes de lutte pour gérer ce fléau s'avère nécessaire.

La présente étude nous a permis d'étudier *in vitro* le pouvoir antagoniste des bactéries isolées à partir de différents sols rhizosphériques, et également isolées à partir des fleurs. Une caractérisation par examen microscopique et macroscopique ainsi qu'une identification par des techniques biochimiques (galeries API 20E) ont été effectués. Par ailleurs, un test du pouvoir pathogène des isolats sur une plante indicatrice (Geranuim) nous a permis de sélectionner les isolats non phytopathogène.

A partir de cette étude nous avons pu conclure ce qui suit :

- Après un criblage primaire sur 57 isolats seulement 21 isolats ont été sélectionnés comme des antagonistes d'*Erwinia amylovora*. Le plus grand nombre d'isolats est celui obtenu à partir du sol de la ferme de l'ENA avec 8 isolats antagonistes repérés.
- La plus grande zone d'inhibition est celle observé chez l'isolat SF10, qui est isolé à partir du sol de la ferme de l'ENA. Cet isolat est plus efficace en comparaison avec la streptomycine (50mg/ml) et *Bacillus subtilis* (commercial) qui ont montré des zones d'inhibition 3.4 mm et 2.13 mm respectivement.
- Pour les résultats d'identification des isolats par la galerie Api20E, à l'exception de l'isolat SP9 qui a montré un très bon niveau du pourcentage d'identification, les pourcentages d'identification obtenus sont généralement très faibles ce qui met ces résultats en doute et rend nécessaire l'utilisation des techniques moléculaires.
- Le test du pouvoir pathogène des isolats a montré que les isolats SP9 et SF16 sont capables de provoquer un noirissement sur les feuilles de Geranuim. Ce résultat indique que ces deux bactéries ne peuvent pas être utilisées comme agents de lutte biologique.

-
- A la lumière de ces résultats, on peut recommander ce qui suit :
 - ✓ Confirmer l'identité des isolats obtenus par les techniques moléculaires.
 - ✓ Evaluer l'activité antimicrobienne des bactéries isolées à partir de différents sols rhizosphériques *in vivo* au laboratoire et au champ.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarbaoui M, (2008). Application des techniques moléculaires et sérologiques dans la détection des agents phytopathogènes : cas d'*Erwinia amylovora* et Tomato Yellow Leaf Curl Virus de la tomate, thèse de Doctorat. Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale.

Abajo P.M, (2006). Development of molecular monitoring methods and assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight *Pseudomonas fluorescens* EPS62e. UDG, Doctorat Thesis.

Agrios, G.N, (1997). Plant Pathology. 4th ed. Academic Press. California. USA.

Alain B , Jean J, Bernard J, Jean F et François T, (1995). Classification of forest humus forms: a French proposal. Annales des Sciences Forestières 52(6): 535-546.

Aldwinckle, H. et Gustafson, H. (1993). Hot water treatment for eradication of *Erwiria amylovora* from propagating wood. *Acta Hort.* 309-338.

Bereswill S, Pahl A, Bellemann P, Zeller W. et Geider K. (1992). Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR-analysis. Applied and Environmental Microbiology 58 :3522-6.

Bereswill S, Bugert P, Bruchmueller I, Geider K. (1995). Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. Appl. Environ. Microbiol 61: 2636–2642.

Blachinsky D, Shtienberg D, Zamski E, Weinthal D, Manulis S (2003). Effects of pear tree physiology on fire blight progression in perennial branches and on expression of pathogenicity genes in *Erwinia amylovora*. Eur J Plant Pathol 116: 315–324.

Borejsza EE, Malnoy M, Beer SV, Aldwinckle HS. (2006). Increased resistance to fire blight in apple plants by silencing DspE-interacting proteins. Phytopathology 96:176.

Boukhari M. A. et Tahiri A. (2013) « Contribution à l'étude de la diversité génétique d'*Erwinia amylovora* (burri, 1883), agent responsable de la maladie du feu bactérien et essais de lutte biologique », Mémoire de fin d'étude, Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, p 80.

Burrill F.J. (1883). New species of Micrococcus (Bacteria).Am Naturalist 17, 319-320.

Delaunay S. (2009). Interaction entre des mutants *hrp* d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité. Thèse de Doctorat. Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale. Ecole Doctorale d'Angers.

Donat V, Biosca EG, Rico A, Penalver J, Borruel M, Berra D, Basterretxea T, Murillo J, Lopez MM. (2005). *Erwinia amylovora* strains from outbreaks if fire blight in Spain: phenotypic characteristics. Annals of Applied Biology, 146 (1), 105-114.

European and mediterranean plant protection organization (EPPO), (2006), Bulletin 34 : 1596171.

Fatmi M. et Bougsiba M., (2008) « Premier rapport du feu bactérien causé par *Erwinia amylovora* sur poire, pomme, coinge au Maroc », Plant diseases, Volume 92, N°2, pp 314.

Gerami E, Hassanzadeh N, Abdollahi H, Ghasemi A, Heydari A, (2009) evaluation of some bacterial antagonists for biological control of fire blight disease. Applied and Environmental Microbiology.

Gorris M.T, Camarasa E, Lopez M.M, Paulin J.P, Chartier R, Cambra M, (1996). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. Acta Hortic.(Wageningen) 411: 47–52.

