

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDERRAHMANE MIRA - Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires.

Mémoire de Magister

en

Sciences Alimentaires

Thème

Effet des extraits de plantes (*Pistacia lentiscus* L. et *Olea europaea* sativa) et d'un co-produit (grignon d'olive) sur la croissance de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* sur *Solanum tuberosum* L.

Présenté par

M^{elle} LAGHA SAMIRA

Devant le jury

Président : BENALLAOUA S.

Rapporteur : ZAIDI R.

Co-Rapporteur : ZAIDI F.

Examineurs : LOUAILECHE H.

IGHEROUADA M.

Professeur (UAMB)

Maître de conférences (UAMB)

Chargé de cours (UAMB)

Professeur (UAMB)

Maître de conférences (UAMB)

Promotion 2006/2007.

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est agréable d'adresser mes remerciements à tous ceux qui m'ont prêté main forte pour sa réalisation.

Je tiens à remercier ma promotrice, Dr. Zaidi R, pour avoir accepté de m'encadrer ainsi que pour ses conseils et ses orientations.

Je tiens à remercier aussi Mr. Zaidi F. mon co-promoteur, ses remarques et ses conseils ont amélioré mon travail et ont permis sa mise au point définitive.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Prof. Benallaoua S. pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider ce présent jury.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude au Prof. Louailache H. et au Dr. Igherouada M. pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour leurs évaluations critiques et leurs remarques concrètes, si nécessaires au débat et à la conclusion de ce travail.

Une reconnaissance toute particulière à Mr. Benamrouche O. pour son aide et ses commentaires. Ma reconnaissance va également au Prof. Sahnoune et à Mr Begdouche, de m'avoir orienté et aidé dans la réalisation de l'étude statistique.

Je tiens à remercier aussi mes collègues de la promotion (M. Zina, B. Samira, B. Farid, E. Nadia et D. Farida) ainsi que Mr L. Rachid, B. Mustapha, A. Aatman et B. Mahmoud, pour leur aide, disponibilité et leur encouragement.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, à toi cher Omar B.

et

à toute personne qui consultera ce document un jour.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Pomme de terre 3

I.1. Aspects botaniques 3

I.2. Production mondiale et algérienne 3

I.3. Pourriture molle de la pomme de terre 4

I.3.1. Agent causal 4

I.3.2. Description de la maladie 5

I.3.3. Modes de contamination et développement de la maladie 5

I.3.4. Moyens de contrôle de la pourriture molle 6

I.3.4.1. Pratiques culturales et sanitaires 6

I.3.4.2. Lutte chimique 7

I.3.4.3. Lutte biologique 7

II. Interaction pomme de terre- *Pectobacterium* 7

II.1. Facteurs de pathogénicité 7

II.1.1. Constituants périphériques 7

II.1.1.1. Sidérophores 7

II.1.1.2. Flagelles 8

II.1.1.3. Lipopolysaccharides 8

II.1.2. Enzymes extracellulaires 8

II.1.2.1. Enzymes pectinolytiques 8

II.1.2.1.1. Pectines méthyle estérases 8

II.1.2.1.2. Pectates lyases	9
II.1.2.1.3. Pectates hydrolases	9
II.1.2.2. Enzymes non pectinolytiques	9
II.1.2.2.1. Cellulases.....	9
II.1.2.2.2. Protéases	9
II.2. Régulation de la sécrétion des exo enzymes.....	9
II.3. Mécanisme de défense de la pomme de terre	10
II.3.1. Réaction d'hypersensibilité.....	10
II.3.2. Renforcement de la paroi cellulaire	10
II.3.3. Stimulation des métabolites secondaires.....	11
II.3.4. Protéines de défense.....	11
II.3.5. Peptides antimicrobiens	12
II.3.5.1. Thionines	12
II.3.5.3. Snakines	12
III. Métabolites secondaires des végétaux	12
III.1. Terpénoïdes et stéroïdes.....	13
III.2. Alcaloïdes	13
III.3. Composés phénoliques	13
III.3.1. Définition	13
III.3.2. Différentes classes des polyphénols.....	14
III.3.2.1. Composés phénoliques simples	14
III.3.2.1.1. Acides phénoliques et coumarines	14
III.3.2.1.2. Flavonoïdes	15
III.3.2.2. Composés phénoliques complexes	15
III.3.2.2.1. Tannins	15
III.3.2.2.2. Lignine.....	16
III.3.3. Activités biologiques des composés phénoliques.....	16
III.3.4. Effet antibactérien des composés phénoliques.....	17
III.3.4.1. Facteurs d'efficacité des composés phénoliques	17
III.3.4.1.1. Composé phénolique	17
III.3.4.1.2. Micro-organisme	18

III.3.4.1.3. Conditions du milieu	18
III.3.4.2. Modes d'action des composés phénoliques	18
III.3.4.2.1. Action sur les membranes cellulaires	19
III.3.4.2.2. Effet sur les enzymes et privation de substrat ..	19
III.3.4.2.3. Privation des métaux	19

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal	21
I.2. Collecte et conservation des échantillons	22
I.2.1. Collecte des échantillons.....	22
I.2.2. Conservation des échantillons.....	22
I.2.2.1. Séchage	22
I.2.2.2. Broyage et tamisage	22
II. Extraction des composés phénoliques	23
III. Dosage des composés phénoliques	24
III.1. Polyphénols totaux solubles.....	24
III.2. Tannins.....	24
III.3. Flavonoïdes	25
IV. Activité antibactérienne	26
IV.1. Activation de la souche bactérienne	26
IV.2. Tests de confirmation de la souche.....	26
IV.3. Evaluation de l'activité antibactérienne	26
IV.4. Détermination de la CMI sur milieu gélosé	27
V. Influence des extraits sur la pathogénicité de <i>P. carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i>	28
V.1. Test de pathogénicité	28
V.2. Effet des extraits sur l'évolution de la pourriture molle sur demi-tubercule.....	29

VI Etude statistique	30
-----------------------------------	----

Résultats et discussion

I. Résultats	31
I.1. Teneur en humidité et rendement en extrait sec	31
I.2. Teneur en composés phénoliques	33
I.3. Activité antibactérienne	33
I.3.1. Confirmation de la souche de <i>Pcc</i>	34
I.3.2. Activité antibactérienne des acides tannique et gallique	34
I.3.3. Activité antibactérienne des extraits	35
I.3.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	37
I.4. Effet des extraits sur la pathogénicité de <i>P.carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i> 37	
I.4.1. pathogénicité de <i>P. carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i>	37
I.4.2. Effet des extraits sur l'évolution de la pourriture molle	39
II. Discussion générale	42
Conclusion	51

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

AA : Acétone Aqueux

BSA : Bovine Serum Albumin

Cel: Cellulase

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

DO: Densité Optique

EA: Extrait Acétonique

EAG: Equivalent Acide Gallique

EAT: Equivalent Acide Tannique

EM: Extrait Méthanolique

EQ: Equivalent Quercétine

ES: Extrait Sec

MA : Méthanol Aqueux

MH: Mueller-Hinton

MS: Matière Sèche

MSPRH : Ministère de la Santé, de la Population et de la Reforme Hospitalière.

