

République Algérienne Démocratique et Populaire.

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderahmane MIRA de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique

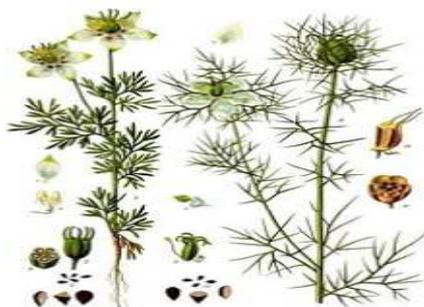
Mémoire de Fin de Cycle

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Option : Pharmacologie moléculaire

Thème

Effet des alcaloïdes des *Nigella sp* sur la pourriture molle
de la pomme de terre et évaluation de toxicité in vivo



Présenté par :

M^{elle} ASSOUL Sabrina

Membre du jury :

Président : M^{lle} KHETTAL B.

Promotrice : M^{me} AMROUCHE-SOBHI W

Examinatrice : M^{me} ZAIDI R.

Examineur : M^r BRIBI N.

Année universitaire : 2011/2012

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier Dieu le tout- puissant, de m'avoir réalisé le rêve de la recherche académique.

Mes vifs remerciements, mes profonds respects et ma reconnaissance à ma promotrice Dr Amrouche née Sobhi Widad pour m'avoir proposé ce thème, offert la méthodologie fondamentale nécessaire à la réalisation de ce travail de recherche, leurs encouragements et leurs conseils.

Je remercie également le Dr KHETTAL Bachra pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury et les Dr ZAIDI Rachida et Mr Brihi. N qui ont accepté d'examiner mon travail.

Je remercie Mr BOUGUEZZA Yacine pour ses aides et ses conseils.

Un grand merci à Mr Amrouche. F et la technicienne du laboratoire d'enzymologie pour leurs aides et leurs conseils.

Dédicaces

J'adresse, surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père et, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de toutes mes années d'études, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.

Mes dédicaces sont adressées à mes frères, ma chère sœur et à tous ceux qui me sont chers.

Une pensée à tous mes amis de promotion pour leur soutien morale.

Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	<i>i</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>ii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>v</i>

<i>Introduction</i>	01
----------------------------------	-----------

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur la pomme de terre

I.1 Origine.....	03
I.2 Description botanique et morphologique	03
I.3 Valeur nutritionnelle.....	06
I.4 Métabolites secondaires de la pomme de terre.....	08
I.5 Toxicité.....	09
I.6 Maladies et ravageurs de la pomme de terre.....	11

Chapitre II : la pourriture molle de la pomme terre et les moyens de lutte

II.1 Pectobactérium et pourriture molle.....	12
II.2- Mécanisme de la pourriture molle de pomme de terre.....	13
II.3 La chronologie des étapes de la pourriture molle.....	15
II.4 Transmission de la maladie.....	16
II.5 Moyens de contrôle de la pourriture molle.....	17
II.5.1 Les pratiques culturales et sanitaires.....	17
II.5.2 La lutte chimique.....	18
II.5.3 La lutte génétique.....	18
II.5.4 Lutte biologique et biopesticides.....	19

Chapitre III : Les *pectobactérium*

III.1 Généralités.....	20
III.2 Taxonomie.....	20
III.3 Description des <i>pectobactérium</i>	23
III.4 Espèces de <i>pectobactérium</i> associées a la pomme de terre.....	23
III.4.1 <i>Pectobactérium carotovorum</i>	24
III.4.2 <i>Pectobactérium astrosepticum</i>	24
III.4.3 <i>Pectobactérium chrysanthemi</i>	24

Chapitre IV : Les alcaloïdes des nigelles

IV.1 Les nigelles.....	26
IV.1.1 Généralités.....	26
IV.1.2 <i>Nigella damascena</i>	27
IV.1.2.1 <i>Description botanique</i>	27
IV.1.2.2 Composition chimique de <i>Nigella damascena</i>	28
IV.1.2.3 Activités biologiques et propriétés pharmacologiques.....	28
IV.1.3 <i>Nigella sativa</i>	29
IV.1.3.1 Aspect botanique.....	29
IV.1.3.2 Composition biochimique de <i>Nigella sativa</i>	29
IV.1.3.3 Activités biologiques et propriétés pharmacologiques.....	30
IV.2 Les alcaloïdes du genre <i>Nigella</i>	30
IV.2.1 Généralités sur les alcaloïdes.....	30
IV.2.2 Alcaloïdes des nigelles.....	33
IV.3 Rôle biologique et effets pharmacologiques des alcaloïdes.....	34

Partie pratique

I. Matériel et méthodes

I.1 Matériel biologique

I.1.1 Les graines de *Nigella damascena* et *Nigella sativa*.....35

I.1.2 Tubercules de pomme de terre.....36

I.1.3 Matériel bactérien.....37

I.2 Méthodologie

I.2.1 Extraction et caractérisation des alcaloïdes totaux.....37

I.2.2 Analyse par chromatographie sur couche mince.....39

I.3 Mode opératoire

I.3.1 Préparation de l'inoculum standard.....40

I.3.2 Test in vivo des alcaloïdes totaux40

I.3.3 Etude de la toxicité des alcaloïdes totaux sur la pomme de terre.....42

II. Résultats et discussions

II.1 Taux d'extraction des alcaloïdes totaux de *N.sativa* et *N. damascena*.....43

II.2 Analyse des alcaloïdes totaux par CCM.....43

II.3 Description de la pourriture molle engendrée par Pcc ,Pca et Dk45

II.4 Effet des alcaloïdes totaux des *Nigella sp* Sur la pourriture molle de la
pomme de terre48

II.4.1 Etudes de l'effet des alcaloïdes sur la variété *Spunta*.....48

II.4.2 Etudes de l'effet des alcaloïdes sur la variété *Désirée*.....52

II.5 La toxicité des alcaloïdes totaux sur la pomme de terre.....56

Conclusion60

Références bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

Liste des abréviations

CCM : Chromatographie sur couche mince

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO: Densité optique

BN: Bouillon nutritif

Pcc: *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum*

Pca: *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum*

Dk: *Dickeya spp.*

N.sativa : *Nigella sativa*

N.damascena : *Nigella damascena*

TP : Tampon phosphate

R_d : Rendement massique

R_f : Rapport frontale

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	A. Structure externe du tubercule de pomme de terre présentant le bourgeon terminal (bg t), les yeux (oe), les lenticelles (len) et le stolon (st). B. Disposition des yeux à la surface du tubercule : les chiffres de 1 à 8 représentent les yeux	4
2	A. Structure interne du tubercule de pomme de terre mature en coupe longitudinale : périderme (pér), anneau vasculaire (an.vasc), cortex (cort), zone périmédullaire (z.péri), moelle (m). B. Détail d'une coupe fine des tissus du tubercule de pomme de terre : parenchyme cortical (pc), phloème externe (ph.e), xylème (x), phloème interne (ph.i), parenchyme médullaire (pm)	5
3	Plante de la pomme de terre	5
4	Valeurs nutritionnelles pour 100 g de pomme de terre cuites avec leur peau et épluchées avant consommation	6
5	Images au microscope optique d'un granule d'amidon de pomme de terre. L'image (a) vue sous un éclairage à fond clair montre bien les anneaux de croissance concentriques, tandis que le motif en croix caractéristique affiché sous la lumière polarisée dans (b).	7
6	Observation en microscope électronique d'un tissu frais de la pomme de terre montrant la structure des cellules et les granules d'amidon	7
7	Mécanisme proposé pour la formation d'acrylamide	11
8	Le cycle des maladies bactériennes de la pomme de terre	12
9	Pourriture molle et humide causée par <i>Pectobacterium sp.</i> ou <i>Dickeya sp</i>	13
10	Schéma descriptif des enzymes pectinolytiques	14
11	Schéma descriptif du mécanisme de macération utilisé par <i>pectobacterium atrosepticum</i>	14
12	Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne	15
13	contacte des tubercules sains avec un tubercule infecté par <i>pectobacterium</i>	17
14	<i>pectobactérium</i> , phytopathogène	23
15	Tubercules infectés par; <i>Pectobacterium carotovorum</i> (a); <i>Dickeya</i> (b). <i>Erwinia carotovora subsp. atroseptica</i> (Eca 709) (c).	25
16	Les différents organes de <i>Nigella damascena</i> (à droite) et de <i>Nigella sativa</i> (à gauche).	27
17	Graines de différentes espèces de <i>Nigella</i> ; a : <i>N. arvensis</i> , b : <i>N. damascena</i> , c : <i>N. hispanica</i> , d : <i>N. integrifolia</i> , e : <i>N. nigellastrum</i> , f : <i>N. sativa</i> , g : <i>N. Orientalis</i> .	27
18	Principaux hétérocycle des alcaloïdes.	31
19	Origine biosynthétique des alcaloïdes.	32
20	Structure des alcaloïdes de type dollabellanes diterpènes.	33

21	Structure chimique des alcaloïdes à noyau imidazole (a) et des alcaloïdes isoquinoleique (b) du genre <i>Nigella</i> .	34
22	Structure chimique de la damascenine.	34
23	Graines de <i>Nigella damascena</i> .	35
24	Graines de <i>Nigella sativa</i> .	36
25	Tubercules de pomme de terre des variétés <i>Spunta</i> à gauche et <i>Désirée</i> à droite.	36
26	Les étapes d'extraction des alcaloïdes totaux de <i>Nigella sp.</i>	38
27	Fractionnement des alcaloïdes totaux par CCM.	39
28	Tubercules disposés dans des boites humidifiées.	40
29	le résumé du test de toxicité.	42
30	Structure des alcaloïdes de type dollabellanes diterpènes.	45
31	Symptôme de pourriture engendrée par les trois souches de bactérie en présence des alcaloïdes de <i>Nigella sp.</i> sur variété <i>Désirée</i> .	46
32	Symptômes de pourriture engendrée par les trois souches de bactérie en présence des alcaloïdes de <i>Nigella sp</i> sur variété <i>Spunta</i> .	47
33	Aucun effet du tampon phosphate, DMSO et bouillon nutritif sur les demi-tubercules variété <i>Spunta</i> à droite et <i>Désirée</i> à gauche.	48
34	L'évolution de la masse pourrie, variété <i>Spunta</i> , en fonction des concentrations des alcaloïdes de <i>N.sativa</i> .	49
35	Le pourcentage de réduction de la pourriture, variété <i>Spunta</i> , en fonction des concentrations des alcaloïdes de <i>N.sativa</i> .	49
36	L'évolution de la masse pourrie, variété <i>Spunta</i> , en fonction des concentrations des alcaloïdes de <i>N.damascena</i> .	51
37	Le pourcentage de réduction de la pourriture, variété <i>Spunta</i> , en fonction des concentrations des alcaloïdes de <i>N.damascena</i>	51
38	Evolution de la masse de pourriture, chez la variété <i>Désirée</i> , en fonction des alcaloïdes de <i>N.sativa</i> .	53
39	Le pourcentage de réduction de la pourriture, variété <i>Désirée</i> , en fonction des concentrations des alcaloïdes de <i>N.sativa</i> .	53

40	L'évolution de la masse pourrie, variété <i>Désirée</i> , en fonction des concentrations des alcaloïdes de <i>N.damascena</i> .	55
41	Le pourcentage de réduction de la pourriture, variété <i>Désirée</i> , en fonction des concentrations des alcaloïdes de <i>N.damascena</i> .	55
42	Effet des alcaloïdes sur la fuite des électrolytes de la variété <i>Spunta</i> , A : Cinétique des la fuite des électrolytes au cours des deux premières heures, B- cinétique de la fuite des électrolytes au cours de 72H.	57
43	Effet des alcaloïdes sur la fuite des électrolytes de la variété <i>Désirée</i> , A : Cinétique des la fuite des électrolytes au cours des deux premières heures, B- cinétique de la fuite des électrolytes au cours de 72H.	58

Liste des tableaux

N°		Page
I	les espèces <i>Erwinia</i> pectinolytiques, les hôtes, et des noms ont été récemment proposés.	22
II	Classification des Nigelles	26
III	le résumé des résultats de CCM.	43

Introduction

Introduction

La pomme de terre, légume par excellence, de part sa qualité gustative et sa valeur nutritive, constitue un produit de base dans la consommation des ménages Algérien (Lepoivre, 2003).

Les cultures de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et les tubercules récoltés sont sujets à de nombreuses agressions bactériennes. Il s'agit de bactéries appartenant notamment aux genres *Clavibacter*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*, et *Streptomyces*. Parmi ces derniers, un regain d'intérêt est accordé aux bactéries macergènes appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, plus connues sous le nom d'*Erwinia carotovora*. Les bactéries macergènes appartenant aux espèces *Pectobacterium atrosepticum* et *Pectobacterium carotovorum* sont responsables de dégâts importants lors de la culture et de la conservation après récolte des tubercules de pomme de terre. L'espèce bactérienne impliquée et la gravité des pertes dépendent de facteurs environnementaux, en particulier de l'humidité et de la température, ainsi que du potentiel infectieux des sols. Aucun traitement ne permet aujourd'hui de lutter efficacement contre cette maladie (Latour et al., 2008).

La recherche et l'application de moyens de lutte efficaces permettant de protéger toutes les étapes de production et de stockage des tubercules représentent donc un véritable enjeu pour les années à venir. Grâce à une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent l'apparition et le développement de la maladie, de nouvelles méthodes de lutte chimique, génétique et biologique ont été proposées. Certaines de ces méthodes ont montré leur efficacité au laboratoire et devront être validées au champ. (Latour et al., 2008).

La nigelle est, justement, une des plantes dont les effets antimicrobiens sont très intéressants. Le genre *Nigella* appartient à la famille des *Renonculacées*. Il en existe une vingtaine d'espèces (Yoshimitsu et al., 2007).

Cette plante a été largement étudiée pharmacologiquement et Les extrait de leurs graines ont des propriétés anti-inflammatoire, analgésique et dépresseur du SNC, anti-tumorale, immunostimulant, antihistaminiques, des antidiabétiques, antihypertenseurs et les activités antimicrobiennes (**Ko'kdil et Yilmaz, 2005**).

Dans cette optique, s'inscrit une originale étude qui a comme objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne des alcaloïdes de *Nigella sativa* et *Nigella damascena* sur les deux variétés de pomme de terre (*Spunta* et *Désirée*) et l'étude de leur toxicité sur ces dernières.

L'étude est réalisée en deux parties :

1. La synthèse bibliographique qu'est constituée de quatre chapitres :

- Les généralités sur la pomme de terre.
- La pourriture molle et les moyens de lutte.
- Les *Pectobacterium*
- Les alcaloïdes de *Nigella sp.*

2. La partie expérimentale est organisée en deux étapes :

La première étape est basée sur l'extraction des alcaloïdes de *Nigella sp* ; leurs analyses sur la chromatographie sur couche mince puis de l'étude de leur effet sur les trois souches de bactérie pectinolytique (*Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum*(Pcc), *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum* (Pca) et *Dickeya.spp* (Dk)) sur les demi-tubercules des deux variétés de pomme de terre (*Spunta* et *Désirée*).

La deuxième étape est consacrée pour l'évaluation de la toxicité des alcaloïdes sur les demi-tubercules des deux variétés de pomme de terre (*Spunta* et *Désirée*).

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur la pomme de terre

I. Généralités sur la pomme de terre

I.1 Origine

Les premières pommes de terre ont été cultivées il y a plus de 6000 ans près du lac Titicaca dans les montagnes des Andes de l'Amérique du Sud, sur la frontière entre la Bolivie et le Pérou. La plus grande diversité d'espèces sauvages de pommes de terre est encore actuellement dans cette région (C.I.P., 2008).

L'introduction de la pomme de terre en Europe remonte au XVI^{ème} siècle lorsque les conquistadors espagnols découvrirent l'Amérique et la "papa" (la pomme de terre) (Saguez, 2007). En Algérie, la pomme de terre, a probablement, été introduite pour la première fois au XVI^{ème} siècle par les Maures andalous qui ont propagé les autres cultures dans la région : tomate, poivron, maïs, tabac... Puis, n'ayant pas suscité d'intérêt, elle est tombée dans l'oubli (Kechid, 2005). La pomme de terre occupe aujourd'hui une place majeure dans l'agriculture européenne et mondiale (Saguez, 2007).

I.2 Description botanique et morphologique

Le nom botanique de la pomme de terre est *Solanum tuberosum*. Il a été donné par Gaspar Bauhin (1560-1624), naturaliste suisse en 1595 (Oswaldo, 2010). *S. tuberosum* L. appartient à la famille des Solanacées, qui sont des plantes à fleurs. Les pommes de terre partagent le genre *Solanum* avec d'autres plantes économiques comme la tomate, aubergines, poivron, le tabac et les pétunias. Le génome de pomme de terre est de taille moyenne avec 12 chromosomes et d'une longueur haploïde d'approximativement 840 millions de paires de base (Visser et al., 2009). *S. tuberosum* L. ($2n = 4x = 48$) est une espèce autotétraploïde qui reproduit par propagation asexuée. La plupart des génotypes de pommes de terre sont génétiquement hétérogènes quelle que soit le cultivar ou le stock génétique (Razdan & Mattoo, 2005).

L'une des caractéristiques de la pomme de terre est son développement souterrain. Elle est renflée dans un tubercule arrondi. Les tubercules servent au renouvellement, à la multiplication et à la propagation de la plante. Il s'agit de la partie de la plante qui ne disparaît pratiquement jamais. Ce sont ces réserves en nutriment qui, en cas de coups durs, aident la plante à survivre (Oswaldo, 2010).

A l'extrémité apicale du tubercule, ou couronne, se trouve le bourgeon terminal (bg t ou apical) tandis qu'à l'opposé, du côté proximal (talon), se trouvent le point d'attache du stolon (st), l'ombilic (**Figure 1A**). Les yeux (oe), disposés régulièrement sur le tubercule suivant une phyllotaxie spiralée (**Figure 1B**), correspondent à l'emplacement des bourgeons axillaires. Des lenticelles (len) parcourent la surface du tubercule et jouent un rôle essentiel dans la respiration du tubercule (**Rousselle et al., 1996**).

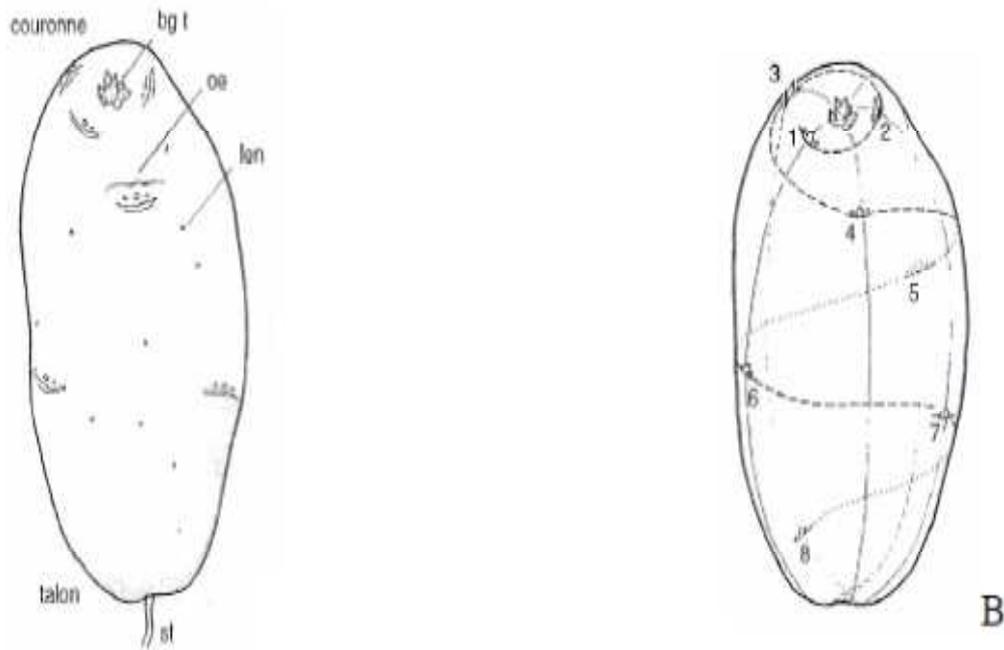


Figure 1. A : Structure externe du tubercule de pomme de terre présentant le bourgeon terminal (bg t), les yeux (oe), les lenticelles (len) et le stolon (st). **B.** Disposition des yeux à la surface du tubercule : les chiffres de 1 à 8 représentent les yeux (**Rousselle et al., 1996**).

En coupe longitudinale d'un tubercule mature (**Figure 2A**), on distingue de l'extérieur vers l'intérieur : le péricorde (pér), le cortex (cort) ou parenchyme cortical, l'anneau vasculaire (an.vasc) composé de phloème externe, de xylème et de parenchyme vasculaire. On peut également remarquer la zone pérимédullaire (z.péri) ou parenchyme pérимédullaire contenant le phloème interne et enfin, la moelle (m) ou parenchyme médullaire (**Figure 2B**) (**Rousselle et al., 1996**).

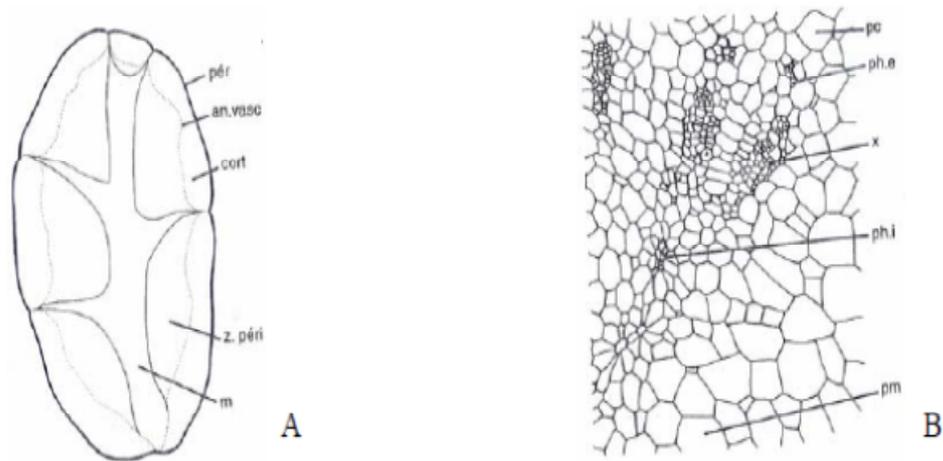


Figure 2. **A :** Structure interne du tubercule de pomme de terre mature en coupe longitudinale : périderme (pér), anneau vasculaire (an.vasc), cortex (cort), zone périmédullaire (z.péri), moelle (m). **B.** Détail d'une coupe fine des tissus du tubercule de pomme de terre : parenchyme cortical (pc), phloème externe (ph.e), xylème (x), phloème interne (ph.i), parenchyme médullaire (pm) (Rousselle *et al.*, 1996).

La plante de la pomme de terre peut atteindre jusqu'à un mètre de hauteur au printemps. Elle possède entre 2 à 10 tiges portant chacune un certain nombre de feuilles. Sur les tiges, des fleurs aux couleurs variant du blanc au violet (selon la variété) peuvent apparaître. A partir des fleurs se développent des fruits ronds, ressemblant à une petite tomate qui renferme des graines (**Figure 3**) (Oswaldo, 2010).

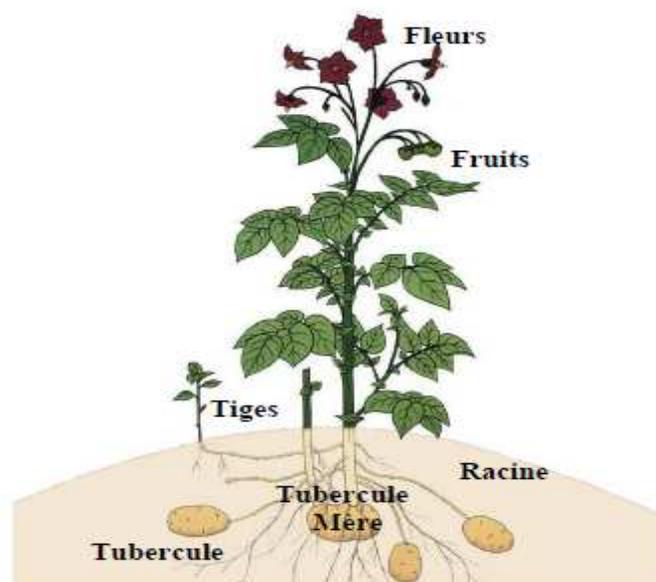


Figure 3 : Plante de la pomme de terre (Oswaldo, 2010).

I.3 Valeur nutritionnelle

Les caractéristiques morphologiques, chimiques et biochimiques du tubercule de pomme de terre varient principalement en fonction de la variété, mais dépendent également des techniques culturales, des conditions climatiques et de l'âge physiologique de la pomme de terre (Delaplace, 2007).

