

**ETUDE DES FACTEURS ECOLOGIQUES INFLUENCANT LA CROISSANCE ET
LE DEVELOPPEMENT DES *PECTOBACTERIUM* spp. INFECTANT LES
TUBERCULES DE POMME DE TERRE**

Ahoussi Augustin MOH

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences
agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs:

Prof. Philippe LEPOIVRE
Prof. Haïssam JIJAKLI

2012

Copyright ©. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures.

MOH Ahoussi Augustin (2012). Etude des facteurs écologiques influençant la croissance et le développement des *Pectobacterium* spp. infectant les tubercules de pomme de terre. Thèse de doctorat, Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique. 113 p., 12 Tabl., 14 Fig.

Résumé

Pectobacterium atrosepticum (Pba) et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) sont responsables de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre en stockage et de la jambe noire de la pomme de terre au champ. Les paramètres écologiques tels que l'humidité et la température influencent énormément le développement de la maladie. L'objectif de la présente étude est de modéliser la croissance des deux bactéries phytopathogènes (Pba et Pcc) sous diverses conditions écologiques au niveau des tubercules de pomme de terre blessés. Pour atteindre ce but, nous avons adopté deux approches de travail à savoir une approche *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons déterminé *in vitro* l'effet combiné de l'activité de l'eau (0,960; 0,980 et 0,997) et de la température (10, 15 et 20°C) sur le taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max}) et sur l'activité spécifique des pectates lyases (PEL) de Pba et Pcc au moyen de la densité optique (DO). Les analyses statistiques ont montré un effet significatif de l' a_w et de la température sur μ_{\max} . Nos résultats ont montré une augmentation de l'activité spécifique des PEL avec la température quelles que soient les souches bactériennes. Mais, contrairement à la croissance les résultats n'ont pas montré une augmentation de l'activité spécifique des PEL avec l' a_w excepté avec les traitements à 15 et 20°C pour les deux souches bactériennes. Sur la base des résultats obtenus sur la croissance et sur la production des PEL nous avons conclu que Pba et Pcc ont le même comportement dans la gamme des valeurs des deux facteurs (a_w et température) testés.

Les études effectuées *in vivo* ont consisté à évaluer et à modéliser l'influence de la température (10, 15 et 20°C), de l'humidité relative (86, 96 et 100%) et de la concentration initiale de bactéries appliquée (10^5 , 10^7 et 10^9 UFC/ml) sur la densité de population de Pba et Pcc et sur le développement des symptômes de pourriture molle à la surface des tubercules de pomme de terre blessés. L'analyse statistique a montré un effet significatif des trois facteurs testés sur la dynamique de la population bactérienne et le développement de la pourriture molle à la surface des tubercules de pomme de terre blessés pour Pba et Pcc. Au regard de l'analyse des coefficients de la régression multiple et des courbes de contour nous pouvons

dire que la température apparaît comme le facteur le plus important, suivi de la concentration de l'inoculum et de l'humidité relative, pour la croissance des deux *Pectobacterium* spp. (Pba et Pcc) et le développement des symptômes de pourriture molle dans nos conditions expérimentales. Plus de 64% de la variation observée au niveau des symptômes de pourriture molle pourraient être expliqués par la présence de Pba et Pcc au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre sous l'effet combiné des facteurs testés.

Les modèles prédictifs développés, par le biais de la méthodologie des surfaces de réponses, dans cette étude (*in vitro* et *in vivo*) devraient prendre en considération, dans les travaux futurs, la grande variation génétique existante (non évaluée dans cette étude) au sein du genre *Pectobacterium* (Pba et Pcc) et *Dickeya* spp.

Mots-clés: *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, Activité de l'eau, Humidité Relative, Température, Taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max}), Pectate lyase (PEL), Tubercules de pomme de terre, Microbiologie prédictive.

MOH Ahoussi Augustin (2012). Study of the ecological factors influencing the growth and the development of *Pectobacterium* spp. infecting potato tubers. PhD Thesis, University of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech, Belgium. 113 p., 12 Tabl., 14 Fig.

Abstract

Pectobacterium atrosepticum (Pba) and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) are the main cause of potato tuber decay (soft rot) in storage and stem rot in the field (blackleg). It has been reported that ecological parameters such as humidity and temperature, greatly influence the disease development. The objective of the present study was to evaluate and model the growth of two phytopathogens bacteria (Pba and Pcc) under various ecological conditions at the level of wounded potatoes tubers. To this purpose, we adopted two experimental approaches named *in vitro* approach and *in vivo* approach.

We determined *in vitro* the effect of water activity (0.960, 0.980 and 0.997) and temperature (10, 15 and 20°C) and their interactions on the growth parameters and pectate lyases (PEL) specific activity of Pba and Pcc using optical density (OD) measurement. Statistical analysis showed a significant effect of a_w and temperature on μ_{\max} . Our result showed an increase of PEL specific activity with the temperature whatever the bacterial strains. But contrary to the bacterial growth, this research did not show an increase of PEL specific activity with a_w except the treatment at 15 and 20°C for the two bacteria strains. According to our results on growth and PEL production, we concluded that Pba and Pcc had the same behaviour in the range of the values of the two factors (a_w and temperature) investigated here.

The studies made *in vivo* were consisted to evaluate and model the influence of temperature (10, 15 and 20°C), relative humidity (86, 96 and 100%) and initial concentration of bacterial inoculum (10^5 , 10^7 and 10^9 CFU/ml) on the population density of Pba and Pcc, and on the development of soft rot symptoms caused by these bacteria at the surface of wounded potatoes tubers. With both bacterial species, statistical analysis showed a significant effect of temperature, relative humidity and initially applied bacterial concentration on population dynamics and soft rot development at the surface of wounded potato tubers. Multiple regression analyses and the contour plots showed that the temperature is the most important factor, followed by the initially applied bacteria concentration and relative humidity. More than 64% of the variability of the soft rot symptoms observed could be explained by the presence of Pba and Pcc at the level of wounded potato tubers under the combined effect of tested factors.

The quadratic polynomial models developed (*in vitro* and *in vivo*) in our research, by means of the response surface methodology, should integrate in further research the large genetic variation (which was not evaluated in this investigation) within *Pectobacterium* genus (Pba and Pcc) and *Dickeya* spp.

Keywords: *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, Water activity, Relative humidity, Temperature, Maximum specific growth rate (μ_{\max}), Pectate lyase (PEL), Potato tubers, Predictive microbiology.

*A la mémoire de mes défunts parents
Mon père BOUEDY Asseu dit MOH Julien
Ma mère ATSAIN Abonou Thérèse*

A mon oncle BOUEDY Yapi Rémi

Remerciements

Au terme de ce travail, il me tient à cœur de remercier toutes les personnes physiques et morales dont la trajectoire de mes études doctorales a permis de rencontrer et qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse.

Je voudrais avant tout remercier du fond du cœur l'Etat de la République de Côte d'Ivoire via le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour la bourse d'études sans quoi cette thèse n'aurait pu être entreprise de ma part en Belgique. Un grand merci à l'Ambassade de Côte d'Ivoire près du Benelux pour l'attention qu'elle accorde aux étudiants et le paiement de la bourse d'études tout au long de mon cursus malgré la crise militaro-politique.

Je tiens à remercier infiniment mes promoteurs, MM. Philippe Lepoivre et Haïssam Jijakli pour m'avoir accepté à l'Unité de Phytopathologie, pour l'encadrement scientifique, les critiques et les suggestions très pertinentes qu'ils ont apportées au présent travail afin de le rendre meilleur. Merci pour votre patience et franchise à mon égard.

Au personnel scientifique et technique de l'Unité de Phytopathologie de Gembloux (passés et actuels) j'adresse mes vifs remerciements, pour leur disponibilité, les conseils et les encouragements accordés durant mon séjour d'études doctorales. Merci à toi Sébastien Massart, Rachid Lahlali et Olivier Dutrecq respectivement pour l'encadrement reçu au cours des premières années de cette thèse, pour l'initiation à la modélisation et pour le protocole utilisé pour le dénombrement de nos bactéries.

Un grand merci à M. Jean-Louis Rolot du Centre wallon de recherches agronomiques (CRA-W) de Libramont (Belgique) pour les souches bactériennes utilisées dans ce travail.

Je remercie également MM. François Béra, Yves Brostaux et Patrick du Jardin pour avoir accepté d'être dans le comité de ma thèse afin d'évaluer la progression de ce travail, pour les conseils avisés et discussions enrichissantes reçues en aparté sur ce travail. C'est aussi l'occasion de remercier la disponibilité légendaire de M. Yves Brostaux pour les analyses statistiques des résultats.

Je remercie MM. Claude Bragard et Yves Brostaux (rapporteurs de la thèse) pour les différentes lectures du manuscrit, pour leurs commentaires et critiques scientifiques ayant permis d'améliorer la rédaction de cette thèse.

Je voudrais à travers M. Yves Beckers (Président du jury) remercier tous les membres du jury de cette thèse pour leur disponibilité.

Merci à MM. Guy Delimme et Christophe Debach respectivement technicien à l'unité de Technologie des industries agro-alimentaires et Physique des bio-systèmes pour l'écolage à l'utilisation de l'Aqua Lab et du thermohygromètre.

Je remercie également tous les membres de l'association des étudiants ivoiriens en Belgique (ASETIB) pour leur convivialité et disponibilité à mon égard. Merci à toi Charles Yapo, Antoine Assamoi, Marius Bessekou, Marie-Solange Tiébré, Marie-Michel Combo, Serge-Charles Yedmel, Sosthène Kouassi, Théodore Kouadio pour l'entraide fraternelle et les bons moments de détentes passés ensemble au sein de la biocénose gembloutoise.

J'exprime toute ma gratitude et mes sincères reconnaissances à tonton Yapi, mon oncle paternel, et à tantie Yoyo (Yolande Bouedy), ma cousine, pour avoir assuré efficacement mon éducation scolaire depuis le secondaire suite au décès inopiné de mes parents.

Je remercie M. et Mme Amin qui m'ont toujours soutenu au cours de mes études mais aussi pour leur amour, leur confiance et leur compréhension au cours de toutes ces années d'études depuis le campus d'Abidjan jusqu'à présent...

Je rends grâce à Dieu et à la vierge de Beauraing pour le soutien spirituel pendant les moments difficiles, de solitudes, d'incertitudes et de stress vécus dans le cadre de la préparation de ce diplôme. Toutes ces épreuves ont été pour moi un escalier dans le cadre de la marche vers l'acquisition du savoir mais aussi de ma maturation spirituelle. Je n'oublierai pas les membres du comité de liturgie de la Paroisse St Guibert de Gembloux pour le partage et la proclamation de la parole de Dieu au cours des messes dominicales. Je remercie très sincèrement Mireille Boraud pour ses conseils et soutiens spirituels à travers le groupe de prière des étudiants catholiques de la Maison Nord-Sud «Onction Divine» sans oublier tous les membres dudit groupe.

Spécial remerciement à Nicole Bosso pour ses prières permanentes à mon égard.

Un grand et chaleureux merci à toi Evelyne mon épouse. Merci pour tes prières, ton soutien et tes encouragements. Merci pour tout ce que nous partageons depuis plus d'une décennie. Merci pour le bonheur qu'Anne-Thérèse, Ludylvine et Mathys (tous nés au cours de cette aventure) et toi me procurez quotidiennement et pour tous ces moments sacrifiés afin de mener à bien cette thèse. Merci illimité, pour votre patience, d'avoir surtout supporté mes sauts d'humeurs (comparables à ceux d'une plante guidée par les mouvements de phototropismes) liés à la préparation de ce travail.

Enfin, que toutes les personnes physiques et morales que j'aurais oubliées par inadvertance trouvent dans ce dernier paragraphe ma sincère reconnaissance et mes remerciements.

Augustin
Printemps 2012

Liste des abréviations

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AHL	N-acylhomoserine lactone
a_w	Activité d'eau
BBD	Box-Behnken Design
CAMEL	Cecropin-melittin hybrid peptide
CAP	Centre Agricole de Pomme de terre
CFU	Colony forming units
CRA-W	Centre wallon de recherches agronomiques
CVPD	Crystal violet pectate double layer
CVPM	Crystal violet pectate modified
CVP-S1	Slendid polypectate-based one-step crystal violet pectate medium
CVP-S2	Slendid polypectate-based two-step crystal violet pectate medium
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich ELISA
DKI	5-keto-4-deoxyuronate
DKII	2,5-diketo-3-deoxygluconate
DO	Densité optique
Eca	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>
Ecc	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>
Ech	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
HR	Humidité relative
IC-PCR	Immunocapture Polymerase chain reaction
IF	Immunofluorescence
IFC	Immunofluorescence Colony Staining
IMS	Immunomagnetic separation
IMS-PCR	Immunomagnetic separation Polymerase chain reaction
KDG	2-keto-3-deoxygluconate
LB	Luria Bertani

LPS	Lipopolysaccharides
M	Molaire
mg	Milligram
min	Minutes
mM	Millimolaire
mol	Molaire
NA	Nutrient agar
nm	Nanomètre
P	Probabilité
Pba	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
Pcc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
PCR	Polymerase chain reaction
PCR-ELOSA	Polymerase chain reaction Enzyme-linked oligosorbent assay
PEH	Polygalacturonases
PEL	Pectates lyases
PGA	Acide polygalacturonique
PME	Pectines méthyles estérases
PNL	Pectines lyases
R ²	Coefficient de détermination du modèle
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RMSE	Erreur quadratique moyenne
rpm	rotation par minute
RSM	Méthodologie de surfaces de réponses
RSS	Residual sum of squares
RT-PCR	Reverse transcription Polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
spp.	Species (plural)
subsp.	Subspecies
T	Température
t	Temps
Tabl.	Tableau
trs/min	Tours par minute
UFC	Unité formatrice de colonie

UFC/cm ²	Unité formatrice de colonie par centimètre carré de tissu de tubercules de pomme de terre
UK	United Kingdom
USA	United State of America
v/v	Volume per volume
VCM	Viable count method
w/w	Weight per weight
Xi	Valeur codée
Y	Réponse
µl	Microlitre
µ _{max}	Taux de croissance spécifique maximal

Publications et posters réalisés dans le cadre général de ce travail

Articles scientifiques avec comité de lecture:

Moh A.A., Massart S., Lahlali R., Jijakli M.H., Lepoivre P. 2011. Predictive modelling of the combined effect of temperature and water activity on the *in vitro* growth of *Erwinia* spp. infecting potato tubers in Belgium. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **15:** 379-386.

Moh A.A., Massart S., Jijakli M.H., Lepoivre P. 2012. Models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers. *Journal of Plant Pathology* **94:** 181-191.

Article scientifique sans comité de lecture:

Massart S., Moh A.A., Roussel S., Van Mellaert S., Jijakli M.H. 2006. Preliminary development of real time PCR for quantification of *Erwinia* species infecting potato tubers. *Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University* **71:** 1171-1173.

Posters:

Moh A.A., Roussel S., Van Mellaert S., Jijakli M.H. 2005. Development of molecular tests for simultaneous detection of *Erwinia* spp. infecting potato tubers in Belgium. 57th International Symposium on Crop Protection. Diagnostic and Epidemiology. Tuesday May 10. Ghent university, Belgium.

Moh A.A., Massart S., Roussel S., Van Mellaert S., Jijakli M.H. 2006. Development of real time PCR for quantification of *Erwinia* spp. infecting potato tubers in Belgium. 58th International Symposium on Crop Protection. Diagnostic and Epidemiology. Tuesday May 23. Ghent university, Belgium.

Moh A.A., Massart S., Lahlali R., Jijakli M.H. 2007. Predictive modelling of the combined effect of temperature and water activity (a_w) on the *in vitro* growth of *Erwinia* spp. infecting potato tubers in Belgium. 59th International Symposium on Crop Protection. Diagnostic and Epidemiology. Tuesday May 22. Ghent university, Belgium.

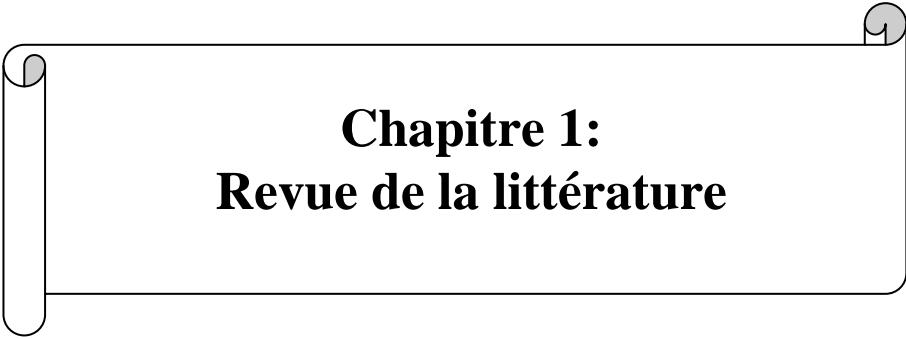
Table des matières

RESUME.....	I
ABSTRACT	III
REMERCIEMENTS.....	VI
LISTE DES ABREVIATIONS	VIII
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTERATURE	1
1.1. INTRODUCTION GENERALE	1
1.2. GENERALITE SUR PECTOBACTERIUM SPP. ET DICKEYA SPP.	3
1.2.1. <i>Taxonomie et description</i>	3
1.2.2. <i>Distribution géographique et incidence économique</i>	4
1.2.3. <i>Source d'inoculum et facteurs de contamination</i>	5
1.2.3.1. Rôle du tubercule mère	5
1.2.3.2. Rôle du sol et de la rhizosphère	6
1.2.3.3. Rôle de l'eau et des aérosols	7
1.2.3.4. Transmission par le matériel et les pratiques agricoles.....	8
1.2.3.5. Transmission par les insectes	9
1.2.4. <i>Conditions favorables au développement de Pectobacterium spp. et Dickeya spp.</i>	
.....	10
1.2.4.1. Au champ	10
1.2.4.2. Au stockage	11
1.2.5. <i>Symptômes sur plant et sur tubercule</i>	11
1.2.5.1. Symptômes sur les parties aériennes	12
1.2.5.2. Symptômes sur les tubercules	12
1.2.6. <i>Enzymes impliquées dans la pathogénicité</i>	14
1.2.7. <i>Mise en évidence, détection et caractérisation des bactéries</i>	15
1.2.7.1. Dénombrement sur milieux de culture spécifique.....	15
1.2.7.2. Sérologie.....	16
1.2.7.3. Biologie moléculaire	18
1.2.8. <i>Méthodes de lutte</i>	20
1.2.8.1. Contre la Jambe noire.....	21

1.2.8.2. Contre la pourriture molle	21
1.3. MODELISATION DE LA CINETIQUE DE CROISSANCE D'UNE POPULATION DE MICRO-ORGANISMES	26
1.3.1. <i>La microbiologie prédictive: une aide à l'évaluation des risques</i>	26
1.3.2. <i>Techniques standard de mesures de la croissance</i>	27
1.3.3. <i>Differentes phases de la croissance d'un micro-organisme</i>	28
1.3.4. <i>Les limites de la microbiologie prédictive</i>	30
1.3.5. <i>Classification des modèles</i>	30
1.3.5.1. Modèles primaires de la croissance (Delignette-Muller, 1995)	30
1.3.5.2. Modèles secondaires de croissance	35
1.3.5.3. Modèles tertiaires de croissance.....	35
1.3.6. <i>Plan d'expériences</i>	36
1.3.6.1. Définition d'un plan d'expérience.....	36
1.3.6.2. Principaux avantages des plans d'expériences.....	36
1.3.6.3. Terminologie des plans d'expériences	36
1.3.6.3.1. Facteur.....	36
1.3.6.3.2. Réponse	37
1.3.6.4. Modèles de surfaces de réponses	37
1.3.6.5. Principales étapes de la méthode des plans d'expériences.....	38
1.3.6.5.1. Préparation de l'étude.....	38
1.3.6.5.2. Choix du plan d'expérience approprié	39
1.3.6.5.3. Analyse et interprétation des résultats.....	39
1.3.7. <i>Classification des plans d'expériences</i>	39
1.3.7.1. Plan d'expérience pour la modélisation	40
1.3.7.1.1. Plans factoriels	40
1.3.7.1.2. Plan de Box-Behnken.....	40
CHAPITRE 2: OBJECTIFS	42
CHAPITRE 3: MATERIELS ET METHODES	44
3.1. ETUDES ET MODELISATION IN VITRO DE L'EFFET COMBINE DE LA TEMPERATURE ET DE L'ACTIVITE DE L'EAU SUR LA CROISSANCE DE PECTOBACTERIUM spp.	44
3.1.1. <i>Matériels biologiques</i>	44

3.1.2. Modification de l'activité de l'eau (a_w) du milieu de culture liquide à base de sels (milieu ceria).....	44
3.1.3. Courbe d'étalonnage.....	45
3.1.4. Inoculation, incubation et suivie de la croissance bactérienne	45
3.1.5. Stabilité de l' a_w au cours de l'expérimentation <i>in vitro</i>	45
3.1.6. Activités spécifiques des Pectates lyases (PEL).....	46
3.1.7. Plan expérimental	46
3.1.8. Modélisation.....	47
3.1.8.1. Modèle primaire	47
3.1.8.2. Modèle secondaire.....	48
3.1.8.3. Evaluation de la performance des modèles <i>in vitro</i>	48
3.2. ETUDES ET MODELISATION PREDICTIVE IN VIVO DE L'EFFET COMBINE DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE RELATIVE SUR LA DENSITE DE LA POPULATION DE PECTOBACTERIUM spp. ET SUR LE DEVELOPPEMENT DE LA POURRITURE MOLLE DES TUBERCULES DE POMME DE TERRE	49
3.2.1. Matériels.....	49
3.2.1.1. Matériel végétal	49
3.2.1.2. Matériels biologiques	49
3.2.1.3. Milieux semi-sélectifs	49
3.2.2. Méthodes	49
3.2.2.1. Préparation des différentes humidités relatives.....	49
3.2.2.2. Dispositif expérimental	50
3.2.2.3. Préparation de l'inoculum et des suspensions bactériennes	52
3.2.2.4. Inoculation et incubation des cylindres de chair de tubercules de pomme de terre.....	52
3.2.2.4.1. Etude de l'effet de la température, de l'humidité relative et de la concentration en inoculum sur la densité de la population de <i>Pectobacterium</i> spp.	52
3.2.2.4.2. Etude de l'effet de la température, de l'humidité relative et de la concentration en inoculum sur le développement des symptômes de pourriture molle.....	53
3.2.2.5. Enumération des bactéries.....	53
3.2.2.6. Quantification des symptômes	53
3.2.2.7. Evaluation de la performance des modèles établis <i>in vivo</i>	54

3.2.2.8. Corrélation entre la densité de la population de <i>Pectobacterium</i> spp., et le développement des symptômes de pourriture molle	54
CHAPITRE 4: RESULTATS ET DISCUSSION.....	55
4.1. MODELISATION DE L'EFFET COMBINE DE LA TEMPERATURE ET DE L'ACTIVITE DE L'EAU SUR LA CROISSANCE IN VITRO DE PECTOBACTERIUM SPP.....	55
4.1.1. <i>Effet de l'activité de l'eau et de la température sur le taux de croissance spécifique maximal</i>	55
4.1.2. <i>Evaluation de la performance des modèles prédictifs in vitro.....</i>	59
4.1.3. <i>Effets de la température et de l'a_w sur l'activité spécifique des Pectates lyases ...</i>	60
4.2. MODELISATION PREDICTIVE DE L'EFFET COMBINE DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE RELATIVE SUR LA DENSITE DE LA POPULATION DE PECTOBACTERIUM SPP. ET SUR LE DEVELOPPEMENT DE LA POURRITURE MOLLE DES TUBERCULES DE POMME DE TERRE	63
4.2.1. <i>Effet de la température, de l'humidité relative et de la concentration initiale d'application sur la densité moyenne de la population de Pba et Pcc</i>	63
4.2.2. <i>Effet de la température, de l'humidité relative et de la concentration en inoculum sur le développement des symptômes de pourriture molle des tubercules de pomme de terre</i>	65
4.2.3. <i>Validation des modèles prédictifs in vivo.....</i>	75
4.2.3.1. Modèles décrivant la densité de population bactérienne à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre	75
4.2.3.2. Modèles décrivant le développement de la pourriture molle au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre	76
4.2.4. <i>Corrélation entre la densité de la population de Pba, de Pcc et le développement des symptômes de pourriture molle.....</i>	77
4.2.5. <i>Liens entre les résultats obtenus in vitro et in vivo.....</i>	77
CHAPITRE 5: CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	79
5.1. CONCLUSIONS GENERALES	79
5.2. PERSPECTIVES	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83
ANNEXES.....	110



Chapitre 1: **Revue de la littérature**

Chapitre 1: Revue de la littérature

1.1. Introduction générale

Les maladies post-récolte de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) sont généralement d'origine fongique ou bactérienne, et résultent pour la plupart de l'infection latente des tubercules au champ et d'une propagation subséquente en entrepôt (Stevenson et al., 2001). *Pectobacterium atrosepticum* (Pba), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) et *Dickeya* spp. anciennement nommées respectivement *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) et *Erwinia chrysanthemi* (Ech) (Gardan et al., 2003; Samson et al., 2005) sont responsables des maladies de qualité. Ces deux genres de bactéries (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) sont responsables de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre en post-récolte et de la jambe noire de la pomme de terre au champ (Pérombelon et Kelman, 1987; Van der Wolf et De Boer, 2007; De Haan et al., 2008). La pourriture molle peut causer des dommages importants dans les tubercules de pomme de terre entreposés (Charkowski, 2006; Latour et al., 2008). Cependant, en dépit de nombreuses recherches, aucun traitement chimique efficace n'existe (Peters et al., 2007; Evans et al., 2010) et aucune variété cultivée n'est totalement résistante vis-à-vis de la pourriture molle et la jambe noire (Rasche et al., 2006; Czajkowski et al., 2011).

En stockage, la température et la formation d'eau libre à la surface des tubercules de pomme de terre par le phénomène de la condensation (Pérombelon et Salmond, 1995; Pringle, 1996) au sein du tas des tubercules où la ventilation est peu efficace, jouent un rôle déterminant dans l'initiation de l'infection et le développement des symptômes de la maladie (Pérombelon et Kelman, 1980; Pérombelon, 2002). Des travaux abordant l'effet *in vitro* de la température et de l'activité de l'eau (a_w) sur la croissance et l'activité des pectates lyases (PEL) des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. infectant la pomme de terre sont disponibles dans la littérature (Mildenhall et al., 1981; Mildenhall et Prior, 1983; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1992; Smadja et al., 2004a).

Plusieurs auteurs ont suggéré également que l'initiation de la pourriture molle dépendait du niveau de la population des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. sur tubercule (Bain et al., 1990; Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003). En effet, lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, les bactéries (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) présentes à l'état latent au niveau du site d'infection entrent en multiplication active et atteignent une population seuil de 10^7 - 10^8 cellules/g de tissu nécessaire à la production de

large variété d'enzymes lytiques extra-cellulaires capables de macérer les tissus de l'hôte (Barras et al., 1994; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2001; Toth et al., 2003). Ces enzymes extra-cellulaires permettent aux *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. d'assurer leurs besoins énergétiques (fonction trophique) et leur progression dans les tissus de l'hôte (Boucher et al., 2001). Au niveau du tubercule, la contamination s'effectue le plus souvent par les lenticelles et les blessures occasionnées par les insectes, les nématodes et les matériels agricoles (Pérombelon et Salmond, 1995; Pérombelon, 2000).

Plusieurs études ont été consacrées à l'écologie des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. infectant la pomme de terre et à leurs maladies qu'elles occasionnent (Pérombelon et Kelman, 1980; Stanghellini, 1982; Pérombelon, 1992a). Des études de détection des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. sur milieu crystal violet pectate (CVP) (Pérombelon et Hyman, 1986; Pérombelon et Burnett, 1991; Hyman et al., 2001; Hélias et al., 2012), par sérologie (Gorris et al., 1994; Pérombelon et Hyman, 1995; Van der Wolf et al., 1996; Singh et al., 2000) et PCR (Fréchon et al., 1998; Toth et al., 1999a; Anajjar et al., 2007; Diallo et al., 2009; Nabhan et al., 2012) ont été également effectuées.

La nécessité de l'humidité dans le développement de la maladie nous amène à penser que ces bactéries (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) phytopathogènes de la pomme de terre seraient sensibles à la dessiccation. Il est donc important d'étudier la relation de ces bactéries (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) vis-à-vis de l'activité de l'eau (a_w). Pour finir, peu de travaux ont été dédiés à la modélisation de la population de ces deux genres de bactéries (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) phytopathogènes de la pomme de terre tant *in vitro* qu'*in vivo*. Malgré, une incidence croissante de *Dickeya* spp., au cours de ces dernières années en Europe de l'Ouest et du Nord (Laurila et al., 2008; Toth et al., 2011), ce travail s'intéressera à Pba et Pcc car étant essentiellement liées à la pomme de terre dans les pays tempérés (Czajkowski et al., 2011). Le présent travail se propose d'apporter une contribution à l'étude des conditions environnementales (température et humidité relative) dans la gestion du risque lié aux *Pectobacterium* spp. par la mise au point de modèles prédictifs de la croissance bactérienne et du développement de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre.

1.2. Généralité sur *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.

1.2.1. Taxonomie et description

Les genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, autrefois regroupés sous le genre *Erwinia*, appartiennent à la famille des Entérobactériacées. Ce sont des bactéries phytopathogènes Gram (-), anaérobiques facultatives, ayant une forme de bâtonnet (0,5-1 µm de diamètre sur 1-3 µm de longueur) et munies de flagelles périthriches (Hauben et Swings, 2005; Charkowski, 2006).

Pendant plusieurs décennies, les entérobactéries causant les maladies de la pourriture molle ont été rangées dans le groupe des carotovoras par Dye (1969) bien qu'il était évident que les *Erwinias* responsables de la pourriture molle et de la nécrose des organes végétaux de diverses cultures ne puissent pas être décrites par le même genre (Charkowski, 2006). Le groupe des carotovoras comptait trois espèces principales (Dye, 1969): *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall) (Eca), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) (Ecc) et *Erwinia chrysanthemi* (Burkholder) (Ech).

La position taxonomique et la spéciation au sein du genre *Erwinia* ont été longtemps l'objet de controverses et de polémiques à cause de l'hétérogénéité des souches d'un même taxon (Paulin et al., 2001; Hauben et Swings, 2005; Costa et al., 2006). Waldee (1945) a proposé que le genre *Erwinia* puisse être limité aux pathogènes (*Erwinia amylovora*, *Erwinia salicis*, et *Erwinia tracheiphila*) occasionnant des nécroses sèches et des flétrissements au niveau des plantes hôtes tandis que les bactéries phytopathogènes pectinolytiques (*Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*) responsables de pourriture molle puissent être placées dans un nouveau genre qu'il nomma *Pectobacterium*. Bien que la suggestion de Waldee ait été supportée par des travaux scientifiques (Brenner et al., 1973) cette nouvelle nomenclature n'a pas été unanimement acceptée par la communauté scientifique (Pérombelon, 2002; Hauben et Swings, 2005). En effet, plusieurs espèces étaient taxonomiquement intermédiaires entre le genre *Erwinia* et *Pectobacterium* c'est-à-dire très proches d'*Erwinia carotovora* mais ne causent pas de pourriture (Hauben et Swings, 2005). D'autres auteurs (Kwon et al., 1997; Hauben et al., 1998) s'appuyant sur l'étude des séquences 16S de l'ADNr, ont proposé de placer le genre des bactéries pectinolytiques (*Erwinia*) dans le genre *Pectobacterium*, rejoignant ainsi Waldee (1945). La nouvelle nomenclature des sous-espèces d'*Erwinia* suggérée par ces auteurs et consignée dans la seconde édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Hauben et al., 2005) est: *Pectobacterium carotovorum* subsp.

atrosepticum (pour Eca), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (pour Ecc) et *Pectobacterium chrysanthemi* (pour Ech).

Cependant, des travaux récents de taxonomie (Gardan et al., 2003; Samson et al., 2005) ont abouti à une nouvelle nomenclature des espèces d'*Erwinia*. L'analyse d'une collection de souches d'*Erwinia* spp. associant des techniques moléculaires, phénotypiques et sérologiques ainsi que les analyses phylogénétiques ont conduit les auteurs à distinguer clairement *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*. Les bactéries pathogènes de la pomme de terre ont été donc subdivisées en deux genres différents. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* et *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* s'appellent respectivement *Pectobacterium atrosepticum* (Pba) et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) (Gardan et al., 2003) pendant que *Erwinia chrysanthemi* devient *Dickeya* spp. (Samson et al., 2005). Les espèces de *Dickeya* spp. associées à la pomme de terre sont *Dickeya dadantii* (anciennement Ech 3937), *Dickeya zae* (anciennement Ech biovar 3), *Dickeya dianthicola* (anciennement Ech biovars 1 et 7) (Samson et al., 2005; Tsror et al., 2009) et la nouvelle dernière espèce provisoirement nommée “*Dickeya solani*” (Parkinson et al., 2009; Cahill et al., 2010; Toth et al., 2011). Nous utiliserons dans ce travail, la dernière classification susmentionnée du genre *Erwinia* proposée par Gardan et al. (2003) et Samson et al. (2005).

Par ailleurs, de nouvelles sous-espèces de *Pectobacterium* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*) associées à des symptômes de jambe noire de la pomme de terre ont été découvertes au Brésil (Duarte et al., 2004) puis en Afrique du Sud (Van der Merwe et al., 2010).

1.2.2. Distribution géographique et incidence économique

La répartition géographique des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. est conditionnée par la présence d'hôtes sensibles mais surtout par leurs exigences thermiques.

Pba est répandue dans les régions tempérées froides et infecte uniquement la pomme de terre (Pérombelon, 1992a; Toth et al., 2003; Kado, 2006). Sous les climats tempérés, la bactérie a pour hôte principal la pomme de terre (Pérombelon et Kelman, 1980; Glasner et al., 2008) bien que des souches aient été occasionnellement isolées de tomates (Barzic et al., 1976), de choux chinois (De Boer et al., 1987b) et de poivrons (Stommel et al., 1996). L'association préférentielle de Pba à la pomme de terre peut être expliquée en termes de concordance entre les exigences écologiques de la bactérie et celles de cette culture (Pérombelon, 1992b).

Pcc est distribuée sur une aire géographique plus vaste et est la cause de la pourriture molle d'une diversité de fruits et légumes (pomme de terre, chou de bruxelles, poivre, carotte, etc.) (Hadas et al., 2001).

Enfin, *Dickeya* spp. sévit en zone tropicale et subtropicale sur de nombreuses cultures telles que la pomme de terre, la banane, le chrysanthème, l'ananas, etc. (Priou et Jouan, 1989; Pérombelon, 2002; Kado, 2006). Cependant, certaines espèces de *Dickeya* se rencontrent de plus en plus en régions tempérées (Europe de l'Ouest et du Nord) notamment *Dickeya dianthicola* et "*Dickeya solani*" (Joutsjoki et al., 2005; Laurila et al., 2008; Tsror et al., 2009; Toth et al., 2011).

Les pertes économiques causées par *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. peuvent être chiffrées en millions d'euros en Europe de l'Ouest (Latour et al., 2008; Cirou et al., 2009). Les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. engendrent sur les cultures de pomme de terre un refus ou un déclassement des lots de semences, ainsi qu'un refus à l'exportation (Pérombelon, 2000; Toth et al., 2011). Elphinstone et Pérombelon (1986a) ont montré qu'un tubercule de pomme de terre infecté pouvait engendrer la contamination de 100 kg de tubercules de pomme de terre sains en conservation. En Belgique, aux Pays-Bas, en Allemagne et en France on observe ces dernières années, une recrudescence de la pourriture molle sur tubercule en conservation et de la jambe noire en végétation (Dupuis et al., 2005; Palacio-Bielsa et al., 2006; Laurila et al., 2008).

