



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche
Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Microbiologie

Mémoire de Fin de Cycle

Vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie microbiennes

Thème

*Extraction/dosage des pectate lyases
à partir des tissus végétaux (pomme de terre et carotte)
inféodés par les espèces des genres *Dickeya* et *Pectobacterium**

Présenté par :

M^{lle} CHERIFI Drifa

M^{lle} LAKAB Samra

Membre du jury :

Président : M^r BENSALD.K

Examineurs : M^r BELHADI.D

M^{me} OUANAS.S

Promoteur : M^r LADJOUZI.R

Année Universitaire 2012/ 2013

Remerciements

Avant tout nous remercions le bon DIEU de nous avoir donné le courage et la foi pour mener à bien ce travail.

Nous adressons nos remerciements :

A notre promoteur Mr LADJOUZI.R de nous avoir accueilli et qui a mis à notre disposition son Savoir ainsi que pour ses précieux conseils, ses orientations et sa confiance qui nous ont guidé tout le long de ce travail.

A Mr Bensaid.K d'avoir accepté de présider ce jury et Mme OUANAS.S et Mr Belhadi.D d'avoir accepté d'examiner et de juger notre travail.

A l'ensemble du personnel de laboratoire de Mycologie, surtout à Djahida et Fatima zahra pour leur aide tant sur le plan moral que matériel.

Nous remercions également toutes les personnes qui nous ont aidé de loin ou de près afin de réaliser ce travail.

CHERIFI et LAKAB

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents qui m'ont encouragés et soutenus tout au long du parcours de mes études et qui sont pour moi les êtres les plus chers que Dieu les préserve de tous malheur.

A la mémoire de ma chère grand-mère «Que Dieu l'accueille dans ses vastes paradis »

A mon cher et seul frère Idris que j'aime beaucoup et qui m'a toujours bien orienté, sa femme Malika et leurs enfants (Celina et Yanis).

A mes chères sœurs (Zhira, Samia, Nouara, Naima) leurs maries (Mohamed, Idir, Moh-chéreif, Mustapha) et leurs enfants (Kahina, Jugurtha, Kenza, Saleh, Asma, Momoh, Zaki, Sara, Aya, Romaisa et Ilyes). Et particulièrement Malika, Safia et son fiancé Omar

A toute ma famille paternelle et maternelle.

A Samra et toute sa famille.

A mes amies (Nadia, Saida, Widad, Saida, sonia, Mechria, Fouzia)

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour réaliser ce travail.

A toute la promotion de Biotechnologie Microbiennes 2013.

Drifa

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à:

*Mes chers parents, mes professeurs de toujours, Pour leurs précieux soutien et encouragements, Que dieu vous protège et vous garde pour nous,
Mon très cher unique frère et son petit fils Mehdi, que j'aime tant,
Mes sœurs : Nacera, Rebiha, Samia, Zoubida et leurs épouses particulièrement à Fatima et son mari Akli pour leurs soutient tout au long de la réalisation de ce travail,*

Ma précieuse sœur Saida,

La mémoire de ma chère sœur, qui j'ai tellement aimé Houria « Que Dieu l'accueille dans ses vastes paradis »,

Mes neveux particulièrement L'adorable Amine,

Mes nièces surtout : Tinhinane, Celia, Tiziri, Ninou, Sara,

Toute ma famille sans exception,

Tous mes chers amis surtout: Tassadit, Naima, Assia, Sara, Amal, Lamia,

Drifa et toute sa famille,

La promotion Biotechnologie Microbienne 2012-2013,

Tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.

Toute personne qui m'aime, qui me connait de près ou de loin, juste pour leur existence.



Samra



Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures et liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Introduction	1
I) Généralité sur la pomme de terre	2
I-1) Origine.....	2
I-2) Description botanique et morphologique.....	2
II) Maladies de la pomme de terre	4
II-1) Jambe noire et pourriture molle	4
II-1-1) Jambe noire.....	4
II-1-2) Pourriture molle	5
II-2) Les agents pathogènes	7
II-3) Facteurs de virulence	8
II-3-1) Facteurs extrinsèques.....	8
II-3-2) Facteurs intrinsèques	9
II-3-2-1) Enzymes pectinolytiques	9
II-3-2-2) Les différentes classes de pectinases et leur mode d'action	9
II-3-2-2-1) Pectinestérases (PE).....	9
II-3-2-2-2) Dépolymérasés	9
II-3-2-3) Effet de la température et du pH sur l'activité pectinolytique	12
II-3-2-3-1) Effet de la température	12
II-3-2-3-2) Effet du pH.....	12
III) Détermination des activités pectinolytique	13
III-1) Mesure de l'activité enzymatique	13
III-2) Dosages enzymatique	13
III-2-1) Dosage des pectinases	14
III-2-1-1) Pectinestérases	14
III-2-1-2) Polygalacturonases	14

III-2-1-3) Pectine- lyases	15
III-2-1-4) Pectate-lyases	15

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

I) Matériel	16
I-1) Matériel bactérien	16
I-2) Matériel végétal	16
I-2-1) Pommes de terre	16
I-2-2) Carottes	17
II) Méthodes	17
II-1) Revivification des souches.....	17
II-2) Tests de conformité biochimique	18
II-2-1) Mise en évidence de l'activité pectinolytique.....	18
II-2-2) Recherche du nitrate réductase	18
II-2-3) Utilisation des sucres (α -méthyl-glucoside, sucrose et inuline)	18
II-3) Préparation de l'inoculum standard et dénombrement cellulaire.....	19
II-4) Test de pathogénicité.....	21
II-5) Dosage de l'activité pectate lyase	23
II-5-1) Produits et matériels utilisé pour le dosage	23
II-5-2) Protocole de dosage	23
II-5-3) Calcul de l'activité spécifique.....	23

Résultats et discussion

I) Revivification des souches.....	25
II) Tests de confirmation des souches de <i>Pectobacterium Dickeya</i>.....	25
II-1) Mise en évidence de l'activité pectinolytique	25
II-2) Réduction des nitrates en nitrites.....	26
II-3) Utilisation des sucres (α -méthyl-D-glucoside, sucrose et inuline).....	26
III) Dénombrement bactérien sur milieu solide	27

IV) Test de pathogénicité..... 28

V) Dosage de l'activité de Pectate lyase..... 35

Conclusion 38

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations :

AG : Acide gras

AS : Activité Spécifique

BN : Bouillon Nutritif

C : carbone

°C : degré Celsius

D : *Dickeya*

DO: Densité Optique

Eps: Exopolysaccharide

FAO: Food and Agriculture Organization

Fig: figure

gr : gramme

h: heure

Kg : Kilogramme

LB : Luria Bertani

LP: Levure Peptone

LPA: Levure Peptone Agar

Lps : Lipopolysaccharide

M : Mole

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

mM : milli Molaire

N : Normale

μl : Microlitre

nm : nanomètre

P : *Pectobacterium*

Pa: *Pectobacterium atrosepticum*

Pc: *Pectobacterium carotovorum*

PE: Pectinestérase

pH : Potentiel d'Hydrogène

PG : polygalacturonase

PGL : polygalacturonate lyase

PeL : pectate lyase

PL : pectine lyase

PMG : polyméthylgalacturonase

PMGL : polyméthylgalacturonate lyase

PSB : poids sec bactérien

sp: Espèce

ssp: Subspecies

SRS : Substances Réductrices du saccharose

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie de la pomme de terre	3
Figure 2 : Symptôme de la pourriture molle sur les tubercules de terre.	6
Figure 3: Symptôme de la jambe noire sur la plante de pomme de terre	6
Figure 4: Cycle de la maladie de jambe noire	6
Figure 5: Mode d'action des pectate lyases.....	11
Figure 6: Mode d'action des pectinases	11
Figure 7: Tubercules de pomme de terre sélectionnés	17
Figure 8: Echantillons de carottes utilisés.....	17
Figure 9: Dénombrement des colonies de <i>Pectobactérium</i> et <i>Dickeya</i> sur milieu solide	20
Figure 10: Méthode d'inoculation des demi-tubercules de pommes de terre et de carottes	22
Figure 11 : Protocole de dosage de l'activité pectate lyase.....	24
Figure 12 : Activité pectinolytique sur milieu Sutton.....	26
Figure 13: Réduction des nitrates en nitrites	26
Figure 14: Utilisation de α -méthylque-D-glucoside	27
Figure 15: Utilisation de l'inuline	27
Figure 16 : Réduction de saccharose.....	27
Figure 17 : Mesures des longueurs et des profondeurs des tissus pourris	28
Figure 18: Symptômes de pourriture molle sur les demi-tubercules de pomme de terre	29
Figure 19: Le volume des pourritures sur la pomme de terre (ml).....	29
Figure 20 : Poids des pourritures sur la pomme de terre (gr).....	30
Figure 21 : Volume des pourritures sur la pomme de terre (ml).....	30
Figure 22: Longueur des pourritures sur la pomme de terre (cm)	31

Figure 23 : Poids des pourritures sur la carotte (gr).....	31
Figure 24 : Volume des pourritures sur les carottes (ml).....	32
Figure 25 : Longueur des pourritures sur les carottes (cm)	32
Figure 26 : Profondeur des pourritures sur les carottes (cm).....	32
Figure 27 : Comparaison du degré de pathogénicité entre pommes de terre et carottes.....	34
Figure 28 : Activité spécifique des Pels sur pomme de terre.....	35
Figure 29 : Activité spécifique moyenne Pels sur pomme de terre.....	36
Figure 30 : Activité spécifique des Pels sur carotte	37
Figure 31 : Activité spécifique moyenne des Pels sur carotte.....	37

Liste des tableaux

Tableau I : Espèces <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i> responsables de pourritures molles chez les végétaux.	7
Tableau II : Résultats de la mise en évidence des souches.....	25

Introduction

Introduction :

La pomme de terre est l'une des denrées alimentaires de base, et l'un des légumes les plus consommés dans le monde, avec une moyenne de 32,60 Kg/personne/an. Sa production mondiale annuelle avoisine les 370 millions de tonnes, elle est cultivée sur une surface de 19 millions d'hectares avec un rendement moyen de 19,45 tonnes /hectares. La culture de pomme de terre est classée, en termes de production, en quatrième position derrière le maïs, le riz et le blé (FAOSTAT, 2011).

En Algérie, la pomme de terre fut introduite au milieu de XIXème siècle, depuis elle occupe une place importante dans les habitudes alimentaires du pays, avec une production qu'a atteinte 3,99 millions de tonnes en 2011 sur une superficie de 161 200 hectares. Aussi, elle occupe la deuxième place en Afrique après l'Egypte (FAOSTAT, 2011).

De part son cycle de vie, ses conditions culturales ainsi que sa large distribution, la pomme de terre représente l'une des productions végétales les plus ciblées par de nombreuses maladies microbiennes, quelles soient d'origine bactérienne (pourriture molle et jambe noire dues espèces pectinolytiques du genre *Pectobacterium*), fongique (mildiou causé par *Phytophthora infestans*) ou virale (virus de l'enroulement et de la mosaïque).

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux espèces phytopathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* sp, agents causals de la pourriture molle, et ceci vu la grande incidence de cette dernière en Algérie.

Ces bactéries envahissent les espaces intercellulaires de la plante et produisent des enzymes pectinolytiques qui sont responsables de la dégradation de la paroi végétale par macération et libération du contenu cellulaire conduisant ainsi à une mort des cellules infectées (Johnson *et al.*, 2011).

Parmi ces pectinases; les pectate lyases jouent un rôle majeur dans le catabolisme de la pectine chez les bactéries et dans l'apparition des symptômes de macération (Wlodarczyk, 2010). En effet, des extraits purifiés de pectate lyases peuvent à eux seuls induire une macération cellulaire (Basham et Bateman, 1975 ; Liao, 1989).

Les objectifs de ce travail sont de caractériser le potentiel pathogène de ces enzymes, ainsi que le degré de sensibilité des tubercules de pomme de terre et d'autres hôtes vis-à-vis des souches les plus virulentes. De même que l'établissement de la relation existante entre l'activité enzymatique et l'intensité des symptômes de pourriture sur les tissus infectés, et ceci en démontrant le rôle clef des tissus végétaux dans l'induction et la surexpression des enzymes.

Synthèse bibliographique

I) Généralités sur la pomme de terre

I-1) Origine

La pomme de terre fut importée du continent sud-américain par les espagnols à la fin du 16^{ème} siècle, pour être cultivée un peu partout en Europe (Jouzier, 2005). Elle fut introduite en Afrique, à la fin de 19^{ème} siècle, où elle est rencontrée très fréquemment en zones arides, principalement au nord et au sud du continent africain. En Algérie, elle fut probablement introduite vers 1856 par des colons français ou des commerçants algériens (Yahiaoui-zaidi, 2004).

I-2) Description botanique et morphologique

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L) appartient à la famille des Solanacées, qui regroupe d'autres cultures comme la tomate, l'aubergine et le poivron...etc. C'est une espèce herbacée vivace par ses tubercules mais cultivée en culture annuelle (Rousselle *et al.*, 1996).

La plante comporte à la fois des tiges aériennes et souterraines (Darpoux et Debelley, 1967) (Fig 1). Par ailleurs, elle s'adapte bien aux différentes zones climatiques des régions tropicales et extra tropicales (Yagi, 2010).

L'appareil aérien est constitué de plusieurs tiges principales souvent ailées qui peuvent atteindre jusqu'à une cinquantaine de centimètres. Les feuilles sont alternes, composées et comportant 7 à 15 grandes folioles latérales, primaires flanquées de folioles secondaires et de folioles intercalaires. Les fleurs sont souvent stériles, la production de fruit (baie sphérique) est donc généralement rare (Rousselle *et al.*, 1996).

L'appareil souterrain représente la partie la plus importante de la plante puisque on y trouve les tubercules qui confèrent sa valeur alimentaire à la pomme de terre. Ces derniers se trouvent sous plusieurs formes, claviformes, oblongs, cylindriques allongées et arrondies, avec des couleurs de chaire variables allant du blanc au jaune. Leur taille est variable selon le cultivar et les conditions de culture (Grison, 1983).

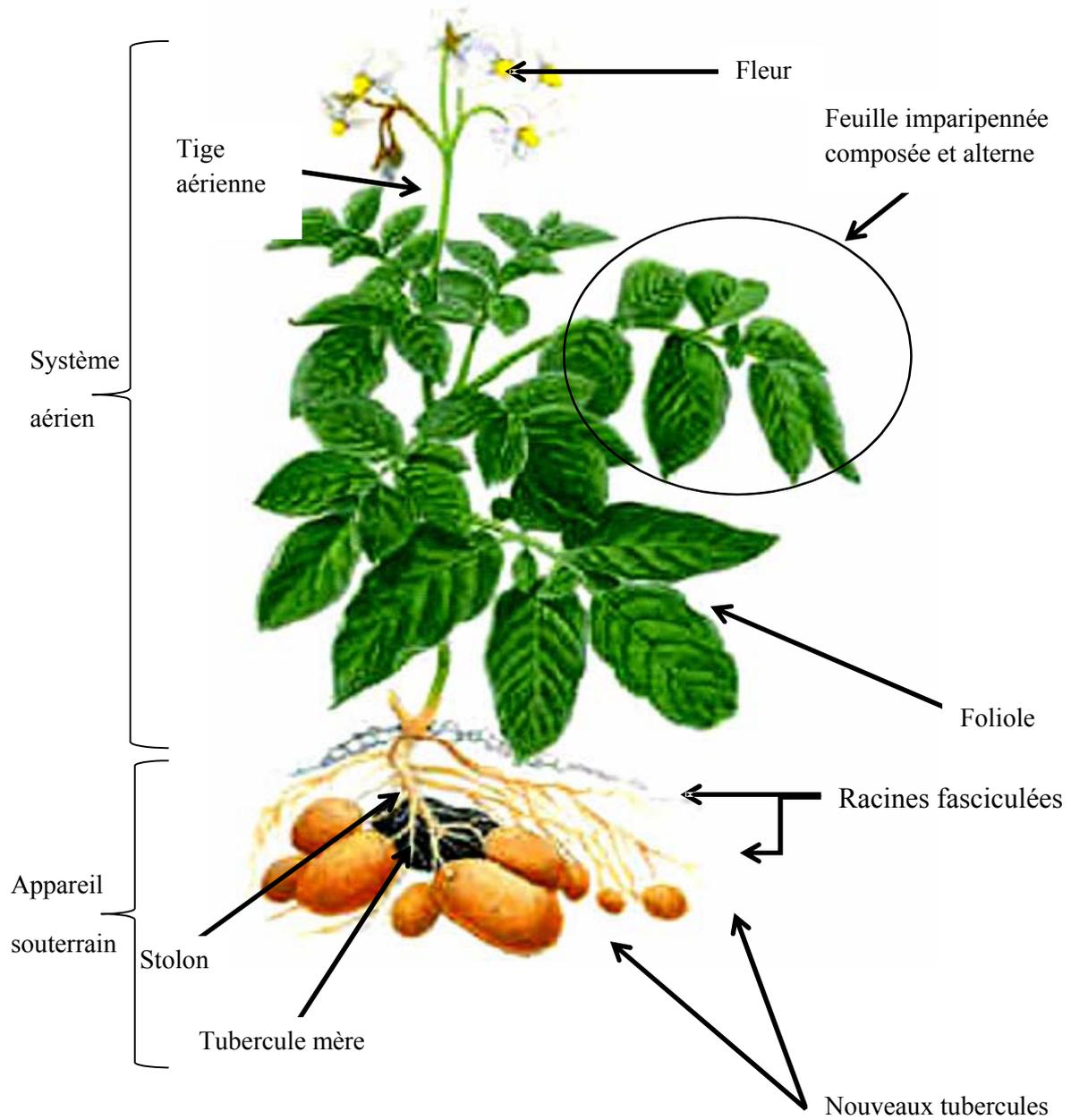


Figure 1 : Morphologie de la pomme de terre (Saguez, 2007).