La composition de la pomme de terre varie considérablement entre les différents cultivars, mais comprend en général 63 à 87% d'eau, 13-37% de matière sèche, 13-30% carbohydrates, de 0,7 à 4.6% de protéines, 0,02 à 0,96% lipides, de 0,2 à 3,5 de fibre, et 0,4 à 2 % de cendres (Medeiros Vinci et al., 2011). La pomme de terre, bien utilisée, est un aliment noble aux nombreuses qualités nutritives (Figure 4) (Oswaldo, 2010).



Figure 4: Valeurs nutritionnelles pour 100 g de pomme de terre cuites avec leur peau et épluchées avant consommation (Oswaldo, 2010).

Les granules d'amidon de pomme de terre possèdent très peu de lipides et de protéines par rapport aux granules de céréales. Ils sont larges, lenticulaires, ovales ou de forme sphérique, avec un diamètre moyen de 23 à 30 μm , et une taille externe variant de 5-100 μm . La figure suivante présente l'aspect de granule d'amidon sous microscope optique (Figure 5) (Ek et al., 2011).

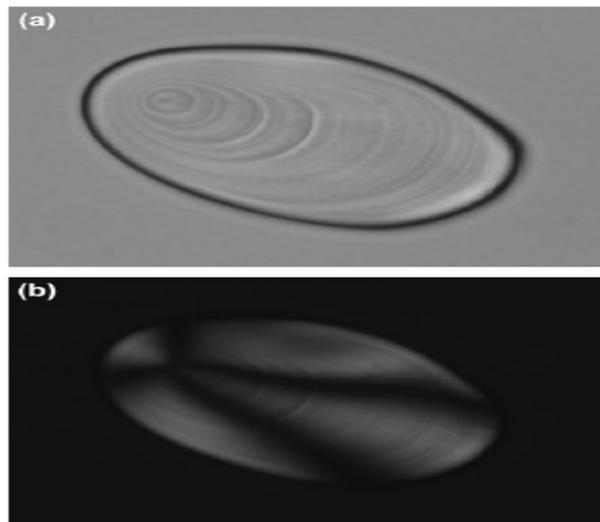


Figure 5. Images au microscope optique d'un granule d'amidon de pomme de terre. L'image (a) vue sous un éclairage à fond clair montre bien les anneaux de croissance concentriques, tandis que le motif en croix caractéristique affiché sous la lumière polarisée dans (b) (Ek et al., 2011).

Le tissu de pomme de terre est constitué de cellules de grande taille ($200 \times 340 \mu\text{m}$) et de petite taille ($80 \times 90 \mu\text{m}$). Chaque cellule observée contient six à dix granules d'amidon larges ($10 - 70 \mu\text{m}$ de diamètre) et des centaines de granules d'amidon très petites ($0.5 - 1.0 \mu\text{m}$). Les cellules dans les tubercules de pomme de terre sont polyédrique isodiamétriques, avec des variations dans la taille, la forme, l'épaisseur de la paroi cellulaire et de la taille des granules d'amidon entre les cultivars (Figure 6) (Ek et al., 2011).

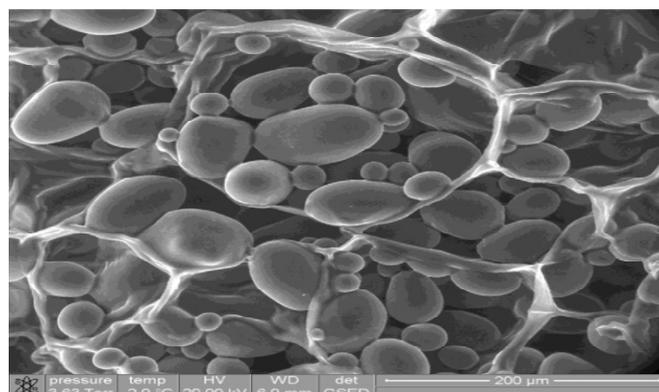


Figure 6. Observation en microscope électronique d'un tissu frais de la pomme de terre montrant la structure des cellules et les granules d'amidon (Ek et al., 2011).

I.4 Métabolites secondaires de la pomme de terre

Les polyphénols comprennent plus de 8000 substances identifiées, qui peuvent être divisés en groupes en fonction de leur structure chimique, tels que les acides phénoliques, les stilbenes, coumarines, les lignines et les flavonoïdes (**Ross & Kasum, 2002**). Al-Saikhan et ses collaborateurs (1995) ont rapporté que le contenu phénolique de pommes de terre était élevé, et variait de 530 à 1770 µg/g. Mattila et Hellstrom (2007) ont montré que des dérivés de l'acide caféique (acide chlorogénique) sont les principaux constituants phénoliques dans les pommes de terre (**Ezekiel et al ., 2011**).

Les flavonoïdes contenus dans les pommes de terre variaient de 200 à 300 µg/g de matière fraîche (**Lewis et al., 1998**). Par ordre d'abondance, on trouve la catéchine, l'épicatéchine, erodictyol, kaempferol et naringénine (**Brown, 2005**).

Les anthocyanes sont un sous-groupe des flavonoïdes et présentent en quantités importantes dans les pommes de terre à chaires pigmentées, ses niveaux sont compris entre 5,5 et 35 /100 g de matière fraîche (**Brown, 2008**).

Les concentrations en folate dans la pomme de terre varient entre 12 et 37 µg/100 g de matière fraîche. Les antioxydants tels que l'acide ascorbique ou les composés thiols ont été détectés, leur effet est de protéger les folates contre la dégradation oxydative (**Ezekiel et al ., 2011**).

Kukoamines (polyamines) ont été détectés pour la première fois dans la pomme de terre par Parr, Mellon, Colquhoun, et Davies (2005). Ces polyamine ont un rôle dans la régulation de la biosynthèse de l'amidon et de rendre les tubercules résistants aux maladies (**Ezekiel et al ., 2011**).

Les pommes de terre sont une bonne source de caroténoïdes, qui sont des composés lipophiles synthétisés dans les plastides isoprénoïdes (**Dellapenna & Pogson, 2006**). La teneur totale en caroténoïdes dans les cultivars de pommes de terre à chair blanches et jaune a été signalée dans l'intervalle de 50–350 µg/100 g de matière fraîche et 800– 2000 µg/100 g de matière fraîche, respectivement (**Brown, 2008**).

I.5 Toxicité

Le contenu en protéines dans la pomme de terre est signalé dans l'intervalle de 1,0% à 2,0% du poids des tubercules frais. La Patatine est la protéine majeure présente dans les tubercules de pomme de terre. Elle représente environ 40% des protéines solubles dans l'eau. Cette protéine a des propriétés allergisantes chez les individus sensibles. Toutefois, cet effet allergisant est grandement réduit lors d'un chauffage (**Lynch et al., 2011**).

Plusieurs classes de protéines inhibitrices de la protéase ont été identifiées dans les pommes de terre (les inhibiteurs I et II, l'activité inhibitrice variable avec la chymotrypsine et la trypsine, et inhibiteurs des carboxy-peptidase). Le traitement thermique réduit généralement l'activité inhibitrice de ces protéines. En plus des inhibiteurs de la protéase, glycoalcaloïdes sont un groupe de toxines connues et spécifiques de la famille des plantes Solanacées. L' α solanine et α -chaconine sont les principaux glycoalcaloïdes identifiés dans les pommes de terre (**Lynch et al., 2011**).

Ces derniers sont les molécules de défense naturelle que la plante a développées pour combattre les champignons et les insectes) (**Oswaldo, 2010**).

Chez les animaux, l'exposition à fortes doses orales de glycoalcaloïdes toxiques de pommes de terre produit des effets irritants des muqueuses du tractus gastro-intestinal. Les effets toxiques systémiques comprennent: l'hémolyse, la dépression du système nerveux, et la dépression respiratoires et des centres moteurs, ce qui conduit à un éventuel arrêt cardiaque (**Clarke et al, 1981**). Chez les lapins, la consommation des pommes de terre contenant 75 mg de glycoalcaloïdes par kg de poids corporel (20-23 mg / kg par jour) ou de pomme de terre vertes contenant 204 mg / kg (49-53 mg / kg de poids corporel) pendant 20 jours, produit des déficiences dans la digestibilité des protéines nécessaires, perte de poids, et la diarrhée. La diminution des cellules sanguines et des taux d'hémoglobine ont été également observés. Des études effectuées sur des singes Rhésus administrés de pommes de terre contenant 3.8 à 4.7 mg de glycoalcaloïdes / kg de poids corporel / jour pendant 25 jours n'ont révélé aucun effet indésirable (**Friedman, 2006**).

Chez les humains, on considère qu'une consommation de plus de 20 mg d'alcaloïdes /100 g de pomme de terre est risquée (**Oswaldo, 2010**).

Les signes cliniques sont : vomissements, diarrhées et autres signes montrant une irritation du tube digestif. Des symptômes neurologiques peuvent aussi apparaître, tels que l'apathie, la confusion et des hallucinations. C'est pour cela qu'il est important de suivre quelques règles de conservation et de stockage de la pomme de terre. Certains facteurs provoquent l'augmentation du taux de glycoalcaloïdes, tel que l'exposition à la lumière. En effet, sous l'influence de cette dernière, la pomme de terre forme un alcaloïde en même temps qu'elle verdit (formation de chlorophylle) (**Oswaldo, 2010**).

Dans les pommes de terre, les concentrations en asparagine sont relativement en excès par rapport aux sucres réduits. Ces sucres réduits représentent le facteur limitant à la formation d'acrylamide et, par conséquent détermine en grande partie la formation d'acrylamide dans les produits de pommes de terre (figure7). L'acrylamide est connu pour son effet neurotoxique. Plusieurs études toxicologiques ont démontré qu'il a un effet carcinogène génotoxique chez les animaux et indiquent ainsi les risques potentiels pour la santé humaine. Il a été postulé que l'acrylamide est cancérigène par voie génotoxique, après sa conversion en glycidamide, un époxyde réactif avec l'ADN. Cependant, des études indiquent que la cancérogénicité induite par l'acrylamide pourrait aussi être modulée par les systèmes hormonaux (**Vinci, et al., 2012**).

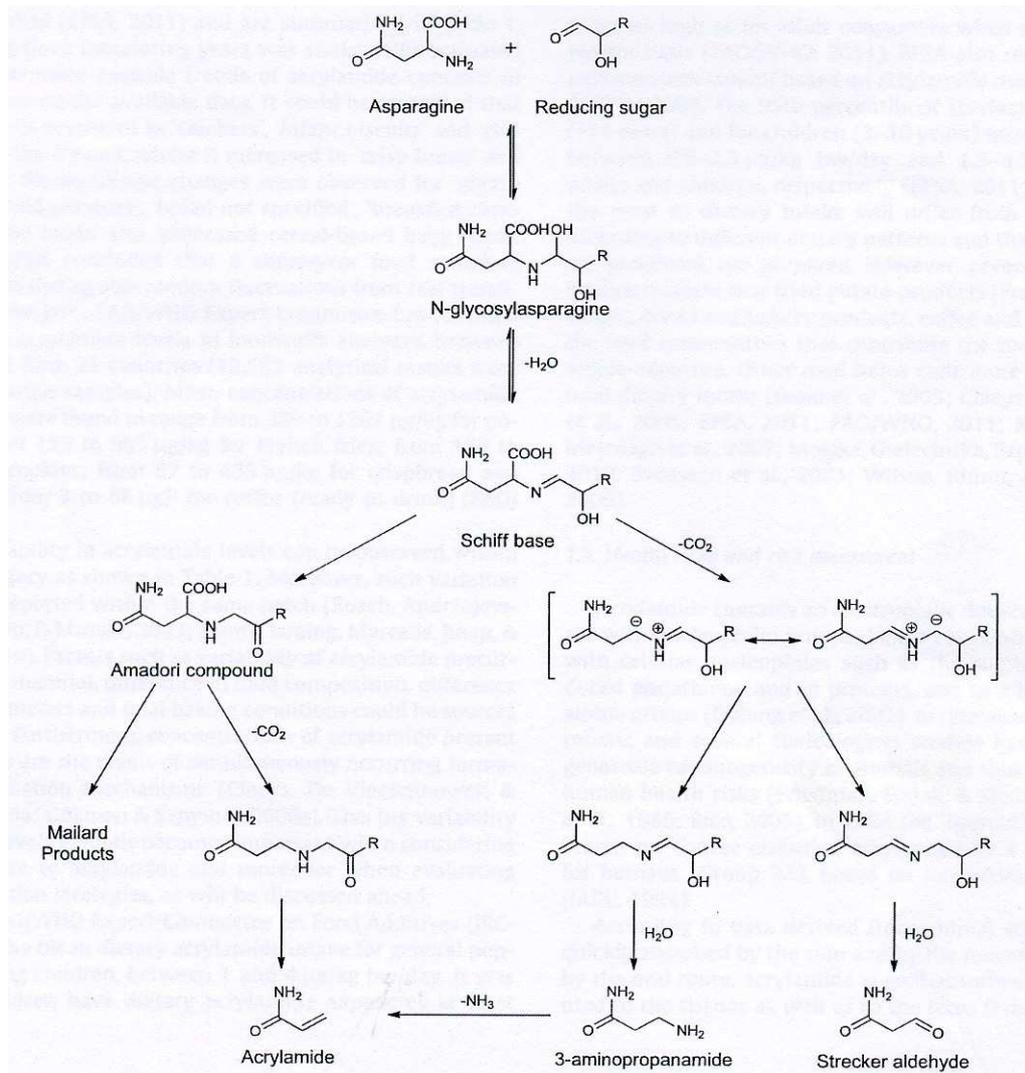


Figure 7 : Mécanisme proposé pour la formation d'acrylamide (Vinci *et al.*, 2012).

I.6 Maladies et ravageurs de la pomme de terre

La pomme de terre est soumise à l'attaque de maladies diverses dues à des champignons, à des virus et viroïdes, à des bactéries et à des mycoplasmes (Rouselle *et al.*, 1996), mais aussi par de nombreux invertébrés tels que les nématodes, les limaces, les myriapodes, les insectes, les acariens, voir par de petits mammifères. Il en résulte des retards de croissance, un affaiblissement des plantes, une destruction des parties malades ou une mauvaise qualité des tubercules qui sont généralement associés à des pertes en rendement considérables (Saguez, 2007).

Chapitre II

La pourriture molle de la pomme de terre et les
moyens de lutte

II. La pourriture molle de la pomme de terre et les moyens de lutte

Les pommes de terre sont très sensibles aux maladies bactériennes et fongiques en raison de leur forte teneur en amidon et en sucre (**Perombelon, 2002**). En outre, elles ont une propagation clonale en plantant des tubercules de semence entiers ou fragmentés, ce qui favorise la propagation des agents pathogènes d'une région à une autre (**De Boer, 2002, Hélias et al, 2008**).

Les principales maladies bactériennes de la pomme de terre sont la pourriture des semences, la jambe noire et pourriture de la tige aérienne dans le champ ainsi que la pourriture molle des tubercules au cours du stockage (**figure 8**) (**Van Der Merwe, 2009**)

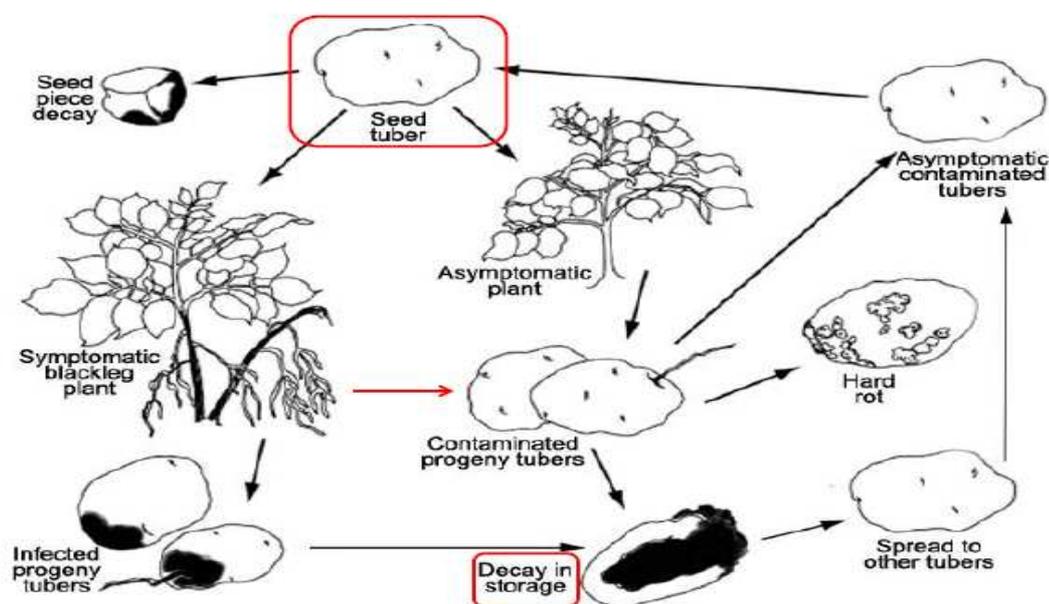


Figure 8: Le cycle des maladies bactériennes de la pomme de terre (**Van Vaerenbergh, 2012**).

II. 1 *Pectobacterium* et pourriture molle

Pectobacterium carotovorum (*Pbc*), *Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*) et *Dickeya* spp. sont généralement connus comme des agents pathogènes induisant la pourriture molle (**Kado, 2006**). Ces phytopathogènes peuvent causer la pourriture molle des tubercules de pommes de terre au cours du stockage et peuvent également entraîner l'apparition de symptômes sur divers champs, y compris l'émergence réduite, la chlorose, le flétrissement, pourriture de la tige, jambe noire, la dessiccation et la mort de la plante (**Terta et al., 2011**). *Pba* l'unique espèce, limitée à la pomme de terre (**Bell et al, 2004; De Boer, 2003**). L'association

préférentielle de *P. atrosepticum* à la pomme de terre peut être expliquée en termes de concordance entre les exigences écologiques de la bactérie et celles de cette culture (**Hélias, 2008**).

Les espèces des *pectobacteriums* induisant la pourriture molle sont très proches. Cependant, une grande variabilité existe sein d'une espèce. La plupart des espèces sont pathogènes sur des hôtes communs, provoquant des symptômes similaires de maladies (**Figure 9**) (**Van Der Merwe, 2009**).



Figure 9. Pourriture molle et humide causée par *Pectobacterium* sp. ou *Dickeya* sp (**Hélias, 2008**).

II. 2 Mécanisme de la pourriture molle de la pomme de terre

Cette maladie est caractérisée par une dégradation des parois cellulaires de la plante par des enzymes pectolytiques excrétées par des bactéries pathogènes, ce qui entraîne la macération des tissus et la pourriture granuleuse de la chair des tubercules infectés (**Pasco et al., 2006**).

La pathogénicité repose principalement sur la production des enzymes extracellulaires dégradant les parois cellulaires de la plante, y compris les pectinases (Pectate lyase, pectin lyase, polygalacturonases pectin methylesterases), les protéases, les cellulases et B-glucosidases qui participent collectivement à la virulence (**figure 10**) (**Whitehead et al, 2002**; **Bell et al, 2004**; **Faure & Dessaux, 2007**). L'exoenzyme le plus important responsable de la macération des tissus et indirectement la mort de la cellule est la pectinase (**Toth et al., 2003**). La pectinase dégrade les pectines et les pectates dans la lamelle médiane entre les cellules et d les parois cellulaires de la plante, causant l'effondrement des tissus, ce

qui aboutit finalement à des dommages cellulaires et la fuite des contenus cellulaires (Van Der Merwe, 2009).

Récemment, les séquences du génome des *Pbc*, *Pbc*, et *Pba* (SCR 1043), ont suggéré que ces bactéries utilisent des outils similaires pour la macération des cellules de la plante, mais selon divers mécanismes lors de la première interaction hôte-pathogène. *Pectobacterium atrosepticum* (SCR 1043) est la seule bactérie identifiée qui requiert des systèmes de type I et II, ainsi que types III, IV et V (auto transporté), deux partenaires de sécrétion et additionnel putatif système de sécrétion type I de la virulence complète (Figure 11) (Van Der Merwe, 2009).

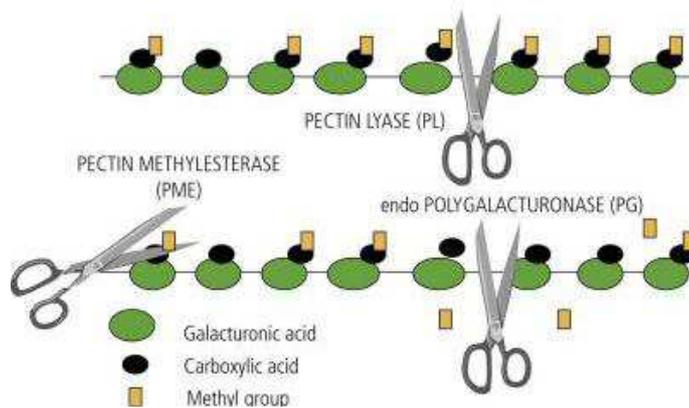


Figure 10: Schéma descriptif des enzymes pectinolytiques (Van Vaerenbergh , 2012).

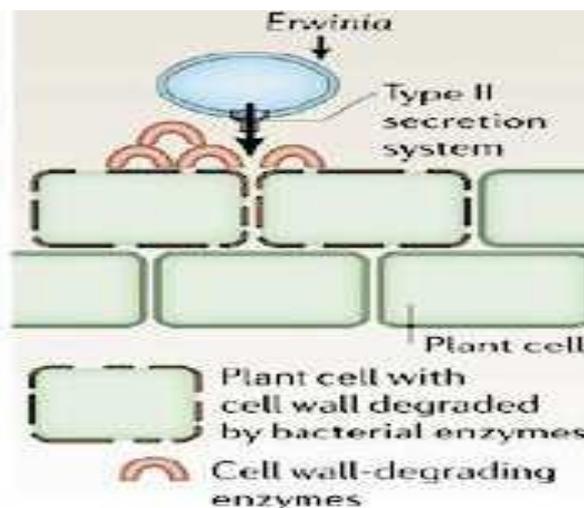


Figure 11: Schéma descriptif du mécanisme de macération utilisé par *pectobacterium atrosepticum* (Van Vaerenbergh , 2012).

II.3 La chronologie des étapes de la pourriture molle

Les bactéries provoquant la pourriture molle sont pectolytique-saprophytes et ont donc un métabolisme complexe utilisant des plantes vivantes ou mortes (**Pérombélon, 2002**). Toth & Birch (2005) ont décrit ces bactéries comme l'hémi-biotrophe du fait de leur capacité à changer durant l'infection d'un biotrophe à une existence nécrotrophe. Initialement, les bactéries sont présentes dans la phase de latence dans les lenticelles et les blessures où elles se multiplient activement jusqu'à ce qu'une densité de population critique (entre 10^7 et 10^8 cellules / ml) soit atteinte. Elles colonisent et se multiplient dans l'apoplaste avant la mort de la cellule végétale. Une fois la densité de population critique est atteinte, la production d'enzymes est initiée et cause la dégradation de la paroi cellulaire des plantes et la macération du tissu de la plante autour de la zone d'infection (**Figure 12**) (**Van Der Merwe, 2009**).

Les parties pourries et saines de la chair sont au début bien délimitées, et les attaques lenticulaires sur tubercule se manifestent par l'apparition de petites taches diffuses, d'aspect huileux autour des lenticelles. Ces nécroses sont de couleur marron avec un point noir foncé au centre. Les bactéries se répendent ensuite dans le tubercule en passant par les tissus vasculaires. Puis, les tissus sous-épidermiques se dépriment, deviennent spongieux, brunissent et se crevassent provoquant ainsi une pourriture molle (**Yahiaoui- Zaidi, 2004**).