OHHL: N-(3-OxoHexanoyl)-Homosérine Lactone

Pca : *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum*

Pcc : *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*

Peh : Pectates hydrolases

Pel : Pectates lyases

PR : Pathogenesis Related

PVA: Potato Virus A

PVX: Potato Virus X

PVY: Potato Virus Y

QS: Quorum Sensing

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

TEA: TriEthanolAmine

UFC: Unité Formant Colonie

Liste des Figures

Figure 1 : <i>Solanum tuberosum</i> L.....	03
Figure 2 : Pourriture molle d'un tubercule de pomme de terre causée par <i>Pectobacterium</i> sp.....	05
Figure 3 : Structure d'une unité isoprène.....	13
Figure 4 : Les alcaloïdes dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine	13
Figure 5 : Squelette carboné des flavonoïdes.....	15
Figure 6 : Structures chimiques des tannins.....	16
Figure 7 : Matériel végétal utilisé.....	21
Figure 8 : Schéma d'inoculation des demi-tubercules	30
Figure 9 : Rendements en extraits secs avec l'acétone aqueux et le méthanol aqueux	31
Figure 10 : Effet antibactérien de l'acide gallique.....	34
Figure 11 : Effet antibactérien de l'acide tannique.....	34
Figure 12 : Représentation de l'activité antibactérienne des acides tannique et gallique.	34
Figure 13 : Corrélations linéaires entre les concentrations d'acides tannique et gallique et les diamètres des zones d'inhibition	35
Figure 14 : Effet antibactérien des extraits.....	36
Figure 15 : Représentation de l'activité antibactérienne des extraits	36
Figure 16 : Symptôme de pourriture molle provoqué par <i>Pcc</i>	38
Figure 17 : Distribution de la sensibilité des demi-tubercules à la pourriture molle.....	38
Figure 18 : Corrélations linéaires entre les concentrations d'extraits et la diminution des poids des tissus pourris.....	41

Liste des Tableaux

Tableau I : Quelques dérivés d'acides phénoliques et de coumarines	14
Tableau II : Teneurs en composés phénoliques des différents substrats	32
Tableau III : caractérisations biochimiques de <i>Pcc</i>	33
Tableau IV : CMI des composés phénoliques de synthèse et des extraits vis-à-vis de <i>Pcc</i>	37
Tableau V : Effet des extraits de <i>P. lentiscus</i> L. sur l'évolution de la pourriture molle causée par <i>Pcc</i>	39
Tableau VI : Effet des extraits acétoniques d' <i>O. europaea</i> L. sur l'évolution de la pourriture molle causée par <i>Pcc</i>	40
Tableau VII : Effet des extraits méthanoliques d' <i>O. europaea</i> L. sur l'évolution de la pourriture molle causée par <i>Pcc</i>	41

Introduction

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est l'une des plantes les plus importantes de la famille des Solanacées, qui regroupe par ailleurs d'autres plantes d'une importance économique majeure telles que les aubergines, les piments, les poivrons et les tomates.

La culture de la pomme de terre peut subir des dommages liés à l'attaque de ravageurs animaux, mais elle peut également être la cible de nombreuses maladies parasitaires dues à des agents pathogènes aussi variés que des champignons, des bactéries et des virus.

La pourriture molle de la pomme de terre est une maladie d'importance planétaire, qui occasionne des pertes économiques considérables en culture et en entrepôt. En Algérie, 70% des refus sont attribués aux problèmes phytosanitaires dont 32% à des problèmes de pourriture molle (Yahiaoui-Zaidi *et al.*, 2003).

Il n'existe actuellement aucun moyen de lutte efficace contre cette maladie, causée par les bactéries pectinolytiques du genre *Pectobacterium*, essentiellement *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. L'arsenal de pathogénécité de cette bactérie est constitué d'une variété d'enzymes extracellulaires (protéases, pectates lyases, pectates hydrolases, etc.) qui sont responsables de la dégradation des principaux constituants de la paroi végétale et de la macération des tissus.

Les végétaux sont connus depuis longtemps pour renfermer différents métabolites secondaires connues pour leur intérêt dans la physiologie végétale (défense de la plante contre les attaques microbiennes, blessures, etc.). Depuis longtemps l'homme exploite les propriétés de ces métabolites à son profit dans différents domaines (médecine, industries chimiques, pharmacologie, agroalimentaire). Les nombreuses recherches ont montré les propriétés biologiques diverses de ces composés particulièrement des composés phénoliques. Ces composés sont largement utilisés en thérapie comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques (xanthine oxydase, lipoxygénase, etc.), antioxydants et antimicrobiens (Ghedira, 2005).

Une enquête ethnobotanique a permis aux auteurs de découvrir que des macérations et des décoctions des parties aériennes de *Pistacia lentiscus* L. et d'*Olea europaea* L. étaient utilisées dans le traitement de diverses infections microbiennes (Baba-Aissa, 1991 ; Markin *et al.*, 2003). De même des extraits aqueux de feuilles d'*Olea europaea* L. et de *Pistacia lentiscus* L. ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis de certaines bactéries résistantes aux antibiotiques (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc.) et antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* (Markim *et al.*, 2002 ; Hayder *et al.*, 2005).

Certains composés phénoliques isolés du grignon d'olive (oleuropéine, acide *p*-hydroxybenzoïque, etc.) ont montré une activité antibactérienne contre certaines bactéries Gram négatives telles que *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Klebsiella pneumoniae*, et antifongique vis-à-vis d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Aziz *et al.*, 1998)

Ce potentiel antimicrobien des composés phénoliques est actuellement démontré en phytopathologie : des extraits phénoliques de plantes médicinales se sont avérés efficaces contre certaines maladies végétales telle que la rouille du pommier causée par *Erwinia amylovora* (Baysal et Zeller, 2004).

En absence de traitement phytosanitaire efficace contre la pourriture molle, les bio-phénols des plantes peuvent présenter une alternative non négligeable à exploiter. Ce travail s'inscrit dans la perspective de valorisation de *Pistacia lentiscus* L. (feuilles) et de *Olea europaea* L. (feuilles et grignon d'olive) dans la lutte contre la pourriture molle. Nous nous sommes intéressés à ces deux plantes médicinales pour étudier leur pouvoir antibactérien à l'égard de *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* inféodée à la pomme de terre.

Après évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits et détermination de leur CMI vis-à-vis de *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*, nous avons mesuré l'effet de ces extraits sur la pathogénicité de cette bactérie sur tubercules de *Solanum tuberosum* L.

I. Pomme de terre

I.1. Aspect botanique

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) a été décrite par Linné en 1753. Elle appartient à l'embranchement des spermatophytes, à la classe des dicotylédones et à l'ordre des Solanales (Spichiger *et al.*, 2004). *Solanum tuberosum* L. est l'une des plantes les plus importantes de la famille des Solanacées, qui regroupe par ailleurs d'autres plantes d'une importance économique majeure telles que les aubergines, les piments, les poivrons et les tomates (Grison, 1983). Il s'agit d'une espèce herbacée, vivace et cultivée comme une espèce annuelle (Rossignol et Rousselle-Bourgeois, 1996).