II) Maladies de la pomme de terre

La culture de la pomme de terre est la cible de nombreuses attaques, à la fois par des agents biotiques (bactéries, champignons, virus, nématodes....) ou abiotiques (conditions environnementales défavorables).

Les maladies bactériennes de pourriture molle et jambe noire dues aux espèces pectinolytiques des genres *Dickeya* et *Pectobacterium*, sont parmi les pathologies les plus importantes et les plus répandues, vu le manque de moyens de lutte les préjudices économiques qu'elles engendrent.

II-1) Jambe noire et pourriture molle

II-1-1) Jambe noire

La maladie de jambe noire (appelée aussi pourriture aérienne) se développe généralement en conditions aérobies, elle est souvent favorisée par des sols humides et des températures relativement fraîches (<19°C). Seul, l'espèce *Pectobacterium atrosepticum*, ainsi que le nouveau genre *Dickeya* sp sont connus comme étant les agents de la maladie (Pérombelon, 2002).

Les symptômes typiques de la jambe noire se manifestent par une pourriture humide brune foncée à noire à la base des tiges, avec des nécroses plus ou moins sèches (Fig 2). Des jaunissements/flétrissements du feuillage sont souvent associés aux symptômes. La macération et pourrissement des organes infectés ont tendance à se produire en conditions humides, tandis qu'en conditions chaudes et sèches, des nécroses sur tiges et des flétrissements des feuilles sont favorisés (Pérombelon et Kelman, 1987). La jambe noire peut atteindre toutes les tiges d'une plante ou n'être localisée que sur quelques unes, voire une seule (Hélias, 2008). L'évolution de la maladie peut conduire à la pourriture totale de la tige, qui s'affaisse et passe souvent inaperçue au sein des plantes voisines (Schaerer et Dupuis, 2010).

Le cycle d'infection de la jambe noire est schématisé dans la figure 4.

II-1-2) Pourriture molle

La pourriture molle de tubercule commence d'abord, dans des conditions humides, au niveau des lenticelles, à l'extrémité du stolon ou suite à des blessures. La lésion peut ensuite s'étendre au tubercule entier et de là jusqu'aux tubercules voisins en conditions de stockage. Les bactéries dégradent les tissus provoquant une macération du parenchyme, les tissus macérés présentent une pourriture d'aspect crémeux de couleur claire, qui brunit jusqu'à devenir noire au contact de l'air, développant ainsi une odeur putride, une fois envahis par des microorganismes, (Fig 3) (Czajkowski *et al.*, 2011).

Toutefois, en conditions sèches, la pourriture reste localisée à de petites parties sèches, foncées et déprimées, Une fois les semences infectées plantées, les tubercules-mère risquent de pourrir avant l'émergence, ce qui entraîne les symptômes de manque à la levée (Elphinstone, 1991).

Parmi les conditions environnementales favorisant l'initiation des symptômes sur tubercules en conservation on recense: l'anaérobiose, l'humidité, l'eau libre, les températures supérieures ou inférieures à l'intervalle requis pour la croissance bactérienne, le potentiel hydrique des cellules végétales, ainsi que le seuil minimum des bactéries estimé à environ 10^3 cellules par tubercule (Pérombelon et Kelman, 1980 ; Bain *et al.*, 1990).

Les bactéries peuvent également survivre dans le sol, infectant la culture suivante aux champs. Le développement de la maladie atteint son maximum à des températures de 25°C à 30°C, mais sa large distribution mondiale suggère une adaptation des bactéries à des températures moins élevées (Lallemand, 2010).



Figure 2 : Symptôme de jambe noire sur la plante de pomme de terre (Pérombelon, 2002).



Figure 3 : Symptôme de pourriture molle sur les tubercules de pomme de terre (Banks, 2006 ; Huttons, 2009).

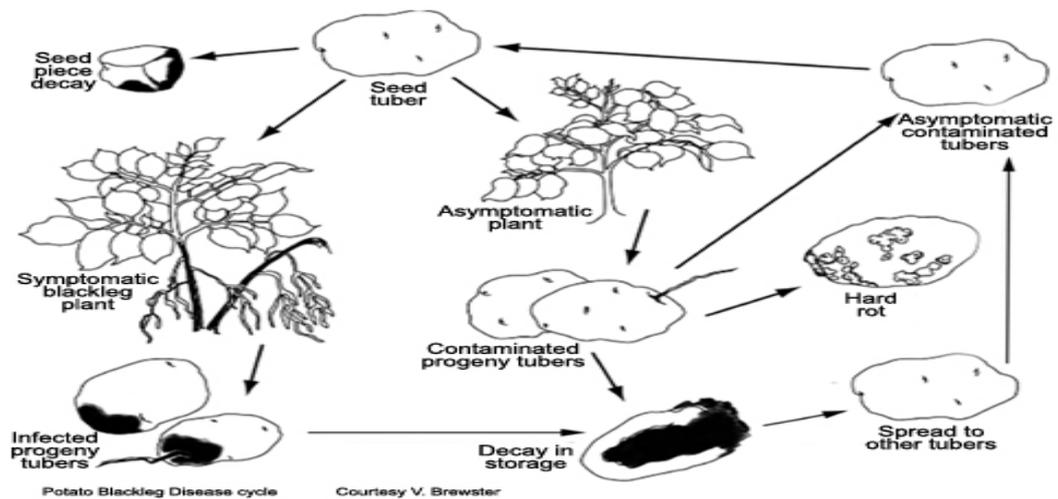


Figure 4 : Cycle de la maladie de jambe noire (De Boer, 2004)

II-2) Les agents pathogènes

Parmi les agents pathogènes qui affectent la pomme de terre, les bactéries anciennement nommées *Erwinia* pectinolytiques (actuellement reclassées dans les genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sp) sont responsables de dégâts potentiellement importants en végétation et/ou en conservation.

En plus de la pomme de terre, ces dernières sont capables d'infecter d'autres cultures végétales tels que la carotte, la tomate, la betterave à sucre, le chou, l'oignon etc..., Trois types d'espèces peuvent causer ces dégâts, Au cours des dernières années, ces agents pathogènes ont fait l'objet de plusieurs remaniements et classements et ont été rebaptisés à maintes reprises (voir tableau I).

Tableau I : Espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* responsables de pourritures molles chez les végétaux

Ancienne appellation	Nouvelle appellation	Importance	Autres plantes hôtes	Références
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i> (<i>Eca</i>)	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (<i>Pa</i>)	Agent pathogène de la jambe noire le plus fréquent dans les pays d'Europe du nord. Se développe à des températures plus fraîches (15 et 25 °C).	Limitée essentiellement aux pommes de terre	(Hélias <i>et al.</i> , 2008).
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> (<i>Ecc</i>)	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (<i>Pc</i>)	Souvent isolée lors de pourriture molle des tubercules et pourriture des tiges (après humidité stagnante). Mène plus rarement à la jambe noire bien étendue dans le sol et sur les tubercules. S'exprime préférentiellement à des températures plus élevées que <i>P. atrosepticum</i> , allant de 20 à 30 °C	Très large spectre d'hôtes (légumes, tournesols, tabac, etc.)	(Henz <i>et al.</i> , 2006)
<i>Erwinia chrysanthemi</i> (<i>Ech</i>)	<i>Dickeya dadantii</i> (<i>D. dadantii</i>)	Agent pathogène le plus courant de la jambe noire. Préfère les températures élevées (35-37 °C)	Tomates, endives, artichauts	(Hélias <i>et al.</i> , 2008).

II-3) Facteurs de virulence

II-3-1) Facteurs extrinsèques

L'invasion, la colonisation et la dégradation des tissus végétaux impliquent la combinaison de facteurs de virulence, aussi nombreux que variés (Lallemand, 2010).

Lorsque les conditions climatiques sont favorables, les *Pectobacterium* présents dans le sol et à la surface des végétaux sensibles passent d'un état de latence à un état d'activité favorisé par les blessures des plantes et le relargage de sucs végétaux. La pénétration dans l'hôte est facilitée par ces blessures, mais elle peut aussi se faire par l'intermédiaire d'ouvertures naturelles comme les lenticelles et les bourgeons (Latour *et al.*, 2008).

Le développement d'une maladie bactérienne dans une culture de pommes de terre est fortement influencé par des facteurs environnementaux tels que l'humidité du sol et de la température (Hutton, 2009). En générale les plus importants facteurs externes influençant les maladies de pourriture molle et de jambe noire sont :

La température : la température détermine les espèces pectinolytiques impliquées et la vitesse du développement de la maladie. A basses températures, *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*) prédomine aussi bien au niveau de la pourriture molle que pour les maladies de la tige. Au fur et à mesure que les températures augmentent *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) et *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* sp) ont tendance à se développer (Smadja *et al.*, 2004).

L'humidité : afin d'initier la pourriture molle, la présence de pellicules d'eau à la surface du tubercule est indispensable pour favoriser les conditions d'anaérobiose permettant ainsi une multiplication rapide des bactéries (Elphinstone, 1991).

D'autres facteurs favorisent la dissémination des germes comme l'utilisation des machines agricoles souillées, les insectes vecteurs, l'eau d'irrigation, l'eau de pluie, les aérosols, l'activité humaine durant les inspections sur pied, ou par l'intermédiaire des animaux entrants dans des gisements de pommes de terre (Czajkowski, 2011).

II-3-2) Facteurs intrinsèques

Parmi les facteurs de virulences internes (chélation du fer, mobilité, Eps, Lps....Etc), le principal déterminant de pathogénie des espèces pectinolytiques est la production et sécrétion d'enzymes extracellulaires de dégradation, notamment les pectinases et les cellulases (Lallemand, 2010).

II-3-2-1) Enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques (pectinases) constituent un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques largement présentes chez les plantes supérieures et les micro-organismes. Ces enzymes sont capables d'attaquer une multitude de liaisons chimiques. Cependant, le terme «enzyme pectinolytique» ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (Combot *et al.*, 2011).

Ces enzymes sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exolytique) (Favela-Torres *et al.*, 2006).

Les pectinases sont divisées en deux grands groupes : les pectinestérases (PE) et les dépolymérases (polygalacturonases et lyases) (Arunachalam et Asha, 2010).

II-3-2-2) Les différentes classes de pectinases et leur mode d'action

II-3-2-2-1) Pectinestérases (PE)

Les PE catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines hautement méthylées, entraînant la libération du méthanol et la formation d'acide polygalacturonique. Leur activité peut être mise en évidence soit par dosage du méthanol libéré, ou bien par détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres ou encore en utilisant un régulateur de pH. Leur pH optimal est compris entre des valeurs de 4 à 5 (Combot *et al.*, 2011).

II-3-2-2-2) Dépolymérases

Les dépolymérases agissent soit par hydrolyse (Hydrolases) ou par β -élimination (Lyases) sur les liaisons glycosidiques. Elles ont pour substrat préférentiel, les pectines ou les pectates et clivent les liaisons à l'intérieur du polymère (mode endo) ou à partir d'une extrémité de substrat (mode exo) (Combot *et al.*, 2011).

➤ Les polygalacturonases (PG)

Les PG catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α (1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par le méthanol. Elles constituent la classe d'enzymes la plus étudiée parmi la famille des pectinases. Selon leurs modes d'actions, on distingue les endopolygalacturonases et les exopolygalacturonases.

Deux méthodes ont été développées pour déterminer l'activité des PG et des PMG (polyméthylgalacturonases). On apprécie cette activité en mesurant la diminution de viscosité ou l'augmentation du pouvoir réducteur du substrat (acide pectique ou pectine) (Combot *et al.*, 2011).

➤ Les lyases

Selon Bekouche en 2006 Les lyases catalysent la dépolymérisation d'un substrat par β -élimination de la liaison glycosidique α (1-4) entre deux résidus d'acide D-galacturonique. L'absence de molécule d'eau dans le mécanisme réactionnel conduit à la formation d'une double liaison entre le C4 et le C5 à l'extrémité non réductrice libérée d'une unité d'acide galacturonique. Comme pour les polygalacturonases, il existe aussi deux types de lyases :

• Les pectine-lyases (PL)

Elles ont pour substrat préférentiel la pectine et possèdent deux modes d'action:

- Les endopectines-lyases agissent par β -élimination et ont une préférence pour les pectines hautement méthylées. Leur affinité pour les pectines diminue avec le degré de méthylation du substrat et sont inactives sur l'acide polygalacturonique. Elles coupent les liaisons soit entre deux acides gras méthoxylés, ou entre un résidu acide gras libre et un autre méthoxylé. Leur plus petit substrat est un acide gras à 4 C totalement méthoxylé (Lemberg *et al.*, 2000).

- Les exopectines-lyases quant à elles agissent sur les pectines fortement estérifiées (Bekouche, 2006).

• Les pectate-lyases (PeL)

Elles agissent préférentiellement sur une chaîne d'acide galacturonique mais aussi sur les pectines faiblement méthylées selon un mécanisme endo ou exolytique (Fig 5):

- Les endopectate-lyases attaquent aléatoirement à l'intérieur de la chaîne polygalacturonique. Le substrat préférentiel est une pectine faiblement méthoxylée avec un degré de polymérisation plus élevé. Le plus petit substrat obtenu est un trimère (AG3) (Bekouche, 2006).

- Les exopectate-lyases ont une action récurrente à partir de l'extrémité réductrice de l'acide galacturonique en libérant des dimères insaturés. La présence de calcium serait nécessaire à l'action des endo et des exopectate-lyases (Bekouche, 2006).

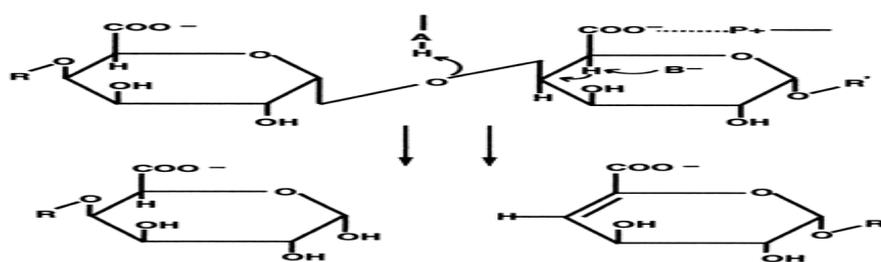


Figure 5 : Mode d'action des Pectate Lyases (PL) (Steven *et al.*, 2000)

Le principe du clivage de l'acide α -1,4-polygalacturonique par un mécanisme de β -élimination par les pectate lyases qui contribuent au minimum trois groupes au mécanisme catalytique : P+, qui neutralise la charge sur le groupe d'acide carboxylique ; B, une base générale qui soustrait le proton de C-5 ; et A, qui est impliqué dans le transfert du proton final à l'oxygène glycosidique, laissant un double lien entre C-4 et C-5.

Les modes d'action des différentes classes de pectinases sont résumés dans la figure suivante :

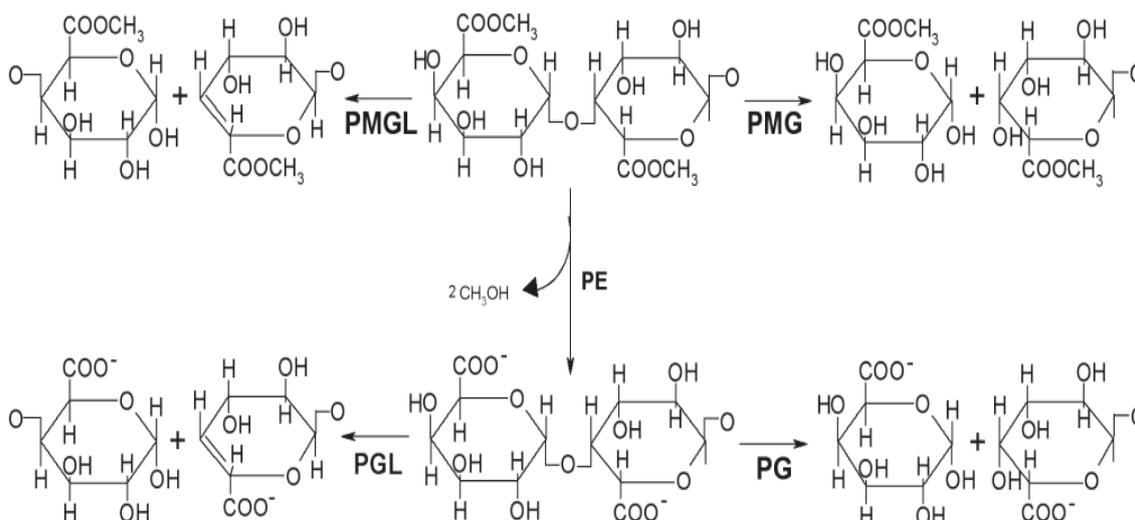


Figure 6 : Mode d'action des pectinases (Combo *et al.*, 2011)

PMGL : polyméthylgalacturonate lyase ; PMG : polyméthylgalacturonase ; PE : pectinestérase ; PGL : polygalacturonate lyase ; PG : polygalacturonase.