1.2.3. Source d'inoculum et facteurs de contamination

La contamination des plantes et tubercules de pomme de terre se fait à partir de différentes sources d'inoculum et est sous l'effet de facteurs biotiques ou abiotiques variés.

1.2.3.1. Rôle du tubercule mère

Plusieurs auteurs, ont établi que le tubercule mère joue un rôle important dans la conservation, la transmission et la dissémination de *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. (Pérombelon et Kelman, 1980; Hélias et al., 2000b; Czajkowski et al., 2009; Toth et al., 2011). Les bactéries peuvent être localisées à l'état latent dans le système vasculaire, les lenticelles ou à la surface des tubercules (Nielsen, 1978; Pérombelon, 2000). Si elles tendent à disparaître rapidement de la surface des tubercules en conditions sèches, les populations bactériennes sont capables de se maintenir pendant les six à sept mois de stockage à un niveau de contamination

sensiblement constant au sein des lenticelles (Pérombelon, 1973). Par ailleurs, les blessures occasionnées lors de la manipulation des tubercules (plantation, récolte et tri) constituent également une porte d'entrée de *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. (Pérombelon et Kelman, 1980). Ce type de contamination se produit principalement lors du contact de tubercules sains avec des tubercules malades (Elphinstone et Pérombelon, 1986a). Par ailleurs, les bactéries persistent mieux au niveau des blessures profondes où elles sont bien protégées de la dessiccation après leur cicatrisation (Pérombelon, 1992a). En cours de culture, la contamination de la descendance peut se produire après la pourriture du tubercule mère, lorsque les bactéries sont libérées dans le sol. Transportées par l'eau libre, les bactéries envahissent alors la rhizosphère des plantes et infectent les tubercules fils. Lorsque le sol est sec, peu de tubercules mères pourrissent et la transmission des bactéries aux tubercules fils est faible (Elphinstone et Pérombelon, 1986b). La capacité au champ du sol (quantité d'eau retenue par le sol) influence également les niveaux de contamination par l'intermédiaire des lenticelles, qui s'ouvrent dans des sols mouillés permettant ainsi l'entrée des bactéries. La contamination des tubercules fils par une plante mère infectée peut également se produire via les stolons susceptibles de transmettre les bactéries au travers le système vasculaire (Hélias et al., 2000b).

Outre, la capacité au champ du sol, le niveau de contamination du tubercule de semence est un facteur important pour le développement de la maladie. Ainsi, des tubercules fortement contaminés par les bactéries ont plus de chances de voir la maladie se développer, indépendamment des conditions environnementales (Bain et al., 1990; Hélias et al., 2000a). Le seuil de contamination minimum permettant au symptôme de la jambe noire de se développer a été établi à environ 10^3 bactéries par tubercule (Bain et al., 1990). Cependant, il n'y a pas actuellement de relation entre le niveau de contamination d'une culture et celui de la descendance de cette culture l'année suivante.

1.2.3.2. Rôle du sol et de la rhizosphère

Les bactéries responsables de la pourriture molle et de la jambe noire auraient une très faible capacité à survivre seules dans le sol. La population de *Pectobacterium* spp. augmente fortement en présence d'exsudats racinaires de plantes (adventices ou cultures) selon McCarter-Zorner et al. (1985). A l'opposé, en cas d'absence ou de quantités moindres de nutriments liées à la récolte ou la maturité des plantes, la population bactérienne diminue jusqu'à un niveau non détectable. La présence d'antagonistes peut également expliquer ce

déclin. Pérombelon et Hyman (1989) estiment, que la longévité des bactéries Pba et Pcc est limitée dans le sol qui possède peu de réserves nutritives comparé aux tissus de plantes au sein desquels les bactéries se développent habituellement. Incapables d'adapter leur métabolisme et d'accumuler des réserves, elles ne peuvent concurrencer favorablement les autres micro-organismes du sol (Pérombelon, 1992a). Les études menées par Van der Wolf et al. (2007) montrent, quant à elles, que les *Dickeya* spp. ne survivent pas plus de trois semaines dans un sol nu.

Contrairement à l'humidité, la température du sol semble avoir un effet plus marqué sur la survie des bactéries. Ainsi, Pérombelon et Hyman (1989) ont montré que Pba et Pcc meurent rapidement dans un sol dépassant les 25°C, alors qu'elles peuvent survivre plusieurs semaines, voire plusieurs mois, à des températures avoisinant 10 à 20°C. Des résultats similaires rapportés par De Mendonça et Stanghellini (1979) montrent la survie de *Pectobacterium* spp. dans les couches inférieures du sol (15-30 cm) où les conditions environnementales sont plus stables et favorables (fluctuations moindres de la température et de l'humidité). Pcc décrite comme ayant une plus grande capacité de survie que Pba, est également plus fréquemment mise en évidence dans la rhizosphère (Pérombelon et Hyman, 1989).

McCarter-Zorner et al. (1985) ont observé la présence de Pba et Pcc au sein de la rhizosphère de différentes cultures (laitues, carottes et betteraves à sucre). Les cultures de *Brassicaceae* (brocoli, colza, rutabaga, navet et chou) sont reconnues comme hébergeant Pba et Pcc fréquemment et à des niveaux relativement élevés (McCarter-Zorner et al., 1985; Pérombelon et Hyman, 1989). Les bactéries sont également isolées à partir de rhizosphères d'adventices (laiteron, mouron, pâturin, amarante, chénopode blanc et renouée) (McCarter-Zorner et al., 1985). Peu d'informations existent concernant le potentiel de survie des *Dickeya* spp. hormis leur description sur des morelles douces amères (Olsson, 1985). L'importante gamme d'hôtes de ce pathogène laisse supposer que d'autres adventices pourraient permettre son maintien dans l'environnement.

1.2.3.3. Rôle de l'eau et des aérosols

Dans la plupart des pays du monde, *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. ont été mis en évidence dans les eaux de rivières, la nappe phréatique, les pluies, les aérosols et même les océans.

Pba et Pcc ont été isolées dans plusieurs rivières aux États-Unis et en Europe (Powelson, 1985; Pérombelon et Hyman, 1987), Pcc étant plus fréquent que Pba. La contamination de rivières par *Dickeya* spp. est mise en évidence en Suède par Olsson (1985), aux Pays-Bas par Van Vuurde et al. (1994), en Australie par Cother et al. (1992); en Finlande par Laurila et al. (2007) et en Ecosse par Cahill et al. (2010). Les homologies observées entre des souches isolées de pomme de terre et d'eau de rivières confortent l'hypothèse selon laquelle ces dernières constituent des sources potentielles de contamination via l'irrigation (Cother et al., 1992; Laurila et al., 2007; Kapsa, 2008).

Pérombelon et Hyman (1987) ont isolé Pba et Pcc dans l'eau des drains souterrains de champs plusieurs années après une culture de pomme de terre.

Pba et Pcc peuvent également être isolées à partir d'échantillons d'eau de mer (McCarter-Zorner et al., 1982), de pluies et d'aérosols, voire de neiges (Franc et al., 1985).

Les aérosols générés par la pluie ou l'arrosage par aspersion sur des tiges malades, ou lors du défanage avant la récolte peuvent également disperser Pba et Pcc sur plusieurs centaines de mètres (Graham et Harrison, 1975). La survie de ces bactéries dans les aérosols semble être de courte durée puisque seulement 50% des bactéries survivent après 5 à 10 minutes (Pérombelon, 1992a).

1.2.3.4. Transmission par le matériel et les pratiques agricoles

Le passage de machines agricoles contaminées lors de la culture constitue un autre mode de dissémination des bactéries. La plantation, la récolte et le tri mécanique des tubercules peuvent également être la cause de la propagation des pathogènes entre les lots de pomme de terre et au sein des stocks. Cette contamination a principalement lieu lors du contact de tubercules sains avec des tubercules ou du matériel infectés (Van Vuurde et al., 1994). Il a ainsi été montré que les niveaux de contamination étaient trois fois plus élevés pour les tubercules récoltés, calibrés et conditionnés en utilisant les pratiques mécaniques par rapport aux tubercules récoltés manuellement (De Boer, 2002).

Un défaut de désinfection du matériel ainsi que les blessures occasionnées sur les grilles des trieuses lors de la manipulation des tubercules lors de la plantation ou après la récolte favorisent également les contaminations (Elphinstone et Pérombelon, 1986a). Le lavage des tubercules avant leur commercialisation peut également disséminer la bactérie dans les lots de pomme de terre lorsque l'eau servant au lavage n'est pas renouvelée ou décontaminée (Pérombelon et Kelman, 1980).

1.2.3.5. Transmission par les insectes

Les insectes (diptères et notamment les drosophiles) sont également cités comme sources de contamination suite à leur passage d'une plante infectée à une plante saine (Harrison et al., 1977; Bedin, 1988). Les insectes seraient apparemment attirés par les plantes malades mais, cette attraction ne semble pas prédominante (Brewer et al., 1980). Les bactéries pourraient également être disséminées par la microfaune du sol, les pupes et larves de certains insectes comme *Thymemyia cilicrura*, ravageur du maïs, par des nématodes et des vers de terre.

Le cycle de développement de la pourriture molle de la pomme de terre est décrit par la Figure 1.

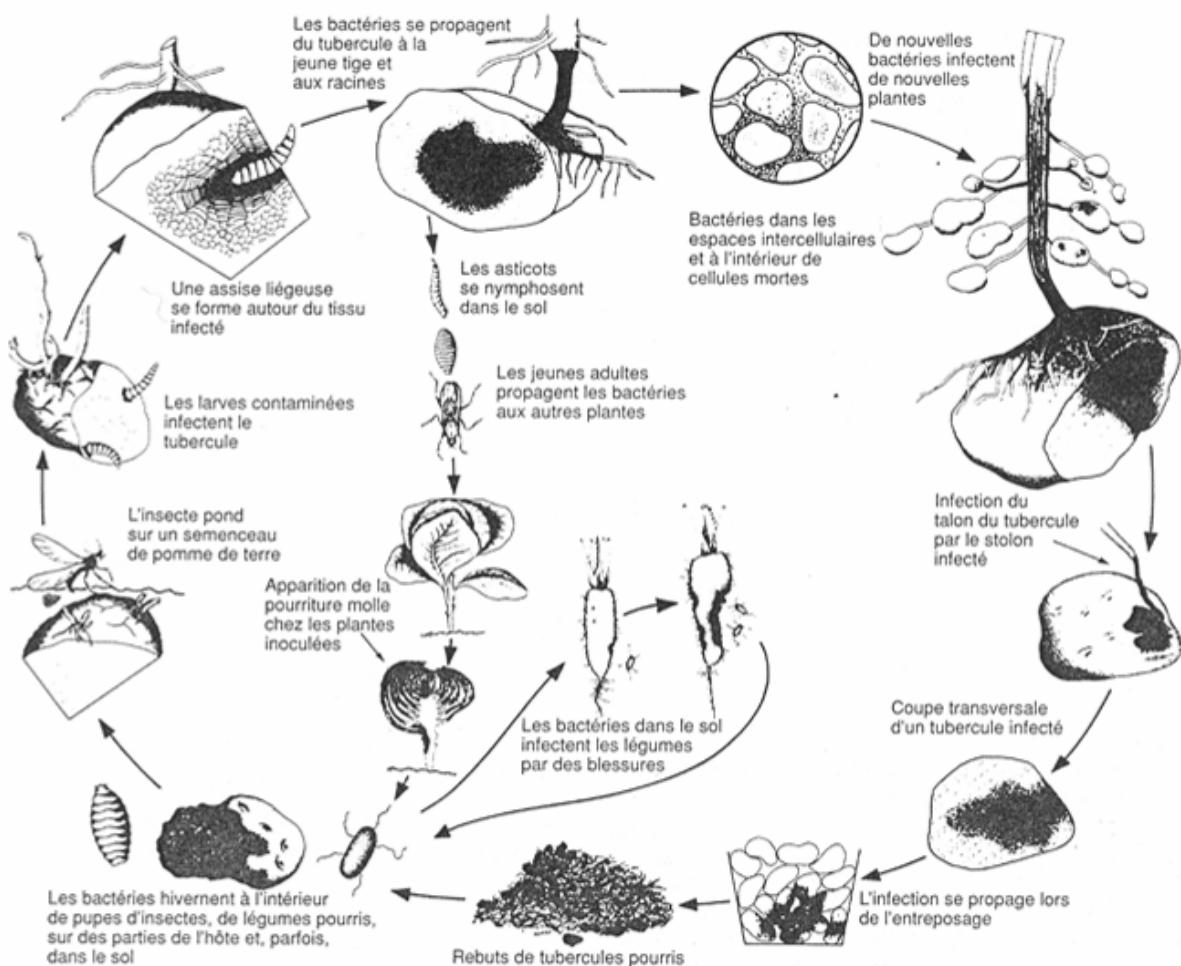


Figure 1. Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne (Source: Agrios, 2005).

1.2.4. Conditions favorables au développement de *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.

1.2.4.1. Au champ

L'initiation de l'infection et le développement des symptômes au champ sont fonction de la température, de l'humidité, du niveau de contamination, des pratiques culturales et de l'état de fertilité du sol (Lund et Kelman, 1977; Elphinstone, 1987).

La jambe noire est favorisée par des sols humides et des températures relativement fraîches (<19°C). Contrairement à la pourriture molle des tubercules de pomme de terre, la jambe noire se développe généralement en condition d'aérobiose et seul Pba et *Dickeya* spp. étaient connues comme étant liées à la maladie pendant plusieurs années (Pérombelon, 2002). Récemment, De Haan et al. (2008) ont montré dans leurs travaux que Pcc était capable de provoquer la maladie de jambe noire en régions tempérées. Un niveau minimal de 10^3 bactéries par tubercule est nécessaire à l'infection (Stead, 1999). Mais ce seuil peut varier en fonction des conditions externes (10^2 en anaérobiose à 10^4 en aérobiose) (Pérombelon et Kelman, 1987).

L'interaction entre le niveau de contamination, l'humidité du sol et la température détermine l'incidence de la maladie (Smadja et al., 2004a) et le type de symptômes (Elphinstone, 1987). Ainsi, un temps humide à la plantation et chaud au moment de la levée provoquera des manques à la levée, parfois associés à la jambe noire. Un temps humide à la plantation et des conditions fraîches au moment de la levée favoriseront la jambe noire, avec parfois des dessèchements si par après les conditions sont plus sèches.

Un niveau de mécanisation élevé est responsable d'une incidence plus grande de la maladie, due aux coups, aux blessures et à la transmission de l'inoculum par le matériel (Elphinstone et Pérombelon, 1986a). Cette augmentation de l'incidence n'est cependant pas chiffrée.

Les risques de développement de la maladie et de contamination des tubercules au champ, sont plus élevés dans des parcelles ayant eu antérieurement des difficultés sanitaires. La fumure azotée serait favorable au développement de la jambe noire. Par contre, une étude menée par Graham et Harper (1966) montre une relation inversement proportionnelle entre la quantité de fumure complète ($N_2P_2O_5K_2O$) appliquée, ou d'azote seul ($(NH_4)_2SO_4$) et le nombre de plantes atteintes de jambes noires.

Le manque de maturité, les radiations solaires, les gelées, la salinité excessive, les dégâts causés par d'autres pathogènes sont également des facteurs favorables au développement des symptômes de pourriture molle (Tweddell et al., 2003).

1.2.4.2. Au stockage

En entrepôt, la pourriture molle débute généralement sur des tubercules situés au fond du tas de pomme de terre, où la ventilation est déficiente et la condensation fréquente, à tel point qu'au moment de s'en rendre compte, une bonne partie de la récolte est déjà irrécupérable.

Les conditions nécessaires à l'initiation des pourritures molles de tubercules de pomme de terre en conservation sont: l'anaérobiose, l'eau libre, la température supérieure au minimum requis pour la croissance bactérienne, le potentiel hydrique des cellules du tubercule élevé (Pérombelon et Kelman, 1980) et un seuil minimum de bactéries (10^3 bactéries par tubercule) (Bain et al., 1990).

L'anaérobiose affaiblit la résistance de l'hôte (par son effet défavorable sur la synthèse des phytoalexines, composés phénoliques, radicaux libres, etc.) (Maher et Kelman, 1983; Bolwell et Wojtaszek, 1997; Pérombelon, 2002), inhibe la lignification et la subérisation des cellules (protègent contre les enzymes pectiques) et augmente la perméabilité membranaire (Pérombelon, 2002).

L'eau libre entraîne le maintien des conditions d'anaérobiose au niveau du tubercule (Burton et Wigginton, 1970). Elle favorise également le déplacement des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. dans les tissus de l'hôte (McGuire et Kelman, 1984; Toth et al., 2003), la turgescence des cellules du tubercule provoquant leur sensibilisation à la pourriture molle.

La température influence le développement de l'une ou l'autre des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. selon le minimum requis pour la croissance (Pérombelon, 2002).

1.2.5. Symptômes sur plant et sur tubercule

L'apparition et la nature des symptômes causés par *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. dépendent des conditions environnementales (température et humidité), de la pomme de terre (génotype, âge physiologique des tubercules, teneur en calcium, en eau, etc.), de la partie du végétal infectée et enfin des interactions avec d'autres agents pathogènes, tels que *Clostridium* spp., *Clavibacter michiganensis*, *Verticillium* spp., et le nématode *Ditylenchus destructor*, inféodés à cet hôte (Pérombelon, 1992b; Pérombelon, 2002; Charkowski, 2006). Il existe également une difficulté à distinguer les symptômes dus à chacune de ces bactéries (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) sur tubercule ou sur plant de pomme de terre (Pérombelon, 1972; Pérombelon et Kelman, 1987; Charkowski, 2009).

1.2.5.1. Symptômes sur les parties aériennes

Pectobacterium spp. et *Dickeya* spp. attaquent la tige du plant de la pomme de terre en cours de végétation provoquant ainsi la jambe noire (ou *Blackleg*). Les bactéries colonisent d'abord les vaisseaux du xylème de la plante et se multiplient par la suite dans les espaces intercellulaires de l'hôte en sécrétant une série de pectinases qui dégradent la paroi mitoyenne des cellules et destabilisent le parenchyme provoquant ainsi la macération des tissus. Ces phénomènes interrompent le transport de l'eau et des éléments minéraux, vers le sommet de la plante, provoquant des symptômes de flétrissement et de jaunissement du feuillage (Hélias et al., 2000a). L'infection induit ensuite une pourriture molle de la tige qui prend une coloration brune foncée à noire, à la base des tiges (Figure 2A), du point d'attache des feuilles sur la tige (Figure 2B), ainsi que des nécroses plus ou moins sèches (Figure 2C). Par ailleurs, il faut prendre garde à ne pas confondre les flétrissements et enroulement-jaunissements liés à la jambe noire avec ceux, proches, pouvant apparaître en cas de sclerotiniose, de rhizoctone ou de flétrissement bactérien, causés respectivement par *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* et *Ralstonia solanacearum*.

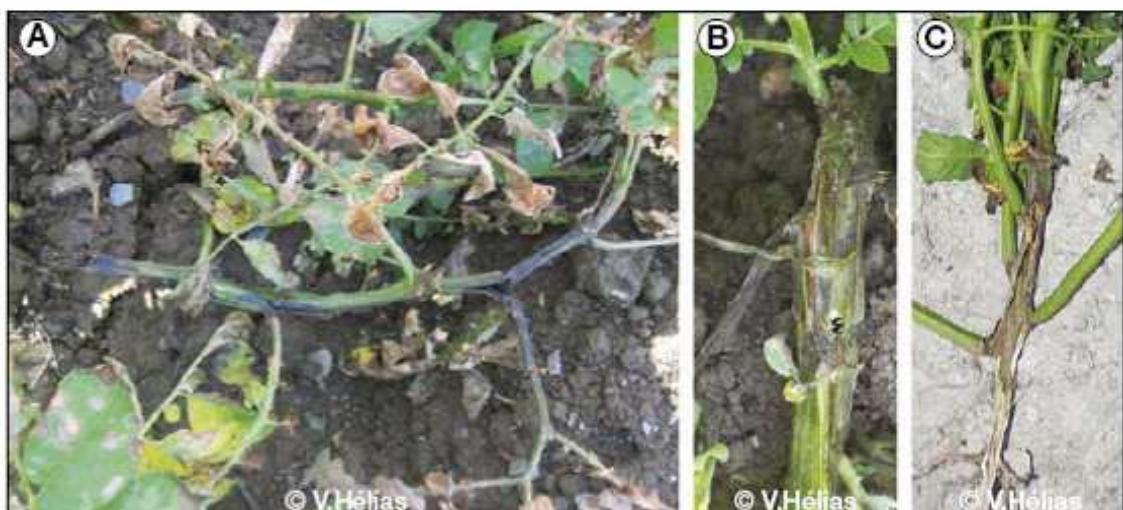


Figure 2. Symptôme de jambe noire, variant de pourritures humides brun foncé à noire de la base des tiges à des nécroses plus ou moins sèches et/ou tiges creuses (Source: Hélias, 2008).

1.2.5.2. Symptômes sur les tubercules

La maladie est provoquée par les trois bactéries (Pba, Pcc et *Dickeya* spp.) qui peuvent agir séparément ou simultanément (Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003; Van der Wolf et De Boer 2007). Les symptômes observés sur tubercules se caractérisent par des pourritures molles. Des petites tâches diffuses d'aspect graisseux commencent généralement par

apparaître autour des lenticelles, des blessures ou du talon, puis s'étendent rapidement à l'intérieur du tubercule. La bactérie dégrade les tissus du tubercule provoquant une macération du parenchyme. La pourriture molle, de couleur claire, brunit jusqu'au noir (Figure 3). Au niveau des tissus du tubercule, la production de poches gazeuses, sont à l'origine d'une odeur nauséabonde très prononcée (Pérombelon et Kelman, 1980). Les tissus infectés sont nettement délimités des parties saines. En conditions sèches, les lésions peuvent devenir creuses, dures et sèches. Dans d'autres cas, l'infection est stoppée et la zone malade se dessèche, laissant une zone creuse remplie d'une masse de matériel mort, dur et noir. En stockage, la pourriture peut s'étendre à tout le stock causant ainsi des dégâts très importants (Romdhani, 1994; Pérombelon, 2002). Les attaques précoce de la bactérie au champ peuvent faire pourrir les tubercules-mères et provoquer des pertes à la levée ou fonte de semis (Pérombelon et Salmon, 1995). D'autres bactéries pectinolytiques (*Clostridium* spp., *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp.) peuvent être associées dans la pourriture des tubercules en conservation, particulièrement lorsque les températures sont élevées (Campos et al., 1982; Pérombelon et Kelman, 1987), mais les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. macergènes restent les agents les plus fréquents et les plus dommageables.

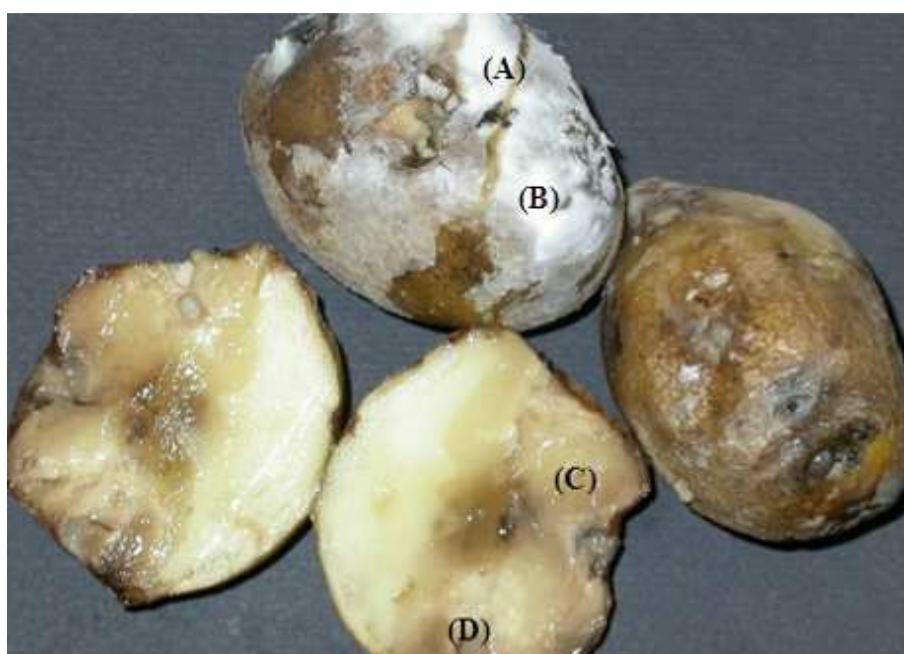


Figure 3. Tubercules de pomme de terre infectés par Pba 709 après trois jours d'incubation à 24 °C et à 100% d'humidité relative. (A): Suintement du tubercule qui favorise la dissémination de la maladie en entrepôt; (B): Développement secondaire de moisissure; (C): Chair du tubercule pourrie; (D): Sites d'infection (Source: Yaganza, 2005).

1.2.6. Enzymes impliquées dans la pathogénicité

Pectobacterium spp. et *Dickeya* spp. produisent plusieurs variétés d'enzymes pectiques extra-cellulaires capables de dégrader les parois cellulaires de l'hôte (Barras et al., 1994; Alfano et Collmer, 1996; Pérombelon, 2002; Terta et al., 2010). Ces enzymes extra-cellulaires renferment des pectinases, des cellulases, des protéases et des xylanases (Collmer et Keen, 1986; Barras et al., 1994). Parmi ces enzymes les pectinases jouent un rôle prépondérant dans le développement de la maladie. Quatre types de pectinases sont connus, les pectates lyases (PEL), pectines lyases (PNL) et les pectines méthyles estérases (PME) avec un pH optimum élevé (~8); et les polygalacturonases (PEH) avec pH optimum faible (~ 6) (Barras et al., 1994; Toth et al., 2003). Les PEL sont les plus importantes dans le développement de la maladie (Smadja et al., 2004a). Des extraits purifiés de PEL provoquent la macération et la mort cellulaire (Basham et Bateman, 1975; Liao, 1989). En outre, des souches de *Dickeya* spp. dont le gène codant pour les PEL a été inactivé par délétion sont devenues moins virulentes (Ried et Collmer, 1988; Beaulieu et al., 1993; Jafra et al., 1999). On distingue trois principaux types de PEL chez Pba (Pel A, B et C), quatre principaux types de PEL (Pel A, B, C et D) au niveau de Pcc et cinq types majeurs de PEL repartis en deux groupes (Pel A, D, E et Pel B, C) et quatre formes secondaires de PEL (Pel I, L, Z et X) avec *Dickeya* spp. (Barras et al., 1987; Beaulieu et al., 1993; Thomson et al., 1999). Les PEL dégradent les substances pectiques de la paroi cellulaire des plantes par β -élimination, provoquant la formation de produit insaturé C4-C5 (Collmer et Keen, 1986). En plus du pH, l'activité enzymatique des PEL est dépendante de la température. Smadja et al. (2004a) ont montré au cours de leurs travaux que la température optimale de pathogénicité de Pba et Pcc est liée à la température optimum de l'activité des PEL et non à leur température optimum de croissance.

La production de ces enzymes de pathogénicité est dépendante de la densité bactérienne de *Pectobacterium* spp. et est régulée par un système de *quorum-sensing* (Fuqua et al., 1994; Whitehead et al., 2002; Smadja et al., 2004a; Ferluga et al., 2008). Celui-ci permet l'expression des gènes de virulence seulement lorsqu'un quorum bactérien est atteint. Afin d'évaluer leur densité et donc de percevoir ce quorum, les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. pectinolytiques synthétisent des molécules signal diffusibles appelés la N-acylhomoserine lactone (AHL) à travers leurs membranes cellulaires. Lorsque la multiplication bactérienne atteint le quorum, la concentration en signaux AHL dans le milieu devient suffisamment élevée pour être perçue par les bactéries comme un signal d'activation de la synthèse des enzymes de pathogénicité (Waters et Bassler, 2005; Reading et Sperandio, 2006; Ferluga et al., 2008; Charkowski, 2009). Cette molécule et ses analogues

fonctionneraient comme un signal régulateur universel, également présents chez d'autres microorganismes.

La régulation de la synthèse des enzymes impliquées dans le pouvoir pathogène des *Pectobacterium* spp. serait également réalisée par l'accumulation au niveau du site d'infection des produits issus de la dégradation de la paroi cellulaire de l'hôte tel que le 5-keto-4-deoxyuronate (DKI), 2,5-diketo-3-deoxygluconate (DKII) et 2-keto-3-deoxygluconate (KDG) (Toth et al., 2003; Barnard et al., 2007) ou par un autre système global de régulation contrôlant la synthèse des enzymes pectiques extra-cellulaires (Pérombelon et Salmon, 1995; Barnard et al., 2007). De plus, l'activité enzymatique est dépendante du pH du site d'infection (Nachin et Barras, 2000) et de la température (Nguyen et al., 2002; Smadja et al., 2004a).

1.2.7. Mise en évidence, détection et caractérisation des bactéries

1.2.7.1. Dénombrement sur milieux de culture spécifique

De nombreux milieux sélectifs à base de pectine ou de polypectate de sodium ont été proposés par plusieurs auteurs en vue de détecter les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. infectant la pomme de terre sur du matériel végétal malade ou apparemment sain (Pérombelon, 1971; Thornes, 1972; Burr et Schroth, 1977). Des milieux ne contenant pas de substrats pectiques ont aussi été testés (Segall, 1971; Lee et Yu, 2006).

Le milieu CVP proposé par Cuppels et Kelman en 1974, a suscité le plus d'intérêt. En effet, ce milieu permet d'éliminer un nombre assez important de la population bactérienne du sol présente sur le tubercule. C'est un milieu monocouche, à faible toxicité envers les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp., simple à préparer comparé aux autres milieux proposés. De plus, une meilleure détection, isolement et énumération des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. est observée, grâce aux cavités distinctives qu'elles y forment suite à la production importante d'enzymes pectinolytiques (Pérombelon et Burnett, 1991; Hyman et al., 2001; Hélias et al., 2012).

Pérombelon et al. (1987) s'appuyant sur cette capacité des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre à former sur milieu CVP des cavités distinctives lorsqu'elles y sont incubées 24 ou 48 heures ont proposé un schéma de formation de cavité permettant de différencier ces bactéries sur l'effet de leurs différentes températures de croissance. Pba forme des cavités à 27°C uniquement, Pcc forme des cavités à 27 et 33,5°C mais pas à 37°C. Par contre *Dickeya* spp. forme des cavités à toutes ces températures susmentionnées. La distinction entre Pba, Pcc et *Dickeya* spp. est permise par apport d'un antibiotique

(érythromycine) au milieu de culture. *Dickeya* spp. y est sensible tandis que Pba et Pcc y sont résistantes (Pérombelon et al., 1987; Janse et Spit, 1989). Cette méthode de dénombrement sur milieu CVP encore appelée *viable count method* (VCM) nécessite 48 à 72 heures pour obtenir une réponse et le matériel doit être testé dans un délai d'une heure à cause de la mort des cellules due à l'oxydation des produits phénoliques présents dans l'extrait de pelure de pomme de terre, même après l'ajout d'un antioxydant. Afin d'obtenir une identification correcte du nombre de bactéries et un prélèvement aisé des colonies, le nombre de cavités creusées dans le milieu CVP ne doit pas excéder 200 (Pérombelon et al., 1987).

Cependant, la profondeur de ces cavités distinctives est fonction de la qualité de la source (firmes industrielles) du polypectate employée pour la préparation du milieu CVP (Pérombelon et Burnett, 1991; Pérombelon et Van der Wolf, 1998; Hyman et al., 2001; Hélias et al., 2012). Van Der Wolf et al. (1996) mettent en évidence l'impossibilité de détecter Pba lorsque la quantité de Pcc dans l'échantillon est 100 fois supérieure à celle de Pba. De même, bien que les bactéries Gram (+) poussent difficilement sur le milieu CVP, certaines bactéries Gram (-) non pectinolytiques s'y développent en abondance variable selon l'origine des tubercules et peuvent inhiber la croissance des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. pectinolytiques. Un des inconvénients majeur de la méthode VCM est que toutes les souches de *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre ne peuvent pas être distinguées (Janse et Spit, 1989). En effet, certaines souches bactériennes de *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. se développent en dehors des températures de croissance susmentionnées (Pérombelon et al., 1987). Quoique certaines bactéries pectinolytiques comme les *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Clostridium* et *Bacillus*, présentes sur la pomme de terre forment aussi des cavités sur le milieu CVP, celles-ci sont différenciables par leur manque de profondeur et leur aspect diffus (Jones et al., 1994). Enfin, cette technique est mal adaptée aux tests de routine à grande échelle étant donné ses exigences en main d'œuvre.

1.2.7.2. Sérologie

Les techniques de détection basées sur la sérologie ou l'immunologie consiste en la réaction de reconnaissance entre un antigène spécifique de l'agent pathogène (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) et un anticorps (Sialer et Rosso, 2007). Les anticorps sont produits par le système immunitaire après injection d'antigène (extrait du pathogène) chez des animaux à sang chaud (mammifères, poulets, etc.). On distingue les anticorps monoclonaux et

polyclonaux qui se caractérisent respectivement par leur fixation à un ou plusieurs épitopes de l'antigène.

Les techniques sérologiques les plus utilisées pour la détection des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. sur matériel végétal sont l'Immunofluorescence (IF) (Allan et Kelman, 1977; Vruggink et de Boer, 1978) et différentes formes d'ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) comme l'ELISA indirecte, le DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) (De Boer et McNaughton, 1987a; Gorris et al., 1994) et le dot-blot ELISA (Pérombelon et Hyman, 1995). Ce choix est favorisé par la robustesse, le coût peu élevé et la simplicité d'application de ces méthodes pour des test de routine sur un grand nombre d'échantillons comparées aux autres techniques de détection (Ward et al., 2004; Peters et al., 2007).

Mais, l'efficacité des techniques sérologiques est limitée par la disponibilité d'anticorps spécifiques (De Boer, 2002; Narayanasamy, 2008; Toth et al., 2011). Dans le cas de l'ELISA, ils ne permettent que la détection de 2 sur les 9 sérogroupes connus au niveau de Pba (Pérombelon, 2002). D'où la nécessité de connaître la majorité des sérogroupes de Pba, Pcc et *Dickeya* spp. présents dans les régions de culture de la pomme de terre avant la mise en œuvre des tests sérologiques (Peters et al., 2007). Le manque de spécificité (présence de faux positifs) des anticorps disponibles (monoclonaux ou polyclonaux) dû aux réactions croisées avec les *Pseudomonas*, les *Comamonas* spp. et à la grande variabilité au sein des sérotypes des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. (Kang et al., 2003) pose un autre problème majeur dans leur utilisation pour des études épidémiologiques et d'identification de Pba, Pcc et *Dickeya* spp. Mais ce problème de réactions croisées peut être surmonté par une étape préliminaire d'enrichissement de l'extrait en condition anaérobique par suppression de la croissance des *Pseudomonas* et *Comamonas* qui sont des bactéries strictement aérobiques (Peters et al., 2007). L'ELISA ne permet pas de différencier les antigènes provenant de Pba, Pcc et *Dickeya* spp. vivantes ou mortes ou de cellules désagrégées contrairement à l'IF et l'IFC. Ceci rend difficile la quantification des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. dans le cas d'études épidémiologique. La sensibilité de ces techniques sur matériel végétal, voisine de 10^4 et 10^5 bactéries/ml pour l'IF et 10^7 bactéries/ml pour l'ELISA (Fraaije et al., 1996; Singh et al., 2000; Toth et al., 2011) est insuffisante pour permettre la mise en évidence de niveaux d'inoculum susceptibles d'induire le développement de la jambe noire et la pourriture molle (10^3 bactéries/tubercule) (Bain et al., 1990).