Les tiges de la pomme de terre sont grêles et atteignent 1m au maximum. Les feuilles sont longues, pennées à folioles ovées, alternes et insérées par paires le long du rachis qui se termine par une foliole unique (Figure 1). Les fleurs sont groupées en une inflorescence cymeuse, située à l'extrémité de la tige. Elles peuvent être blanches, violettes, rosâtres ou bleuâtres. Le tubercule peut être de grosseur et de forme variable, allant du rond oblong au plus au moins aplati selon les variétés. La couleur de sa peau varie entre le blanc, le jaune, le rose, le rouge et le violet tandis que sa chair est soit blanche, soit jaune (Grison, 1983 ; Rousselle *et al.*, 1996).



Figure 1 : *Solanum tuberosum* L. (Rousselle *et al.*, 1996).

I.2. Production mondiale et algérienne

Avec plus de 330 millions de tonnes, la pomme de terre est la quatrième production mondiale après le maïs, le blé et le riz. Les principaux producteurs sont par ordre, la

Chine, la Fédération de Russie, l'Inde, l'Ukraine et les Etats-Unis avec respectivement 73.5, 37.3, 25, 19.5 et 19.1 millions de tonnes.

Avec une production totale de 2.16 millions de tonnes en 2005, l'Algérie est le deuxième producteur de pommes de terre en Afrique après l'Egypte (FAO, 2005).

I.3. Pourriture molle de la pomme de terre

La pomme de terre est soumise à l'attaque de maladies diverses dues à des champignons (*Phytophthora infestans*, *Fusarium* sp., etc.), des virus (PVA, PVY, PVX, etc.), des bactéries (*Pectobacterium* sp., *Pseudomonas solanacearum*, etc.) et des nématodes. Ces pathogènes, en infectant le feuillage, les racines et/ou les tubercules, provoquent des manques à la levée, un affaiblissement des plants, une mort prématurée et/ou une mauvaise qualité des tubercules. De plus, diverses maladies peuvent apparaître ou continuer à se développer sur les tubercules pendant la période de conservation telle que la gale argentée, la pourriture molle, etc. (Rouselle *et al.*, 1996). En Algérie, 70% des causes de refus sont attribués aux problèmes phytosanitaires dont 29% à des viroses et 32% à des pourritures molles.

I.3.1. Agent causal

Les bactéries pectinolytiques du genre *Pectobacterium* (anciennement appelé *Erwinia*) sont connues pour être responsables des dégâts occasionnés sur pomme de terre. Ce genre est divisé en deux espèces *P. chrysanthemi* et *P. carotovorum*. Cette dernière est divisée en cinq sous-espèces parmi lesquelles deux (*P. carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pcc*) et *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum* (*Pca*)) sont largement inféodées à la pomme de terre. Seule *Pcc* fait l'objet de notre travail.

P. carotovorum ssp. *carotovorum* est une entérobactérie à large spectre d'hôtes, distribuée aussi bien dans les zones tempérées que tropicales (Salmond, 1994). Une étude réalisée par Yahiaoui-Zaidi *et al.* (2003), sur le polymorphisme de l'ADN amplifié d'un grand nombre de souches de *Pcc*, a montré une grande diversité au sein de cette sous-espèce, ce qui explique sa grande répartition géographique. Cette sous-espèce est présente dans l'eau, le sol, sur les insectes et nématodes et à la surface des feuilles. Elle possède un optimum thermique allant de 20 à 30°C (De Boer, 1994)

I.3.2. Description de la maladie

La pourriture molle est l'une des maladies bactériennes de la pomme de terre, responsable des pertes économiques importantes à l'échelle mondiale. La maladie peut se propager en entrepôt à partir de tubercules infectés au champ (De Boer, 1994).

En conservation, les tubercules présentent tout d'abord de petites taches huileuses de 3 à 5 mm de diamètre au niveau des lenticelles. Les taches translucides grandissent en diamètre et en profondeur dans les conditions qui favorisent le développement de la maladie, telles que l'humidité, l'anaérobiose, etc. Le tissu s'affaisse autour du pore et forme des lésions déprimées, et les tissus sous épidermiques deviennent spongieux et se crevassent. Les parties infectées sont d'abord de couleur crème, elles passent ensuite au brun et laissent suinter une substance visqueuse d'odeur fétide (Figure 2). L'odeur est provoquée par les bactéries envahissantes secondaires qui se développent dans les tissus de décomposition. Selon les conditions du milieu ambiant, la maladie évolue en pourriture sèche et les tubercules se momifient, ou en pourriture molle à odeur nauséabonde, leur chair noircie au contact de l'air et se liquéfie. Cette dernière est de loin la plus redoutable car elle conduit à la contamination de nombreux tubercules dans le lieu de conservation (Grison, 1983).

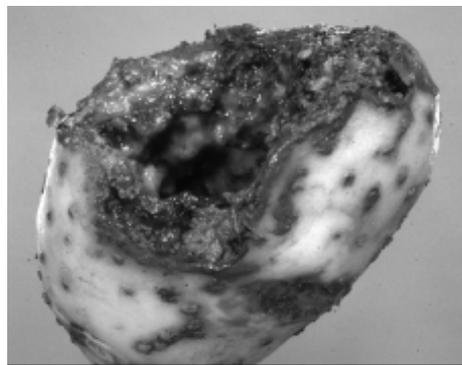


Figure 2 : Pourriture molle d'un tubercule de pomme de terre causée par *Pectobacterium* sp. (Rowe, 1995).

I.3.3. Modes de contamination et développement de la maladie

Les semences et les sols infectés représentent une source importante d'*inoculum*. La propagation de l'infection au champ est facilitée par les eaux d'irrigation et de pluie, les insectes, les nématodes et la machinerie contaminée par ce pathogène. La dissémination en entrepôt est de son côté assurée par le suintement de tubercules pourris et par les insectes (Toth *et al.*, 2003).

Les blessures mal cicatrisées, les lenticelles et le stolon des tubercules sont les principales portes d'entrée des bactéries. L'infection est facilitée par plusieurs facteurs. L'humidité formée sur le tubercule altère l'anatomie des lenticelles entraînant leur ouverture et l'entrée du pathogène dans les tissus. L'eau semble faciliter le mouvement des bactéries sur le cortex du tubercule et les solutés peuvent servir de nutriments pour le métabolisme bactérien. Les conditions d'anaérobiose peuvent aussi d'une part, affecter la membrane cellulaire des tissus de l'hôte entraînant la fuite d'eau et de soluté, à travers la paroi cellulaire et d'autre part, réduire le mécanisme de résistance de l'hôte (Pérombelon, 2002).

Une fois dans l'espace intercellulaire, le pathogène demeure dans ces zones, parfois plusieurs mois à l'état latent. Lorsque les facteurs environnementaux deviennent favorables, la phase de dormance sera rompue et la phase d'attaque bactérienne se met en place. Cette dernière se déroule en deux étapes distinctes : une étape primo-invasive, au cours de laquelle la bactérie se multiplie au point d'infection pour atteindre une densité cellulaire de l'ordre de 10^7 à 10^8 cellules, puis une phase lytique, marquée par une production massive d'une grande variété d'enzymes exocellulaires. Durant cette phase les dégâts apparaissent très clairement sur les végétaux (Smadja *et al.*, 2004).