II-3-2-3) Effet de la température et du pH sur l'activité pectinolytique**II-3-2-3-1) Effet de la température****➤ Sur l'activité polygalacturonase**

Les polygalacturonases possèdent un optimum de température à 55°C (Nihan, 2006).

➤ Sur l'activité pectine lyase

L'enzyme a montré un intervalle entre 50 à 70°C avec un maximum à 60°C (Salmaan et Alyaa., 2010).

➤ Sur l'activité pectate lyase

Les activités spécifiques maximales et minimales des Pels sont respectivement égale 20°C et 10°C. (Augustin MOH ,2012). L'activité de Pel la plus élevée est à environ 17°C (Ni *et al.*, 2010).

II-3-2-3-2) Effet du pH**➤ Sur l'activité polygalacturonase**

Environ 80% des PGA ont un pH entre 6 et 7. L'enzyme est très stable à pH 5 et maintient 65 et 70% de son activité à pH 4 et 6 respectivement. L'enzyme perd environ 50 à 60% de son activité à pH 8. L'enzyme est aussi stable à pH acide et alcalin (Nihan, 2006).

➤ Sur l'activité pectine lyase

L'activité optimale des pels est atteinte à l'intervalle de pH (8-10), avec un optimum à 8.5. D'une part, la pectine lyase a montré une activité très réduite à des valeurs de pH acides (Salmaan et Alyaa, 2010).

➤ Sur l'activité pectate lyase

Le pH optimal des endopectate lyases est voisin de 6, Leur gamme d'activité s'étend de 4,5 à 9,5 avec une plus grande intensité à pH 6 et 8,5 (Heim *et al.*, 1971).

III) Détermination des activités pectinolytiques

III-1) Mesure de l'activité enzymatique :

L'analyse enzymatique est une pratique de laboratoire courante, ce terme couvre la mesure de l'activité des enzymes et les dosages de substrats par voie enzymatique.

Les méthodes de mesure de l'activité enzymatique sont aussi nombreuses que variées. Les unes sont essentiellement des techniques de recherche permettant une étude fine de la réaction enzymatique (polarisation rotatoire, méthodes d'analyse rapide), les autres sont utilisées pour la détermination des activités dans les produits biologiques, en particulier en pratique médicale.

On peut distinguer :

- Les méthodes d'analyse chimique directe qui consistent à doser le substrat disparu ou le produit formé pendant un temps déterminé, dans les conditions expérimentales de détermination de la vitesse maximum. Les techniques de dosage sont souvent colorimétriques, elles peuvent être aussi volumétriques ou potentiométriques.
- Les méthodes cinétiques spectrophotométriques ou fluorimétriques, dans ces techniques on visualise la cinétique enzymatique ce qui donne une garantie du bon déroulement de la réaction lorsque l'on obtient une droite. Ces méthodes présentent plusieurs avantages : spécificité, précision, rapidité, facilité dans l'expression du résultat directement en unités internationales (Audigié et Zonszain, 1995).

III-2) Dosages enzymatique :

La quantité présente d'une enzyme peut être déterminée ou dosée selon l'effet catalytique qu'elle produit, correspondant ainsi à la conversion d'un substrat en un produit. Pour doser une enzyme, il faut maîtriser l'équation-bilan de la réaction catalysée et disposer d'un procédé analytique qui permet de quantifier soit la disparition d'un substrat, ou l'apparition d'un produit.

L'activité d'une enzyme est généralement dosée en mesurant la vitesse d'apparition du produit ou la vitesse de disparition du substrat. Si le substrat ou le produit absorbe la lumière à une longueur d'onde spécifique, les variations de la concentration de ces molécules peuvent être mesurées en suivant la variation de l'absorption à cette longueur d'onde. Ceci est typiquement réalisé en utilisant un spectrophotomètre.

La densité optique étant proportionnelle à la concentration, la vitesse de la variation de l'absorption est proportionnelle à la vitesse de la réaction enzymatique exprimée en moles de substrat consommées(ou en moles de produit formées) par unité de temps (Hames *et al.*, 2000).

III-2-1) Dosage des pectinases :

C'est au début des années 1950 que les recherches sur les cellulases et les polysaccharidases ont commencé, puis étendues vers les années 70 et 80 (Bajpai, 1999). Cependant, les pectinases ont été employées dans l'industrie alimentaire dès 1930. Au regard de leur importance, les pectinases sont extraites et dosées à partir d'une large variété de micro-organismes comprenant des bactéries, mycètes, actinomycètes, levures, ainsi qu'à partir de diverses plantes (Bhat, 2000). L'analyse de l'activité pectinolytique est suivie spectrophotométriquement, avec comme substrat la pectine (acide polygalacturonique). C'est une technique qui permet de quantifier les sucres réducteurs libérés dans le milieu réactionnel (Amraoui *et al.*, 2004 ; Oyeleke *et al.*, 2012).

III-2-1-1) Pectinestérases :

L'analyse de l'activité des PE est basée sur la libération de groupes carboxyliques ou du méthanol de pectine. La technique la plus utilisée consiste à mesurer le taux de dégagement des groupes carboxyliques de la pectine en utilisant une méthode d'analyse spectrophotométrique à une longueur d'onde de 412 nm, basée sur la mesure de changement de l'absorbance d'un indicateur de pH, en raison de la formation de groupes carboxyliques libres. Le méthanol peut être mesuré par méthode colorimétrique ou par chromatographie gazeuse (Mcfeeters *et al.*, 1992 ; Rondan-Sanabria *et al.*, 2006).

III-2-1-2) Polygalacturonases :

La mesure de l'activité PG est réalisée par spectrophotométrie UV-Visible en utilisant l'acide polygalacturonique comme substrat qui se dégrade en acide galacturonique. L'absorbance est mesurée à 500 nm. La quantité de sucres réducteurs peut être estimée aussi en utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicyclique et la méthode du cuivre d'arsenomolybdate, ou par la méthode de réduction de la viscosité (Nihan, 2006 ; Apoorvi et Vuppu, 2012).

III-2-1-3) Pectine-lyases :

Le dosage des PL est réalisé en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 235 nm. La pectine ou l'acide galacturonique sont utilisés comme substrat, avec une solution tampon comme mélange réactionnel ajusté au pH optimum de l'enzyme. Après incubation, le mélange est dilué et l'absorbance est déterminée à 235 nm (Elizabeth *et al.*, 1989 ; Salmaan et Alyaa, 2010).

III-2-1-4) Pectate-lyases :

La technique de dosage de l'activité Pel est basée sur le principe que la pectine est dégradée sous l'action des Pels par β -élimination. Cette réaction libère des composés contenant une double liaison entre C4 et C5 ; cette double liaison et le groupe carboxyle en C5 entraînent une absorbance maximale à 235 nm (Mehri-Kamoun, 2001).

Le dosage est réalisé soit avec le surnageant des cultures bactériennes ou en utilisant le toluène sur l'extrait cellulaire. L'activité de Pel est déterminée par spectrophotométrie en suivant la dégradation du PGA en produits insaturés (Wilfred *et al.*, 2010).

Partie
Expérimentale

Matériels

et

méthodes

I) Matériel

I-1) Matériel bactérien

Quatre souches de références :

- *Dickeya dadantii* 3937-(470) ;
- *Dickeya solani* (99) ;
- *Pectobacterium atrosepticum* (86.20) ;
- *Pectobacterium carotovorum* (82.22).

La souche 470 provient de l'UMR (Unité Mixte de Recherche) ; Microorganismes, Adaptation et Pathogénie (MAP)-Université Claude Bernard-69100, Lyon-France.

La souche 99 est d'origine polonaise (Laboratory of Plant Protection and Biotechnology- Intercollegiate Faculty of Biotechnology University of Gdansk and Medical University of Gdansk, Poland).

Les souches 82 et 86 sont issues de la collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP)-INRA de Rennes (France).

I-2) Matériel végétal

Tubercules de pommes de terre et rhizomes de carottes échantillonnées à partir de marchés hebdomadaires au niveau de la ville de Bejaia durant la période comprise entre mars et avril 2013.

I-2-1) Pommes de terre

Les tubercules appartenant à la variété Spunta, de taille uniforme, d'apparence saine, ne présentant aucune blessure ou symptôme (Fig 7). Ces tubercules sont utilisés ultérieurement pour la réalisation de tests d'infection.



Figure 7: Tubercules de pomme de terre sélectionnés

I-2-2) Carottes

Les carottes utilisées dans cette étude sont choisies selon leurs tailles uniformes, et exemptes de blessures ou de maladies (Fig 8).



Figure 8 : Echantillons de carottes utilisés

II) Méthodes

II-1) Revivification des souches

Les souches de référence (*D. dadantii*, *D. solani*, *P. atrosepticum* et *P. carotovorum*) après congélation à -80°C sont revivifiées. Elles sont d'abordensemencées sur du bouillon nutritif (BN) en tubes à essai pour enrichissement. Après incubation à 27°C pendant 24 à 48h, elles sont repiquées plusieurs fois sur milieu de culture semi sélectif King B en boîtes de Pétri et tubes à essai.

Les souches sont conservées sur milieux Luria Bertali et LPA (Levure Peptone Agar) en gélose inclinée, ceci afin de réaliser les tests subséquents de confirmation.

II-2) Tests de conformité biochimique

Dans le but de mettre en évidence les principales activités biochimiques et physiologiques des souches, une batterie réduite de tests clefs d'identification a été réalisée, elle comprend :

- La détermination de l'activité pectinolytique ;
- La présence d'enzyme nitrate réductase ;
- L'utilisation de sucres spécifiques : α - méthyl-glucoside, sucrose et inuline.

II-2-1) Mise en évidence de l'activité pectinolytique

La recherche de l'activité pectinolytique ou test pectinase sert à déterminer l'activité enzymatique d'une bactérie, c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine contenue le milieu de culture comme seule source de carbone, ceci via la production d'une gamme d'enzymes.

Différents milieux sélectifs à base de pectine et polypectate de sodium sont utilisés pour l'isolement et l'identification des bactéries pectinolytiques (Liao et Shollenberger, 2004) d'après Ladjouzi, (2007). Parmi lesquels les principaux sont: le milieu Crystal Violet Pectate (CVP) et le milieu de Sutton, c'est ce dernier que nous avons utilisé dans notre étude.

Milieu de Sutton

Les souches sont ensemencées par piqure centrale dans 3 ml du milieu Sutton en tubes à essai. Après 24 h d'incubation à 27 °C, la présence d'une activité pectinolytique se traduit par le virage de l'indicateur de couleur du bleu-vert vers le jaune, ce qui signifie une acidification du milieu. Après 48 h, la liquéfaction du milieu indique la dégradation de la source de pectine (Hélias, 1999).

II-2-2) Recherche du nitrate réductase

Ce test permet la détection de l'enzyme nitrate réductase qui réduit les nitrates en nitrites et en azote élémentaire. Des tubes à essai avec 5 ml d'eau peptonée nitraté sont ensemencés par une suspension bactérienne fraîche, puis incubés à 27°C pendant 24 heures.

La lecture se fait par addition de quelques gouttes des réactifs de révélation I et II. L'apparition d'une couleur rouge sang met en évidence la présence de nitrites (NO_2^-) (Yahiaoui-Zaidi, 2004).

II-2-3) Utilisation des sucres (α -méthyl-glucoside, sucrose et inuline)

La dégradation de l' α -méthyl-glucoside et la production de substances réductrices du sucrose (saccharose) permettent d'identifier les espèces atrosepticum qui sont positives aux tests

Des amas de cultures bactériennes sont ensemencés dans 2 ml des milieux α -méthyl-glucoside, SRS et inuline, puis incubés à 27°C pendant 24 à 48h. L'utilisation de ces sucres se traduit par :

- ❖ Une acidification du milieu (couleur jaune) pour l' α -méthyl-glucoside, l'absence d'une couleur signifie une réaction négative ;
- ❖ Un virage de l'indicateur coloré du rouge vers le jaune pour le milieu inuline ;
- ❖ L'apparition d'un précipité de couleur jaune-orange, après chauffage et ajout du réactif de révélation Benedict (Lacroix et Vézina, 2003 ; Hélias, 1999).

II-3) Préparation de l'inoculum standard et dénombrement cellulaire

L'inoculum standard est préparé à partir d'une colonie bactérienne inoculée dans 5 ml de bouillon Levure Peptone (LP), puis incubée pendant 24h à 27°C, ensuite une série de dilutions est réalisée dans 9 ml d'eau physiologie stérile.

Un volume de 100 μ l de chaque dilution est ensemencé sur 2 boîtes de pétri contenant le milieu King B, la densité optique (D.O) est mesurée par spectrophotomètre à 600 nm. Les boîtes sont incubées à 27°C pendant 18 à 24h. Après lecture, les colonies sont dénombrées.

Toutes les suspensions bactériennes utilisées pour les tests biochimiques sont ajustées et standardisées.

La standardisation de l'inoculum de départ et les dénombrements cellulaires sont réalisés selon le protocole modifié d'Hélias *et al.* (2005) comme suit (Fig 9) :

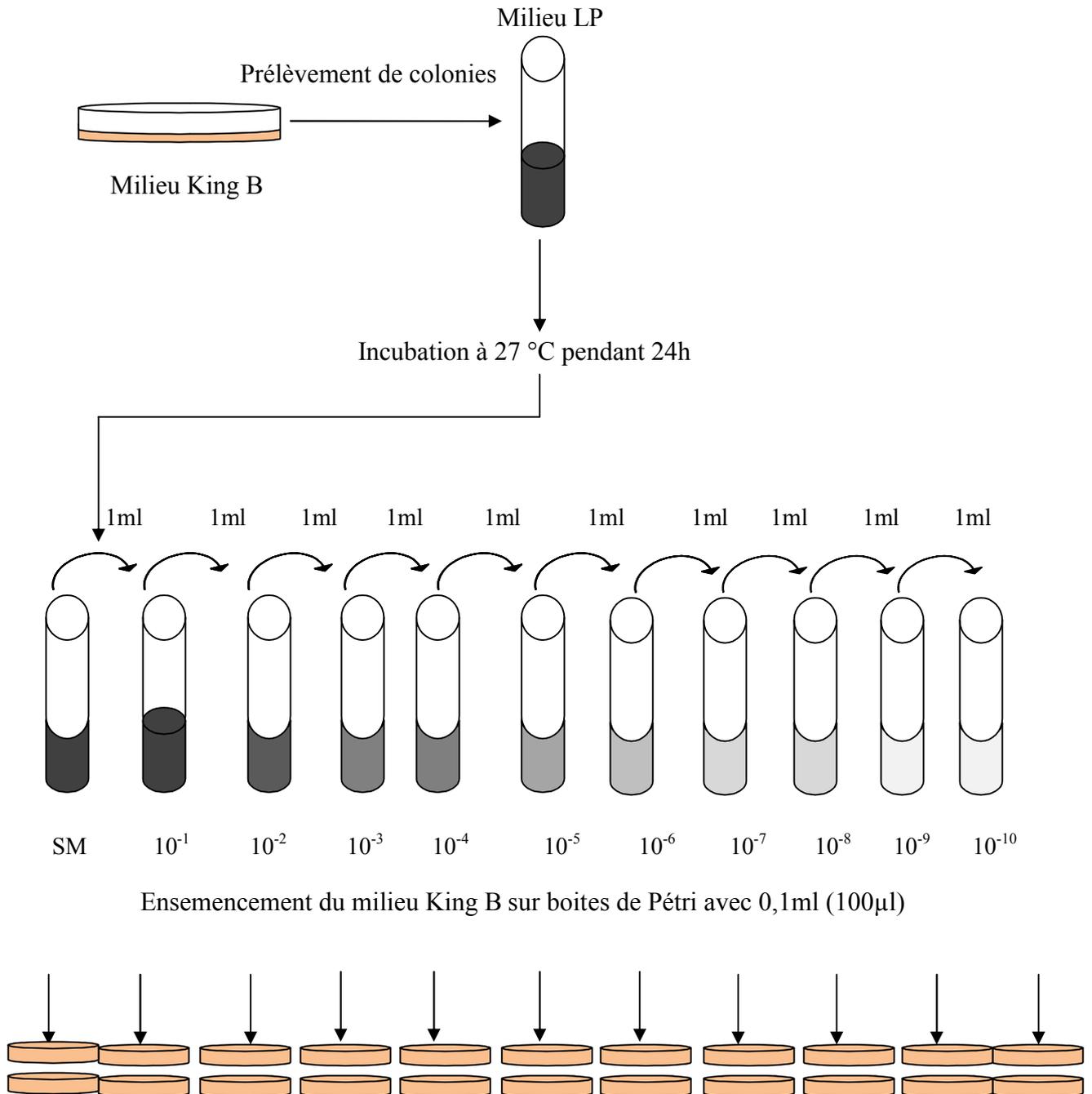


Figure 9 : Dénombrement des colonies de *Pectobactérium* et *Dickeya* sur milieu solide

II-4) Test de pathogénicité

La technique d'inoculation des demi-tubercules recommandée pour sa précision est utilisée pour différencier les niveaux de pathogénicité des souches testées, et le degré de sensibilité des différents échantillons de pomme de terre et de carotte selon la méthode décrite par Ibrahim *et al* (1978).

