

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.AGR/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Agronomiques
Spécialité : Santé des plantes

Présenté par :

AMMI Fatma Zohra Houda

Thème

*La maladie du feu bactérien causée par la bactérie
Erwinia amylovora dans la région de Tizi-Ouzou*

Soutenu le : 28 / 09 / 2017

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. MAHDI K

MCA

Univ. de Bouira

Présidente

Mlle. TAFIFET L

MAA

Univ. de Bouira

Promotrice

Mlle. MABDOUA S

MAA

Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2016/2017

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail ...

*A Mes exemples éternels, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, ceux qui se sont toujours sacrifiés pour me voir réussir, **Mes chers Parents**, que Dieu les garde pour moi toujours.*

*A Mes adorables sœurs, qu'aucun mot ne pourra décrire leur dévouement et leur soutien et surtout ma petite sœur et mon petit bonheur **Sérine**.*

A Mes chers amis que l'amitié sincère nous a liées, en témoignent les bons moments passés ensemble.

A Toutes les personnes qui ont cru en moi, qui m'encouragent et qui me donnent toujours l'envie d'aller en avant.

Houda.

Remerciements

*Je tiens, tout d'abord, à remercier Dieu, **ALLAH**, le tout puissant et miséricordieux, pour m'avoir donné le courage, la force ainsi que la capacité de pouvoir mener jusqu'au bout de ce modeste travail.*

*J'adresse mes profondes reconnaissances et mes chaleureux remerciements à ma promotrice **Mlle TAFIFET**, pour les connaissances qu'elle n'a cessé de me prodiguer, de la confiance qu'elle m'a témoignée, pour m'avoir guidé et orienté tout au long de mon projet et surtout pour son aimable disponibilité.*

*Je voudrais également remercier les membres de mon jury : **Mme. MAHDI K** et **Mlle. MEBDOUA**, pour l'honneur qu'elles m'ont fait en portant leur attention sur ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent à tout le personnel de la direction des services agricoles de Tizi Ouzou, ainsi qu'à la Subdivision Agricole de Tizi Ouzou et de Draâ Ben Khedda, plus spécialement à **Mme MOULOUDJ**, **Mr RABIA** et **Mr OUKACI**, sans oublier **Mme KEBIR**, de la station régionale de la protection des végétaux de Tizi Ouzou,.*

*Un vif remerciement à L'agriculteur **Mr ADEL** pour tous les conseils qui m'a donné.*

*Je remercie aussi la technicienne de laboratoire 09 d'agronomie **Mme HADIOUCHE** pour sa disponibilité et sa patience ainsi que **Mr CHEDRI**, responsable du laboratoire de recherche pour son aide durant ma période d'expériences au laboratoire.*

Enfin, je remercie vivement toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin afin que je puisse accomplir mon travail en toute quiétude.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Plantes hôtes de la bactérie <i>Erwinia amylovora</i> agent causal de la maladie de feu bactérien (OEPP,2011)	08
Tableau 02 : Lieux et dates d'échantillonnage	18
Tableau 03 : Résultats des tests d'identification chimiques et biologiques	32



Liste des figures

- Figure 01 :** Cellule virulente d'*E. amylovora* avec flagelles péritriches abondants observée sous microscope électronique (18 000 x) (Van der Zwet et al., 2012) **03**
- Figure 02 :** Morphologie typique de colonies d'*Erwinia amylovora* (Agriréseau, 2014) A : milieu King B / B : milieu levane /C : milieu CCT.....**04**
- Figure 03 :** Représentation schématique du T3SS à partir de bactéries phytopathogènes (Piqué et al., 2015) **05**
- Figure 04 :** Carte géographique de la répartition mondiale de la maladie de feu bactérien (OEPP, 2017)**08**
- Figure 05 :** Fleurs infectées, finissent par se flétrir, se ratatiner et brunir ou noircir (Momol, 2000).....**10**
- Figure 06 :** fruits de pommier infectés par le feu bactérien (Oregon State University, 2006).....**10**
- Figure 07 :** Pousses gravement infectées par le feu bactérien (Ward Gauthier, 2002)..... **10**
- Figure 08 :** Suintement bactérien (exsudat) sur un fruit de pomme (Nelson, 2015)**10**
- Figure 09 :** Chancres de feu bactérien présentant un pourtour rugueux sur une branche (Celetti, 2015).....**10**
- Figure 10 :** Le cycle épidémiologique du feu bactérien, causé par le pathogène bactérien *Erwinia amylovora*, sur les pommes et les poires (Johnson, 2000) (modifié).....**12**
- Figure 11 :** Carte géographique de la wilaya de Tizi Ouzou (Google,2017) **16**
- Figure 12 :** diagramme Ombrothermique du GAUSSEN de la région de Tizi-Ouzou (ONM, 2012)**17**
- Figure 13 :** Situation de la région de Tizi-Ouzou dans le Climagramme d'Emberger **18**
-

Figure 14 :	Image satellite du verger de poirier de Tadmaït (Google Earth, 2016)	19
Figure 15 :	Image satellite du verger de pommier (A), et de poirier (B), de la région de Draâ Ben Khedda, (Google Earth, 2016)	19
Figure 16 :	Situation géographique du verger d'Oued Falli (A) et Tassadorte (B), (Google Earth, 2016)	20
Figure 17 :	Chancres sur les tronc et rameaux des quelque arbres des vergers de poirier.....	24
Figure 18 :	Symptôme de la maladie de feu bactérien sur des arbres de poirier.....	25
Figure 19 :	Noircissement des rameaux avec des fruits momifiés de l'année précédente.....	25
Figure 20 :	Structure des colonies isolées sur milieu levane.....	26
Figure 21 :	Colonies isolées à d'autre critères	26
Figure 22 :	Résultats du test de Gram. (A) : Bacterie a gram négatif / (B) : Bacterie a gram positif	27
Figure 23 :	Résultats du test d'oxydase : (A) réaction négative ; (B) réaction positive....	27
Figure 24 :	Résultat du test d'oxydation/fermentation (A) : Tube anaérobique (présence d'une couche d'huile de vaseline) ; (B) : Tube aérobique.....	28
Figure 25 :	Résultat du test de citrate : (A) virage de couleur de milieu vers le bleu (test positif) ; (B) test négatif.....	29
Figure 26 :	Résultats du test d'utilisation d'indole : (A) formation d'un anneau rouge (production de l'indole) ; (B) test négatif (pas de formation d'indole)	29
Figure 27 :	Résultats du test de catalase	30
Figure 28 :	Bactérie émettant une fluorescence verte sous la lumière UV.....	30
Figure 29 :	Résultats du test d'hyper sensibilité sur tabac : (A) apparition d'une plage nécrotique, (B) témoin négatif, (C) résultat négatif.	31

Table des matières

Introduction	01
Chapitre I : Données bibliographiques	03
I. <i>Erwinia amylovora</i> agent causal de la maladie de feu bactérien	03
I.1. Taxonomie	03
I.2. Caractéristiques générales	03
I.2.1. Caractéristiques morphologiques	03
I.2.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques	04
I.3. Les effecteurs de pouvoir pathogène	04
I.3.1. Système de sécrétion de type III	04
I.3.2. Les exopolysaccharides (EPS)	05
I.3.3. Le système d'acquisition du fer	06
II. La maladie du feu bactérien	07
II.1 Historique et répartition géographique	07
II.2 Plantes hôtes	07
II.3. Symptômes	09
II.4. Cycle de vie de la maladie	11
II.5. Facteurs favorables au développement de la maladie	13
II.6. Gestion de la maladie	13
II.6.1. Lutte préventive et culturale	13
II.6.2. Lutte chimique	13
II.6.3. Lutte génétique	14
II.6.4. Lutte biologique	14

II.6.5. Lutte intégrée	15
Chapitre II : Matériel et méthodes	16
II. Présentation de la région d'étude	16
II.1. Répartition géographique	16
II.2. Climat	16
II.3. Climagramme d'Emberger	17
II.4. Stations d'étude	18
II.4.1. Tadmaït	18
II.4.2. Draâ Ben Khedda	19
II.4.3. Tizi Ouzou	19
II.5. Prélèvement des échantillons sur terrain	20
II.6. Traitement des échantillons au laboratoire	21
II.6.1. Isolement	21
II.6.2. Purification	21
II.7. Tests d'identification de l'agent pathogène	21
II.7.1. Tests biochimiques	21
II.7.1.1. Test de Gram	21
II.7.1.2. Test de mise en évidence de l'activité cytochrome C Oxydase.....	22
II.7.1.3. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/ fermentatif du glucose	22
II.7.1.4. Test d'utilisation du citrate	22
II.7.1.5. Test d'utilisation d'indole	22
II.7.1.6. Test de catalase	23
II.7.1.7. Test de fluorescence sur King B	23

II.7.2. Test Biologique	23
II.7.2.1. Test d'hypersensibilité sur tabac (HR)	23
Chapitre III : Résultats et Interprétations	24
III.1. Observation des symptômes sur terrain	24
III.2. Résultats du diagnostic au laboratoire	26
III.3. Résultats des tests d'identifications biochimiques	27
III.3.1. Test de Gram	27
III.3.2. Test de mise en évidence de l'activité cytochrome oxydase	27
III.3.3. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose	28
III.3.4. Test d'utilisation du citrate	28
III.3.5. Test d'utilisation d'indole	29
III.3.6. Test de catalase	30
III.3.7. Test de fluorescence sur King B	30
III.4. Test d'identification biologique	31
III.4.1. Test d'hypersensibilité sur tabac (HR)	31
Chapitre IV. Discussion	34
Conclusion	37
Références bibliographiques	39

INTRODUCTION

Introduction

Les Rosacées forment une famille qui compte environ 3100 espèces réparties en plus d'une centaine de genres (Judd *et al.*, 1999). Elle existe un peu partout dans le monde, mais de façon prépondérante dans les régions tempérées. La superficie des Rosacées en Algérie a pratiquement doublé en 10 ans, passant de 35 403 ha en 2001 à plus de 72 000 ha en 2011 (FAO, 2013). Ces chiffres traduisent l'importance grandissante accordée ces dernières années à la culture des Rosacées en Algérie (Abdelguerfi, 2003).

En effet, comme beaucoup de plantes cultivées, cette famille est sujette à de nombreuses maladies cryptogamiques et bactériennes (tavelure, alternariose, oïdium, chancres, pourriture, rouilles), et ravageurs (nématodes, acariens, cécidomyies, punaises, syrphes, thrips). La bactérie *Erwinia amylovora* est l'agent pathogène responsable de la maladie du feu bactérien, la maladie la plus redoutable des Rosacées jusqu'à l'heure actuelle, ayant causé des pertes considérables du point de vue économique.

Le Feu bactérien, dû à *Erwinia amylovora*, est une maladie qui affecte les Maloïdées (sous-famille des Rosacées) comprenant les arbres fruitiers à pépins (pommier, poirier...) et des arbustes d'ornement (aubépine, Pyracantha, amélanchier...). C'est une maladie sporadique qui peut provoquer des dommages considérables, car elle est nécrogène et évolue très rapidement (Cesbron, 2009), ainsi qu'aucun traitement n'est efficace pour lutter contre cette maladie.

Erwinia amylovora est une bactérie à grame négatif appartient à la famille des Entérobactéries qui est étroitement liée à de nombreux agents pathogènes importants des humains et des animaux, cet agent pathogène est considéré comme un organisme nuisible de quarantaine dans l'Union Européenne qui se trouve dans la liste A2 (OEPP, 2012).

Le feu bactérien a été observé pour la première fois, en 1780 en Amérique du Nord au niveau de la vallée de l'Hudson, (Saoud et Mniai, 2010), elle s'est répandue dans la région de Maghreb où elle est apparue au Maroc, puis en Algérie et récemment en Tunisie (Rhouma, 2013).

En Algérie cette maladie a été détectée dans plusieurs vergers de poiriers et néfliers (*Pyrus communis* et *Eriobotrya japonica*), et signalés dans différentes régions du pays : Ain Témouchent, Sidi Bellabes, Oran, Ain Defla, Boumerdès, Bouira, Béjaïa, Tizi Ouzou et Mila (Ziad, 2011). Des échantillons ont été analysés au laboratoire et la présence d'*Erwinia amylovora* a été confirmée en 2011 (OEPP, 2011).

Dans ce contexte, la présente étude vise à confirmer la présence de la bactérie *Erwinia amylovora*, l'agent causal du feu bactérien, dans quelques vergers de poiriers et de pommiers dans la région de Tizi Ouzou, par un diagnostic symptomatologique sur terrain et isolement de la bactérie phytopathogène au laboratoire, suivi par une série de tests d'identification biochimiques biologiques des souches isolées.

Cette étude est composée de quatre chapitres. Le premier comprend les données bibliographiques sur l'agent pathogène, le second concerne le matériel et les méthodes suivies sur le terrain et au laboratoire. Le troisième chapitre définit les résultats obtenus et leurs interprétations. Le dernier chapitre représente la discussion sur les résultats obtenus.



CHAPITRE I
Données Bibliographiques

Chapitre I : Données bibliographiques

I. *Erwinia amylovora* agent causal de la maladie de feu bactérien

L'agent pathogène responsable de la maladie du feu bactérien est la bactérie *Erwinia amylovora*, qui colonise les tissus sous corticaux de nombreuses espèces de la famille des Rosacées (Megan, 2016). Cette maladie représente une énorme menace pour la culture des fruits dans de nombreuses régions du monde, car elle peut infecter la plupart des plantes des Rosacées, cultivars ornementaux, dont les pommiers et les poiriers sont d'importants hôtes (Vrancken *et al.*, 2013).