D'autres techniques immunologiques comme l'IFC (Immunofluorescence colony staining) (Van Vuurde et Roozen, 1990), et l'IMS (Immunomagnetic separation) (Van Der Wolf et al., 1996) permettent d'augmenter la sensibilité de la détection des *Pectobacterium* spp. L'IFC a

permet d'améliorer la sensibilité envers Pba jusqu'à 10-50 Pba/ml (Van Vuurde et Roozen, 1990). L'IMS permet un enrichissement des extraits avant l'étalement et l'énumération sur milieu CVP favorisant ainsi une réduction des risques de faux-négatifs et une amélioration de la sensibilité (10^2 UFC/ml d'extrait de pelures) de la méthode dénombrement sur milieu CVP. Récemment, une nouvelle technique immunologique utilisant la cytométrie en flux (technologie *Luminex xMAP*) a permis de détecter simultanément Pba et *Dickeya* spp., avec un seuil de sensibilité de 10^2 à 10^3 UFC/ml, après une étape d'enrichissement sur un milieu semi-sélectif à base de polypectate (Peters et al., 2007). Dans certains pays de l'Europe de l'Ouest la technique ELISA précédé d'une étape préliminaire d'enrichissement est utilisée dans les programmes de test de routine en vue de détecter les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre (Peters et al., 2007).

1.2.7.3. Biologie moléculaire

La PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne est l'une des méthodes moléculaires actuellement utilisée pour la détection et l'identification des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. infectant la pomme de terre. La technique PCR permet de réaliser une amplification sélective *in vitro* de séquences d'ADN spécifiques au génome de la bactérie (Narayanasamy, 2008). Les séquences nucléotidiques utilisées en PCR pour la détection et l'identification des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. pectinolytiques sont pour la plupart ceux des régions conservées entre les 16S et 23S de l'ADNr (Toth et al., 1999a; Toth et al., 2001; Baghaee-Ravari et al., 2011) ou celles codant pour les pectactes lyases ou gène *pel* (Darrasse et al., 1994b; Hélias et al., 1998; Nazerian et al., 2011; Tsror et al., 2012).

La PCR est devenue un outil essentiel dans les laboratoires de recherche et ses applications sont nombreuses (Ward et al., 2004; Sankarana, 2010). Les techniques de diagnostic basées sur la PCR peuvent être divisées en deux catégories, à savoir celles utilisées pour la détection et celles employées pour caractériser les isolats de *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. (Charkowski et al., 2006; Laurila et al., 2008). Les couples d'amorces utilisés pour la détection permettent d'effectuer une détection simultanée des trois bactéries (Pba, Pcc et *Dickeya* spp.) (Toth et al., 1999a; Moh, 2005) ou individuelle de Pba (Darrasse et al., 1994a; De Boer et Ward, 1995; Fréchon et al., 1998; Hyman et al., 2000b), de Pcc (Darrasse et al., 1994b; Kang et al., 2003) et de *Dickeya* spp. (Nassar et al., 1996; Tsror et al., 2012). Récemment, Diallo et al. (2009) ont, par PCR multiplex, détecté et identifié simultanément Pba et *Dickeya* spp. en associant deux couples d'amorces différents. Des études portant sur la détection quantitative des Pba sur les tubercules de pomme de terre ont été développées en

utilisant la PCR. Ces travaux ont permis de détecter et de quantifier Pba, dans l'ordre de 10^2 à 10^5 Pba/ml, à l'aide du couple d'amorce Pba1f-Pba2r et d'un ADN compétiteur cloné dans *Escherichia coli*, à travers le vecteur pGEM-T (E. coli 4R 1/1), puis additionné à l'extrait de peau de pomme de terre (Hyman et al., 2000a).

Les techniques moléculaires basées sur la PCR comme, l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Avrova et al., 2002), la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Slédz et al., 2000; Toth et al., 2001; Fessehaie et al., 2002; Yahiaoui et al., 2003), la RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) (Maki-Valkama et al., 1994; Parent et al., 1996; Toth et al., 1999b; Hadas et al., 2001), ont été développées pour différencier et étudier la variabilité des isolats de Pba, Pcc et *Dickeya* sp.

Appliquée directement sur des extraits de pelure, la PCR seule ne permet pas l'obtention de seuils de détection proches des niveaux de population suffisants pour induire le développement de la maladie (10^3 bactéries/tubercule) (Bain et al., 1990) à cause de la présence des inhibiteurs de la PCR issus de l'extrait de pelure (composés phénoliques, carbohydrates, acides humiques, etc.). C'est pourquoi, une étape préliminaire d'enrichissement sur des milieux sélectifs tel que le milieu CVP, avant la détection par PCR, a été proposée par certains auteurs en vue d'améliorer la sensibilité de la méthode PCR (Hyman et al., 1997; Toth et al., 1999a). Une autre approche est d'utiliser l'IMS-PCR (Van der Wolf et al., 1996a), l'immunocapture PCR (IC-PCR) afin de réduire les problèmes d'inhibiteurs de l'extrait de pelure et d'améliorer également la sensibilité et la spécificité de la PCR (Pérombelon et Van der Wolf, 2002; Ward et al., 2004). Les seuils de détection atteints oscillent entre 10^1 à 10^3 UFC/ml d'extrait.

L'un des inconvénients majeurs de l'utilisation de la PCR en routine sur un grand nombre d'échantillons réside dans la technique adoptée pour la révélation des amplicons PCR. Les méthodes de révélation des amplicons sont nombreuses: (1) la visualisation des produits d'amplification sur gel d'agarose par l'électrophorèse (méthode classique); (2) la capture des amplicons dans une microplaquette, suivie d'une révélation colorimétrique (PCR-ELISA et PCR-ELOSA: Enzyme-linked oligosorbent assay); (3) le transfert des produits d'amplification sur une membrane, leur hybridation avec une sonde homologue marquée et la révélation de l'épreuve par colorimétrie, chimioluminescence, fluorescence ou radioactivité.

La PCR en temps réel permet de surmonter ces problèmes liés aux opérations post-PCR. En effet, cette technique ne nécessite pas d'étape de détection post-PCR et d'ouverture des tubes PCR. Cette technique élimine aussi les risques de contamination des produits d'amplification par *carry-over* d'échantillon à échantillon et réduit donc les risques de faux positifs (Ward et

al., 2004). La PCR en temps réel permet une quantification du nombre de molécules présentes en début de réaction. A notre connaissance, peu de publications ont été décrites sur la détection des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. pathogènes de la pomme de terre par la PCR en temps réel. Takle et al. (2007) ont dans leurs travaux proposés des gènes candidats (recA et ffh) dans le but de quantifier les ARN totaux de Pba dans les tissus de l'hôte par RT-PCR en temps réel. Laurila et al. (2010) ont utilisé les sondes fluorescentes SYBR Green pour détecter et identifier par PCR en temps réel des souches de *Dickeya* spp. sur des plants de pomme de terre en Finlande.

De manière générale, les méthodes de détection moléculaire basées sur la PCR présentent les inconvénients d'être chères (Degefou, 2006) et exigeantes en main d'œuvre qualifiée (Pérombelon et al., 1998; Degefou et al., 2009). Par contre, elles sont spécifiques, sensibles, rapides (Alvarez, 2004; Narayanasamy, 2008) et pourraient être utilisées pour la quantification de *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. par tubercule d'un échantillon représentatif. Ce type d'analyse, non encore disponible en routine pour des analyses à grande échelle, pourrait aider à qualifier l'état sanitaire d'un lot de tubercules de pomme de terre afin de mieux intégrer les conditions environnementales dans la gestion du risque lié aux *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre. La PCR est également utilisée pour vérifier les résultats issus des autres méthodes de détection susmentionnées. C'est une technique de diagnostic parfaitement automatisable et compatible avec des analyses à haut débit notamment la PCR en temps réel.

1.2.8. Méthodes de lutte

L'absence de moyens de lutte chimique efficaces et agréés contre la pourriture molle et la jambe noire, oriente les agriculteurs vers d'autres moyens de lutte axés essentiellement sur des mesures prophylactiques et culturales (Rousselle-Bourgeois et Priou, 1995; Latour et al., 2008; Czajkowski et al., 2011). Ces mesures prophylactiques visent à réduire d'une part les niveaux d'inoculum au départ des cultures, et d'autre part, à rechercher les conditions qui ralentissent la multiplication et la transmission de la maladie. De même, aucune variété commerciale totalement résistante (Rasche et al., 2006; Czajkowski et al., 2011) n'a été signalée vis-à-vis de ces bactéries (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) de qualité de la pomme de terre en dépit de leurs niveaux de sensibilité différents (Pasco et al., 2006).

1.2.8.1. Contre la Jambe noire

La mise en place de la culture est conseillée sur un sol bien drainé dans l'optique d'éviter les conditions humides et asphyxiantes (anaérobies) favorables à la multiplication bactérienne puis au développement précoce de la maladie (Scott et al., 1996; Hélias, 2008). L'éradication des plantes infectées au champ et les repousses qui peuvent être des sources d'inoculum ou favoriser la dissémination des bactéries sont à encourager au niveau des agriculteurs (Fiers et al., 2012). En outre, une fertilisation azotée et raisonnée du sol est souhaitable (Olivier, 2004). Certains auteurs, rapportent qu'une fertilisation calcique (gypse) et magnésienne appropriée favoriserait la réduction des symptômes de jambe noire par stimulation de la résistance des plantes (Bain et al., 1996). En effet ces ions divalents renforcent la paroi cellulaire de la plante contre les PEL des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. (Pérombelon et Salmon, 1995; Charkowski et al., 2006; Abo-Elyousr et al., 2010). D'autres auteurs ont montré que le calcium affecte également la régulation des gènes de virulences au niveau de Pba et Pcc (Flego et al., 1997; Ahn, 2007). C'est pourquoi, le choix des sols possédant une bonne capacité d'échange cationique et ayant une bonne teneur en calcium s'avère adéquat (Bain et al., 1996; Abo-Elyousr et al., 2010). L'utilisation de tubercules-semences certifiés à la plantation (Pérombelon et Van der Wolf, 2002; Charkowski et al., 2006), couplée à la mise en œuvre d'une rotation de culture au champ permet de diminuer sensiblement l'incidence de la maladie (Hélias, 2008). La production des tubercules-semences certifiés est basée sur l'observation des symptômes de jambe noire au champ (inspection au champ) (Pérombelon, 2000) additionnée de tests sérologiques ou moléculaires en laboratoire en vue d'une confirmation (Czajkowski et al., 2011).

1.2.8.2. Contre la pourriture molle

Dans le cadre de la conservation des tubercules de pomme de terre, il est recommandé d'avoir de bonnes mesures d'hygiène au sein de l'exploitation. Il s'agit du nettoyage et de la désinfection régulière du matériel agricole, des appareils de conditionnement et des locaux d'entreposage (Rousselle et al., 1996; Hélias, 2008). En effet, les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre peuvent se conserver dans les mottes de terre se trouvant sur sol et sur les locaux d'entreposage et constituer ainsi un pouvoir de contamination non négligeable. Voici quelques désinfectant utilisés: le formol (formaldéhyde), le crésyl (huile de houille), l'eau de javel (hypochlorite de sodium) et des produits à base de phénols et d'ammonium quaternaire (Rousselle et al., 1996). Il est aussi indiqué d'employer le défanage

chimique plutôt que le défanage mécanique parce qu'il présente l'avantage de ne pas provoquer de blessures ou de chocs au niveau des tubercules. Au cours de la récolte des tubercules, il est souhaitable d'éviter une humidité excessive des sols (sensibilise à l'infection lenticillaire) et une température supérieure à 20°C (occasionne des dégâts mécaniques dus à un sol sec) (Rouselle et al., 1996). En outre, il est demandé d'éviter la présence d'un film d'eau sur les tubercules durant le stockage (Pérombelon et Salmon, 1995). L'entreposage des tubercules de pomme de terre dans un local ayant une température et une humidité relative adéquates est également un moyen de lutte efficace.

Plusieurs autres approches ou techniques de lutte contre les bactéries de qualité (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) des tubercules de pomme de terre en conservation ont été proposées avec un degré d'efficacité variable.

Afek et al. (1999) ont montré un effet désinfectant de la pulvérisation des locaux d'entreposage des tubercules de pomme de terre avec du peroxyde d'hydrogène stabilisé au moyen d'un mélange de substances contre les *Pectobacterium* spp. Ranganna et al. (1997) ont constaté que les rayons ultraviolets (UV) permettaient le contrôle de Pcc et de *Fusarium solani* pour des courtes durées de conservation sans dégrader la qualité des tubercules (fermeté, couleur et germination). Des traitements thermiques (chaleur, vapeur et eau chaude) ou au mercure organique en vue de réduire l'inoculum sur les tubercules ont été efficaces (Burnett et al., 1990; Ranganna et al., 1998; Afek et Orenstein, 2002). Afek et Orenstein (2002) soutiennent que ces traitements thermiques agissent suivant trois modes qui sont: (1) la chaleur détruit le pathogène et (2) stimule la résistance de la plante, (3) la pression enlève les spores fongiques et les débris de surface des tubercules. Malgré son effet anti-bactérien contre les *Pectobacterium* spp., le traitement des tubercules-semences de pomme de terre à l'aide de produits chimiques à base d'organomercure est déconseillé dans de nombreux pays pour des raisons de protection de l'environnement (Priou et Jouan, 1996). L'utilisation de réacteurs de décontamination dont la technologie est basée sur l'émission de plasmas froids est aussi envisagée pour traiter les eaux de lavage des tubercules après récolte afin de limiter la dissémination dans l'environnement de Pba (Moreau et al., 2005).

Certains antibiotiques (Kasugamycine, neomycine, streptomycine, tétracycline et vancomycine) (Bartz, 1999; Cui et al., 2009) et composés chimiques à base de cuivre (champ 2, phyton-27, cuivre analytique et cuivre fixée) sont efficaces contre les *Pectobacterium* spp. (Blom et Brown, 1999; Gracia-Garza et al., 2002). Mais, l'utilisation au champ de ces molécules présente un danger pour la santé humaine (Muhammad et al., 2009), un risque

écologique d'altération des équilibres microbiens et un développement important de résistances (Priou et Jouan, 1996; Latour et al., 2008).

De nouveaux composés capables d'altérer l'intégrité cellulaire bactérienne ou d'inhiber la croissance de *Pba* et *Pcc* ont montré, une réelle efficacité lors d'essais *in vitro* et *in vivo* au laboratoire. Il s'agit de solutions salées de chlorure d'aluminium et de métabisulfite de sodium (Yaganza et al., 2004), de plusieurs solutions salées organiques ou inorganiques (Mills et al., 2006; Yaganza et al., 2009), de peptides de synthèses (CAMEL) (Kamysz et al., 2005). Au niveau physicochimique, il semble que l'inhibition de la croissance *in vitro* de *Pba* et *Pcc* observée avec les sels résulte de la capacité d'ionisation de l'eau (faible pKa ou pKb) de leurs constituants, ainsi que de leur lipophilicité (dans le cas du benzoate de sodium et du sorbate de potassium) qui favoriserait les interactions avec la membrane bactérienne (Yaganza et al., 2009). Au niveau ultrastructural, le chlorure d'aluminium, provoque des bris de la paroi cellulaire de *Pba* et *Pcc*, une disparition des vésicules extracellulaires et une agrégation du cytoplasme. Par contre, le mode d'action par lequel le métabisulfite de sodium exerce son effet toxique implique une altération de la membrane cytoplasmique bactérienne et une agrégation du cytoplasme (Yaganza et al., 2004).

Par ailleurs, il est important de souligner que les politiques agricoles de nombreux pays au monde mettent aujourd'hui l'accent sur l'évaluation de l'efficacité des traitements versus leur coût environnemental (Epstein et Bassein, 2003). C'est pourquoi, la recherche de nouvelles molécules à faible impact environnemental est actuellement encouragée, notamment les molécules ciblant la virulence du pathogène (anti-virulents) plutôt que sa viabilité (bactéricides) (Latour et al., 2008). L'existence du signal de *quorum-sensing* chez ces bactéries (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) phytopathogènes de la pomme de terre et son rôle stratégique dans la maladie (Smadja et al., 2004b) désignent cette communication cellulaire bactérienne comme une cible privilégiée pour développer des outils de lutte contre la virulence. Ces stratégies d'anti-virulence ont toutes pour but d'interrompre la signalisation *quorum-sensing* de *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. nécessaire à l'induction des gènes de virulence (*quorum-quenching*) par le biais de composés chimiques, toxines, enzymes (Lin et al., 2003; Park et al., 2006; Truchado et al., 2012).

L'emploi de la résistance des cultivars sauvages de pomme de terre résistants à la maladie (pourriture molle et jambe noire) est également envisagé pour la création de nouvelles variétés commerciales résistantes en vue d'une lutte génétique contre *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. (Carputo et al., 2000). Les gènes qui gouvernent la résistance du tubercule et celui de la tige sont différents (Rabot et al., 1994; Pasco, 2005). Cependant, l'insertion de gènes de

résistances au niveau des cultivars commercialisés est rendue difficile à cause d'une incompatibilité et la transmission de caractères non désirés du parent résistant (Ahmet et al., 2004). Ce constat a amené certains généticiens à explorer d'autres voies de sélection notamment la création de pomme de terre transgénique. Ce sont des pommes de terre ayant intégrés un ou plusieurs gènes issus d'une autre espèce végétale, microbienne ou animale présentant un effet anti-bactériens contre les *Pectobacterium* spp. de la pomme de terre (Yi et al., 2004; Kamysz et al., 2005). Les gènes bactériens impliqués dans la dégradation des AHL intervenant dans la communication cellulaire des *Pectobacterium* spp. de la pomme de terre codent pour des lactonases identifiées chez *Bacillus* (Dong et al., 2000) et *Rhodococcus* (Park et al., 2006), des amidohydrolases identifiées chez *Ralstonia* (Lin et al., 2003). Le gène bactérien codant une lactonase de *Bacillus* a été introduit dans la pomme de terre par transgenèse. Ces plantes de pomme de terre transgéniques (y compris les tubercules) se sont avérées plus résistantes que leurs parents sauvages suite à une infection par Pba et Pcc (Fray et al., 1999; Dong et al., 2001; Charkowski, 2009).

Cependant, le développement des variétés transgéniques et leur emploi se heurtent à une faible acceptabilité générale des végétaux génétiquement modifiés (OGM) en Europe à cause des problèmes d'éthique et de risques environnementaux accrus (impact sur la structure des communautés microbiennes, dissémination du transgène à d'autres plantes ou organismes de la biocénose) qu'elles soulèvent (Myskja, 2006; Varzakas et al., 2007).

La lutte biologique contre les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre apparaît comme une autre alternative de lutte. Vokou et al., en 1993 ont montré que des huiles essentielles (*Coridothymus capitatus*, *Origanum dictannus* et *Satyreja thymbra*) avaient une action anti-microbiennes contre Pba et Pcc. Des huiles essentielles de *Cinnamomum zeylanicum*, *Corydothymus capitatus* et *Origanum heracleoticum* ont inhibé à plus de 80% la croissance *in vitro* de Pba sans être efficaces *in vivo* sur des tranches de tubercules de pomme de terre (Dabiré, 2009). Des études ont montré que 38% des *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* (bactéries endophytes de tubercules) présentent une activité antagoniste contre Pba et Pcc lors d'essais d'inhibition sur boîtes de Pétri (*in vitro*) et sur tubercules de pomme de terre (*in vivo*) (Reiter et al., 2002). L'effet antagoniste de ces deux bactéries réside dans la production d'enzymes, de sidérophores (Xu et Gross, 1986), des antibiotiques comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (Keel et al., 1992; Cronin et al., 1997). L'activité antibactérienne de *Streptomyces cinereoruber* contre *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII observée par certains auteurs souligne l'importance de souches d'actinomycètes comme candidats potentiels pour le contrôle biologique des bactéries phytopathogènes des tubercules de pomme de terre (El

Karkouri et al., 2010). Par ailleurs, Baz et al. (2012) ont observé une efficacité de 65 à 94% dans la réduction de la sévérité des symptômes de pourriture molle causés par Pba et Pcc sur des tranches de tubercules de pomme de terre en utilisant des actinobactéries (*Streptomyces* sp. OE7) comme agent de lutte biologique. Malheureusement, l'efficacité de ces isolats n'a pas été démontrée au champ. Récemment, *Serratia plymuthica* A30 (une bactérie endophyte) isolée sur des tubercules de pomme de terre pourris a permis d'inhiber le développement de la jambe noire et la colonisation de tiges de plants de pomme de terre par *Dickeya* sp. biovar 3 dans des études effectuées en serre (Czajkowski et al., 2012).

Les lipopolysaccharides (LPS), principaux constituants de la paroi des bactéries Gram (-), semblent jouer un rôle direct dans le mécanisme de reconnaissance de la plante par le pathogène et dans l'induction de la résistance (Erbs et Newman, 2003). Val et al. (2006) ont testé les effets de protection des LPS de Pba et Pcc sur des tubercules de pomme de terre (Bintje) contre la bactérie Pba. Les résultats de ces auteurs ont montré que les LPS de Pba et Pcc provoquent une protection contre la pourriture molle si le traitement intervient au moins 24 heures avant l'inoculation. Cependant, aucun effet significatif de la bactérie d'origine des LPS n'a été mis en évidence par ces auteurs. Certaines bactéries de la rhizosphère et du sol ont été sélectionnées comme candidats de biocontrôle sur base de leur capacité à dégrader les signaux du *quorum-sensing* (AHL) des *Pectobacterium* spp. de la pomme de terre (Jafra et al., 2006). Il s'agit de *Bacillus*, *Delftia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, et *Ochrobactrum* qui ont exhibé une efficacité *in vitro* contre *Pectobacterium* spp. (Dong et al., 2004; Uroz et al., 2003; Jafra et al., 2006). Les travaux de Cirou et al. (2007) ont montré que certains composés chimiques biodégradables (gammacaprolactone, 6-caprolactone, 4-heptanolide) sont capables de stimuler la croissance des bactéries dégradant les AHL, comme *Rhodococcus* et *Delftia*, dans la rhizosphère de la pomme de terre en culture hors sol.

A notre connaissance, aucun agent de lutte biologique contre les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. n'est disponible commercialement (Charkowski et al., 2006; Czajkowski et al., 2012). L'ensemble des techniques décrites ne sont pas exclusives et pourraient être associées dans une pratique de lutte intégrée contre ces entérobactériacées (*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.) phytopathogènes de la pomme de terre. L'impact environnemental et l'efficacité de ces nouvelles stratégies de lutte devront être évalués.

1.3. Modélisation de la cinétique de croissance d'une population de micro-organismes

1.3.1. La microbiologie prédictive: une aide à l'évaluation des risques

La microbiologie prédictive est une branche de la microbiologie alimentaire qui utilise des modèles mathématiques, pour définir des réponses microbiennes aux conditions environnementales, permettant une évaluation objective des effets de traitement, de la distribution et des opérations de stockage sur la qualité et la sécurité microbiologique des produits alimentaires (MacDonald et Sun, 1999; McMeekin et al., 2002; Juneja et al., 2009). La microbiologie prédictive est donc un outil qui permet d'évaluer les risques d'infection des produits stockés et de les maîtriser.

Traditionnellement, lorsqu'un microbiologiste voulait prédire l'évolution d'une population de micro-organismes contaminants dans un produit alimentaire donné, il devait réaliser expérimentalement des cinétiques de croissance dans les conditions environnementales en usage pour le produit considéré (*challenge test*). Si l'un des facteurs influençant la croissance (température, pH, a_w , etc.) était modifié dans le produit alimentaire, le microbiologiste n'avait plus qu'à refaire ses expériences dans les nouvelles conditions considérées. Cette démarche était coûteuse, et ne permettait pas une réponse rapide (Juneja et al., 2009).

C'est dans ce contexte que le concept de microbiologie prévisionnelle (Whiting, 1995; McMeekin et Ross, 1996) a été proposé; les phénomènes observés sont modélisés avec des modèles généraux valables pour plusieurs micro-organismes et plusieurs types d'aliments. L'utilisation de ces modèles permet d'éviter la mise en place, pour l'étude d'un nouveau produit, d'expérimentations microbiologiques spécifiques. Les simulations en microbiologie apportent une contribution dans l'estimation des risques associés aux germes pathogènes (Buchanan et Whiting, 1996; Membré et al., 2005; Pouillot et Lubran, 2011).

Plusieurs modèles ont été proposés dans la littérature scientifique pour décrire ou prédire la croissance des micro-organismes en fonction des paramètres écologiques. Mais, peu d'études ont été consacrées à la modélisation de la croissance des pathogènes infectant les tubercules de pomme de terre notamment les *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.

Lui et Kushalappa (2002 et 2003) ont développé des modèles prédictifs permettant de gérer les risques liés au développement de la pourriture sèche due à *Fusarium sambucinum* et la pourriture aqueuse causée par *Pythium ultimum* sur des tubercules de pomme de terre en post-récolte à partir des facteurs (température, humidité et la durée du stockage) influençant l'infection et l'expansion des lésions des deux maladies susmentionnées. Le potentiel de

l'infection et de l'expansion de la maladie ont été évalués, par ces auteurs, au moyen du volume de la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourri. Sepulchre et al. (2007) ont modélisé la régulation du gène *pel* de *Dickeya* sp. au cours de la relation hôte pathogène. Certains auteurs se sont focalisés sur la modélisation de l'effet de la température en condition dynamique sur les risques de prolifération et de croissance de Pba et Pcc dans du jus de salade d'endive pasteurisé ou non (Leporq et al., 2001; Shorten et al., 2004, 2006). Kendrick et al. (1959) ont utilisé un index température - humidité relative pour prédire l'incidence de la pourriture molle sur les tubercules de pomme de terre naturellement infectés. Mais, aucune information sur le genre des bactéries (*Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp., *Pseudomonas* ou *Clostridium*) impliquées dans le développement de la maladie n'est donnée. Kushalappa et Zulfiqar (2001) ont modélisé le développement la pourriture molle des tubercules de pomme de terre vis-à-vis des facteurs tels que la température, l'humidité et la durée du stockage. Mais, les modèles prédictifs de ces auteurs ont été développés uniquement avec Pcc. En outre, ces modèles prédictifs ne tiennent pas compte de la quantité de bactéries (Pcc) présente au niveau du site d'infection.

1.3.2. Techniques standard de mesures de la croissance

Il existe deux méthodes classiques permettant l'acquisition des données de croissance d'une population de micro-organismes (Brock et Madigan, 1991; McMeekin et al., 1993) :

- Le dénombrement des cellules viables sur boîte de Pétri
- La mesure de la biomasse par turbidimétrie

La technique de dénombrement sur boîte de Pétri fait partie des méthodes de mesure directe du nombre de micro-organismes. Cette technique consiste à ensemencer à intervalles de temps réguliers des boîtes de Pétri par une dilution appropriée d'un échantillon de la suspension microbienne (Figure 4). Cette technique suppose qu'à un micro-organisme déposé au départ correspond après culture exactement une colonie. La croissance est ainsi mesurée en *unité formatrice de colonies* (UFC).

La deuxième technique ne consiste pas à compter directement les cellules, mais à mesurer la biomasse microbienne au travers de l'opacification du milieu de culture liquide. Les techniques turbidimétriques permettent de suivre l'évolution de la biomasse microbienne par la mesure de la densité optique (DO). Cette variable, définie comme le logarithme du rapport entre l'intensité I_0 du faisceau incident et l'intensité I du faisceau transmis, caractérise l'opacité d'un milieu (Figure 5).

Prélèvement et dilutions successives de la suspension microbienne

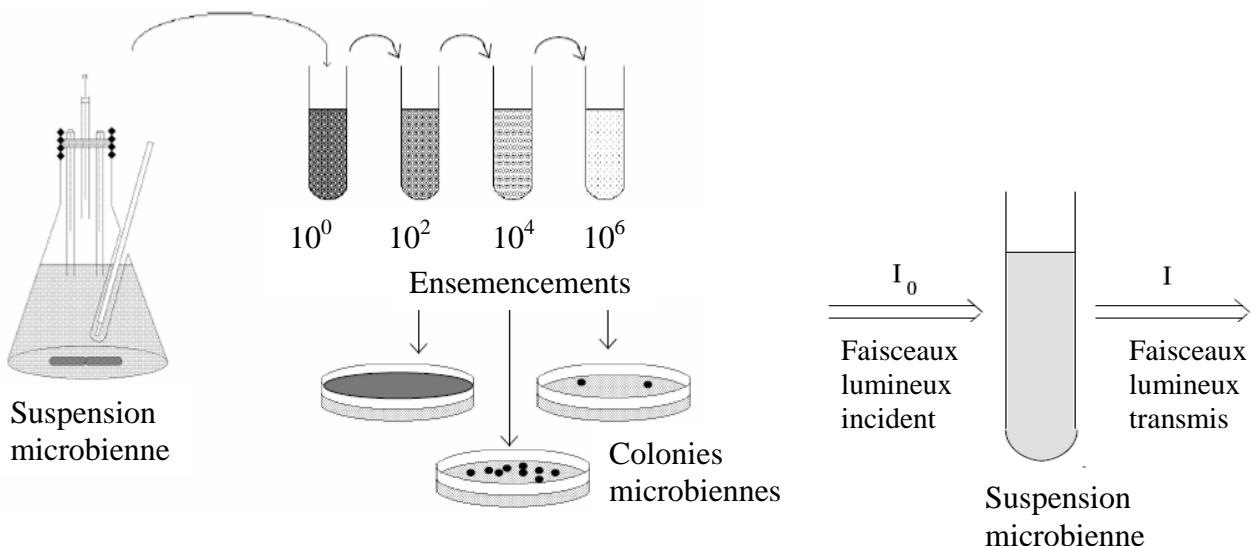


Figure 4. Technique des dilutions pour les étalements et le dénombrement sur boîtes de Pétri.

Figure 5. Technique turbidimétrique de mesure de la biomasse.

1.3.3. Différentes phases de la croissance d'un micro-organisme

Le schéma standard de la croissance d'une population bactérienne en milieu non renouvelé a été établi par Buchanan (1918) (Figure 6). Cette courbe de croissance se décompose en sept phases distinctes:

1. La phase de latence encore appelée la phase initiale stationnaire, qui correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parler (phase d'adaptation au nouvel environnement)

2. La phase d'accélération de la croissance

3. La phase de croissance quasi-exponentielle, dite aussi phase de croissance maximale ; cette phase de croissance est considérée en première approximation comme étant purement exponentielle. La pente de la droite (lorsque la concentration bactérienne est exprimée en coordonnées semi-logarithmiques) correspond à la vitesse (ou taux) de croissance maximale (μ_{\max}), avec:

$$\mu_{\max} = \frac{y_2 - y_1}{t_3 - t_2} \quad (1)$$

4. La phase de décélération ou phase de freinage, qui semble intervenir au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent dans l'environnement de culture

5. La phase stationnaire maximale
6. La phase d'accélération de la décroissance
7. La phase de décroissance exponentielle, qui apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des cellules bactériennes

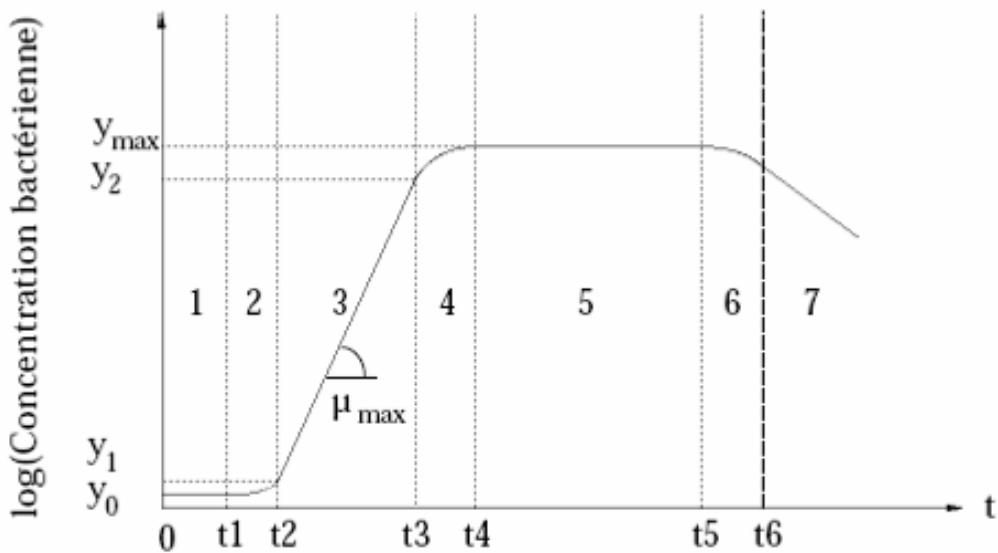


Figure 6. Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide.

Les cinétiques de croissance bactérienne sont le plus souvent représentées en coordonnées semi-logarithmiques (Figure 6). La phase 3 de croissance exponentielle apparaît alors linéaire et la pente de cette partie linéaire de la courbe de croissance (μ_{\max}) est estimée par une analyse de régression linéaire. Les cinétiques de croissance observées en pratique sont loin de correspondre au schéma simple et classique de la figure 6 et présentent une grande variabilité. En particulier plusieurs phases exponentielles de croissance correspondant à des régimes différents peuvent se succéder, et les formes de courbes observées à partir de la phase de freinage sont très variées. Des efforts ont cependant été fournis pour modéliser les quatre ou cinq premières phases de cette cinétique. La complexité de ce phénomène biologique nécessite l'utilisation de modèles non linéaires pour identifier les paramètres de croissance (Charles-Bajard, 1996).

1.3.4. Les limites de la microbiologie prédictive

Bien que la microbiologie prévisionnelle constitue un outil intéressant pour évaluer les risques microbiologiques et de les circonscrire, la plupart des modèles prédictifs disponibles montrent de nombreuses limites dans leur utilisation (Delignette-Muller, 1995; Sanaa, 2002; Zuliani, 2005):

- Les équations disponibles ne peuvent pas être appliquées en dehors du domaine d'étude dans lequel ils ont été définis pour les facteurs environnementaux étudiés.
- Les modèles mathématiques ne tiennent pas compte des caractéristiques physico-chimiques des produits alimentaires, des interactions avec les micro-organismes naturellement présents.
- La capacité de prédiction des modèles établis est d'autant plus difficile qu'ils prennent en compte plusieurs facteurs.

1.3.5. Classification des modèles

Whiting et Buchanan (1993) ont proposé trois classes de modèles : les modèles primaires, les modèles secondaires et les modèles tertiaires.

1.3.5.1. Modèles primaires de la croissance (Delignette-Muller, 1995)

Les modèles primaires décrivent l'évolution au cours du temps de la population microbienne dans des conditions environnementales particulières. Selon leur complexité, les modèles primaires sont caractérisés par un ou plusieurs paramètres comme le temps de latence (λ), le taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max}), la densité de population maximale (y_{\max}), etc. (Sanaa, 2002; Baty et Delignette-Muller, 2004; Zuliani, 2005). Ces paramètres sont spécifiques à des conditions d'environnement constantes au cours du temps.