Les échantillons sont d'abord lavés à l'eau de robinet, puis mis dans de l'éthanol 10% pendant 5 minutes afin de désinfecter toute contamination sur leur surface. Ils sont ensuite rincés à l'eau et séchés à température ambiante.

Une pré-culture réalisée sur bouillon LP est ensuite repiquée sur milieu King B, pour être transférée par la suite dans des tubes d'eau physiologie à 0,85%.

Sur pommes de terre chaque tubercule est coupé longitudinalement en deux parties identiques, tandis que l'inoculation est réalisée sur les carottes entières. À l'aide d'un emporte-pièce des puits de 5mm de diamètre/5mm de longueur sont creusés. Chaque puits est rempli par 50 µl de suspension bactérienne.

Les demi-tubercules et les carottes sont disposés dans des boîtes en plastique couverte, à l'abri de la lumière afin de créer une atmosphère humide et confinée. Cinq répétitions sont réalisées pour chaque essai.

L'incubation se fait à température ambiante (20°C) pendant 5 jours. Le développement de la maladie est suivi visuellement, et les différences de pathogénicité entre les souches de *Pectobacterium* et *Dickeya* sont estimées en fonction des quantités de tissus macérés. La lecture est réalisée en mesurant quatre différents paramètres :

- Prélèvement et pesée des tissus pourris (gr) ;
- Mesure du volume d'eau nécessaire pour remplir les puits par une pipette graduée, correspondant à la quantité de tissus macérés (ml) ;
- Calcul de la longueur de la zone macérée (cm) ;
- Estimation de la profondeur de la dépression créée par la pourriture (cm).

La figure suivante résume les étapes entreprises pour les tests d'infection bactérienne :

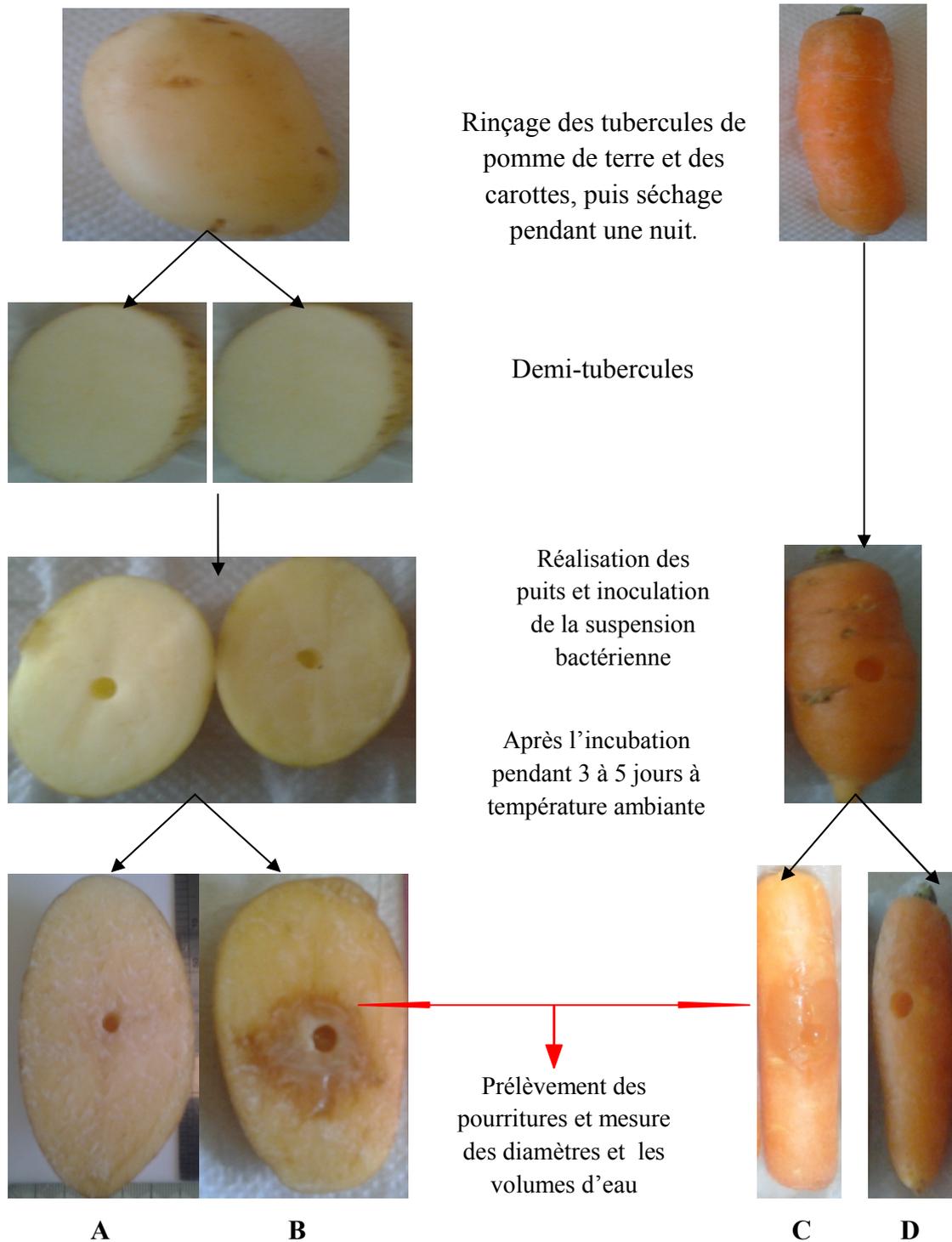


Figure 10 : Méthode d'inoculation sur pommes de terre et carottes

A : Témoin

B : Demi-tubercule inoculé

C : Carotte inoculé

D : Témoin

II-5) Dosage de l'activité pectate lyase

Les Pectate lyases clivent les liaisons osidiques α (1-4) du polygalacturonate, en libérant des oligogalacturonides insaturés qui présentent un maximum d'absorption à 230 nm. Le dosage des pectate lyases repose sur la détermination spectrophotométrique des oligogalacturonides libérés au cours du temps.

II-5-1) Produits et matériels utilisés pour le dosage

- Spectrophotomètre UV-Visible.
- Tampon PL (4°C): Tris HCl 0,1M pH 8,5, CaCl₂ 0,1 mM, PGA 0,05%.

Soit pour 100 ml :

- 10 ml Tris HCl 1M pH 8,5
- 50 μ l CaCl₂ 0,2 M
- 2 ml PGA à 2,5% (peser 2,5 g de PGA dans 100 ml tris HCl 0,1M pH 8,5).
- Ajouter environ 0,8 ml de soude 1N puis ajusté à pH 7 toujours avec NaoH.
- Diluer le CaCl₂ dans l'eau et le Tris : ajouter le PGA à la fin.

II-5-2) Protocole de dosage

- 0,5 g de tissus macérés sont mis dans 5 ml de bouillon nutritif en tube à essai, puis la culture incubé sous agitation à 27°C pendant 24 heures.
- Pour estimer la concentration bactérienne, 0,1 ml de chaque culture sont mises dans 0,9 ml de bouillon nutritif et la DO est mesuré à 600 nm.
- Le dosage de l'activité pectate lyase est réalisé après 2 séries de centrifugation à 12000 g pendant 3 minutes en prélevant 1ml de chaque culture. 50 μ l du surnagent sont mis dans 950 μ l de tampon PL, la DO est ensuite mesurée à 230 nm.

II-5-3) Calcul de l'activité spécifique

Ce calcul est basé sur la formule : $\Delta DO = \epsilon lc$

Où ϵ est le coefficient d'extinction molaire, l est la longueur de la cuve (1cm) et c la concentration en mole par litre.

Le coefficient d'extinction molaire pour ce dosage est de 5200 c'est-à-dire 1 μ mole/ml d'oligogalacturonide insaturés libérée par clivage du PGA donne un coefficient de 5,2 à 230 mg de PSB correspondent à une DO de 0,6 à 600 nm, on peut calculer l'activité spécifique

exprimée en nmoles de produits libérés /min/mg de PSB. Tout calcul fait, on utilise la formule :

$$AS = (0,412 \times \text{pente} \times \text{dilution enzyme}) / DO_{600} \quad \text{Où pente} = \Delta DO / \text{min}$$

La figure suivante illustre le protocole expérimental utilisé :

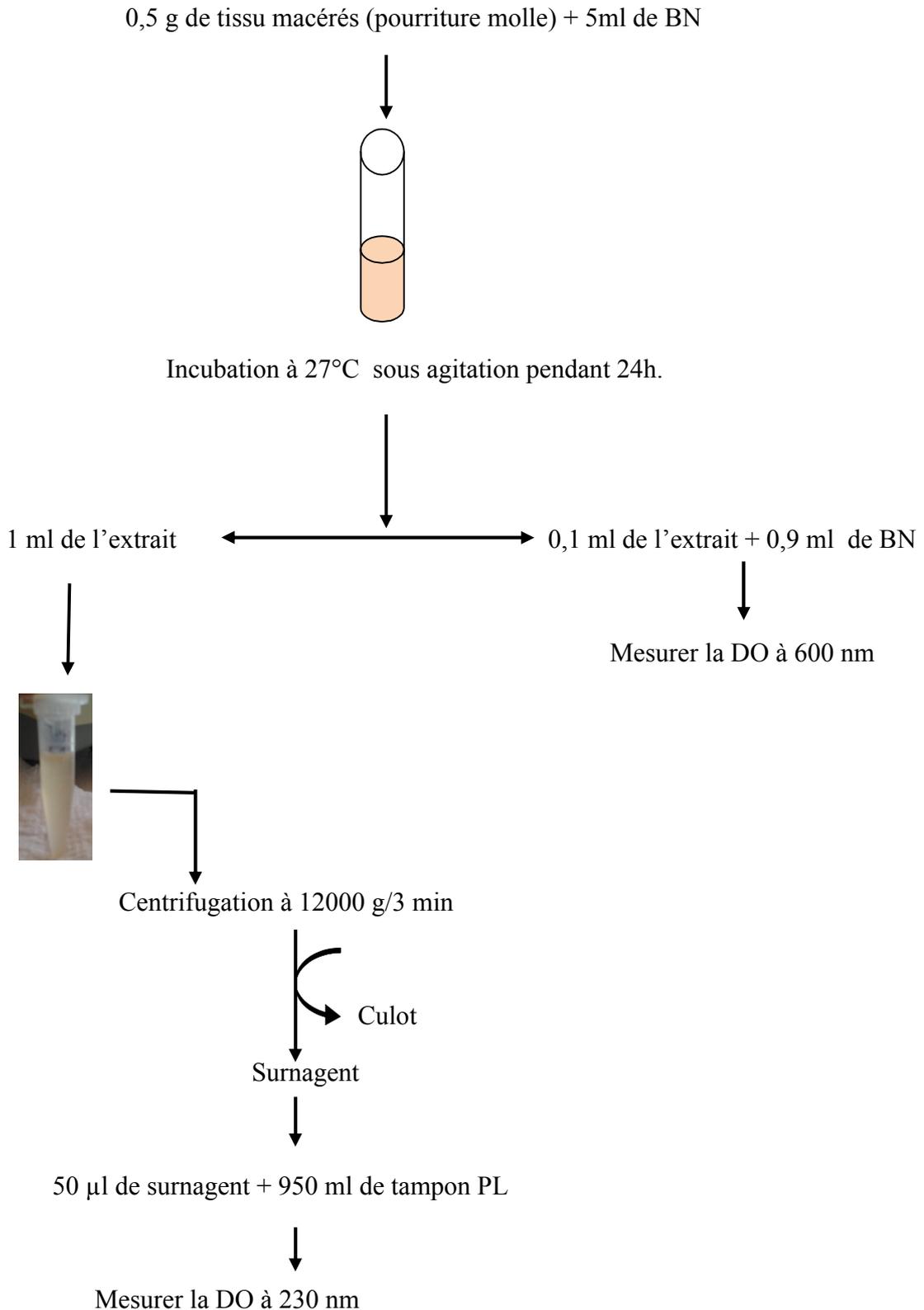


Figure 11 : Protocole de dosage de l'activité pectate lyase.

Résultats
et
Discussion

I) Revivification des souches

Après de multiples repiquages des souches bactériennes sur milieu King B, les colonies observées présentent des caractéristiques morphologiques conformes à celles de *Pectobacterium* et de *Dickeya* sp définies par Jean-François *et al* en 1981, à savoir une couleur blanche crémeuse, un aspect butyreux et légèrement iridescent.

II) Tests de confirmation des souches *Pectobacterium* et *Dickeya*

Pour la détermination de l'activité des *Pectobacterium/Dickeya*, des critères clés sont indispensables. Les plus importants sont la mise en évidence de la dégradation de la pectine sur milieu Sutton, l'activité nitrate réductase et l'utilisation de l'inuline, réduction du saccharose.

Tableau II : Résultats de la mise en évidence des souches.

Tests Souches	Activité pectinolytique sur Sutton	Présence de nitrate réductase	Dégradation de l' α -méthyl-glucoside	Utilisation de l'inuline	Utilisation de saccharose
<i>Pc</i>	+	+	-	-	-
<i>Pa</i>	+	+	+	-	+
<i>Ds</i>	+	+	-	-	-
<i>Dd</i>	+	+	-	-	-

II-1) Mise en évidence de l'activité pectinolytique

Concernant l'activité pectinolytique, les quatre espèces ont donné des résultats positifs sur milieu de Sutton, traduit par un changement de couleur de bleu-vert en jaune et une liquéfaction de milieu au bout de 48h d'incubation (fig. 12). Ce qui indique qu'elles possèdent une activité pectinolytique régulière, de même les 4 souches ont montré des résultats positifs aux autres tests.



Figure 12 : Activité pectinolytique sur milieu Sutton.

A : réponse négative B : réponse Positive

II-2) Réduction des nitrates en nitrites

L'apparition d'une couleur rouge sang après ajout des réactifs I et II est indicatrice de la présence de nitrites pour toutes les souches testées (Rahman *et al.*, 2012).



Figure 13 : Réduction des nitrates en nitrites

A : réponse négative B : réponse Positive

II-3) Utilisation des sucres (α -méthylique-D-glucoside, sucrose et inuline)

L'espèce *P. atrosepticum* a montré une réponse positive aux tests d'utilisation de l' α -méthylique-D-glucoside (Fig 14) et du sucrose (Fig 16) par l'apparition d'une couleur jaune due à l'acidification du milieu qui indique l'utilisation de ces sucres par les bactéries, alors que les autres souches n'ont pas métabolisé les deux sucres.

Tandis que pour l'inuline, l'ensemble des souches utilisées n'ont pas induits de réaction, à savoir absence de virage de couleur (Fig 15), ce qui est conforme aux résultats obtenus par Holt *et al.*, (1994), Hyman (1998), Sutra *et al* (2001) Ahmed en 2001, et Ni. L *et al.* , (2010).

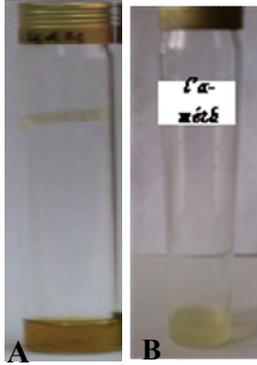


Figure 14: utilisation de L' α -méthyl-D-glucoside
A : réponse négative **B :** réponse Positive



Figure 15: Utilisation de l'inuline



Figure 16 : Réduction du saccharose

III) Dénombrement bactérien sur milieu solide

Les résultats du dénombrement cellulaire ont permis de déterminer la concentration de l'inoculum standard requise, en se basant sur la formule suivante :

$C = \frac{Ec}{(n1 + 0.1n2)} * (1/d)$ Avec :

- C : concentration bactérienne en UFC/mL
- Ec : nombre de colonies comptées sur toutes les boîtes
- n1 : nombre de boîtes retenues de la première dilution
- n2 : nombre de boîtes retenues de la deuxième dilution
- d : dilution

La concentration obtenue est de l'ordre de $X10^8$ cellules /ml (*P. atrosepticum* : $10,5 \cdot 10^8$ UFC/ml ; *P. carotovorum* : $13,2 \cdot 10^8$ UFC/ml ; *D. dadantii* : $7 \cdot 10^8$), tandis que pour *D. solani* nous n'avons pas pu déterminer la concentration.

IV) Test de pathogénicité

Dans le but d'évaluer l'activité de macération de notre collection de souches, ces dernières ont été testées sur demi-tubercules de pomme de terre, ainsi que sur carottes. Après 5 jours d'incubation, la lecture est réalisée en mesurant quatre facteurs (poids des pourritures, volumes d'eau, longueur et profondeur de la zone de macération) (Fig 17).