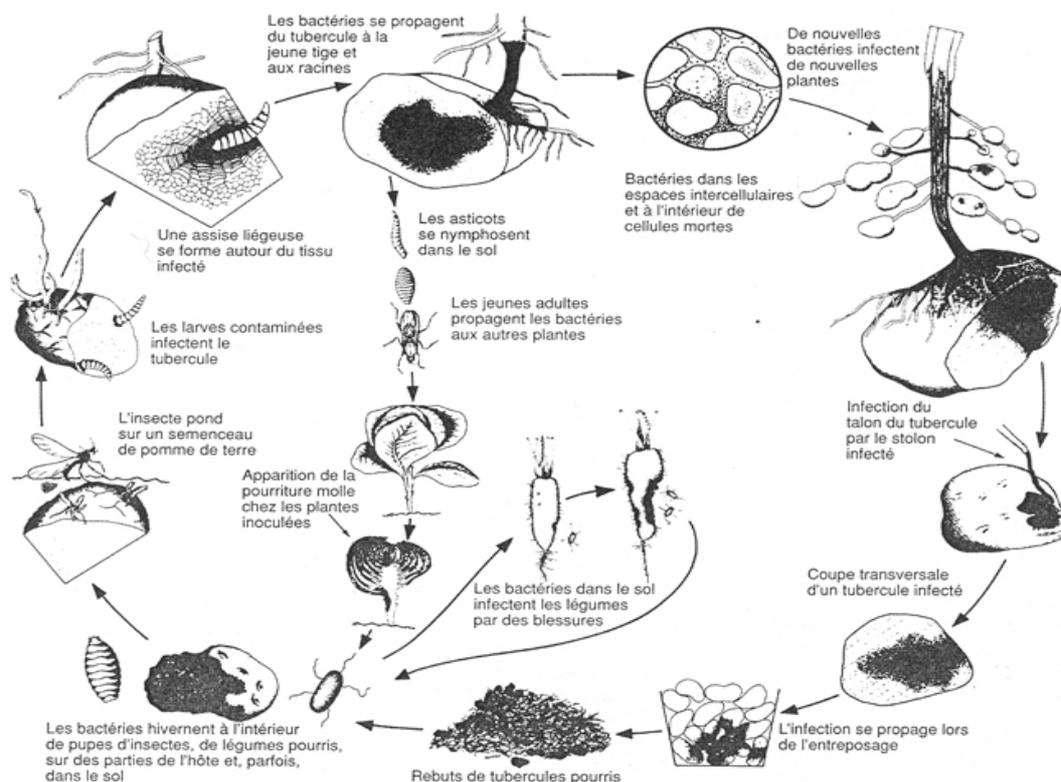


Figure 12: Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne (**Yaganza, 2005**).

II. 4 Transmission de la maladie

Le développement des maladies est initié quand la température est optimale, la concentration en oxygène est faible, l'humidité est élevée et l'eau libre disponible est suffisamment présent (**Smadja et al, 2004b**; **Toth et al, 2003**).

En cours de culture, la contamination de la descendance peut se produire après la pourriture du tubercule mère, lorsque les bactéries sont libérées dans le sol, transportées par l'eau libre, elles envahissent alors la rhizosphère des plantes et infectent les tubercules fils. Lorsque le sol est sec, peu de tubercules mères pourrissent et la transmission des bactéries aux tubercules fils est faible (**Elphinstone et Pérombelon, 1986 b**). Le taux d'humidité du sol influence également les niveaux de contamination par l'intermédiaire des lenticelles, qui s'ouvrent dans des sols mouillés permettant ainsi l'entrée des bactéries. La contamination des tubercules fils peut également se produire via les stolons susceptible de transmettre les bactéries au travers le système vasculaire (**Hélias et al., 2000 b**). Plus que l'humidité du sol, c' sa température est aussi importante (**Hélias, 2008**). La présence des bactéries *p. atrosepticum* se limite habituellement aux tubercules cultivés dans les sols tempérés, tandis que les bactéries de l'espèce *p. carotovorum* sont très représentées dans les zones plus chaudes, notamment subtropicales et tropicales (**Lateur et al ., 2008**).

Le passage de machines agricoles contaminées lors de la culture constitue un autre moyen de dissémination des bactéries. La plantation, la récolte et le tri mécanique des tubercules peuvent également être la cause de la propagation des agents pathogènes entre les lots de pomme de terre et au sein des stocks. Cette contamination a principalement lieu lors du contact de tubercules sains avec des tubercules ou du matériels infectés (**Figure 13**). Les écarts de tris et tas de déchets qui attirent des insectes constituent également des réservoirs des bactéries contaminés par *pectobacterium spp*. Les drosophiles sont aussi capables de les transmettre à des cultures de pomme de terre (**Hélias, 2008**).



Figure 13: contacte des tubercules sains avec un tubercule infecté par *pectobacterium* (Van Vaerenbergh , 2012).

Enfin, les tubercules jouent aussi le rôle de semence. Des tubercules contaminés, même sans symptôme visible (porteurs sains), peuvent disséminer la maladie au champ lors des phases de multiplications des plants (Lateur et al, 2008).

II.5 Moyens de contrôle de la pourriture molle

Actuellement, un contrôle partiel de la pourriture molle est obtenu principalement par l'application de certaines pratiques culturales et sanitaires, et indirectement par l'utilisation de fongicides chimiques. L'utilisation de variétés résistantes demeure encore très expérimentale (Yaganza, 2005).

II.5.1 les pratiques culturales et sanitaires

Eviter de blesser les tubercules pendant les opérations de récolte et de manutention (les blessures étant une porte d'entrée privilégiée pour pourriture molle) ; Débarrasser la ferme et les entrepôts des résidus des végétaux potentiellement contaminés et à désinfecter les équipements de lavage et de tri. Une bonne subérisation des blessures après l'opération de tranchage de semences ; L'application des fongicides ainsi qu'une récolte à des températures inférieures à 20 C° et par temps sec ; L'assurance d'une bonne régie d'entreposage, ainsi que la pratique des rotations de cultures (Yaganza, 2005).

II.5.2 La lutte chimique

Expérimentalement, le traitement de tubercules avec formaldéhyde et l'hypochlorite de sodium a permis de réduire la quantité d'inoculum bactérien ;L'application post-récolte est pratiquée et donner de bon résultats : l'acétaldéhyde et de benzoate de sodium, mélangés à la tourbe pour enrober les tubercules pendant le transport (**Yaganza, 2005**).De nouveaux composés capables d'altérer la croissance des *pectobacterium* ont montré une réelle efficacité lors d'essais au laboratoire : il s'agit de solution salée de chlorure d'aluminium et de métabisulfite de sodium (**Yaganza et al, 2004**).

II.5.3 Lutte génétique

L'utilisation des cultivars résistants à la pourriture molle de la pomme de terre, bien que prometteuse grâce aux progrès de la biotechnologie, demeure une pratique difficile. Les bases biochimiques et génétiques de la résistance sont encore mal comprises. Actuellement, tous les cultivars commerciaux sont, plus au moins, sensibles à la pourriture molle (**Yaganza, 2005**).

La création de variétés transgéniques, c'est-à-dire de pomme de terre ayant intégré un ou plusieurs gènes issus d'une autre espèce microbienne, végétale ou animale a consisté à intégrer dans le génome de la pomme de terre un gène originaire d'un bactériophage codant pour la production de lysozyme qui dégrade la membrane de certaines bactéries. Cette opération diminue significativement la sensibilité de la variété étudiée aux attaques de *P. atrosepticum*, que se soit lors d'essais sur tubercules ou sur plantes cultivées en serres (**Latour et al, 2008**).

L'expression des facteurs de virulence des *Pectobacteria* est régulée par un mécanisme original découvert au début des années 1990 : le *quorum-sensing* (**Latour, 2008**), le quorum sensing est un système de contrôle médié par HSLacyle (un acyle lactone homosérine) est largement répandu dans bactéries à Gram négatif et est responsable de la régulation de divers phénotypes (**Whitehead et al., 2002**). Celui-ci permet l'expression des gènes de virulence seulement lorsqu'un quorum bactérien est atteint. Après leur pénétration dans les tissus de la plante hôte, généralement par des ouvertures naturelles comme les lenticelles ou par des blessures (**Pérombelon, 2002**), les bactéries se multiplient jusqu'à atteindre un nombre

nécessaire et suffisant. C'est seulement lorsque ce quorum bactérien est atteint, que les bactéries sécrètent, de façon synchronisée, l'ensemble des facteurs de virulence impliqués dans l'altération des composants des parois végétales (**Latour, 2008**).

II.5.4 Lutte biologique et biopesticides

Les biopesticides, par la définition la plus large, sont des organismes vivants ou des produits naturels dérivés de ces organismes qui suppriment les populations de ravageurs. Les organismes peuvent être des plantes, les nématodes, ou des micro-organismes, y compris les bactéries, les champignons et les virus. Des composés biochimiques avec le mode d'action non toxique, et des composés qui stimulent les mécanismes de défense naturelle de plante (sémio-chimiques, phéromones) font également partie des produits enregistrés (**Bailey et al., 2009**).

Parmi les alternatives envisagées, les laboratoires de recherche se penchent depuis plusieurs années, sur les moyens de lutte biologiques qui visent à contrôler les agents pathogènes par des biopesticides dont un grand nombre a été développé dans différents laboratoire (**El Guilli et al., 2009**).

L'isolement massif de *Pseudomonas* a permis de sélectionner quelques rares souches de *pseudomenas* fluorescence et *pseudomenas putida* antagonistes des *pectobacteriums* in vitro, c'est-à-dire lors d'essais d'inhibition sur boîtes de pétri. Le pouvoir protecteur de ces souches était attribué à la production des sidérophores ou à celle d'antibiotiques, comme le 2,4 - diacétylphloroglucinol (**Latour, 2008**). D'après Sharga et Lyon (1998), *Bacillus subtilis* BS 107 serait actif in vitro et in vivo, contre *Ecc* et *Eca*.

L'antibiotique produit par *Erwinia carotovora* subsp. *Betavascularum* serait aussi efficace contre le développement d'*Ecc* sur la pomme de terre (**Axelrood et al., 1988**).

Chapitre III

Les Pectobacterium

III. Les *pectobactérium*

III.1 Généralités

Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (Vanhall) Dye et (Pcc), *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum* (Pca) (Jones) Dye (Eca) et *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder) MacFadder et Dimmock (Pch) ont une large distribution géographique et sont des agents phytopathogènes ayant un impact économique important (Yahiaoui-Zaidi et al., 2009). Ces espèces étaient auparavant connues sous le nom *Erwinia spp.* pectinolytiques, caractérisées par la production de grandes quantités des enzymes pectiques extracellulaires (Pérombelon, 2002). Elles sont toutes des membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (Hauben et al., 1998).

III.2 Taxonomie

Le genre *Erwinia* a été décrit pour la première en 1917 pour regrouper tous les membres de la famille des *Enterobacteriaceae*. Les espèces de ce genre causent des maladies des plantes, indépendamment de leur relation aux autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* (Pérombelon, 1990). L'association des techniques moléculaires, phénotypiques et sérologiques ainsi que les analyses phylogénétiques ont conduit les chercheurs à distinguer clairement *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi* (Hélias, 2008).

Il a été aussi suggéré par Hauben et ses collaborateurs (1998), à partir de l'analyse des séquences d'ARNr 16S, que les *Erwinias* pectolytiques sont renommés *Pectobacterium carotovorum ssp. Atrosepticum* (Eca), *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* (Ecc) et *Pectobacterium chrysanthemi* (Ech), en soutenant une proposition antérieure de Waldee (1945) pour renommer le même groupe (Toth et al., 2003).

Erwinia chrysanthemi (Burkholder) (Ech) a été également récemment placé dans un nouveau genre, *Dickeya*, basée sur hybridation ADN-ADN, tests phénotypiques et des séquences génétiques ARN16S (Samson et al., 2005; . Charkowski, 2006). (Tableau 1)

Une nouvelle classification des sous-groupes est basée sur la préférence d'hôte et de leur capacité à survivre dans des différents environnements géographiques (De Boer, 2003). *Pectobacterium carotovorum* est classée en sous-espèces, *betavascolorum*, *odorifera* et *wasabioe* qui ont des hôtes spécifiques : la betterave, la chicorée, et le raifort, respectivement (Van Der Merwe, 2009).

Récemment, Duarte et ses collaborateurs (2004) ont décrit une sous-espèce au Brésil : *Pectobacterium carotovorum subsp. Brasiliensis* (Pbcb), qui provoque également des symptômes semblables à la jambe noire de pommes de terre.

Garden et ses collaborateurs (2003) ont décrit des caractéristiques différentes des *Pectobacterium spp.* Les principales caractéristiques permettant de distinguer entre les espèces sont que *P. carotovorum* peut croître à 36 ° C et cause la pourriture molle sur des hôtes divers, tandis que *P. atrosepticum* ne peut pas croître à 36 ° C et provoque la jombe noire et la pourriture molle des tubercules de pommes de terre et de tomates (Darrasse et al., 1994). *Pectobacterium spp carotovorum subsp. Brasiliensis*, la nouvelle souche détectée au Brésil, peuvent se développer à une température supérieure à 37 ° C (Duarte et al., 2004)

Nasser et ses collaborateurs (1996) ont découvert que les espèces dans les régions tropicales sur les cultures des solanacées ont une plus grande diversité. Il a proposé que le sud et l'Amérique centrale est le centre de la diversification des *Dickeya spp.* Les plus importants *Dickeya spp.* causant les maladies de pomme de terre sont: *Dickeya dadantii* (anciennement Ech 3937) (Dd) et *D. zae* (anciennement Ech biovar 3) qui sont des agents phytopathogène dans les climats chauds. Toutefois, le *D.dianthicola* (anciennement Echr biovar 1 et 7) est plus adapté aux régions tempérées. Il devient, actuellement, un problème en Europe (Van Der Merwe, 2009).

Tableau 1: les espèces *Erwinia* pectolytiques, les hôtes, et des noms ont été récemment proposés (Charkowski, 2006).

Former Name	Proposed Name	Host	Reference
<i>Erwinia carotovora</i>			
subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	potato, tomato	Gardan et al. (2003)
subsp. <i>betavasculatorum</i>	<i>Pectobacterium betavasculatorum</i>	sugarbeet, sunflower, potato, artichoke	Gardan et al. (2003)
subsp. <i>brasiliensis</i>	no new name proposed	potato	Duarte et al. (2004)
subsp. <i>carotovora</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	various hosts	Hauben et al. (1998)
subsp. <i>odorifera</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	chicory, leeks, celery	Hauben et al. (1998)
subsp. <i>wasabiae</i>	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	horseradish	Gardan et al. (2003)
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Pectobacterium chrysanthemum</i>	various hosts	Hauben et al. (1998)
pv. <i>dieffenbachia</i> (2, 3) ^a	<i>Dickeya dieffenbachiae</i>	<i>Dieffenbachia</i> banana, tomato	Samson et al. (2005)
	<i>Dickeya dadantii</i>	geranium, pineapple, carnation, poinsettia, sweetpotato, banana, maize, <i>Philodendron</i> , African violet	Samson et al. (2005)
pv. <i>dianthicola</i> (1, 7, 9)	<i>Dickeya dianthicola</i>	carnation, chicory, artichoke, dahlia, kalanchoë, tomato, potato	Samson et al. (2005)
pv. <i>paradisiaca</i> (3)	<i>Dickeya paradisiaca</i>	banana, maize	Samson et al. (2005)
pv. <i>zeae</i> (3, 8)	<i>Dickeya zeae</i>	maize, pineapple, potato <i>Brachiaria</i> , banana rice	Samson et al. (2005)
pv. <i>chrysanthemi</i> (5, 6)	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	chrysanthemum, tobacco	
pv. <i>parthenii</i> (5, 6)	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	chrysanthemum, guayule, artichoke, chicory, sunflower, tomato, <i>Parthenium</i> , <i>Philodendron</i>	Samson et al. (2005)
<i>Erwinia cacticida</i>	<i>Pectobacterium cacticidum</i>	cacti	Hauben et al. (1998)
<i>Erwinia cypripedii</i>	<i>Pectobacterium cypripedii</i>	orchid	Hauben et al. (1998)

^a*E. chrysanthemi* biovars. For example, *E. chrysanthemi* pv. *dieffenbachia* includes biovars 2 and 3. Biovar 3 strains have also been identified in pathovars *paradisiaca* and *zeae*.

III.3 Description des *pectobacterium*

Pectobacterium carotovorum, *Pba* et *Dickeya spp.* sont des bactéries phytopathogènes qui sont anaérobies facultatives, à flagelles peritriches, bacilles à Gram négatif, 0,5-1,0 de 1,0-3,0 µm de taille et non-sporulées (**Figure 14**) (Agrios, 1997; Charkowski, 2006). *Pectobacterium carotovorum* et *Dickeyes spp.* présentent des pili sur leurs cellules. Ces derniers ne sont pas présents sur les cellules *Pba* (Pérombelon & Kelman, 1980). Toutes les espèces sont catalase positive et oxydase négative. La *pectobacteria* peut être distinguée des autres entérobactéries phytopathogènes par son activité pectinolytique et par les caractéristiques de la colonie sur Crystal Violet pectate moyen (CVP) (Kelman & Dickey, 1988; Charkowski, 2006).

Les bactéries pectinolytiques sont ubiquitaires et peuvent être trouvées dans des débris, sur les racines ou d'autres parties de l'hôte, dans des hôtes alternatifs, dans l'eau, dans le sol et dans les pupes de plusieurs insectes (Van Der Merwe, 2009).

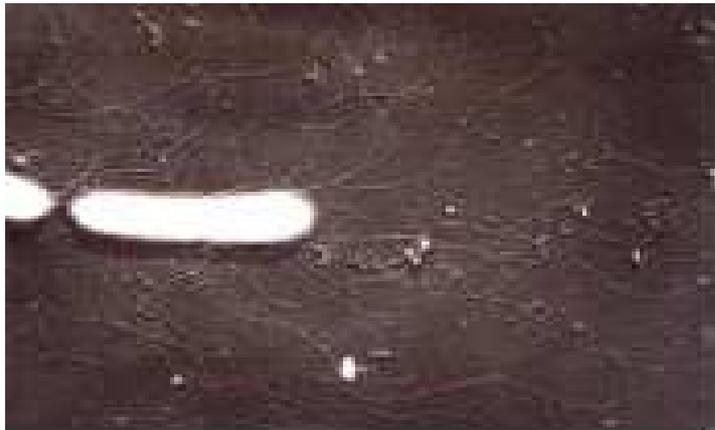


Figure 14: *pectobactérium*, phytopathogène (Van Vaerenbergh, 2012)

III.4 Espèces de *Pectobactérium* associées à la pomme de terre

Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum et *Dickeya chrysanthemi* ont une large gamme d'hôtes, infectant les cultures principalement dans les régions tropicales et subtropicales, tandis que *P. atrosepticum* est limitée presque exclusivement à la pomme de terre dans les régions tempérées, ce qui provoque la pourriture molle des tubercules et la jambe noire des tiges (Tavasoli et al., 2011).

Ces bactéries peuvent causer des dommages graves et sont impliquées dans les maladies de pourriture molle de plusieurs grandes cultures, y compris la pomme de terre, concombre, tomate et carotte (Yahiaoui-Zaidi *et al.*, 2009).

III.4.1. *Pectobacterium carotovorum*

P. c. subsp. *carotovorum*, anciennement *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* est distribué dans une aire géographique étendue, aussi bien dans les zones tempérées que tropicales et sur une gamme d'hôtes très large (Hélias, 2008). Cette espèce cause des maladies de pourriture molle des plantes. Elle dégrade la paroi cellulaire des plantes, provoquant la macération du tissu végétal (Figure 15) (An *et al.*, 2005). *P. c.* subsp. *carotovorum* se développent dans l'intervalle de températures allant de 20°C à 37-40°C (Priou et Jouan, 1996).

Cette espèce produit aussi deux ou plusieurs substances antibactériennes appelées bactériocines qui renforcent sa compétitivité face à des espèces apparentées rivales. Cependant, le mécanisme de sécrétion de bactériocine à faibles masse moléculaire est encore inconnu (Chan *et al.*, 2009).

II.4.2. *Pectobacterium atrosepticum*

P. atrosepticum est la nouvelle appellation d'*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Elle est répertoriée dorénavant comme espèce, *P. atrosepticum* est généralement associée au symptôme de la jambe noire de la pomme de terre dans les régions tempérées (Pérombelon et Kelman, 1980).

Elle se développe préférentiellement entre 15 et 25 °C, entraînant des pourritures des tubercules et des tiges (Figure 15) (Hélias, 2008).

II.4.3. *Pectobacterium chrysanthemi*

Les *E. chrysanthemi* sont désormais intégrées dans le nouveau genre *Dickeya*. Avec une température de croissance optimale élevée (35-37 °C) (Hélias, 2008). *Dickeya* a été jusqu'à présent surtout identifiée sous les climats chauds et en serre. Parmi les six nouvelles espèces décrites dans ce nouveau genre, *Dickeya zaeae* et *Dickeya dianthicola* sont pathogènes pour la pomme de terre (Figure 15) (Samson *et al.*, 2005).



Figure 15: Tubercules infectés par; *Pectobacterium carotovorum* (a) (Van Vaerenbergh, 2012); *Dickeya* (b) (Van Vaerenbergh, 2012). *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca 709) (c) (Yaganza, 2005).

- (A) : Suintement du tubercule qui favorise la dissémination de la maladie en entrepôt;
- (B) : Développement secondaire de moisissure;
- (C) : Chair du tubercule pourri;
- (D) : Sites d'infection.

Les Alcaloïdes des nigelles

IV.1 Les nigelles

IV.1.1 Généralités

Les **nigelles** dicotylédones (**Palese et al., 1990**), sont des plantes herbacées au feuillage finement découpé, de la famille des Renonculacées, appartenant au genre *Nigella* (**tableau II**), du latin « *Nigella* » lui-même de « *niger* » signifiant noir en référence à la couleur des graines des espèces de ce genre (**Palese et al., 1990 ; Guignard., 2001**). Les nigelles sont des plantes annuelles à courte demi-vie et à court cycle de régénération. Ce sont des plantes typiques des sols naturels semi-arides. Il en existe une vingtaine d'espèces, *Nigella sativa* , *Nigella damascena* , *Nigella arvensis*, *Nigella integrifolia*, *Nigella nigellastrum*, *Nigella gallica*, *Nigella glandulifera*, *Nigella Hispanica*, *Nigella Orientalis*... (**Andreas et al., 2005**), toutes originaires d'Eurasie (**Nickavar et al., 2003 ; Tian et al., 2006**).

Nigella sativa et *Nigella damascena* comportent plusieurs noms vernaculaires dans différentes régions du monde (**Tacherfiout, 2008**) (**Annexe I**).

Tableau II: Classification des Nigelles (Guignard, 2001).

	Nomenclature
Règne	Végétale
Sous règne	Cormophyte
Supra embranchement	Rhizophyte
Embranchement	Spermaphyte
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Eudicotylédone
Sous classe	Audicots archaïques
Ordre	Ranunculales
Famille	Renonculacées
Sous famille	Helloboroidées
Genre	<i>Nigella</i>
Espèce	<i>N. sativa</i> , <i>N. damascena</i> , <i>N. Arvensis</i> , <i>N. Hispanica</i> , <i>N. Orientalis</i> ...

Les graines de *Nigella* sont utilisées contre les ulcères, les maladies pulmonaires, et comme agent carminatif, diurétique et vermifuge, elles sont connues aussi comme stimulateur de lactation depuis le moyen âge, ces effets peuvent être dus aux huiles essentielles et aux saponines (**Brückner, 1993 ; Fico et al., 2001**). Elles sont utilisées aussi comme des antidotes pour traiter les morsures de serpents et des piqûres de scorpions (**Andreas et al., 2005**).

IV.1.2 *Nigella damascena*

IV.1.2.1 Description botanique

Nigella damascena est une plante annuelle herbacée (**figure 16**) qui pousse dans les zones tempérées du moyen orient et d'Europe (**Agradi et al., 2001**). Sa tige est glabre de 30cm, striée, feuillée et rameuse dans sa partie supérieure. Ses feuilles sont alternées sessiles et découpées. Ses fleurs, de couleur bleue, sont grandes entourées par une collerette feuillée et multifide. Ses capsules sont lisses et forment par leur soudure complète un fruit renflé, presque globuleux ou ovoïde (**Diane et al., 2007**). Les graines de couleur noire sont ovoïdes aplanies, à trois faces (**Palese et al., 1990**) et aromatiques (**figure 17**) (**Agradi et al., 2001**).



Figure 16: Les différents organes de *Nigella damascena* (à droite) et de *Nigella sativa* (à gauche) (**Andreas et al., 2005**).



Figure 17: Graines de différentes espèces de *Nigella* ; **a** : *N. arvensis*, **b** : *N. damascena*, **c** : *N. hispanica*, **d** : *N. integrifolia*, **e** : *N. nigellastrum*, **f** : *N. sativa*, **g** : *N. Orientalis* (**Andreas et al., 2005**).

IV.1.2.2 Composition chimique de *Nigella damascena*

Les graines de *Nigella damascena* sont très riches en huiles fixes. Le taux des acides gras totaux contenus dans l'huile est de 97% tandis que le pourcentage des acides gras libres s'élève à 30% (Mohan *et al.*, 1965). L'acide linoléique est l'acide gras le plus abondant (47.02%). (Kökdil *et al.*, 2005). Les huiles essentielles représentent 0.5% de la masse totale de la graine. Elles sont composées uniquement de sesquiterpène (100%) ou de monoterpènes représentent plus de 90%. Le composant majoritaire est le β -Elemene qui représente 73.2% (Moretti *et al.*, 2004).