I.1. Taxonomie décrite par Winslow *et al.*, 1920

Règne : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Erwinia*

Espèce : *Erwinia amylovora* (Burrill, 1882)

I.2. Caractéristiques générales

I.2.1. Caractéristiques morphologiques

Le genre *Erwinia* appartient à la famille des Entérobactéries qui comprend de nombreuses espèces pathogènes d'animaux, d'insectes ou de plantes (Cesbron, 2009). La cellule d'*Erwinia amylovora* est un bâtonnet à gram négatif, anaérobie facultative, de taille 0,3 x 1-3 μm , et possède de deux à sept flagelles péritriches par cellule (fig 01) (Paulin, 2000).

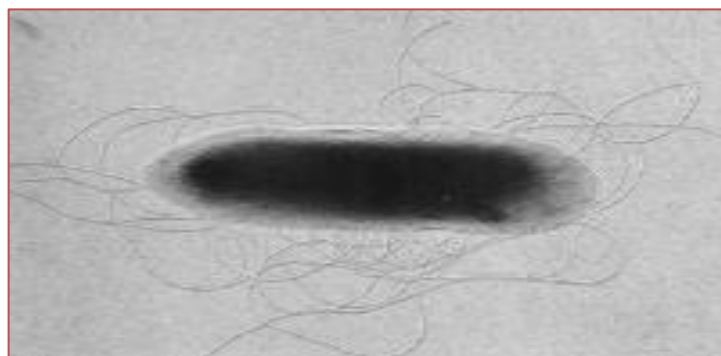


Figure 01 : Cellule virulente d'*E. amylovora* avec flagelles péritriches abondants observée sous microscope électronique (18 000 x) (Van der Zwet *et al.*, 2012).

Chez *E. amylovora*, la cellule bactérienne est entourée d'une couche de polysaccharides (galactose, glucose, mannose et acide uronique) organisée en capsule, formant l'exopolysaccharide (EPS) appelé amylovorane essentiel à la virulence (Bugert et Geider, 1995).

I.2.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques

La bactérie *Erwinia amylovora* peut être identifiée à l'aide de méthodes biochimiques et moléculaires (amplification d'ARN 16S). Une fois identifiée, elle peut être mise en culture pure sur un milieu King B, sur lequel de petites colonies blanchâtres sont observées de 1 mm de diamètre, rondes et lisses, après 72h de croissance à 21°C (Arnaud, 2014).

La bactérie peut être isolée depuis des extraits végétaux sur un milieu de culture différentiel, le milieu CCT, sur lequel sa croissance est optimale à 27°C pendant 3 jours. Les colonies obtenues sont plutôt grandes (4 à 7 mm de diamètre), lisses, de forme convexe avec une coloration bleutée et diffuse (fig 02) (Arnaud, 2014).

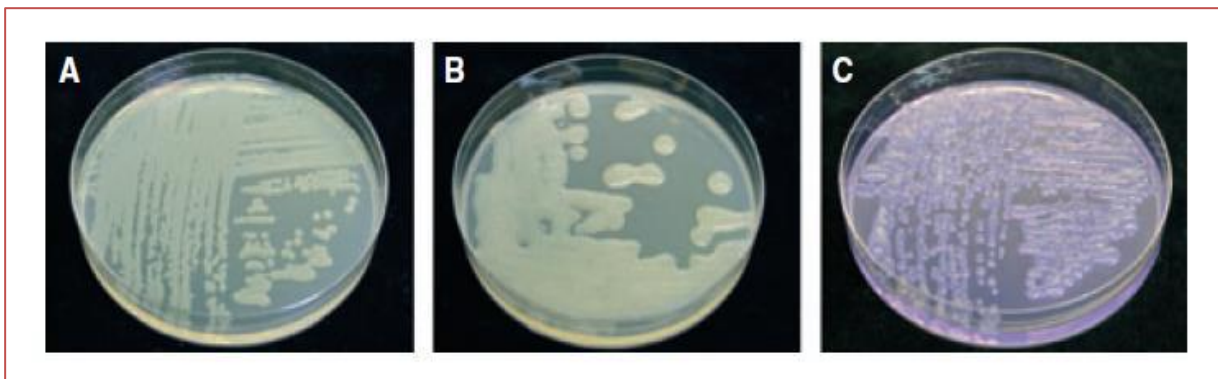


Figure 02 : Morphologie typique de colonies d'*Erwinia amylovora* (Agriréseau, 2014)

A : milieu King B / B : milieu levane / C : milieu CCT

D'autre part, Les plasmides sont connus pour être présents dans un certain nombre de souches de bactéries phytopathogènes (et autres). Dans le cas d'*E. amylovora*, le même plasmide (pEA29) semble être présent dans toutes les souches étudiées du pathogène. Ce plasmide de 29 kb semble jouer un rôle en pathogénicité (paulin, 2000).

I.3. Les effecteurs de pouvoir pathogène

I.3.1. Système de sécrétion de type III

Au cours des 30 dernières années, des études génétiques approfondies ont été réalisées pour identifier et caractériser les gènes impliqués dans la capacité d'*E. amylovora* à causer le feu bactérien (Oh et Beer, 2005).

Ces études ont déterminé qu'une voie de sécrétion / translocation de protéines, appelée système de sécrétion type III (hrp-T3SS) ; et l'exopolysaccharide ont été requis pour la pathogénicité d'*E. amylovora* (Oh et Beer, 2005).

Les bactéries phytopathogènes à gram négatif telles que *E. amylovora* utilisent ce système de sécrétion conservé de façon évolutive pour exporter et sécréter des protéines effectrices dans le cytosol des cellules végétales hôtes par une structure semblable à celle du pilus, qui forme l'élément central de base du T3SS (Block *et al.*, 2008).

Le T3SS (fig 03) des bactéries phytopathogènes est principalement constitué de protéines Hrc, codées par des gènes conservés par hrp (*hrc*) et les protéines Hrp, codées par des gènes de réponse hypersensible et de pathogénicité (Galbis *et al.*, 2015).

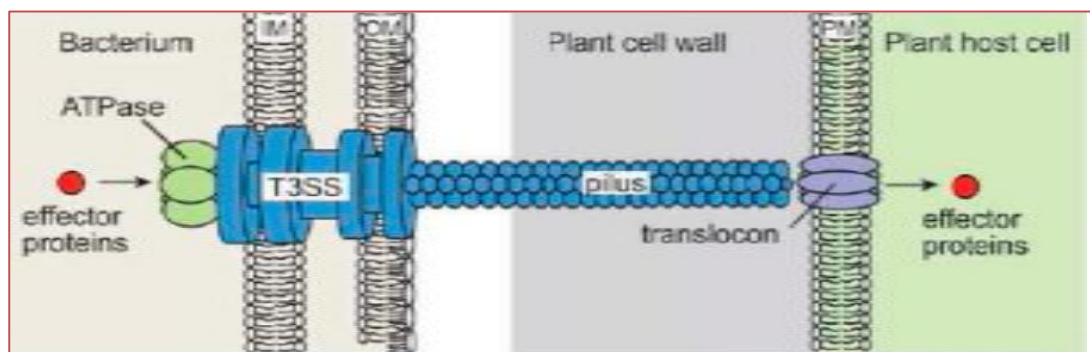


Figure 03 : Représentation schématique du T3SS à partir de bactéries phytopathogènes (Piqué *et al.*, 2015).

I.3.2. Les exopolysaccharides (EPS)

Les exopolysaccharides (EPS) ont été suggérés de jouer un rôle clé dans le contournement du système de défense des plantes, en perturbant et obstruant le système vasculaire de la plante et en protégeant les bactéries contre l'eau et la perte de nutriments pendant les conditions sèches (Ordax *et al.*, 2010 ; Vrancken *et al.*, 2013).

L'amylovorane requiert un grand nombre de gènes. La plupart de ces gènes sont localisés dans une région du chromosome d'environ 17kb appelée *ams* (Bugert et Geider, 1995). Les quantités d'EPS synthétisées varient selon les souches mais aussi en fonction de la température, du pH, de la concentration en sels du milieu et de la source de carbone, ainsi la quantité d'amylovorane produite par des souches *E. amylovora* individuelles étant corrélée avec le degré de virulence (Galbis *et al.*, 2015).

I.3.3. Le système d'acquisition du fer

Erwinia amylovora possède un système d'acquisition du fer composé de sidérophores de type hydroxamate et d'un récepteur FoxR (Kachadourian *et al.*, 1996). Ce système est important pour la survie de la bactérie en milieu carencé en fer comme l'apoplaste.

Le sidérophore majoritairement produit par *E. amylovora* est cyclique (DFO E) mais de petites quantités d'autres sidérophores du même type, cycliques (DFO D, X) ou linéaires (DFO G), sont synthétisées (Feistner *et al.*, 1993 ; Kachadourian *et al.*, 1996). Sur fleurs, les mutants *dfoA* et *foxR* montrent une capacité de colonisation des fleurs plus faible que la souche sauvage et induisent un niveau moindre de maladie (Dellagi *et al.*, 1998). Ce système est donc impliqué dans l'agressivité de la bactérie.

II. La maladie du feu bactérien

D'après Cazelles et Hasler (2006) le feu bactérien est une maladie bactérienne très dangereuse des arbres fruitiers à pépins, ainsi que de quelques plantes ornementales et sauvages. Cette maladie, causée par la bactérie *Erwinia amylovora*, menace les vergers. Les bactéries peuvent se multiplier activement dans les tissus et l'infection progresse rapidement.

Cette maladie se manifeste par la perte des branches et affecte la structure de l'arbre. Dans les cas graves, quand la bactérie progresse dans le tronc ou le porte-greffe, l'arbre meurt. La gravité de la maladie dépend de la sensibilité du cultivar et du porte-greffe, de l'état de santé général de l'arbre, des pratiques culturales et des conditions du milieu. Les pertes économiques dues au feu bactérien découlent d'une diminution de l'étendue de la surface en fruits et de la mortalité des arbres (Vanneste, 2008)

Erwinia amylovora a été déclaré organisme de quarantaine de la liste A2, et il y a obligation d'annoncer tout cas suspect (Gazelles et Hales, 2006).

II.1 Historique et 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 New-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'Égypte 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).

Rhouma (2013) ajoute que la maladie s'est répandue dans la région de Maghreb où elle est apparue au Maroc, puis en Algérie et récemment en Tunisie (fig 04).

II.2 Plantes hôtes

Le feu bactérien s'attaque aux plantes de la famille des Rosacées ; La plupart des hôtes naturels se trouvent dans la sous-famille *Maloideae* (Momol et Aldwinckle, 2000). À côté des poiriers, pommiers et cognassiers, le feu bactérien attaque quelques plantes ornementales et sauvages de la famille des Rosacées (tableau 01) (OEPP, 2011).

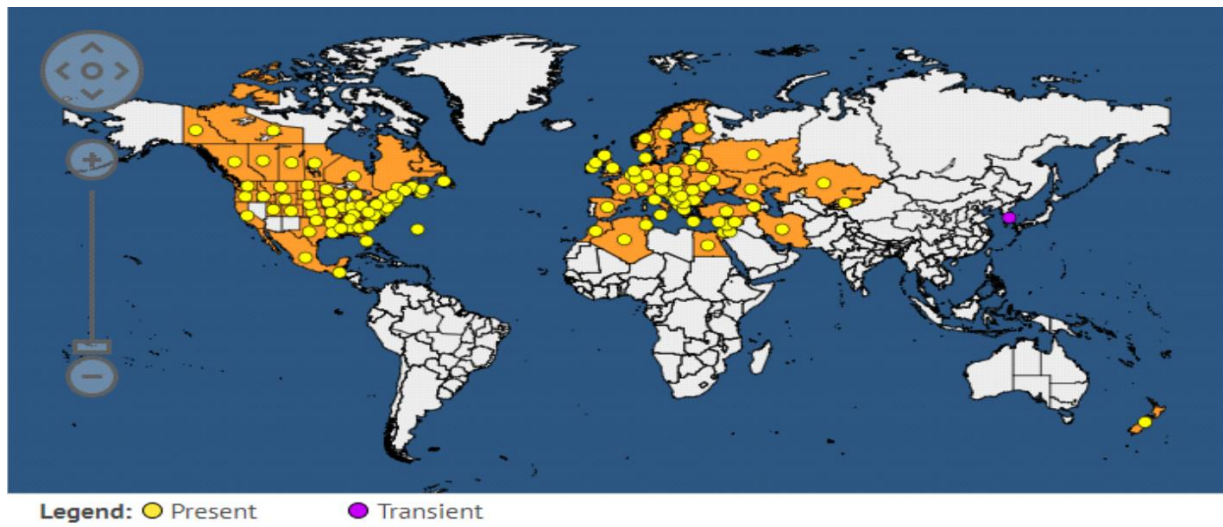


Figure 04 : Carte géographique de la répartition mondiale de la maladie de feu bactérien (OEPP, 2017)

Tableau 01 : Plantes hôtes de la bactérie *Erwinia amylovora* agent causal de la maladie de feu bactérien (OEPP, 2011)

	Noms latins	Noms français
Fruits à pépins	<i>Malus</i>	Pommier (y compris pommier d'ornement)
	<i>Pyrus</i>	Poirier (y compris poirier d'ornement et nashi)
	<i>Cydonia</i>	Cognassier
Arbustes d'ornement	<i>Chaenomeles</i>	Cognassier du Japon
	<i>Cotoneaster</i>	Cotonéaster
	<i>Pyracantha</i>	Pyracanthé ou buisson ardent
	<i>Mespilus</i>	Néflier d'Allemagne
	<i>Eriobotrya japonica</i>	Néflier du Japon
	<i>Photinia ou Stranvaesia</i>	<i>Stranvaesia</i>
Arbustes sauvages	<i>Crataegus</i>	Aubépine
	<i>Sorbus</i>	Alisier et sorbier
	<i>Amelanchier</i>	Amélanchier

II.3. Symptômes

Les principaux symptômes de feu bactérien selon Giraud *et al* (2006) sont :

- **Nécroses et noircissement** des organes atteints : fleurs, bouquets floraux, fruits, pousses, branches. Ils restent fixés sur l'arbre. Les jeunes fruits se momifient (fig 05, 06).
- **Flétrissement, dessèchement** des jeunes pousses avec un éventuel recourbement en crosse (symptômes caractéristiques) (fig 07).
- **Production d'exsudat** sur les pédoncules floraux, les fruits ou les rameaux atteints : gouttelettes d'un liquide blanc ou jaunâtre puis ambré, collant (fig 08).
- **Coloration rouge brune des tissus** situés immédiatement sous l'écorce de la zone proche de la nécrose.
- **Progression de la nécrose** vers des organes âgés et formation de chancres de la périphérie vers la base de la plante (fig 09), plus rapide chez le poirier que chez le pommier.