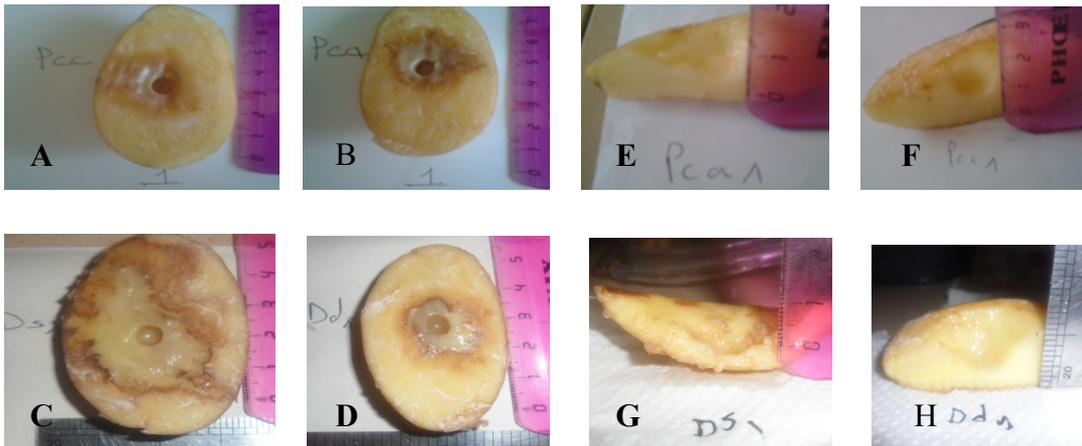


Figure 17 : Mesures des longueurs et des profondeurs des tissus pourris

(B,E) : Pa , (A ,F) : Pc , (C,G) : Ds , (D,H) : Dd

L'intensité des symptômes et la quantité de tissus macérés et pourris autour du site d'inoculation confirment la pathogénicité de ces bactéries.

Les symptômes de pourriture sont typiques pour chaque souche. Les souches de *P.atrosepticum* et *P.carotovorum* sont distinguables par l'apparence de la pourriture occasionnée. *P.atrosepticum* est caractérisée par une pourriture foncée et humide entourée d'un halo noir marquant une frontière avec les tissus sains. Tandis que les symptômes provoqués par *P.carotovorum* sont plutôt secs, de couleur marron clair, avec une surface nécrosée et plus réduite (Fig 18).

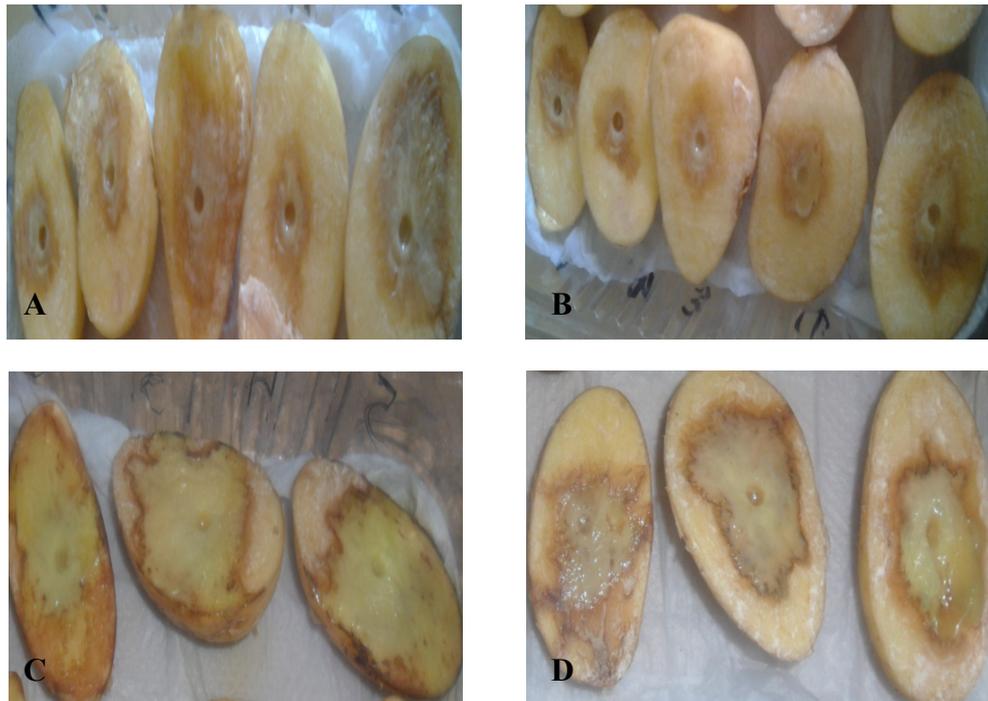


Figure 18: Symptômes de pourriture molle sur demi-tubercules de pommes de terre

A : *Pc*, **B:** *Pa*, **C :** *Ds*, **D :** *Dd*

Une variabilité pathogénique est observée au sein des différentes souches inoculées.

Pour la masse des tissus macérés, on remarque que la différence peut aller jusqu'à 4 fois entre les souches les plus pathogènes de *Dickeya* sp et les souches les moins virulentes de *Pectobacterium*, notamment l'espèce *P.atrosepticum* (Fig 19). Le même constat est observé pour les volumes d'eau mesurés, ou les volumes engendrés par les souches de *Dickeya* sont nettement plus élevés par rapport aux souches de *Pectobacterium* (Fig 20).

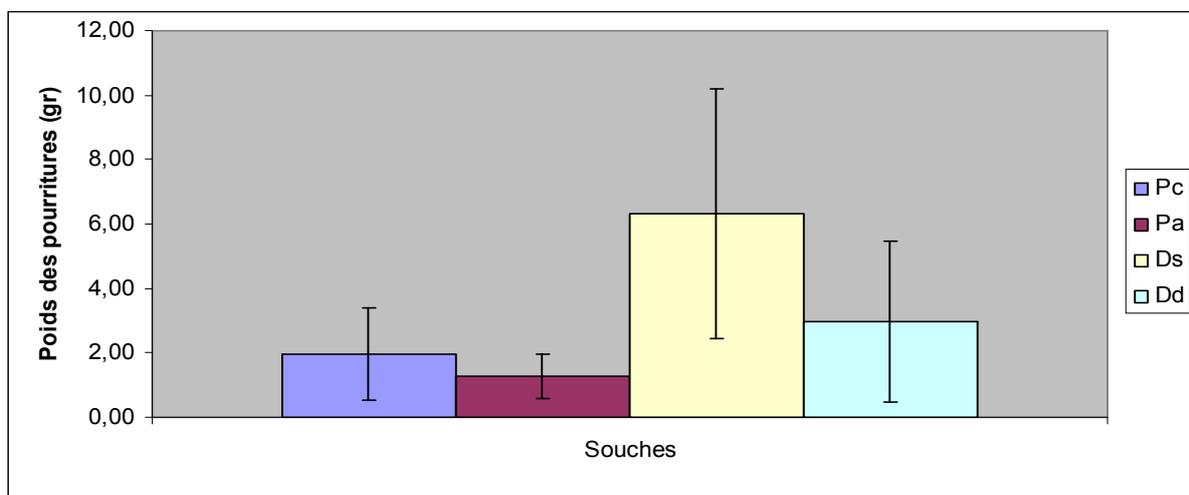


Figure 19 : Poids des pourritures sur pomme de terre (gr)

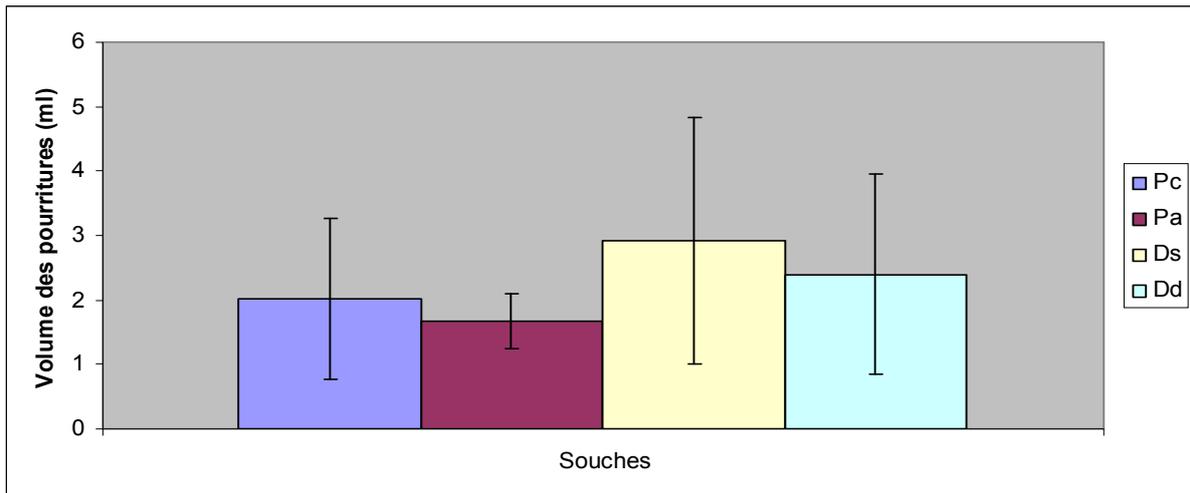


Figure 20 : Volume des pourritures sur pomme de terre (ml)

Pour les mesures des longueurs et profondeurs des pourritures, ce sont toujours les espèces *D. dadantii* et *D. solani* qui sont les plus agressives, tandis que *P. atrosepticum* est la moins virulente, avec des rapports pouvant aller jusqu'à 2 fois (Fig 21 et 22).

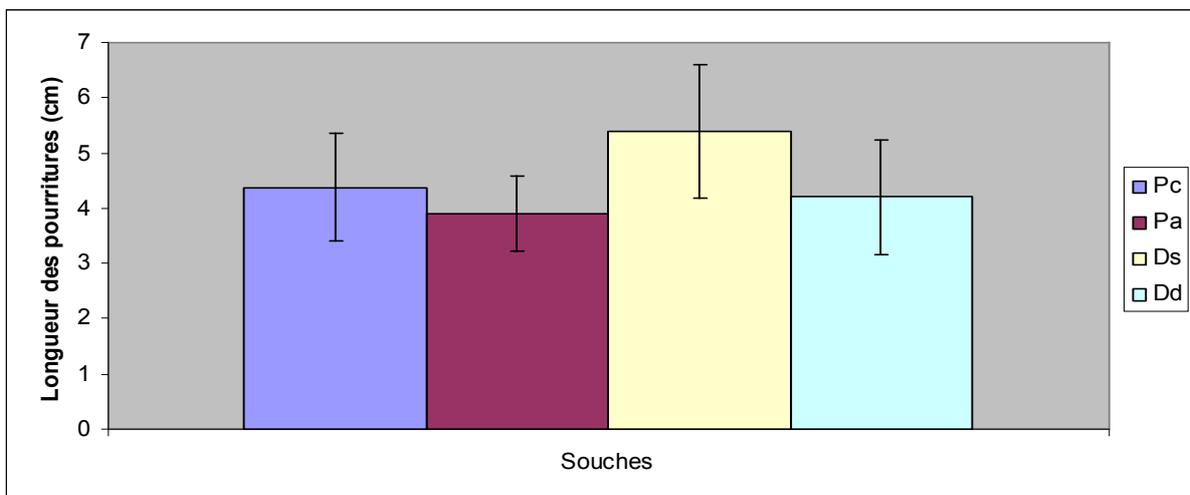


Figure 21 : longueur des pourritures sur pomme de terre (cm)

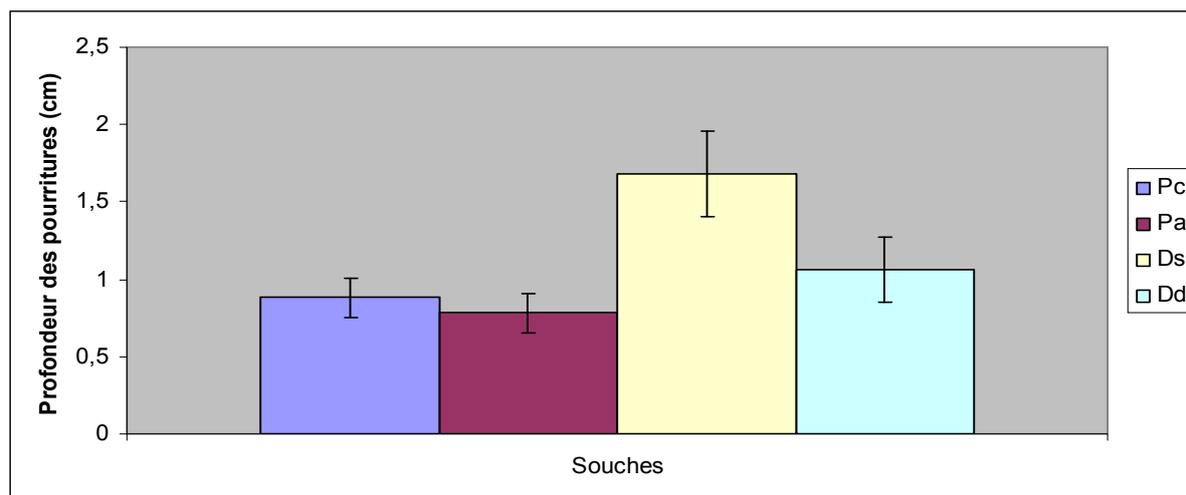


Figure 22 : Profondeur des pourritures sur pomme de terre (cm)

Sur carottes, les résultats sont similaires, en se référant aux données de Rukshima et Siddiqui en 2013, qui ont testé la virulence de trois souches bactériennes différents parmi lesquelles l'espèce *atrosepticum* sur carottes, ils ont démontré que chaque souche provoque une pourriture molle d'un degré plus élevé en inoculant les souches séparément qu'on les appliquant en association. On observe ainsi une prédominance du genre *Dickeya*, notamment l'espèce *solani*, ainsi qu'une virulence plus réduite pour les souches du genre *Pectobacterium* (voir Fig 23 jusqu'à 26).

Ainsi, nous sommes arrivés aux mêmes conclusions par rapport au test d'infection sur carottes, ce qui suggère que les souches de *Dickeya* sont nettement plus agressives que *Pectobacterium*.

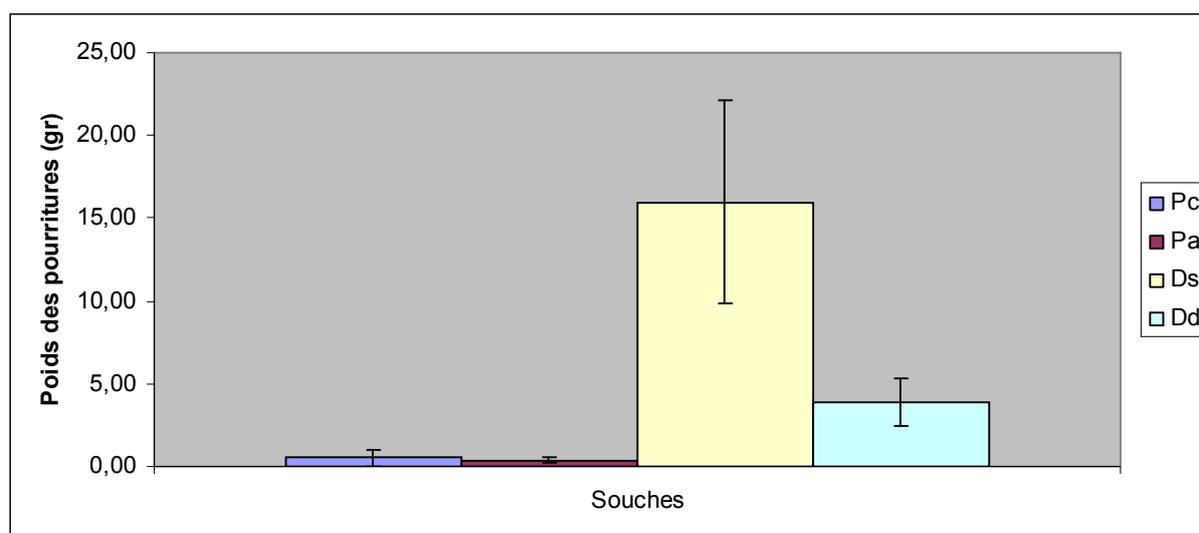


Figure 23: Poids des pourritures sur carotte (gr)

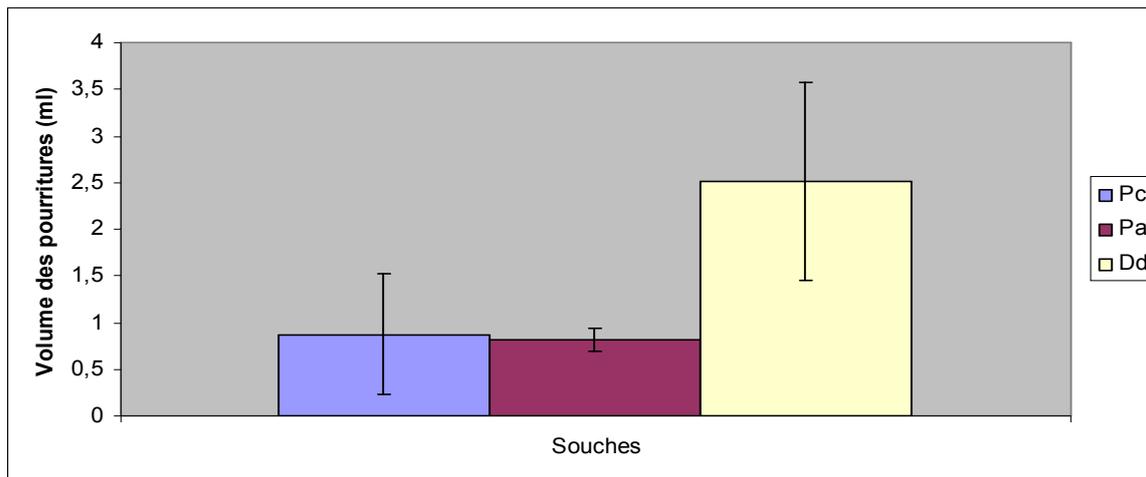


Figure 24 : Volume des pourritures sur carottes (ml)