Les graines de *Nigella damascena* contiennent plusieurs composés phénoliques tel que : le 3,4-dihydroxy- β -phénethyl alcool, acide dihydroxyphénylacétique et l'acide dihydroxyphénylacétique méthyle ester (Agradi *et al.*, 2001), le p-coumaric, l'acide caféique, le kaempferol et le kaempferol-3-O-glucopyranoside, et le 1-O-(2,4-dihydroxy) phénylacétyle glycérol (Fico *et al.*, 2001 ; Fico *et al.*, 2004).

IV.1.2.3 Activités biologiques et propriétés pharmacologiques

Certains auteurs attribuent à la graine de *Nigella damascena* le rôle analgésique et diurétique (Fico et Tomè, 1998a), l'huile fixe des graines de *Nigella damascena* est responsable d'un important effet analgésique dû à la présence d'un principe opioïde présent dans cette huile. Elle inhibe aussi la lipoperoxydation non enzymatique dans les liposomes, tandis que la thymoquinone des graines exerce un effet piègeur de radicaux libres (Teuscher *et al.*, 2005).

L'huile essentielle des graines de *Nigella damascena* présente des effets antibactériens contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Cette activité est due aux composés phénoliques et à l'action synergique entre les composés phénoliques et les alcaloïdes (Fico *et al.*, 2004).

L'extrait méthanolique des graines de *Nigella damascena* possède une activité oestrogénique causée par deux composés phénolique : 3, 4-dihydroxy- β -phenethyl alcohol et 2, 4-dihydroxyphenylacetic qui se fixent au récepteur d'oestrogène et exercent le même effet que l'oestrogène dans la régulation de cycle menstruel de la femme (Agradi *et al.*, 2001 ; Agradi *et al.*, 2002).

IV.1. 3 *Nigella sativa*

IV .1.3.1 Aspect botanique

Nigella sativa ou nigelle cultivée (**figure 16**) est une plante annuelle herbacée atteignant 30 à 60 cm de haut. Ses fleurs sont petites à pétales blanchâtres et à sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle, (**Ghedira 2006**).

Les feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères. Les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues (**Bonnier, 1990**).

Les graines de *Nigella sativa* sont ovoïdes de 2 à 3.5mm qui présentent 03 à 04 ongles et la face supérieure et finement granuleuse et réticulée (**figure 17**) (**Andreas et al., 2005**).

IV .1.3.2 Composition biochimique de *Nigella sativa*

Les graines de *Nigella sativa* contiennent des monosaccharides tels que : glucose, ramnose, xylose, arabinose et des polysaccharides non amidonnés sous forme de fibre alimentaire (**Zahoor et al., 2004**), plusieurs vitamines (A, B, B2, C et Niacine) (**Salem, 2005**).

Les huiles fixes de *Nigella sativa* extraits par pression à froid sont majoritairement composées de triglycérides (57,50%) et contiennent une faible fraction de lipides polaires (03,70%), des monoacylglycérol (MG) et diacyl-glycérol (DG) avec des proportions respectives de 04,80% et 05,10%. On y trouve aussi des stérols libres et estérifiés. L'analyse des stérols libres montre que le β -sitostérol représente le composant majeur suivi par le Δ 5-venastérol et le D7-avenastérol, alors que le stigmastérol, le campestérol et le lanostérol ont été trouvés à des taux faibles (**Ramdan et al., 2002**).

L'huile essentielle de *Nigella sativa* constitue 0,4 à 2,5% de la masse sèche de la graine. Ces taux variables sont dus à la méthode et à la durée de distillation (**Morreti et al., 2004**). Les composants essentiels des huiles volatiles de *Nigella sativa* sont des monoterpènes tels que le p-cymène, un monoterpène hydrocarboné ; la carvone, un monoterpène cétonique et le carvacrol, un monoterpène alcoolique. On y trouve aussi les hydrocarbures non terpénoïdes, les sesquiterpènes et les composants propanoïdes phényliques (**Nickavar et al., 2003**).

La graine de *Nigella sativa* est très riche en protéines (20 à 26%). L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés, y compris 8 acides aminés essentiels. Quantitativement, les acides aminés constitutifs majoritaires sont non essentiels (69,81%). Le tryptophane y est absent et l'acide glutamique est fortement présent (24,74%) (**Al-Jassir, 1992 ; salem, 2005 ; El-Obeid et al., 2006**).

IV .1.3. 3 Activités biologiques et propriétés pharmacologiques

Les pays du bassin méditerranéen, principalement le Maroc, l'Algérie, l'Égypte et la Turquie utilisent fortement la graine de *Nigella*, notamment celle de *Nigella sativa* qui est souvent confondue avec la nigelle de Damas ; *Nigella damascena*, dans la médecine traditionnelle comme étant carminative, diurétique, fortifiante, antirhumatismale et antimigraineuse (**Ghedira, 2006**).

Elle est également utilisée contre le rhume, la grippe, la fièvre, les sinusites, l'asthme, les hémorroïdes, dans les affections pulmonaires et les algies dentaires. A faible dose, elle est préconisée comme galactagogue, vermifuge, emménagogue, antipyrétique et antivenimeuse. Par voie locale, elle est employée dans le traitement des verrues, des cors, du vitiligo, des dartres et de la paralysie faciale. En infusion, elle est indiquée dans les nausées, les gastralgies, les vomissements et les coliques. Ecrasées dans l'huile, les graines sont employées comme liniment contre les rhumatismes et elles seraient efficaces contre la constipation et les céphalées. L'huile des graines aurait une action protectrice contre les bronchospasmes. Elle serait antitussive, broncho-dilatatrice, expectorante, anti-hypertensive, diaphorétique, stomachique. En friction, l'huile de la graine est préconisée contre les spasmes musculaires et la sciatique (**Ghedira, 2006**).

IV.2 Les alcaloïdes du genre *Nigella*

IV.2.1 Généralités sur les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azotés, plus ou moins basiques, de distribution restreinte et doués, à faibles doses, de propriétés pharmacologiques marquées. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé (**figure 19**) (**Bruneton, 1999**).

Par ailleurs on distingue aussi certains produits naturels contenant un atome d'azote dans leur structure et qui ne sont pas considérés comme des alcaloïdes (**Bruneton., 1999 ; Cordell et al., 2001**), comme :

- Les Proto alcaloïdes : Constitué de simple amine, les amines Biologiques (Ex : Ephédrine, Mescaline).
- Les Pseudo alcaloïdes : Ils contiennent dans leur structure un atome « N » mais ne dérivent pas d'acide aminé. (Ex. Terminaline, Caféine).

Plus de 12000 structures alcaloïdes sont actuellement connues; ils portent tous la terminaison « ine » (**Figure 18**) (**Guignard, 2000**) et sont en général classés suivant la nature de leur cycle.

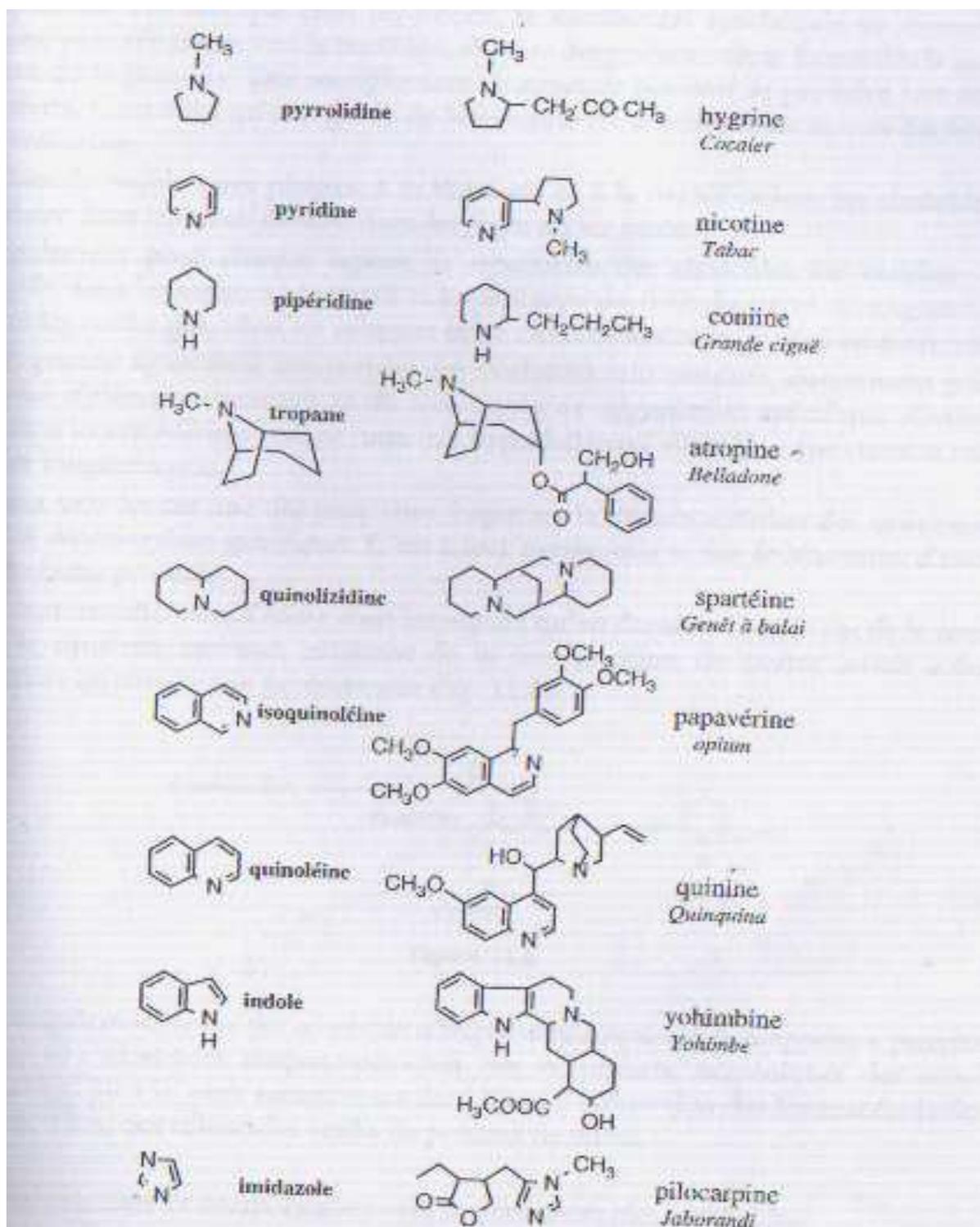


Figure 18: Principaux hétérocycle des alcaloïdes (Guignard, 2000).

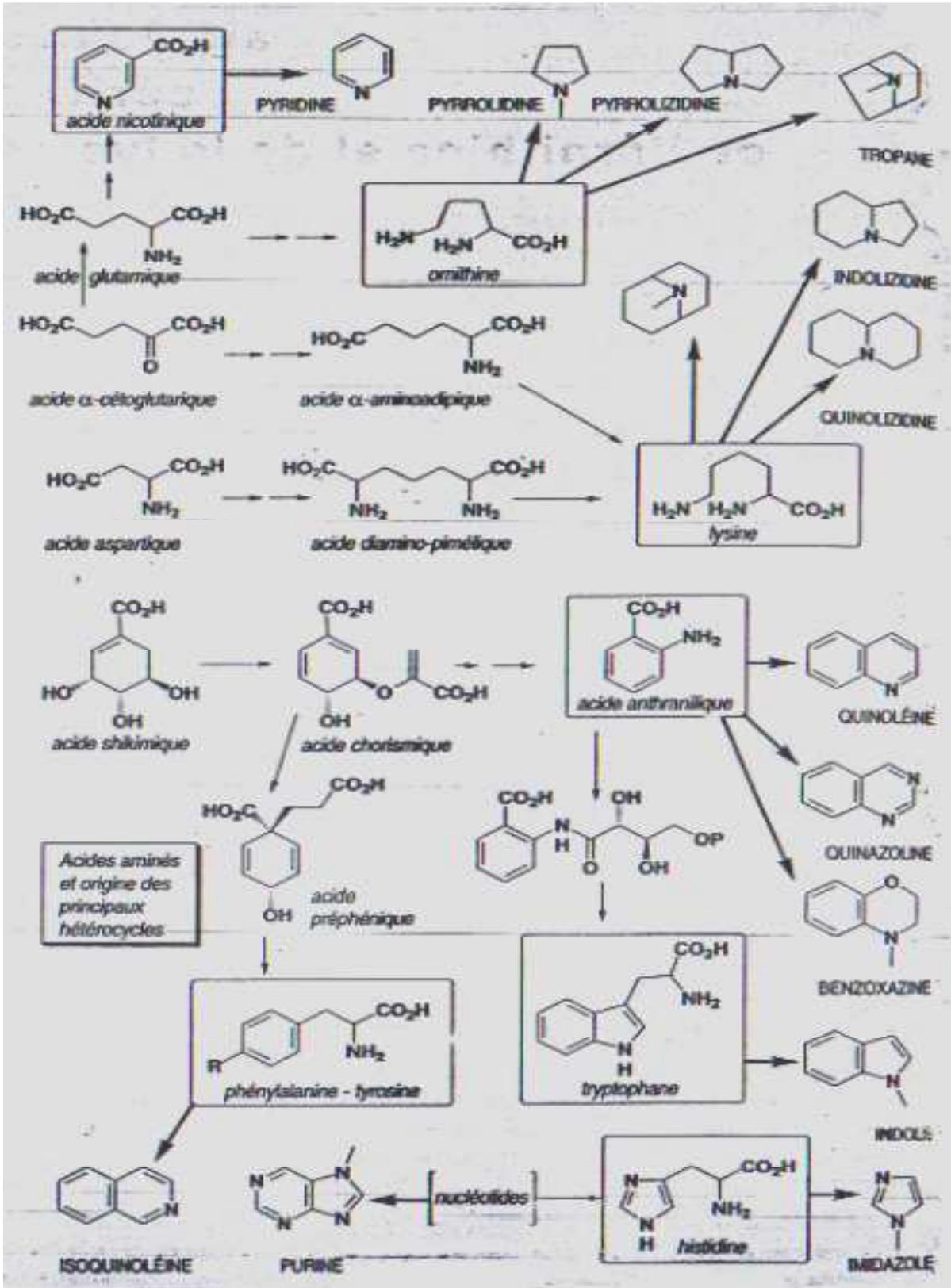


Figure 19: Origine biosynthétique des alcaloïdes (Bruneton, 1999)

IV.2.2 Alcaloïdes des nigelles

Les métabolites secondaires majoritaires du genre *Nigella* sont les alcaloïdes diterpéniques (Atta *et al.*, 1992 ; Agradi *et al.*, 2002). Les alcaloïdes les plus abondants de *Nigella sativa* sont les dollabellanes de type diterpéniques, les nigellamines (figure 20) (Morikawa *et al.*, 2004 ; Labib-Salem., 2005 ; Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007).

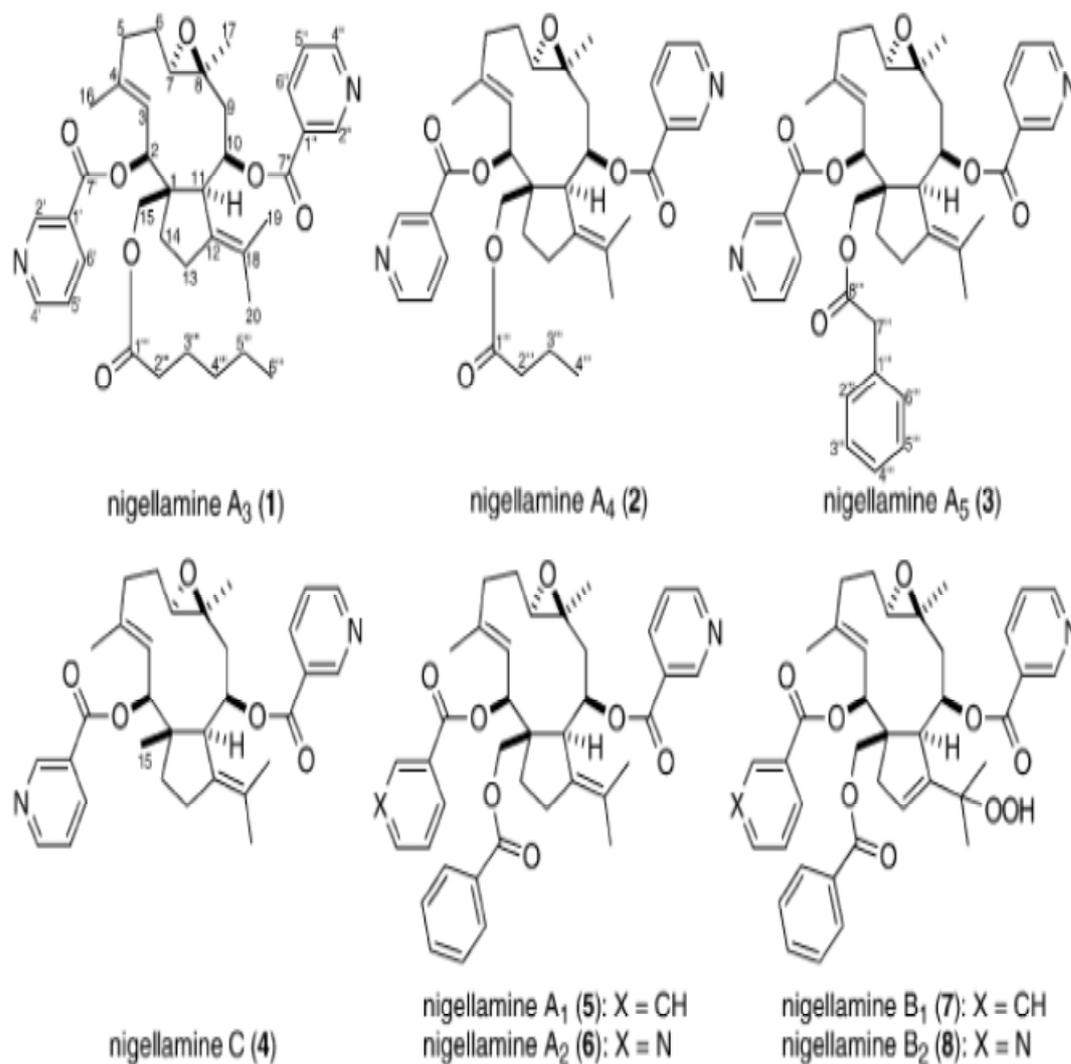


Figure 20: Structure des alcaloïdes de type dollabellanes diterpènes (Morikawa *et al.*, 2004).

Le genre *Nigella* contient aussi des alcaloïdes à noyau imidazole comme la nigellicine, la nigellidine et la nigelganine (Atta *et al.*, 1985 ; Atta *et al.*, 1995) ainsi que des alcaloïdes de type isoquinoléine tels les nigellimines (figure 21)(Khan, 1999) .

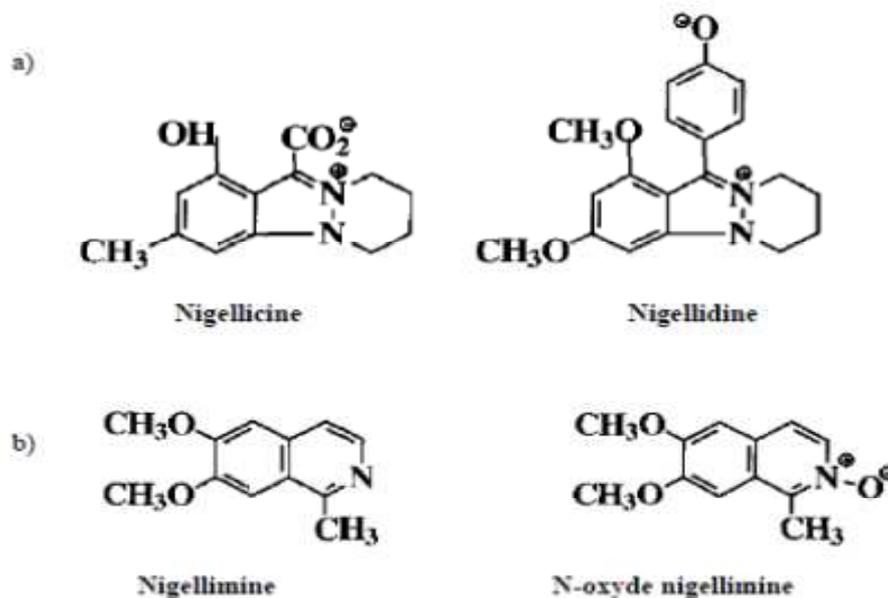


Figure 21: Structure chimique des alcaloïdes à noyau imidazole (a) et des alcaloïdes isoquinoleïques (b) du genre *Nigella*. (Khan., 1999).

La graine de *Nigella damascena* est caractérisée par la présence d'un alcaloïde majoritaire, la damascenine (figure 22) qui représente 0,7% de la masse totale de la graine (Mohan, 1965). Cet alcaloïde est synthétisé à partir de la méthionine via la voie de l'acide chikimique (Munshé et Mothes, 1965).

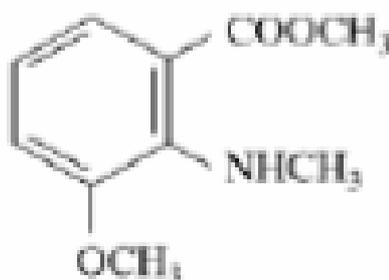


Figure 22: Structure chimique de la damascenine (Fico et al., 2004).

IV.3 Rôle biologique et effets pharmacologiques des alcaloïdes

Le rôle biologique des alcaloïdes est essentiellement celui de phagodétérant ; leur amertume et leur toxicité repoussent les herbivores (Guignard, 2000).

Les alcaloïdes présentent des activités pharmacologiques divers ; antibactérien, Anticancéreux, Stimulant du SNC, Anesthésique, etc. (Marek et al., 2003).

Partie pratique

I-Matériel et méthodes

I.1. Matériel biologique :

I.1.1. Les graines de *Nigella damascena* et *Nigella sativa*

Les graines de *Nigella damascena* sont d'origine Syrienne. Elles ont été achetées chez un herboriste à Bejaia. Ces graines sont de couleur noire très brillante de $5 \pm 0,2$ mm de taille et possède une forme ovoïde aplanie et lisse (**Figure 23**). Le volume, la densité en gros et l'indice des graines de *Nigella damascena* sont de $26,9 \pm 0,05$ cm³ et $0,83 \pm 0,01$ g/cm³, $22,5 \pm 0,35$ g respectivement (**Tacherfiout, 2008**).



Figure 23: Graines de *Nigella damascena* (photographie prise au niveau du laboratoire d'enzymologie).

Les graines de *Nigella sativa* sont d'origine locale, elles sont produites au nord de l'Algérie (Sétif). Une fois réceptionnées, les graines ont été soigneusement nettoyées et conservées à l'abri de la lumière. Ces graines sont de couleur noire très foncée non brillante de $02 \pm 0,1$ mm de taille et possède une forme ovoïde angulaire et granulaire (**Figure 24**). Le volume, la densité en gros et l'indice des graines de *Nigella sativa* sont de $4,88 \pm 0,01$ cm³ et $0,59 \pm 0,04$ g/cm³, $02,89 \pm 0,05$ g respectivement (**Tacherfiout, 2008**).



Figure 24: Graines de *Nigella sativa* (photographie prise au niveau du laboratoire d'enzymologie).

I.1.2. Tubercules de pomme de terre

Les tubercules de pomme de terre de variété *Désirée* ont été achetés à Sétif. Ils sont de forme ovale- long, la couleur de la peau rouge avec une chaire jaune claire (**figure 25**).

Les tubercules de pomme de terre de la variété *Spunta* ont été achetés à Targa ouzamour (wilaya de Bejaia), de forme longue, la couleur de la peau blanche avec une chaire jaune claire (**figure 25**).

La sélection de ces tubercules est basée sur l'absence de tous symptômes spécifiques de pourriture : forme spongieuse, couleur crème à brune, ainsi qu'odeur nauséabonde très caractéristique.



Figure 25 : Tubercules de pomme de terre des variétés *Spunta* à gauche et *Désirée* à droite.

I.1.3. Matériel bactérien

Trois souches de bactéries appartenant aux genres *pectobacterium* et *Dickeya* ont été utilisées comme des agents induisant la pourriture molle. Ces souches bactériennes ont été isolées localement par le professeur Yahiaoui-Zaidi R. à partir des tubercules de pomme de terre symptomatiques. Les trois espèces sont :

La souche 1 : *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum*(Pcc) ;

La souche 2 : *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum* (Pca) ;

La souche3 : *Dickeya spp.*

I.2. Méthodologie

I.2.1. Extraction et caractérisation des alcaloïdes totaux

L'extraction a été effectuée à partir de la poudre de graine selon le protocole décrit par Sousek *et al* (1999) modifié. Les graines une fois débarrassées de la poussière par le lavage ont été séchées à l'étuve (40°C) pendant dix jour, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique.