Le modèle de croissance le plus simple est le modèle exponentiel (McMeekin et al., 1993). Il suppose que la vitesse de variation de la densité de population microbienne x est proportionnelle à x , c'est-à-dire que le taux de croissance dx/dt est constant :

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \\ t \geq 0; x \geq x_0 > 0 \end{cases} \quad (2)$$

où x représente la densité de population microbienne au temps t et μ_{\max} est le taux de croissance spécifique maximal. Ce modèle décrit uniquement la phase 3 de la croissance (Figure 6).

Des modèles de croissance décrivant aussi les phases 4 et 5 à l'aide d'une fonction de freinage f ont été proposés :

$$\begin{cases} \frac{dx}{xdt} = \mu_{\max} f(x) \\ \lim_{t \rightarrow \infty} x = x_{\max} \\ t \geq 0, x_{\max} \geq x \geq x_0 \geq 0 \end{cases} \quad (3)$$

où x_{\max} représente la valeur maximale de la densité de population microbienne et la fonction de freinage f est strictement décroissante. On peut citer deux fonctions de freinage couramment utilisées, celle du modèle logistique (Verhulst, 1845):

$$f(x) = 1 - \frac{x}{x_{\max}} \quad (4)$$

Et celle du modèle de Gompertz (Gompertz, 1825):

$$f(x) = \ln\left(\frac{x_{\max}}{x}\right) / \ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right) \quad (5)$$

La figure 7a et b montre les courbes décrites par les modèles (4) et (5), en logarithme de la densité microbienne. La propriété de stricte monotonie de la fonction de freinage implique que le taux de croissance est maximal au début et ne cesse de décroître. Or comme on le voit sur la figure 6, la croissance apparaît souvent après une phase de latence causée par changement des conditions de croissance au moment de l'inoculation. Ce délai à la croissance est couramment désigné par le terme anglais *lag* (Buchanan et Cygnarowicz, 1990). Les modèles définis précédemment n'intègrent pas ce délai.

Des modèles plus complexes permettant de décrire de façon continue les phases de croissance 1 à 5 ont été proposés par de nombreux auteurs qui utilisent le modèle de Gompertz (Gompertz, 1825) appliqué non pas à la densité de population microbienne, mais à son logarithme (Gibson et al., 1988; Zwietering et al., 1990). Cette approche permet d'obtenir une sigmoïde sur le logarithme de la densité de population microbienne (Figure 7), et d'intégrer ainsi les phases 1 et 2 de la croissance. Ce modèle de Gompertz modifié a été présenté sous la forme analytique suivante par Zwietering et al. (1990):

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right) \exp\left[-\exp\left(\frac{\mu_{\max} \exp(1)}{\ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right)} (lag - t) + 1\right)\right] \quad (6)$$

Néanmoins, comme l'ont souligné Baranyi et al. (1993a et b), le modèle de Gompertz modifié est strictement empirique, et ne correspond pas du tout au modèle classique de croissance de Gompertz (5). Par conséquent il n'apparaît plus de phase exponentielle de croissance (linéaire en coordonnées logarithmiques), et le taux de croissance μ_{\max} ne peut donc pas correspondre à la pente de cette phase. Il a alors été défini comme la tangente au point d'inflexion de la sigmoïde (6) (Zwietering, 1990). Comme l'a souligné Baranyi et al. (1993b), la courbure non nulle du modèle au voisinage de son point d'inflexion risque d'induire une surestimation du taux de croissance lors d'un ajustement sur des données expérimentales. D'autre part, la variable x_0 ne correspond théoriquement pas non plus à la valeur initiale de x , ce qui apparaît clairement sur la figure 7 pour un faible temps de latence.

Baranyi et al. (1993a et b) ont proposé une approche différente, en introduisant dans le modèle de croissance (3) une fonction d'adaptation α :

$$\frac{dx}{xdt} = \mu_{\max} \alpha(t) f(x) \quad (7)$$

où α est une fonction strictement croissante, à valeurs dans $[0, 1]$ et tendant vers 1 lorsque t tend vers l'infini. La fonction d'adaptation sigmoïde proposée par Baranyi et al. est la suivante:

$$\alpha_n(t) = \frac{t^n}{lag^n + t^n} \quad (8)$$

où lag est le délai à la croissance et n est un coefficient entier. Baranyi et al. (1993a) ont montré que le modèle obtenu avec cette fonction d'adaptation et la fonction de freinage logistique (4) ajustait au moins aussi bien les courbes expérimentales de croissance que le modèle de Gompertz appliqué au logarithme de la densité de population microbienne, tout en gardant une forme différentielle simple du taux de croissance (7). La fonction d'adaptation (8) présente néanmoins quelques inconvénients. Le paramètre n semble difficile à ajuster, ce qui a obligé les auteurs à le fixer empiriquement à la valeur 4. D'autre part la forme analytique obtenue après intégration de l'équation (7) est très complexe et difficilement utilisable. Delignette-Muller et al. (1995) ont proposé une forme alternative de la fonction sigmoïde d'adaptation:

$$\alpha(t) = \frac{1 - e^{-\rho_a t}}{1 + e^{-\rho_a (t - lag)}} \quad (9)$$

où lag est le délai à la croissance et ρ_a est un taux d'adaptation réel positif. Dans cette fonction d'adaptation, le lag vérifie exactement la définition proposée par Buchanan et Cygnarowicz

(1990) : c'est l'abscisse du point d'inflexion de la courbe donnant le taux de croissance en fonction du temps, c'est-à-dire du point d'inflexion de la fonction d'adaptation.

L'intégration de l'équation (7) avec la fonction d'adaptation (9) et la fonction de freinage logistique (4) donne une forme analytique relativement simple, nettement plus facile à utiliser que celle obtenue par Baranyi et al. (1993a et b):

$$\begin{cases} x(t) = \frac{x_{\max}}{1 + \left(\frac{x_{\max}}{x_0} - 1\right) e^{-(\mu_{\max} t + A(t))}} \\ A(t) = \frac{\mu_{\max}}{\rho_a} (1 + e^{-\rho_a \text{lag}}) \ln \frac{1 + e^{-\rho_a (t - \text{lag})}}{1 + e^{\rho_a \text{lag}}} \end{cases} \quad (10)$$

L'estimation du paramètre a du modèle (10) sur une courbe expérimentale de croissance n'est possible que si la phase 2 (Figure 6) y apparaît clairement. Il arrive que cette phase soit très courte et/ou que l'on ne dispose pas d'assez de points expérimentaux la décrivant. On peut alors utiliser une forme dégénérée du modèle (10) obtenue en faisant tendre le paramètre a vers l'infini :

$$\begin{cases} t < \text{lag}, x(t) = x_0 \\ t \geq \text{lag}, x(t) = \frac{x_{\max}}{1 + \left(\frac{x_{\max}}{x_0} - 1\right) e^{-\mu_{\max}(t - \text{lag})}} \end{cases} \quad (11)$$

Cette forme correspond aussi au modèle de Baranyi et al. (1993a et b) dégénéré en faisant tendre le coefficient n de la fonction (8) vers l'infini. Les formes (10) et (11) du modèle logistique avec adaptation ont été représentées sur la figure 7e et f.

Ce modèle permet de décrire relativement simplement les phases 1 à 5 du schéma classique de la croissance d'une population microbienne sur la base du modèle exponentiel (2). Contrairement au modèle de Gompertz modifié (6), ses paramètres gardent leur sens communément admis. Suivant les jeux de données, ce modèle peut être utilisé sous sa forme globale (10) ou simplifiée (11). De même, la fonction de freinage peut ou non être prise en compte suivant que l'on s'intéresse ou non aux phases 4 et 5.

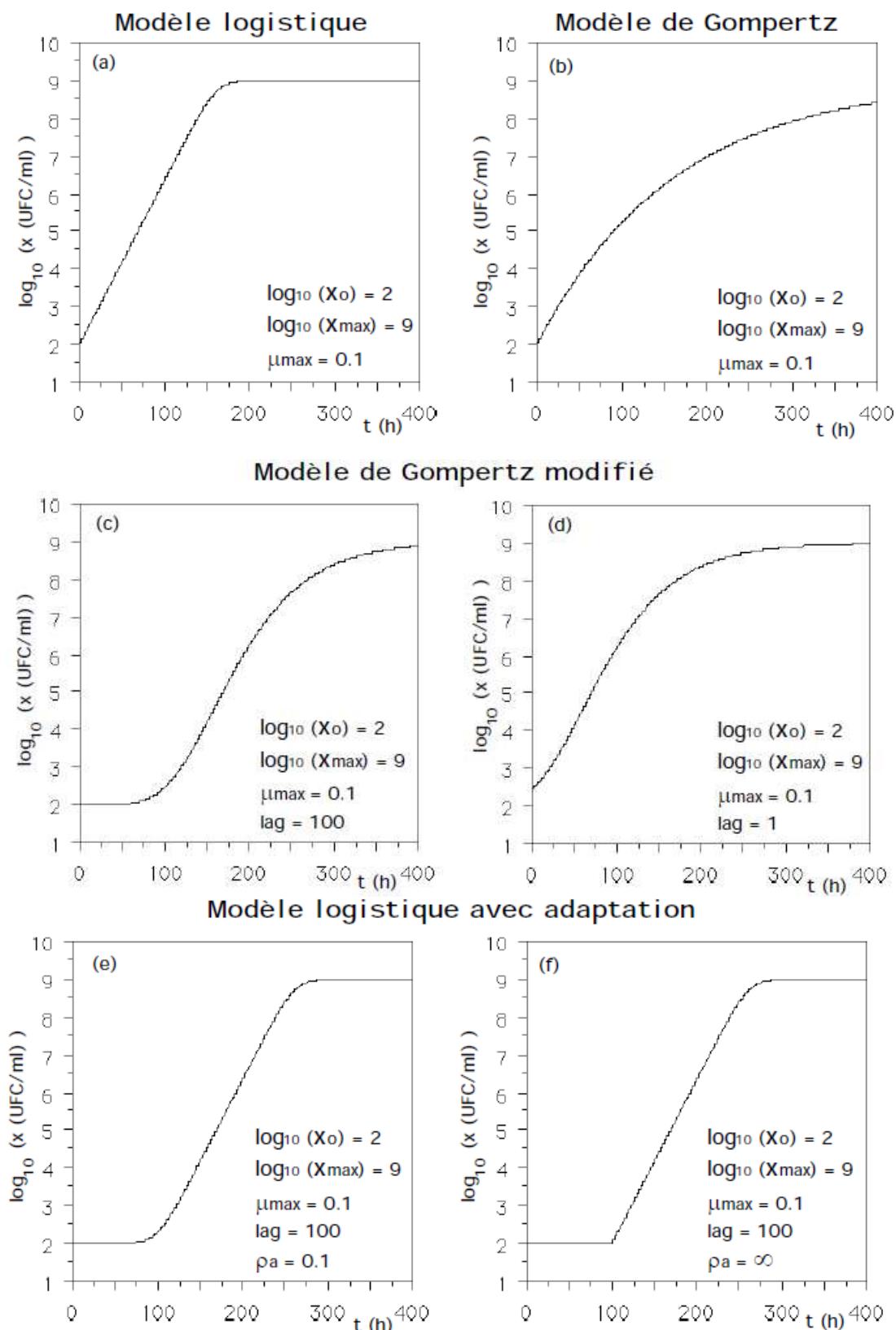


Figure 7. Les modèles de croissance primaires les plus communément utilisés pour décrire la variation d'une population microbienne dans un substrat non renouvelé en fonction du temps (Delignette-Muller, 1995).

1.3.5.2. Modèles secondaires de croissance

Les modèles secondaires décrivent l'influence d'un ou plusieurs facteurs environnementaux sur l'un des paramètres de croissance (μ_{\max} , λ , etc.) issus des modèles primaires (Juneja et al., 2009). Ainsi, un modèle reliant le μ_{\max} d'un micro-organisme à l' a_w , la température, au pH, etc., sera dit secondaire.

On distingue ainsi deux approches:

- La première consiste à étudier l'impact de chaque facteur sur la croissance.

Cette approche est beaucoup plus simple et conduit à des modèles assez robustes, mais ne permet pas d'étudier les éventuelles interactions entre les facteurs sur la croissance microbienne.

- La deuxième consiste à étudier simultanément l'effet d'un ou plusieurs facteurs sur les paramètres de croissance.

La deuxième approche nécessite la définition de plans d'expérience parfois assez complexes et les données sont analysées avec des modèles multivariés souvent polynomiaux ou de surface. La méthodologie des plans d'expérience sera développée au chapitre suivant.

1.3.5.3. Modèles tertiaires de croissance

Les modèles utilisant les systèmes experts et de bases de données pour faire le lien entre les modèles primaires et secondaires sont appelés *modèles tertiaires*.

Les plus connus et les plus utilisés, actuellement, sont le *Pathogen Modeling Program* (PMP), le *Food Micromodel*, le *Growth Predictor* et le *Sym'Previus* (Leporq et al., 2005; Membré et Lambert, 2008). Ces programmes sont simples d'utilisation et très conviviaux. Ils permettent de calculer la réponse des micro-organismes à des conditions d'environnement variables et de comparer les effets de différents facteurs.

Les modèles présentés ci-dessus sont adaptés aux situations où les conditions de l'environnement sont constantes. En réalité, les aliments se trouvent dans des conditions qui varient au cours du temps. C'est le cas par exemple de la température de stockage. C'est pourquoi, en parallèle à cette classification, des modèles dynamiques permettant de prédire la croissance microbienne en fonction des paramètres des modèles primaires qui varient en fonction du temps sont en cours de développement (Sanaa, 2002; Yaghlene et al., 2009).

1.3.6. Plan d'expériences

1.3.6.1. Définition d'un plan d'expérience

Un plan d'expérience consiste à mettre en oeuvre une stratégie de travail dont le but est de réduire le nombre des essais tout en atteignant rapidement les réponses aux questions posées. Dans un plan d'expérience, on cherche à établir des relations entre les causes (facteurs) et les effets (réponses).

La méthode "une variable à la fois" qui consiste à fixer tous les facteurs sauf un, pour connaître son effet sur la réponse, est coûteuse en nombre d'essais, et peu efficace car elle ne permet pas d'optimiser le processus ni de trouver un modèle prédictif s'il existe des interactions entre les facteurs (couplage de paramètres). Dans un plan d'expérience optimisé au contraire, toutes les données sont utilisées simultanément pour calculer chaque effet. D'où une précision accrue et un faible nombre d'essais. Le résultat de l'essai peut être expérimental ou découler d'une simulation numérique.

1.3.6.2. Principaux avantages des plans d'expériences

Les principaux avantages des plans d'expériences sont les suivants :

- Diminution du nombre des essais
- Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs
- Détection des interactions éventuelles entre les facteurs
- Détection des optima
- Détermination des résultats avec une meilleure précision
- Optimisation des résultats
- Modélisation aisée des résultats

1.3.6.3. Terminologie des plans d'expériences

Ce paragraphe est un bref rappel des principaux termes utilisés dans la science des plans d'expériences.

1.3.6.3.1. Facteur

Toutes les variables que l'expérimentateur désire étudier, et qui sont considérées comme causes possibles des réponses sont appelées facteurs. Dans le langage des plans d'expériences, le facteur varie entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas (codé par -1) et la

borne supérieure est le niveau haut (codé par +1) (Hibbert, 2012). L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur ou le domaine du facteur (Goupy, 2006). Un facteur peut prendre plusieurs niveaux à l'intérieur de son domaine de variation. S'il y a plusieurs facteurs, chacun d'eux à son domaine de variation et la réunion des domaines des différents facteurs est appelée domaine d'étude (Figure 8).

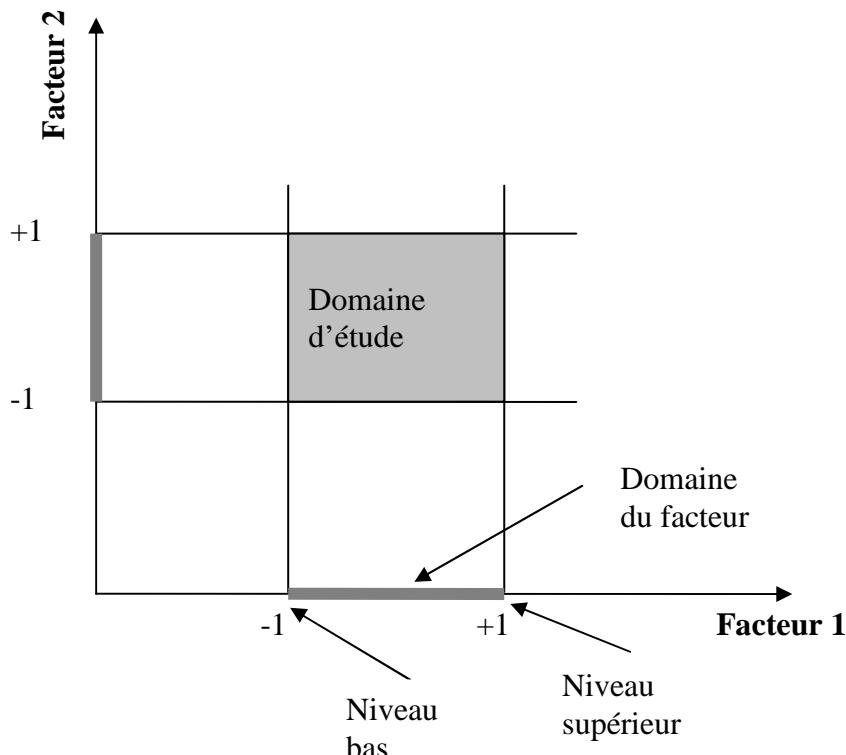


Figure 8. Exemple de domaine de variation et domaine d'étude de deux facteurs.

1.3.6.3.2. Réponse

La réponse est la grandeur qui intéresse l'expérimentateur, et qui est mesurable à chaque expérience ou point expérimental.

1.3.6.4. Modèles de surfaces de réponses

La méthodologie de surfaces de réponses consiste à décrire une quantité Y comme une fonction d'un ou plusieurs facteurs contrôlés X_i par l'expérimentateur. La finalité de l'expérimentateur est de chercher les relations existantes entre la réponse Y et les facteurs X_i .

mis sous expérience. Ces relations peuvent être matérialisées par un modèle (ou équation) liant Y aux facteurs X_i ($i = 1, \dots, k$). Le modèle s'écrit d'une manière générale:

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_k, e)$$

- Y , est la réponse ou la grandeur d'intérêt.
- X_i , sont les niveaux des différents facteurs (ces valeurs sont définies par l'expérimentateur).
- e , représente l'erreur expérimentale due à l'ensemble des facteurs non contrôlés par l'expérience et qui peuvent agir sur la réponse Y .
- f , est la forme fonctionnelle liant Y à X_1, X_2, \dots, X_k . f est une fonction polynôme.

Trois modèles sont généralement utilisés dans la littérature des plans d'expérience pour décrire la réponse Y en fonction des différents facteurs (Buyske, 2001).

Modèle polynomial d'ordre 1 : $E(y) = \beta_0 + \sum \beta_i x_i$.

Modèle d'ordre 2 (modèle quadratique) : $E(y) = \sum \beta_i x_i + \sum \sum_{i \leq j} x_i x_j$.

Modèle d'ordre 3 (modèle cubique) : $E(y) = \sum \beta_i x_i + \sum \sum_{i \leq j} x_i x_j + \sum \sum \sum_{i \leq j \leq k} x_i x_j x_k$.

1.3.6.5. Principales étapes de la méthode des plans d'expériences

La mise en œuvre d'une expérimentation doit obéir à une démarche précise. Cette démarche est facilitée par l'application de la méthode des plans d'expériences. Les principales étapes de la méthodologie des plans d'expériences sont les suivantes:

1.3.6.5.1. Préparation de l'étude

- Définition de l'objectif du travail:

La définition de l'objectif de l'étude est indispensable. C'est de là que tous les choix et toutes orientations du travail vont prendre forme.

- Description précise des éléments de l'expérience:

C'est une description qui a pour objet de mettre en relief les principaux éléments qui entrent en jeu dans l'expérimentation (appareils de mesure, design experimental, etc.).

- Choix de la réponse permettant d'atteindre l'objectif:

L'objectif étant précisé, il faut choisir la réponse (ou les réponses) qui permettra de savoir si ce dernier est atteint ou non, ou si l'on n'est près ou loin du but.

- Recherche des facteurs qui pourraient influencer la réponse:

Il s'agit, à cette étape, d'identifier et de sélectionner les facteurs les plus importants qui pourraient avoir une influence sur la réponse choisie. Pour cette sélection, lorsque les facteurs

ne sont pas connus précisément, il est recommandé de faire des expériences préliminaires (Lacroix et Castaigne, 1986).

- *Définition des niveaux des facteurs:*

C'est une étape importante où on attribue des niveaux pour chaque facteur. Ces niveaux définissent le domaine expérimental qui doit être correctement choisi pour que les conclusions de l'expérimentation soient valables. C'est une étape difficile car le domaine de chaque facteur ne doit être ni trop grand ni trop petit (Goupy, 1999).

- *Cibler les contraintes liées à l'expérimentation:*

Les contraintes expérimentales peuvent être d'ordre matériel (dangerosité des produits, produits en quantité limité, budget limité, etc.), ou être dues à un manque de temps. Il faudra donc construire un plan capable de surmonter toutes ces contraintes.

1.3.6.5.2. Choix du plan d'expérience approprié

Il s'agit du dispositif expérimental, qui représente l'ensemble des expériences à réaliser, afin d'obtenir les résultats recherchés tout en réduisant l'erreur expérimentale.

1.3.6.5.3. Analyse et interprétation des résultats

C'est une étape qui demande une grande attention et beaucoup de temps. Les connaissances théoriques et pratiques du sujet traité sont indispensables à une bonne interprétation.

1.3.7. Classification des plans d'expériences

Les plans d'expériences peuvent être subdivisés en 3 groupes (Dejaegher et Heyden, 2011):

- *Les plans de criblage*

Les plans de criblage permettent de découvrir les facteurs indépendants les plus influents sur une réponse donnée.

- *Les plans de modélisation*

Ce sont les plans couramment utilisés en modélisation, ils couvrent les facteurs indépendants.

- *Les plans de mélange*

Les plans de mélanges sont des plans particuliers adaptés aux facteurs dépendants. Ils sont par exemple adéquats pour l'étude de l'influence des proportions des constituants d'un produit sur une réponse donnée.

Dans le cadre du présent travail nous nous intéresserons uniquement aux plans utilisés en modélisation.

1.3.7.1. Plan d'expérience pour la modélisation

Nous traiterons dans ce paragraphe le plan factoriel complet et le plan de Box-Behnken. Ces deux plans seront employés dans notre travail.

1.3.7.1.1. Plans factoriels

Un plan factoriel complet est un plan d'expérience obtenu lorsqu'au moins un essai pour chaque combinaison de facteurs est réalisé. Ces plans sont utilisés pour 2, 3 ou 4 facteurs. Dans un plan factoriel complet de n^k , n^k essais avec k facteurs et n niveaux devraient être effectués (Hibbert, 2012).

Lorsque les facteurs étudiés sont limités à deux niveaux, un traitement ou un point expérimental est symbolisé par des signes + et – représentant respectivement les niveaux hauts et bas de chaque facteur (Leardi, 2009). Par exemple, pour 3 facteurs à deux niveaux, il faudrait réaliser 8 combinaisons d'essais.

L'avantage des plans factoriels complets est qu'ils permettent d'estimer non seulement les effets principaux des facteurs, mais également de toutes leurs interactions deux à deux, trois à trois,...., jusqu'à l'interaction qui fait intervenir les k facteurs (Dejaegher et Heyden, 2011). Néanmoins, lorsque le nombre de facteurs augmente, son utilisation conduit rapidement à un nombre très élevé d'expériences à réaliser (Mertens et al., 2012a).

1.3.7.1.2. Plan de Box-Behnken

Le Box-Behnken Design (BBD) proposé par Box et Behnken en 1960 est défini comme une fraction d'un plan factoriel complet 3^k qui permet d'ajuster un modèle quadratique. Dans ce dispositif, les combinaisons des traitements sont aux points médians des bords et au centre de l'espace de fonctionnement (Figure 9a).

C'est un dispositif qui exige trois facteurs au minimum pour son utilisation (Hibbert, 2012). En outre, chaque facteur testé doit avoir trois niveaux (Mertens et al., 2012a). Le nombre N d'essais à réaliser est défini par l'équation suivante: $N = 2k(k-1) + C_0$ (où k est le nombre de facteur et C_0 est le nombre de points centraux). A trois facteurs, le BBD offre un certain avantage en exigeant un petit nombre d'essais (15 essais) (Figure 9b). Le BBD présente donc

l'avantage d'être moins coûteux en temps (nombre d'essais réduits) et ressources à investir pour l'expérimentation.

Le BBD ne permet pas de tester les traitements pour lesquels tous les facteurs sont placés simultanément à leur niveau élevé ou bas. Le BBD minimise donc les combinaisons situées dans les conditions extrêmes du domaine de variations des facteurs où l'on observe en général une réponse non satisfaisante (réponse élevée ou faible). C'est pourquoi le BBD n'est pas indiqué dans des études où l'expérimentateur souhaite évaluer la réponse dans les conditions extrêmes du domaine de variations des facteurs (Ferreira et al., 2007).

Le BBD connaît de nombreuses applications dans plusieurs domaines scientifiques. Le BBD a été utilisé, dans plusieurs branches de la chimie (chimie analytique, spectrophotométrie, chromatographie, etc.) dans le but d'optimiser plusieurs processus chimique et physique (Ferreira et al., 2007; Dong et al., 2009). Sautour et al. (2003) en microbiologie, Lahlali et al. (2008) en phytopathologie, ont utilisé le BBD pour évaluer l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance des micro-organismes agroalimentaires.

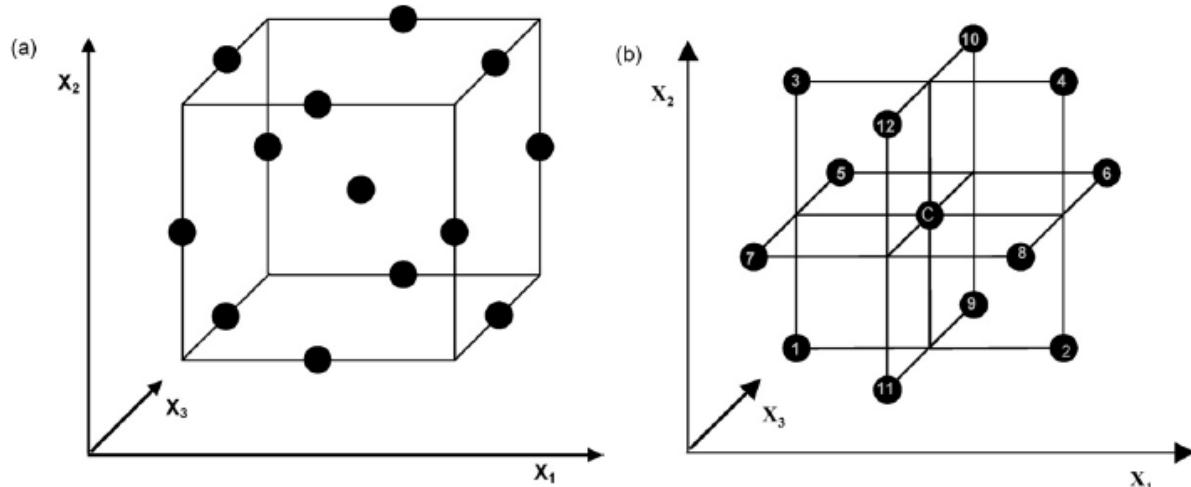
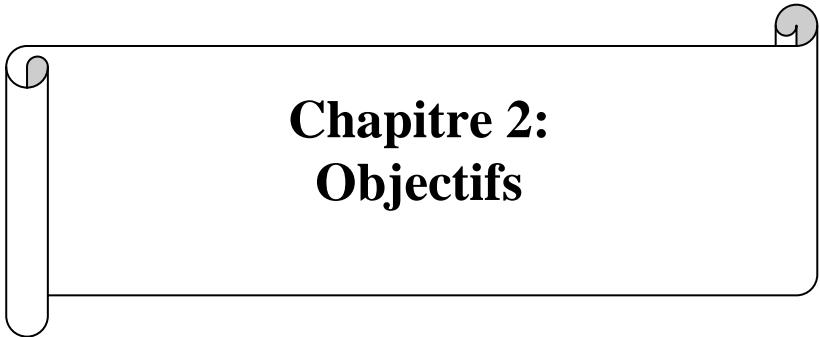


Figure 9. Illustration du plan de Box-Behnken Design pour trois facteurs, (a) traitements aux points médians des bords et au centre du cube, (b) le plan de Box-Behnken est une combinaison de trois plans factoriels 2^2 .



Chapitre 2: Objectifs

Chapitre 2: Objectifs

L'objectif général de ce travail est de modéliser la croissance de deux Entérobactériacées (Pba et Pcc) phytopathogènes des tubercules de pomme de terre au champ et en post-récolte sous diverses conditions écologiques au niveau des tubercules de pomme de terre blessés. Pour atteindre ce but, deux approches de travail ont été adoptées dans cette étude à savoir une approche *in vitro* et *in vivo*. Le terme a_w est beaucoup utilisé par les micro-biologistes afin de décrire l'effet de l'eau libre sur la croissance et la physiologie des bactéries. A température constante et dans une atmosphère close, l' a_w est directement liée à l'humidité relative (HR) par la relation suivante: $a_w = P/P_0 = HR$ avec,

P = Pression de vapeur d'eau développée par le produit ou la solution

P_0 = Pression de vapeur développée par l'eau pure

1-) Les études en conditions *in vitro* visent à déterminer l'effet combiné de la température et de l' a_w sur deux variables clés de la pathogenèse de Pba et Pcc à savoir la croissance bactérienne et l'activité des PEL. En d'autres termes il s'agira spécifiquement de:

- Etudier et modéliser la croissance de Pba et Pcc sous l'effet combiné de la température et de l' a_w .
- Etudier l'effet isolé ou combiné de la température et de l' a_w sur les activités PEL de Pba et Pcc.
- Comparer les compétences écologiques de nos deux micro-organismes.

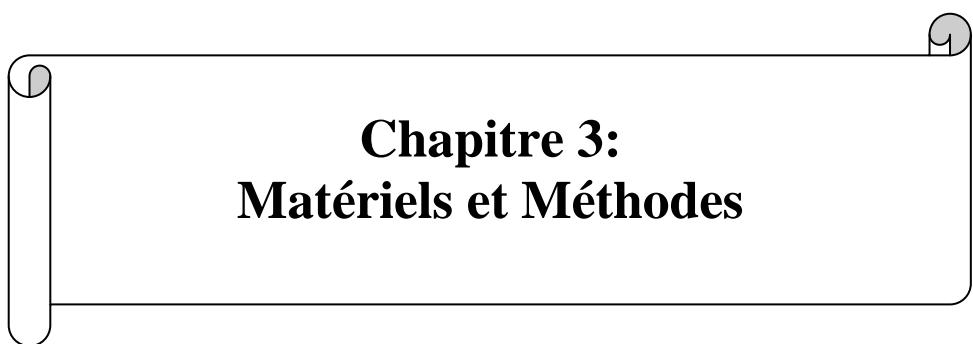
2-) Au niveau *in vivo*, il s'agira:

- De concevoir un modèle mathématique décrivant la dynamique de croissance de la population des deux bactéries (Pba et Pcc) en fonction de l'humidité relative, la température et la concentration initiale d'inoculum.
- De modéliser l'effet des deux facteurs environnementaux, la température et l'humidité relative sur le développement de la pourriture molle, au niveau des tubercules de pomme de terre blessés, à partir de différentes concentrations d'une suspension de Pba et Pcc.
- Ensuite, d'associer la densité de la population des deux bactéries (Pba et Pcc) observée avec un facteur de risque de développement des symptômes de pourriture molle au niveau des tubercules de pomme de terre blessés.

Le facteur de risque de développement de la maladie sera qualitatif, c'est-à-dire l'observation d'une population bactérienne faible ou élevée correspondra respectivement à un risque faible ou élevé pour le développement de la maladie.

- De déterminer la corrélation entre la densité ultérieure de la population de Pba et Pcc et le développement des symptômes de pourriture molle des tubercules.

3-) Pour finir, nous allons comparer qualitativement les deux types de modèles prédictifs à savoir le modèle *in vitro* et le modèle *in vivo* en nous appuyant sur leurs faiblesses et leurs atouts respectifs.



Chapitre 3: **Matériels et Méthodes**

Chapitre 3: Matériels et Méthodes

3.1. Etudes et modélisation *in vitro* de l'effet combiné de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance de *Pectobacterium* spp.

3.1.1. Matériels biologiques

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude (Pba 03034/1 et Pcc 030033) ont été précédemment isolées et caractérisées par le Centre wallon de recherches agronomiques (CRA-W) de Libramont (Belgique). Pour une conservation à long terme, ces souches ont été placées dans des tubes contenant du glycérol à 25% (v/v) et conservés à -80°C. Les bactéries ont toujours été repiquées au moins deux fois sur milieu ceria solide (Nachin et Barras, 2000) modifié (15g Agar, KH₂PO₄ 8,5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1 g/l, MgSO₄ 0,1 g/l, MnSO₄ 10⁻⁶ M, FeSO₄ 10⁻⁶ M) et supplémenté avec l'acide polygalacturonique 4 g/l (Potassium salt, Sigma P0853). Le pH du milieu de culture a été ajusté à 8,0 avec le KOH avant la stérilisation.

3.1.2. Modification de l'activité de l'eau (a_w) du milieu de culture liquide à base de sels (milieu ceria)

L'activité de l'eau du milieu liquide ceria additionné d'acide polygalacturonique 4 g/l (Potassium salt, Sigma P0853), a été modifiée avec des quantités croissantes de glycérol afin d'atteindre les niveaux désirés à 10, 15 et 20°C (Tableau 1). L' a_w de ces échantillons a été mesurée par l'appareil Aqua Lab (Model CX 3, Decagon Devices Inc., USA, Pullman Washington) avec une précision de $\pm 0,003$ sur les valeurs obtenues.

Tableau 1. Activité d'eau du milieu liquide ceria additionné d'acide polygalacturonique 4 g/l en fonction de la quantité de glycérol ajoutée dans 100 ml de milieu et de la température de mesure.

Proportion en glycérol (ml/100 ml)	Activité d'eau en fonction de la température de mesure		
	10°C	15°C	20°C
0	0,995	0,997	0,998
3,5	0,985	0,987	0,989
4	0,982	0,985	0,986
4,2	0,979	0,980	0,981
8	0,973	0,975	0,976
12	0,959	0,961	0,962

3.1.3. Courbe d'étalonnage

Nous avons établi deux courbes de calibration pour Pba 03034/1 et Pcc 030033 afin d'établir une correspondance entre la densité optique (DO) de ces deux bactéries et la quantité de cellules vivantes (UFC). Nos résultats ont donné la même équation suivante pour Pba 03034/1 et Pcc 030033: $\text{UFC/ml} = 2\text{E}+08 * \text{DO} - 1\text{E}+07$.

3.1.4. Inoculation, incubation et suivie de la croissance bactérienne

Les bactéries ont été inoculées dans du milieu ceria liquide. Pour chaque traitement, trois erlenmeyers (100 ml) ont été inoculés par essai. Les erlenmeyers ont été agités à 120 trs/min et les bactéries inoculées afin d'obtenir une concentration initiale de 10^6 UFC/ml. Les différents milieux de culture ont été préalablement pré-tempérés à la température de l'essai. L'évolution de la population bactérienne dans le milieu de culture a été suivie trois à cinq fois par jour par spectrophotométrie à 600 nm (Prim light spectrophotometer 230 V, Secomam, France). Les données de croissance en fonction du temps issues de la DO ont été transformées en UFC/ml au moyen de la courbe de calibration indiquée ci-dessus.