I.3.4. Moyens de contrôle de la pourriture molle

Un contrôle partiel de cette maladie est obtenu par l'application de certaines pratiques culturales et sanitaires, et indirectement par l'utilisation de fongicides chimiques. Quant à l'utilisation de variétés résistantes, elle demeure encore très expérimentale.

I.3.4.1. Pratiques culturales et sanitaires

Les pratiques culturales et sanitaires traditionnellement utilisées pour contrôler le développement des maladies de la pomme de terre consistent, à éviter de blesser les tubercules pendant les opérations de récolte et de manutention, à débarrasser les champs et les entrepôts des résidus de végétaux potentiellement contaminés et à désinfecter les équipements de lavage et de tri. L'utilisation des semences saines, le bon espacement des plants au champ, l'assurance d'une bonne régie d'entreposage ainsi que la pratique des rotations de cultures permettent également de réduire l'incidence de cette maladie (De Boer, 1994).

I.3.4.2. Lutte chimique

La maladie se développe facilement sur des tubercules pré-infectés par les champignons ; l'utilisation de fongicides aide indirectement à contrôler cette maladie. Les travaux de De Boer (1994), ont montré que le traitement des tubercules avec le formaldéhyde et l'hypochlorite de sodium permet de réduire la quantité d'*inoculum* bactérien présent. Par ailleurs, l'application post-récolte d'acétaldéhyde et de benzoate de sodium, mélangés à la tourbe, sur les tubercules pendant le transport, a également montré en conditions expérimentales une certaine efficacité dans la réduction de la sévérité de la pourriture molle. Une autre étude réalisée par Yaganza (2005), a montré en conditions expérimentales que, le chlorure d'aluminium, le métabisulfite de sodium et à moindre degré le benzoate de sodium permettaient une réduction importante de la pourriture molle causée par *Pca* et *Pcc*, *in vitro* et *in vivo*.

I.3.4.3. Lutte biologique

La lutte biologique fait partie des méthodes de plus en plus favorisées en phytopathologie pour contrôler les maladies végétales. Toutefois, son application aux maladies de la pomme de terre demeure expérimentale. Les travaux de Sharga et Lyon (1998), ont montré que *Bacillus subtilis*107 serait actif *in vitro*, contre deux espèces de *Pectobacterium* (*Pcc* et *Pca*). Dans leurs études récentes, Val *et al.* (2006) ont utilisé les lipopolysaccharides (LPS) extraits des deux souches de *Pca* et de *Pcc* pour la protection des tubercules de pomme de terre contre la pourriture molle causée par *Pca*. Ils ont montré, en conditions expérimentales que, pour des doses de LPS et d'*inoculum* correspondant respectivement à 50 µg/ml de LPS et 10⁷ UFC/ml, une protection est observée après 24 heures de traitement.

II. Interaction pomme de terre- *Pectobacterium*

II.1. Facteurs de pathogénicité

Les molécules présentes à la surface cellulaire de la bactérie ou excrétées dans le milieu extracellulaire, peuvent agir comme des déterminants de pathogénicité.

II.1.1. Constituants périphériques

II.1.1.1. Sidérophores : ce sont des composés de faible poids moléculaire qui lient le fer disponible dans l'environnement immédiat, avec une très grande spécificité et le

véhiculent à l'intérieur de la cellule bactérienne. Le fer étant essentiel lors du processus infectieux, son acquisition se fait par la synthèse de sidérophores. Les *P. carotovorum* synthétisent des sidérophores de type catéchol (Expert, 1999).

II.1.1.2. Flagelles : ils permettent aux bactéries de chercher des environnements favorables ou d'échapper aux conditions détritantes ainsi que la compétition avec les autres micro-organismes. En outre, le flagelle lui-même secrète certains facteurs de virulence tels que les flagellines. Ces dernières peuvent induire des réactions de défense chez l'hôte (Hossain *et al.*, 2006).

II.1.1.3. Lipopolysaccharides : ce sont des composés majeurs des parois bactériennes Gram négatives, ils jouent un rôle important dans les premières étapes de l'infection de la plante, notamment dans la fixation des bactéries aux parois végétales et ils induisent des réponses de défense chez l'hôte (Newman et Ropenack, 2000 ; Val *et al.*, 2006).

II.1.2. Enzymes extracellulaires

L'arsenal de pathogénicité de *Pectobacterium* est constitué d'une variété d'enzymes extracellulaires (les pectinases, les cellulases et les protéases), responsables de la dégradation des constituants de la paroi végétale, de la macération des tissus et de la libération des nutriments indispensables à la croissance bactérienne au niveau du site d'infection (Pérombelon, 2002).

II.1.2.1. Enzymes pectinolytiques

Les pectinases dégradent les fractions pectiques de la paroi cellulaire primaire et de la lamelle moyenne, et facilitent la pénétration et la colonisation de la plante par le pathogène. Elles constituent le facteur déterminant de la pathogénicité des *Pectobacterium*. Les produits cataboliques qui en résultent sont transportés à l'intérieur de la cellule bactérienne pour continuer leur dégradation. Les différentes pectinases rencontrées sont les pectines méthyle estérases (PME), les pectates lyases (Pel), et les polygalacturonases (PG) ou pectates hydrolases (Peh) (Liu *et al.*, 1997).

II.1.2.1.1. Pectines méthyle estérases : ces isoenzymes déméthylent la pectine au niveau du carbone 6 des acides galacturoniques, et permettent alors l'action ultérieure des autres

pectinases dépolymérisantes. L'élimination du groupement méthyle donne comme produit l'acide polygalacturonique et le méthanol (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992).

II.1.2.1.2. Pectates lyases : ces isoenzymes coupent les liaisons α (1-4) des polymères d'acide galacturonique, soit au hasard dans la chaîne (endo Pel), soit aux extrémités (exo Pel), générant ainsi des oligomères insaturés contenant une double liaison entre le C₄ et le C₅ (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1992). Chez *Pcc* trois endo pectates lyases extracellulaires, avec un pH optimale de 8.3-8.5 et deux isoenzymes périplasmiques de pH neutre ont été caractérisées (Mastsumoto *et al.*, 2003).

II.1.2.1.3. Pectates hydrolases : appelées aussi polygalacturonases, elles hydrolysent la chaîne polygalacturonique au niveau de la liaison α (1-4), à l'intérieur de la chaîne (endo Peh) ou aux extrémités (exo Peh). Ces deux formes sont présentes chez *P. carotovorum* mais une sécrétion dominante de l'endo Peh a été principalement observée chez *Pcc* (Priou, 1992). Selon Barras *et al.* (1994), les polygalacturonases sont actives à un pH de 5,5.

II.1.2.2. Enzymes non pectinolytiques

II.1.2.2.1. Cellulases (Cel) : appelées également endoglucanases, elles dégradent les liaisons reliant les résidus D-glucopyranosyls de cellulose en position β (1-4). Chez *Pcc*, deux cellulases avec un pH optimal de 6,8 à 7 ont été décrites (Barras *et al.*, 1994).