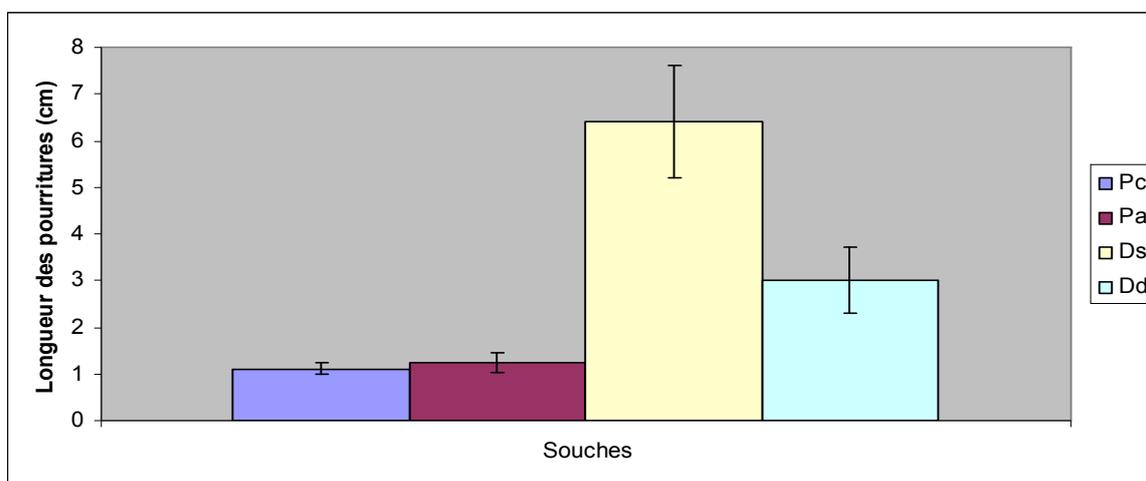


Figure 25 : Longueur des pourritures sur carottes (cm)

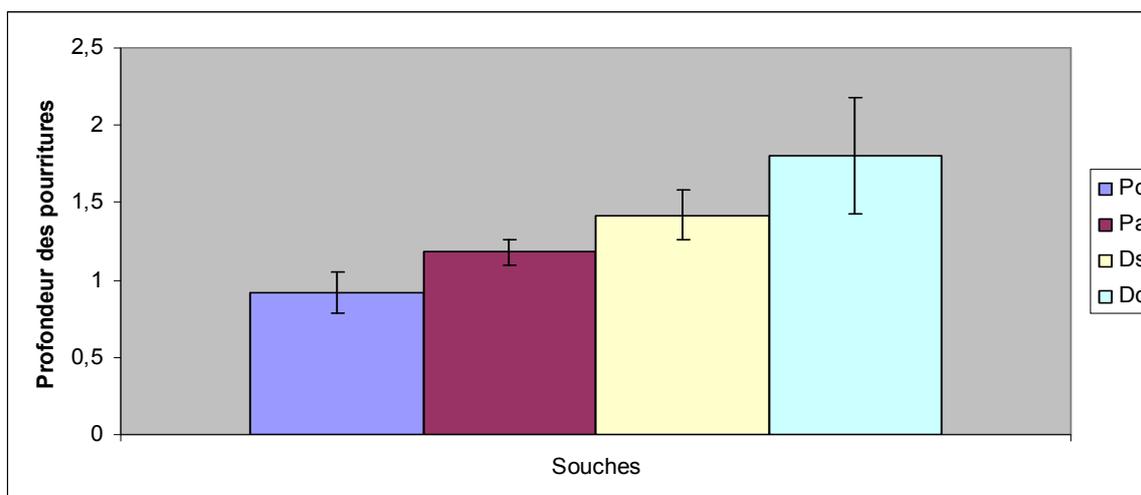


Figure 26 : Profondeur des pourritures sur carottes (cm)

Pour les résultats de mesure du volume d'eau occupé par la pourriture, la souche *solani* a occasionné des volumes plus importants que les autres souches au point que la mesure de volume été impossible car la plupart des carottes sont complètement consommées.

L'infection des échantillons de pommes de terre et carottes est réalisée dans le but de sélectionner les souches les plus agressives ainsi que pour mieux maîtriser la résistance des plantes hôtes aux maladies de la pourriture molle et de jambe noire. Par ailleurs, il existe une corrélation entre les tests de pathogénicité effectués sur pomme de terre et ceux qui réalisés sur carotte.

En comparant le degré de pathogénicité des souches entre la pomme de terre et carotte on constate que la pomme de terre qui est l'hôte spécifique de ces souches est plus sensible par rapport à la carotte qui présente une certaine résistance, et une moindre sensibilité.

Ces résultats sont confirmés par les travaux d'Ishii (1976) qui a montré que la susceptibilité des tissus végétaux à la macération enzymatique dépend en grande partie de la spécificité d'enzymes et non de la concentration en enzymes.

La mesure des facteurs de macération (longueur, profondeur et de volumes d'eau) est réalisée afin d'évaluer le degré de pénétration des tissus par les souches de *Pectobacterium* et *Dickeya* (Lapwood *et al.*, 1984).

D'une manière générale, et en vue des résultats obtenus, on constate que c'est la souche *D. solani* qui présente les taux d'infection les plus élevés, ceci à la fois pour tous les paramètres de mesures, (poids, volume, longueur et profondeur des pourritures), aussi bien sur tubercules que sur carottes, avec une capacité de macération plus importante sur pomme de terre. Suivi de près par *D. dadantii*. Alors que les souches de *Pectobacterium* sont les moins agressives car ayant enregistré les taux les plus bas. L'espèce *atrosepticum* affiche les valeurs de pourriture les moins élevées, *P. carotovorum* étant intermédiaire.

Par ailleurs, les demi- tubercules témoins ne présentent aucun symptôme de pourriture molle après 5 jours d'inoculation.

En analysant les différentes interactions plante-pathogène, on constate que pour les démentions des pourritures (la surface et la profondeur), les souches de *Dickeya* (*Ds*) et (*Dd*) sont les plus agressives par rapport à celle de *Pectobacterium* (*Pc*) et (*Pa*) respectivement. La même conclusion est faite pour le poids de pourriture et le volume d'eau mesuré.

Plusieurs études antérieures ont confirmé les résultats obtenus dans ce travail. Ainsi, Woltrers et Collins. (1994) ont démontré que les souches de *Dickeya* et *P.carotovorum* sont

beaucoup plus agressives par rapport aux souches de *P.atrosepticum* . De même, les travaux de Marquez-Villavicencio et Charkowski, (2011) qui ont testés la virulence de deux souches *Pc* et *Pa* sur 9 variétés de pomme de terre ont conclut que la souche *P.carotovorum* est bien plus agressive que la souche *P.atrosepticum* . Ainsi que les travaux de Michalik et al (1992) qui ont porté sur le degré de virulence des deux souches *P.carotovorum* et *P.atrosepticum* sur carottes et ont conclu que *P.carotovorum* est plus virulente que *P.atrosepticum*.

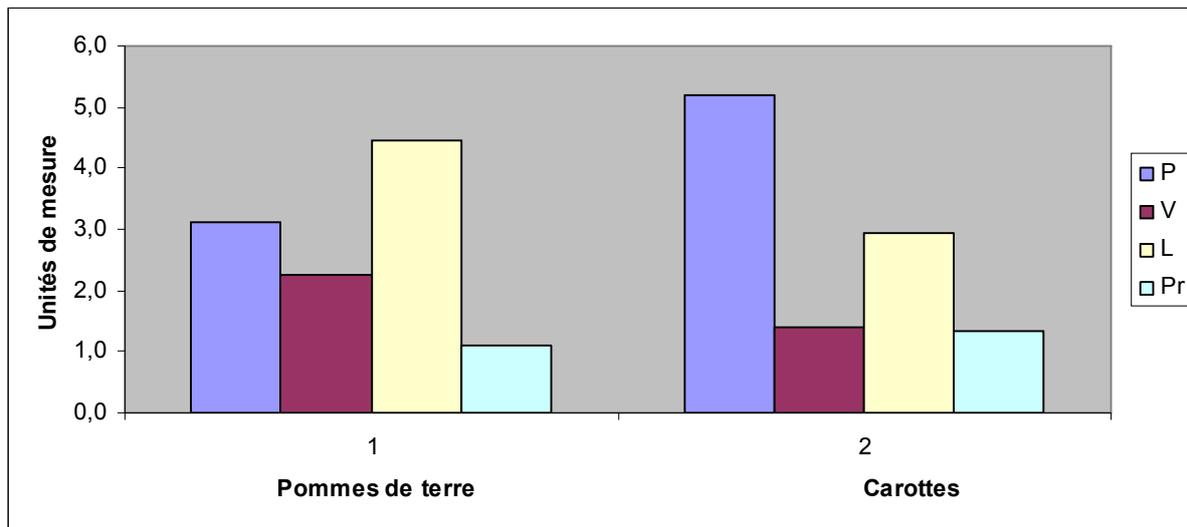


Figure 26: Comparaison du degré de pathogénicité entre pommes de terre et carottes

Allefs et al. (1996) ont aussi montré que chez 12 variétés de pomme de terre, la résistance à l'inoculation est plus prononcée pour les tubercules inoculés par *Dickeya* que ceux traités par *Pectobacterium (Pa)*.

Par ailleurs, les résultats du test d'inoculation peuvent être différents et opposés d'un auteur à un autre et d'une année à une autre. Ainsi Zimnoch-Guzawska *et al.* (1999) ont testé la résistance de 44 hybrides diploïdes de pomme de terre vis-à-vis des maladies de jambe noire et pourriture molle. Ils ont en conclu que les souches de *P.atrosepticum* sont les plus virulentes et produisent des quantités de pourritures généralement plus importantes que les souches de *Dickeya*, ceci dépend bien sur des conditions expérimentales, notamment les températures d'incubation.

En effet, la prédominance des espèces appartenant au nouveau genre *Dickeya* peut être expliquée par la température optimum de croissance entre 25°C, ce qui favorise l'activité de ces dernières. Le test de pathogénicité a été réalisé vers la fin du mois mars et début de mois avril, caractérisé par des températures ambiantes allant jusqu'à 30°C.

V) Dosage de l'activité Pectate lyase

La quantification de l'activité pectate lyase nous a permis de comparer l'activité enzymatique des souches de *Pectobacterium* et celles de *Dickeya*, cette dernière joue un rôle primordial dans la pathogénicité.

La méthode de dosage utilisé au cours de ce travail est basée sur la quantification des oligouronides insaturés. Ces derniers sont produits lors de la réaction de β -élimination, catalysée par la pectate lyase. La concentration des produits de dégradation est proportionnelle à la quantité de pectate lyase libérée dans le milieu.

Les résultats obtenus dans les figures 28 et 29 montrent que l'activité spécifique des souches de *Dickeya* peut varier de 56 jusqu'à 73 Unités Internationales (UI), par contre l'activité des *Pectobacterium* se situe entre 16 et 28 UI. Ce qui permet de conclure que les souches de *Dickeya* libèrent une quantité importante d'enzymes dégradatives de la paroi végétale provoquant ainsi la pourriture molle. Ces résultats confirment les précédents résultats du test d'infection, à savoir que les souches de *Dickeya* sp sont les plus agressives.

Corbaz (1990) a montré que les recombinants des clones de *Dickeya* capables de produire la polygalacturonique-acide transéliminase provoqueraient une macération des pétioles et céleri, des tubercules de pomme de terre et des racines de carotte, tandis que des clones mutants dépourvus de l'enzyme n'engendraient pas de symptômes de macération.

Se référant aux résultats des travaux de Lautier, 2007 qui a montré que l'agressivité de la bactérie phytopathogène *Dickeya*, est essentiellement liée à sa capacité à produire massivement différents facteurs de virulence dont les Pels,

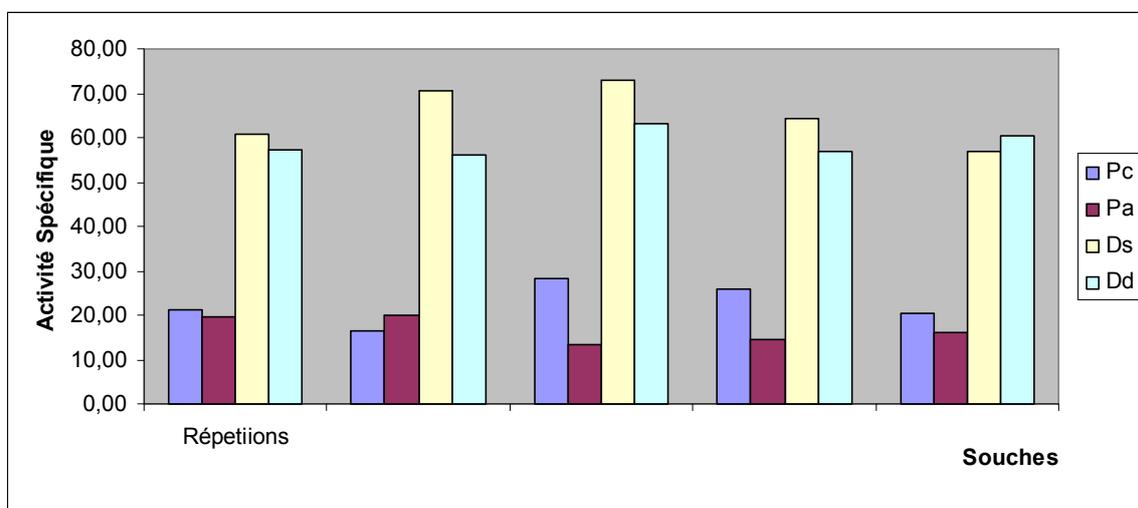


Figure 28 : Activité spécifique des Pels sur pomme de terre

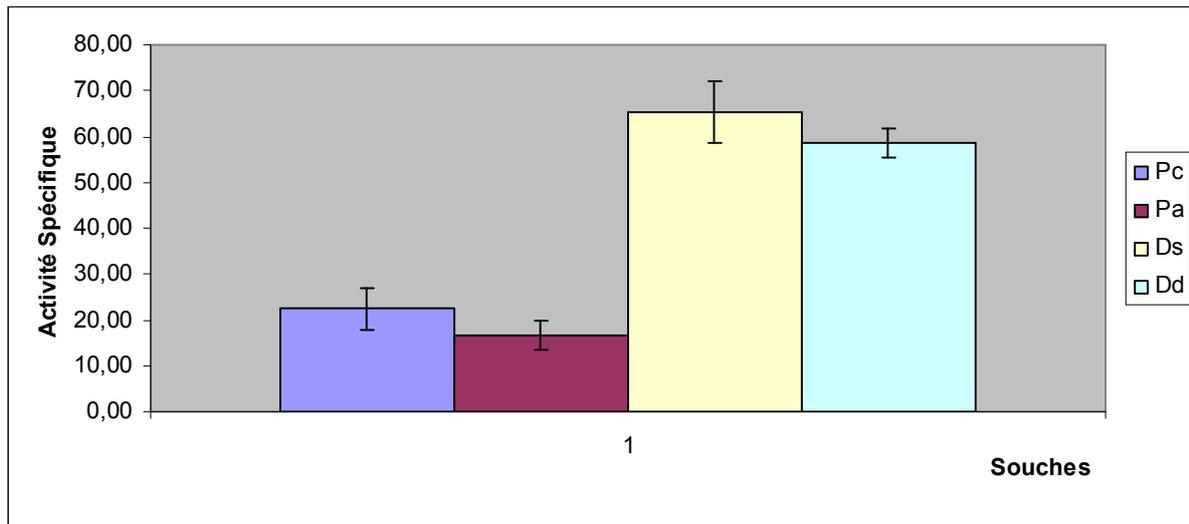


Figure 29: Activité spécifique moyenne Pels sur pomme de terre

Ces résultats sont conformes à celle obtenu par Dorel *et al.* (1992) qui ont établi la relation entre gravité de la maladie et activité des PeLs sur deux cultivars de pomme de terre dont l'un est sensible et l'autre résistant, il a été noté que l'intensité de la maladie est plus réduite dans les tissus des tubercules résistants, ceci est dû au fait que les tissus végétaux résistants possèdent divers facteurs qui pourraient inhiber l'activité PeL en inactivant les enzymes produites par les *Pectobacterium* tels que la polyphénol oxydase et peroxydase. L'autre possibilité est que la pectine de plantes résistantes est fortement méthylée et en tant que tel, ne pourrait pas être dégradée par les pectate lyases.

De même que pour le dosage de l'activité spécifique des PeLs sur carotte, on a constaté que les souches de *Dickeya* sécrètent plus des Pels que les souches de *Pectobacterium* (Fig 30 et 31). Nos résultats sont aussi en conformité avec ceux de Parthiban en 2012, qui a testé l'effet de quatre enzymes pectinolytiques dont les pectate lyases de trois souches de *P.carotovorum* sur des tissus de carottes, ils ont ainsi confirmé une corrélation entre activité enzymatique et symptômes de macération au cours de 5 jours d'infection.