Johnson, K.B.; Stockwell, V.O.; Burgett, D.M.; Sugar, D.; Loper, J.E. (1993) Dispersal of *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas fluorescens* by honey bees from hives to apple and pear blossoms. Phytopathology 83, 478-484.

Jordi Cabrefiga, Anna Bonaterra, Emilio Montesinos, (2007), Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight, Applied and Environmental Microbiology.

Kabeil, Sanaa S, (2010), Antagonistic activity of some bacterial isolates against *Erwinia amylovora*. Applied and Environmental Microbiology.

Keck. M; Chartier, R.; Zislavsky, W.; Lecomte, P. and Paulin, J.P. (1995). Heat treatment of plant propagation material for the control of fire blight. *Plant Pathol.* 44:124-129.

Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schmiedeknecht, G. and Hain R, (2000).
TZB24® *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality
Pflanzenschutz-nachrichten Bayer, Applied and Environmental Microbiology.

Llop P, Bonaterra A, Penalver J, & Lopez M, (2000) « Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material ». *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2071-2078.

Lynch et whipps (1990), Substrate flow in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*

Magniez frédéric, (2008), Identification bactérienne par la coloration de GRAM, biotechnologies.
Malnoy M, Faize M, Venisse JS, Geider K, Chevreau E. (2005). Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. *Plant Cell Rep* 23:632-638.

Mourgues F, Brisset MN, Chevreau E (1998). First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the attacin E gene from *Hyalophora cecropia*. *Trends Biotech* 16:203-210.

Office fédéral de l'agriculture OFAG,(2007), Lutte contre le feu bactérien en Suisse.

Paulin, J.P. and Lachaud, G. (1984). Comparison of the efficacy of some chemicals in preventing fire blight blossom infections. *Acta Hort.* 151:209-214.

Pusey P.L., Stockwell V.O, Mazzola M, (2009). Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 99, 571–581.

Psallidas P.G., Tsiantos J. (1990). Chemical control of fire blight. In Fire Blight : the Disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, pp. 199-234.

P. L. Pusey, V. O. Stockwell, C. L. Reardon, T. H. M. Smits, and B. Duffy, (2011), Antibiosis Activity of *Pantoea agglomerans* Biocontrol Strain E325 Against *Erwinia amylovora* on Apple Flower Stigmas. *Applied and Environmental Microbiology*.

Salm H. et Geider K. (2004). Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathology* 53 : 602-610.

Saoud H., Mnai D. (2010) « Gestion de la crise feu bacterien au maroc ». Journée sécurité sanitaire des produits alimentaires, p 43.

Steiner P.W. (1990). Predicting apple blossom infections by *Erwinia amylovora* using the Marvblot model. *Acta Hortic* 139-148

Steiner P.W. (2000). Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight. pp. 339-358. In: Vanneste, J.L. (ed.). Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing. Wallingford. UK.

Sundin G.W., Mc Ghee G.C., Ehret G.R., (2008). Field evaluation of biological control agents for fire blight control in Michigan. Proceedings of the 7th International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, Florida 2008: 76.

Tani A., Takeuchi T., Horita H. (1990). Biological control of scab, black scurf and soft rot of potato by seed tuber bacterization. In: Horney, D. (Ed.), Biological Control of Soil Borne Plant Pathogens. CAB International Wallingford, UK, pp. 143–164.

Thomson, S.V. (2000). Epidemiology of fire blight. Pp. 9-36. In: Vanneste, J.L. (ed.). Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing. Wallingford. UK.

Thomas Paternoster, Geneviève Défago, Brion Duffy, Cesare Gessler, Ilaria Pertot, (2010), Selection of a biocontrol agent based on a potential mechanism of action: degradation of nicotinic acid, a growth factor essential for *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*.

Van der Zwet T. (2002) « Present world-wide distribution of fire blight». *Acta Horticulturae* 590: 33-34.

Van der Zwet T. et Keil H. (1979). Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants. U.S. Dept. Agric., Agriculture Handbook 510. P200.

Van der Zwet et Beer S.V. (1995). Fire blight. Its nature, prevention and control: a practical guide to integrated disease management. US Department of Agriculture. *Agriculture Information Bulletin* 635: 91 pp.

Vanneste J.L. et Eden-Green S.J. (2000). Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. Pp 73-83 in : Vanneste J.L. (ed) Fire blight the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford 370pp. ISBN 0 85 199 2943.

Vanneste J.L. et Eden-Green S.J. (2000). Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. Pp 73-83 in : Vanneste J.L. (ed) Fire blight the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford 370pp. ISBN 0 85 199 2943.

Wilson, M.; Lindow, S.E. (1993), Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology* 83, 117-123.

Zhang Y.X. et Geider K. (1997). Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 63 : 4421-4426.

ANNEXES

ANNEXES

Tampon d'extraction :

Tris Hcl, pH7,5 24,2 g

NaCl 14,6 g

EDTA	9,3 g
Polyvinilpyrrolidone PVP-10	20 g
ED	11

Tampon TBE (1x) :

(89 mM) Tris base	10,78 g
(2 mM) Na ₂ EDTA	5,50 g
(89 mM) Acide borique	0,58 g
ED	11

MILIEUX DE CULTURE :

Milieu Levane :

Yeast extract	2g
Bactopeptone	5g
NaCl	5g
Sucrose	50g
Agar	20g
ED	11

Milieu LB (Luria Broth):

Tryptone	10g
Yeast extract	10g
NaCl	5g
Agar	15g
ED	11

Milieu PDA :

Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Agar	25g
ED	1L