Brûlure des bords floraux

Les symptômes de cette phase du feu bactérien apparaissent généralement dans une ou deux semaines après la floraison (Douglas, 2003). Les fleurs infectées deviennent initialement imprégnées d'eau et d'un vert plus foncé (Vanneste, 2008), puis commencent à se faner, à se ratatiner et à brunir ou à noircir (Anonyme, 2008).

Brûlure des branches et du tronc

Les pertes les plus lourdes qu'entraînent les infections par la brûlure de la fleur et la brûlure des pousses se produisent lorsque la maladie progresse à l'intérieur du vieux bois (Anonyme, 2008), Ce sont des zones fortement déprimées de l'écorce, décolorée sur les troncs et les grands membres. Ces chancres sont habituellement faciles à reconnaître et fournissent une source majeure d'inoculum au printemps et se retrouvent sur de petites brindilles ou des membres où des infections se sont produites (Douglas, 2003).



Figure 05 : Fleurs infectées, finissent par se flétrir, se ratatiner et brunir ou noircir (Momol, 2000)

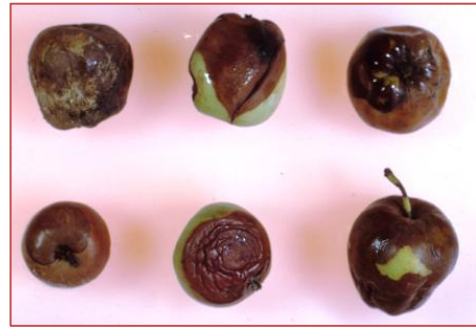


Figure 06 : Fruits de pommier infectés par le feu bactérien (Anonyme, 2006)



Figure 07 : Pousses gravement infectées par le feu bactérien (Ward Gauthier, 2002)



Figure 08 : Suintement bactérien (exsudat) sur un fruit de pomme (Nelson, 2015)



Figure 09 : Chancre de feu bactérien présentant un pourtour rugueux sur une branche (Celetti, 2015)

II.4. Cycle de vie de la maladie

Le feu bactérien est une maladie complexe qui passe tout son cycle en étroite association avec la plante hôte, où elle peut infecter les fruits, les feuilles, les pousses et les tissus de fleurs. Les parties de plantes infectées provoqueront, dans tous les cas, des exsudats collants composés de bactéries viables dans une matrice de polysaccharides, formés sur les parties de la plante détériorées (Doolotkeldieva et Bobusheva, 2016).

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

La principale voie d'infection d'*E.amylovora* est à travers les fleurs. La bactérie se dissémine à partir de lésions actives via des insectes pollinisateurs pendant la période de floraison, ou grâce à des phénomènes physiques. L'agent pathogène peut également envahir les tissus de la plante à travers les ouvertures naturelles (stomates) ou des plaies (Kamber, 2013) causées par le vent, insectes, grêle ou activité agricole en période de floraison ou de croissance des pousses.

Une fois dans l'apoplaste, elle se multiplie préférentiellement dans les tissus jeunes en croissance, ce qui peut se traduire par l'apparition à leur surface de gouttelettes d'exsudats. Cet exsudat permet une rapide dissémination de la maladie. Les tissus atteints se nécrosent, les rameaux et les feuilles flétrissent et se dessèchent. La bactérie peut envahir l'ensemble de la plante en se multipliant dans les espaces intercellulaires du parenchyme cortical mais elle peut aussi atteindre les vaisseaux du xylème où elle se déplace contre le flux ascendant de la sève (Bogs *et al.*, 1998).

L'hôte tente de limiter la propagation de l'infection en scellant les tissus infectés par déposition de plusieurs couches de liège dans le cortex, conduisant à la formation de chancres sur les branches ou le tronc, dans lesquels la bactérie peut se conserver pendant la période de repos végétatif ou l'hiver. Elle reprend sa multiplication au printemps suivant (Eden Green et Billing, 1974).

Le cycle épidémiologique (fig 10) est caractérisé par deux phases d'inoculation : primaire et secondaires, permettant à la bactérie de suivre un processus de contamination et des mouvements systémiques lors de son cycle infectieux (Arnaud, 2014).

Sources de l'inoculum primaire

Les bactéries peuvent survivre l'hiver dans les tissus vivants de l'écorce, près des chancres qui servent d'inoculum pour le printemps suivant, qui, infectés, produisent un exsudat composé de bactéries viables. La dispersion s'effectue alors en direction des fleurs ouvertes (Thomson, 2000 ; Philion, 2014). D'autres sources peuvent être responsables de l'infection primaire comme la pluie, par le biais d'éclaboussures depuis l'exsudat vers les fleurs, les feuilles, ou éventuellement les apex (Thomson, 2000). Les plantes réservoirs jouent également un rôle de réserve d'inoculum de la bactérie pendant l'hiver.

Inoculum secondaire

Quand le stade de débourrement des pommiers intervient, la population résidente sur les chancres augmente graduellement, et ce jusqu'à la floraison, période avant laquelle il y a peu de risque d'infection des arbres. Les bactéries peuvent alors être disséminées dans le verger, voire dans les vergers alentours (Van der Zwet et Keil, 1979 ; Thomson, 2000 ; Philion, 2014).

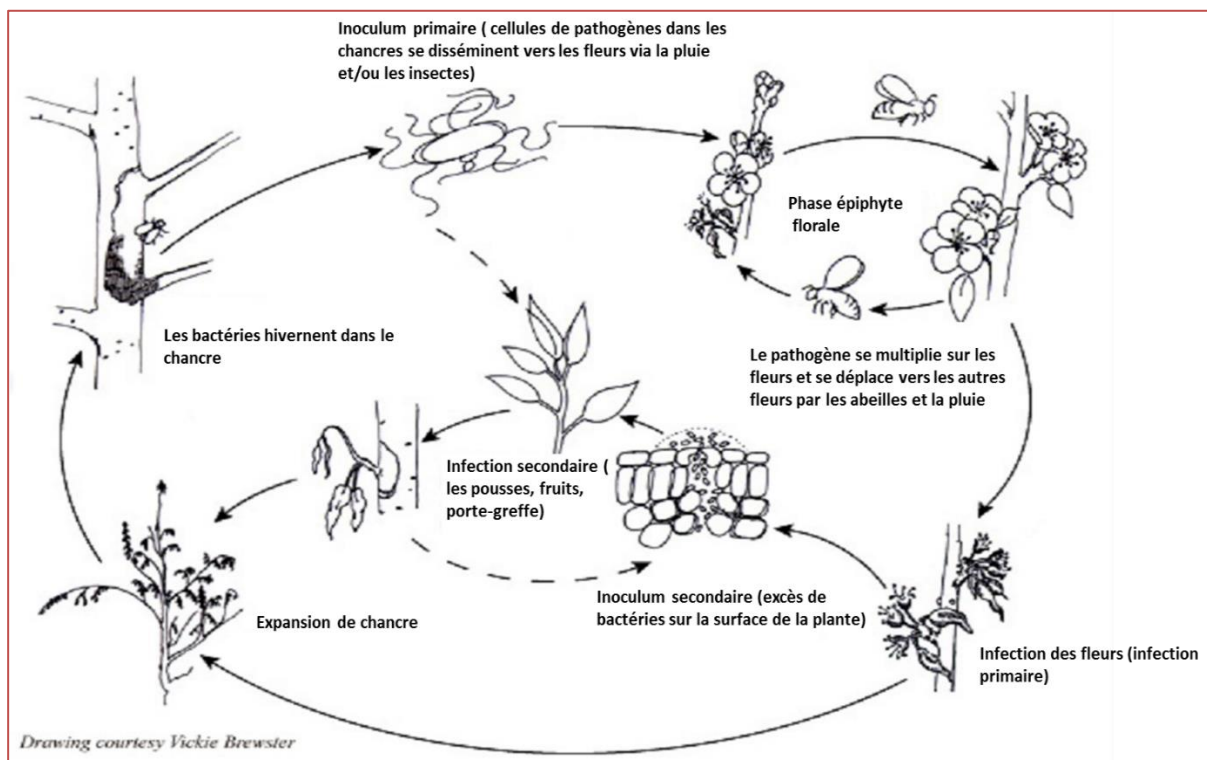


Figure 10 : Le cycle épidémiologique du feu bactérien, causé par la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora*, sur les pommes et les poires (Johnson, 2000) (modifié)

II.5. 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).

Le feu bactérien se développe pendant les températures chaudes et l'humidité élevée, entre environ 15°C et 26°C, et une humidité relative supérieure à 60% avec de l'humidité libre provenant de la rosée, du brouillard, de la pluie ou de l'irrigation (Olsen, 2011).

II.6. Gestion de la maladie

Les méthodes de lutte actuelles contre le feu bactérien sont diverses mais chacune d'elle reste d'une efficacité limitée (Van der Zwet et Bill, 1995).

II.6.1. Lutte préventive et culturale

Il est possible de réduire la dispersion de la maladie en appliquant de bonnes mesures culturales (Vanneste, 2008) :

Suppression des sources primaires d'inoculum par la taille pendant la saison dormante éliminera une importante quantité d'inoculum primaire. Il est particulièrement important de reconnaître et d'enlever les petits chancres jeunes. Des arbres entiers ou de grandes branches devraient être retirés du verger (Koski et Jacobi, 2014).

Choix de variétés résistantes ; toutes les variétés de pommiers, poiriers et cognassiers ne sont pas pareillement sensibles au feu bactérien. Par contre, il ne semble pas y avoir de variétés absolument résistantes. La sélection de variétés plus tolérantes peut néanmoins diminuer le risque (Morel, 2008).

En outre, il est préférable d'associer un cultivar qui soit le moins sensible possible avec un porte-greffe résistant afin de réduire au maximum les risques de feu bactérien (Philion, 2014).

II.6.2. Lutte chimique

Le contrôle chimique du feu bactérien est très peu efficace dans les plantes affectées, car il est seulement possible de l'utiliser pour éviter de manière préventive la diffusion de la maladie (Ruz Estivez, 2003). Les pulvérisateurs chimiques sont des traitements préventifs doivent être appliqués avant le début des symptômes du feu bactérien. Les pulvérisations ont

peu d'effet après le début des symptômes (Olsen, 2011). Parmi les composés chimiques, seuls les antibiotiques (streptomycine, oxytétracycline, kasugamycine et flumequine) et les dérivés de cuivre (sulfate de cuivre, l'oxychlorure de cuivre et hydroxyde de cuivre) ont montré une certaine efficacité dans le contrôle de la maladie (Ruz Estivez, 2003). Ces produits agissent au niveau de l'interaction hôte-pathogène, en modifiant la physiologie de l'hôte ou en induisant une résistance systémique. Certains d'entre eux montrent une activité antimicrobienne directe faible, tandis que d'autres ne l'ont pas (waard *et al.*, 1993).

II.6.3. Lutte génétique

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. Elles consistent à faire produire à la plante des substances antibactériennes (Mourgues *et al.*, 1998), des substances inhibitrices de facteurs du pouvoir pathogène, des réactions de défense surexprimées (Malnoy *et al.*, 2005).

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 (Cesbron, 2009).

II.6.4. Lutte biologique

La définition de la lutte biologique donnée par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique) implique une notion importante d'équilibre. À l'inverse des méthodes chimiques, la lutte biologique ne vise pas nécessairement l'éradication de l'organisme nuisible, mais son maintien à une densité raisonnable. Ainsi, elle respecte mieux les écosystèmes (Calatayud, 2013).