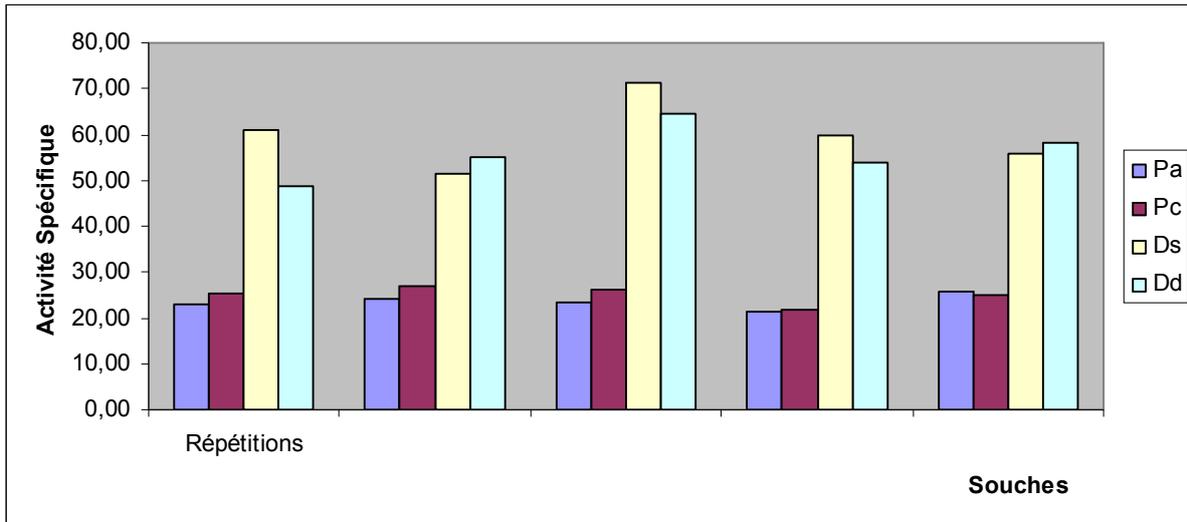


Figure 30 : Activité spécifique des Pels sur carotte

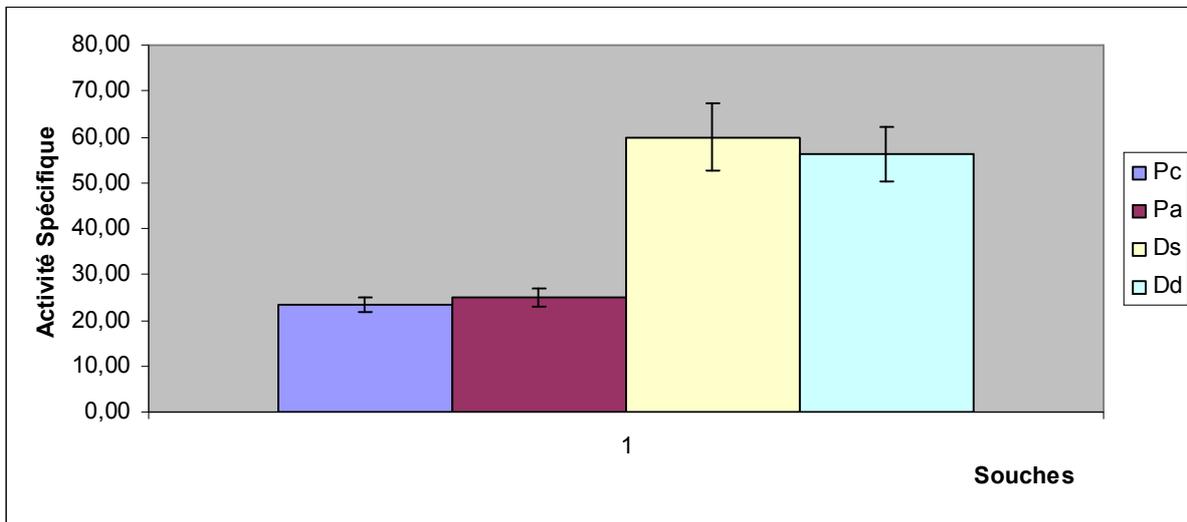


Figure 31 : Activité spécifique moyenne des Pels sur carotte

Cependant, l'activité spécifique des Pels est plus élevée chez les souches inoculées sur pomme de terre que celle réalisées sur la carottes confirment ainsi les résultats de Corbaz. (1990) qui à montré que l'activité enzymatique est plus le reflet du milieu que du pathgène.et les résultats d'Ishii (1976) qui conclu que les enzymes de macération tissulaire, leurs activité relative varie en fonction du tissu végétal et de la souche bactérienne.

Ces résultats mettent en évidence la relation proportionnelle existante entre l'activité enzymatique et l'intensité des symptômes de pourriture sur les tissus infectés de pomme de terre et de carotte.

Conclusion

Conclusion

Au terme de notre étude, la capacité des espèces *Pectobacterium* et *Dickeya* à induire les symptômes de pourriture molle sur tubercules de la pomme de terre et sur carottes a été mise en évidence. De même, que pour leur pouvoir de production d'enzymes pectinolytiques.

Les résultats du test de pathogénicité réalisés par inoculation nous ont permis d'estimer et d'évaluer le degré d'infectivité de notre collection de souches, en se basant sur l'intensité des symptômes générés. Ainsi, il s'avère que les souches de *Dickeya* sp, notamment l'espèce *D. solani* sont les plus virulents à la fois sur tubercules et sur carottes, car enregistrant les valeurs de pourritures les plus importantes que ça soit en termes de poids, volume, longueur et profondeur des zones macérées. Tandis que *Pectobacterium atrosepticum* est de loin la moins virulente. Cette différence de pathogénicité est due à la forte activité pectinolytique des espèces *Dickeya* par rapport aux *Pectobacterium*. Il a été observé aussi que les tubercules de pommes de terre sont plus susceptibles à la pourriture comparé aux tissus de carottes.

Par ailleurs, les résultats du dosage de l'activité pectate lyase (pels), par analyse spectrophotométrique, à partir des tissus macérés ont confirmé le potentiel hautement pectinolytique des souches de *Dickeya solani* puis *dadantii* dont la production de pels est nettement plus importante, corroborant et confirmant ainsi les résultats des tests d'inoculation. En outre, ces données ont établi une étroite corrélation proportionnelle entre degré de macération et activité enzymatique. Par ailleurs, le rôle des tissus végétaux, en particuliers, les tubercules de pommes de terre dans l'induction d'enzymes, a été clairement démontré.

Ces résultats mettent l'accent sur l'éventuelle différence observée entre les quatre souches lié d'une part, à leur capacité de synthèse d'enzymes de dégradation, et d'autres parts, à la spécificité leur interaction pathogène-hôte.

Pour terminer, cette étude se doit d'être complétée en élargissant la collection de souches testées, ainsi qu'en analysant d'autres types de pectinases. De même, il serait intéressant d'étendre notre échantillonnage à des cultures cible, autres que la pomme de terre et la carotte.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Ahmed Mamdoh Ewis Esmael. (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. Thèse de Doctorat en sciences Agriculture. Université Georg-August. Faculté des Sciences Agricoltes, 166p.

Allefs J H M, Van Dooijeweert, W, Prummel, L C P et Hoogendoorn, J (1996). components of partial resistance to potato blackleg caused by pectolytic *Erwinia carotovora* *subsp. Atroseptica* and *E. chrysanthemi*. Plant Pathology. **45**, 486-496.

Amraoui H, Sedra My H et Hamdaoui A. (2011). Etude des secretions protéiques et enzymatiques du *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, agent causal du Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. AL Awamia. **2**, 109-110.

Anna O, Avrova, Lizbeth J Hyman, Rachel L Toth, et Ian K Toth. (2002). Application of Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Taxonomy and Identification of the Soft Rot Bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Applied and Environmental Microbiology **68**, 1499–1508.

Apoorvi Chaudhri et Vuppu Suneetha. (2012). Microbially Derived Pectinases. School Of Biosciences and Technology, VIT University, India, pp. 01-05.

Arunachalam C et Asha S (2010). Pectinolytic Enzyme - A Review of New Studies. Advanced Biotech Journal – Online. 5p.

Audigié C et Zonszain F (1995). Biochimie métabolique. Edition : ISBN. 272p.

Augustin MOH A (2012). Etude des facteurs écologiques influençant la croissance et le développement des *pectobacterium* spp infectant les tubercules de pomme de terre, Thèse de Doctorat en sciences Agronomiques et ingénierie biologique. Academie universitaire wallonie-europe université de liege. 110 p.

B

Bain R A, Pérombelon M C M, Tsrer L et 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.

Bajpai Pratima. (1999). Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. *Biotechnol. Prog.* **15**, 147-157.

Baldwin A Elizabeth et Russell Pressey. (1989). Pectic Enzymes in Pectolyase Separation, Characterization, and Induction of Ethylene in Fruits. *Plant Physiol.* **90**, 191-196.

Banks E (2006). Des maladies qui réduisent les rendements dans les pommes de terre, carnet agricole. **519**, 826-4047.

Basham H G et Bateman D F. (1975). Relationship of cell death in plant tissue treated with a homogeneous endopectate lyase to cell wall degradation. *Physiological Plant Pathology* **.5**, 249-262.

Bekhouche F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : Isolement et Identification biochimique. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. These de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie. Universite de Mentouri Constantine institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires.149p.

Bhat M K . (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances.* **18**, 355–383.

C

Chibane A. (1999). Techniques de la production de la pomme de terre au Maroc.
Bulletin de Transfert de Technologie en Agriculture. p 4.

Combo M Aguedo M et Paquot M. (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications Possibles. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **15**, 153-164.

Corbaz Roger. (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Edition:ISBN , Suisse. 285p.

Czajkowski Robert, Perombelon M C M, Johannes A van Veen et Jan M van der Wolf. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review, Plant Pathology. pp, 21-43.

Czajkowski Robert. (2011). Ecology and control of *Dickeya* spp.in potato, Thèse de Doctorat en biologie,Leiden University, Institute of Biology. 23-208.

D

Darpoux R et Debelley M. (1967). Les plantes sarclées. Edition. J.B. Baillière et fils france.
Collection d'Enseignement Agricole. 307p.

De Boer S H . (2004). Blackleg of potato. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-2004-0712-01.

Dorel C, Lojkowska E et Robert-Baudouy J. (1992). Reduced activity of *Erwinia chrysanthemi* pectinases after inoculation of potato plants resistant to soft rot. Plant Pathogenic Bacteria, Versailles (France), Ed. INRA, Paris (Les Colloques, n066), pp 627-632.

Dupuis B, Michelante D, Garcia-Albeniz N et 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.p.40.

E

Elizabeth A, Baldwin and Russell Pressey. (1989). Pectic Enzymes in Pectolyase, Separation, Characterization, and Induction of Ethylene in Fruits. *Plant Physiol.* **90**, 191-196.

Elphinstone John G. (1991). Soft rot and blackleg of potato, *Erwinia ssp.* International Potato Center. Lima, perau. 18p.

F

FAO. (2011). FaoStat Database. Available from <http://faostat.fao.org>.

Favela-Torres Ernesto, Tania Volke-Sepúlveda et Gustavo Viniegra-González. (2006). Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 221–227.

G

Grison Claude. (1983). La pomme de terre, caractéristiques et qualités alimentaires. Edition : APRIA. Paris. 291 p.

H

Hames. B.D, Hooper. N. M et Houghton. J. D. (2000). Biochimie, édition Berté, p. 77.

Heim. M. Roger. (1972). Enzymes pectinolytiques de souches de *Phytophthora* de Bary. Parasites de cultures tropicales. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. **273**, 1805-1808.

Henz Gilmar Paulo. Francisco José Becker Reifschneider et Valmir Duarte. (2006). *Erwinia chrysanthemi*: pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil. **41**, 1567-1571.

Hélias V. (1999). Mise au point d'outils de caractérisation et de détection d'*Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* agent de la jambe noire et de la pourriture molle de pomme de terre. Application à l'étude de la transmission de la bactérie, via la plante, du tubercule mère vers les tubercules fils en cours de culture. Thèse de Doctorat en Biologie et Agronomie. Rennes, France, 190p.

Hélias V. (2008). *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. De la pomme de terre .nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomologie, épidémiologie et prophylaxie. Cahiers aricultures. **17**, 394-354.

Hélias. V, Criza F et Montfort, F. (2005). Evaluation of a new polypectate formulation for isolation of soft rot pectobacterium on CVP medium. European Association for Potato Research, Bilbao 17-22.

Holt J G, Krieg N R, Sneath P, Staley H A et Williams S T. (1994). Bergey's Manual oh Determinative Bacteriology. 9th edition Williams & Wilkins, 787p.

Hutton Sand . (2009). Bacterial Rots of Potato Tubers. Plant disease factsheet. The food and Environnement Research Agency.p.4.

Hyman L J, Toth I K et Pérombelon M C M (1998). Isolation and identification Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Pérombelon, M. C. M. and Van Der Wolf, J. M. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication.10. 82 p.

I

Ibrahim M, Jouan B, Samson R, Poutier F et Saily M. (1978). Prospect of a pathogenicity test concerning *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on half tubers. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers pp. 591-602.

Ishii S. (1976). Enzymatic Maceration of Plant Tissues by Endo-Pectin Lyase and Endo-Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. Phytopathology. **66**, 281-289

J

Jean-François Daniel, Bernard Boher et Franz Kohler. (1981). Les maladies bactériennes du manioc (*Manihot Esculenta* Crantz) en république populaire du Congo et en république Centrafricaine. *Agronomie*. **1**, 751-758.

Johnson Dennis A, Jeremiah K S Dung, Thomas F Cummings et Brenda K Schroeder. (2011). Development and Suppression of Aerial Stem Rot in Commercial Potato Fields. *Plant Disease*. **95**, 285-291.

Jouzier E. (2005). Solanacées médicinales et philatélie. *Bulletin de la Société de Pharmacie. Bordeaux*.**144**, 311-332.

L

Lacroix C et Vézina L. (2003). Technique de laboratoire pour le diagnostic des bactéries phytopathogène. *Laboratoire de diagnostic en phytoprotection pour la détection et l'identification des bactéries phytopathogènes*. 50p.

Ladjouzi R. (2007). Recherche et identification des *Pectobacterium*, agents de la pourriture molle sur différentes plantes hôtes : pomme de terre, tomates et carottes. Thèse de Magister en Microbiologie Appliquée. Université de Bejaia, Faculté de Science de la Nature et de la Vie, Algérie ,72p.

Lallemand Mathilde. (2010). Dissection des interactions entre les composants du système de sécrétion de type II chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). Thèse de Doctorat en Biologie, L'institut national des sciences appliquées de Lyon, 310p.

Lapwood D H, Read P J et Spokes J. (1984). Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora*. *Plant Pathol*. **33**, 13- 20.

Latour X, Faure D, Diallo S, Cirou S, Smadja B, Dessaux Y et Orange N. (2008). Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium spp.* (*Erwinia carotovora*). *Cahier Agricultures*.**17**, 355-360p.

Laurent P, Buchon L, Burini J F et Orange N. (2001). Low pH and cold temperature combine to limit growth and pectate lyase production by the psychrotrophic bacterium *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* MFCL0. *Biotechnology Letters* **23**,753–756.

Lautier T. (2007). Rôle de la protéine associée au nucléoïde Fis dans le contrôle de la virulence chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthémie*. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 200p.

Lemberg G, Körner. R, Christensen. T M I E, Roepstorff P et Mikkelsen J D. (2000). Analysis of pectin structure. I. Analysis of different deesterification mechanisms by enzymatic fingerprinting using endo-pectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydrate Research*, **327**, pp: 293-307.

Liao C-H. (1989). Analysis of pectate lyases produced produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Applied and Environment Microbiology*. **55**, 1677-1683.

M

Marquez-Villavicencio Maria del Pilar et Amy O Charkowski . (2011). Soft Rot Disease Severity Is Affected by Potato Physiology and *Pectobacterium* taxa. *Plant Disease*. **95**, 232-241.

Mcfeters. R F Hankin L et Lacy G H. (1992). Pectinolytic and pectolytic microorganisms, American Public Assiation, p 213-218.

Mehri-Kamoun Raoudha. (2001). Effet de la Pectolyase Y-23 et de la cellulase RS sur le rendement en protoplastes viables de *Prunus cerasus* L. “Montmorency” *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **5**, 99–104

Michalik Barbara, Philipp W Simon et Warren H. Gabelman. (1992). Assessing Susceptibility of Carrot Roots to Bacterial Soft Rot .*Hortscience*. **27**, 1020-1022.

N

Ni L, Guo L, Custers J B M et Zhang L. (2010). Characterization of calla lily soft rot caused by *pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* zt0505: bacterial growth and pectate lyase activity under different conditions. *Journal of Plant Pathology* .**92**, 421-428.

Nihan Göğüş. (2006). Effect of the morphology of *Aspergillus sojae* on pectinase enzyme and the optimization of fermentation conditions. School of Engineering and Sciences of Azmir Institute of Technology .74p.

O

Olsen N, Miller J and Nolte P. (2006). Diagnosis and Management of Potato Storage Diseases. University of Idaho Extension, Moscow. 8p.

Oyeleke S B, Oyewole, O A, Egwim, E C, Dauda, B E N et Ibeh, E N. (2012).

Cellulase and Pectinase production potentials of *Aspergillus niger* isolated from corn cob, Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, **5**,78 – 83.

P

Parthiban V K, Prakasam V et Prabakar K. (2012). Enzymatic changes in carrot roots induced by *erwinia carotovora* var. *carotovora*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. **3**, 246-252.

Pérombelon M C M et Kelman A. (1980). Ecology of the soft rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology* .**18**, 361-87.

Pérombelon M C M et Kelman A. (1987). Blackleg and other diseases caused by soft rot *Erwinia*: proposal for revision of terminology. *Plant Disease*.**71**, 283-285.