80g de poudre de chaque espèce de *Nigella sp* ont été divisée en deux masses équivalentes et mises dans deux cartouches. Puis chaque cartouche (40g) est épuisée avec 200 ml de méthanol dans un soxhlet pendant 7h sous une température d'ébullition du méthanol. L'extrait méthanolique séché a été obtenu après évaporation complète dans un évaporateur rotatif puis solubilisé dans 800ml d'HCL de 0,02N.

Ce mélange a subit une délipidation complète dans une ampoule à décanter avec 150ml d'hexane. La phase aqueuse récupérée a été ensuite mélangée à 50 ml du réactif de Mayer (KI 4,9%, HgCl₂ 1,35%).

La suspension obtenue a été filtrée sur papier Wattman n°3 et le précipité est récupéré dans de l'acétone. Après évaporation de l'acétone, les alcaloïdes ainsi obtenus sont pesés puis conservés à température ambiante et à l'abri de la lumière (**Figure 26**).

Le taux d'extraction ou rendement massique est calculé selon la formule suivante (**Bruneton, 1987**).

$$R_d = (m / m_i) \times 100$$

m : masse de l'extrait d'alcaloïdes.
m_i : masse de la matière sèche initiale
R_d : rendement massique

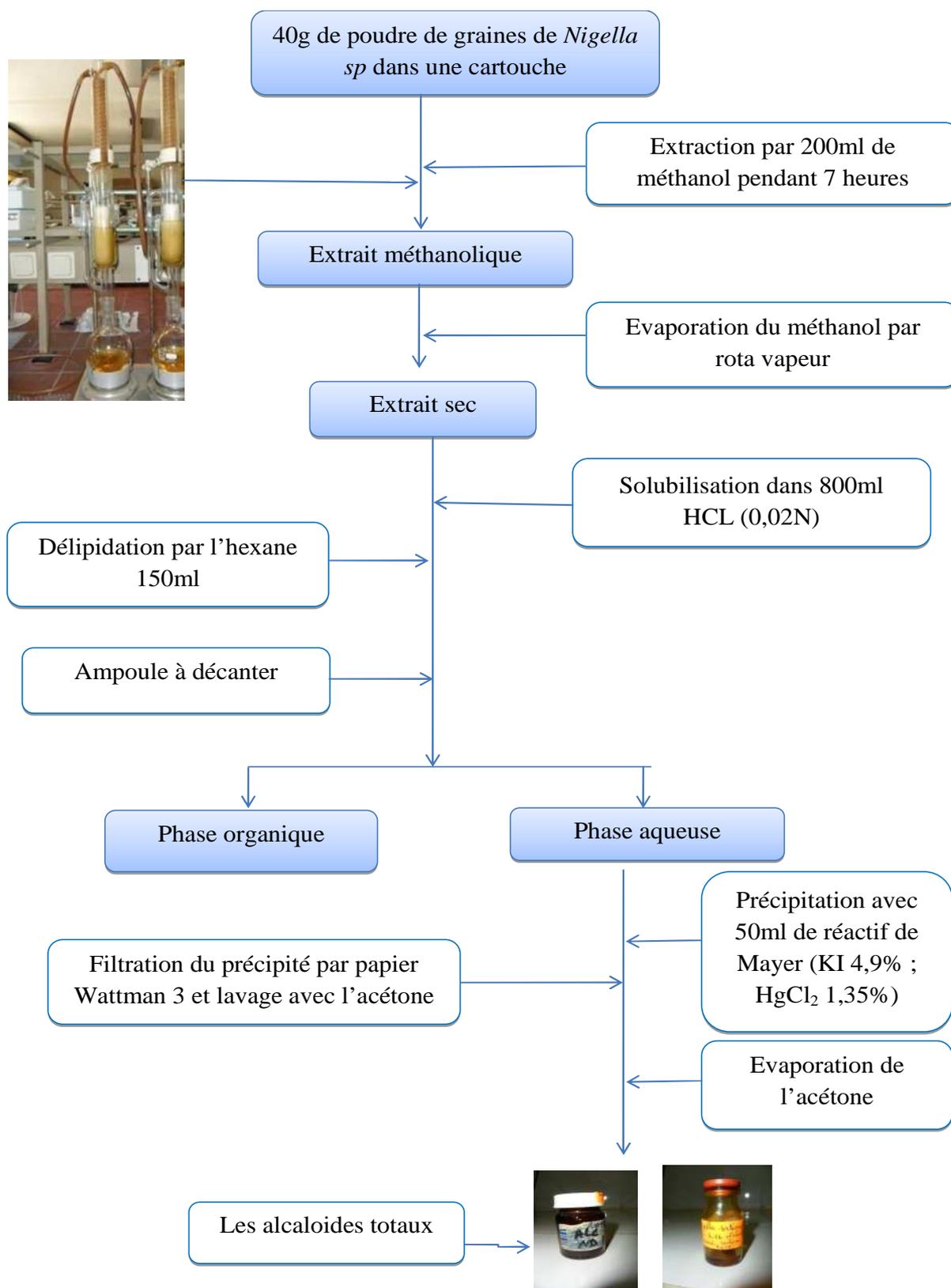


Figure 26: Les étapes d'extraction des alcaloïdes totaux de *Nigella sp* (Sousek et al, 1999).

I.2.2. Analyse par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique, rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation des composants d'un mélange, elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel.

Le système utilisé :

- ✚ La phase stationnaire : plaque de CCM pré-coulée, dont les caractéristiques sont HPTLC gel de silice 60F 54Merck. KGaA. Lot : 013333609.
- ✚ La phase mobile : méthanol/ dichlorométhane : 1/1(V/V).

Les alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* et de *Nigella sativa* ont été analysés sur des plaques de CCM (4,5cm x 10cm x 0,1 mm d'épaisseur). Ces dernières ont été activées à 110°C pendant 5min. 10µl de solution d'alcaloïdes solubilisés dans le méthanol (3 mg/ml) ont été déposés en petits spots à 1 cm du bord de la plaque de migration. Les plaques ont été ensuite placées dans une cuve en verre préalablement saturée par la phase mobile. La migration de différentes fractions dure quelques minutes (20 min) (**figure27**). Après séchage, la plaque de chromatographie a été visualisée par exposition aux UV.



Figure 27: Fractionnement des alcaloïdes totaux par CCM (à gauche les alcaloïdes de *Nigella sativa* et à droite *Nigella damascena*).

La mesure du rapport frontal a été obtenue en utilisant la relation suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la tache}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

I.3. Mode opératoire

I.3.1. Préparation de l'inoculum standard

Chaque souche bactérienne a été ensemencée sur milieu de culture King B, incubée dans une étuve pendant 24h à 27°C afin de la revivifier. Elles ont été conservées à 4°C jusqu'au moment d'utilisation.

L'inoculum a été préparé en ensemencant chaque espèce dans un tube de bouillon nutritif. Une DO de 0.5 a été mesuré afin de standardiser l'inoculum. En effet la densité optique de 0.5 à 585nm correspond à une charge bactérienne de 10^8 de cellules /ml.

I.3.2. Test in vivo des alcaloïdes totaux :

- **Préparation des tubercules de pommes de terre**

Les tubercules de chaque cultivar ont été lavés dans l'éthanol à 20% pendant 15min pour désinfecter les pommes de terre, ensuite ils ont été rincés à l'eau distillée et séchés pendant 12h. Chaque tubercule a été coupé longitudinalement en deux parties presque identiques. Un puits de 10mm de diamètre/10mm de longueur a été réalisé à l'emporte-pièce, stérilisé avec du l'éthanol à 75%. Après, ils ont été pesés pour noter leurs masses initiales à l'aide d'une balance puis les demi-tubercules ont été mis sur du papier absorbant humidifié avec 100ml de l'eau distillée stérile et placés dans des boîtes en plastiques (**Figure 28**).



Figure 28: Tubercules disposés dans des boîtes humidifiées.

- **Préparation des solutions des alcaloïdes**

La solution alcaloïdique a été préparée en solubilisant 20 mg d'alcaloïde de chaque espèce de *Nigella .sp* dans 1ml de DMSO et 9ml du tampon phosphate (PH=7.4, M=0.1). Plusieurs dilutions ont été réalisées à partir de cette solution :

- ✚ 2mg de chaque espèce de *Nigella sp* et 1ml de DMSO et 9ml de tampon phosphate pour obtenir une concentration de 200µg/ml.
- ✚ 1mg de chaque espèce de *Nigella sp* et 1ml de DMSO et 9ml de tampon phosphate pour obtenir une concentration de 100µg/ml.
- ✚ 0.5mg de chaque espèce de *Nigella sp* et 1ml de DMSO et 9ml de tampon phosphate pour obtenir une concentration de 50µg/ml.

- **Le test**

100µl de chaque solution alcaloïdique de chaque espèce ont été déposée au fond de chaque puits de demi- tubercules (Trois essais pour chaque concentration), puis les laissés pendant 24h pour optimiser la diffusion des alcaloïdes.

Après avoir préparé les suspensions bactériennes, 100µl ont été déposés dans les demi-tubercules traités au préalable avec la solution d'alcaloïdes. Plusieurs témoins ont été préparés :

- ✚ En utilisant *Pca* seul, *Pcc* seul, *Dk* seul ;
- ✚ Avec 1ml de DMSO et 9ml de tampon phosphate ;
- ✚ Avec 1ml de DMSO et 9ml de tampon phosphate et *Pcc* ;
- ✚ Avec 1ml de DMSO et 9ml de tampon phosphate et *Pca* ;
- ✚ Avec 1ml de DMSO et 9ml de tampon phosphate et *Dk*.

Enfin, les boîtes ont été couvertes à l'aide d'un film alimentaire afin de créer une atmosphère confinée et humide. Après trois jours d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, le développement de la pourriture molle a été noté en pesant les demi-tubercules après l'incubation et en déterminant la masse du tissu pourri par la pesée.

I.3.3. Etude de la toxicité des alcaloïdes totaux sur la pomme de terre

• Méthode

La toxicité des alcaloïdes a été estimée par l'évaluation de la fuite des électrolytes. Les tubercules de chaque cultivar ont été lavés et imbibés dans l'éthanol à 20% pendant 15min, ensuite, rincés deux fois à l'eau distillée et séchés à l'aire libre. Après, ils ont été coupés en cubes de dimension (1x1x1cm). Six (06) cubes de chaque variété de pomme de terre ont été mis dans des béchers. Leur masse moyenne est de 1,29g.

Le test a été organisé de la façon suivante :

- ✚ Bécher 1 contenant 80mg d'alcaloïdes de *N.sativa* solubilisés préalablement dans 2ml de DMSO et 38ml de l'eau distillée stérile ensuite en ajoutant 06 cubes de pomme de terre variété *Spunta*.
- ✚ Bécher 2 contenant 80mg d'alcaloïdes de *N.sativa* solubilisés préalablement dans 2ml de DMSO et 38ml de l'eau distillée stérile ensuite en ajoutant 06 cubes de variété *Désirée*.
- ✚ Bécher 3 contenant 80mg d'alcaloïdes de *N.damascena* solubilisés préalablement dans 2ml de DMSO et 38ml de l'eau distillée stérile ensuite en ajoutant 06 cubes de la variété *Spunta*.
- ✚ Bécher 4 contenant 80mg d'alcaloïdes de *N.damascena* solubilisés préalablement dans 2ml de DMSO et 38ml de l'eau distillée stérile ensuite en ajoutant 06 cubes de variété *Désirée*.
- ✚ Bécher 5 contenant 38ml de l'eau distillée stérile ensuite en ajoutant 06 cubes de variété *Spunta*, utilisé comme témoin.
- ✚ Bécher 6 contenant 38ml de l'eau distillée stérile ensuite en ajoutant 06 cubes de variété *Désirée*, utilisé comme témoin.

Après la mise des cubes dans les béchers, on a mesuré la conductivité à l'aide d'un conductimètre avec un intervalle de temps de 30min (**figure29**).



Figure 29 : le résumé du test de toxicité

II-Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

II.1 Taux d'extraction des alcaloïdes totaux de *N. sativa* et *N.damascena* :

Le taux d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

Rd (rendement massique) = masse de l'extrait alcaloïde x 100/ masse de la matière sèche initiale (**Bruneton, 1987**). Les rendements d'extraction ainsi calculés 2,82% et 3,43% pour *N. sativa* et *N. damascena* respectivement.

II.2 Analyse des alcaloïdes totaux par CCM :

L'analyse qualitative de l'extrait d'alcaloïdes de *Nigella damascena* et de *Nigella sativa* sur CCM a permis de distinguer 03 taches pour *Nigella damascena* et 02 taches pour *Nigella sativa*. Les Rf correspondant à chaque tache ont été calculés et présentés sur le tableau suivant :

Tableau III: le résumé des résultats de CCM.

<i>Nigella sp</i>	Nombre de taches	Les rapports frontaux	Abondance	L'absorbances	Substances probables
<i>Nigella damascena</i>	Trois taches	Rf ₁ : 0,95	+	360 nm	Damascenine
		Rf ₂ : 0,93	+		Damascinine
		Rf ₃ : 0,87	-	253 nm	-
<i>Nigella sativa</i>	Deux taches	Rf ₁ : 0,93	+	253 nm	Nigellamine
		Rf ₂ : 0,86	-		Negellidine

Légende :

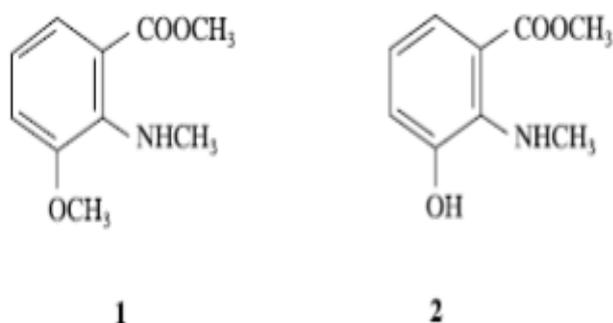
+ : Densité de la tache élevée.

- : Densité de la tache faible.

Les résultats de la CCM montrent que *N. damascena* renferme 03 taches différentes dont les Rf sont 0,95, 0,93 et 0,87 respectivement. Les deux premières taches absorbent à 360 nm alors que la dernière n'absorbe qu'à 253 nm. *N.sativa* donne deux taches. Les Rf sont 0,93 et 0,86. Elles absorbent à 253 nm.

Fico et al. (2004) ont découvert que les graines de *Nigella damascena* possèdent deux alcaloïdes majeurs de structures presque identiques : Damascenine (3-methoxy-2-methylamino) benzoic acid methyl ester) (**1**) et damascinine (3-hydroxy-2-(methylamino) benzoic acid methyl ester) (**2**) (Fico et al., 2004).

Ces deux alcaloïdes peuvent correspondre aux deux taches (Rfs : 0,95, 0,93) détectées sur la CCM de *N.damascena*. La troisième tache détectée pour *N.damascena* peut probablement correspondre aux alcaloïdes mineurs qui peuvent exister. Cas des alcaloïdes de type isoquinoléine, indolique ou diterpénique qui absorbent aussi à 253nm et de Rf est de 0,87.



L'analyse de taches détectées chez *N.sativa* permet de dire qu'ils peuvent correspondre à la Nigellamine et Nigellidine du fait qu'elles ont, dans les mêmes conditions de CCM, les mêmes rapports frontaux (Rf).

Les métabolites secondaires majoritaires du genre *Nigella* sont les alcaloïdes diterpéniques (Atta et al., 1992 ; Agradi et al., 2002). Les alcaloïdes les plus abondants de *Nigella sativa* sont les dollabellanes de type diterpéniques, les nigellamines (Morikawa et al., 2004 ; Labib-Salem., 2005 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007).

Atta-ur-Rahman et al. (1995) ont indiqué que la Nigellidine (C₁₉H₂₀N₂O₂) absorbe dans l'intervalle de 230, 280, et 328 nm.

Toshio Morikawa et al. (2004) ont observé que le maxima absorbance des Nigellamines est dans l'intervalle de 217 et 264nm.

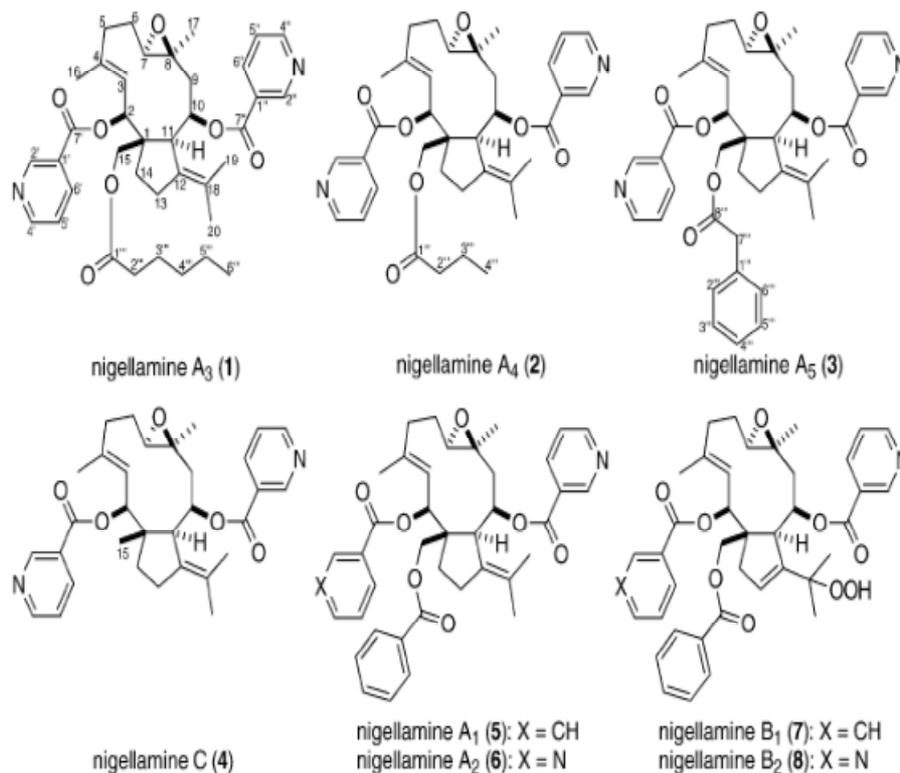


Figure 30: Structure des alcaloïdes de type dollabellanes diterpènes (Morikawa *et al.*, 2004).

II.3 Description de la pourriture molle engendrée par *Pcc*, *Pca* et *Dk*

Les tests d'inoculation des demi-tubercules de deux variétés de pomme de terre (*Spunta*, *Désirée*) par les trois souches de bactéries pectinolytiques (*Pcc*, *Pca* et *Dk*) ont montré un net l'effet pathogène de ces souches : développement de la pourriture molle caractéristique de ces souches.

Les symptômes de pourriture sont typiques pour chaque souche et chaque variété de pomme de terre.

- Les symptômes causés par *Pca* sur la variété *Désirée* sont caractérisés par une pourriture foncée et humide entourée d'un halo noir marquant une frontière avec les tissus sains. Ceux provoqués par *Pcc* sont un peu humides, de couleur marron clair et l'étendue de la surface nécrosée est plus réduite. Les symptômes causés par *Dk* sont caractérisés par une pourriture claire entourée d'un halo noir marquant une frontière avec les tissus sains, très humide et l'étendue de la surface nécrosée est réduite (**Figure 31**).

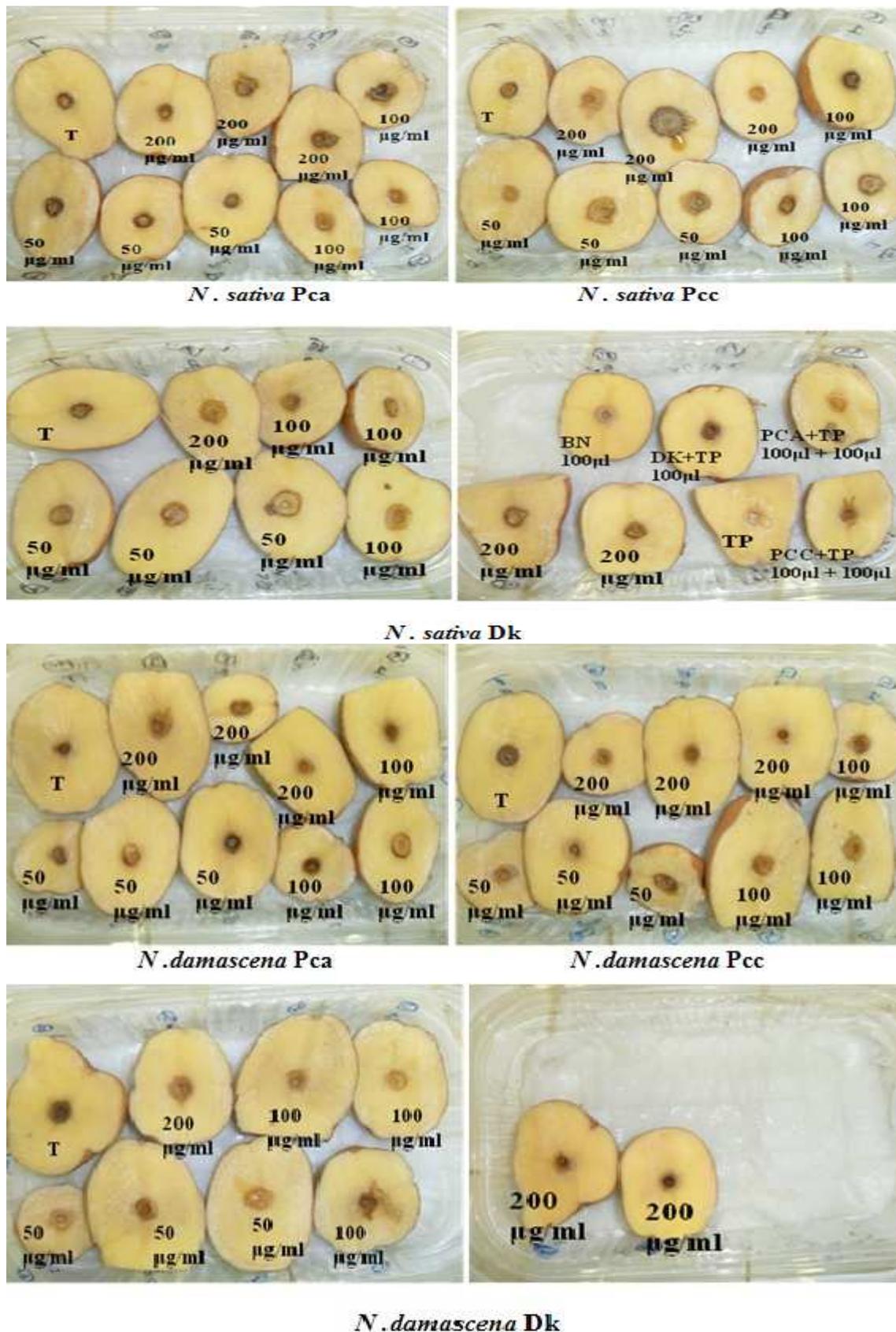


Figure 31 : Symptôme de pourriture engendrée par les trois souches de bactérie en présence des alcaloïdes de *Nigella* sp. sur variété Désirée.

- *Pcc*, *Pca* et *Dk* provoquent une pourriture molle qui est caractérisée par une apparence humide, une consistance légèrement granuleuse de couleur blanche à crème noircissant au périphérique du tissu malade, dégageant une odeur nauséabonde. (Figure 32).