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)

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 *Pseudomonas agglomerans* et *Bacillus subtilis* et des levures (Pusey *et al.*, 2009), Blossom Protect est une combinaison de deux souches d'*Aureobasidium pullulans*, une levure qui se produit naturellement dans les fleurs de fruits du Pacifique Nord-Ouest. Cet organisme se développe sur le nectar et le stigmate des fleurs traitées, et rivalise avec le pathogène du feu bactérien pour la ressource nutritionnelle disponible sur ces surfaces (Smith, 2016).

II.6.5. Lutte intégrée

Selon l'Union Européenne, la lutte intégrée est « l'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques, culturelles ou intéressant la sélection des végétaux, dans laquelle l'emploi de produits phytopharmaceutiques est limité au strict nécessaire pour maintenir la présence des organismes nuisibles en dessous de seuil à partir duquel apparaissent des dommages ou une perte économiquement inacceptables » (Plaideau, 2013).

Les méthodes de lutte actuelles contre le feu bactérien sont diverses mais chacune d'elle reste d'une efficacité limitée. La gestion efficace du feu bactérien nécessite une approche intégrée de plusieurs pratiques qui visent à réduire la quantité d'inoculum, et à imposer des obstacles à l'établissement de l'agent pathogène sur l'hôte, et pour réduire la sensibilité de l'hôte aux infections (Van der Zwet et Beer, 1995). Un tel programme devrait comprendre une taille diligente des chancres en hiver ; une taille durant la saison de croissance pour éliminer les symptômes dès leur apparition ; la mise en œuvre d'un programme de nutrition équilibré ; le recours à des modèles de prévision pour déterminer le meilleur moment pour l'application des produits de lutte restreignant la dissémination de la maladie (Anonyme, 2006).



CHAPITRE II
Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

II. Présentation de la région d'étude

II.1. Répartition géographique

La wilaya de Tizi-Ouzou est située sur le littoral centre Est de l'Algérie et s'étend sur une superficie de 2.958 Km².

Elle est limitée au Sud par la wilaya de Bouira, à l'Est par Bejaia, à l'Ouest par Boumerdes et ouvre au Nord sur la Mer Méditerranée par 85 Km de côtes (fig 11).



Figure 11 : Carte géographique de la wilaya de Tizi Ouzou (Google,2017)

II.2. Climat

Bagnouls et Gaussen (1953), considèrent qu'un mois est sec, quand le total mensuel des précipitations (P) exprimé en millimètres est inférieur ou égal au double de la température moyenne (T) de ce même mois exprimé en degrés Celsius. Le climat est sec quand la courbe des températures monte au-dessus de celle des précipitations. Il est humide dans le cas contraire.

Ce diagramme (fig12) nous renseigne la présence de deux périodes. Une période humide qui commence du janvier jusqu'à Mai et du septembre jusqu'à mi-décembre. Tandis que les autres mois de l'année représentent la période sèche.

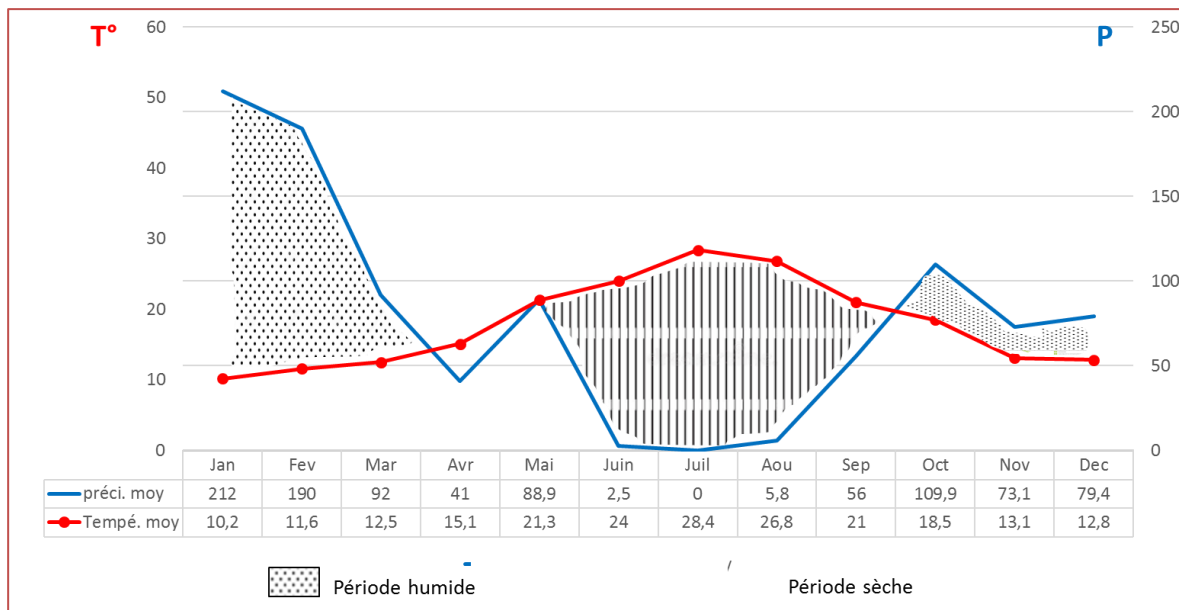


Figure 12 : diagramme Ombrothermique du GAUSSEN de la région de Tizi-Ouzou (ONM, 2012)

II.3. Climagramme d'Emberger

Le diagramme d'Emberger permet de définir un quotient pluviothermique. Selon Stewart (1969) le quotient pluviothermique est calculé par la formule suivante :

$$Q = 3.43 \times \frac{P}{M - m}$$

Q est le quotient pluviothermique d'Emberger.

P est la somme des précipitations annuelles exprimée en mm.

M est la moyenne des températures maxima du mois le plus chaud en °C.

m est la moyenne des températures minima du mois le plus froid en °C. Le Quotient pluviométrique (Q) d'Emberger pour Tizi-Ouzou et pour une période de 11 ans

$$Q_2 = 108,86$$

Ces données permettent de classer la région de Tizi-Ouzou dans l'étage bioclimatique subhumide à hiver tempéré (fig 13).

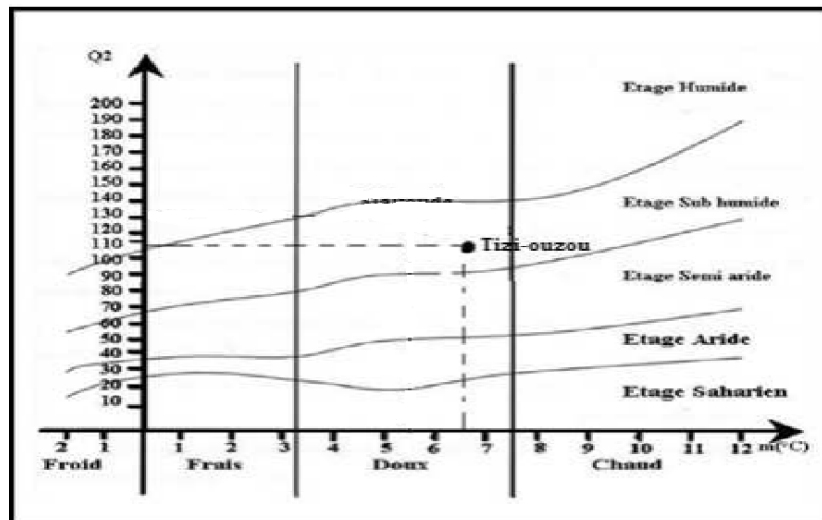


Figure 13 : Situation de la région de Tizi-Ouzou dans le Climagramme d'Emberger (Sbargoud, 2009).

II.4. Stations d'étude

Après prospections au préalable, l'étude a porté sur un prélèvement des échantillons de poirier et de pommier symptomatiques (présentent les symptômes de la maladie de feu bactérien) à partir des 05 vergers (tableau 02), situés dans 03 communes dans la région de Tizi Ouzou (Tadmait, Draâ ben Khedda, Oued falli, Tassadorte). Au total 05 sorties ont été effectuées sur une période de 01 mois (mois de Juin).

Tableau 02 : Lieux et dates d'échantillonnage.

Lieu de verger	Date d'échantillonnage	plante hôte
Tadmait	04 juin 2017	Poirier
Draâ Ben Khedda (1)	13 juin 2017	Pommier
Draâ Ben Khedda (2)	15 juin 2017	Poirier
Oued Falli	18 juin 2017	Poirier
Tassadorte	19 juin 2017	Poirier

II.4.1. Tadmait

Un verger symptomatique de poirier variété Santa Maria qui s'étend sur une superficie d'environ 08 ha. Située à l'Est de la région de Tizi Ouzou, un échantillonnage a été effectué le 04 juin 2017 (fig14).



Figure 14 : Image satellite du verger de poirier de Tadmaït (Google Earth, 2016)

II.4.2. Draâ Ben Khedda

Deux vergers symptomatiques ont été visités, un verger de pommier variété Royal Gala (le 13 juin 2017), et un autre de poirier variété Santa Maria (15 juin 2017) qui s'étalent sur des superficies respectives de 03 ha, et de 09 ha (fig15).



Figure 15 : Image satellite du verger de pommier (A), et de poirier (B), de la région de Draâ Ben Khedda, (Google Earth, 2016)

II.4.3. Tizi Ouzou

Deux vergers de poiriers échantillonnés (respectivement le 18 et le 19 juin 2017) à la commune de Tizi Ouzou situés dans deux régions différentes de la variété Santa Maria, l'un dans la région d'Oued Falli, sa superficie est 6 ha, et l'autre dans la région de Tassadorte avec une superficie de 5ha.



Figure16 : Situation géographique du verger d'Oued Falli (A) et Tassadorte (B), (Google Earth, 2016)

II.5. Prélèvement des échantillons sur terrain

L'échantillonnage a été effectué aléatoirement sur des arbres de poirier et de pommier présentant des symptômes typiques à ceux du feu bactérien : dessèchement et noircissement des jeunes pousses, des bouquets floraux et des jeunes fruits, recourbement des extrémités des tiges, des feuilles et des fruits brûlés qui restent momifiés et fixés sur les rameaux, des chancres au niveau des rameaux et sur l'écorce (Giraud *et al.*, 2006).

Dans chaque verger, plusieurs prélèvements ont été effectués à partir de plusieurs organes de la plante (feuilles, fleurs, fruits, rameaux, inflorescences) à l'aide d'un sécateur désinfecté par l'alcool à 70° préalablement et après chaque prélèvement.

Le matériel végétal obtenue est donc mis dans des sacs de congélation fermés et étiquetés (date, commune, code de verger ...). Un total de cinq échantillons représentatifs ont été emmenés pour le diagnostic au laboratoire du département d'agronomie de l'université de Bouira.

Dans notre travail, nous avons suivis le protocole de diagnostic d'*Erwinia amylovora* décrit par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (EPPO, 2013).

II.6. Traitement des échantillons au laboratoire

II.6.1. Isolement

Le matériel végétal symptomatique est flambé puis découpé en petits morceaux à l'aide d'un scalpel stérile. Les fragments obtenus sont récupérés par la suite dans un mortier stérile pour les macérer en additionnant une quantité d'eau distillée stérile pendant 20 à 30 minutes de macération, afin de libérer les bactéries des tissus végétaux.

À l'aide d'une micro-pipette, Une quantité d'environ 100µl de macérât obtenu est mis sur les boîte de Pétri contenant le milieu levane, puis étalé par une anse sur toute la surface de la boîte, trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon.

Les boîtes de cultureensemencées sont incubées à 27 C° pendant 24 à 48 heures.

Milieu de culture

Le milieu levane conseillé lorsque les échantillons ne sont pas dans les conditions optimales pour l'analyse : suspicion de faible contamination, présence importante de saprophytes (Klos et Ishimaru, 1984).

II.6.2. Purification

Après incubation de trois à cinq jours à 27°C, nous avons procédé à l'identification macromorphologique des colonies. Les colonies qui se rapprochent le plus des caractéristiques culturelles d'*Erwinia amylovora* sont purifiées et re-purifiées dans le milieu levane.

Les isolats obtenus ont fait l'objet d'une série de tests biochimiques avec un témoin négatif (des tubes à essai non ensemencés) ; et un témoin positif (souche de référence *Erwinia amylovora* fournie par l'INRA de Tunis) et un témoin négatif (infiltration de l'eau distillés stérile) pour le test biologique.

II.7. Tests d'identification de l'agent pathogène

II.7.1. Tests biochimiques

II.7.1.1. Test de Gram

Le présent test vise à déterminer si la bactérie est gram positif ou négatif. Une colonie bactérienne de 24 à 48 heures est mélangée à une goutte de solution de KOH (3%) préalablement déposée sur une lame de microscope. Le gram est considéré comme négatif s'il

il y a formation de filament en soulevant l'anse. En cas d'absence de filaments, le gram est positif (Suslow *et al.*, 1982).

II.7.1.2. Test de mise en évidence de l'activité cytochrome C oxydase

Une goutte d'une solution N,N, diméthyle paraphénylène diamine, préparée extemporanément est déposée sur du papier buvard. Par la suite, une émulsion immédiate d'une anse de la culture bactérienne est faite sur le buvard imbibé. L'apparition d'une coloration rose violacée atteste de l'activité de cytochrome C oxydase. Le test est négatif en l'absence de coloration (Klement *et al.*, 1990).