II.1.2.2.2. Protéases : elles sont synthétisées dans le but de fournir des acides aminés pour la biosynthèse des protéines microbiennes ainsi que pour la dégradation des protéines de l'hôte associées aux mécanismes de résistance. Ces enzymes peuvent être produites de façon constitutive ou induites par la présence de peptides dans le milieu, et peuvent ainsi accélérer la macération et la perte de cohésion des tissus (Kyöstiö, 1991).

II.2. Régulation de la sécrétion des exo enzymes

Chez la plupart des bactéries phytopathogènes, les facteurs de virulence sont très étroitement régulés, ce qui permet à la bactérie de répondre rapidement aux variations de son environnement. *Pcc* possède un système de sécrétion de pectinases et de cellulases de type II (Thomas *et al.*, 1997). Ce système fonctionne sous le contrôle du Quorum-Sensing (QS) ou communication cellule à cellule.

Dans ce système, la communication dépend de la densité bactérienne et repose sur la synthèse et la diffusion, de bactérie à bactérie, de petites molécules signales, de la famille des N-acyl homosérine-lactones (Michiko *et al.*, 2003). Le système QS est composé d'une protéine régulatrice et d'une enzyme auto inductrice (Ruimy et Andremont, 2004). Chez *Pcc* l'enzyme auto inductrice (La N-(3-oxohexanoyl)-homosérine lactone synthase), contribue à la synthèse de petites molécules signales, N-(3-oxohexanoyl)-homosérine lactone (OHHL) qui diffusent facilement de bactérie à bactérie (Brader *et al.*, 2005).

Lorsque le taux de OHHL atteint un seuil critique qui est relié à la densité de la population (autour de 10^6 cellules/ml) (Toth *et al.*, 2003), les OHHL se lient à la protéine régulatrice de la transcription des gènes exo cellulaires appelée « PecS » (Byers *et al.*, 2002). La modification structurale de la protéine PecS, l'empêche d'assurer sa répression sur l'expression des gènes qu'elle contrôle. Le complexe ainsi formé active la transcription de plusieurs facteurs de virulence et permet d'amplifier et de synchroniser la virulence à l'ensemble de la population bactérienne (Ruimy et Andremont, 2004).

II.3. Mécanisme de défense de la pomme de terre

La plante réagit très tôt à la tentative d'invasion des agents pathogènes. Les mécanismes de défense induits chez le végétal, se caractérisent par un bouleversement du métabolisme. On note ainsi la synthèse ou l'augmentation de la synthèse de molécules constitutives ou non de la plante, pouvant entraîner des modifications morphologiques visant essentiellement à empêcher ou à stopper la colonisation du pathogène. Plusieurs mécanismes de défense sont mis en place au moment de l'infection ou de l'élicitation.

II.3.1. Réaction d'hypersensibilité

La réaction d'hypersensibilité est un mécanisme particulier de résistance locale. Elle présente deux caractéristiques principales: apparition de lésions nécrotiques au niveau de chaque point d'infection (due à la mort de quelques cellules végétales entourant les cellules infectées) et l'accumulation de molécules antimicrobiennes autour de la zone infectée par le pathogène (Greenberg, 1997).

II.3.2. Renforcement de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire est une barrière physique très efficace face aux agresseurs qui synthétisent des enzymes capables de la dégrader. Lors d'une infection par un agent

pathogène cette paroi va être renforcée par des dépôts de lignines, de subérine, de polysaccharides tels que la callose et les glycoprotéines riches en hydroxyproline. Ces derniers forment un réseau serré, empêchant ainsi la pénétration du pathogène, et permettent d'agglutiner les bactéries réduisant ainsi leur mobilité (Benhamou, 1996).

II.3.3. Stimulation des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés synthétisés par la plante pour inhiber ou bloquer la propagation des pathogènes. Les enzymes qui participent à ces synthèses sont stimulées en réponse à l'application d'éliciteurs. La phénylalanine ammonia-lyase, une enzyme permettant la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique. Ce dernier est à l'origine de plusieurs polyphénols dont les acides : transcinnamique, caféique, chlorogénique et ferullique, etc. (Katz *et al.*, 1998). Les blessures et les infections des tubercules favorisent la synthèse et la mobilisation des composés phénoliques. Elles entraînent la libération de la polyphénoloxydase et la peroxydase qui interviennent dans l'oxydation de ces composés en quinones, très toxiques pour les *Pectobacterium* (Lojkowska et Holubovsca, 1992). Certaines enzymes du métabolisme des sesquiterpénoïdes impliquées dans la synthèse de certaines phytoalexines sont aussi induites en réponse à des éliciteurs. Ces composés organiques de faibles poids moléculaires possèdent des propriétés antimicrobiennes et sont synthétisés en grande quantité lors de la réaction d'hypersensibilité (Rogers *et al.*, 1996).

D'autres molécules interviennent dans la résistance des plantes aux pathogènes, dont l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène qui sont des phytohormones. L'éthylène et l'acide jasmonique interviennent dans l'activation de diverses réponses de défense, et à la résistance systémique de toute la plante à certaines pathogènes (Klessig *et al.*, 2000). L'acide salicylique joue un rôle clef dans les mécanismes de défense des plantes. En effet, il est impliqué à la fois dans la mise en place d'une résistance locale et d'une résistance systémique acquise, ainsi que dans l'expression des gènes codant pour les protéines PR (Pathogenesis Related) (Andersen *et al.*, 1998).

II.3.4. Protéines de défense

Les protéines **PR**, représentent un ensemble de protéines dont la production est fortement induite lors de l'infection. Elle sont très stables à pH acide et très résistantes à l'action des protéases produites par la plante elle même ou par les micro-organismes

pathogènes. Ces deux propriétés confèrent aux protéines PR une grande stabilité dans les environnements défavorables où elles s'accumulent, notamment dans les vacuoles, et les espaces intercellulaires occupés par les pathogènes. Elles sont fortement synthétisées au niveau des cellules entourant les lésions nécrotiques (Fritig *et al.*, 1998). Ces protéines sont capables de dégrader la paroi des bactéries, libérant ainsi des petits fragments de chitine et de glucane (Ponstein *et al.*, 1994). Quelques protéines ont été caractérisées et leurs fonctions biochimiques sont connues, les protéines PR-2 sont des β 1,3-glucanases et les protéines PR-3 sont des chitinases. Les glucanases et les chitinases peuvent hydrolyser les composants structuraux du pathogène (Van loon *et al.*, 1994).

II.3.5. Peptides antimicrobiens

Ces peptides sont fortement synthétisés par la pomme de terre en réponse à une agression des pathogènes (Broekaert *et al.*, 1997).

II.3.5.1. Thionines : ils sont majoritairement vacuolaires mais on en trouve aussi dans la paroi cellulaire (Bohlmann et Appel, 1991). Les thionines sont supposées agir sur le pathogène après la mort des cellules végétales et la libération du contenu vacuolaire. Le mode d'action de ces peptides sur les pathogènes est particulier : ils modifient la perméabilité membranaire suivi d'un relargage du contenu cellulaire (Thevissen *et al.*, 1996).