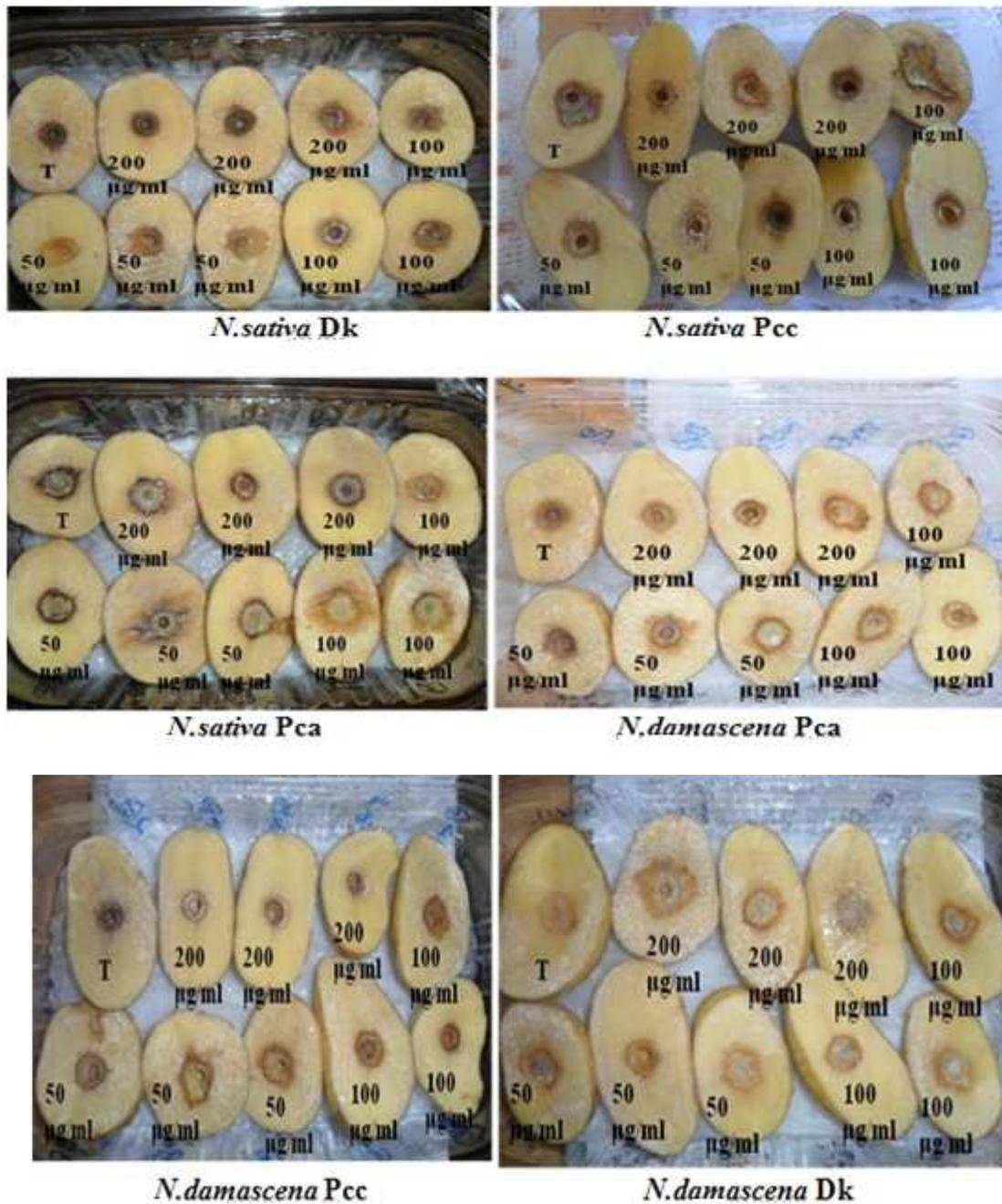


Figure 32 : Symptômes de pourriture engendrée par les trois souches de bactérie en présence des alcaloïdes de *Nigella sp* sur variété *Spunta*.

Afin de mieux apprécier l'effet des trois souches nous avons comparé les aspects de pourritures engendrées par les différentes souches pectinolytiques testées aux différents témoins négatifs, à savoir témoin en présence de tampon phosphate seul, témoin avec tampon phosphate + DMSO et témoin avec bouillon nutritif seul. Ces témoins sont utilisés pour chaque test. Les résultats sont présentés sur la figure suivante (**figure 33**) :



Figure 33: Aucun effet du tampon phosphate, DMSO et bouillon nutritif sur les demi-tubercules variété *Spunta* à droite et *Désirée* à gauche.

Les résultats montrent bien qu'aucun effets similaire à la pourriture produite par les trois souches : *Pcc*, *Pca* et *DK*.

II. 4-Effet des alcaloïdes totaux des *Nigella sp.* sur la pourriture molle de la pomme de terre

L'effet antibactérien sur les demi-tubercules de pomme de terre de chaque variété a été estimé par l'évaluation de la masse pourrie en fonction des concentrations des alcaloïdes de *Nigella sp.* Les taux de réduction de la pourriture en fonction des concentrations des alcaloïdes de *Nigella sp.* ont été calculés afin de mieux apprécier l'effet des alcaloïdes sur les souches *Pcc*, *Pca* et *DK*.

II.4.1. Etude de l'effet des alcaloïdes sur la variété *Spunta*

- Effet des alcaloïdes de *N.sativa* contre les *pectobactérium* chez variété *Spunta*

L'effet des alcaloïdes de *N.sativa* contre *Pcc*, *Pca* et *Dk* a été évalué par la mesure des quantités de pourriture engendrée par ces souches, Après l'inoculation des demi-tubercules de la variété *Spunta*.

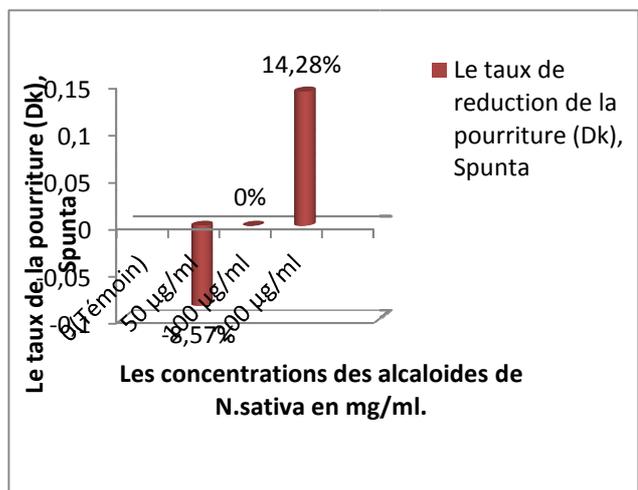
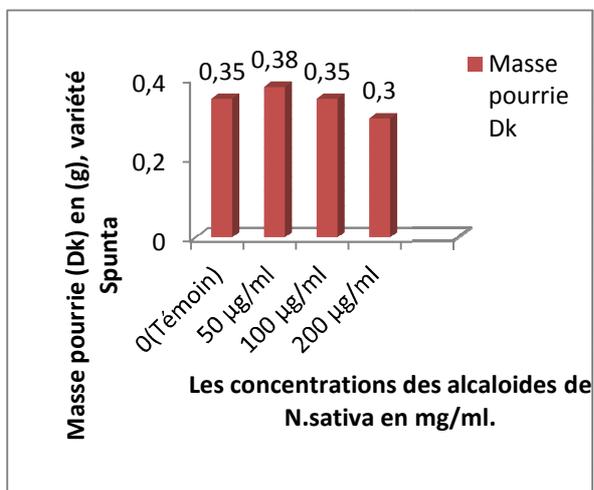
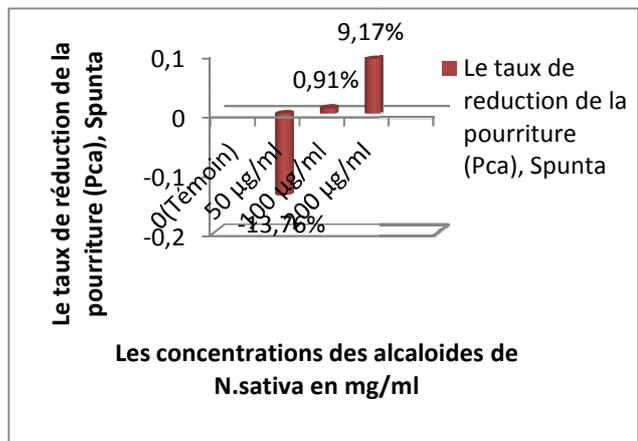
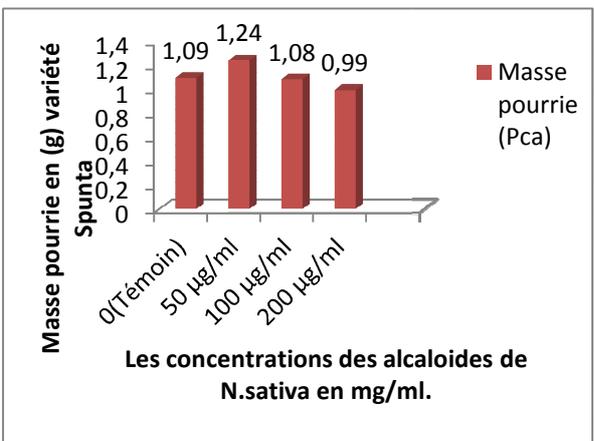
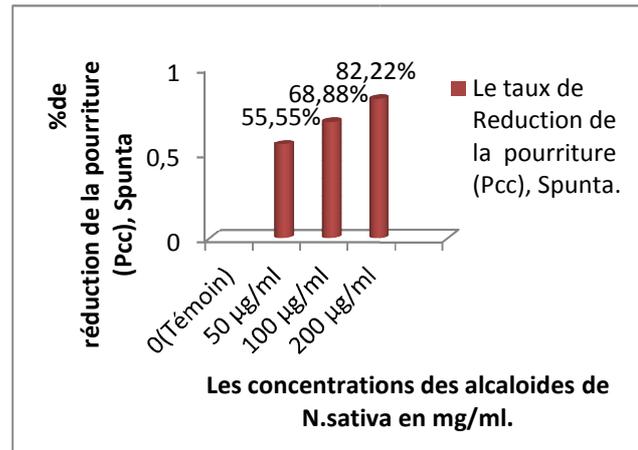
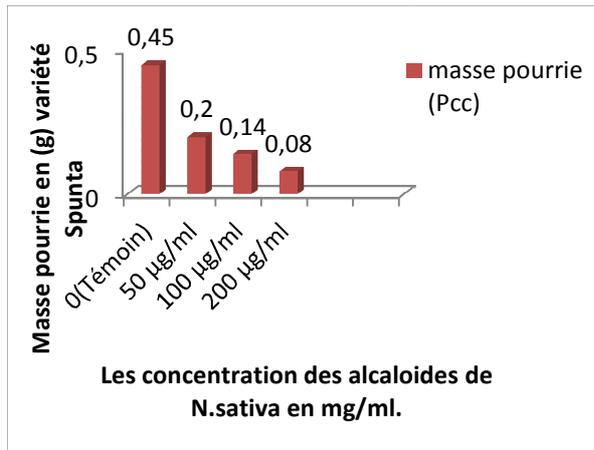


Figure 34 : L'évolution de la masse pourrie, variété *Spunta*, en fonction des concentrations des alcaloïdes de *N.sativa*.

Figure 35 : Le pourcentage de réduction de la pourriture, variété *Spunta*, en fonction des concentrations des alcaloïdes de *N.sativa*.

Les résultats présentés sur **les figures 34, 35** montrent que :

Les alcaloïdes de *N.sativa* sont actifs sur *Pcc*. Cela se traduit par une diminution très significative de la pourriture. Pour la concentration de 200µg/ml le taux de réduction de la pourriture est de 82,22% ; et pour la concentration de 100µg/ml on note un taux de réduction de la pourriture de 68,88% et enfin à 50µg/ml, le taux de réduction du tissu pourri est de 55,55%.

Absence d'effet des alcaloïdes de *N.sativa* sur *Pca*. Le même cas est observé pour *Dk*.

- **Effet des alcaloïdes de *N. damascena* contre les *pectobactérium* chez variété *Spunta***

L'effet des alcaloïdes de *N. damascena* sur la masse de pourriture molle produites par les trois souches *Pcc*, *Pca* et *Dk* sur la variété *Spunta* est présenté sur **les figures 36, 37**

L'évaluation de la masse de pourriture de *Spunta* engendrée par *Dk* montre, que les alcaloïdes de *N.damascena* ont un effet très significatif : à concentration de 200µg/ml on note une réduction de la pourriture de 61,58% contre une réduction de la masse de la pourriture de la pourriture de 57,24% et 48,96% à des concentrations des alcaloïdes de *N.damascena* respectives de 100µg/ml et 50µg/ml.

Un effet moins marqué est observé sur *Pca*. En effet, Les alcaloïdes de *N.damascena* ne réduisent la pourriture que de 42,10% pour la concentration maximale de 200µg/ml.

De la même manière ; *Pcc* semble moins affectée que les deux précédentes souches : à concentration de 200µg/ml d'alcaloïde de *N.damascena*. Les taux de réduction de la masse de pourriture n'est que de 13,18%.

De ce qui précède, et en comparant les effets des alcaloïdes de *N .sativa* et ceux de *N. damascena* , on retient ce qui suit :

- Les alcaloïdes de *N.sativa* sont plus efficaces sur *Pcc* .Alors les alcaloïdes de *N.damascena* le sont sur *Dk*.
- Les taux de réduction de la masse de pourriture sont plus importants avec les alcaloïdes de *N.sativa* (atteignent 82,22% sur *Pcc*) contre 61,58% pour les alcaloïdes de *N. damascena* sur *Dk*.

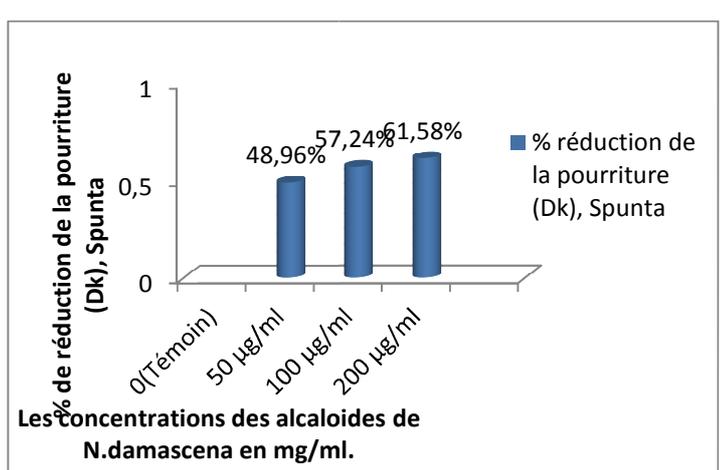
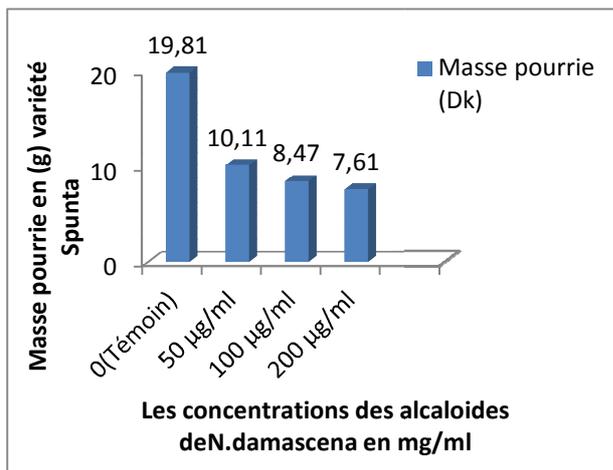
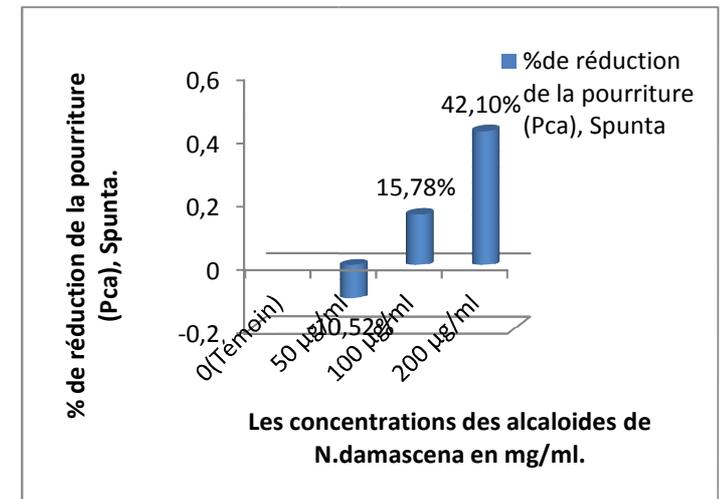
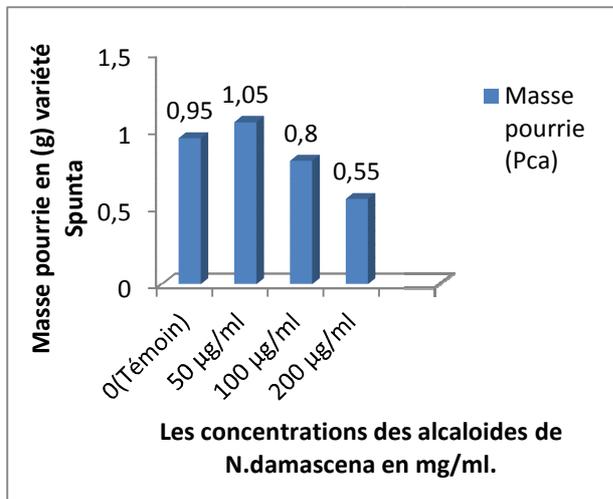
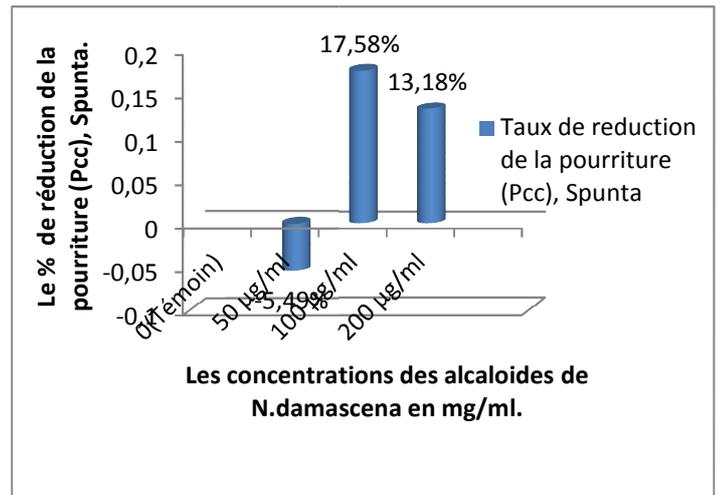
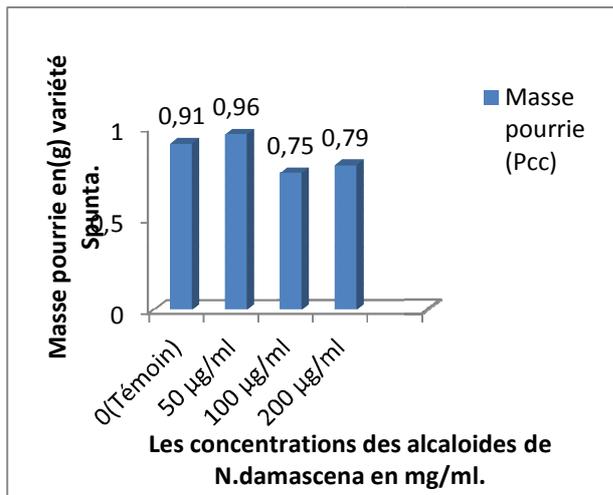


Figure 36 : L'évolution de la masse pourrie, variété *Spunta*, en fonction des concentrations des alcaloïdes de *N.damascena*.

Figure 37 : Le pourcentage de réduction de la pourriture, variété *Spunta*, en fonction des concentrations des alcaloïdes de *N.damascena*.

II.4.2. Etude de l'effet des alcaloïdes sur la variété *Désirée*

- Effet des alcaloïdes de *N.sativa* contre les *pectobactérium* chez variété *Désirée*

Les résultats de l'étude de l'effet des alcaloïdes de *N.sativa* sur la pourriture engendrée par *Pcc*, *Pca* et *Dk* sur la variété *Désirée*, ainsi que les taux de réduction de cette pourriture sont présentés sur les **figures 38** et **39**.

Les résultats montrent que les alcaloïdes de *N.sativa* ont plus d'effet sur *Dk* avec un taux de réduction de la masse pourrie de 49,48% pour une concentration de 200µg/ml. La réduction du taux de pourriture est de 22,68% et 13,91% pour les concentrations de 100µg/ml et 50µg/ml respectivement.

On note aussi que les alcaloïdes de *N.sativa* agissent d'une manière similaire sur *Pcc* et *Pca*. Ils réduisent la masse pourrie de 40,47% et 45,74% pour les deux souches respectives. Ces valeurs sont obtenues à concentration de 200µg/ml. A plus faible concentration (100µg/ml), les alcaloïdes de *N.sativa* réduisent le taux de pourriture engendrée par *Pcc* de 23,80% alors qu'à cette concentration, ces alcaloïdes ne réduisent la pourriture engendrée par *Pca* qu'à 10,63% et inversement, à 50µg/ml on a peu d'effet sur *Pca* (10,63%) que sur *Pcc* (-19,04) (pour cette dernière valeur on peut la considérer comme absence d'effet).

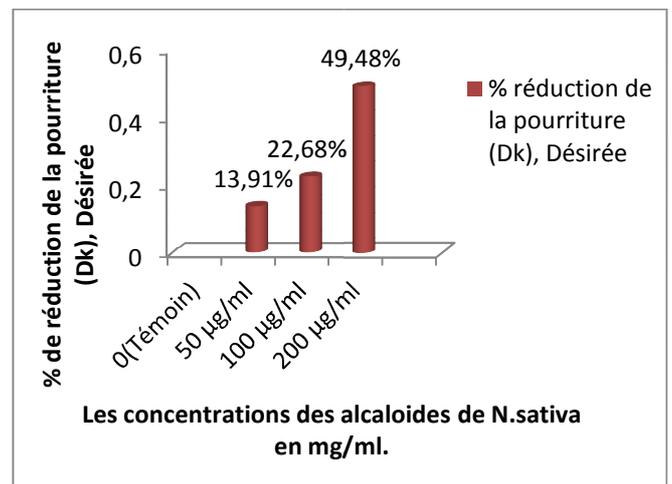
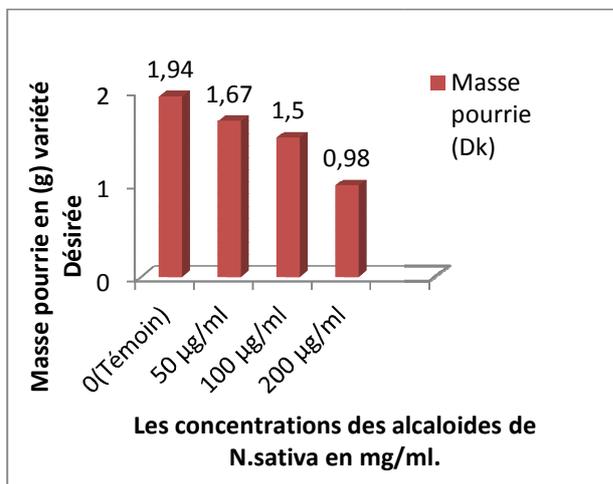
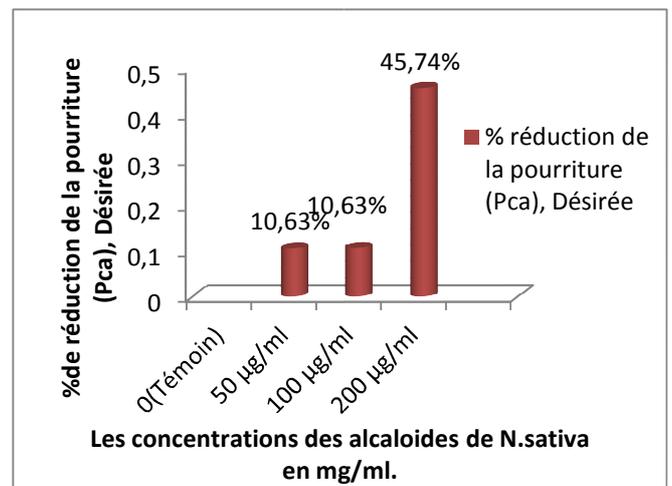
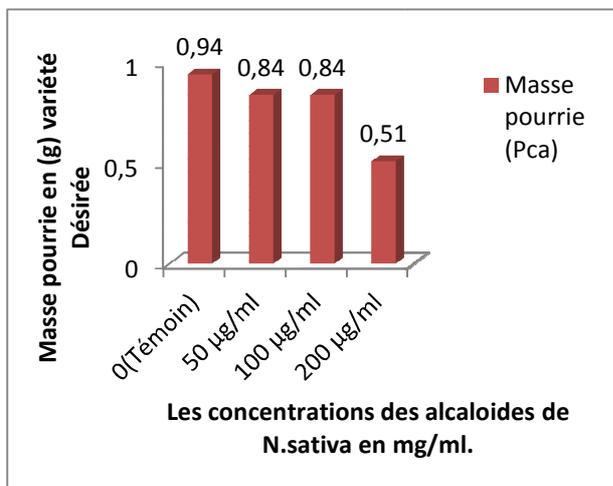
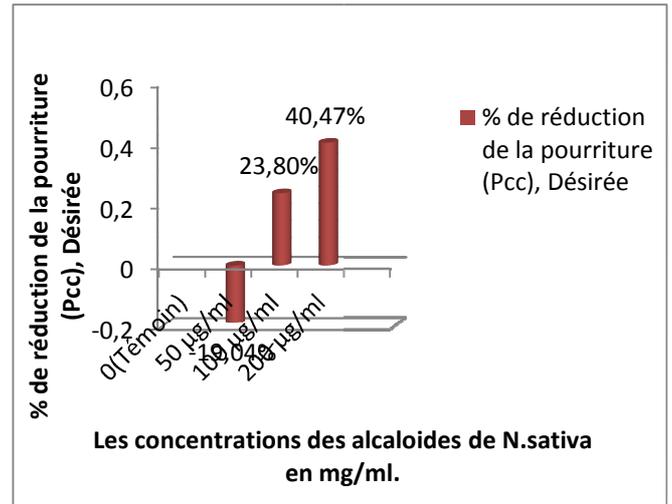
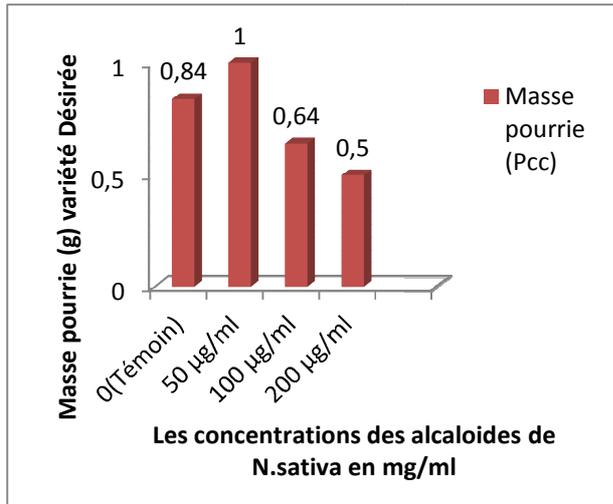