II.7.1.3. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose

Une colonie (âgée de 24 à 72 heures) est prélevée à l'aide d'un fil de platine stérile à la flamme, puis ensemencée dans deux tubes gélosés contenant le milieu Hugh et Leifson par piqure centrale. Un des deux tubes est mis en conditions d'anaérobiose en ajoutant une couche d'environ 1cm d'huile de vaseline stérile à la surface du tube. Incubé pendant 48 à 72 heures à la température de 25°C (+/-3°C) (Hugh et Leifson, 1953).

- Lorsque les deux tubes virent au jaune, la bactérie est dite « fermentative ».
- La bactérie « oxydative » du glucose n'acidifie pas le tube en anaérobiose (absence de changement de couleur), alors qu'une acidification débute à la surface du tube en aérobiose (couleur jaune).

II.7.1.4. Test d'utilisation du citrate

Une colonie (âgée de 24 à 72 heures) est prélevée au moyen d'une anse stérilisée à la flamme. Et ensemencée sur la pente gélosée contenant le milieu citrate de Simmons et incubée à la température optimale de croissance de la bactérie (25°C +/- 3°C). Les bactérie « citrate-positives » poussent sur le milieu de Simmons en provoquant une alcalinisation du milieu (virage au bleu de la coloration du tube). Les bactéries « citrate-négatives » ne croissent pas sur le milieu (Schaad *et al.*, 2001).

II.7.1.5. Test d'utilisation d'indole

Un tube de milieu d'indole est ensemencé à l'aide d'une culture jeune, et incubé pendant 24 à 48 heures à 25°C (+/- 3°C). 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs sont ajoutées par la suite. La réaction positive se caractérise par la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du milieu. Le test est négatif en l'absence de coloration (Frenev *et al.*, 1992).

II.7.1.6. Test de catalase

Le test de catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'oxygène (H₂O₂). Sur une lame en verre stérile, une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les isolats bactériens âgés de 24 heures sont déposés dans la solution de peroxyde d'hydrogène à l'aide d'une anse àensemencer en plastique stérile. Après 2 minutes, la présence de bulles révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive (Dickey et Zumoff, 1988).

II.7.1.7. Test de fluorescence sur King B

Une colonie bactérienne âgée de 24 à 72 heures est prélevée et ensemencée en stries sur une boîte de pétri contenant du milieu KB. Incubée pendant 48 heures à 25°C, l'éventuelle fluorescence est révélée en éclairant la boîte avec la lampe à UV dans une pièce noire. Le test est positif si apparition de fluorescence allant du vert au bleu. Il est négatif en l'absence de fluorescence (Schaad *et al.*, 2001).

II.7.2. Test Biologique

II.7.2.1. Test d'hypersensibilité sur tabac (HR)

Le test d'hypersensibilité sur tabac (*Nicotiana tabacum*) permet de mettre en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par nécrose des zones d'inoculation (Jones et Geider, 2001).

Ce test est réalisé par une infiltration sous épidermique d'une suspension bactérienne dense à environ 10⁷ ufc/ml d'une culture jeune (24 à 48 heures) d'une jeune feuille de tabac à l'aide d'une seringue. Le test considéré positif s'il apparaît après deux à cinq jours, une plage nécrotique correspondant à la zone infiltrée. Le test est négatif si aucune réaction n'est observée (Schaad *et al.*, 2001).

Ce test a été réalisé au laboratoire de phytobactériologie à l'université de Blida1.



CHAPITRE III
Résultats et Interprétations

Chapitre III : Résultats et Interprétations

La période des prélèvements des échantillons à partir de 05 vergers symptomatiques (04 vergers de poiriers et 01 verger de pommier) situés dans la région de Tizi Ouzou, est effectuée durant le mois de juin.

Au total 15 échantillons ont été collectés, et diagnostiqués au niveau de laboratoire d'agronomie de l'université Akli Mohand Oulhadj de Bouira.

III.1. Observation des symptômes sur terrain

Tous les vergers visités montrent les symptômes de la maladie de feu bactérien : des chancres sur le tronc et les rameaux, des nécroses et noircissement des fleurs, bouquets floraux, fruits, pousses, branches, avec des jeunes fruits momifiés qui restent fixés sur les branches, des arbres brûlés entièrement et morts (fig :17,18,19).



Figure 17 : Chancres sur les tronc et rameaux des quelque arbres des vergers de poirier.

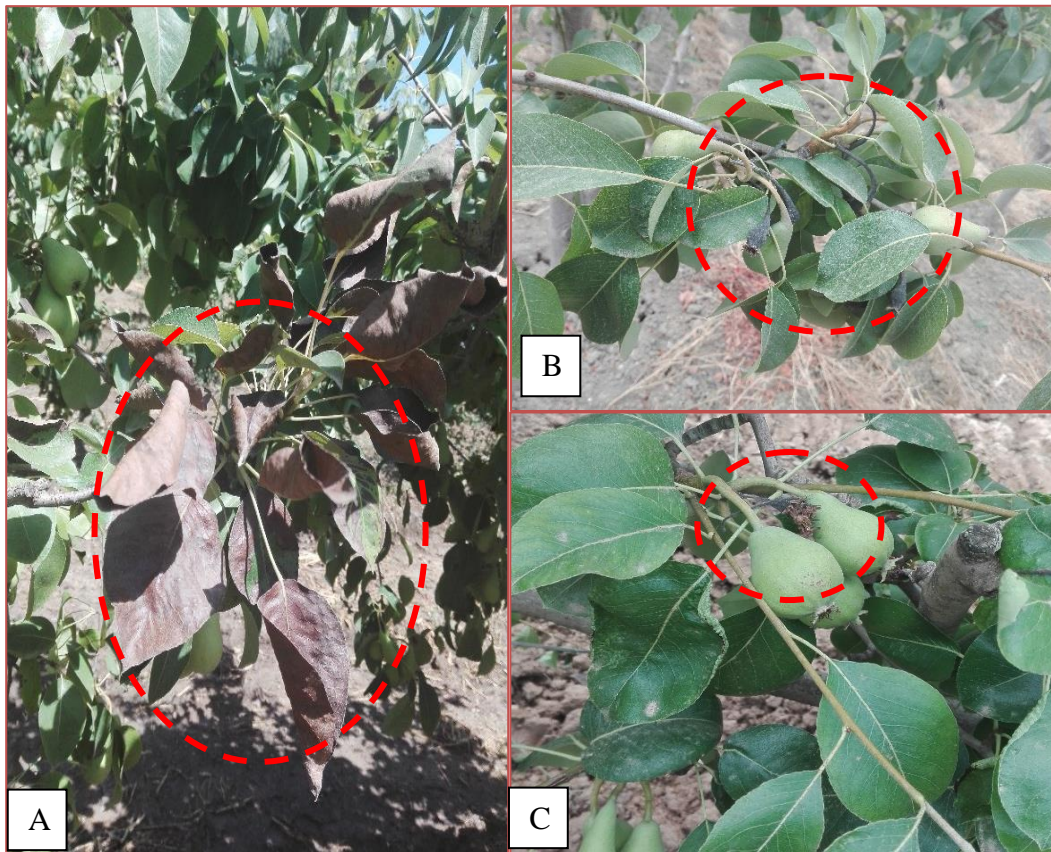


Figure 18 : Symptômes de la maladie de feu bactérien sur des arbres de poirier : (A) brulure des feuilles et des jeunes pousses ; (B) brulures des jeunes fruits ; (C) brulures des bouquets floraux.



Figure 19 : Noircissement des rameaux avec des fruits brulés et momifiés de l'année précédente.

III.2. Résultats du diagnostic au laboratoire

Isolement et obtention des isolats bactériens

A partir des échantillons prélevés (bouquets floraux, feuilles, fruits, rameaux...) nous avons pu isoler et purifier sur le milieu de culture levane un totale de 38 isolats bactériens.

Descriptions morphologiques des isolats

Les colonies bactériennes obtenues présentent une morphologie typique aux colonies d'*Erwinia amylovora* sur milieu levane, sont typiquement blanchâtres, luisantes, mucoïdes avec des stries radiales et un centre flocculant dense ou un cycle central après 2 ou 3 jours à 27°C (Paulin, 2000) (fig : 20), et il y a des colonies qui présentent d'autres caractères : couleurs jaunâtre orangé, circulaire élevés, luisantes (fig : 21).

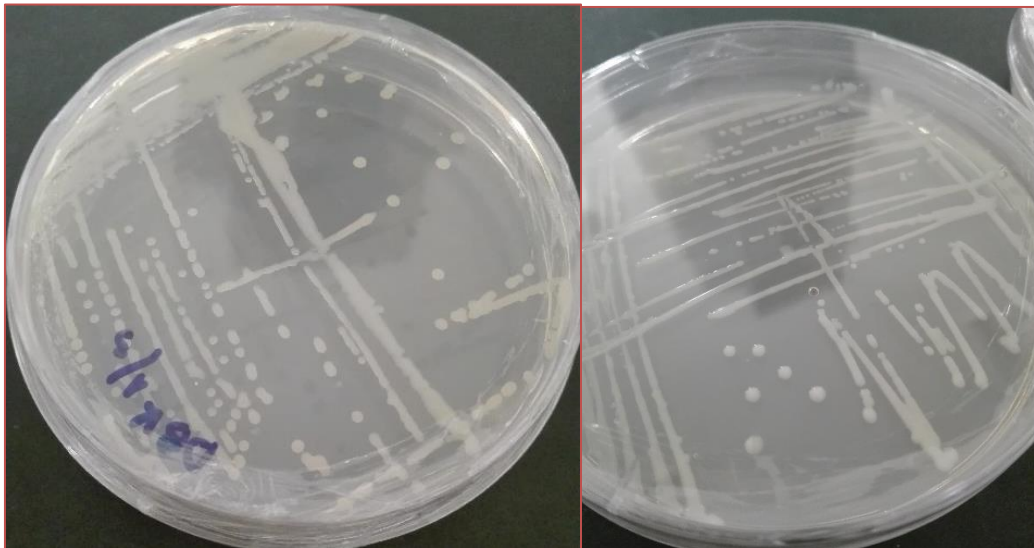


Figure 20 : Structure des colonies isolées sur milieu levane.



► **Figure 21** : Colonies isolées à d'autre critères.

Dans ce travail nous avons utilisé les colonies d'isolats obtenues pour effectuer une série de tests biochimique et biologique afin d'identifier la bactérie *Erwinia amylovora*.

III.3. Résultats des tests d'identifications biochimiques

III.3.1. Test de Gram

Les résultats de ce test montrent que 26 isolats se sont montrés à gram négatif. Les bactéries prennent une forme de filament mucoïde sur une lame comme le confirme les observations faites par Suslow *et al.*, (1982). Ce dernier confirme que les bactéries à gram négatif provoquent une augmentation de la viscosité du **KOH**. Ce procédé utilise la destruction rapide de la paroi cellulaire des bactéries à gram négatif dans une solution alcaline, libérant l'acide désoxyribonucléique, ce qui provoque la viscosité de la solution (Suslow *et al.*, 1982) (fig 22).

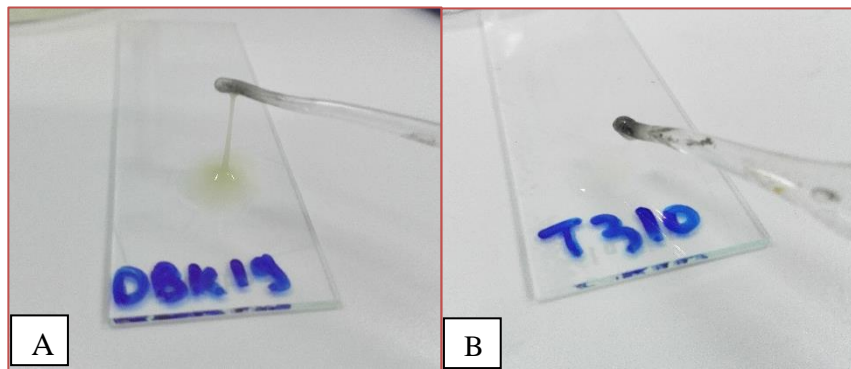
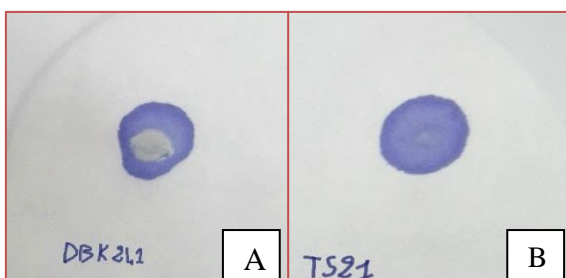


Figure 22 : Résultats du test de Gram. (A) : Bactérie à gram négatif / (B) : Bactérie à gram positif

III.3.2. Test de mise en évidence de l'activité cytochrome oxydase

22 isolats ont présenté une réaction négative (absence de coloration violette) ce qui montre l'absence de l'activité cytochrome Coxydase, tandis que 17 isolats ont montré une réaction positive (fig 23). Cette enzyme est capable d'oxyder le réactif : **N diméthyl paraphénylène diamine** (Klement *et al.*, 1990).



► **Figure 23** : Résultats du test d'oxydase : (A) réaction négative ; (B) réaction positive.

III.3.3. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose

La distinction pratique entre l'oxydation et la fermentation des hydrates de carbone repose sur le rôle joué par l'oxygène atmosphérique (Hugh et Leifson, 1953).