3.1.5. Stabilité de l' a_w au cours de l'expérimentation *in vitro*

Nous avons vérifié la stabilité de l' a_w de nos échantillons (0,960; 0,980 et 0,997) au cours des essais en mesurant l' a_w en fin d'expérimentation pour les trois températures testées (10, 15 et

20°C). L'essai a été réalisé pour les deux souches bactériennes (Pba 03034/1 et Pcc 030033). Les résultats obtenus ont montré que l' a_w de nos échantillons demeure constante au cours des expérimentations. En effet, l' a_w mesurée à la fin de l'essai est identique à celle mesurée au début de l'essai (annexe 1).

3.1.6. Activités spécifiques des Pectates lyases (PEL)

L'activité spécifique des PEL (PEL totaux) a été suivie pour chaque traitement en début de phase stationnaire ($\sim 10^8$ UFC/ml). Pour ce faire, 1,5 ml de culture bactérienne en début de phase stationnaire a été centrifugé à 4°C pendant 10 min à 12000 rpm. Le surnageant a été stérilisé par filtration au moyen d'un filtre Acrodisc (0,2 μ m diamètre des trous) à membrane stérile (Pall Corporation Newquay Cornwall, UK). L'activité spécifique des PEL a été évaluée selon le protocole décrit par Smadja et al. (2004a). La formation de produit insaturé C4-C5 issu de la réaction enzyme-substrat a été suivie à 235 nm chaque minute avec le spectrophotomètre (LKB Biochrom ultrospec II, UK). Le mélange réactionnel est composé de 500 μ l de tampon Tris-HCl (pH 9,0 à 0,1 M/l) renfermant 0,5 mM/l CaCl₂, 370 μ l of d'eau distillée, 100 μ l d'acide polygalacturonique à 10% (w/v), et 30 μ l de surnageant bactériens filtré. Le mix a été incubé à 30°C. Une unité de DO est définie comme étant la quantité d'enzymes produisant 1 μ mol de produit insaturé par minute. L'activité spécifique des PEL a été exprimée en micromoles de produit insaturé libéré par unité de log₁₀ (UFC). L'activité spécifique des PEL a été évaluée trois fois pour chaque traitement.

3.1.7. Plan expérimental

Nous avons utilisé le plan factoriel complet 3^k (Tableau 2) pour la modélisation de l'effet combiné de la température (10, 15 et 20°C) et de l' a_w (0,960; 0,980 et 0,997) sur la croissance des deux bactéries (Pba et Pcc) par le biais de la méthodologie des surfaces de réponses. Le plan expérimental contenait neuf essais avec trois répétitions dans le temps.

Tableau 2. Les valeurs expérimentales et leurs codes attribués du plan factoriel 3² pour la température et l' a_w modifiée avec du glycérol.

Expériences	Valeurs expérimentales		Valeurs codées	
	Températures	a_w	Températures	a_w
E1	10	0,960	-1	-1
E2	15	0,960	0	-1
E3	20	0,960	+1	-1
E4	10	0,980	-1	0
E5	15	0,980	0	0
E6	20	0,980	+1	0
E7	10	0,997	-1	+1
E8	15	0,997	0	+1
E9	20	0,997	+1	+1

3.1.8. Modélisation

3.1.8.1. Modèle primaire

Pour chaque traitement, le taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max} , h^{-1}) a été estimé au moyen d'une procédure de régression linéaire de la croissance bactérienne (\log_{10} (UFC/ml)) en fonction du temps sous le solveur d'excel (Microsoft Office Excel 2007).

Le modèle primaire de Gompertz (1825) a été utilisé pour l'ajustement de la croissance bactérienne (\log_{10} (UFC/ml)) en fonction du temps (Zwietering et al., 1990) :

$$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (12)$$

où y = le logarithme de la population bactérienne,

A = l'asymptote de la courbe de croissance,

μ_{\max} (h^{-1}) = le taux de croissance spécifique maximal,

e est l'exponentielle de 1 [$\exp (1) = 2,71$],

λ = le temps de latence (h),

t = le temps (heures).

3.1.8.2. Modèle secondaire

Les valeurs estimées moyennes de μ_{\max} issues du modèle primaire ont été ajustées par un modèle secondaire afin de décrire les effets isolés et combinés de la température et de l' a_w sur la croissance de Pba et Pcc:

$$g = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (13)$$

où g = la réponse (μ_{\max}),

β_0 = la constante,

X_i = les codes des variables compris entre -1 et +1,

β_i = les coefficients linéaires,

β_{ij} = les coefficients des interactions,

β_{ii} = les coefficients quadratiques.

L'ensemble des valeurs des coefficients du modèle a été estimé par l'analyse de la régression multiple moyennant le logiciel statistique Minitab 15 (Minitab Inc. USA, 2006). L'interprétation des données est basée sur le signe positif ou négatif des coefficients de régression β_i et de leur signification statistique ($P < 0,05$). L'interaction entre deux facteurs peut être exprimée comme un effet antagoniste (l'effet négatif) ou un effet synergique (effet positif).

3.1.8.3. Evaluation de la performance des modèles *in vitro*

L'évaluation de la performance des modèles prédictifs, c'est-à-dire leur habileté à pouvoir décrire de manière adéquate les données expérimentales observées, a été effectuée au moyen des indices mathématiques et statistiques suivants: RMSE (root mean square error), coefficient de détermination (R^2), indice de biais et de précision (Ross, 1996; te Giffel et Zwietering, 1999; Dantigny et al., 2005; Lahllali et al., 2007; Ding et al., 2010). RMSE et les indices de biais (bias indice) et de précision (accuracy factor) ont été calculés comme suit:

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{n}} = \sqrt{\frac{\sum (\mu_{\text{observed}} - \mu_{\text{predicted}})^2}{n}} \quad (14)$$

$$\text{Bias factor} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\mu_{\text{observed}} / \mu_{\text{predicted}})}{n} \right)} \quad (15)$$

$$\text{Accuracy factor} = 10^{\left(\frac{\sum |\log(\mu_{\text{observed}} / \mu_{\text{predicted}})|}{n} \right)} \quad (16)$$

3.2. Etudes et modélisation prédictive *in vivo* de l'effet combiné de la température et de l'humidité relative sur la densité de la population de *Pectobacterium* spp. et sur le développement de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre

3.2.1. Matériels

3.2.1.1. Matériel végétal

Les tubercules de pomme de terre de la variété Bintje connue pour une sensibilité à la pourriture molle ont été utilisés dans ce travail comme matériel végétal. Ces tubercules ont été achetés au Centre Agricole de Pomme de terre (Ferme CAP) d'Ernage situé à 4 km de Gembloux (Belgique).

3.2.1.2. Matériels biologiques

Les essais ont été réalisés dans ce travail avec les deux souches bactériennes que nous avons utilisées pour les essais *in vitro* à savoir Pba 03034/1 et Pcc 030033. Ces deux bactéries ont toujours été repiquées deux fois sur milieu Nutrient Agar (NA) avant leur utilisation.

Par ailleurs, un test de pathogénicité a été effectué à 28°C sur des tranches de tubercules de pomme de terre (Bintje) avec les deux bactéries (Pba 03034/1 et Pcc 030033) afin de s'assurer de leur pouvoir pathogène.

3.2.1.3. Milieux semi-sélectifs

Nous avons sélectionné dans la littérature scientifique quatre milieux semi-spécifiques à base de crystal violet pectate à savoir CVPD (annexe 2) (Bdliya, 1995), CVPM (annexe 3) (Ahmed, 2001), CVP-S1 (annexe 4) et CVP-S2 (annexe 5) (Hyman et al., 2001). Le milieu CVP-S2 (Hyman et al., 2001) a été retenu pour la suite des essais parce qu'il a permis un meilleur dénombrement de Pba 03034/1 et Pcc 030033 par rapport aux trois autres milieux. En outre, le milieu CVP-S2 a été plus aisé à préparer comparé aux trois autres milieux.

3.2.2. Méthodes

3.2.2.1. Préparation des différentes humidités relatives

Trois différentes valeurs approximatives d'humidité relative d'équilibre (86±1, 96±1 et 100%) ont été obtenues en utilisant des dessicateurs. L'humidité relative à l'intérieur des

dessiccateurs a été stabilisée en utilisant deux solutions saturées de sels et de l'eau distillée: KCl (86%), KNO₃ (96%) (Winston et Bates, 1960; Xu et al., 2001; Hong et al., 2002; Lahlali et al., 2008) et de l'eau distillée (100%). Chaque sel (KCl ou KNO₃) a été mélangé dans un litre d'eau distillée et agité jusqu'à l'obtention d'une solution saturée. L'humidité relative obtenue par ces solutions varie légèrement avec la température (Winston et Bates, 1960). Pour chaque traitement (température x humidité relative), le dessiccateur renfermait 250 ml de la solution saline saturée appropriée avec un excès de la phase solide du sel afin de maintenir l'humidité relative désirée. Les dessiccateurs à différentes humidités relatives ont été incubés 48 heures à la température de l'expérience (10, 15 et 20°C) avant d'être utilisés. L'humidité relative de chaque chambre humide a été régulièrement contrôlée par un thermohygromètre.

3.2.2.2. Dispositif expérimental

La méthodologie des surfaces de réponses (RSM) a été employée pour déterminer l'effet des trois facteurs (température, humidité relative et concentration initiale d'application) d'une part sur la densité finale de Pba et Pcc à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre et d'autre part, sur la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie due à ces deux bactéries au niveau de ces blessures.

Le plan expérimental utilisé est celui du Box-Behnken (1960). Ce plan permet d'étudier l'effet de 3 facteurs en 45 séries dans un seul bloc avec 3 points centraux. L'ordre des expériences a été totalement randomisé en un seul bloc. Les valeurs de l'humidité relative (Martin et Gravoueille, 2001) et les températures testées ont été choisies en s'appuyant sur l'humidité relative existant pendant le processus de stockage des tubercules de pomme de terre. La méthodologie des surfaces de réponses (RSM) avec le plan expérimental de Box-Behnken (1960) a été appliquée via le logiciel Minitab 15 (Minitab Inc. USA, 2006). Température (10, 15 et 20°C), concentration initiale d'application des bactéries (10⁵, 10⁷ et 10⁹ UFC/ml) et l'humidité relative (86, 96 et 100%) ont été sélectionnées (Tableau 3). Les données ont été modélisées par l'analyse de la régression multiple. Un modèle polynomial quadratique a été défini pour ajuster la réponse:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_T + \beta_2 X_{HR} + \beta_3 X_C + \beta_{11}(X_T)^2 + \beta_{22}(X_{HR})^2 + \beta_{33}(X_C)^2 + \beta_{12}X_T X_{HR} + \beta_{13}X_T X_C + \beta_{23}X_{HR} X_C$$

Y est la réponse c'est-à-dire la densité finale de Pba et Pcc à la surface des blessures des tubercules de pomme de terre, exprimées en log₁₀ (UFC/cm²); ou la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie due à Pba et Pcc, et exprimée en pourcentage (%); β_0

est la constante du modèle; β_1 , β_2 , β_3 , β_{11} , β_{22} , β_{33} , β_{12} , β_{13} et β_{23} sont les coefficients du modèle estimés par régression multiple; X_T (température), X_{HR} (humidité relative) et X_C (concentration initiale d'application) représentent respectivement les codes des variables compris entre -1 à +1. L'interprétation des données a été basée sur le signe (effet positif ou négatif sur la réponse) et l'effet significatif des coefficients (risque de première espèce fixé à 5%). L'interaction entre deux facteurs peut avoir un effet antagoniste (coefficient négatif) ou effet synergique (coefficient positif).

Tableau 3. Les valeurs expérimentales et leurs codes attribués du plan expérimental de Box-Behnken (1960).

Essai	Valeurs expérimentales			Valeurs codées		
	Température (°C)	Humidité relative (%)	Concentration d'application (UFC/ml)	X_T	X_{HR}	X_C
E ₁	10	96	10 ⁹	-1	0	+1
E ₂	15	96	10 ⁷	0	0	0
E ₃	20	86	10 ⁷	+1	-1	0
E ₄	10	86	10 ⁷	-1	-1	0
E ₅	10	96	10 ⁵	-1	0	-1
E ₆	20	100	10 ⁷	+1	+1	0
E ₇	15	96	10 ⁷	0	0	0
E ₈	20	96	10 ⁹	+1	0	+1
E ₉	10	100	10 ⁷	-1	+1	0
E ₁₀	15	100	10 ⁵	0	+1	-1
E ₁₁	20	96	10 ⁵	+1	0	-1
E ₁₂	15	100	10 ⁹	0	+1	+1
E ₁₃	15	86	10 ⁹	0	-1	+1
E ₁₄	15	86	10 ⁵	0	-1	-1
E ₁₅	15	96	10 ⁷	0	0	0

3.2.2.3. Préparation de l'inoculum et des suspensions bactériennes

Des cultures de 48 heures de Pba et Pcc ont été ensemencées dans 50 ml de milieu Luria Bertani (LB) liquide puis incubées à 27°C pendant une nuit sous agitation (120 trs/min). Après retrait de l'incubation, la solution a été centrifugée et le culot a été récupéré pour la préparation des suspensions bactériennes.

Dans les tubes contenant le culot, on ajoute 5 ml d'eau physiologique (NaCl à 0,85%). La densité optique (DO) de la suspension a été relevée au spectrophotomètre (Prim light spectrophotometer 230 V, Secomam, France) et sa concentration déterminée au moyen d'une courbe de calibration ($\text{UFC/ml} = 2 \times 10^8 \times \text{OD}_{600} - 10^7$ pour Pba et Pcc). Les différentes suspensions bactériennes ont été ajustées aux concentrations désirées (10^9 , 10^7 et 10^5 UFC/ml) par addition des volumes déterminés d'eau physiologique au moyen de l'équation de la courbe de calibration susmentionnée.

3.2.2.4. Inoculation et incubation des cylindres de chair de tubercules de pomme de terre

Des cylindres de chair de tubercules de pomme de terre (substrat nutritif) de 12 mm de diamètre et 20 mm de longueur ont été réalisés sur des tranches transversales de tubercules de pomme de terre à l'aide d'un emporte-pièce stérile sous le flux laminaire. Les tranches transversales sont issues de tubercules de pomme de terre préalablement stérilisés en surface avec une solution d'hypochlorite de sodium (10%) pendant 20 min.

3.2.2.4.1. Etude de l'effet de la température, de l'humidité relative et de la concentration en inoculum sur la densité de la population de *Pectobacterium* spp.

Deux filtres millipore de 12 mm de diamètre et de 0,2 µm (diamètre des trous) préalablement autoclavés ont été déposés sur chaque cylindre de chair de tubercules de pomme de terre. Vingt µl de chaque suspension bactérienne ont été prélevés et déposés sur le premier filtre millipore non en contact direct avec le tubercule de pomme de terre. Le NaCl à 0,85% stérile a été déposé sur les témoins négatifs. Quatre cylindres de chair de tubercules de pomme de terre dont un témoin ont été utilisés pour chaque traitement. Les quatre cylindres sont issus de trois tubercules différents de pomme de terre. Les dessiccateurs renfermant les trois types de traitements susmentionnés ont été incubés aux trois températures indiquées (10, 15 et 20°C) pendant trois jours.

3.2.2.4.2. Etude de l'effet de la température, de l'humidité relative et de la concentration en inoculum sur le développement des symptômes de pourriture molle

Pour étudier l'impact de la température, de l'humidité relative et de la concentration en inoculum sur le développement des symptômes, les suspensions de Pba et Pcc ont été déposées directement sur la chair des tubercules de pomme de terre (cylindres). En outre, afin de tenir compte de la perte de poids en eau des cylindres de chair de tubercules de pomme de terre, due aux différentes humidités relatives, trois autres cylindres de chair de tubercules de pomme de terre non inoculés avec le pathogène ont été mis à incuber pour chaque combinaison testée.

3.2.2.5. Enumération des bactéries

Au troisième jour d'incubation, nous avons retiré aseptiquement pour chaque traitement le premier filtre millipore sur lequel la suspension bactérienne avait été déposée puis nous avons laissé diffuser pendant 10 minutes dans des tubes Falcon contenant 5 ml de NaCl à 0,85%. On obtient ainsi la suspension initiale bactérienne. Nous avons réalisé des dilutions décimales de cette suspension bactérienne. Sur la base d'essais préliminaires nous avons étalé 100 μ L des dilutions appropriées pouvant nous permettre de dénombrer 30 à 300 colonies sur chaque boîte de Pétri après 48 ou 72 heures d'incubation à 27°C. Cet intervalle de 30 à 300 colonies est considéré par Meynell et Meynell (1970) comme donnant le moins d'erreur sur le dénombrement final des colonies.

3.2.2.6. Quantification des symptômes

Trois jours après l'incubation deux mesures ont été effectuées.

Premièrement, la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie (Qcp) a été exprimée en pourcentage par la formule suivante: $Qcp (\%) = P_1 - P_2 / P_1$ avec,

P_1 : poids (g) du cylindre de chair de tubercules de pomme de terre inoculé avant incubation.

P_2 : poids (g) du cylindre de chair de tubercules de pomme de terre inoculé après enlèvement de la chair pourrie à l'aide d'une lame de scalpel au troisième jour de l'incubation.

Deuxièmement, la quantité d'eau perdue par les cylindres de chair de tubercules de pomme de terre (Qe) a été exprimée également sous forme de pourcentage par la formule suivante:

$Qe (\%) = P'_1 - P'_2 / P'_1$ avec,

P'_1 : poids (g) du cylindre de chair de tubercules de pomme de terre non inoculé avant incubation.

P'_2 : poids (g) du cylindre de chair de tubercules de pomme de terre non inoculé après trois jours d'incubation.

Finalement, ces deux mesures, Q_{cp} et Q_e , ont été utilisées pour estimer la quantité nette de chair de tubercules de pomme de terre pourrie (Q_{ncp}) par la formule suivante:

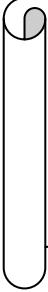
$$Q_{ncp} (\%) = Q_{cp} - Q_e$$

3.2.2.7. Evaluation de la performance des modèles établis *in vivo*

L'évaluation de la performance des modèles prédictifs établis dans les conditions *in vivo* a été effectuée selon les critères statistiques et mathématiques décrits au point 3.1.8.3.

3.2.2.8. Corrélation entre la densité de la population de *Pectobacterium* spp., et le développement des symptômes de pourriture molle

Une analyse de corrélation entre la densité de la population de *Pba* et *Pcc*, et le développement des symptômes de pourriture molle a été effectuée via le logiciel Minitab 15 (Minitab Inc. USA, 2006).



Chapitre 4: **Résultats et discussion**

Chapitre 4: Résultats et discussion

4.1. Modélisation de l'effet combiné de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance *in vitro* de *Pectobacterium* spp.

4.1.1. Effet de l'activité de l'eau et de la température sur le taux de croissance spécifique maximal

Les valeurs observées et prédites de la moyenne du taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max} , h^{-1}) pour chaque combinaison a_w -température sont consignées dans le tableau 4. Pour toutes les combinaisons, il n'y a pas de grande différence entre les valeurs observées et prédites de la moyenne du taux de croissance spécifique maximal pour les deux bactéries. Les croissances minimales et maximales pour les deux bactéries (Pba et Pcc) sont observées respectivement aux combinaisons $a_w = 0,960$ et température = 10°C, et $a_w = 0,997$ et température = 20°C et correspondent aux limites inférieures et supérieures du domaine pour ces deux facteurs. Le tableau 4 montre qu'une augmentation de l' a_w de 0,960 à 0,997 entraîne une augmentation de μ_{\max} pour Pba et Pcc. Nous avons observé des résultats similaires avec les deux bactéries lorsque la température augmente de 10 à 20°C, excepté pour Pcc en raison de la mauvaise prédiction du modèle au niveau de la combinaison 0,960 a_w et 15°C où la valeur prédite de μ_{\max} est deux fois inférieure à celle observée. Nous avons relevé dans la littérature peu d'informations sur l'effet combiné de la température et de l' a_w sur la croissance des bactéries phytopathogènes. Smadja et al. (2004a) ont étudié l'effet de plusieurs températures (8 à 28°C) sur le taux de croissance spécifique maximal de Pba et Pcc. Ces auteurs n'ont observé aucune croissance pour Pcc et une faible croissance pour Pba à 8°C. Par ailleurs, un optimum de croissance a été observé pour Pba à 24°C et pour Pcc > 28°C. Laurent et al. (2001) ont observé une croissance optimale pour Pcc MFCL0 à 28°C.

Dans ce travail, le taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max}) a été calculé à partir de la mesure de la densité optique (DO) des deux bactéries (Pba et Pcc) après une correspondance entre la DO mesurée et le nombre d'UFC au moyen d'une courbe de calibration. Plusieurs auteurs ont utilisé des données d'absorbance (DO) transformées en nombre d'UFC avec une courbe de calibration afin développer des modèles de croissance pour des bactéries (McClure et al., 1993; Dalgaard et al., 1994; Chorin et al., 1997; Valero et al., 2006). Cette méthode présente l'avantage d'être rapide, peu coûteuse et relativement facile à automatiser en comparaison avec d'autres techniques classiques comme la méthode de comptage sur boîtes

Tableau 4. Valeurs expérimentales et prédictives du taux de croissance spécifique maximal de Pba et Pcc obtenues par l'application du plan factoriel 3^k pour les deux facteurs température et a_w pour les modèles quadratiques à base de glycérol.

Expériences	Valeurs expérimentales		Valeurs codées		Taux de croissance spécifique maximal (h^{-1})			
					Valeurs observées		Valeurs prédictes	
	Températures	a_w	Températures	a_w	Pba 03034/1	Pcc 030033	Pba 03034/1	Pcc 030033
E1	10	0,960	-1	-1	$0,029 \pm 0,007$	$0,045 \pm 0,004$	0,021	0,046
E2	15	0,960	0	-1	$0,045 \pm 0,006$	$0,054 \pm 0,005$	0,034	0,025
E3	20	0,960	+1	-1	$0,135 \pm 0,011$	$0,158 \pm 0,011$	0,153	0,186
E4	10	0,980	-1	0	$0,096 \pm 0,003$	$0,110 \pm 0,008$	0,121	0,136
E5	15	0,980	0	0	$0,181 \pm 0,013$	$0,198 \pm 0,011$	0,184	0,202
E6	20	0,980	+1	0	$0,383 \pm 0,035$	$0,479 \pm 0,046$	0,354	0,450
E7	10	0,997	-1	+1	$0,104 \pm 0,012$	$0,119 \pm 0,012$	0,087	0,093
E8	15	0,997	0	+1	$0,194 \pm 0,008$	$0,221 \pm 0,011$	0,201	0,247
E9	20	0,997	+1	+1	$0,413 \pm 0,038$	$0,581 \pm 0,034$	0,422	0,582

de Pétri dont la mise en œuvre nécessite beaucoup de temps de travail (Swinnen et al., 2004; Mertens et al., 2012b). Dalgaard et Koutsoumanis (2001) ont comparé μ_{\max} calculé directement avec les mesures de la DO et la méthode de comptage des bactéries sur boîtes de Pétri. Ces auteurs ont conclu que les mesures issues de la DO peuvent être utilisées de façon fiable pour l'évaluation du taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max}).

La figure 10 présente les courbes de contour montrant l'effet prédit de l' a_w et de la température sur le taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max}) de Pba et Pcc. Quelle que soit la souche bactérienne, les courbes de contour montrent que μ_{\max} est très sensible aux deux paramètres environnementaux. Les résultats du tableau 5 montrent un effet hautement significatif des facteurs isolés et combinés ($P < 0,0001$) pour Pba et Pcc. Plus la valeur absolue du coefficient linéaire est élevée (β_1 ou β_2), plus est élevée l'influence du facteur correspondant (température ou a_w) sur μ_{\max} . Ainsi, pour toutes les combinaisons, l'effet de la température était plus grand que celui de l' a_w . Nous avons reporté un effet positif linéaire, quadratique et combiné de la température et de l' a_w sur le taux de croissance des deux bactéries (Pba et Pcc) excepté l'effet quadratique de l' a_w . Ce travail constitue, à notre connaissance, la première étude dédiée à la modélisation prédictive de la croissance au niveau du genre *Pectobacterium* sous l'effet combiné de la température et de l' a_w . Les travaux précédents se sont focalisés sur l'effet des conditions dynamiques de la température sur la cinétique de croissance de Pba et Pcc (Leporq et al., 2001), sur l'effet de la température sur le taux de croissance spécifique maximal de Pba et Pcc (Smadja et al., 2004a) ou sur la température comme facteur de risque d'infection des jus de légumes par Pba et Pcc (Shorten et al., 2006).

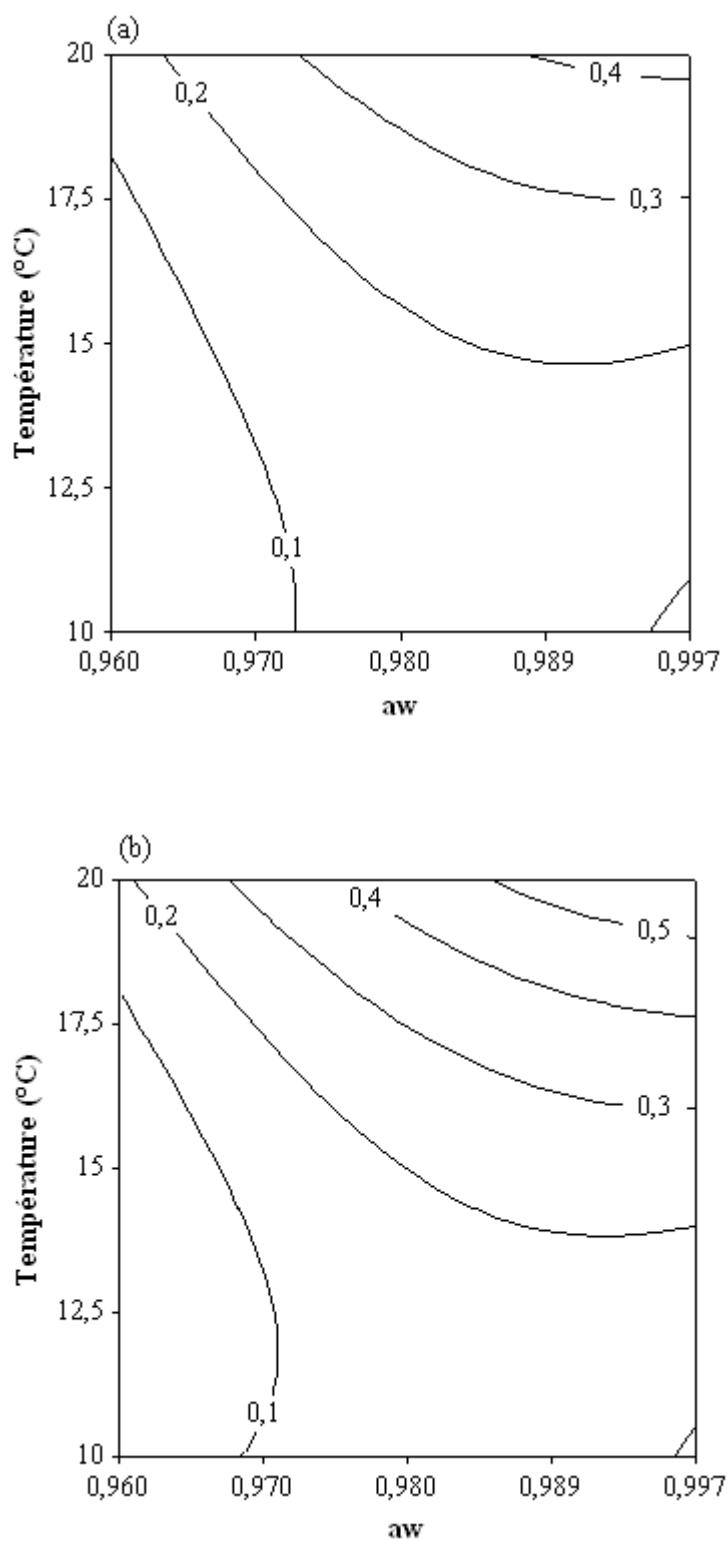


Figure 10. Courbes de contour montrant l'effet prédict de l' a_w et de la température sur le taux de croissance spécifique maximal (μ_{\max}) (a) de Pba 03034/1 et (b) Pcc 030033.

Tableau 5. Signification des coefficients de régression des modèles obtenus sur le taux de croissance spécifique maximal de Pba et Pcc.

Paramètres	Coefficients	Taux de croissance spécifique maximal (h ⁻¹)	
		Pba 03034/1	Pcc 030033
Constante	β_0	0,184***	0,202***
t	β_1	0,117***	0,157***
a_w	β_2	0,084***	0,111***
t^2	β_{11}	0,054***	0,091***
a_w^2	β_{22}	-0,067***	-0,066***
t x a_w	β_{12}	0,051***	0,087***

*** : très significatif (P < 0,0001)

4.1.2. Evaluation de la performance des modèles prédictifs *in vitro*

Plusieurs méthodologies sont utilisées pour l'évaluation de la performance des modèles. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 6. Le coefficient de détermination R^2 montre que la température et l' a_w représentent 97,29% et 97,76% des variations observées au niveau du taux de croissance spécifique maximal respectivement pour Pba et Pcc. L'erreur quadratique (RMSE) est indiquée comme la mesure la plus simple et la plus évocatrice de la qualité d'ajustement du modèle. Plus l'erreur quadratique est faible, meilleure est la performance du modèle (Dantigny et al., 2005; Lahlali et al., 2007). Nos modèles prédictifs présentent de faibles valeurs de RMSE, compris entre 0,005 et 0,021. Les indices de biais (bias indice) et de précision (accuracy factor) sont largement utilisés pour évaluer la performance des modèles prédictifs (Ross, 1996). Dans ce travail, les indices de biais des modèles établis varient entre 1,05 et 1,07. Ces valeurs proches de 1 indiquent que les modèles établis sont fiables pour Pba et Pcc. Les différences moyennes entre les valeurs observées et prédites du μ_{max} pour les modèles de Pba et Pcc sont respectivement de 18% et 23%. Les valeurs d'indices de biais et de précision obtenues dans ce travail sont semblables à celles relevées dans la littérature par Neumeyer et al. (1997). Nous pouvons donc conclure que les modèles établis sont capables de prédire l'effet de l' a_w et de la température sur la croissance de Pba et Pcc dans la gamme des deux facteurs testés.

Tableau 6. Indices de validation de la performance des modèles de croissance de Pba et Pcc obtenus à différentes températures dans du milieu ajusté à une a_w donnée avec du glycérol.

Taux de croissance spécifique maximal (h^{-1})		
	Pba 03034/1	Pcc 030033
R^2	97,29	97,76
RMSE	0,021	0,027
Indices de biais	1,05	1,07
Indices de précision	1,18	1,23

4.1.3. Effets de la température et de l' a_w sur l'activité spécifique des Pectates lyases

La figure 11 montre l'effet de la température et de l' a_w sur l'activité spécifique des PEL (PEL totaux) de Pba et Pcc. L'activité spécifique des PEL a été suivie en début de la phase stationnaire pour chaque traitement car à cette période de la croissance bactérienne, la production des PEL atteint son maximum et reste constante selon Laurent et al. (2001). La température et l' a_w ont une grande influence sur l'activité spécifique des PEL des deux bactéries (Pba et Pcc) testées. Les activités spécifiques maximales et minimales des PEL de Pba et Pcc sont observées respectivement à la combinaison a_w x température égale à 0,997 x 20°C et 0,960 x 10°C. Au Nord-Ouest de l'Europe la température optimale de pathogénicité au niveau du tubercule et de la tige du plant de pomme de terre est autour de 15 à 20°C pour Pba (Pérombelon et Salmond, 1995; Priou et Jouan, 1996). Laurent et al. (2001) ont observé une production optimale des PEL à 14°C dans le milieu d'acide polygalacturonique (PGA) et le milieu celeriac (CM) avec Pcc MFCL0. Smadja et al. (2004a) ont relevé une température optimale pour la production des PEL autour de 15 et 17°C pour Pcc. D'autres auteurs ont relevé au Nord-Ouest de l'Europe une température optimale pour la pathogénicité de Pcc de 25°C sur des tubercules de pomme de terre (Pérombelon et Kelman, 1987; Priou et Jouan, 1996). Nos résultats ont montré une augmentation de l'activité spécifique des PEL avec la température d'incubation, pour les deux bactéries phytopathogènes (Pba et Pcc). Des résultats similaires ont été observés avec la croissance de Pba et Pcc. Ces résultats suggèrent que l'activité spécifique des PEL des *Pectobacterium* spp. est liée à la multiplication des bactéries. Mais, contrairement à la croissance bactérienne, cette étude n'a pas montré une augmentation

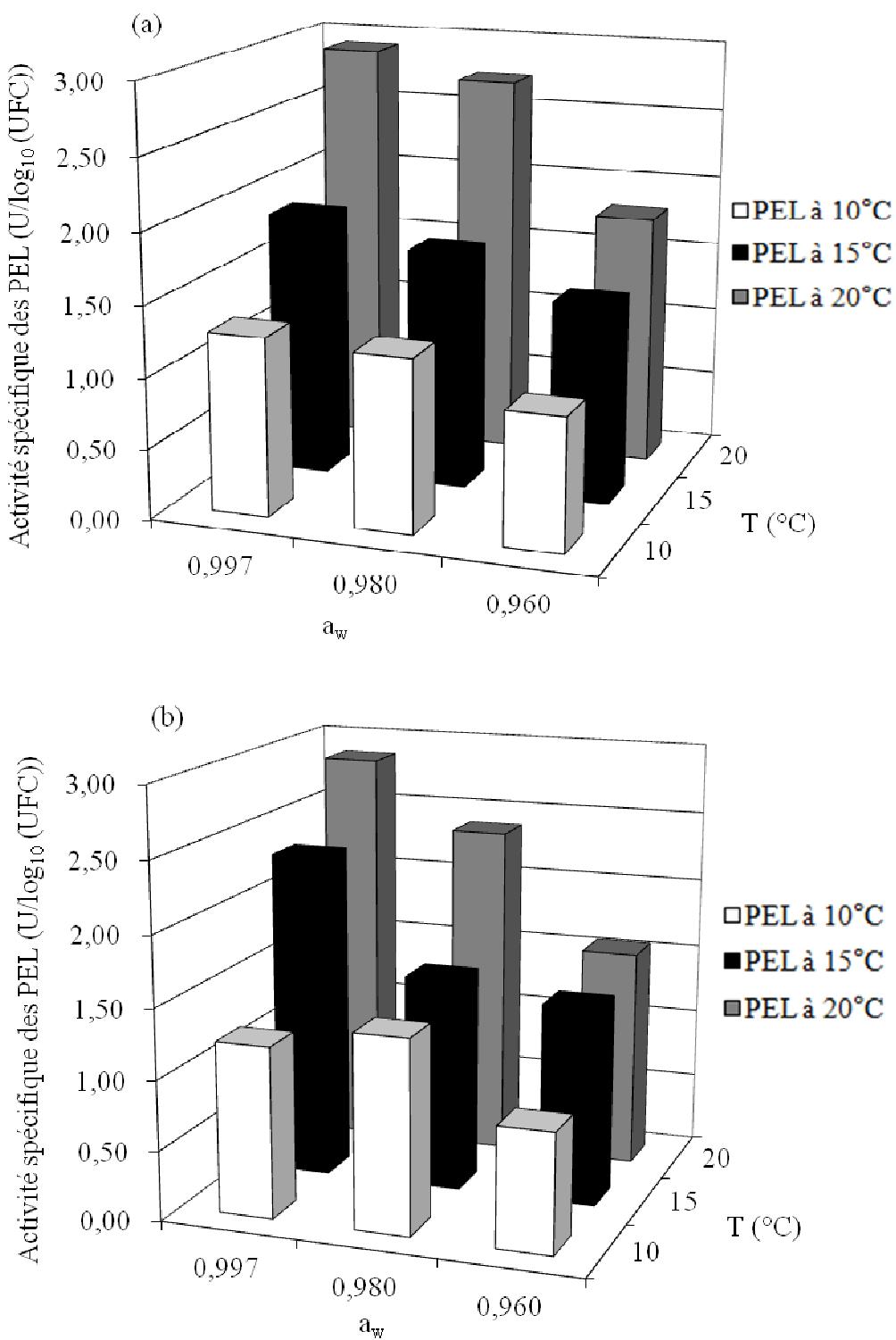


Figure 11. Effet de la température et de l' a_w sur l'activité spécifique des PEL (a) de Pba 03034/1 et (b) Pcc 030033.

de l'activité spécifique des PEL avec l' a_w excepté avec les traitements à 15 et 20°C pour les deux bactéries (Pba et Pcc). Ces résultats sont en accord avec le rôle de la température dans le développement de la pourriture molle (Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003).