Figure 38 : Evolution de la masse de pourriture, chez la variété Désirée, en fonction des alcaloïdes de N.sativa

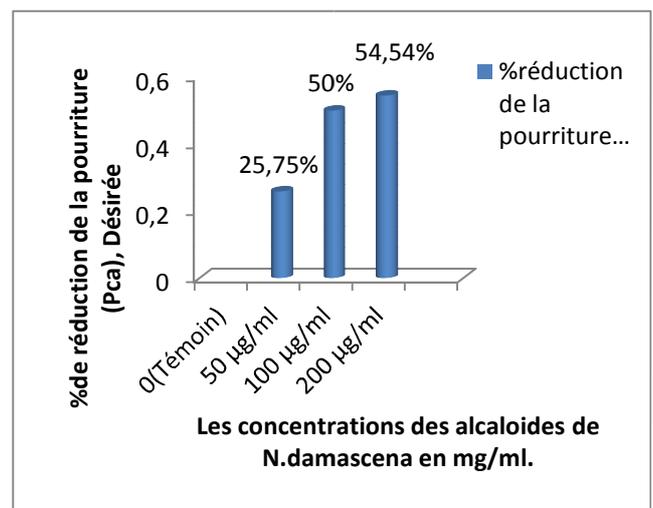
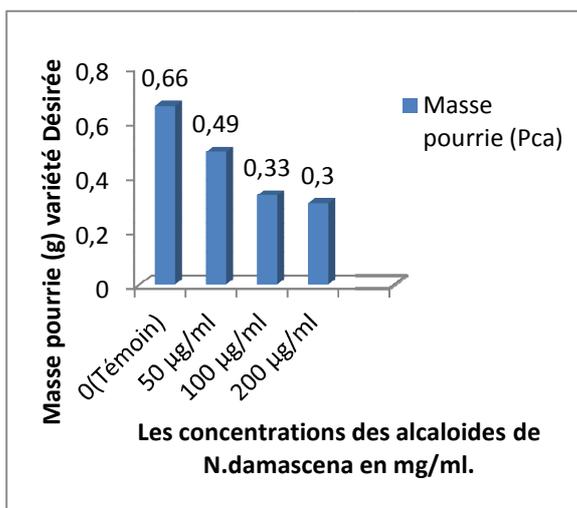
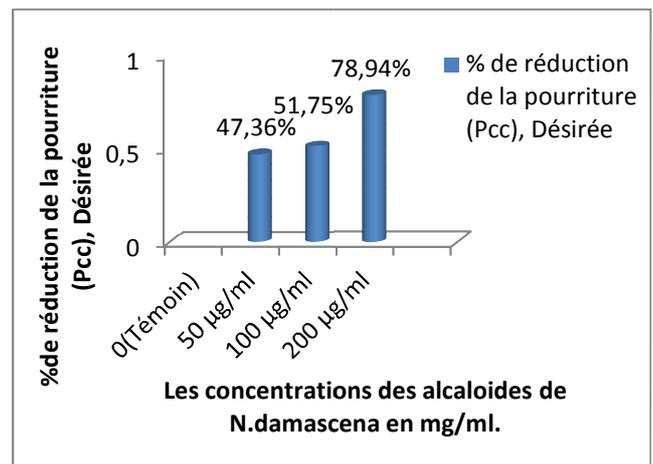
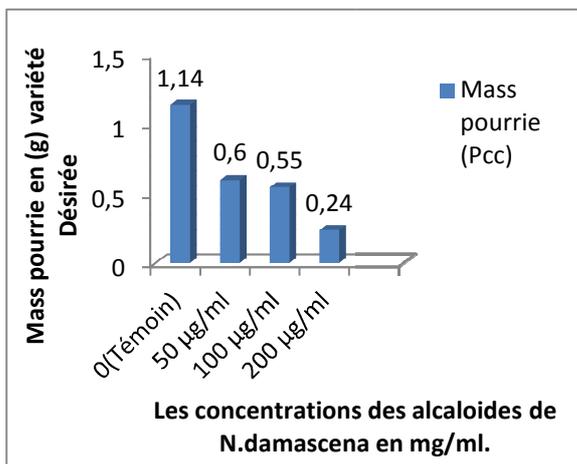
Figure 39 : Le pourcentage de réduction de la pourriture, variété Désirée, en fonction des concentrations des alcaloïdes de N.sativa

- Effet des alcaloïdes de *N.damascena* contre les *pectobactérium* chez variété *Désirée*

Les résultats de l'effet des alcaloïdes de *N.damascena* sur la masse de pourriture engendrée par *Pcc*, *Pca* et *Dk* sont présentés sur les figures 40 et 41.

Les résultats montrent que les alcaloïdes de *N.damascena* agissent mieux sur *Pcc*. Le taux de réduction de la pourriture a été estimé à 78,94% pour une concentration de 200µg/ml. L'effet est dépendant de la concentration. Les alcaloïdes de *N.damascena* agissent avec moins d'efficacité sur *Pca*. Le taux de réduction de la pourriture à la même concentration de 200µg/ml est de 54,54.

L'effet est encore plus faible sur *Dk* : 30,95% pour la concentration de 200µg/ml.



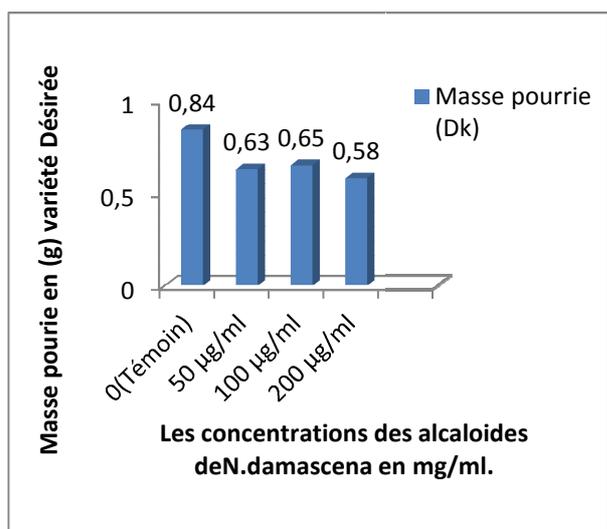


Figure 40 : L'évolution de la masse pourrie, variété *Désirée*, en fonction des concentrations des alcaloïdes de *N. damascena*.

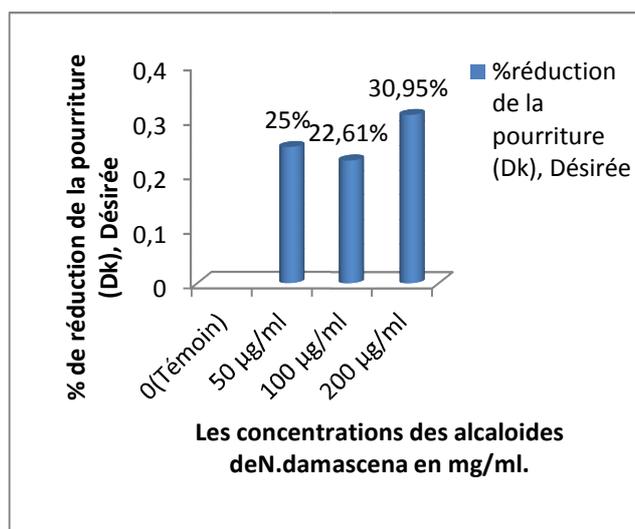


Figure 41 : Le pourcentage de réduction de la pourriture, variété *Désirée*, en fonction des concentrations des alcaloïdes de *N. damascena*.

La comparaison de l'effet des alcaloïdes de *N. sativa* et les alcaloïdes de *N. damascena* sur la variété *Désirée* montre que les alcaloïdes de *N. damascena* ont plus d'effet sur *Pcc* avec un taux de réduction maximal de 78,94% contre un effet de *N. sativa* sur la même souche (40,47%).

Les alcaloïdes de *N. damascena* sont aussi plus efficaces contre *Pca* comparé à l'effet de *N. sativa*. À l'inverse, les alcaloïdes de *N. sativa* semblent plus actifs sur *Dk*.

En comparant de l'effet des alcaloïdes de *Nigella sp* sur la variété *Spunta* et *Désirée* on observe que les alcaloïdes de *N. sativa* sont plus actifs sur *Dk* sur la variété *Désirée* avec un taux de réduction maximal de la pourriture de 49,48%. À l'inverse, ces mêmes alcaloïdes sont beaucoup plus significatifs sur *Pcc* sur la variété *Spunta* avec un taux de réduction maximal de la pourriture de 82,22%.

Les alcaloïdes de *N. damascena* sont plus efficaces contre *Dk* sur variété *Spunta* avec un taux de réduction maximal de la pourriture de 61,58% et sur la variété *Désirée*, ils ont plus d'effet sur *Pcc* et *Pca* avec un taux de réduction maximal de la pourriture de 78,94% et 54,54% respectivement.

Ce qui précède on peut conclure que la nature de la variété de la pomme de terre semble interférer avec l'interaction alcaloïde/ bactérie.

Les effets antibactériens des nigelles ont été déjà étudiés par Landa et *al.* (2006). Leur résultats montrent que les extraits méthanolique des graines de *N.sativa* et *N.damascena* sont actifs in vitro contre une large gamme de bactérie Gram négatif (*Bacteroides fragilis*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*).

Selon Fico et *al.* (2004). Les alcaloïdes de *N.damascena* (damascenine et damascinine) ont un effet bactériostatique sur ces deux bactéries : *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-négatif) et *Staphylococcus aureus* (Gram positif).

Différents extraits bruts issus de la graine de *N.sativa* ont été testé vis-à-vis de germes antibiorésistants (16 Gram négatifs et 6 Gram positifs). Les alcaloïdes totaux et le décocté se sont révélés être les extraits les plus actifs, notamment à l'égard des bactéries Gram négatifs (Morsi, 2000).

Des études ont été faites pour prouver l'effet antibactérien des alcaloïdes de différentes plantes, parmi eux on cite Nenaah, (2010) qui confirme dans son étude que les alcaloïdes β -carboline de *Peganum harmala* possèdent une activité antimicrobienne contre les bactéries *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris* (Gram-négatif) et contre les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Gram-positif).

II.5. La toxicité des alcaloïdes totaux sur la pomme de terre

Le test de la fuite des électrolytes a pour but d'évaluer la toxicité des alcaloïdes de *N.sativa* et ceux de *N.damascena* sur le tissu frais de pomme de terre. La révélation de la toxicité pourra compromettre l'utilisation de ces molécules in vivo. Les résultats sont présentés sur les **figures 42 et 43**. La mesure de la conductivité (milli siemens) a été réalisée chaque 30 min. La conductivité de la solution de chaque bucher donne l'idée sur la quantité d'ion libérée dans le milieu externe des cubes de la pomme de terre.

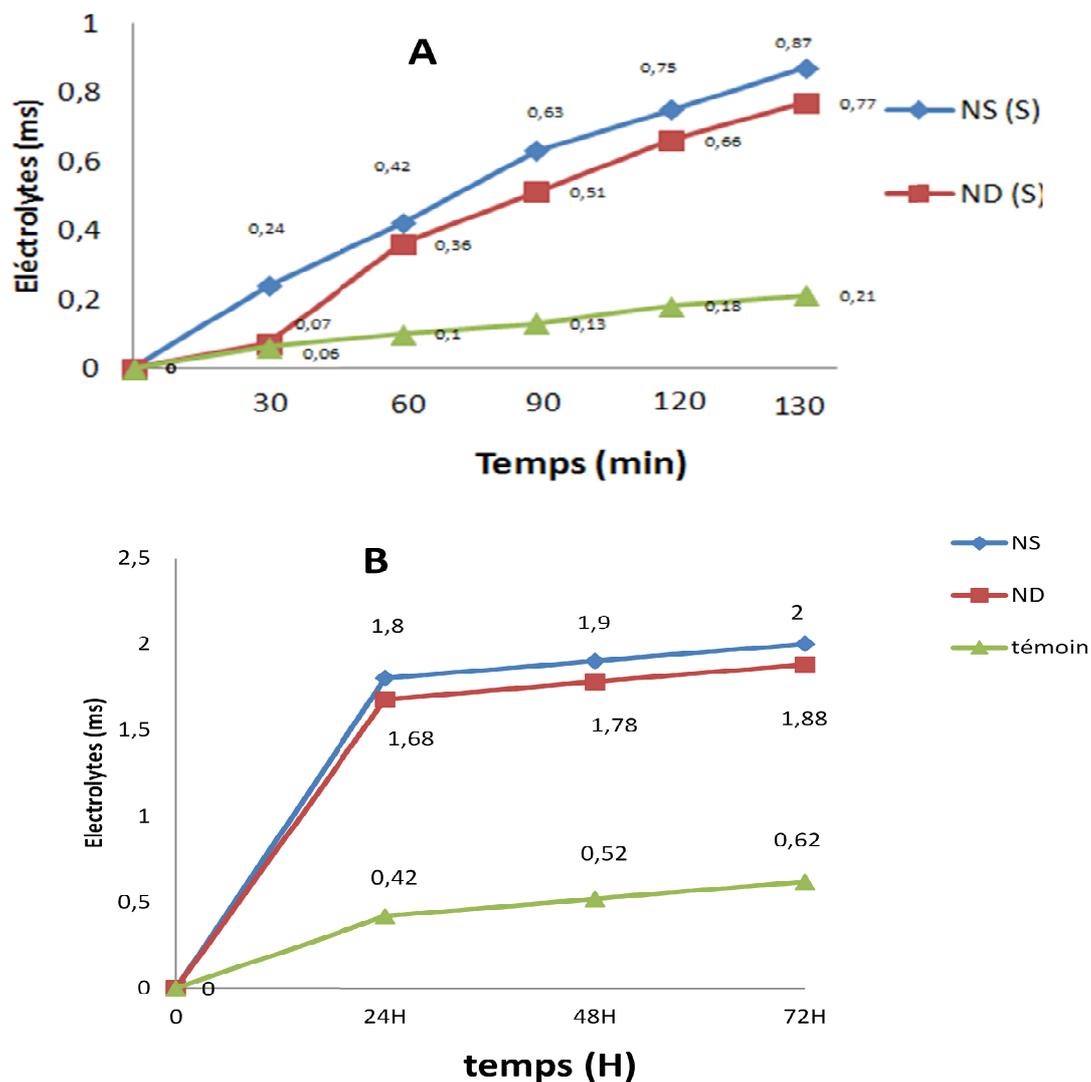


Figure 42 : Effet des alcaloïdes sur la fuite des électrolytes de la variété *Spunta*, A : Cinétique des la fuite des électrolytes au cours des deux premières heures, B- cinétique de la fuite des électrolytes au cours de 72H.

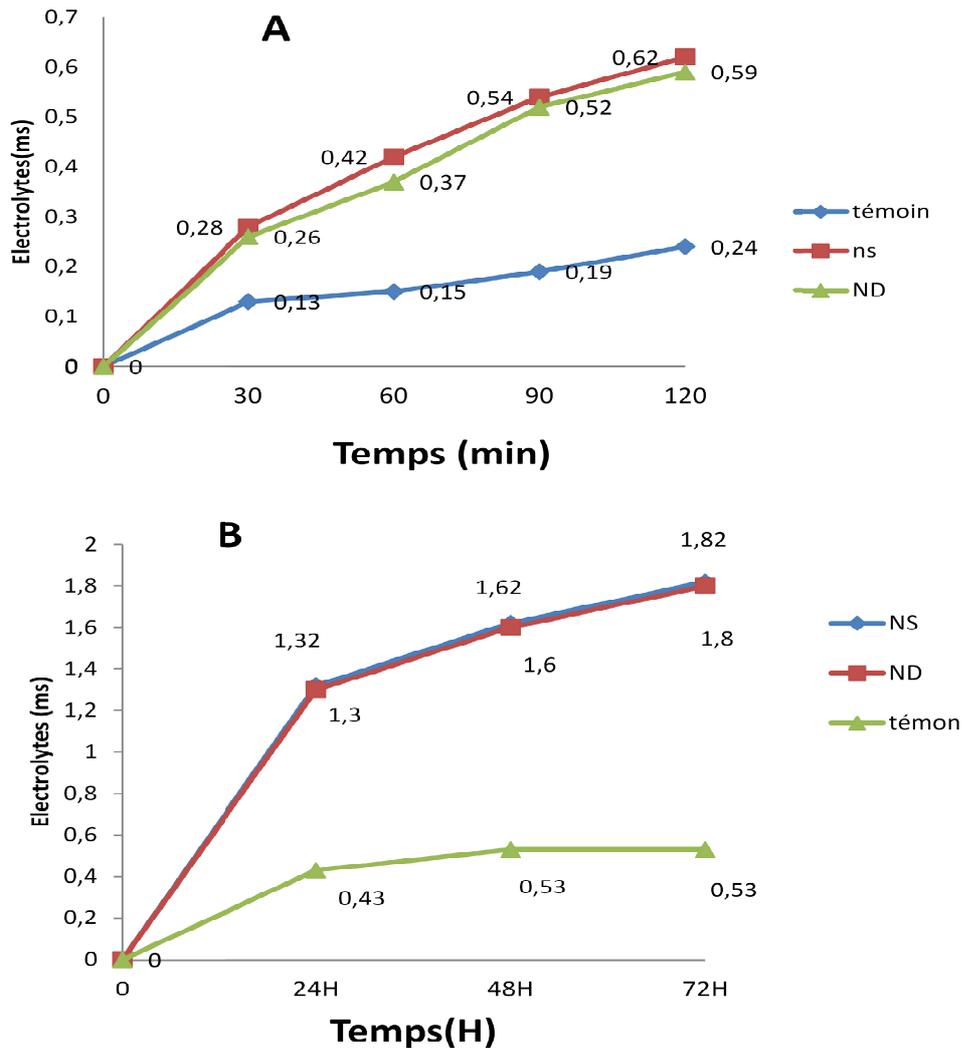


Figure 43 : Effet des alcaloïdes sur la fuite des électrolytes de la variété *Désirée*, A : Cinétique de la fuite des électrolytes au cours des deux premières heures, B- cinétique de la fuite des électrolytes au cours de 72H.

L'analyse des résultats révèle qu'une fuite d'électrolytes est d'abord observée pour les témoins où il n'y a pas d'alcaloïdes. Ceci indique que la fuite est un phénomène qui peut avoir lieu en absence d'agression par un agent chimique. Cependant, elle pourrait avoir lieu à cause de l'agression provoqué par un stress mécanique, ici, il s'agit de la coupure réalisée pour former des cubes. La fuite serait donc due aux cassures des parois cellulaires.

Chaque variété de pomme de terre traitée par les alcaloïdes soit de *Nigella sativa* ou de *Nigella damascena* présente une fuite des ions. Cette fuite évolue dans temps. En plus de l'impact du traitement mécanique qu'ont subi les cubes de pomme de terre, la quantité des électrolytes libérée ne peut être expliquée que par l'effet des alcaloïdes sur les tissus.

Chez la variété de pomme de terre *Spunta*, on remarque que la quantité des ions libérés dans les premières heures est plus importante en présence des alcaloïdes de *N.sativa* que ceux de *N.damascena*. Cela peut être expliqué, entre autre, par le fait que les alcaloïdes de *N.sativa* (nigellidine et nigellamine) stimuleraient beaucoup plus les canaux ionique de la paroi cellulaire de la pomme de terre que les alcaloïdes majeur de *N.damascena* (damascenine et damascinine).

Avant les premières 24H, on note une augmentation rapide de la libération de la quantité des électrolytes. De 24H jusqu'à 72H, un ralentissement dans la libération des ions est observé. La quantité des ions libérés en présence des alcaloïdes de *N. damascena* rejoignent celle provoqués par les alcaloïdes de *N. sativa*.

L'étude des effets des alcaloïdes sur la fuite des électrolytes de la variété *Désirée*, a permis de voir que ces substances ont des effets similaires que ce soit au cours des deux premières heures ou durant les 72H. En effet, la quantité des ions libérés dans les premières heures est la même chez les deux espèces de *Nigella sp.*

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Ce travail a pour but de mettre en évidence *in vivo* que les alcaloïdes de *N.sativa* et *N.damascena* sont responsables de l'effet protecteur contre la pourriture molle sur deux variétés de pomme de terre (*Spunta* et *Désirée*) engendrée par trois souches de bactérie pectinolytique (*Pcc*, *Pca* et *Dk*) et d'évaluer la toxicité de ces alcaloïdes sur le tissu frais de pomme de terre.

L'effet des alcaloïdes de *N.sativa* et *N.damascena* contre *Pcc*, *Pca* et *Dk* ont été évalué par la mesure des quantités de pourriture engendrée par ces souches, Après l'inoculation des demi-tubercules de la variété *Spunta* et *Désirée*.

En comparant les effets des alcaloïdes de *N.sativa* sur la variété *Spunta* et ceux de *N.damascena*, on retient ce qui suit :

- Les alcaloïdes de *N.sativa* sont plus efficaces sur *Pcc*. Alors les alcaloïdes de *N.damascena* le sont sur *Dk*.
- Les taux de réduction de la masse de pourriture sont plus importants avec les alcaloïdes de *N.sativa* (atteignent 82,22% sur *Pcc*) contre 61,58% pour les alcaloïdes de *N.damascena* sur *Dk*.

La comparaison de l'effet des alcaloïdes de *N.sativa* et les alcaloïdes de *N.damascena* sur la variété *Désirée* montre que les alcaloïdes de *N.damascena* ont plus d'effet sur *Pcc* avec un taux de réduction maximal de 78,94% contre un effet de *N.sativa* sur la même souche (40,47%). Les alcaloïdes de *N.damascena* sont aussi plus efficaces contre *Pca* comparé à l'effet de *N.sativa*. À l'inverse, les alcaloïdes de *N.sativa* semblent plus actifs sur *Dk*.

En comparant de l'effet des alcaloïdes de *Nigella sp* sur la variété *Spunta* et *Désirée* on observe que les alcaloïdes de *N.sativa* sont plus actifs sur *Dk* sur la variété *Désirée* avec un taux de réduction maximal de la pourriture de 49,48%. A l'inverse, ces mêmes alcaloïdes sont beaucoup plus significatifs sur *Pcc* sur la variété *Spunta* avec un taux de réduction maximal de la pourriture de 82,22%. Les alcaloïdes de *N.damascena* sont plus efficaces contre *Dk* sur variété *Spunta* avec un taux de réduction maximal de la pourriture de 61,58% et sur la variété *Désirée*, ils ont plus d'effet sur *Pcc* et *Pca* avec un taux de réduction maximal de la pourriture de 78,94% et 54,54% respectivement.

Ce qui précède on peut conclure que la nature de la variété de la pomme de terre semble interférer avec l'interaction alcaloïde/ bactérie.

Le test de la fuite des électrolytes a pour but d'évaluer la toxicité des alcaloïdes de *N.sativa* et ceux de *N.damascena* sur le tissu frais de pomme de terre. La révélation de la toxicité pourra compromettre l'utilisation de ces molécules in vivo.

Chaque variété de pomme de terre traitée par les alcaloïdes soit de *Nigella sativa* ou de *Nigella damascena* présente une fuite des ions. Cette fuite évolue dans temps. En plus de l'impact du traitement mécanique qu'ont subit les cubes de pomme de terre, la quantité des électrolytes libérée ne peut être expliquée que par l'effet des alcaloïdes sur les tissus.

Néanmoins des tests de la toxicité complémentaires seraient recommandés afin de confirmer ce dernier résultat.

Cette étude ouvre sans doute d'innombrables perspectives. Notamment pour l'utilisation des alcaloïdes des *Nigella sp* comme des biopesticides afin de confirmer ce dernier résultat.