Les résultats du test d'oxydation /fermentation montrent que tous les tubes testés, des différents isolats, soumis aux conditions d'aérobioses et d'anaérobioses changent tous de couleurs du bleu vers le jaune (Fig 24). Ceci montre que toutes les souches présentent métabolisme oxydatif et fermentatif du glucose (Hugh et Leifson, 1953)

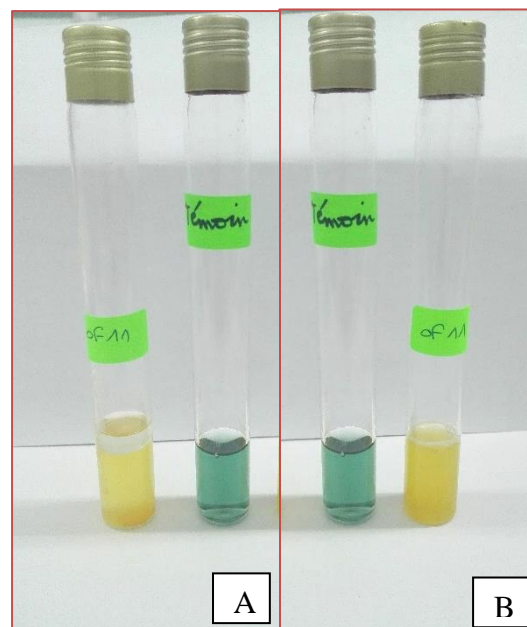


Figure 24 : Résultat positif du test d'oxydation/fermentation, (A) : Tube anaérobie (présence d'une couche d'huile de vaseline) ; (B) : Tube aérobie.

III.3.4. Test d'utilisation du citrate

La plupart des isolats (26 isolats) de ce test ont développé des réactions positives. Les autres isolats (12 isolats) peuvent être considérés comme des bactéries citrate négatives (fig 25). Ce test est utilisé pour déterminer la capacité des bactéries à utiliser le citrate comme seule source de carbone. Les bactéries citrate-positives poussent sur le milieu de Simmons en provoquant une alcalinisation du milieu (virage au bleu de la coloration du tube). Les bactéries citrate-négatives ne croissent pas sur ce milieu.

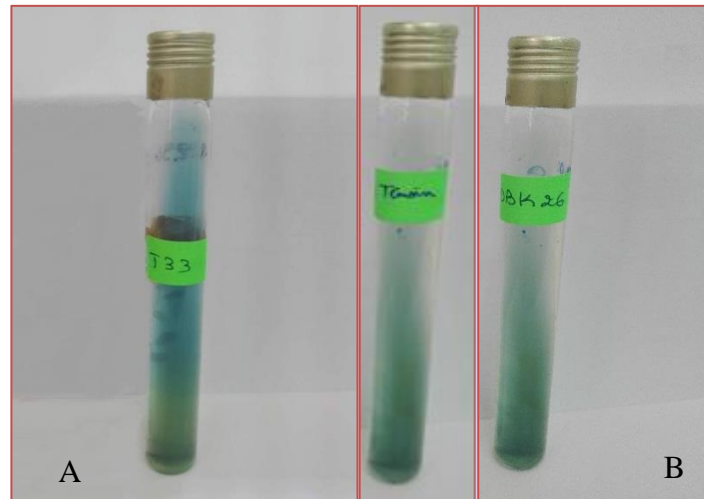


Figure 25 : Résultat du test de citrate : (A) virage de couleur de milieu vers le bleu (test positif) ; (B) test négatif

III.3.5. Test d'utilisation d'indole

Le test d'indole sert à déterminer si la bactérie produit de l'indole à partir de tryptophane (un acide aminé). Il est mis en évidence grâce à la formation d'un anneau rouge vermillon à la surface du milieu urée-indole, caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs.

Un total de 11 souches ont présenté une réaction positive en utilisant le réactif de Kovacs, et ont formé un anneau rouge, se traduisant par l'absence d'enzyme de l'hydrolyse du tryptophane, la tryptophanase. Tandis que 27 souches ont présenté une réaction négative (fig 26).

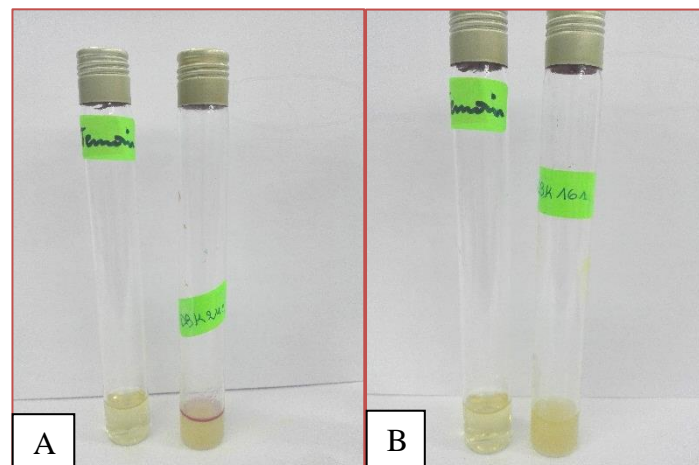


Figure 26 : Résultats du test d'utilisation d'indole : (A) formation d'un anneau rouge (production de l'indole) ; (B) test négatif (pas de formation d'indole).

III.3.6. Test de catalase

Le test de catalase est positif pour la plupart des isolats (29 isolats, dites catalase + et 09 isolats catalase -), les bactéries catalase positives peuvent dissocier le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (Hart et Shears, 1999) en formant des bulles grâce à l'enzyme de catalase, les bactéries catalase négatives ne possèdent pas l'enzyme de catalase (fig 27).

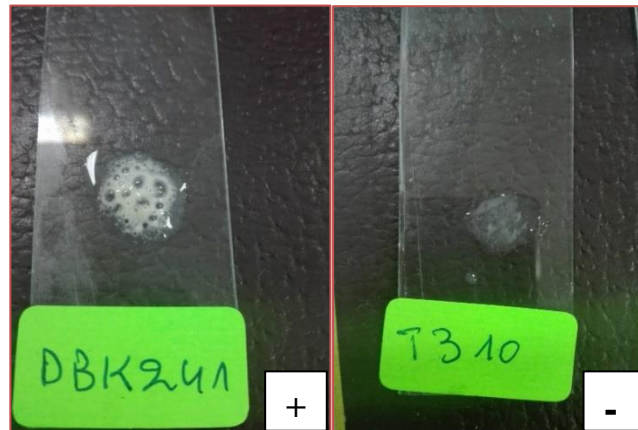


Figure 27 : Résultats du test de catalase.

III.1.3.7. Test de fluorescence sur King B

Tous les isolats n'ont pas révélé l'éventuelle fluorescence en éclairant les boîtes avec la lampe à UV allant du vert au bleu (fig 28). Le test est considéré donc négatif pour toutes les souches sélectionnées.



Figure 28 : Bactérie émettant une fluorescence verte sous la lumière UV

III.1.4. Test d'identification biologique

III.1.4.1. Test d'hypersensibilité sur tabac (HR)

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

19 souches ont montré une réaction positives sur les souches choisis à l'exception de la souche TS121, les résultats positifs ont été obtenus sous forme d'une plage nécrotique sur les feuilles du tabac (fig 29), au niveau de la zone infiltrée, ce qui confirme que ces souches sont pathogènes.

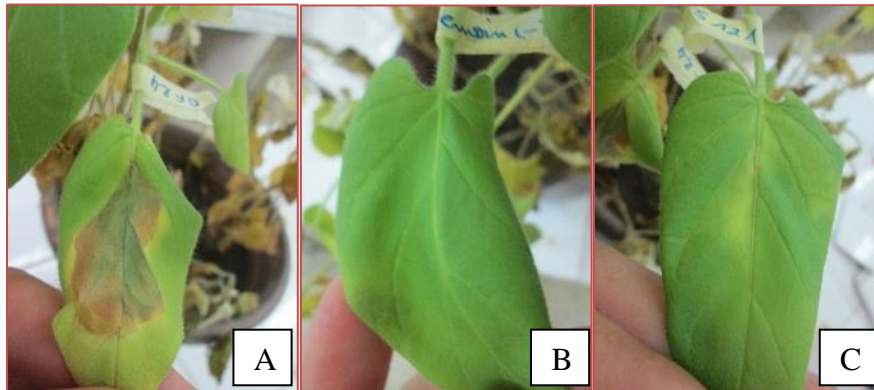


Figure 29 : Résultats du test d'hypersensibilité sur tabac : (A) apparition d'une plage nécrotique, (B) témoin négatif, (C) résultat négatif.

Tous les résultats des tests d'identification biochimiques et du test biologique obtenus sont récapitulés dans le tableau 03.

CHAPITRE IV

Discussion

Chapitre IV : Discussion

Nous avons choisi la région de Tizi Ouzou pour effectuer cette étude qui consiste à l'identification de la bactérie *Erwinia amylovora*, qui est l'agent causal de la maladie du feu bactérien.

Les vergers de pommiers et de poiriers dans la wilaya de Tizi-Ouzou sont, actuellement, exposés à la menace réelle d'attaque par le feu bactérien, l'une des plus dangereuses maladies de ces espèces arboricoles, provoquée par la bactérie *Erwinia amylovora* (Anonyme, 2011).

A cet effet, nous avons effectué des sorties sur 03 communes différentes de la région de Tizi Ouzou (à savoir Tadmaït, Draâ ben khedda et Tizi Ouzou), durant la période du mois de juin 2017 afin de prélever des échantillons pour analyses.

Cinq vergers de poiriers et de pommiers ont été étudiés lors de notre prospection dans la région. Le diagnostic visuel de ces vergers montre la présence de symptômes de la maladie de feu bactérien : Chancres sur le tronc et les rameaux, noircissement des rameaux, brûlures des feuilles, des fruits et des bords floraux. La sévérité de ces symptômes diffère d'un verger à un autre.

En effet, les symptômes les plus sévères ont été repérés sur les vergers de Tassadorte car aucune mesure culturale ou bien une approche phytosanitaire n'a été pratiquée. Un grand nombre d'arbres sont brûlés, d'autres portent des feuilles et des fruits brûlés et momifiés de l'année en cours et même de l'année précédente et qui n'ont pas été arrachés. Aucune taille des rameaux et branches infectés n'a été effectuée. Le verger de poirier de Tadmaït est pareillement infecté par la maladie, tous les arbres sont très âgés (plus de 20 ans) dont la quasi-totalité contient des chancres et des blessures sur les troncs et ne sont toujours pas éliminés. L'endurance des arbres aux maladies est en fonction de leurs caractéristiques, l'âge est un facteur important qui augmente la sensibilité aux attaques des maladies (Jullien, 2014 ; Rosenberger, 2003).

Les vergers de poiriers de Draâ Ben Khedda et d'Oued Falli sont également infectés par cette maladie. L'agriculteur propriétaire de verger de DBK2 pratique des mesures culturales régulières après l'infection de son verger. Le verger de Oued Falli nouvellement implanté (âgé de 04 ans) présente aussi des symptômes. Le verger de DBK1 est un verger de

pommier âgé de 17 ans et dont les symptômes commencent déjà à apparaître. La plupart des poiriers sont très vulnérables à la maladie de feu bactérien. Les cultivars de pommiers diffèrent considérablement en ce qui concerne leur sensibilité au feu bactérien (Rosenberger, 2003).

En outre, la sévérité de la maladie varie d'une année en année et d'un endroit à un autre (Eden-Green et Billing, 1974), en raison de la variation des conditions environnementales et la différence dans la quantité d'inoculum initial (Millis, 1955).

La bactérie se développe pendant les températures chaudes, entre environ 15°C et 29°C, et une humidité relative supérieure à 60% (Olsen, 2011). La maladie est très grave lorsque les températures du printemps sont plus chaudes que la moyenne (Koski et Jakobi, 2014). Durant la saison printanière, la région de Tizi Ouzou a enregistré une température moyenne en printemps égale à 22,1°C, une valeur qui semble idéale au développement de la bactérie responsable de la maladie de feu bactérien, au même titre que les températures élevées qui favorisent l'activité des insectes qui jouent un rôle très important dans la dissémination de la maladie (Thomson, 2000).

Les exsudats n'ont pas été observés sur les arbres infectés durant nos diagnostics symptomatiques aux vergers. Selon Philon (2014), l'exsudat finit par disparaître en séchant pour former des filaments bactériens qui sont difficiles à observer. En absence d'exsudat visible, les symptômes du feu bactérien peuvent être facilement confondus avec d'autres maladies ou dommages d'insectes par conséquent un diagnostic est donc nécessaire.

Pour cela, un total de 16 échantillons ont été prélevés à partir de ces vergers symptomatiques pour les analyser et confirmer la présence de la bactérie *d'Erwinia amylovora*.

Dans notre travail nous avons procédé à l'identification de la bactérie en suivant le protocole de l'organisation européenne de la protection des plantes (OEPP, 2012), qui consiste à réaliser une série de tests biochimiques pour déterminer les propriétés phénotypiques et biochimiques qui sont universellement présentes ou absentes chez *E.amylovora* (Paulin, 2000), et un autre test de confirmation de pathogénicité biologique (test d'hyper sensibilité sur tabac).