Dans ce travail nous avons suivi l'activité spécifique totale des PEL de Pba et Pcc. Ces deux bactéries (Pba et Pcc) produisent au moins trois à six isoenzymes de PEL (Kotoujansky, 1987; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996). Au niveau de Pcc, Laurent et al. (2000, 2001) ont montré que les activités enzymatiques de certains isoenzymes de PEL tel que les PELI et PELIII dépendaient fortement de la température d'incubation, tandis que les activités enzymatiques des PELII étaient presque identiques pour plusieurs températures (4 à 28°C).

La thermorégulation de la production des isoenzymes des PEL seraient également dépendante de la source de carbone du milieu de culture (Laurent et al., 2000). Des études plus approfondies au niveau de ces différentes isoenzymes quant à leur relation vis-à-vis de la disponibilité en eau (a_w) seraient utiles dans le cas d'une meilleure connaissance des conditions favorisant le déclenchement de la pathogénèse chez chaque espèce de *Pectobacterium* spp.

4.2. Modélisation prédictive de l'effet combiné de la température et de l'humidité relative sur la densité de la population de *Pectobacterium* spp. et sur le développement de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre

4.2.1. Effet de la température, de l'humidité relative et de la concentration initiale d'application sur la densité moyenne de la population de Pba et Pcc

Les modèles quadratiques décrivant simultanément l'influence de la température, de l'humidité relative et de la concentration de l'inoculum appliquée sur la population finale des bactéries à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre sont les suivants:

$$Y_1 = 7,438 + 0,856X_T + 0,088X_{HR} + 2,036X_C - 0,675(X_T)^2 - 0,001(X_{HR})^2 - 0,045(X_C)^2 + 0,012X_TX_{HR} + 0,076X_TX_C + 0,07X_{HR}X_C \quad (17)$$

$$Y_2 = 6,555 + 0,379X_T - 0,063X_{HR} + 1,989X_C - 0,465(X_T)^2 + 0,019(X_{HR})^2 + 0,166(X_C)^2 + 0,030X_TX_{HR} + 0,033X_TX_C + 0,019X_{HR}X_C \quad (18)$$

où Y_1 et Y_2 , représentent respectivement les valeurs prédictes de la densité de la population de Pba 03034/1 et Pcc 030033, en nombre de \log_{10} (UFC/cm²), à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre;

X , le code de valeur (entre -1 et +1) pour les facteurs indiqués par les indices attachés.

Les résultats du logarithme de la densité finale de la population de Pba et Pcc observés et prédits à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre sont consignés respectivement dans le tableau 7 et 8 colonne 5 et 6. Pour toutes les combinaisons, il n'y a pas de grande différence entre les valeurs observées et prédites de la densité moyenne de la population de Pba et Pcc.

L'analyse de régression multiple a permis de déterminer l'influence relative des différents facteurs isolés ou combinés pour les modèles de Pba (Tableau 9) et Pcc (Tableau 10), colonne 3 et 3. Plus la valeur absolue du coefficient linéaire est élevé (β_1 , β_2 , ou β_3), plus est élevé l'influence du facteur correspondant (Box et Draper, 1987) sur la densité prédictive de bactéries. Pour les deux bactéries (Pba et Pcc), les coefficients β_1 (la température) et β_3 (la concentration initiale d'application des bactéries) étaient très hautement significatifs et le coefficient β_2 (l'humidité relative) était significatif. Ces résultats reflètent l'importance connue des conditions de stockage pour le contrôle et la croissance de Pba et Pcc (Pringle et al., 1991; Pérombelon et Salmond, 1995). Les coefficients β_{11} , β_{22} , et β_{33} décrivant respectivement l'effet quadratique de la température, de l'humidité relative et de la concentration de l'inoculum

appliquée ont un effet très significatif pour β_{11} , mais non significatif pour β_{22} , et β_{33} pour le modèle de Pba. Tous les coefficients quadratiques du modèle de Pcc ont un effet très hautement significatif excepté le coefficient β_{22} (effet quadratique de l'humidité relative) qui est non significatif. Au niveau interaction entre les facteurs, les résultats expérimentaux montrent qu'ils sont tous non significatifs pour les deux modèles (Pba et Pcc). Ces résultats suggèrent que l'effet interaction ne semble pas influencer le modèle de croissance de Pba et Pcc dans la gamme des valeurs testées.

L'analyse statistique des réponses expérimentales pour le modèle de Pba et Pcc a montré que les trois facteurs évalués affectent fortement la multiplication des cellules de Pba et Pcc à la surface des tubercules de pomme de terre blessés. La sensibilité de la population de *Pectobacterium* spp. aux conditions environnementales offre des perspectives pour sélectionner un agent de biocontrôle. En effet, la connaissance de la gamme de facteurs environnementaux à l'intérieur de laquelle les agents pathogènes peuvent proliférer est une étape importante dans la sélection des agents de la lutte biologique. Il est connu que *Pectobacterium* spp. exige pour sa croissance de l'eau libre au niveau du site de croissance (Pringle et al., 1991) c'est pourquoi il serait approprié d'incorporer directement l'humidité observée au niveau du site de la croissance bactérienne dans le modèle en lieu et place de l'humidité détectée dans l'atmosphère de stockage. Mais cette méthode nécessite la disponibilité d'un outil capable de mesurer directement l'humidité au niveau du site de la croissance bactérienne.

Les courbes de contour décrivant l'effet combiné de la température et de l'humidité relative sur le logarithme de la densité de la population de Pba (Figure 12a, b et c) et Pcc (Figure 13a, b et c) ont été réalisées pour chaque concentration d'inoculum. Ces graphiques montrent que le logarithme de la densité de la population des deux *Pectobacterium* (Pba et Pcc) augmente avec la concentration bactérienne initiale. Ces résultats indiquent que la croissance de Pba et Pcc sont également dépendantes de la température. Des résultats similaires ont été observés par Van Vuurde et de Vries (1994) sur le nombre de Pba au niveau des blessures des tubercules de pomme de terre deux jours après inoculation. Erinle (1975) a également observé une augmentation de la croissance de Pba et Pcc sous l'effet de la température (25-30°C) et de l'humidité relative (68%) mais sur des tiges de plants de pomme de terre inoculées. L'augmentation de la population de Pba et Pcc avec la température suggère également une augmentation du risque d'initiation de la pourriture molle sur des tubercules de pomme de terre blessés. Plusieurs auteurs ont reporté que, lorsqu'un nombre critique de bactéries (10^7 - 10^8 UFC) est atteint au niveau du site d'infection, les *Pectobacterium* spp. secrètent

plusieurs enzymes extracellulaires parmi lesquelles on distingue les enzymes pectinolytiques qui sont essentielles pour la virulence (Barras et al., 1994; Maë et al., 2001; Pérombelon, 2002; Latour et al., 2008). Cette sécrétion est contrôlée par un processus de *quorum-sensing* qui repose sur la production de N-acylhomoserine lactones (AHL) par les bactéries (Toth et al., 2004; Barnard et Salmon, 2007; Cirou et al., 2009; Truchado et al., 2012). Lorsque l'infection est initiée, le développement des symptômes de la maladie est tributaire au potentiel hydrique des tubercules de pomme de terre (Pérombelon et Salmond, 1995; Pérombelon, 2002). La croissance de Pba et Pcc est plus dépendante de la température que de l'humidité relative dans la gamme testée quelle que soit la concentration initiale de bactéries. Par ailleurs, la croissance minimale et maximale de Pba et Pcc ont été observées respectivement à 10 et 20°C indépendamment de la concentration initiale de bactéries appliquée. La croissance maximale de Pba pour les trois concentrations initiales testées était environ 10 fois plus élevée que celle de Pcc. Ces résultats suggèrent que Pba croît plus vite que Pcc à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre.

4.2.2. Effet de la température, de l'humidité relative et de la concentration en inoculum sur le développement des symptômes de pourriture molle des tubercules de pomme de terre

Les modèles quadratiques suivants permettent de prédire l'effet simultané de la température, de l'humidité relative et de la concentration initiale d'inoculum sur le pourcentage de la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie (Figure 14) au niveau des blessures:

$$Y_3 = 11,814 + 9,721X_T + 1,225X_{HR} + 12,386X_C + 1,261(X_T)^2 + 1,715(X_{HR})^2 + 6,944(X_C)^2 + 1,276X_TX_{HR} + 7,955X_TX_C + 0,137X_{HR}X_C \quad (19)$$

$$Y_4 = 9,272 + 8,109X_T + 1,095X_{HR} + 10,609X_C + 0,717(X_T)^2 + 1,794(X_{HR})^2 + 1,35(X_C)^2 + 0,102X_TX_{HR} + 6,869X_TX_C + 0,686X_{HR}X_C \quad (20)$$

où Y_3 et Y_4 représentent respectivement les valeurs prédictes du pourcentage de la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie au niveau des blessures due à Pba et Pcc; X , le code de valeur (entre -1 et +1) pour les facteurs indiqués par les indices attachés.

Les résultats du pourcentage (%) de la quantité de chair de pomme de terre pourrie observés et prédits à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre causé par Pba 03034/1 et Pcc 030033 sont présentés respectivement dans le tableau 7 et 8, colonne 7 et 8. De manière globale, il n'y a pas de grande différence entre les résultats du pourcentage de la quantité de chair de pomme de terre pourrie observés et prédits à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre causé par Pba et Pcc.

Les tableaux 9 et 10, colonne 4 et 4, résument respectivement les coefficients de régression de l'équation (19) et (20), estimés au moyen de la régression multiple. Tous les coefficients linéaires des deux modèles (Pba et Pcc) à savoir β_1 , β_2 et β_3 , caractérisant respectivement les effets de la température, de l'humidité relative et de la concentration de l'inoculum appliquée sont très hautement significatifs pour β_1 et β_3 sauf β_2 qui est significatif. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Togbé (2007) sur le développement de la pourriture molle au niveau de tranches de tubercules de pomme de terre inoculées avec Pba. Plusieurs auteurs ont indiqué l'importance de l'effet isolé des trois facteurs testés sur le développement de la maladie par Pba et Pcc (Pérombelon et Kelman, 1980; Pérombelon, 1992; Kushalappa et Zulfiqar, 2001). Les coefficients β_{11} , β_{22} , et β_{33} décrivant respectivement l'effet quadratique de la température, de l'humidité relative et de la concentration d'application en inoculum ont un effet non significatif pour β_{11} , significatif pour β_{22} et très hautement significatif pour β_{33} au niveau de Pba et Pcc. Au niveau interaction entre les facteurs, les interactions température x humidité relative et humidité relative x concentration initiale en inoculum ne sont pas significatives pour les deux modèles. Les effets quadratiques ou d'interactions non significatifs des facteurs testés, semblent indiquer qu'ils n'ont pas d'influence sur le pourcentage de tissu pourri prédict par chaque modèle dans nos conditions expérimentales contrairement à ceux qui ont été significatifs. Des tubercules de pomme de terre présentent toujours des infections latentes avec *Pectobacterium* spp. (Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003) et des humidités relatives élevées (85 à 95%) sont toujours présentes pendant la phase du stockage (Martin et Gravouille, 2001). C'est pourquoi, si l'interaction humidité relative x concentration initiale en inoculum était significative, des cas d'infection massive des lots de pomme de terre devraient toujours avoir lieu pendant la phase du stockage. L'interaction température x concentration initiale en inoculum a un effet très hautement significatif et positif avec le modèle de Pba et Pcc, ce qui suggère un effet de synergie de cette combinaison sur le pourcentage de la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie.

Les courbes des contours de surface de réponse montrant l'effet combiné de la température et de l'humidité relative sur le développement de la pourriture molle au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre causé par Pba (Figure 12d, e et f) et Pcc (Figure 13d, e et f) ont été également réalisées pour les trois concentrations d'inoculum (10^5 , 10^7 et 10^9). Ce choix est guidé par le fait que la quantité d'inoculum initial présent au niveau des tubercules au moment du stockage est une donnée fixe, seuls varient la température et l'humidité relative (facteurs environnementaux). Comme nous l'avons relevé pour la croissance des deux *Pectobacterium* (Pba et Pcc), le pourcentage de la quantité de chair de tubercules de pomme

de terre pourrie est plus dépendant de la température que de l'humidité relative quelle que soit la concentration initiale des bactéries. Togbé (2007) a observé des résultats similaires avec Pba sur des tranches de tubercules de pomme de terre. En outre, le pourcentage de la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie maximale due à Pba et Pcc est observé lorsque la température et l'humidité relative sont les plus élevées (20°C et 100%) avec un effet plus marqué avec Pcc quelle que soit la concentration initiale appliquée. Ces résultats suggèrent que Pcc est plus dommageable que Pba dans nos conditions d'études. L'effet différentiel de la température sur la pathogénicité de Pba et Pcc peut être attribué à son effet sur la production des pectates lyases (Smadja et al., 2004a).

Les modèles polynomiaux décrits dans ce travail au moyen d'une analyse multi-factorielle ne sont uniquement valables que dans le champ expérimental des facteurs testés, pour les deux souches de Pba et Pcc testées, pour la variété de pomme de terre Bintje, etc. Toute extrapolation à d'autres souches, espèces, ou sous-espèces de *Pectobacterium*, cultivars de pomme de terre ou en dehors du domaine expérimental des valeurs expérimentales considérées dans cette étude est à proscrire.

Tableau 7. Valeurs expérimentales et prédictives des densités de population de *Pba*, exprimées en \log_{10} (UFC/cm²), à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre et de la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie au niveau des blessures, exprimée en pourcentage (%), due à la pourriture molle, obtenues par l'application du plan expérimental de Box-Behnken pour les trois facteurs contrôlés, température, humidité relative et la concentration initiale d'application de *Pba*.

Essai	Température (°C)	Humidité Relative (%)	Concentration d'application (UFC/ml)	Densité de <i>Pba</i> \log_{10} (UFC/cm ²)		Quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie (%)	
				Valeurs observées	Valeurs prédictives	Valeurs observées	Valeurs prédictives
E ₁	10	96	10 ⁹	7,90 ± 0,02	7,93	13,46 ± 0,83	14,73
E ₂	15	96	10 ⁷	7,45 ± 0,25	7,44	12,15 ± 0,66	11,81
E ₃	20	86	10 ⁷	7,60 ± 0,09	7,52	19,70 ± 0,29	22,01
E ₄	10	86	10 ⁷	5,84 ± 0,01	5,83	6,05 ± 0,40	5,12
E ₅	10	96	10 ⁵	3,89 ± 0,05	3,80	3,89 ± 0,31	5,87
E ₆	20	100	10 ⁷	7,71 ± 0,09	7,72	26,08 ± 1,25	27,01
E ₇	15	96	10 ⁷	7,42 ± 0,27	7,44	12,12 ± 1,83	11,81
E ₈	20	96	10 ⁹	9,49 ± 0,17	9,58	52,06 ± 1,46	50,08
E ₉	10	100	10 ⁷	5,90 ± 0,01	5,98	7,33 ± 0,50	5,02
E ₁₀	15	100	10 ⁵	5,35 ± 0,04	5,37	8,84 ± 0,43	9,17
E ₁₁	20	96	10 ⁵	5,59 ± 0,23	5,57	10,67 ± 0,78	9,40
E ₁₂	15	100	10 ⁹	9,70 ± 0,01	9,59	33,18 ± 2,86	34,22
E ₁₃	15	86	10 ⁹	9,28 ± 0,01	9,26	31,83 ± 2,47	31,50
E ₁₄	15	86	10 ⁵	5,24 ± 0,01	5,34	8,05 ± 0,06	7,00
E ₁₅	15	96	10 ⁷	7,43 ± 0,16	7,44	11,17 ± 1,28	11,81

Tableau 8. Valeurs expérimentales et prédictives des densités de population de Pcc, exprimées en \log_{10} (UFC/cm²), à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre et de la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie au niveau des blessures, exprimée en pourcentage (%), due à la pourriture molle, obtenues par l'application du plan expérimental de Box-Behnken pour les trois facteurs contrôlés, température, humidité relative et la concentration initiale d'application de Pcc.

Essai	Température (°C)	Humidité Relative (%)	Concentration d'application (UFC/ml)	Densité de Pcc \log_{10} (UFC/cm ²)		Quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie (%)	
				Valeurs observées	Valeurs prédictes	Valeurs observées	Valeurs prédictes
E ₁	10	96	10 ⁹	7,78 ± 0,03	7,83	10,30 ± 1,06	12,01
E ₂	15	96	10 ⁷	6,59 ± 0,13	6,55	9,31 ± 1,01	9,27
E ₃	20	86	10 ⁷	6,35 ± 0,09	6,39	16,93 ± 0,73	18,69
E ₄	10	86	10 ⁷	5,75 ± 0,03	5,70	4,14 ± 0,17	2,68
E ₅	10	96	10 ⁵	3,88 ± 0,02	3,92	3,01 ± 0,57	4,53
E ₆	20	100	10 ⁷	6,53 ± 0,12	6,58	19,63 ± 1,27	21,09
E ₇	15	96	10 ⁷	6,45 ± 0,28	6,55	9,27 ± 0,74	9,27
E ₈	20	96	10 ⁹	8,70 ± 0,12	8,66	43,49 ± 2,04	41,97
E ₉	10	100	10 ⁷	5,81 ± 0,03	5,76	6,43 ± 0,20	4,67
E ₁₀	15	100	10 ⁵	4,79 ± 0,05	4,79	7,01 ± 0,07	7,26
E ₁₁	20	96	10 ⁵	4,67 ± 0,13	4,61	8,72 ± 0,34	7,01
E ₁₂	15	100	10 ⁹	8,82 ± 0,07	8,81	29,78 ± 1,08	29,85
E ₁₃	15	86	10 ⁹	8,65 ± 0,02	8,65	26,53 ± 1,16	26,28
E ₁₄	15	86	10 ⁵	4,70 ± 0,04	4,71	6,50 ± 0,59	6,44
E ₁₅	15	96	10 ⁷	6,63 ± 0,14	6,55	9,24 ± 0,54	9,27

Tableau 9. Coefficients de régression des modèles et leur signification sur la densité de population de Pba exprimée en \log_{10} (UFC/cm²) à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre et la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie exprimée en pourcentage (%) au niveau des blessures due à la pourriture molle.

Paramètres	Coefficients	Densité de Pba \log_{10} (UFC/cm ²)	Quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie (%)
Constante	β_0	7,438***	11,814***
T	β_1	0,856***	9,721***
HR	β_2	0,088*	1,225*
C	β_3	2,036***	12,386***
T^2	β_{11}	-0,675***	1,261 ^{ns}
HR^2	β_{22}	-0,001 ^{ns}	1,715*
C^2	β_{33}	-0,045 ^{ns}	6,944***
T x HR	β_{12}	0,012 ^{ns}	1,276 ^{ns}
T x C	β_{13}	0,076 ^{ns}	7,955***
HR x C	β_{23}	0,07 ^{ns}	0,137 ^{ns}

^{ns} non significatif, *significatif ($P < 0,05$), **hautement significatif ($P < 0,01$),

***très hautement significatif ($P < 0,001$)

Tableau 10. Coefficients de régression des modèles et leur signification sur la densité de population de Pcc exprimée en \log_{10} (UFC/cm²) à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre et la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie exprimée en pourcentage (%) au niveau des blessures due à la pourriture molle.

Paramètres	Coefficients	Densité de Pcc \log_{10} (UFC/cm ²)	Quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie (%)
Constante	β_0	6,555***	9,272***
T	β_1	0,379***	8,109***
HR	β_2	0,063*	1,095*
C	β_3	1,989***	10,609***
T^2	β_{11}	-0,465***	0,717 ns
HR^2	β_{22}	0,019 ns	1,794*
C^2	β_{33}	0,166***	1,35***
T x HR	β_{12}	0,030 ns	0,102 ns
T x C	β_{13}	0,033 ns	6,869***
HR x C	β_{23}	0,019 ns	0,686 ns

ns non significatif, *significatif ($P < 0,05$), **hautement significatif ($P < 0,01$),

***très hautement significatif ($P < 0,001$)

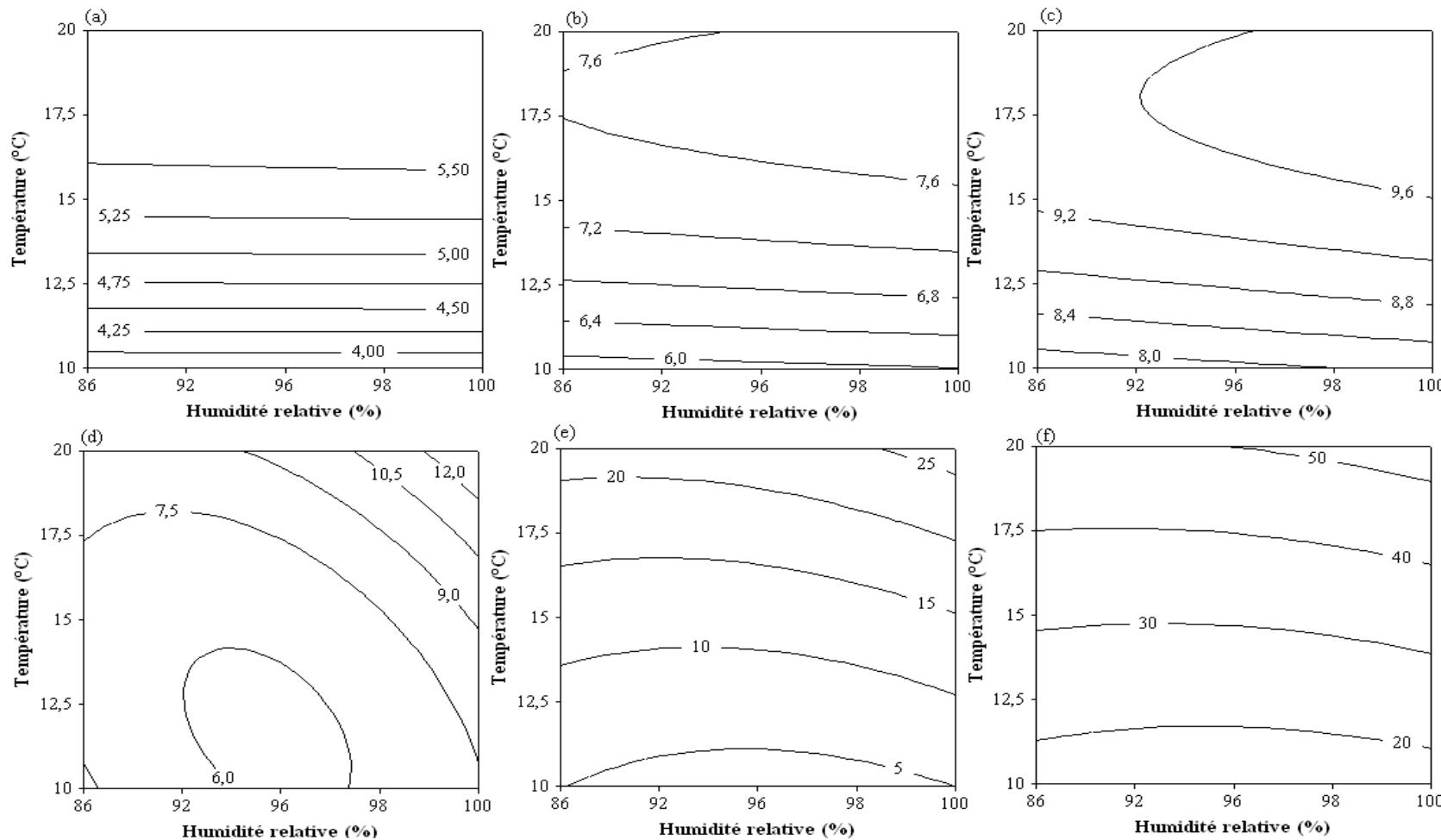


Figure 12. Courbes de contour montrant l'effet prédict de la température et de l'humidité relative, sur la densité de la population de Pba, exprimée en \log_{10} (UFC/cm^2), à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre, inoculées avec 10^5 (a), 10^7 (b) et 10^9 (c) de Pba; et sur le développement de la pourriture molle au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre, exprimée en pourcentage (%) de tissu pourri, inoculées avec 10^5 (d), 10^7 (e) et 10^9 (f) de Pba.

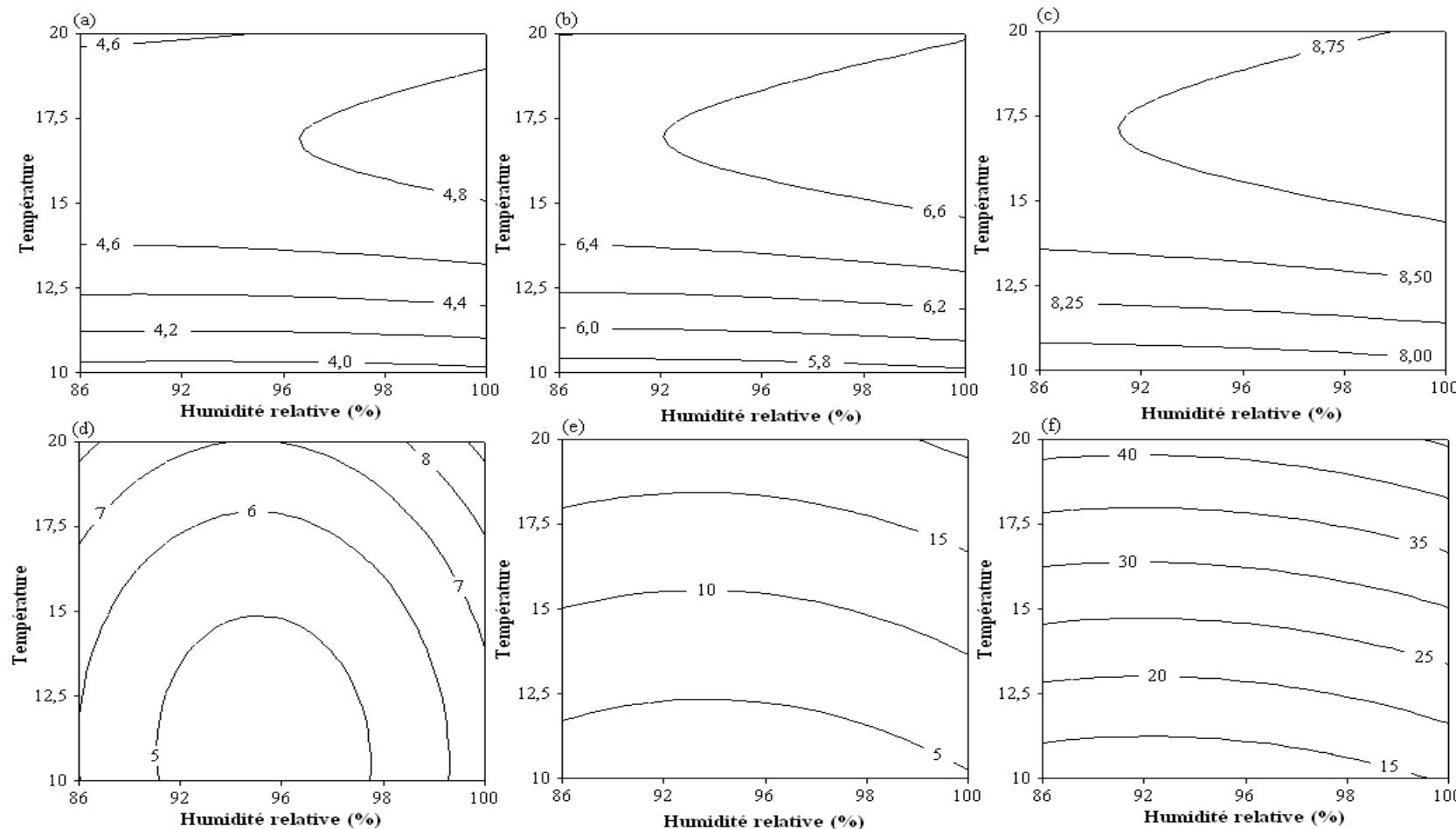


Figure 13. Courbes de contour montrant l'effet prédict de la température et de l'humidité relative, sur la densité de la population de Pcc, exprimée en \log_{10} (UFC/cm²), à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre, inoculées avec 10^5 (a), 10^7 (b) et 10^9 (c) de Pcc; et sur le développement de la pourriture molle au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre, exprimée en pourcentage (%) de tissu pourri, inoculées avec 10^5 (d), 10^7 (e) et 10^9 (f) de Pcc.

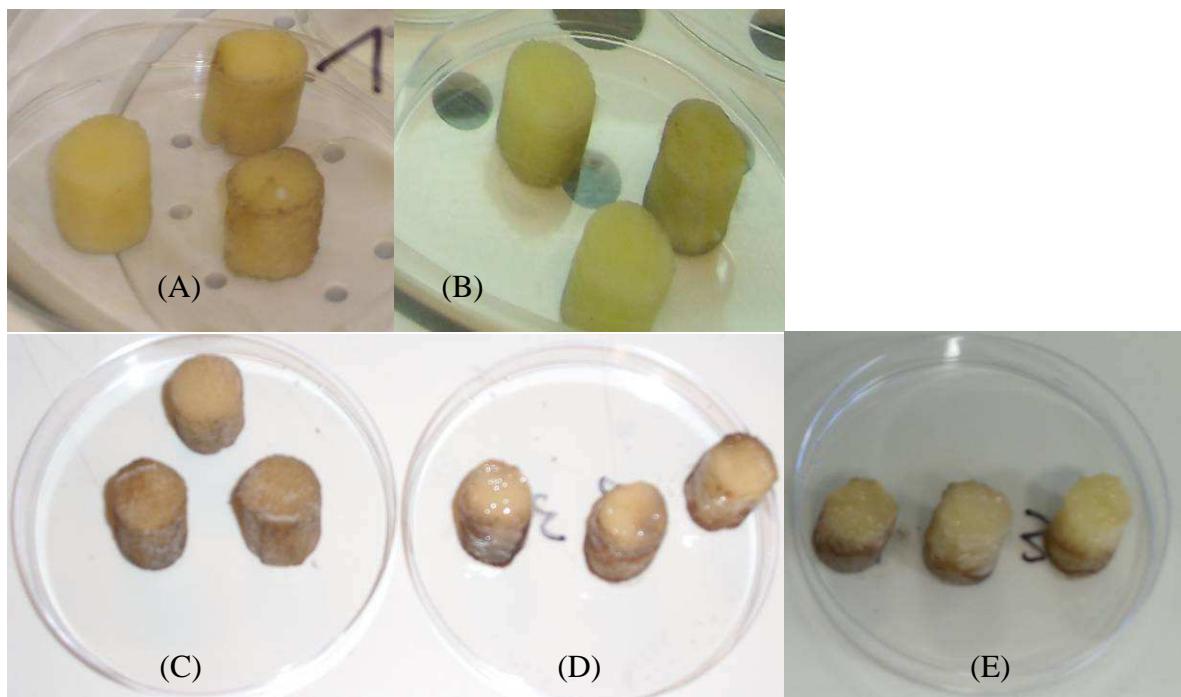


Figure 14. Cylindres de chair de tubercules de pomme de terre inoculés, avec du NaCl à 0,85% chez des témoins (A), avec Pba ou Pcc (10^9 UFC/ml) (B) avant l'incubation à 20°C et à 100% d'humidité relative. Cylindres de chair de tubercules de pomme de terre après trois jours d'incubation à 20°C et à 100% d'humidité relative présentant, aucun symptôme de la pourriture molle chez des témoins (C), des symptômes de pourriture molle (D) et (E) dus respectivement à Pba et Pcc (10^9 UFC/ml).

4.2.3. Validation des modèles prédictifs *in vivo*

4.2.3.1. Modèles décrivant la densité de population bactérienne à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre

Les tests de validation mathématiques et statistiques de la qualité de prédiction de la densité de population bactérienne de Pba et Pcc, à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre par les deux modèles établis dans les conditions contrôlées *in vivo* sont présentés au tableau 11. Les coefficients de détermination R^2 , correspondant aux deux modèles établis sont de 99,06 pour Pba et de 99,40 pour Pcc. Lorsque la valeur de R^2 est proche de 1 le modèle est dit statistiquement capable de prédire la réponse (\log_{10} (UFC/cm²)) à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre. Le coefficient R^2 est interprété comme étant la part de variation de la réponse expliquée par les variables impliquées dans la conception du modèle. Ceci montre dans notre cas que 99,06% de variation de la densité de population de Pba et 99,40% de variation de la densité de population de Pcc observées à la surface des blessures de tubercules de pomme terre sont attribuées seulement à la température, l'humidité relative et la concentration initiale d'application (Box et Draper, 1987). Les deux modèles montrent de faibles valeurs de RMSE, compris entre 0,117 et 0,161. Quelle que soit l'espèce ou la sous-espèce de *Pectobacterium* étudiée, l'indice de biais est très proche de 1,00. Ces résultats confirment que nos deux modèles permettent une bonne prédiction de la densité de population bactérienne, à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre en fonction des facteurs étudiés à partir de leurs points expérimentaux. Les indices de précisions basés sur les données de croissance expérimentales montrent que les prédictions diffèrent de l'observation par 1 et 2% respectivement pour Pcc et Pba.

Tableau 11. Indices de validation de la performance des modèles de la densité de population de Pba et Pcc exprimée en \log_{10} (UFC/cm²) à la surface des blessures de tubercules de pomme de terre.

	Densité des bactéries \log_{10} (UFC/cm ²)	
	Pba 03034/1	Pcc 030033
R^2	99,06	99,40
RMSE	0,161	0,117
Indice de biais	1,00	1,00
Indice de précision	1,02	1,01

4.2.3.2. Modèles décrivant le développement de la pourriture molle au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre

Les indices de validation de la performance des modèles de prédiction du développement de la pourriture molle au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre pour les deux modèles établis sont consignés dans le tableau 12. Au regard des coefficients de détermination R^2 obtenus, nous pouvons donc dire que 97,63% de variation du pourcentage de la quantité de chair de pomme de terre pourrie au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre sont attribuées à la température, l'humidité relative et la concentration initiale d'application de Pba. Le modèle établi pour Pcc permet d'expliquer 97,00% de variation du pourcentage de la quantité de chair de pomme de terre pourrie au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre sous l'effet combiné de la température, de l'humidité relative et de la concentration initiale d'application. Les différences moyennes entre les valeurs observées et prédites de la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie pour les modèles de Pba et Pcc sont respectivement de 15 et 18%. Le modèle de Pba et Pcc montrent respectivement des valeurs de RMSE de 2,568 et 2,476. Les indices de biais des modèles établis dans cette étude sont de 1,01. Ces valeurs étant proches de 1 nous permettent de dire que les modèles établis sont fiables pour Pba et Pcc.