II.3.5.2. Snakines : représentent une nouvelle famille de peptides antimicrobiens isolés du tubercule de pomme de terre. Cette classe provoque l'agrégation des bactéries. Le Snakin-1 est riche en cystine, sur 63 acides aminés on retrouve 12 cystéines. Ce peptide est actif à des concentrations inférieures à 10 μ M, vis-à-vis des pathogènes de la pomme de terre (Segura *et al.*, 1999). Le Snakin-2 est un peptide de 66 acides aminés. Il a été montré que ce peptide est actif, à des concentrations inférieures à 20 μ M, contre les champignons et les bactéries associées à la plante (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002).

III. Métabolites secondaires des végétaux

Les métabolites secondaires des végétaux sont des composés non nutritifs qui ne sont pas essentiellement, vitaux pour l'organisme. Ces composés sont en très grand nombre, d'une variété structurale extraordinaire. Ils marquent de manière originale, une espèce, famille ou genre. Permettent parfois une taxonomie chimique (Richter, 1993).

Trois grandes catégories de métabolites secondaires ont été définies : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques.

III.1. Terpénoïdes

Les composés de ce groupe sont constitués uniquement de l'élément carbone, hydrogène et oxygène. Leur chaîne carbonée est constituée de 5 atomes de carbones, assemblés d'abord en une chaîne insaturée, appelée unité isoprène (Figure 3) qui est ensuite modifiée par oxydation, réduction ou élimination de carbone. Ce groupe comporte les huiles essentielles, résines, stéroïdes et des polymères comme le caoutchouc (Richter, 1993).

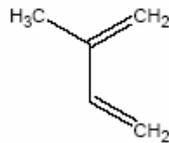
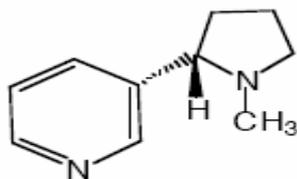


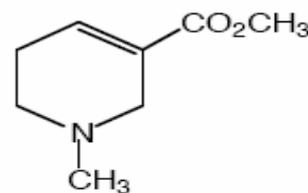
Figure 3 : Structure d'une unité isoprène (Richter, 1993).

III.2. Alcaloïdes

Ce sont des bases organiques dont l'atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique (Figure 4). La majorité des alcaloïdes dériveraient des acides aminés tryptophane, tyrosine, lysine, histidine et ornithine (Richter, 1993).



Nicotine (a)



Arécoline (b)

Figure 4 : Les alcaloïdes dérivés de la phénylalanine (a) et de la tyrosine (b) (Richter, 1993).

III.3. Composés phénoliques

III.3.1. Définition

Les polyphénols également dénommés composés phénoliques, forment l'une des classes principales des métabolites secondaires des végétaux. Ce sont des dérivés non azotés dont l'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement

liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, ester, hétérosides, etc.) (Mompon *et al.*, 1996 ; Robards *et al.*, 1999).

III.3.2. Différentes classes des polyphénols

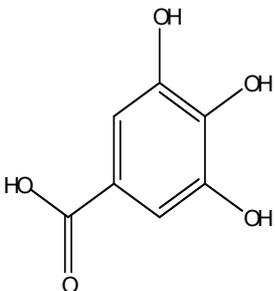
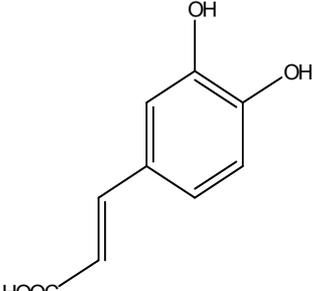
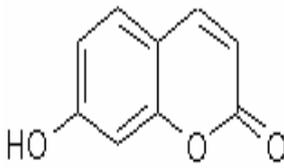
Les polyphénols sont une famille constituée d'environ 8000 composés répartis en différentes classes. Plusieurs classifications sont citées dans la littérature. La classification adoptée dans ce travail est celle de Freudenberg (1920) cité par Despande *et al.* (1986) qui distingue, selon leurs structures, des composés simples de type phénols et des composés complexes de type tannins.

III.3.2.1. Composés phénoliques simples

III.3.2.1.1. Acides phénoliques et coumarines

Le terme acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, cette dénomination est réservée aux acides benzoïques caractérisés par un squelette en C₆-C₁ (acides gallique, *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique et syringique) et les acides cinnamiques de structure C₆-C₃ (acides *p*-coumarique, caféique, férulique et plus rarement l'acide sinapique) (Balasundrum *et al.*, 2006) (Tableau I). Aux acides cinnamiques se rattachent les coumarines, constituées également par un élément en C₆-C₃, dans lequel la chaîne en C₃ est sous forme d'un hétérocycle oxygéné; l'umbelliférone est un exemple de coumarine (Richter, 1993).

Tableau I: Quelques dérivés d'acides phénoliques et de coumarines (Richter, 1993).

Dérivé de l'acide benzoïque (C ₆ - C ₁)	Dérivé de l'acide cinnamique (C ₆ - C ₃)	Dérivé de coumarine (C ₆ - C ₃)
		
Acide gallique	Acide caféique	Umbelliferone

III.3.2.1.2. Flavonoïdes

Comme le laisse supposer sa dénomination historique (du latin, *Flavus* : jaune), ce groupe très important et très étendu comprend des composés de couleur jaune, mais il compte aussi des composés de couleurs variées (bleu, violet, etc.) ou incolores. Les flavonoïdes dérivent du flavane qui contient 15 atomes de carbone, rangés dans la configuration C₆-C₃-C₆; deux noyaux aromatiques, A et B, liés entre eux par un hétérocycle C oxygéné (Figure 5). La configuration variée de ce dernier permet une classification en sous groupes ou familles, dont les membres peuvent porter des substituants différents au niveau des cycles A et B. Les différents sous groupes rencontrés sont les : flavonols, flavones, flavanones, flavanols (catéchines), isoflavones, flavanonols et anthocyanidines (Richter, 1993 ; Balasundrum *et al.*, 2006).

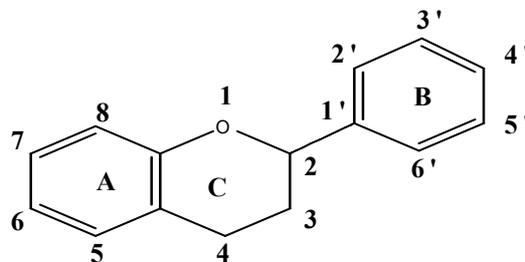


Figure 5 : Squelette carboné des flavonoïdes (Richter, 1993).