Pérombelon M C M. (2002). Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of Pathogenesis. *Plant Pathology*. **51**, 1–12.

R

Rahman M M, Eaquib Ali M, Khan A A, Hashim U, Akanda A M et Hakim M A. (2012). Characterization and identification of soft rot bacterial pathogens in Bangladeshi potatoes. *African Journal of Microbiology Research*. **6**, 1437-1445.

Raoudha Mehri-Kamoun. (2001). Effet de la Pectolyase Y-23 et de la cellulase RS sur le rendement en protoplastes viables de *Prunus cerasus* L. "Montmorency". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **5**, 99–104.

Rondan-Sanabria Gerby Giovanna, Tatiana da Costa Raposo Pires et Flavio Finardi Filho. (2006). Preliminary approach to detect amylolytic and pectinolytic activities from maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **42**, p 48- 59.

Rousselle P, Robert Y et Crosnier J C. (1996). La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Editions: INRA-ITCF. Paris. 607p.

Rukshima Nesha et Siddiqui Zaki. (2013). Interactions of *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* and *Meloidogyne javanica* on the Disease Complex of Carrot. *International Journal of Vegetable Science*.17p.

S

Saguez J. (2007). Dérégulation des activités chitinasés : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides. Thèse de Doctorat en Science et Santé. Université de Picardie, Faculté des Sciences, Jules Verne, 148p.

Salmaan M Ikbaal Abdul Hamed et Alyaa M. (2010). Purification and characterization of extra cellular Pectin lyase from *Erwinia carotovora* isolate from spoiled potatoes. **6**,383-397.

Schaerer Santiago et Dupuis Brice. (2010). Nouvelles pratiques pour contrer la jambe noire. *Production Vegetale. Revue UFA* .p. 29

Smadja B, Latour X et Faure D. (2004) Involvement of *N*-acylhomoserine lactones throughout the plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol Plant Microbe Interact* . **17**, 1269-78.

Steven R Herron, Jacques A E Benen, Robert D. Scavetta, Jaap Visser, et Frances Journak. (2000). Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**, 8762–8769.

Sutra Laurent, Christen Richard, Bollet Claude, Simoneau Philippe et Gardan Louis. (2001). *Samsonia erythrinae* gen. nov., sp. nov., isolated from bark necrotic lesions of *Erythrina* sp., and discrimination of plant-pathogenic *Enterobacteriaceae* by phenotypic features. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**, 1291–1304.

V

Van Vaerenbergh mail Johan, Steve Baeyen, Paul De Vo set Martine Maes. (2012). Sequence Diversity in the *Dickeya fliC* Gene: Phylogeny of the *Dickeya* Genus and TaqMan® PCR for '*D. solani*', New Biovar 3 Variant on Potato in Europe. *Biosearch Biotechnologie*. **7**, 1310-1371.

W

Wilfred D Kepseu, Jacques-Alexandre Sepulchre, Sylvie Reverchon et William Nasser. (2010). Towards a quantitative modeling of the synthesis of the pectate lyases, essential virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Dickeya dadantii* virulence regulatory network ,p.21.

Włodarczyk A. (2010). Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). Thèse de Doctorat en Microbiologie Environnementale. Institut National des Sciences Appliqués de Lyon, 152p.

Wolters P J and Collins W W. (1994). Evaluation of diploid potato clones for resistance to tuber soft rot induced by strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* and *E. chrysanthemi*. *Potato Research*. **37**, 143-149.

Y

Yahiaoui-Zaidi-R. (2004). Contribution à l'étude des *Erwinia* pectinolytiques isolées chez *solanum tuberosum* L. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Ferhat Abbas-Sétif, Algérie, 187p.

Yagi S. (2010). Étude diagnostique de la filière pomme de terre dans les communes de Douchi, Koré Maïroua et Soukougoutane. Mémoire de Maîtrise en Biologie. Université Abdou Moumouni de Niamey Niger.81p.

Z

Zimnoch-Guzawska E, Lebecka R et Pietrak J. (1999). Soft rot and blackleg reactions in diploid potato hybrids inoculated with *Erwinia spp.* American Journal of Potato Research **76**, 199-207.

Annexes

Annexe I

Tableau I: Symptômes et dégâts des principaux ravageurs et maladies de la pomme de terre
(Chibane, 1999)

Maladies ou ravageurs	microorganismes	Symptômes et dégâts
Maladies fongiques		
Mildiou	<i>Phytophthora infestans</i>	<p>Feuillage : apparition de taches jaunâtres qui brunissent rapidement. Un duvet fin, blanc grisâtre dissémine les spores. Les tiges attaquées noircissent, et la plante est détruite en quelques jours.</p> <p>Tubercule : taches diffuses brunâtres sur l'épiderme. La chair présente des zones à texture granuleuse de couleur brun-rouille, des pourritures secondaires s'installent par la suite.</p>
Alternariose	<i>Alternariasolani</i>	<p>Feuillage : taches arrondies, brunes à noires, avec des cercles concentriques.</p> <p>Tubercule : plages brunes légèrement déprimées à la surface</p>
Rhizoctone	<i>Rhizoctoniasolani</i>	<p>Tige : apparition de plusieurs petits tubercules aériens de couleur violacée. Nécrose des racines et pourriture du collet</p> <p>Tubercule : formation de sclérotés noirs de forme irrégulière, l'épiderme se trouvant au-dessus des sclérotés n'est pas affecté</p>
Pourriture rose	<i>Phytophthora erythroseptica</i>	<p>Tubercule : taches brunâtres, lenticelles colorées en noir. Tubercules tendres et élastiques au toucher.</p>

Gale argentée	<i>Helminthosporium solani</i>	Tubercule : taches claires, argentées et irrégulière, déshydratation des tubercules et formation de conidiophores noirs sur les parties mortes.
Maladies bactériennes		
Jambe noire et pourriture molle	<i>Pectobacterium</i> spp.	Tubercule : dépressions circulaires à partir desquelles la pourriture peut se répandre rapidement. Les tissus infectés sont humides et prennent une couleur allant du blanc au marron crème.
Pourriture brune	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Tubercule : un liquide visqueux suinte à travers les yeux des tubercules fortement atteints. Une section transversale du tubercule montre la décoloration des faisceaux vasculaires.
Gale commune	<i>Streptomyces scabies</i>	Tubercule : pustules à la surface et parfois en profondeur du tubercule.
Viroses		
Virus de l'enroulement	PLRV	Feuillage : enroulement et jaunissement des feuilles qui prennent un port érigé ; Tubercule : Durcissement du tubercule mère.
Mosaïque (bigarrure)	Virus Y (PVY)	Feuillage : les feuilles deviennent cassantes, se plient et se dessèchent, la croissance de la plante est ralentit et le port est affaissé.
Virus X	PVX	Feuillage : décoloration en forme de mosaïque légère entre les nervures.

Insectes et ravageurs		
Acarien des racines	<i>Rhizoglyphusechi nopus</i> (<i>R. robini</i>)	Tubercule : tubercules fendillés avec des couloirs remplis d'une farine granuleuse jaune-brun.
Puceron vert du pêcher	<i>Myzuspersicae</i>	Déformation du limbe et écoulement de miellat sur les feuilles entravant ainsi l'assimilation.
Teigne de la pomme de terre	<i>Phthorimaea operculella</i>	Feuillage : les larves vivent en mineuse au niveau des feuilles, surtout les plus basses et les plus larges. La plante flétrit et meurt. Tubercule : les larves creusent des galeries à l'intérieur des tubercules qui constituent des ports d'entrée pour d'autres contaminants.
Nématode à kyste blanc de la pomme de terre	<i>Globoderapallida</i> (<i>Heteroderapallida</i>)	Les premiers symptômes sont des retards de croissance et une végétation rabougrie. Feuillage : rapetissement des feuilles et des pousses et enroulement des folioles, les racines infectées présentent des nœuds ou des galles. Tubercule : les tubercules présentent des galles et se déforment perdant ainsi leurs qualités commerciales.

Annexe II

La plupart des milieux de cultures sont stérilisés à l'autoclave, à une température de 120°C pendant 20 minutes.

II-1) Milieux gélosés pour la culture et la conservation des *Pectobacterium* et *Dickeya*

Milieu de King B (pH 7,2)

composition	Par litre
Protéose peptone	20 g
K ₂ HPO ₄	1,145 g
MgSO ₄	1,5 g
Glycérol	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	Ajusté à 1000 ml

Milieu LB (pH 7,2)

Composition	Par litre
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	Ajusté à 1000 ml

Bouillon LP

Composition	Par litre
Peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillée	Ajusté à 1000 ml

II-2) Milieu utilisés pour l'identification biochimique des *Pectobacterium*

Milieu de Sutton (7,2)

Composition	Par litre
NaOH 1N	6 à 10 ml
CaCl ₂ , 2H ₂ O (10%)	6 à 21 ml
Bleu de bromothymol (0,5%)	6 ml
Extrait de levure	5 g
Polypectate de sodium	15 g
Eau distillée	Ajusté à 1000 ml

Milieu Inuline

Composition	Par litre
Tryptone	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Extrait de levure	0,5 g
Rouge de phénol	0,18
Inuline	3 g
Eau distillée	Ajusté à 1000 ml

Milieu SRS (pH 7,2)

Composition	Par litre
Bacto-peptone	10 g
Extrait de bœuf	5 g
Saccharose	40 g
Eau distillée	Ajusté à 1000 ml

Réactif de Benedict

Solution A: C₆H₅Na₃O₇·2H₂O 173 g
 Na₂CO₃·10H₂O 269,6 g
 Eau distillée 800 ml

Dissoudre en chauffant filtrer

Solution B : CuSO₄·5H₂O 17,3 g
 Eau distillée 100 ml

Verser la solution A dans la solution B et compléter à 1000 ml.

Milieu α - méthyl-D-glucoside (pH 7,0-7,2)

Composition	Par litre
Peptone	10 g
NaCl	5 g
A-méthyl-D-glucoside	10g
Bleu de bromothymol (0,5%)	6 ml
Eau distillée	Ajusté à 1000ml

Milieu eau peptoné nitraté (pH 6,8-7,2)

Composition	Par litre
Peptone	10g
KNO ₃	1g
Eau distillée	Ajusté à 1000ml

Réactifs de révélation de l'activité nitrate réductase

Composition	Par litre
Réactif I	
Acide sulfanilique	8 g
Acide acétique	1000ml
Réactif II	
Acide α - naphtylique	5g
Acide acétique	Ajusté à 1000ml

Annexe III**III-1) La longueur de la surface occupée par la pourriture molle en (cm)**

Tableau II : pour la pomme de terre.

<i>Répétition souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	3,4	3,5	5,0	3,0
R ₂	3,7	3,1	3,5	3,2
R ₃	5,9	4,5	6,2	4,5
R ₄	4,2	3,7	5,6	5,0
R ₅	4,7	4,7	6,6	5,3

Tableau III : pour la carotte.

<i>Répétition souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	1,2	1,5	5,0	2,5
R ₂	1,1	1,2	5,5	2,0
R ₃	1,2	1,3	8,0	3,5
R ₄	0,9	1,3	6,5	3,6
R ₅	1,1	0,9	7,0	3,4

III-2) Poids de pourriture molle en (g)

Tableau IV: pour la pomme de terre.

<i>Répétition souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	0,641	1,046	3,605	0,744
R ₂	1,143	0,435	1,808	0,395
R ₃	3,068	1,055	6,087	2,831
R ₄	1,000	1,449	8,684	6,291
R ₅	3,873	2,356	11,490	4,541

Tableau V: pour la carotte.

<i>Répétition souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	0,537	0,608	9,824	2,436
R ₂	0,297	0,362	12,064	3,114
R ₃	1,400	0,404	25,860	5,518
R ₄	0,112	0,341	15,602	2,901
R ₅	0,245	0,104	16,541	5,405

III-3) Le volume occupé par la pourriture molle en ml

Tableau VI : pour la pomme de terre.

<i>Répétition souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	0,9	1,8	2,25	1,1
R ₂	1,2	1,1	1,2	0,9
R ₃	2,7	2,0	1,2	1,9
R ₄	1,4	1,4	5,0	4,0
R ₅	3,9	2,1	4,9	4,1

Tableau VII: pour la carotte.

<i>Répétition souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	0,8	1,0	//////////	2,0
R ₂	0,55	0,7	//////////	2,8
R ₃	2,0	0,8	//////////	2,2
R ₄	0,6	0,85	//////////	1,4
R ₅	0,4	0,7	//////////	4,2

III-4) Profondeur de la pourriture molle en centimètre

Tableau VIII : pour la pomme de terre.

<i>Répétition souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	0,7	0,9	1,3	1,2
R ₂	1,0	0,9	1,5	1,1
R ₃	0,8	0,7	1,8	0,9
R ₄	1,0	0,8	2,0	0,8
R ₅	0,9	0,6	1,8	1,3

Tableau IX : pour la carotte.

<i>Répétition souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	1,0	1,3	1,5	2,2
R ₂	0,9	1,2	1,3	2,0
R ₃	1,0	1,1	1,5	1,4
R ₄	1,0	1,1	1,2	1,4
R ₅	0,7	1,2	1,6	2,0

III-5) Dosage de la suspension bactérienne par l'absorption à l'uvée visible à une longueur d'onde de 600 nm

Tableau X: pour la pomme de terre

<i>Répétition</i> <i>souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	0,140	1,191	0,617	0,632
R ₂	0,160	1,258	0,545	0,640
R ₃	0,136	1,937	0,517	0,554
R ₄	0,110	1,259	0,572	0,631
R ₅	0,159	1,340	0,654	0,591

Tableau XI : pour la carotte

<i>Répétition</i> <i>souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	1,342	1,399	0,601	0,725
R ₂	1,242	1,299	0,693	0,650
R ₃	1,288	1,382	0,507	0,547
R ₄	1,355	1,316	0,623	0,685
R ₅	1,202	1,389	0,648	0,608

III-5) Dosage des enzymes pectinolytique par l'absorption à l'ultra violé à une longueur d'onde de 230 nm

Tableau XII: pour la pomme de terre :

<i>Répétition</i> <i>souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	1,438	1,140	1,823	1,752
R ₂	1,284	1,226	1,871	1,737
R ₃	1,868	1,237	1,834	1,695
R ₄	1,379	0,882	1,789	1,737
R ₅	1,583	1,057	1,806	1,731

Tableau XIII : pour la carotte :

<i>Répétition</i> <i>souches</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>
R ₁	1,501	1,722	1,776	1,709
R ₂	1,462	1,699	1,737	1,737
R ₃	1,456	1,743	1,752	1,717
R ₄	1,408	1,403	1,806	1,789
R ₅	1,494	1,675	1,752	1,723

Résumé :

Les espèces *Dickeya* et *Pectobacterium* sont des entérobactéries phytopathogènes responsables des pertes économiques importantes. Alors que *P. atrosepticum* est un pathogène exclusif de la pomme de terre, *P. carotovorum*, *D. dadantii*, et *D. solani* ont un spectre d'hôte plus large incluant tomates, carottes, choux... etc. Ces bactéries causent les maladies de jambe noire et pourriture molle des pommes de terre, respectivement en végétation en conditions de conservation. La macération des tissus est due à la production massive d'enzymes principalement des pectinases, parmi lesquels les pectate lyases qui jouent un rôle majeur dans la pathogénicité. 4 souches, dont 2 du genre *Dickeya* (espèces *dadantii* et *solani*) et 2 autres appartenant aux *Pectobacterium* (*atrosepticum* et *carotovorum*) ont été testées pour leurs pouvoirs pathogènes sur les demi-tubercules de pomme de terre, ainsi que sur carottes, les résultats ont montrés que les souches de genre *Dickeya*, notamment *D. solani* sont plus agressives que celles du genre *Pectobacterium*. Par ailleurs, après dosage de l'activité pectate lyase à partir des tissus infectés, il apparait que cette dernière est plus importante chez *Dickeya* par rapport aux *Pectobacterium*, suggérant ainsi une étroite relation entre activité enzymatique et intensité des symptômes de macération.

Mots clefs : pommes de terre, *Dickeya*, *Pectobacterium*, pourriture molle, dosage, pectate lyases, pathogénicité.

Abstract:

Dickeya and *Pectobacterium* species are enterobacterial phytopathogenes responsible for an important economic losses. Whereas, *P. atrosepticum* is pathogenic exclusive of potatoes, *P. carotovorum*, *D. dadantii*, and *D. solani* have a broader spectrum of host including tomatoes, carrots, cabbages etc. These bacteria cause blackleg and soft rot diseases of potatoes in vegetation, and in conservation respectively. Tissue maceration is due to the great production of pectinolytic enzymes, namely pectate lyases (pels) witch play an important role in pathogenicity. 4 strains of genus *Dickeya* (*dadantii* and *solani*) and 2 of *Pectobacterium* (*atrosepticum* and *carotovorum*) were tested for their pathogenic capacities on the potato half-tubers and carrots. The results show that *Dickeya* strains, namely *D. solani* are more aggressive than *Pectobacterium* species. After enzyme assay from infected tissues, pels activity is greater with genus *Dickeya* than *Pectobacterium*, suggesting a tight relationship between enzyme activity and maceration symptoms.

Key words: potatoes, *Dickeya*, *Pectobacterium*, soft rot, enzyme assay, pectate lyases, pathogenicity.