Tableau 12. Indices de validation de la performance des modèles sur le développement de la pourriture molle exprimée en pourcentage (%) de tissu pourri.

	Quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie (%)	
	Pba 03034/1	Pcc 030033
R^2	97,63	97,00
RMSE	2,568	2,476
Indice de biais	1,01	1,01
Indice de précision	1,15	1,18

4.2.4. Corrélation entre la densité de la population de Pba, de Pcc et le développement des symptômes de pourriture molle

L'analyse de la corrélation entre la densité de la population de Pba et le développement des symptômes de pourriture molle donne un coefficient de corrélation linéaire (r) égale à 0,83 ($R^2 = 69\%$). Pour Pcc nous avons observé un r égale à 0,80 ($R^2 = 64\%$) entre la densité de la population et le développement des symptômes de pourriture molle. Ces résultats indiquent que plus de 64% de la variabilité des symptômes de pourriture molle observée pourraient être expliqués par la présence de Pba et Pcc au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre sous l'effet combiné de la température et de l'humidité relative. L'effet combiné des facteurs étudiés dans ce travail n'est pas la seule combinaison de facteurs responsables du développement de la pourriture molle à la surface des tubercules de pomme de terre blessés. D'autres facteurs non contrôlés par l'expérimentation comme le statut en O_2 de l'enceinte du dessicteur, la résistance physiologique, les conditions de la récolte ou de stockage des tubercules de pomme de terre pourraient également moduler le développement de la maladie (Kushalappa et Zulfiqar, 2001; Lui et Kushalappa, 2003). De plus, l'aptitude à la croissance des bactéries a été évaluée sur un support de croissance non naturel et elle ne sera pas forcément la même si les bactéries avaient été cultivées directement sur la chair des tubercules de pomme de terre.

4.2.5. Liens entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*

Dans ce paragraphe nous tenterons de dégager les acquis de notre travail tant *in vitro* qu'en conditions *in vivo* afin de comparer qualitativement, les deux types de modèles prédictifs développés pour Pba et Pcc.

La faiblesse majeure de notre approche de travail est qu'il est difficile de transposer les résultats obtenus *in vitro* à ceux obtenus *in vivo*.

Les modèles prédictifs de croissance établis *in vivo* et *in vitro* montrent que la première étape de la pathogénèse des *Pectobacterium* spp. (multiplication des bactéries) est plus dépendante de la température du site d'infection (Effet température > effet a_w ou HR). De plus, l'aptitude à la croissance de Pba et Pcc observée *in vitro* (allure de croissance presque similaire) est opposée à celle relevée *in vivo* (croissance maximale de Pba est 10 fois plus élevée que celle de Pcc).

La production *in vivo* des PEL (deuxième étape de la pathogénèse des *Pectobacterium* spp.) est mesurée indirectement par la quantité de chair de tubercules de pomme de terre pourrie.

In vitro, Pba et Pcc ont montré un pouvoir pathogène presque identique (production quantitative des PEL) pour l'ensemble des combinaisons testées. Cependant, nous avons observé une réaction non similaire *in vivo*.

Ces discordances observées entre le déclenchement de la pathogénèse *in vitro* (croissance bactérienne et production de PEL) et *in vivo* (croissance bactérienne et développement de la pourriture via les PEL) voudraient dire que le comportement écologique des *Pectobacterium* spp. *in vitro* (croissance) et leur pouvoir pathogène (PEL) ne sont pas des indicateurs fiables de ce que serait leur croissance et leur capacité à macérer les tubercules de pomme de terre blessés.



Chapitre 5: Conclusions générales et perspectives

Chapitre 5: Conclusions générales et perspectives

5.1. Conclusions générales

La pourriture molle de la pomme de terre est une maladie d'importance mondiale, qui occasionne des pertes économiques considérables au stockage. En entrepôt, la température et la formation d'eau libre à la surface des tubercules de pomme de terre jouent un rôle majeur dans l'initiation et le développement de la maladie, provoquée par les deux espèces bactériennes étudiées à savoir *Pectobacterium atrosepticum* (Pba) et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc). La présente étude est une contribution à l'évaluation et à la modélisation, des compétences écologiques de Pba et Pcc, et au développement de la pourriture molle au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre vis-à-vis des facteurs environnementaux. Deux approches de travail ont été adoptées dans cette étude à savoir l'approche *in vitro* et l'approche *in vivo*.

Les études *in vitro* ont consisté à déterminer l'effet combiné de la température et de l' a_w sur la croissance et la production des PEL (deux étapes clés de la pathogénèse) de ces deux bactéries (Pba et Pcc). Nous avons développé *in vitro* des modèles prédictifs permettant de décrire la croissance de Pba et Pcc sous l'effet combiné de la température et de l' a_w . Ces modèles prédictifs permettent d'expliquer respectivement 97,29% et 97,76% des variations observées au niveau du taux de croissance spécifique maximal de Pba et Pcc sous l'effet combiné de la température et l' a_w . Les résultats ont montré un effet significatif de l' a_w et la température sur le taux de croissance spécifique maximal (μ_{max}) des deux bactéries (Pba et Pcc). A l'opposé de la croissance bactérienne l'activité spécifique des PEL n'augmente pas avec l' a_w pour nos deux bactéries sauf pour les traitements à 15 et 20°C pour toutes les souches bactériennes. L'eau libre ne joue donc pas un rôle prépondérant dans la deuxième phase de la pathogénèse à savoir la production des PEL par les *Pectobacterium* spp. infectant les tubercules de pomme de terre. Sur la base de ces observations nous pouvons dire que Pba et Pcc ont le même comportement dans nos conditions expérimentales.

Nous avons tenté de mettre au point des modèles mathématiques permettant, d'une part de décrire la dynamique de croissance de la population de Pba et Pcc en fonction de l'humidité relative, la température et la concentration initiale d'inoculum et d'autre part, de décrire l'effet de ces deux facteurs environnementaux, la température et l'humidité relative, sur le développement des symptômes de pourriture molle au niveau des tubercules de pomme de terre blessés et inoculés par différentes concentrations d'une suspension de Pba et Pcc. Sur la

base des différents coefficients de détermination R^2 calculés, nous pouvons dire que la part de variation de la densité de population bactérienne expliquée par le modèle est de 99,06% pour Pba et 99,40% pour Pcc. De même, les modèles établis pour Pba et Pcc permettent d'expliquer respectivement 97,63% et 97,00% de variation du pourcentage de la quantité de chair de pomme de terre pourrie au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre sous l'effet combiné de la température, de l'humidité relative et de la concentration initiale d'application.

L'analyse statistique a montré un effet significatif de la température, de l'humidité relative et de la concentration initiale de bactéries sur la dynamique de la population des deux *Pectobacterium* spp. (Pba et Pcc) et sur le développement de la pourriture molle à la surface des tubercules de pomme de terre blessés. Nous avons observé, pour toutes les combinaisons testées, un risque potentiel de la croissance de Pba et Pcc et du développement de la pourriture molle au niveau des blessures des tubercules de pomme de terre. Plus les deux facteurs environnementaux augmentent (température et humidité relative) plus ce risque s'accentue.

Au vu de l'ensemble de ces informations issues de l'analyse des coefficients de régression multiple et des courbes de contour nous pouvons dire que, dans nos conditions expérimentales, la température apparaît comme le facteur le plus important, suivi de la concentration de l'inoculum et de l'humidité relative, dans la croissance des deux *Pectobacterium* spp. (Pba et Pcc) et dans le développement des symptômes de pourriture molle.

Plus de 64% de la variation observée au niveau des symptômes de pourriture molle pourraient être expliqués par la présence de Pba et Pcc au niveau des blessures de tubercules de pomme de terre sous l'effet combiné des facteurs environnementaux (température et humidité relative). Les modèles développés *in vivo* dans cette étude ont une bonne capacité de prédiction de la réponse (R^2 est proche de 1,00 pour chaque modèle). Cependant, avant leur utilisation comme un système d'aide à la décision, des adaptations aux conditions pratiques sont nécessaires. Il s'agit d'intégrer aux modèles différentes souches de *Pectobacterium* spp., différents cultivars de pomme de terre, la physiologie des tubercules de pomme de terre, les conditions de récolte et de stockage, etc. En outre, les résultats obtenus dans ce travail pour les deux types de modèles prédictifs à savoir les modèles *in vitro* et les modèles *in vivo* ne seront pas valables en dehors du domaine d'étude des différents facteurs testés. C'est pourquoi, toutes extrapolations de ces résultats seraient hasardeuses et dangereuses.

5.2. Perspectives

Tous les modèles prédictifs développés dans cette étude *in vitro* et *in vivo* ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité des *Pectobacterium* appartenant à la même espèce. C'est pourquoi, les travaux futurs devraient prendre en considération la grande variation génétique existant au sein du genre *Pectobacterium* (Pba et Pcc) et, *Dickeya* spp. qui ont été isolées au cours des dernières années en Europe de l'Ouest et du Nord. En effet, *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. peuvent infecter simultanément les tubercules de pomme de terre en stockage. Mais face aux exigences thermiques plus ou moins différentes de chacune de ces espèces ou sous-espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* il serait recommandé de ne pas utiliser pour la modélisation les mêmes gammes de température ou de les élargir afin de mieux évaluer leurs compétences écologiques au niveau des deux étapes clés de la pathogénèse à savoir la multiplication bactérienne et la macération des tissus de l'hôte via la production d'enzymes pectinolytiques.

Les discordances observées entre Pba et Pcc au niveau des essais *in vitro* (production des PEL) et *in vivo* (développement de la pourriture via l'action des PEL) pourraient être liées à la diversité des isoenzymes de PEL existante chez ces bactéries. Une connaissance précise de leurs nombres et de leurs rôles pendant l'infection *in planta* sous l'effet combiné des facteurs environnementaux testés dans ce travail s'avèreraut utile dans le cadre de la gestion des risques de développement de la maladie.

Les modèles prédictifs de la croissance et du développement de la pourriture molle établis *in vivo* ont été effectués au niveau des blessures des tubercules de pomme de terre. Il serait également intéressant de suivre la population de *Pectobacterium* spp. au niveau des lenticelles (portes d'entrées naturelles des *Pectobacterium* spp.) des tubercules entiers de pomme de terre. Mais tout ceci nécessite, une méthode d'inoculation adéquate des tubercules entiers de pomme de terre au niveau des lenticelles tel que l'inoculation sous-vide et un plan expérimental approprié.

Par ailleurs, au cours de cette investigation, le facteur de risque du développement de la pourriture molle était qualitatif c'est-à-dire une population faible ou élevée de *Pectobacterium* spp. au niveau des blessures des tubercules de pomme de terre correspondaient respectivement à un risque faible ou élevé du développement de la maladie. Il serait intéressant de quantifier ce facteur de risque c'est-à-dire associé au risque qualitatif (faible ou élevé) du développement de la pourriture molle la quantité de tubercules de pomme de terre infectés (incidence de la maladie).

Les modèles prédictifs développés dans cette étude *in vivo* ont confirmé un effet important de la température et de l'humidité relative sur la croissance de Pba et Pcc à la surface des tubercules de pomme de terre blessés. Ces résultats pourraient aider à orienter la sélection et la formulation en faveur d'un ou plusieurs agents antagonistes contre ces deux bactéries phytopathogènes (Pba et Pcc) de la pomme de terre.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abo-Elyousr K.A.M., Allam A.D.A., Sallam M.A., Hassan M.H.A. 2010.** Role of certain potato tubers constituents in their resistance to bacterial soft rot caused by *E. carotovora* ssp. *carotovora*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **43**, 1190–1197.
- Afek U., Orenstein J. 2002.** Disinfecting potato tubers using steam treatments. *Canadian Journal of Plant Pathology* **24**, 36–39.
- Afek U., Orenstein J., Nuriel E. 1999.** Fogging disinfectants inside storage rooms against pathogens of potatoes and sweet potatoes. *Crop Protection* **18**, 111-114.
- Agrios G.N. 2005.** Plant Pathology. Elsevier academic press. 5th ed. San Diego, California. USA.
- Ahmed M.E.E. 2001.** Detection and effects of latent contamination of potato tubers by soft rot bacteria, and investigations on the effect of hydrogen peroxide on lipopolysaccharides of *Erwinia carotovora* in relation to acquired resistance against biocides. Thesis in Agricultural Sciences. Georg-August-University, Göttingen, Germany, 166p.
- Ahmet L.T., Stevenson W.R., Helgeson J.P., Jiang J. 2004.** Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 249–254.
- Ahn I-P. 2007.** Disturbance of the Ca²⁺/calmodulin-dependent signalling pathway is responsible for the resistance of *Arabidopsis* dnd1 against *Pectobacterium carotovorum* infection. *Molecular Plant Pathology* **8**, 747–759.
- Alfano J.R., Collmer A. 1996.** American Society of Plant Physiologists Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *The Plant Cell* **8**, 1683-1698.
- Allan E., Kelman A. 1977.** Immunofluorescence stain procedures for detection and identification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Phytopathology* **67**, 1305-1312.
- Alvarez A.M. 2004.** Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 339–366.
- Anajjar B., Aitmhand R., Timinouni M., Ennaji M.M. 2007.** Caractérisation par PCR de deux souches d'*Erwinia carotovora* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre dans la région du grand Casablanca au Maroc. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **37**, 175–180.
- Avrova A.O., Hyman L.J., Toth R.L., Toth I.K. 2002.** Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot

- bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied Environmental Microbiology* **68**, 1499–1508.
- Baghaee-Ravari S., Rahimian H., Shams-Bakhsh M., Lopez-Solanilla E., Antúnez-Lamas M., Rodríguez-Palenzuela P. 2011.** Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. *European Journal of Plant Pathology* **129**, 413–425.
- Bain R.A., Millard P., Pérombelon M.C.M. 1996.** The resistance of potato plants to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in relation to their calcium and magnesium content. *Potato Research* **39**, 185–193.
- Bain R.A., Pérombelon M.C.M., Tsor L., Nachmias A. 1990.** Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed potatoes. *Plant Pathology* **39**, 125–33.
- Baranyi J., McClure P.J., Sutherland J.P., Roberts T.A. 1993b.** Modelling bacterial growth responses. *Journal of Industrial Microbiology* **12**, 190–194.
- Baranyi J., Roberts T.A., McClure P.J. 1993a.** A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* **10**, 43–59.
- Barnard A.M.L., Bowden S.D., Burr T., Coulthurst S.J., Monson R.E., Salmond G.P.C. 2007.** Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **362**, 1165–1183.
- Barnard A.M.L., Salmond G.P.C. 2007.** Quorum sensing in *Erwinia* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 415–423.
- Barras F., Thurn K.K., Chatterjee A.K. 1987.** Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) and characterisation of the enzymes in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics* **209**, 319–325.
- Barras F., Van Gijsegem F., Chatterjee A.K. 1994.** Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology* **32**, 201–34.
- Barzic M.R., Samson R., Trigalet A. 1976.** Pourriture bactérienne de la tomate cultivée en serre. *Annual Review of Phytopathology* **8**, 237–40.
- Basham H.G., Bateman D.F. 1975.** Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. *Phytopathology* **65**, 141–153.
- Baty F., Delignette-Muller M.L. 2004.** Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology* **91**, 261–277.

- Baz M., Lahbabi D., Samri S., Val F., Hamelin G., Madore I., Bouarab K., Beaulieu C., Ennaji M.M., Barakate M. 2012.** Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**, 303–311.
- Bdliya B.S. 1995.** Studies on the detection and identification of soft rot causing *Erwinia* species (*Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (van Hall) Dye, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Jones) Bergey *et al.*, and *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al.*) on potato tubers. Dissertation, Universität Göttingen, 148p.
- Beaulieu C., Boccara M., van Gijsegem F. 1993.** Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 197–202.
- Bedin P. 1988.** Les maladies provoquées par les bactéries du genre *Erwinia*. *La pomme de terre française* **445**, 65-68.
- Blom T.J., Brown W. 1999.** Preplant Copper-based Compounds Reduce *Erwinia* Soft Rot on Calla Lilies. *HortTechnology* **9**, 56-59.
- Bolwell G.P., Wojtaszek P. 1997.** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence — a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 347-366.
- Boucher C., Genin S., Arlat M. 2001.** Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences* **324**, 915–922.
- Box G.E.P., Behnken D.W. 1960.** Some new three level design for study of quantitative variables. *Technometrics* **2**, 455-476.
- Box G.E.P., Draper N.R. 1987.** Empirical Model Building and Response Surfaces. John Wiley and Sons Inc., New York, NY, USA.
- Brenner D.J., Steigerwalt A.G., Miklos G.V., Fanning G.R. 1973.** Deoxyribonucleic acid relatedness among erwiniae and other Enterobacteriaceae: the soft-rot organisms (genus *Pectobacterium* Waldee). *International Journal of Systematic Bacteriology* **23**, 205–216.
- Brewer J.W., Harrison M.D., Winston J.A. 1980.** Differential attraction of *Drosophila Melanogaster* meig. to potato tissue infected with two varieties of *Erwinia carotovora*. *American Potato Journal* **57**, 319-224.
- Brock T.D., Madigan M.T. 1991.** Growth and its control. In: Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs, pp. 307-347.

- Buchanan R.E. 1918.** Lifes phases in a bacterial culture. *Journal of Infections diseases* **23**, 109-125.
- Buchanan R.L., Cygnarowicz M.L. 1990.** A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology* **7**, 237– 240.
- Buchanan R.L., Whiting R.C. 1996.** Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection*. Supplément, 31-36.
- Burnett E.M., Dashwood P.E., Pérombelon M.C.M. 1990.** Control of blackleg and tuber borne fungal diseases by hot water treatment of seed tubers. EAPR. Abstracts Edingburgh, UK, pp. 441-442.
- Burr T.J., Schroth M.N. 1977.** Occurrence of soft-rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. *Phytopathology* **67**, 1382-1387.
- Burton W.G., Wigginton M.J. 1970.** The effect of a film of water upon the oxygen status of a potato tuber. *Potato Research* **13**, 150–86.
- Buyse S., Trout R. 2001.** Stat 591: Advanced Design of Experiments. Rutgers University Fall 2001, 110p.
- Cahill G., Fraser K., Kowalewska M.J., Kenyon D.M., Saddler G.S. 2010.** Recent findings from the *Dickeya* survey and monitoring programme. In: *Proceedings Crop Protection in Northern Britain 2010*, Dundee, UK, 171–6.
- Campos E., Maher E.A., Kelman A. 1982.** Relationship of pectolytic clostridia and *Erwinia carotovora* strains to decay of potato tubers in storage. *Plant Disease* **66**, 543-6.
- Carputo D., Cardi T., Palta J.P., Sirianni P., Vega S., Frusciante L. 2000.** Tolerance to low temperatures and soft rot in hybrids between *Solanum commersonii* and *Solanum tuberosum* obtained through manipulation of ploidy and endosperm balance number (EBN). *Plant Breeding* **119**, 127-130.
- Charkowski A.O. 2006.** The Soft Rot *Erwinia*. In: Samuel S. Gnanamanickam (Ed.). *Plant-Associated Bacteria*, pp. 423-505.
- Charkowski A.O. 2009.** Decaying signals: will understanding bacterial-plant communications lead to control of soft rot? *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 178–184.
- Charles-Bajard S. 1996.** Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard- Lyon I, 178p.
- Chorin E., Thuault D., Cléret J-J., Bourgeois C.M. 1997.** Modelling *Bacillus cereus* growth. *International Journal of Food Microbiology* **38**, 229–234.

- Cirou A., Diallo S., Kurt C., Latour X., Faure D. 2007.** Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environmental Microbiology* **9**, 1511-22.
- Cirou A., Uroz S., Chapelle E., Latour X., Orange N., Faure D., Dessaix Y. 2009.** Quorum Sensing as a Target for Novel Biocontrol Strategies Directed at *Pectobacterium*. In: U. Gisi et al. (eds.). *Recent Developments in Management of Plant Diseases*, vol. XV, pp. 121-131.
- Collmer A., Keen N.T. 1986.** The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 383-409.
- Costa A.B., Eloy M., Cruz L., Janse J.D., Oliveira H. 2006.** Studies on pectolytic *Erwinia* spp. in Portugal reveal unusual strains of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Plant Pathology* **88**, 161-169.
- Cother E.J., Bradley J.K., Gillings M.R., Fahy P.C. 1992.** Characterization of *Erwinia chrysanthemi* biovars in alpine water sources by biochemical properties, GLC fatty acid analysis and genomic DNA fingerprinting. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 99-107.
- Cronin D., Moënne-Loccoz Y., Fenton A., Dunne C., Dowling D.N., O'Gara F. 1997.** Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiology Ecology* **23**, 95-106.
- Cui W., Quan X., Tao K., Teng Y., Zhang X., Liu Y., Shi G., Hou T. 2009.** Mechanism of action of neomycin on *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **95**, 85-89.
- Cuppels D., Kelman A. 1974.** Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* **64**, 468-475.
- Czajkowski R., de Boer W.J., van Veen J.A., van der Wolf J.M. 2012.** Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 *in vitro* and *in planta*. *Plant Pathology* **61**, 169-182.
- Czajkowski R., Grabe G.J., van der Wolf J.M. 2009.** Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 263-275.
- Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., van Veen J.A., van der Wolf J.M. 2011.** Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* **60**, 999-1013.

- Dabiré G.T. 2009.** Activité antibactérienne d'huiles essentielles contre *Erwinia spp.* et *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. Mémoire : Master Complémentaire International en Protection des Cultures Tropicales et Subtropicales. Université de Liège (Belgique), Gembloux Agro Biotech, 67p.
- Dalgaard P., Koutsoumanis K. 2001.** Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods* **43**, 183-96.
- Dalgaard P., Ross T., Kamperman L., Neumeyer K., McMeekin T. A. 1994.** Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* **23**, 391–404.
- Dantigny P., Guilmart A., Radoi F., Bensoussan M., Zwietering M. 2005.** Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. *International Journal of Food Microbiology* **98**, 261-269.
- Darrasse A., Kotoujanski A., Bertheau Y. 1994a.** Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 298-306.
- Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y. 1994b.** PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1437-1443.
- De Boer S.H. 2002.** Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. *Plant Disease* **86**, 960-4.
- De Boer S.H., McNaughton M.E. 1987a.** Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I. *Phytopathology* **77**, 828-832.
- De Boer S.H., Verdonck L., Vrugink H., Harju P., Bang H.O., De Ley J. 1987b.** Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *Erwinia carotovora* strains. *Journal of Applied Bacteriology* **63**, 487-95.
- De Boer S.H., Ward L.J. 1995.** PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* **85**, 854-858.
- De Haan E.G., Dekker-Nooren T.C.E.M., van den Bovenkamp G.W., Speksnijder A.G.C.L., van der Zouwen P.S., van der Wolf J.M. 2008.** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 561–569.

- De Mendonça M., Stanghellini M.E. 1979.** Endemic and soilborne nature of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, a pathogen of mature sugar beets. *Phytopathology* **69**, 1096-9.
- Degefou Y., Jokela S., Tokola E-J., Virtanen E. 2006.** DNA based detection of blackleg and soft rot disease causing *Erwinia* strains in seed potatoes. *Maataloustieteen päivät*, 1-6.
- Degefou Y., Virtanen E., Väyrynen T. 2009.** Pre-PCR Processes in the Molecular Detection of Blackleg and Soft Rot *Erwiniae* in Seed Potatoes. *Journal of Phytopathology* **157**, 370-378.
- Dejaegher B., Heyden Y.V. 2011.** Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **56**, 141–158.
- Delignette-Muller M.L. 1995.** Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de microorganismes. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard- Lyon I, 148p.
- Diallo S., Latour X., Groboillot A., Smadja B., Copin P., Orange N., Feuilloley M.G.J., Chevalier S. 2009.** Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *European Journal of Plant Pathology* **125**, 349–354.
- Ding T., Rahman S.M.E., Purev U., Oh D.-H. 2010.** Modelling of *Escherichia coli* O157:H7 growth at various storage temperatures on beef treated with electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering* **97**, 497–503.
- Dong C-H., Xie X.-Q., Wanga X.-L., Zhan Y., Yao Y.-J. 2009.** Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food and bioproducts processing* **87**, 139–144.
- Dong Y.H., Wang L.H., Xu J.L., Zhang H-B., Zhang X-F., Zhang L-H. 2001.** Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acylhomoserine lactonase. *Nature* **411**, 813-7.
- Dong Y.H., Xu J.L., Li X.Z., Zhang L-H. 2000.** AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 3526-31.
- Dong Y.H., Zhang X.F., Xu J.L., Zhang L.H. 2004.** Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 954-60.

- Duarte V., De Boer S.H., Ward L.J., de Oliveira A.M.R. 2004.** Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 535-545.
- Dupuis B., Michelante D., Garcia-Albeniz N., Nimal C. 2005.** Le point sur les infections par *Erwinia* spp en plant de pommes de terre. *Journée d'étude Pomme de terre - CRA-W Gembloux – 23 novembre*, pp. 34-40.
- Dye D.W. 1969.** A taxonomic study on the genus *Erwinia*: II. the “*carotovora*” group. *New Zealand Journal of Science* **12**, 81–97.
- El Karkouri A., El Hassani F., El Mzibri M., Benlemlih M., El Hassouni M. 2010.** Isolation and identification of an actinomycete strain with a biocontrol effect on the *phytopathogenic* *E. chrysanthemi* 3937VIII responsible for soft rot disease. *Annals Microbiology* **60**, 263–268.
- Elphinstone J.G. 1987.** Soft rot and blackleg of potato; *Erwinia* spp. *Technical Information Bulletin* **21**. International Potato Center, Lima, Peru.
- Elphinstone J.G., Pérombelon M.C.M. 1986a.** Contamination of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading. *Plant Pathology* **35**, 25-33.
- Elphinstone J.G., Pérombelon M.C.M. 1986b.** Contamination of progeny tubers of potato plants by seed- and leaf-borne *Erwinia carotovora*. *Potato Research* **29**, 77-93.
- Epstein L., Bassein S. 2003.** Patterns of pesticide use in California and the implications for strategies for reduction of pesticides. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 351-75.
- Erbs G., Newman M.A. 2003.** The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* **14**, 421–425.
- Erinle I.D. 1975.** Growth of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and *E. carotovora* var. *carotovora* in Potato Stems. *Plant Pathology* **24**, 187–248.
- Evans T.J., Trauner A., Komitopoulou E., Salmond G.P.C. 2010.** Exploitation of a new flagellatropic phage of *Erwinia* for positive selection of bacterial mutants attenuated in plant virulence: towards phage therapy. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 676–685.
- Ferluga S., Steindler L., Venturi V. 2008.** N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing in Gram-Negative Rhizobacteria. In: P. Karlovsky (ed.). Secondary Metabolites in Soil Ecology. *Soil Biology* **14**, 69-90.
- Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brand G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S., dos Santos W.N.L. 2007.** Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* **597**, 179–186.

- Fessehaie A., De Boer S.H., Levesque C.A. 2002.** Molecular characterization of DNA encoding 16S-23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 387–398.
- Fiers M., Edel-Hermann V., Chatot C., Le Hingrat Y., Alabouvette C., Steinberg C. 2012.** Potato soil-borne diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. **32**, 93–132.
- Flego D., Pirhonen M., Saarilahti H., Palva T. K., Palva E.T. 1997.** Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Microbiology* **25**, 831-838.
- Fraaije B.A., Birnbaum Y., Van Den Bulk R.W. 1996.** Comparison of methods for detection of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in progeny tubers derived from inoculated tubers of *Solanum tuberosum L.* *Phytopathology* **144**, 551-557.
- Franc G.D., Harrison M.D., Powelson M.L. 1985.** The presence of *Erwinia carotovora* in ocean water, rain water and aerosols. In: Graham DC, Harrison MD, eds. *Report of the International conference on potato blackleg disease*. Oxford : Potato Marketing Board, pp. 43-5.
- Fray R.G., Throup J.P., Daykin M., Wallace A., Williams P., Stewart G.S.A.B., Grierson D. 1999.** Plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones communicate with bacteria. *Nature Biotechnology* **17**, 1017-20.
- Fréchon D., Exbrayat P., Hélias V., Hyman L.J., Jouan B., Llop P., Lopez M.M., Payet N., Pérombelon M.C.M., Toth I.K., Van Beckhoven R.C.M., Van der Wolf J.M., Bertheau Y. 1998.** Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwina carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Research* **41**, 163-173.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1994.** Quorumsensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* **176**, 269-75.
- Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R. 2003.** Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 381-91.
- Gibson A.M., Bratchell N., Roberts T.A. 1988.** Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology* **6**, 155-178.

- Glasner J.D., Marquez-Villavicencio M., Kim H-S., Jahn C.E., Ma B., Biehl B.S., Rissman A.I., Mole B., Yi X., Yang C-H., Dang J.L., Grant S.R., Perna N.T., Charkowski A.O. 2008.** Niche specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **21**, 1549-1560.
- Gompertz B. 1825.** On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **115**, 513-585.
- Gorris M.T., Alarcon B., Lopez M.M., Cambra M. 1994.** Characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and comparison of serological methods for its sensitive detection on potato tubers. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2076-2085.
- Goupy J. 1999.** Plans d'expériences pour surfaces de réponse, Dunod, Paris.
- Goupy J. 2006.** Introduction aux plans d'expériences. 3e édition Dunod, Paris.
- Gracia-Garza J.A., Blom T.J., Brown W., Allen W. 2002.** Pre- and postplant applications of copper-based compounds to control *Erwinia* soft rot of calla lilies. *Canadian Journal of Plant Pathology* **24**, 274–280.
- Graham D.C., Harper P.C. 1966.** Effect of inorganic fertilizers on the incidence of potato blackleg disease. *European Potato Journal* **3**, 141-45.
- Graham D.C., Harrison M.D. 1975.** Potential spread of *Erwinia* spp. in aerosol. *Phytopathology* **65**, 739-41.
- Hadas R., Kritzman G., Gefen T., Manulis S. 2001.** Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* contaminating pepper seeds. *Plant pathology* **50**, 117-123.
- Harrison M.D., Quinn C.E., Sells A.I., Graham D.C. 1977.** Waste potato dumps as sources of insects contaminated with soft rot coliform bacteria in relation to recontamination of pathogen-free potato stocks. *Potato Research* **20**, 37-52.
- Hauben L., Moore E.R.B., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., and Swings J. 1998.** Phylogenetic position of phytopathogens with Enterobacteraceae. *Systematic and Applied Microbiology* **21**, 384-397.
- Hauben L., Swings J. 2005.** Family I. Enterobacteriaceae. Genus XIII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920, 209^{AL} emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck and Swings 1999a, 1. In: George M. Garrity (eds). Second Edition. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Proteobacteria vol 2. The Gammaproteobacteria, part B, pp. 670-679.

- Hauben L., Van Gusegem F., Swings J. 2005.** Family I. Genus XXIV. *Pectobacterium* Waldee 1945, 469AL emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenakcers, Mergaert, Verdonck and Swings 1999a, 1. In: George M. Garrity (eds). Second Edition. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Proteobacteria vol 2. The Gammaproteobacteria, part B, pp. 721-730.
- Hélias V. 2008.** *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. *Cahiers Agricultures* **17**, 349-54.
- Hélias V., Andrivon D., Jouan B. 2000a.** Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* under field conditions and effects of these symptoms on the yield of individual potato plants. *Plant Pathology* **49**, 23-32.
- Hélias V., Andrivon D., Jouan B. 2000b.** Internal colonisation pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Pathology* **49**, 33-42.
- Hélias V., Hamon P., Huchet E., Wolf J.V.D., Andrivon D. 2012.** Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology*. *Plant Pathology* **61**, 339–345.
- Hélias V., Roux A.C., Bertheau Y., Andrivon D., Gauthier J.P., Jouan B. 1998.** Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* in potato plants, soil or water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 685–699.
- Hibbert D.B., 2012.** Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*. doi:10.1016/j.jchromb.2012.01.020
- Hong T.D., Ellis R.H., Gunn J., Moore D. 2002.** Relative humidity, temperature, and the equilibrium moisture content of conidia of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin: a quantitative approach. *Journal of Stored Products Research* **38**, 33–41.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S. 1996.** Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 213–257.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Dominguez H., Robert-Baudouy J. 1992.** Environmental conditions Affect Transcription of the Pectinase Genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* **174**, 7807-7818.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Reverchon S. 2001.** Two transporters, TogT and TogMNAB, are responsible for oligogalacturonide uptake in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* **41**, 1125–1132.

- Hyman L.J., Birch P.R.J., Dellagi A., Avrova A., Toth I.K. 2000a.** A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Letters in Applied Microbiology* **30**, 330–5.
- Hyman L.J., Birch P.R.J., Dellagi A., Avrova A.O., Toth I.K. 2000b.** Development of a quantitative PCR-Based detection system for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato Tubers. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 409-411.
- Hyman L.J., Dewasmes V., Toth I.K., Pérombelon M.C.M. 1997.** Improved PCR detection sensitivity of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato tuber peel extract by prior enrichment on a selective medium. *Letters in Applied Microbiology* **25**, 143-147.
- Hyman L.J., Sullivan L., Toth I.K., Pérombelon M.C.M. 2001.** Modified crystal violet pectate medium (CVP) based on a new polypectate source (Slendid) for the detection and isolation of soft rot *Erwinias*. *Potato Research* **44**, 265-270.
- Jafra S., Figura I., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Lojkowska E. 1999.** Expression of the *Erwinia chrysanthemi* pectinase genes pelI, pelL and pelZ during infection of potato tubers. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **12**, 845–51.
- Jafra S., Przysowa J., Czajkowski R., Michta A., Garbeva P., Van der Wolf J.M. 2006.** Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. *Canadian Journal of Plant Pathology* **52**, 1006–1015.
- Janse J.D., Spit B.E. 1989.** A note on the limitations of identifying soft rot erwinias by temperature tolerances and sensitivity to erythromycin on a pectate medium. *J. Phytopathology* **125**, 265 – 268.
- Jones D.A.C., Hyman L.J., Tumeiseit M., Smith P., Pérombelon M.C.M. 1994.** Blackleg potential of potato seed: determination of tuber contamination by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by immunofluorescence colony staining and stock and tuber sampling. *Annals of Applied Biology* **124**, 557-568.
- Joutsjoki T., Laurila J., Pirhonen M., Lehtinen A., Hannukkala A. 2005.** Diagnostics and incidence of blackleg caused by *Erwinia* bacteria in Finland. In: *Proceedings of the 16th Triennial Conference of the EAPR*. Bilbao, Spain, pp. 717–718.
- Juneja V.K., Melendres M.V., Huang L., Subbiah J., Thippareddi H. 2009.** Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45 °C. *International Journal of Food Microbiology* **131**, 106–111.
- Kado C.I. 2006.** *Erwinia* and Related Genera. In: *The Prokaryotes, A Handbook of the Biology of Bacteria, Proteobacteria, Gamma Subclass*. 3rd Edition. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 443–450.