III.3.2.2. Composés phénoliques complexes

III.3.2.2.1. Tannins

Ce sont des composés phénoliques complexes obtenus à partir de la condensation des phénols simples. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da, et leur propriété importante réside dans la combinaison de leur nombreux hydroxyles avec les fonctions amides des protéines auxquelles ils se lient par différentes liaisons : liaisons hydrogènes, ioniques ou par des interactions hydrophobes (Makkar, 2003). Les tannins sont divisés en deux groupes: les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Figure 6).

a. Tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucides et d'acides phénoliques, la molécule glucidique est en général du glucose. Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes (tannases) en ose et en acide phénolique, selon la nature de celui-ci, on distingue les gallotannins et les ellagitannins (Ribereau-Gayon, 1968 ; Remesy *et al.*, 1996).

b. Tannins condensés ou proanthocyanidines

Ce sont des dimères, oligomères et/ou polymères de flavanne-3-ols (catéchols ou catéchines) ou de flavannes-3,4-diols (leucoanthocyanes ou proanthocyanidols) liés entre eux par des liaisons carbone-carbone le plus souvent 4-8 ou 4-6 (Remesy *et al.*, 1996).

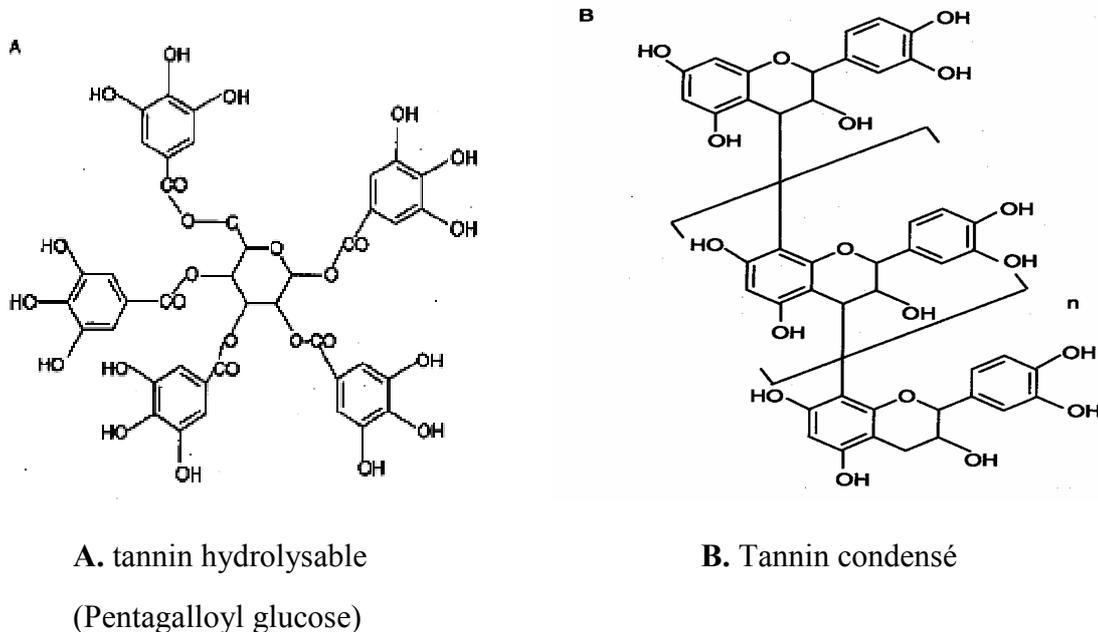


Figure 6 : Structures chimiques des tannins (Bennick, 2002).

III.3.2.2.2. Lignine

La lignine est un polymère d'unités phényle propane qui incruste les parois des cellules végétales, elle est responsable de la dureté et la rigidité de la matière végétale (Scehovic, 1990).

III.3.3. Activités biologiques des composés phénoliques

Les polyphénols sont des composés très répandus dans la nature. Ils sont très fréquents chez les végétaux supérieurs notamment chez les plantes alimentaires, où leur présence contribue aux qualités sensorielles comme la couleur, l'arôme ou l'astringence, et contribue à la protection de l'organisme végétal contre les agressions environnementales (blessures mécaniques, attaques animales et microbiennes) (Scehovic, 1990 ; Remesy *et al.*, 1996). Les composés phénoliques particulièrement les tannins, sont considérés comme des défenseurs de la plante contre les herbivores et les attaques microbiennes. Ce rôle est attribué à leur propriété amère et astringente et à leur capacité

de précipiter les protéines et d'inhiber les enzymes gastro-intestinales des animaux prédateurs et les enzymes microbiennes (Scehovic, 1990).

Les polyphénols sont actuellement l'objet de nombreuses études car ils sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques qui promouvaient des effets bénéfiques sur l'organisme (Dave oomah, 2003). Ils sont caractérisés par une large gamme d'effets biochimiques et pharmacologiques y compris les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, vasculoprotectrices, antiallergiques, antiulcéreuses, antihépatotoxiques et antimicrobiennes (Yang *et al.*, 2001 ; Ghedira, 2005).

III.3.4. Effet antibactérien des composés phénoliques

III.3.4.1. Facteurs d'efficacité des composés phénoliques

Selon de nombreux auteurs, l'effet toxique des composés phénoliques sur les micro-organismes dépend du composé phénolique, de l'espèce microbienne considérée et des conditions du milieu.

III.3.4.1.1. Composé phénolique

L'efficacité d'un composé phénolique dépend de son poids moléculaire et de son hétérogénéité structurale (Hagerman et Butler, 1981). Les facteurs qui peuvent influencer son efficacité sont : la concentration et la solubilité.

a. Concentration

Le rapport pondéral polyphénol/protéine a un effet sur l'affinité des polyphénols pour les protéines (Zimmer, 1995). Lorsque tous les sites de liaison des protéines sont occupés par les polyphénols, le reste de polyphénols non liés forment des petits agrégats qui s'agglomèrent peu à peu. À un poids moléculaire très élevé (> à 5000 Da) le complexe perd sa capacité à précipiter les protéines, en solution physiologique il devient insoluble et précipite (Kumar et Vaithyanathan, 1990).

b. Solubilité

Il a été établi que la lipophilie joue un rôle dans l'activité antimicrobienne. En effet, les molécules hydrophobes interagissent avec les lipopolysaccharides et les lipides, tandis que les composés hydrophiles dépendent des porines qui leur sont indispensables pour traverser la membrane (Meyer *et al.*, 1999).

III.3.4.1.2. Micro-organisme

La structure de la paroi des micro-organismes intervient beaucoup dans la résistance naturelle. Ainsi, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives. Une étude réalisée par Alzoreky et Nakahara (2003) sur l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de 26 plantes de consommation courante en Asie (*Ceratonia silica*, *Artemisia absinthium*, etc.) a révélée que, les bactéries Gram négatives ont montré une résistance vis-à-vis des extraits de 22 plantes alors que les bactéries Gram positives ont été inhibées par les extraits de 16 plantes.

III.3.4.1.3. Conditions du milieu

Une des principales propriétés chimiques des polyphénols est leur facilité d'oxydation. Cette oxydation intervient en présence d'oxygène soit à des pH voisins de neutralité en présence de polyphénoloxydases, soit en milieu alcalin en absence d'enzymes. Les quinones résultant de cette réaction sont très réactives et peuvent réagir avec divers groupements fonctionnels des protéines tels que les groupements α et ε -NH₂, thiol et thioléther (Cuq et Jaussan, 1991). Hurrell *et al.* (1982) ont montré à partir d'un système modèle caséine-acide phénolique, qu'une réaction de condensation se produit entre les groupements NH₂ des résidus lysine et les quinones résultant de l'oxydation du polyphénol. Les dérivés formés, du type amine substituée ou quinonimine, peuvent engendrer des modifications des propriétés fonctionnelles ou structurales des protéines qui se traduisent au niveau bactérien par un effet bactéricide ou bactériostatique (Cuq et Jaussan, 1991).