Les isolements et les purifications des bactéries faites au laboratoire à partir des échantillons collectés nous ont permis d'obtenir un ensemble de 38 isolats bactériens possédant des caractéristiques morphologiques typiques à *E. amylovora*. Les colonies étaient typiquement blanches, brillantes, mucoïdes avec des stries radiales et possédaient un centre flocculant dense (Billing *et al.*, 1961).

Après la réalisation des tests d'identification biochimiques et biologique, 18 isolats sur 38 ont montré des résultats similaires à ceux de la bactérie *E. amylovora*.

Les souches : DBK161, DBK151, DBK27, DBK 19, DBK 212, TS21 avaient des réactions identiques à la souche de référence avec tous les tests réalisés ce qui confirme que ces souches représentent la bactérie *Erwinia amylovora*.

Certaines caractéristiques physiologiques et biochimiques peuvent varier pour quelques souches bactériennes (OEPP,2013). Certains auteurs, confirment l'existence d'une certaine hétérogénéité entre les différentes souches d'*Erwinia amylovora*. En effet, il peut exister des différences entre les isolats d'*Erwinia amylovora* (Pulawska et Sobiczewski, 2006, Atanasova *et al.*, 2007). Les souches de verger de poirier de la zone de Tadmaït : T310, T2321 ont montré une réaction négative pour le test de catalase, tandis que le test d'hyper sensibilité confirme que ces souches sont pathogènes. Ainsi pour les souches de verger de Oued Falli : OF17, OF24, OF28 et la souche DBK171, qui ont montré une réaction négative au test de citrate, les bactéries sont incapables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone.

Les souches DBK174 et DBK251 ont montré une réaction positive au test d'oxydation et la souche DBK21 au test d'indole, contrairement à la souche de référence.

Les résultats de diagnostic sur terrain et les résultats des tests d'identification biochimiques et biologiques effectués aux laboratoires sur nos isolats obtenus dans cette étude nous ont confirmé que la bactérie *Erwinia amylovora* existe toujours dans les vergers de poiriers et de pommiers prospectés dans la région de Tizi Ouzou.

CONCLUSION

Conclusion

Le feu bactérien est une maladie nécrogénique dévastatrice, causée par la bactérie à grame négatif *Erwinia amylovora* qui affecte les pommiers, les poiriers et d'autres plantes de la famille des Rosacées, y compris d'importantes espèces ornementales (Malnoy *et al.*, 2005 ; Kamber, 2013). Les conditions climatiques favorables tel que les températures élevées et l'humidité, ainsi que les agents de disséminations, l'état physiologique du végétal et la concentration d'inoculum jouent un rôle capital pour le développement de feu bactérien (Thomson, 2000). Cette maladie a été signalée dans plus de 46 pays à travers le monde (Van der Zweet, 2006), dont l'Algérie.

Le feu bactérien a été détecté pour la première fois en Algérie dans les années 2010 dans les vergers de poiriers de Koléa, puis elle s'est propagée vers d'autres wilaya au centre de pays notamment dans la wilaya de Tizi Ouzou en 2011 (Anonyme, 2011).

Le but de la présente étude consiste à isoler et à identifier la bactérie *Erwinia amylovora* dans la région de Tizi Ouzou, conformément au protocole de l'Organisation Européenne de la Protection des Plantes (OEPP, 2013).

Nous avons collecté un total de 16 échantillons représentatifs à partir de cinq (05) vergers symptomatiques de poiriers et de pommiers situés dans trois (03) communes dans la wilaya de Tizi Ouzou (Tadmaït, Draâ Ben Khedda et Tizi Ouzou), durant la période du mois de juin 2017.

Une série de tests biochimiques et un test biologique ont été réalisés sur 38 isolats bactériens obtenus après isolement et purification au niveau de laboratoire dont les résultats finaux ont confirmé que 18 souches identifiées représentent le même profil de la bactérie *Erwinia amylovora*.

Au terme de ce travail, on peut conclure que la bactérie *Erwinia amylovora* est présente dans les vergers de poiriers et de pommiers de la wilaya de Tizi Ouzou. Cette bactérie très dangereuse possède des caractères physiologiques et biochimiques et un pouvoir de pathogénicité lui servant à causer des dégâts importants et des pertes qualitatives et quantitatives sur les plantes hôtes.

La gestion efficace du feu bactérien nécessite une approche intégrée de plusieurs pratiques visant à réduire la quantité d'inoculum (Norelli *et al.*, 2003). Les méthodes de lutte contre le feu bactérien comprennent l'utilisation de variétés moins sensibles, les pratiques culturales, les tailles et la pulvérisation. L'utilisation de variétés résistantes est la méthode de prévention la plus efficace (Douglas, 2003).

En perspectives, il est important de développer des outils de tests de diagnostic rapides permettant de déterminer la présence de l'agent pathogène *Erwinia amylovora* en champs.

L'utilisation d'autres méthodes plus fiables telles que les tests sérologiques comme le test d'agglutination et test d'ELISA. Les techniques moléculaires comme l'amplification et le séquençage d'ADN, la PCR, aident à identifier la bactérie *E. amylovora* d'une manière efficace.

Des études approfondies doivent être réalisées pour mieux connaître l'interaction entre la bactérie *E. amylovora* et la plante hôte en mettant l'accent sur la pathogénicité et la stratégie d'infection de *E. amylovora* et les mécanismes de défense possibles de cette plante malade afin de développer leur résistance systémique induite par des traitements à base de composés naturels.

Références

Références bibliographiques

1. **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.
2. **Abdelguerfi, A. (2003).** Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Projet ALG/97/g31.
3. **Agrireseau. (2014).** Un test pour la détection de la résistance de *Erwinia amylovora* à la streptomycine, laboratoire de diagnostic en phytoprotection. MAPAQ du Québec. [en ligne] <http://www.agrireseau.qc.ca/lab/documents/Streptomycine.pdf> (consulté le 15/04/2014).
4. **Anonyme (2011).** Le Feu Bactérien Menace les Fruits à Pépins (Tizi Ouzou). Journal Le Midi Libre le 14 juin 2011.
5. **Anonyme. (2006).** Lutte intégrée contre le feu bactérien de la pomme et de la poire au Canada. PSFR, N° A118.
6. **Anonyme. (2008).** Lutte intégrée contre les ennemis du pommier : Brulure bactérienne, Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales. Ontario, Canada.
7. **Arnaud, B. (2014).** Etude des populations naturelles de la bactérie *Erwinia amylovora* et incidence au sein des vergers Québécois. Thèse de Master 2 : Production et Technologie du Végétal (ProTeV). Angers : Université d'Angers ,72p.
8. **Atanasova, I., Stefanova, K., Kabadjova, P., Tishkov, S., Dimitrov, Z., Bogatzevska, N., Moncheva, P. (2007).** Phenotypic diversity of *Erwinia amylovora* in Bulgaria. *Z Naturforsch C*, vol. 62, p 857–868.

9. **Bagnouls, F., Gaussen, H. (1953).** Saison sèche et indice xerothermique. Toulouse, *Bull soc hist*, p193-23
10. **Bayot,R.G., Ries,S.M. (1986).** Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compound. *Phytopathologie*, vo. 76 (n°4), p 441-445
11. **Billing. E., Baker. L. A. E., Cross, J. E., Garrett, C. M. E. (1961).** Characterization of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill). *Journal of Applied Bacteriology*, vol.24, p 195-211.
12. **Block, A., Li,G.Y., Fu, Z.O., Alfano,J.R. (2008).** Phytopathogèn type III effector weaponry and their plant tragets. *Curr Opin Plant Biol*, vol.11, p 396-403.
13. **Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C., Geider, K. (1998).** Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology*, vol.88, p 416-421
14. **Bugert, P., Geider, K. (1995).** Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol Microbiol*, vol.15, p917-933
15. **Burrill F.J. (1882).** New species of *Micrococcus* (Bacteria). *Am Naturalist*, vol.17, p 319-320.
16. **Burrill, T. J. (1882).** New Species of *Micrococcus*. *Am. Naturalist*, vol.17, p 319-320
17. **Büttner, D., He, S.Y. (2009).** Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, vol.150, p 1656-1664.
18. **Cataylaud, P. A. (2013).** La Lutte Biologique, strategies durable pour la science N° 424.
19. **Cazelles, O., Hasler, T. (2006).** Le feu bactérien, Station de Recherche Agroscope Changing, Wadenswil.

-
20. **Celetti, M. (2015).** Fire blight canker removal in early spring, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. [En ligne] : <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/hortmatt/2015/02hrt15a1.htm>
21. **Cesbron, S.D. (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 : Biologie cellulaire et moléculaire végétale. Angers : Université d'Angers, 192p.
22. **Dauglas, Sh.M. (2003).** Fire Blight. The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Hven.
23. **Dellagi, A., Brisset, M.N., Paulin, J.P., Expert, D. (1998).** Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity, *Mol. Plant Microbe Interact*, vol.11, p 734 – 742
24. **Dickey. R. S., Zumoff. C. H. (1988).** Emended Description of *Enterobacter cancerogenus* comb. nov. (Formerly *Erwinia cancerogena*), *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol.38 (n°4), p 371-374
25. **Doolotkeldieva.T, Bobusheva.S. (2016).** Fire Blight Disease Caused by *Erwinia amylovora* on Rosaceae Plants in Kyrgyzstan and Biological Agents to Control This Disease. *Advances in Microbiology, Microbiology*, vol.6, p 831-851.
26. **Eden-Green SJ, Billing E. (1974).** Fireblight. *Rev Plant Pathol*, vol.53, p 353-365.
27. **El Abci, A. (2011).** Feu Bactérien : Vigilance et Prospection. Journal Le Quotidien le 16 juillet 2011.
28. **FAO. (2013).** Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.faostat.fao.org>.
29. **Feistner, G.J., Stahl, D.C., Gabrik, A.H. (1993).** Proferrioxamine siderophores of *Erwinia amylovora*. A capillary liquid chromatographic/electrospray tandem mass spectrometry study. *Org. Mass Spectrom*, vol.28, p 163–175.
-

30. **Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C. (1992).** Manuel de bactériologie Clinique, *ELSEVIER Collection Option Bio*, vol.1, p 79-143
31. **Galbis, D. M., Piqué, N., Merino, S., Tomás. J. M. (2015).** Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *Int. J. Mol. Sci*, vol.16(n°6), p 12836-12854
32. **Giraud, M., Baudry, O., Orts, R., Gendrier, J. (2006).** Protection intégrée pommier-poirier. Paris : Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. 200p
33. **Hart, T., Shears. P. (1999).** Atlas de poche de microbiologie, Médecine-Sciences Flammario. Paris, 317p
34. **Hueck, C. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, vol.62, p 379-433.
35. **Hugh, R., Leifson, E. (1953).** the taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, vol.66, p 24-26
36. **Johnson, K.B. (2000).** Fire blight of apple and pear. The Plant Health Instructor [en ligne], 10 (10)(page consultee le03/2017)
<file:///C:/Users/Client/Documents/feu%20bactrien/Fire%20blight%20of%20apple%20and%20pear.html>
37. **Jones, A., Geider, K. (2001).** Gram negative bacteria. *B. Erwinia and Pantoea*. In: Schaad, N.W., Jones, J.B., Chum, W. Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd edn. St Paul (US): APS Press, 40 –55
38. **Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. (1999).** Plant Systematics: A phylogenetic approach. *Sinauer Associates Inc Sunderland MA*. p 290–306.
39. **Jullien, E. (2014).** Cultiver et Soigner les Fruitiers. *Sang de la Terre et Groupe Eyrolles*. 9p
40. **Kachadourian, R., Dellagi, A., Laurent, J., Bricard, L., Kunesch, G., Expert, D. (1996).** Desferrioxamine-dependent iron transport in *Erwinia amylovora* CFBP1430 :

- cloning of the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR, *BioMetals*, vol.9, p 143-150.
41. **Kamber, T. (2013)**. Characterization of *Erwinia amylovora*, host plant and biocontrol agent interaction, Thèse de Doctorat : Mathématique et Science Naturelles. Zurich : Université de Zurich, 182p.
42. **Kamber, T., Smits, T. H. M., Duffy, B. (2012)**. Genomics of the fire blight pathogen *Erwinia* and biocontrol agent *Pantoea*, *Trees Struct. Funct.* Vol.26, p 227–238
43. **Karfach, A. (2015)**. Isolement et identification de bactéries antagonistes contre *Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien des rosacées à pépins. Mamoire Master Recherche : Biotechnologie microbienne. Fès : Université Sidi Mohammed Abdellah,63p.
44. **Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. (1990)**. Methods in Phytobacteriology, Kluwer Academic Publishers. Budapest, 568 p.
45. **Klos, E. J., Ishimaru, E. S. (1984)**. New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology*, vol.74, p 1342–1345.
46. **Koski, R. D., Jacobi, W. R. (2014)**. Fire Blight. *Colorado State University Extension*, vol.907 (n°2).
47. **Malnoy, M., Faize, M., Venisse, J. S., Geider, K., Chevreau, E. (2005)**. Expression of Viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear, *Plant Cell Rep*, vol.23, p 632-638
48. **Megan, C. (2016)**. *Erwinia amylovora*, agent pathogène du feu bactérien, *fredon*, p1-2
49. **Millis, J. (1955)**. Some aspects of breastfeeding in Singapore. *Medical Journal of Malaya*, vol.10, p 157–161