- Kamysz W., Krolicka A., Bogucka K., Ossowski T., Lukasiak J., Lojkowska E. 2005.** Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic *Pectobacterium* species. *Journal of Phytopathology* **153**, 313-7.
- Kang H.W., Kwon S.W., Go S.J. 2003.** PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* **52**, 127-133.
- Kapsa J.S. 2008.** Important Threats in Potato Production and Integrated Pathogen/Pest Management. *Potato Research* **51**, 385–401.
- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D., Defago G. 1992.** Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 : importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant- Microbe Interactions* **5**, 4-13.
- Kendrick J.B., Randolph J., Wedding T., Paulus A.O. 1959.** A temperature-relative humidity index for predicting the occurrence of bacterial soft rot of Irish potatoes. *Phytopathology* **49**, 701-705.
- Kotoujansky A. 1987.** Molecular genetics of pathogenesis by softrot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology* **25**, 405–430.
- Kushalappa A.C., Zulfiqar M. 2001.** Effect of wet incubation time and temperature on infection, and of storage time and temperature on soft rot lesion expansion in potatoes inoculated with *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Potato Research* **44**, 233-242.
- Kwon S.-W., Go S.-J., Kang H.-W., Ryu J.-C., Jo J.-K. 1997.** Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1061–1067.
- Lacroix C., Castaigne F. 1986.** Application des plans expérimentaux factoriels fractionnés et de la technique de surface de réponse à l'optimisation d'un produit ou d'un procédé dans le domaine alimentaire. *Industrie Agriculture Alimentation* **103**, 105-113.
- Lahlali R., Massart S., Serrhini M.N., Jijakli M.H. 2008.** A Box-Behnken design for predicting the combined effects of relative humidity and temperature on antagonistic yeast population density at the surface of apples. *International Journal of Food Microbiology* **122**, 100–108.
- Lahlali R., Serrhini M.N., Friel D., Jijakli M.H. 2007.** Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. *International Journal of Food Microbiology* **114**, 1–9.

- Latour X., Faure D., Diallo S., Cirou A., Smadja B., Dessaix Y., Orange N. 2008.** Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*). *Cahiers Agricultures* **17**, 355-60.
- Laurent P., Buchon L., Burini J.F., Orange N. 2001.** Low pH and cold temperature combine to limit growth and pectate lyase production by psychrotrophic bacterium *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* MFCL0. *Biotechnology Letters* **23**, 753–756.
- Laurent P., Buchon L., Guespin-Michel J.F., Orange N. 2000.** Production of pectate lyases and cellulases by the bacterium *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1538–1543.
- Laurila J., Ahola V., Lehtinen A., Joutsjoki T., Hannukkala A., Rahkonen A., Pirhonen M. 2008.** Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 213–225
- Laurila J., Hannukkala A., Nykyri J., Pasanen M., Hélias V., Garlant L., Pirhonen M. 2010.** Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 249-262.
- Laurila J., Lehtinen A., Ahola V., Pasanen M., Hannukkala A., Pirhonen M. 2007.** Characterisation of *Dickeya* (*Erwinia chrysanthemi*) strains causing potato blackleg and soft rot in Finland. In: Hannukkala A., Segerstedt M. (eds.). *New and old pathogens of potato in changing climate, Proceedings of the EAPR Pathology Section seminar*. Hattula : MTT Agrifood Research Finland.
- Leardi R. 2009.** Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **652**, 161–172.
- Lee Y.A., Yu C.P. 2006.** A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Microbiological Methods* **64**, 200– 206
- Leporq B., Deremaux L., Demeurisse V., Kubaczka M., Dubois J., Membré J.-M. 2001.** Validation of predictive models in dynamic conditions: Microbial proliferation of *Erwinia carotovora* spp. at low changing temperatures. *Acta Horticulturae* **566**, 137–142.
- Leporq B., Membré J.-M., Dervin C., Buche P., Guyonnet J.P. 2005.** The “Sym’Previus” software, a tool to support decisions to the foodstuff safety. *International Journal of Food Microbiology* **100**, 231– 237.

- Liao C.H. 1989.** Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1677–83.
- Lin Y.H., Xu J.L., Hu J., Wang L-H., Ong S.L., Leadbetter J.R., Zhang L-H. 2003.** Acylhomoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology* **47**, 849-60.
- Lui L.H., Kushalappa A.C. 2002.** Response surface models to predict potato tuber infection by *Fusarium sambucinum* from duration of wetness and temperature, and dry rot lesion expansion from storage time and temperature. *International Journal of Food Microbiology* **76**, 19– 25.
- Lui L.H., Kushalappa A.C. 2003.** Models to predict potato tuber infection by *Pythium ultimum* from duration of wetness and temperature, and leak-lesion expansion from storage duration and temperature. *Postharvest Biology and Technology* **27**, 313-322.
- Lund B.M., Kelman A. 1977.** Determination of the potential for development of bacterial soft rot of potatoes. *American Journal of Potato Research* **54**, 211-225.
- MacDonald K., Sun D.W. 1999.** Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* **52**, 1-27.
- Maë A., Montesano M., Koiv V., Palva E.T. 2001.** Transgenic plants producing the bacterial pheromone *N*-acylhomoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**; 1035-42.
- Maher E., Kelman A. 1983.** Oxygen status of potato tuber tissue in relation to maceration by pectic enzymes of *Erwinia carotovora*. *Physiology and Biochemistry* **73**, 536-539.
- Maki-Valkama T., Karjalainen R. 1994.** Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. *Annals of Applied Biology* **125**, 301–305.
- Martin M., Gravouille J.M. 2001.** *Stockage et conservation de la pomme de terre*. Collection ITCF-ITPT Pomme de terre. 1 éd. Paris: ITCF, 88 p.
- McCarter-Zorner N.J., Graham D.C., Harrison M.D., Sells L.A., Quinn C.E., Paget C., Michaud J.E., Franc G.D. 1982.** The presence of *Erwinia carotovora* in surface water. *American Potato Journal* **59**, 478.
- McCarter-Zorner N.J., Harrison M.D., Franc G.D., Quinn C.E., Sells I.A., Graham D.C. 1985.** Soft rot *Erwinia* bacteria in the rhizosphere of weeds and crop plants in Colorado, United States and Scotland. *Journal of Applied Microbiology* **59**, 357-68.

- McClure P.J., Cole M.B., Davies K.W., Anderson W.A. 1993.** The use of automated turbidimetric data for the construction of kinetic models. *Journal of Industrial Microbiology* **12**, 277–285.
- McGuire R., Kelman A. 1984.** Reduced severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with increased calcium content. *Phytopathology* **74**, 1250-1256.
- McMeekin T.A., Olley J., Ratkowsky D.A, Ross T. 2002.** Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International journal of Food Microbiology* **73**, 395-407.
- McMeekin T.A., Olley J.N., Ross T., Ratkowsky D.A. 1993.** Predictive Microbiology: Theory and Application. Taunton, UK: Research Studies Press.
- McMeekin T.A., Ross T. 1996.** Shelf life prediction: status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 65–83.
- Membré J-M., Lambert R.J.W. 2008.** Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* **128**, 10–15.
- Membré J-M., Leporq B., Vialette M., Mettler E., Perrier L., Thuault D., Zwietering M. 2005.** Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International Journal of Food Microbiology* **100**, 179–186.
- Mertens L., Derlinden E.V., Van Impe J.F. 2012a.** Comparing experimental design schemes in predictive food microbiology: Optimal parameter estimation of secondary models. *Journal of Food Engineering*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.018>
- Mertens L., Derlinden E.V., Van Impe J.F. 2012b.** A novel method for high-throughput data collection in predictive microbiology: Optical density monitoring of colony growth as a function of time. *Food Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.001>
- Meynell G.G., Meynell E. 1970.** Quantitative aspects of microbiological experiments. Cambridge: Cambridge University press.
- Mildenhall J.P., Prior B.A. 1983.** Water Relations of *Erwinia chrysanthemi*: Intracellular and Extracellular Pectate Lyase Production. *Journal of General Microbiology* **129**, 3019-3025.
- Mildenhall J.P., Prior B.A., Trollope L.A. 1981.** Water relations of *Erwinia chrysanthemi*: growth and extracellular pectic acid lyase production. *Journal of General Microbiology* **127**, 27-34.

- Mills A.A.S., Platt (Bud) H.W., Hurta R.A.R. 2006.** Sensitivity of *Erwinia* spp. to salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage. *Postharvest Biology and Technology* **41**, 208–214
- Moh A.A. 2005.** Développement de techniques moléculaires pour la détection simultanée des 3 *Erwinias* infectant les tubercules de pomme de terre en Belgique. Mémoire: Diplôme d'Etudes Approfondies en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique (DEA), FUSAGx, Belgique, 62 p.
- Moreau M., Feuilloley M.G.J., Orange N., Brisset J.L. 2005.** Lethal effect of the gliding arc discharges on *Erwinia* spp. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 1039-46.
- Muhammad G., Thomas C., Julien J., Michel P., Saïd B. 2009.** Copper modulates the heat-induced sulphydryl/disulfide interchange reactions of b-Lactoglobulin. *Food Chemistry* **116**, 884–891.
- Myskja B.K. 2006.** The moral difference between intragenic and transgenic modification of plants. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* **19**, 225-38.
- Nabhan S., Wydra K., Linde M., Debener T. 2012.** The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant Pathology* **61**, 498-508.
- Nachin L., Barras F. 2000.** External pH: An Environmental Signal That Helps to Rationalize *pel* Gene Duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **13**, 882–886.
- Narayanasamy P. 2008.** Molecular Techniques for Detection of Microbial Pathogens. In: *Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management. Microbial Plant Pathogens*, Vol. 1. Springer Science Business Media B.V., pp. 7-158.
- Nassar A., Darrasse A., Lemattre M., Kotoujansky A., Dervin C., Vedel R., Bertheau Y. 1996.** Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2228-2235.
- Nazerian E., Sijam K., Ahmad Z.A.M. Keshavarz K. 2011.** Characterization of *Pectobacterium carotovorum* causing a new soft rot disease on okra in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology* **77**, 292–294.
- Neumeyer K., Ross T., Thomson G., McMeekin T.A. 1997.** Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of *Pseudomonas*. *International Journal of Food Microbiology* **38**, 55– 63.

- Nguyen H.A., Kaneko J., Kamio Y. 2002.** Temperature-dependant production of carotovorin Er and pectin lyase in phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* **66**, 444–447.
- Nielsen LW. 1978.** *Erwinia* species in the lenticels of certified seed potatoes. *American Potato Journal* **55**, 671-6.
- Olivier M. 2004.** Fertilisation azotée : nouvelles de la campagne de mesures avec le chlorophyllomètre. FIWAP INFO **83**, 14-16.
- Olsson K. 1985.** The presence of *Erwinia carotovora* in ocean water, rain water and aerosols. In : Graham DC, Harrison MD, eds. *Report of the International Conference on Potato Blackleg Disease*. Oxford : Potato Marketing Board: pp. 48-9.
- Palacio-Bielsa A., Cambra M.A., Lopez M.M. 2006.** Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. *Annals of Applied Biology* **148**, 157–164.
- Parent J.-G., Lacroix M., Page D., Vezina L. 1996.** Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Disease* **80**, 494-499.
- Park S.Y., Hwang B.J., Shin M.H., Kim J-A., Kim H-K., Lee J-K. 2006.** N-acylhomoserine lactonase producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiology Letters* **261**, 102-8.
- Parkinson N., Stead D., Bew J., Heeney J., Tsror L., Elphinstone J. 2009.** *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of recA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2388–93.
- Pasco C. 2005.** Comportement variétal de pomme de terre vis-à-vis des pourritures molles : test sur tubercules en conditions contrôlées. *Cahier des techniques de l'INRA*, 183-7.
- Pasco C., Bozec M., Ellissèche D., Andrivon D. 2006.** Resistance Behaviour of Potato Cultivars and Advanced Breeding Clones to Tuber Soft Rot Caused by *Pectobacterium atrosepticum*. *Potato Research* **49**, 91–98.
- Paulin J.P., Ridé M., Prunier J-P. 2001.** Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans : controverses et polémiques transatlantiques. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences* **324**, 905–914.
- Pérombelon M.C.M. 1971.** A semi-selective medium for estimating population densities of pectolytic *Erwinia* spp. in soil and in plant material. *Potato Research* **14**, 158-160.

- Pérombelon M.C.M. 1972.** The extent and survival of contamination of potato stocks in Scotland by *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia carotovora* var *atroseptica*. *Annals of Applied Biology* **71**, 111-117.
- Pérombelon M.C.M. 1973.** Sites of contamination and numbers of *Erwinia carotovora* present in store seed potato stocks in Scotland. *Annals of Applied Biology* **74**, 59-65.
- Pérombelon M.C.M. 1992a.** Potato blackleg epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **98**, 135-46.
- Pérombelon M.C.M. 2000.** Blackleg risk potential of seed potatoes determined by quantification by the causal agent and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: a critical review. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 413-420.
- Pérombelon M.C.M. 2002.** Potato diseases caused by soft rot *erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* **51**, 1-12.
- Pérombelon M.C.M., Bertheau Y., Cambra M., Frechon D., Lopez M.M., Niepold F., Persson P., Sletten A., Toth I.K., van Vuurde J.W.L., van der Wolf J.M. 1998.** Microbiological, immunological and molecular methods suitable for commercial detection and quantification of the blackleg pathogen, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, on seed potato tubers: A review. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **28**, 141-155.
- Pérombelon M.C.M., Burnett E.M. 1991.** Two modified crystal violet pectate (CVP) media for the detection, isolation and enumeration of soft rot *erwinias*. *Potato Research* **34**, 79-85.
- Pérombelon M.C.M., Hyman L.J. 1986.** A rapid method to identify and quantify soft rot *erwinias* directly from plant material based on their temperature tolerance and sensitivity to erythromycin. *Journal of Applied Bacteriology* **60**, 61-66.
- Pérombelon M.C.M., Hyman L.J. 1987.** Frequency of *Erwinia carotovora* in the Alyth Burn in eastern Scotland and the sources of the bacterium. *Journal of Applied Bacteriology* **63**, 281-91.
- Pérombelon M.C.M., Hyman L.J. 1989.** Survival of soft rot coliforms, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* in soil in Scotland. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 95-106.
- Pérombelon M.C.M., Hyman L.J. 1995.** Serological methods to quantify potato seed contamination by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *EPPO Bulletin* **25**, 195-202.
- Pérombelon M.C.M., Kelman A. 1980.** Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 361-87.

- Pérombelon M.C.M., Kelman A. 1987.** Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: a proposal for a revision of the terminology. *Plant Disease* **71**, 283–5.
- Pérombelon M.C.M., Lumb V.M., Hyman L.J. 1987.** A rapid method to identify and quantify soft rot *erwinias* on seed potato tubers. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **18**, 25 - 35.
- Pérombelon M.C.M., Salmon G. 1995.** Bacterial soft rot. In : Singh U.S., Singh R.P., et Kohmoto K., eds. *Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular basis*, Pergamon, United Kingdom **1**, 1-20.
- Pérombelon M.C.M., van der Wolf J.M. 2002.** Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: *a laboratory manual*. Revised Version. p82.
- Pérombelon MCM 1992b.** Diversity in *erwinias* as plant pathogens. In : INRA, ed. *Plant Pathogenic Bacteria, Versailles*, pp. 113-28.
- Peters J., Sledz W., Bergervoet J.H.W., van der Wolf J.M. 2007.** An enrichment microsphere immunoassay for the detection of *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dianthicola* in potato tuber extracts. *European Journal of Plant Pathology* **117**, 97–107.
- Pouillot R., Lubran M.B. 2011.** Predictive microbiology models vs. modeling microbial growth within *Listeria monocytogenes* risk assessment: What parameters matter and why. *Food Microbiology* **28**, 720-726.
- Powelson M.L. 1985.** Potato early dying disease in the Pacific Northwest caused by *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* and *E. carotovora* pv. *atroseptica*. *American Potato Journal* **62**, 173-6.
- Pringle R.T. 1996.** Storage of seed potatoes in pallet boxes. 2. Causes of tuber surface wetting. *Potato Research* **39**, 223-240.
- Pringle R.T., Robinson K., Wale S., Burnett G. 1991.** Comparison of the effect of storage environment on tuber contamination with *Erwinia carotovora*. *Potato Research* **34**, 17-28.
- Priou S., Jouan B. 1989.** Jambe noire et pourritures molles : une bonne conduite limite les dégâts. *Cultivars* **263**, 88-93.
- Priou S., Jouan B. 1996.** Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. In: Rousselle P., Robert Y., Crosnier J.C. (eds.). *La pomme de terre. Institut National de la Recherche Agronomique*, Paris, France, pp. 260–265.

- Rabot B., Pasco C., Schmidt J. 1994.** Assessing six Austrian potato cultivars for resistance to *Erwinia carotovorum* subsp. *atroseptica*. *Potato Research* **37**, 197-203.
- Ranganna B., Kushalappa A. C., Raghava G.S.V. 1997.** Ultraviolet irradiance to control dry rot and soft rot of potato in storage. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**, 30-35.
- Ranganna B., Ragahvan G.S.V., Kushalappa A.C. 1998.** Hot water dipping to enhance storability of potatoes. *Postharvest Biology and Technology* **13**, 215-223.
- Rasche F., Velvis H., Zachow C., Berg G., Van Elsas J.D., Sessitsch A. 2006.** Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *Journal of Applied Ecology* **43**, 555-566.
- Reading N.C., Sperandio V. 2006.** Quorum-sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **254**, 1-11.
- Reiter B., Pfeifer U., Schwab H., Sessitsch A. 2002.** Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2261-2268.
- Ried J.L., Collmer A. 1988.** Construction and characterization of an *Erwinia chrysanthemi* mutant with directed deletions in all of the pectate lyase structural genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **1**, 32-38.
- Romdhani M.E. 1994.** Les espèces et sous-espèces pectinolytiques d'*Erwinia* inféodées à la pomme de terre en Tunisie. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques Appliquées, Gent. 344p.
- Ross T. 1996.** Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 501-508.
- Rousselle P., Robert Y., Crosnier J.C. 1996.** La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. INRA Paris, pp. 62.
- Rousselle-Bourgeois F., Priou S. 1995.** Screening tuber-bearin *Solanum* spp. for resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica* (Van Hall) Dye. *Potato Research* **38**, 111-118.
- Samson R., Legendre J.B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L. 2005.** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya*

- dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1415-27.
- Sanaa M. 2002.** Microbiologie prévisionnelle: principaux modèles de croissance utilisés en appréciation quantitative des risques. *Epidémiologie et Santé Animale* **41**, 169-177.
- Sankarana S., Mishra A., Ehsani R., Davis C. 2010.** A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture* **72**, 1–13.
- Sautour M., Mary P., Chihib N.E., Hornez J.P. 2003.** The effects of temperature, water activity and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila* and on its subsequent survival in microcosm water. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 807–813.
- Scott R.I., Chard J.M., Hocart M.J., Lennard J.H., Graham D.C. 1996.** Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of Blackleg disease. *Potato Research* **39**, 333-334.
- Segall R. H. 1971.** Selective medium for enumerating *Erwinia* species commonly found in vegetable packinghouse waters. *Phytopathology* **61**, 425-426.
- Sepulchre J.-A., Reverchon S., Nasser W. 2007.** Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *Journal of Theoretical Biology* **244**, 239–257.
- Shorten P.R., Membré J.M., Pleasants A.B., Kubaczka M., Soboleva T.K. 2004.** Partitioning of the variance in the growth parameters of *Erwinia carotovora* on vegetable products. *International Journal of Food Microbiology* **93**, 195– 208.
- Shorten P.R., Soboleva T.K., Pleasants A.B., Membré J.M. 2006.** A risk assessment approach applied to the growth of *Erwinia carotovora* in vegetable juice for variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology* **109**, 60–70.
- Sialer M.M.F., Rosso L. 2007.** Molecular detection in integrated pest and disease management. In: *General Concepts in Integrated Pest and Disease Management*. A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.), pp. 305–328.
- Singh U., Trevors C.M., De Boer S.H. 2000.** Fimbrial-specific monoclonal antibody-based ELISA for european potato strains of *Erwinia chrysanthemi* and comparison to PCR. *Plant Disease* **84**, 443-448.
- Slędz W., Jafra S., Waleron M., Lojkowska E. 2000.** Genetic diversity of *Erwinia carotovora* strains isolated from infected plants grown in Poland. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 403-407.
- Smadja B., Latour X., Faure D., Chevalier S., Dessaix Y., Orange N. 2004b.** Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout the plant infection by *Erwinia carotovora*

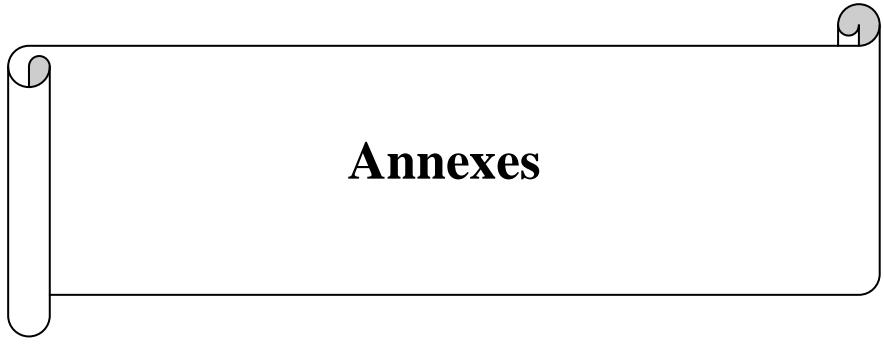
- subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 1269-78.
- Smadja B., Latour X., Trigui S., Burini J.F., Chevalier S., Orange N. 2004a.** Thermodependance of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium spp*). *Canadian Journal of Microbiology* **50**, 19-27.
- Stanghellini M.E. 1982.** Soft rotting bacteria the rhizosphere. In : Mount MS, Lacy GH, editors. *Phytopathogenic Prokaryotes* 1, 249-61.
- Stead D. 1999.** Bacterial diseases of potato: relevance to in vitro potato seed production. *Potato Research* **42**, 449-456.
- Stevenson W.A., Loria R., Franc G.D., Weingartner D.P. 2001.** Compendium of potato diseases. American Phytopathological Society. 2e éd. St-Paul, Minnesota. 106p.
- Stommel J.R., Goth R.W., Haynes K.G., Kim S.H. 1996.** Pepper (*Capsicum annuum*) soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Disease* **80**, 1109-12.
- Swinnen I.A.M., Bernaerts K., Dens E.J.J., Geeraerd A.H., Van Impe J.F. 2004.** Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 137– 159.
- Takle G.W., Toth I.K., Brurberg M.B. 2007.** Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *BMC Plant Biology* **7**, 50.
- te Giffel M.C., Zwietering M.H. 1999.** Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **46**, 135–149.
- Terta M., Kettani-Halabi M., Ibenyassine K., Tran D., Meimoun P., M'Hand R.A., El-Maarouf-Bouteau H., Val F., Ennaji M.M., Bouteau F. 2010.** Arabidopsis thaliana cells: a model to evaluate the virulence of *P. carotovorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 139–143.
- Thomson N.R., Thomas J.D., Salmon G.P.C. 1999.** Virulence determinants in the bacterial phytopathogen *Erwinia*. *Methods in Microbiology* **29**, 347–426.
- Thornes S.N. 1972.** A pectate gel medium for the isolation and diagnosis of pectinolytic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **35**, 357-358.
- Togbé C.E. 2007.** Etude des facteurs écologiques (température, humidité relative) influençant le développement de la pourriture molle sur tubercule de pomme de terre. Mémoire :

- Master Complémentaire International en Protection des Cultures Tropicales et Subtropicales. Université catholique de Louvain (Belgique). 61p.
- Toth I.K., Avrova A.O., Hyman L.J. 2001.** Rapid identification and differentiation of the soft rot *erwinias* by 16S–23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4070–76.
- Toth I.K., Bell K., Holeva M.C., Birch P.R.J. 2003.** Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* **4**, 17-30.
- Toth I.K., Bertheau Y., Hyman L.J., Laplaze L., López M.M., McNicol J., Niepold F., Persson P., Salmond G.P.C., Sletten A., Van der Wolf J.M., Pérombelon M.C.M. 1999b.** Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 770–81.
- Toth I.K., Hyman L.J., Wood J.R. 1999a.** A one step PCR-based method of the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 158-166.
- Toth I.K., Newton J.A., Hyman L.J., Lees A.K., Daykin M., Ortori C., Williams P., Fray R.G. 2004.** Potato plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones increase susceptibility to soft rot *erwiniae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 880–887.
- Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsror (Lahkim) L., Elphinstone J.G. 2011.** *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* **60**, 385–399.
- Truchado P., Tomás-Barberán F.A., Larrosa M., Allende A. 2012.** Food phytochemicals act as Quorum Sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. *Food Control* **24**, 78-85.
- Tsror (Lahkim) L., Erlich O., Lebiush S., Hazanovsky M., Zig U., Slawiak M., Grabe G., van der Wolf J. M., van de Haar J.J. 2009.** Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *European Journal of Plant Pathology* **123**, 311–320.
- Tsror (Lahkim) L., Erlich O., Hazanovsky M., Daniela B.B., Zigb U., Lebiusha S. 2012.** Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hot-climate conditions. *Plant Pathology* **61**, 161–168.

- Tweddell R.J., Boulanger R., Arul J. 2003.** Effect of chlorine atmospheres on sprouting and development of dry rot, soft rot and silver scurf on potato tubers. *Postharvest Biology and Technology* **28**, 445-454.
- Uroz S., D'Angelo C., Carlier A., Elasri M., Sicot C., Petit A., Oger P., Faure D., Dessaix Y. 2003.** Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing regulated functions of plant pathogenic bacteria. *Microbiology* **149**, 1981-9.
- Val F., Barzic M.-R., Desender S., Hamelin G., Andrivon D. 2006.** Stockage des pommes de terre Un lipopolysaccharide bactérien... anti-bactérien ? Évaluation d'un candidat pour la protection biologique des tubercules de pomme de terre contre les bactéries. *Phytoma, la défense des végétaux* **596**, 33-36.
- Valero A., Pérez-Rodríguez F., Carrasco E., García-Gimeno R.M., Zurera G. 2006.** Modeling the growth rate of *Listeria monocytogenes* using absorbance measurements and calibration curves. *Journal of Food Science* **71**, 257-264.
- Van der Merwe J.J., Coutinho T.A., Korsten L., van der Waal J.E. 2010.** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 175–185
- Van der Wolf J., Speksnijder A., Velvis H., Van der Haar J., Van Doorn J. 2007.** Why is *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* sp.) taking over?—The ecology of a blackleg pathogen. In: Hannukkala A, Segerstedt M (eds) New and old pathogens of potato in changing climate. *MTT Agrifood Research Working papers*, p. 30.
- Van der Wolf J.M., de Boer S.H. 2007.** Bacterial pathogens of potato. In: Vreugdenhil D (Ed.), *Potato biology and biotechnology*. Advances and Perspectives. pp. 595-619.
- Van der Wolf J.M., Hyman L.J., Jones D.A.C., Grevess C., Van Beckhoven J.R.C.M., Van Vuurde J.W.L., Pérombelon M.C.M. 1996.** Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium or by PCR. *Journal of Applied Bacteriology* **80**, 487-495.
- Van Vuurde J.W.L., De Vries P.H.M., Roozen N.J.M. 1994.** Application of immunofluorescence colonystaining (IFC) for monitoring populations of *Erwinia* spp. on potato tubers, in surface water and in cattle manure slurry. In: Lemattre M, Freigoun S, Rudolph K, Swings JG, eds. *Proceedings of the 8th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Paris*.

- Van Vuurdde J.W.L., de Vries P.M. 1994.** Population dynamics of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on the surface of intact and wounded seed potatoes during storage. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 568-575.
- Van Vuurdde J.W.L., Roozen N.J.M. 1990.** Comparison of immuno-fluorescence colony staining in media, selective isolation on pectate medium, ELISA and immunofluorescence cell staining for detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. chrysanthemi* in cattle manure slurry. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **96**, 75-89.
- Varzakas T.H., Arvanitoyannis I.S., Baltas H. 2007.** The politics and science behind GMO acceptance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **47**, 335-61.
- Verhulst P.F. 1845.** Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. Mémoire de l'académie royale des sciences, des lettres et des beaux-arts de Belgique **18**, 1-38.
- Vokou D., Vareltzidou S., Katinakis P. 1993.** Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **47**, 223-235.
- Vruggink H., De Boer S.H. 1978.** Detection of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* in potato tubers with immunofluorescence following induction of decay. *Potato research* **21**, 225-229.
- Waldee E.L. 1945.** Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State College Journal of Science* **19**, 435-484.
- Ward E., Foster S.J., Fraaije B.A. McCartney H.A. 2004.** Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology* **145**, 1-16.
- Waters C.M., Bassler B.L. 2005.** Quorum-sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 319-46.
- Whitehead N.A., Byers J.T., Commander P., Corbett M.J., Coulthurst S.J., Everson L., Harris A.K.P., Pemberton C.L., Natalie J.L.S., Debra S.H.S., Welch S.M., Williamson N., Salmond G.P.C. 2002.** The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 223-231.
- Whiting R. 1995.** Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **35**, 467-494.
- Whiting R.C., Buchanan R.L. 1993.** A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology* **10**, 175-177.

- Winston P.W., Bates D.H. 1960.** Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* **41**, 232-237.
- Xu G.-W., Gross D.C. 1986.** Field evaluations of the interactions among fluorescent pseudomonads, *Erwinia carotovora* and potato yields. *Phytopathology* **76**, 423-30.
- Xu X.M., Guerin L., Robinson J.D. 2001.** Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilia fructigena*. *Plant Pathology* **50**, 561-568.
- Yaganza E.-S. 2005.** Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre : base physico-chimique. Philosophiae doctor (Ph.D.): Université Laval (Québec, Canada). 175p.
- Yaganza E.S., Rioux D., Simard M., Arul J., Tweddell R.J. 2004.** Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 6800-8.
- Yaganza E-S., Tweddell R.J., Arul J. 2009.** Physicochemical Basis for the Inhibitory Effects of Organic and Inorganic Salts on the Growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 1465–1469.
- Yaghlene H.B., Leguerinel I., Hamdi M., Mafart P. 2009.** A new predictive dynamic model describing the effect of the ambient temperature and the convective heat transfer coefficient on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology* **133**, 48–61.
- Yahiaoui R., Jouan B., Andrivon D. 2003.** Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology* **52**, 28-40.
- Yi J.Y., Seo H.W., Yang M.S., Robb E.J., Nazar R.N., Lee S.W. 2004.** Plant defense gene promoter enhances the reliability of shiva-1 gene-induced resistance to soft rot disease in potato. *Planta* **220**, 165–171.
- Zuliani V. 2005.** Prédiction de la contamination bactérienne lors de la fabrication et de la conservation d'un aliment - Application à de la viande de porc contaminée par *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal. 289p.
- Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Van't riet K. 1990.** Modeling of the bacterial growth curve. *Applied Environmental Microbiology* **56**, 1875-1881.



Annexes

Annexes

Annexe 1. Stabilité de l' a_w au cours de l'expérimentation *in vitro*.

Température de l'essai (°C)	Début de l'expérimentation	a_w	
		Pba	Pcc
10	0,960	0,958	0,959
	0,980	0,979	0,978
	0,997	0,996	0,997
15	0,960	0,962	0,963
	0,980	0,982	0,978
	0,997	0,995	0,996
20	0,960	0,961	0,959
	0,980	0,979	0,979
	0,997	0,998	0,996

Annexe 2. Crystal violet pectate double layer (CVPD) (Bdliya, 1995)

<u>Couche du fond</u>		<u>Couche superficielle</u>	
Peptone	4,0 g	Solution de cristal violet (0,075% w/v)	1,0 ml
Yeast extract	0,6 g	NaNO ₃	1,0 g
NaCl	1,0 g	Tri-Na citrate dihydrate	2,5 g
Agar	3,0 g	Agar	2,0 g
Tryptone	1,5 g	Tryptone	1,5 g
L-asparagine	0,5 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O	6,8 ml (10% solution)
SDS	50,0 mg	Bromothymol blue	0,5 ml (0,5% solution)
Eau distillée	250 ml	Eau distillée froide	500 ml
		Polypectate de sodium (Sigma P 3850)	9,0 g

Couler 12 ml de la couche du fond à 50°C dans chaque boite de Pétri, après autoclavage. Laisser refroidir sous flux pendant 10 min. Puis couler 15 ml de la couche superficielle à 45°C sur la couche du fond gélifiée.

Annexe 3. Crystal violet pectate modifié (CVPM) (Ahmed, 2001)

<u>Couche du fond</u>		<u>Couche superficielle</u>	
Peptone	2,0 g	Solution de cristal violet (0,075 % w/v)	1,0 ml
Tryptone	1,5 g	NaNO ₃	1,0 g
Yeast extract	0,6 g	Tri-Na citrate dihydrate	2,5 g
NaCl	1,0 g	Agar	2,0 g
L-asparagine	0,5 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O	6,5 ml
SDS	0,05 g	(10% solution)	
Eau distillée	250 ml	Eau distillée froide	500 ml
		Polypectate de sodium (Sigma P 3850)	7,5 g
pH= 7,2		pH= 7,2	

Ajouter le polypectate de sodium à la couche superficielle en dernière position.
 Couler 12 ml de la couche du fond à 50°C dans chaque boîte de Pétri, après autoclavage.
 Laisser refroidir sous flux pendant 10 min. Puis couler 15 ml de la couche superficielle à 45°C sur la couche du fond gélifiée.

Annexe 4. Slendid polypectate-based one-step crystal violet pectate medium (CVP-S1) (Hyman et al., 2001)

CVP-S1

Tryptone (Oxoid L42)	0,5 g
Tri-Na citrate	2,5 g
NaNO ₃	1,0 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (10% solution)	5,1 ml
Solution de cristal violet (0,075% w/v)	1 ml
NaOH 5M	1,3 ml
Eau distillée froide	500 ml
Agar (BDH Agar powder)	2,0 g
Polypectate de sodium (Slendid type 440, US)	9,0 g
pH= 7,0	

Autoclaver pendant 15 min à 120°C (restaurer progressivement la pression afin d'éviter la formation de bulle dans le milieu). Couler 18 ml par boîte de Pétri (agiter doucement lors du coulage des boîtes de Pétri)

N.B.: Polypectate de sodium (Slendid type 440, US) a été remplacé par celui de Sigma P 3850 [9049-37-0]

Annexe 5. Slendid polypectate-based two-step crystal violet pectate medium (CVP-S2) (Hyman et al., 2001)

CVP-S2

Mix A (250 ml)	Mix B (250 ml)
Tryptone (Oxoid L42)	0,5 g
Tri-Na citrate	2,5 g

NaNO ₃	1,0 g	NaNO ₃	1,0 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	5,1 ml	CaCl ₂ x 2H ₂ O	5,1 ml
(10% w/v, solution)		(10% w/v, solution)	
Solution de cristal violet	1,0 ml	Solution de cristal violet	1,0 ml
(0,075% w/v)		(0,075% w/v)	
		NaOH 5M	1,3 ml
Agar (BDH Agar powder)	2,0 g	Agar(BDH Agar powder)	2,0 g
		Polypectate de sodium	9,0 g
		(Slendid type 440, US)	

Autoclaver le mix A et le mix B pendant 15 min à 120°C (restaurer progressivement la pression afin d'éviter la formation de bulle dans le milieu). Verser le Mix A dans le Mix B sous agitation afin de les mélanger, ajuster le PH à 7,0. Puis couler le mélange dans des boîtes de Pétri (18 ml / boîte de Pétri).

N.B.: Polypectate de sodium (Slendid type 440, US) a été remplacé par celui de Sigma P 3850 [9049-37-0]