Cependant des questions importantes, notamment pratiques restent à résoudre telles que :

A quelles concentration utilise-t-on ces alcaloïdes et sans effet toxique sur le tissu frais de pomme de terre ? Et quelles sont les effets de ces composés sur la pomme de terre entière ? Comment utiliser ces composés ? En pulvérisation sur les pommes de terre en culture ? Ou bien durant le stockage des semences ? Le traitement avec ces composés aura-t-il un effet toxique sur l'environnement ?

Toutes ces questions et beaucoup d'autre méritent d'être résolues et faire l'objet d'autre études.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Agradi E, Fico G, Cillo F, Fransisci C et Tomé F. (2001). Estrogenic activity of phenolic compounds from *Nigella damascena* evaluated using recombinant yeast screen. *Planta Med.* **67**, 553-555.
- Agradi E, Fico G, Cillo F, Fransisci C et Tomé F. (2002). Estrogenic activity of *Nigella damascena* extracts, evaluated using a recombinant yeast screen. *Phytother Res.* **16**, 414–416.
- Agrios GN. (1997). *Plant pathology*. 4th Ed. Academic Press, New York. 616p.
- Al-Jassir S. (1992): chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry.* **45**, 239-242
- An CL, Lim WJ, Hong SY, Shin EC, Kim MK, Lee JR, Park SR, Woo JG, Lim YP et Yun HD. (2005). Structural and biochemical analysis of the asc operon encoding 6- phospho- B- glucosidase in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* Ly 34. *Research in Microbiology.* **156**, 145-153.
- Andreas GH et Oeggl K. (2005). The oldest evidence of *Nigella damascene* L. (Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe. *Veget. Hist. Archaeobot.* **14**, 562–570.
- Atta-Ur-Rahman, Malik S et Zaman K. (1992). Nigellimine: a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Journal of Natural Products*, **55**, 676-678.
- Atta-Ur-Rahman, Malik S, Hasan SS, Choudhary MI, Ni CZ et Clardy J. (1995). Nigellidine: a new indazol alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett.* **36**, 1993-1996.
- Atta-Ur-Rahman.; Malik S.; Cun-heng H. & Clardy J. (1985): Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett.* **26**, 2759-2762.

- Axelrood PE, Rella M et Schroth MN. (1988). Role of antibiosis in: competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**, 1222-1229.

B

- Bailey KL, Boyetchko SM et Lãngle T. (2009). Social and economic drivers shaping the future of biological controle: A Canadian perspective on the factors effecting the development and use microbial biopesticides. *Biological control*. **52**, 221-229.
- Bell KS, Sebaïhia M, Pritchard L, Holden MTG, Hyman LJ, Holeva MC, Thomson NR, Bentley SD, Churcher LJC, Mungall K, Athin R, Bason N, Brooks K, chillingworth T, Clark K, Doggett J, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, norbertczak H, Ormond D, Price C, Quail MA, Sanders M, walker D, whitehead S, Salmond GPC, Birch PRJ, Parkhill J et Toth IK. (2004). Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* and characterization of virulence Factors. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America* **101**, 11105-11110.
- Bonnier G. (1990). *La grande flore en couleur*. Edition Belin. Paris. 191p.
- Brown CR, (2008). Breeding for phytonutrient enhancement of potato. *American journal of potato research*. **85**, 298-307.
- Brown CR. (2005). Antioxydants in potato. *American journal of potato research*. **62**, 163-172.
- Brückner C. (1993): A survey on herbal galactogogue used in Europe. *Actes du 2e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11eme Conférence internationale 'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27 mars 1993*. P 140-145.
- Bruneton J. (1987). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3^{ème} Edition Technique et Documentation Lavoisier. Tec & Doc, Paris, pp. 784-873.
- Bruneton J. (1999): *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3^{ème} Edition Technique et Documentation Lavoisier: 784-873.

C

- C.I.P. (2008). About potatoes. <<http://www.cipotato.org/potato>> (Accessed 20.04.2012)
- Chan YC, Wu HP et chuang DY. (2009). Extracellular secretion of Carocin SI in *pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* occurs via the type III secretion system integral to the bacterial flagellum. BMC Microbiology. **9**, 181-191.
- Charkowski AO. (2006). The soft rot *Erwinia*. In: Gnananmanickam SS. (Eds), Plant- Associated Bacteria. Springer, Netherlands, pp. 423-505.
- Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Hentati B, Blecker C, Deroanne C. et Attia H. (2007): *Nigella sativa* L: Chemical composition and Physico- chemical characteristics of lipid fraction. Food Chemistry. **101**, 673-681.
- Clarke ML, Harvey DG, Humphreys DJ. (1981). Veterinary Toxicology, second edition. Bailliere Tindall. London. England. 253p.
- Cordell A.G.; Quinn-Bettie L.M. & Farnsworth N.R. (2001): The potential of alkaloids in drug discovery. Phytother.Res. **15**, 183-205.

D

- Darasse A, Priou S, kotoujansky A et Bertheau y. (1994). PCR and restriction fragment length polymorphisme of a gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. Applied and Environmental Microbiology. **60**, 1437-1443.
- De Boer SH. (2003). Characterization of pectolytic *Erwinia* as highly sophisticated pathogens of plants. Europeans Journal of Plant Pathology **109**, 893-899.
- De Boer SH. (2002). Relative incidence of *Erwinia carotouorum* subsp. *Atroseptica* in stolon End and peridermal tissue of potato tubers in Canada. Plant Disease. **86**, 960-964.
- Delaplace P, Fauconnier ML et du Jardin P. (2008). Méthodes de mesure de l'âge physiologique des tubercules semences de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **12**(2), 171-184.
- Dellapenna D et Pogson BJ. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. Annual Review of plant biology. **57**, 711-738.

- Diane N et Yves S. (2007). Les jardins de grand portage, Catalogue de semences biologiques et activité. P12.
- Duarte V, De Boer SH, Ward LJ. et De Oliveira AMR. (2004). Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. **96**, 535-545.

E

- EK LN, Jennie Brand-Miller and Les Copeland. (2011). Glycemic effect of potatoes. *Food chemistry*,
- El Guilli M, Achbani E, Fahad K, Jijakli H. (2009). Biopesticides : Alternative à la lutte chimique ?. Symposium international <<Agriculture durable en region Mediterraneenne (AGDUMED)>>,14-16 Mai 2009 ; Rabat, Maroc. p. 266-280.
- El-Obeid A.; Al-Harbi S.; Al-Jomah N. and Hassib A. (2006): Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-a), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*. **13**, 324–333.
- Elphinstone JG, Pérombelon MCM. (1986 b). Contamination of progeny tubers of potato plants by seed and leaf-borne *Erwinia carotovora*. *Potato Res.* **29**, 77-93.
- Ezekiel R, Singh N, Sharma S et Kaur A. (2011). Beneficial phytochemicals in potato- a review, *Food Research International*. (in press).

F

- Faure D. et Dessaux Y. (2007). Quorum sensing as a target for developing control strategies for the plant pathogen *pectobacterium*. *European Journal of Plant pathology* **119**, 353-365.
- Fico G, Panizzi L, Flamini G, Braca A, Morelli I, Tomè F et Cioni PL. (2004). Biological screening of *Nigella damascena* for antimicrobial and molluscicidal activities. *Phytother Res.* **18**, 468–470.
- Fico G. & Tomè F. (1998a): Alkaloids content in the ripening seeds of *Nigella damascena*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 6. **1**, 70-79.
- Fico G.; Braca A.; Tomè F. & Morelli I. (2001): A new phenolic compound from *Nigella damascena* seeds. *Fitoterapia*.**72**, 462-463.

- Friedman M. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J Agric Food chem.* **54**, 8655-8881.

G

- Ghedira K. (2006). La nigelle cultivée: *Nigella sativa L.* (Ranunculaceae). *Phytothérapie.* **5**, 220-226.
- Guignard J.L. (2000). Les alcaloïdes. In: *Abrégés de Biochimie Végétale.* 2^{ème} Edition Dunod. Paris. 274p.
- Guignard J.L. (2001). In: *Botanique systématique moléculaire.* 12^{ème} Edition Masson, Paris. 304p.

H

- Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, verdonck L et Swings J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbial.* **21**, 384-397.
- Hélias V, Andrivon D, Jouan B. (2000 b). Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovorum* subsp. *Atroseptica*. *Plant pathol.* **49**, 33-42.
- Hélias V. (2008). *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre: nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. *Cahiers Agriculture.* **17**(4), 349-354.

K

- Kado CI. (2006). *Erwinia* and related genera. *Prokaryotes* **6**, 443-450.
- Kechid M. (2005). Physiologie et biotechnologie de la microtubérisation de la pomme de terre *Solanum tuberosum*.L. Thèse de Magister en biotechnologie végétale. Université Mentouri de constantine, département des sciences de la nature et de la vie, Constantine, 158p.
- Kelman A et Dickey RS. (1988). Soft rot or “carotovora” group. In: Schaad NW. (Eds.), *Laboratory Guide for identification of plant pathogenic Bacteria.* 2nd ed. St Paul American phytopathological Society. Pp. 44-59
- Khan Akram M. (1999): Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa L.* *Inflammopharmacology.* **7** (1), 15-35.

- KöKdil G. et Yilmaz H. (2005). Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella* L. (Ranunculaceae) in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. **33**(12), 1203-1209.

L

- Labib SM. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*. **5**, 1749-1770.
- Landa P, Marsik M, VanekT, Rada V et Kokoska L. (2006). In vitro anti-microbial activity of extracts from the callus cultures of some *Nigella* species. *Biologia*. **61**(3), 285-288.
- Latour X, Faure D, Diallo S, Cirou A, Smadja B, Dessaux Y et Orange N. (2008). Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp.(*Erwinia carotovora*). *Cahiers Agricultures*. **17**(4), 355-360.
- Lepoivre P. (2003).Phytopathologie. Les prokaryotes phytopathogènes. pp 79-143 Ed. De boeck université, Bruxelles. Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire.415p.
- Lewis CE, Walker JRL, Lancaster JE, et Sutton KH. (1998). Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: coloured cultivars of *solanum tuberosum* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **77**, 45-57.
- Lynch B, Simon RR, Van Otterdijk FM, Emmen HH, Giuseppin MLF and Kemme-Kroonsberg C. (2011). Subchronic toxicity evaluation of potato protein isolates. *Food and chemical toxicology*. **50**, 373-384.

M

- Marek R.; Seckarova P.; Holova D.; Marek J. & Sklenar V. (2003): Secondary metabolites. *Nat.Prod.***66**, 481-486.
- Mohan L.V.; Mothes K.; Engelbrecht L. & Schroter H.B. (1965): Biosynthesis of damascenine in *Nigella damascena* L. *Nature*. **12**,1421-1428.
- Moretti A.; D’Antuono L.F. & Elementi S. (2004): Essenatial oils of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. Seed. *Journal of Essential Oil Research*. **16**, 182-183.

- Morikawa T, Xu F, Ninomiya K, Matsuda H et Yoshikawa M. (2004). Nigellamines A3, A4, A5, and C, New Dolabellane-Type Diterpene Alkaloids, with Lipid Metabolism-Promoting Activities from the Egyptian Medicinal Food Black Cumin. *Chem Pharm Bull.* **52**(4), 494-497.
- Morsi NM. (2000). Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta microbiologica polonica.* 49(1), 63-74.
- Munshe D. & Mothes K. (1965): Fütterungsversuche zur biosynthese des damascenins in *Nigella damascena* L. *Phytochemistry.* **4**, 705-712.

N

- Nenaah G. (2010). Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia.* **81**, 779-782.
- Nickavar B, Mojaba F, Javidniab K, et Amolia MAR. (2003). Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift fur naturforschung C. Journal of biosciences.* **58**(9-10), 629-631.

O

- Oswaldot T. (2010). Hommage à la pomme de terre. Filière nutrition et diététique. Haute, école de santé Genève, Suisse. 11p.

P

- Palese R et Aexmoun D. (1990). Renonculacées: Isopyrum, Garidella, Nigella. In: Bonier G. (Eds), La grande flore en couleurs. *Belin, Paris*, **4** : pp. 23-24.
- Pasco C, Bozec M, Ellissèche D et Andrivon D. (2006). Resistance Behaviour of potato Cultivars and Advanced Breeding clones to Tuber Soft rot caused by *Pectobacterium atrosepticum*. *Potato Resarch.* **49**, 91-98.
- Periou S et Jouan B. (1996). Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes de genre *Erwinia*. In : Rousselle P, Robert Y, et Crosnier JC. (Eds.), la pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. INRA-ITCF, paris, pp. 260-279.

- Pérombelon MCM et Kelman A. (1980). Ecology of the soft rot *erwinias*. *Phytopathology*. **18**, 361-387.
- Pérombelon MCM. (1990). The genus *Erwinia*. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W et Schleifer KH. (Eds.), *The prokaryotes*. 2nd edition, Springer-Verlag, Newyork, pp. 2899-2921.
- Pérombelon MCM. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias : an overview of pathogenesis. *Plant pathology*. **51**, 1-12.

R

- Ramadan M. F. and Mörsel J. T. (2002): Neutral lipid classes of black cumin (*Nigella sativa L.*) seed oils. *Eur Food Res Technol.***214**, 202–206.
- Razdan MK et Mattoo AK. (2005). *Genetic Improvement of solanaceous crops (vol. 1: potato): science publishers Inc.* 476p.
- Ross JA, et Kasum CM. (2002). Dietary flavonoides: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. **22**, 19-34.
- Rouselle P, Robert Y, Crosnier JC. (1996). *La pomme de terre-production-amélioration, ennemis et maladies, utilisation.* INRA Editions. 607p.

S

- Saguez J. (2007). *Dérégulation des activités chitinases: vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides.* Thèse de Doctorat en science et santé. Université de Picardie, Faculté des sciences, Jule Verne. 119p.
- Salem M.L. (2005): Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa L.* Seed. *International Immunopharmacology*. **5**, 1749–1770.
- Samson R, Legendre JB, Christen R, Saux MF, Achouak W et Gardan L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiacal* to the genus *Dikeya* gen. nov. as *Dikeya chrysanthemi* comb.nov. and delineation of four novel species, *Dikeya dadantii* sp.nov., *Dikeya dianthicola* sp. nov., *Dikeya dieffenbachiae* sp.nov. and *Dikeya Zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **55**, 1415-1427.

- Smadja B, Latoux X, Trigui S, Burini JF, chevaliser S. et Orange N. (2004 b). thermodependance of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). Canadian journal of Microbiology. **50**, 19-27.
- Sousek J, Guédon D, Adam T, Bochorakova H, Taborska E, Valka I et Simanek V. (1999). Alkaloids and organic acids continent of eight *Fumaria* species. Phytochemical analysis. **10**, 6-11.

T

- Tacherfiout M. (2008). Caractérisation physico-chimique et profils des protéines de réserve des graines de *Nigelle sativa* et *Nigella damascena*. Mémoire de magister. Université de Bejaia, Faculté des sciences de la nature et de la vi, Bejaia. 59p.
- Tavasoli E, Marefat AR et Hassanzadeh N. (2011). Identity and genetic diversity of *pectobacterium* spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran. African Journal of plant science. **5**(6), 329-336.
- Terda M, Azelmat S, Ait M'hand R, Achbani E, Barakate M, Bouteau F et Ennaji MM. (2011). Molecular typing of *pectobacterium carotovorum* isolated from potato tuber soft rot in Morocco. Ann Microbiol. (in press).
- Teuscher E.; Anton R. & Lobestesein A. (2005): Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition; Tec&Doc, Paris, 343 P.
- Tian Z, Liu YM, Chen SB, Yang JS, Xiao PG, Wang L et Wu E. (2006). Cytotoxicity of Two Triterpenoids from *Nigella glandulifera*. Molecules. **11**, 693-699.
- Toth IK, Bell KS, Holeva MC et Birch PRJ. (2003). Soft rot erwiniae : from genes to genomes. Molecular Plant Pathology. **4**(1), 17-30.

V

- Van Der Merwe JJ. (2009). Etiology of soft Rot and Blackleg on potatoes in South Africa. Master Scientae (Agriculturae). University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Pretoria, 138p.

- Van Vaerenbergh J. (2012). “*Erwinia*” et Co: la pomme de terre dans la purée. Institut voor Landbouw-en visserijonderzoek. www.carah.be/.../PommeDeTerre/.../Erwinia. (20.03.2012).
- Vinci RM, Mestdagh F et De Meulenaer B. (2012). Acrylamide formation in fried potato products- present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food chemistry*. **133**, 1138-1154.
- Visser RGF, Bachem CWB, De Boer JM, Bryan, GT, Chakrabati SK, Feingold S, Gromadka R, van Ham R.CHJ, Huang S, Jacobs JME, Kuznetsov B, de Melo PE, Milbourne D, Orjeda G, Sagredo B et Xiaomin Tang X. (2009). Sequencing the potato genome: outline and first result, to come from the elucidation of the sequence of the world’s third most important food crop. *American journal of potato research*. **86**(6), 417-429.

W

- Waldee EL. (1945). Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State College Journal of Science*. **19**(4), 435-484.
- Whitehead NA, Byers JT, Commander P, Corbett MJ, Coulthurst SJ, Everson L, Harris AKP, Pemberton CL, Simpson NJL, Slater H, Smith DS, Welch M, Williamson N et Salmond GPC. (2002). The regulation of virulence in phylogenetic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**, 223-231.

Y

- Yaganza ES, Rioux D, Simard M, Arul J, Tweddell RJ. (2004). Ultrastructural Alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* Caused by Treatment with Aluminum Chloride and Sodium Metabisulfite. *Appl Environ Microbiol*. **70**, 6800-6808.
- Yaganza ES. (2005). Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre : base physico-chimique. Thèse de Doctorat en sciences et technologie des aliments. Université Laval, Faculté des sciences de l’agriculture et de l’alimentation, Québec, Canada.

- Yahiaoui – Zaidi R, Ladjouzi R et Benallaoua S. (2009). Pathogenic variability within biochemical groups of *Pectobacterium Carotovorum* isolated in Algeria from seed potato tubers. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*. **1**, 1-9.
- Yahiaoui-Zaidi R. (2004). Contribution à l'étude des *Erwinia pectinolytiques* isolées chez *solanum tuberoson* L. Thèse de Doctorat en biologie. Université Ferhat Abbas., Sétif, Algérie, 187p.
- Yoshimitsu, H., Nishida, M., Okawa, M et Nohara, T. (2007). Four New Triterpene Glycosides from *Nigella damascena*. *Chem. Pharm. Bull.* **55**: 488-491.

Z

- Zahoor A.; Ghafoor A. and Aslam M. (2004): *Nigella sativa*: A potential commodity in crop diversification traditionally used in healthcare. In “introduction of medicinal herbs and spices as crops” Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Pakistan: 5 – 31.

Annexes

Annexe I : les noms vernaculaires de *Nigella sativa* et de *Nigella damascena* dans le monde (Tacherfiout, 2008).

Région	<i>Nigella sativa</i>	<i>Nigella damascena</i>
France	Faux cumin, nigelle cultivé, toute épice, graine noire, cumin noir, quatre épices, nielle des jardins, poivrete, herbe aux épices.	barbiche, cheveux de venus, nigelle de damas.
U.S.A.	Black seed, black cumin	
Angleterre	Black caraway, common fenel flower, garden nielle	Love-in-a-mist
Allemagne	Schwarzkümmel, schwarzer kreuzkümmel, schwarzer romischer, koriander, nigellensamen	damaszener, Schwarzkümel, jungfran im grün
Inde et Pakistan	Black seed, kalonji, kalujua, kalajeera	
Italie	Nigella coltivata, granonero, cominella, melantro coltivato	anigella, damigella, scapigilate
Espagne	Niguilla, sanuj, arauela cultivada, barba d'ermita	
Arabie saoudite	Al-habba al-Sawda, alkamoun al-aswad, hebbet albarakha, shunez	
Afrique du nord	Chit, djahta, bouneffa, sanoudj, kamoun assoued, habat essouda, kemoun chadaf, kamoun alakhhal	
Algérie	Zerara, tikamnin, sanoudj, sinoudj, habba essouda	
Iran	Siyah daneh	
Suède		Junfgrun i det groan
Russie		чернушка дамасская [černuška damasskaja]

Annexe II

1- Préparation des réactifs :

- **Réactif de Valsér Mayer** (tétra-iodomercurate de potassium) dans 100 ml d'eau distillée, on dissout 4.9 g de KI et 1.35 g de HgCl₂. A l'aide d'un agitateur le mélange sera homogène.
- **Tampon phosphate** : La préparation (pH=7.4 ; M=0.1) se fait par le titrage d'une base conjugué (Na₂HPO₄, PM = 142 g/mol) avec un acide (NaH₂PO₄, PM = 120 g/mol). On a dissout 2,84 g de Na₂HPO₄ et 2,4 g de NaH₂PO₄ dans 200 ml de l'eau distillé pour chaque an.

2- Milieu de cultures :

2.1 La composition chimique du milieu King B (pH = 7.2) :

Composition	Par litre
Protéose peptone	20 g
Phosphate de K dibasique (K ₂ HP ₀ 4)	1,5 g
Sulfate de Mg (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	1,5 g
Agar	15 g
Glycerol	100 ml
Eau distillée	1000 ml

2.2 La composition chimique du bouillon nutritive (pH = 6,8):

Composition	Par litre
Extrait de viande	3 g
Peptone	5 g
Eau distillée	1000 ml

Glossaire

Glossaire

Autotétraploïde : relatif à une plante ayant quatre copies homologues de chaque chromosome.

Glycoalcaloïde : famille de substances toxiques communément trouvées dans les espèces de la famille des solanacées.

Haploïdes : organismes dont les noyaux des cellules somatiques ne possèdent qu'un seul jeu de chromosome (n).

Isodiamétrique : précis une forme dont tous les diamètres principaux sont égaux.

Lancéolées : en forme de lance, effilé aux deux extrémités et plus large dans la partie médiane.

Lenticelle : petite fonte servant aux échanges de gaz, que l'on rencontre sur les écorces des arbres et arbustes.

Nectarifères : se dit d'un organe qui secrète du nectar.

Nématodes : anciens « vers ronds ».

Pennatiséquées : se dit d'une feuille dont le limbe est penné et divise en segments séparés par des sinus qui atteignent presque la nervure médiane.

Pétaloïdes : vivement coloré, semblable à un pétale.

Pétunias : très jolies fleurs qui fleurissent dès le printemps et jusqu'au premières gelées.

Renflée: Qui présente un grossissement dans sa partie médiane. Plus épais à un endroit.

Tubercule : organe de réserve, généralement souterrain, qui assure la survie des plantes pendant la saison d'hiver ou en période de sécheresse.

Résumé

Deux variétés de pommes de terre ont été choisies ; *Spunta* et *Désirée*, afin de tester in vivo, l'effet protecteur des alcaloïdes de *Nigella sativa* et *Nigella damascena* contre la pourriture molle engendrée par trois souches de bactéries pectinolytiques « *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* et *Dickeya spp* » et d'évaluer leur toxicité sur le tissu frais de pomme de terre. L'effet des alcaloïdes de *N.sativa* et *N.damascena* contre *Pcc*, *Pca* et *Dickeya spp* ont été évalués par la mesure des quantités de pourriture engendrée par ces souches, après l'inoculation des demi-tubercules des deux variétés de pomme de terre. À la lumière des résultats obtenus dans la présente étude, nous pouvons dire que la nature de la variété de la pomme de terre semble interférer avec l'interaction alcaloïde/bactérie. Les résultats du test de toxicité des alcaloïdes sur le tissu frais de pomme de terre et qui sont obtenus par la méthode de la fuite des électrolytes indiquent que la révélation de cette toxicité pourra compromettre l'utilisation de ces molécules in vivo.

Mots clés :

Alcaloïdes, Activité antibactérienne, Toxicité, *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, *Spunta*, *Désirée*.

Abstract

Two varieties of potatoes were selected; *Spunta* and *Désirée*, in order to test in vivo, the protective effect of alkaloids of *Nigella sativa* and *Nigella damascena* against the soft rot generated by three strains of pectinolytic bacteria “*Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya spp*” and to evaluate their toxicity on fresh potato tissue. The effect of alkaloids of *N.sativa* and *N.damascena* against *Pcc*, *Pca* and *Dickeya spp* were evaluated by measurement of the quantities of rot generated by these stocks, after the inoculation of the half-tubers of the two varieties of potato. In the light of the results obtained in the present study, we can say that the nature of the variety of potato seems to interfere with the interaction alkaloid/bacterium. The results of the test of toxicity of the alkaloids on fresh potato tissue and which are obtained by the method of the escape of the electrolytes indicate that the revelation of this toxicity will be able to compromise the use of these molecules in vivo.

Key words:

Alkaloids, antibacterial activity, Toxicity, *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, *Spunta*, *Desirée*.