-
50. **Momol, T. (2002).** Fire Blight on Pears and Indian Hawthorn in North Florida and South Georgia, Department of Plant Pathology. University of Florida – IFAS. [En ligne]:http://ipm.ifas.ufl.edu/community/Fire_Blight_on_Pears_and_Indian_Hawthorn_in_North_Florida_and_South_Georgia.shtml
51. **Momol, M.T., Aldwinckle, H.S. (2000).** Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste JL. Fire blight the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. Wallingford, Oxon UK: CABI Publishing, p55-72.
52. **Morel, J. (2008).** Feu bactérien Fondements, Problèmes et mesures nécessaires. Pro Natuea, Station Ornithologiques. Suisse, 11p
53. **Mourgues, F., Brisset, M. N., Chevreau, E. (1998).** First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the attacin E gene from *Hyalophora cecropia*, *Trends Biotech*, vol.16, p 203-210.
54. **Nelson, S. (2015).** Apple Blight, [En ligne] :
<http://imagict.com/en/words/apple+blight>
55. **Norelli, J.L., Jones, A.L., Aldwinckle, H.S. (2003).** Fire blight management in the twenty-first century, using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Dis*, vol.87, p 756-765.
56. **OEPP/EPPO. (2011).** N°6 Première signalement d'*Erwinia amylovora* en Algérie, Service d'information. Paris, 2p
57. **OEPP/EPPO. (2012).** *Erwinia amylovora* (ERWIAM) distribution of *Erwinia amylovora*, Global Data Base.
58. **OEPP/EPPO. (2013).** PM 7/20 *Erwinia amylovora* (ERWIAM), vol.43(n°1), p 21-45
59. **OEPP/EPPO. (2017).** *Erwinia amylovora* (ERWIAM). [En ligne]:
<https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/distribution>
60. **Oh, ch.S., Beer, S.V. (2005).** Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight, *FEMS Microbiology Letters*, vol.253(n°2), p 185-192.
-

61. **ONM (2012).** Office National de la Météorologie
62. **Ordax, M., Macro-Noales, E., Lopez, M. M., Biosca, E. G. (2010).** Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies, *Res Microbiol*, vol.161, p 549-555.
63. **Oslen, M. W. (2011).** Fire Blight. Arizona cooperative extension.
64. **Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A., Lopez, M.M., ordax. M., penalver, J., Gorris, M.T., Cambra, M., Marco-Noales, E., Liop, p., Biosca, E.G., Rosello, M., Montesinos, E., Liorente, I., Badosa, E., Cabrefiga, J., bonaterra, A., Ruz, L., Moragrega, C., Frances, J., Diaz, C. (2009).** El fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*). Ministère de l'environnement et des affaires rurales et maritimes. Espagne.
65. **Paulin, J. P. (2000).** *Erwinia amylovora*: General Characteristics, Biochemistry and Serology. In: Vanneste, J.L. Fire Blight: The Disease and its Causative Agent *Erwinia amylovora*. France : CAB International, p 87-115.
66. **Phillion, V. (2014).** Le feu bactérien. In : Poulin D. Guide de référence en production fruitière intégrée pour les producteurs de pommes du Québec. Québec. Ed, CFP, p 403-422.
67. **Piqué, P. Galbis, M.D. Merino, S. (2015).** Virulence Factors of *Erwinia amylovora*. *International Journal of Molecular Sciences*, vol.16 (n°10), p 12836-12854.
68. **Plaideau, M. (2013).** Un verger conduit d'après le concept de la protection intégrée des cultures, 17p
69. **Pulawska, J., Kielak, K., Sobiczewski, P. (2006).** Phenotypic and genetic diversity of selected Polish *Erwinia amylovora* strains, *Acta Horti*, vol.704, p 439–444.
70. **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*, vol.99, p 571–581.

71. **Raymundo, A. K., Ries, S. M. (1980).** Chemotaxis of *Erwinia amylovora*, *Phytopathology*, vol.70 (n°10), p 1066-1069.
72. **Rhouma, A. (2013).** Lutte intégrée contre la maladie de feu bactérien dans les conditions tunisiennes. Formulaire de proposition d'une action de recherche, N° 02.
73. **Rosenberger, D. (2003).** La brûlure Bactérienne : une maladie dévastatrice des pommiers et des framboisiers, Hudson, Valley Laboratory de l'université Cornell, Highland.
74. **Ruz Estivez, L. (2003).** Improvement of Strategies for the management of fire blight (*Erwinia amylovora*), Evaluation and Optimization of physical and Chemical control Methodes and se of dicison support systems. These de Doctorat : Technologie d'agroalimentaire. Espagne : Université de Gérone, 166p.
75. **Saoud H., Mniai D. (2010).** Gestion de la crise du feu bactérien au Maroc. Journée sécurité sanitaire des produits alimentaires, 43p.
76. **Sbargoud, A. (2009).** Diagnostic environnemental de la gare routière (pollution atmosphérique par TSP et métaux lourds), Ingénieur d'état en Ecologie et Environnement. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. 82p
77. **Schaad,N.M., Jones, J.B., Chun, W. (2001).** Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic Bacteria. APS Press. St Paule, Minnesota (US), 373p
78. **Smith, T. (2016).** Fire Blight, WSU Tree Fruit Extention
79. **Stewart, Ph. (1968).** Quotient pluviothermique et dégradation biosphérique : quelques réflexions. Bull. Soc. Hist. Nat. *Afrique du Nord* 59, vol.1 (n°4), p 23–36.
80. **Suslow, T.V., Schroth, M.N., Isaka, M. (1982).** Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria without Staining, *Phytopathology*, vol.72, p 917-918.

81. **Thomson, S.V. (2000).** Epidemiology of fire blight. In: Vanneste, J.L. Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, *Erwinia Amylovora*. Wallingford, UK, 2000. (ed), CAB International. p 9 - 36.
82. **Van der Zwet T. (2002).** Present world-wide distribution of fire blight, *Acta Horticulturae*, vol.590, p 33-34.
83. **Van der Zwet, T. (2006).** Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases, *Acta Horticulturae*, vol.704, p 35-36
84. **Van der Zwet, T., Beer, S.V. (1995).** Fire Blight its nature, Prevention, and Control. A Practical Guide to Inegrated Disease Management, US Departement of Agriculture, Agriculture Information Bulletin N° 631, Washington DC, 97p.
85. **Van der Zwet, T., Keil, H.L. (1979).** Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants. United States: Department of Agriculture, 510p
86. **Vanneste, J. (2000).** Fire blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. Wallingford,Oxon, UK: CABI Publishing.
87. **Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T., Valcke, R. (2013).** Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae. *State of the art.Microbiology*. vol.159, p 823 – 832
88. **Waard, M.A., Geoggopoulos, S.G., Hollomon, D.W., Ishii, H., Le Roux, P., Ragsdale, N.N., Schwinn, FJ. (1993).** Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Ann. Rev. Phytopathol*, vol.31, p 403 - 421.
89. **Ward Gauthier, N. (2002).** Fire Blight, College of agriculture food and environement [En ligne]: <http://applescout.ca.uky.edu/fireblight>
90. **Winslow, C. E. A., Broadhust, J., Bu Chanan, R. E., Krumwied, C. Jr., Rogers, L. A., Smith, G. H. (1920).** The families and genera of the bacteria; *Erwineae*. *Journal of Bacteriologi*y, vol.5, p 191-229.

91. **Ziad, A. (2011).** Algérie : Le feu bactérien a affecté des centaines d'hectares. Journal La Tribune du 29 Août, 2011.

Annexes

Annexes

Annexe 01 : Composition de milieu King B pour formuler 1 L d'eau distillée (King *et al.*, 1954)

Protéose-peptone N° 3	20.0g
Glycérole	10.0g
Phosphate de potassium dibasique	1.50g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1.50g
Agar bactériologique	15.0 g

Ph = 7, autoclavage pendant 20 mn à 120°C

Annexe 02 : Composition de milieu Levane pour formuler 1 L d'eau distillée (OEPP, 2013)

Extrait de levure	02 g
Bactopeptone	05 g
Saccharose	50 g
Chlorure de sodium	05 g
Agar bactériologique	20 g

Ph = 7, autoclavage pendant 20 mn à 120°C

Annexe 03 : Composition de milieu Hught et Leifson pour formuler 1 L d'eau distillée (Hught et Leifson, 1953)

Bacto tryptone	02 g
Phosphate de potassium dibasique	0.3 g
Chlorure de sodium	05 g
Bleu de bromothymol	0.03 g
D glucose	10 g
Agar bactériologique	03 g

Ph = 7, autoclavage pendant 20 mn à 120°C, on ajoute les 10g de glucose par filtration

Annexe 04 : Composition de milieu Indole pour formuler 1 L d'eau distillée (Lelliott et Dickey, 1984)

Peptone 20g

NaCl 05g

Ph = 7.2, stérilisé pendant 20 minutes à 120°C

Annexe 05 : Composition de milieu Citrate de Simmons pour formuler 1 L d'eau distillée (Freney *et al.*, 1992)

Dihydrogénophosphate d'ammonium 01g

Phosphate de potassium dibasique 01 g

Chlorure de sodium 05 g

Bleu de bromothymol 0.08 g

Citrate de sodium 2.0 g

Sulfate de magnésium 0.2 g

Agar bactériologique 20 g

Ph = 7.2, autoclavage pendant 20 minutes à 120°C

Résumé

Le feu bactérien est l'une des maladies les plus destructrices qui attaque les arbres fruitiers à pépins, causé par la bactérie *Erwinia amylovora* de la famille des *Entérobactériaceae*. Découverte pour la première fois aux Etats-Unis à la fin du 18^{ème} siècle, et en Algérie en 2010.

L'objectif de ce travail vise à isoler et identifier la bactérie *E.amylovora* à partir des vergers de poiriers et de pommiers dans la wilaya de Tizi Ouzou durant la période de mois de juin 2017, en réalisant un diagnostic symptomatique sur terrain, suivi d'une série de tests biochimiques et biologiques au laboratoire.

Ces tests ont été effectués sur un total de 38 isolats obtenus ayant montré des caractères morphologiques semblables à ceux de la bactérie *E.amylovora*. Les résultats de l'ensemble de ces tests ont confirmé que parmi ces isolats, 18 souches phytopathogènes ont été identifiées étant *Erwinia amylovora*.

Cette étude a révélé la présence de la bactérie *Erwinia amylovora* dans la région de Tizi Ouzou qui est en propagation permanente. Pour cela, les autorités doivent déployer toutes les mesures nécessaires pour éradiquer et lutter contre cette maladie dévastatrice.

Mots clé : feu bactérien, *Erwinia amylovora*, *Rosaceae*, Tizi Ouzou, diagnostic

Abstract

Fire blight is one of the most destructive diseases attacking pome fruit trees, caused by the *Erwinia amylovora* bacterium belonging to the family of *Enterobacteriaceae*. Discovered the first time in the United States at the end of the 18th century, and in Algeria in 2010.

The aim of this work is to isolate and identify the *E.amylovora* bacterium from the pear and apple orchards in the wilaya of Tizi Ouzou, during the June 2017 period by performing a symptomatic diagnosis on the ground, followed by a series of biochemical and biological tests in Laboratory.

These tests were carried out on a total of 38 isolates obtained who have shown a morphological characteristics similar to those of the *E.amylovora* bacterium. The results of all these tests confirmed that among these isolates, 18 isolates were identified as the *Erwinia amylovora*

This study revealed the presence of the *Erwinia amylovora* bacterium in the region of Tizi Ouzou, which is in permanent propagation. For this, the authorities must deploy all the necessary measures to eradicate and control this devastating disease.

Keywords: fire blight, *Erwinia amylovora*, *Rosaceae*, Tizi Ouzou, diagnostic

ملخص

تعتبر اللقحة النارية واحدة من أكثر الأمراض الخطيرة التي تستهدف عائلة الزهريات، الناجمة عن البكتيريا *إروينيا أميلوفورا* التي تنتمي إلى عائلة *Entérobactériaceae*. اكتشفت لأول مرة في الولايات المتحدة في نهاية القرن الثامن عشر، وفي الجزائر في عام 2010.

الهدف من هذا العمل هو عزل وتشخيص البكتيريا *إروينيا أميلوفورا* من بساتين الإجاص والتفاح في ولاية تيزي وزو خلال فترة جوان 2017، من خلال إجراء تشخيص لأعراض المرض ميدانيا، متبوع بسلسلة من الاختبارات البيوكيميائية والبيولوجية على مستوى المخبر.

هذه الاختبارات أجريت على 38 بكتيريا المتحصل عليها والتي أظهرت خصائص مورفولوجية مماثلة لبكتيريا *إروينيا أميلوفورا*. أظهرت نتائج هذه الاختبارات أنه من بين البكتيريا التي تم عزلها، تم تحديد 18 بكتيريا وتأكيدتها على أنها *إروينيا أميلوفورا*.

هذه الدراسة كشفت لنا أن *إروينيا أميلوفورا* لا تزال موجودة في منطقة تيزي وزو، ولا تزال في أنتشار دائم، وأنه يجب على السلطات اتخاذ جميع التدابير اللازمة للقضاء على هذا المرض المدمر ومكافحته.

الكلمات المفتاحية: اللقحة النارية، *إروينيا أميلوفورا*، الزهريات، تيزي وزو، تشخيص