III.3.4.2. Modes d'action des composés phénoliques

Pour être plus actif, l'agent antimicrobien doit se fixer sur l'enveloppe externe du micro-organisme et la traverser. Cette fixation entraîne des changements de charges électriques et modifient la mobilité électrophorétique de la bactérie (Meyer *et al.*, 1999). La microscopie électronique a montré que les proanthocyanidines du Sainfoin se lient aux polymères du cell coat des *Streptococcus bovis* et *Butyrivibrio fibrislovens*, et entraînent une croissance et une multiplication anormale de ces espèces (Reed, 1995).

L'effet antibactérien des composés phénoliques met en jeu trois mécanismes : action sur la membrane cellulaire, inhibition des enzymes microbiennes, et la privation des substrats et des métaux (Akiyama *et al.*, 2001; Rodriguez-Vaquero *et al.*, 2007).

III.3.4.2.1. Action sur les membranes cellulaires

La membrane cytoplasmique bactérienne présente la même sensibilité aux composés phénoliques, qu'il s'agisse d'une bactérie Gram positive ou Gram négative (Freney *et al.*, 1995). Les polyphénols pénètrent dans la cellule bactérienne et inactivent les perméases du périplasme qui sont impliquées dans le transport des aminoacides et des polysaccharides. Cela entraîne une modification de la perméabilité cellulaire, avec une lyse de la cellule bactérienne suivi par une perte de ses constituants (Leinmüller *et al.*, 1991 ; Lojkowska et Holubovsca, 1992).

L'examen microscopique montre qu'à des concentrations élevées d'acides phénoliques (à partir de 5mM), l'apparence des cellules est très modifiée. Des lésions suivies d'une libération du contenu cellulaire sont observées dans le cas de *Ruminococcus albus* et *Veillonella alcalescens* (Leinmüller *et al.*, 1991).

III.3.4.2.2. Effet sur les enzymes et privation de substrat

Les composés phénoliques inhibent l'activité de divers enzymes. Matsui *et al.* (2002), rapportent que l'extrait phénolique de la racine de la patate douce enrichi en anthocyanines inhibe l'activité de l' α -glucosidase intestinale de la souris et l' α -amylase salivaire humaine. Mc Dougall *et al.* (2005) rapportent également que les extraits phénoliques des fruits (framboise, fraise et cassis) inhibent l'activité de l' α -amylase et de l' α -glucosidase *in vitro*, et que l'élimination des tannins des extraits de framboise et de fraise diminue cette inhibition, et l'enrichissement des extraits de cassis en anthocyanines accentue l'activité enzymatique de ces dernières.

L'inhibition de l'activité enzymatique résulte de deux phénomènes, simultanés ou non. Les composés phénoliques liés aux molécules substrats rendent ces dernières moins accessibles aux enzymes en les insolubilisant ou en masquant les sites de reconnaissance enzyme-substrat. Les tannins liés aux enzymes inhibent leur activité directement par précipitation de la protéine enzymatique et en se fixant sur les sites actifs (de reconnaissance de substrat), indirectement par encombrement stérique et par la formation d'un complexe (enzyme –substrat- inhibiteur) inactif (Leinmüller *et al.*, 1991).

III.3.4.2.3. Privation des métaux

Les composés phénoliques contiennent certains groupes structuraux (α -dihydroxyphénols, α -hydroxycarbonyles, etc.) susceptibles de former des complexes avec

les métaux (Ribereau-Gayon, 1968). Cette complexation est d'une grande importance dans la défense des plantes contre les attaques microbiennes.

L'inhibition de l'activité bactérienne par la formation du complexe ion métallique - composé phénolique, peut découler de la réduction de la teneur en ARN et ADN de la bactérie suite à la réduction de l'utilisation du phosphore, ce dernier fait partie constituante des acides nucléiques. Selon Makkar *et al.* (1988), en présence de 5% d'acide tannique, 20% de phosphore seulement sont incorporés dans la cellule bactérienne. Elle peut également découler de la réduction de l'utilisation du fer qui est un nutriment indispensable à la survie des microorganismes pour des besoins aussi primordiaux que la respiration et la synthèse d'ADN (Akiyama *et al.*, 2001). Et enfin, peut découler de la privation de divers minéraux tels que Cu^{+2} , Fe^{+2} , etc. Ces derniers sont des cofacteurs et des activateurs enzymatiques, et ils jouent sans aucun doute un rôle très important dans le maintien de l'équilibre physicochimique de la bactérie (Meyer *et al.*, 1999).

I. Matériel végétal

Les extraits testés sont obtenus à partir des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. et de deux sous produits d'*Olea europaea* L., variété « Aimel »: les feuilles et le grignon d'olive. Les tubercules de *Solanum tuberosum* L., variété « Désirée » sont utilisés comme substrat d'étude du développement de *Pcc*. Le matériel végétal utilisé est présenté dans la figure 7.



Arbrisseau, feuilles et graines de *P. lentiscus* L.



Arbre et feuilles d'*O. europaea* L. variété « Aimel »



Grignon d'olive variété « Aimel » Tubercules de *S. tuberosum* L. variété
« Désirée »

Figure 7 : Matériel végétal utilisé

Les données générales sur le matériel végétal utilisé sont présentées dans l'annexe I.

I.1. Collecte et conservation des échantillons

I.1.1. Collecte des échantillons

Les feuilles de *P. lentiscus* L. sont récoltées dans la forêt de Sidi Ahmed. La récolte est faite d'une manière aléatoire à partir de plusieurs arbrisseaux en février 2006.

Les feuilles d'*O. europaea* L. proviennent d'une oliverie de Boudjellil (région située au Sud Ouest de la Wilaya de Bejaia). Selon les tests d'identification réalisés à l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de Vigne à Takrietz (ITAFV), il s'agit de la variété Aimel, très largement répandue dans la zone. Les feuilles ont été échantillonnées aléatoirement en février 2006.

Le grignon d'olive est récupéré en janvier 2006 d'une huilerie moderne (région de Boudjellil) à système d'extraction par centrifugation à deux phases.

Les tubercules de pomme de terre variété « Désirée » proviennent du marché (novembre 2006).

I.1.2. Conservation des échantillons

I.1.2.1. Séchage

Compte tenu de la teneur en humidité de nos trois échantillons déterminée par dessiccation à l'étuve (105°C) pendant 4 heures (Doymaz *et al.*, 2004), nous avons procédé à leur séchage à 40°C selon la méthode rapportée par Silanikove *et al.* (1996). Le séchage est arrêté lorsque la teneur en matière sèche atteint 90%.

I.1.2.2. Broyage et tamisage

Les feuilles séchées de *P. lentiscus* L. et d'*O. europaea* L. ont été broyées à l'aide d'un moulin à café (Wong et Kitts, 2006), puis tamisées au moyen d'un tamis de 500µm de diamètre des mailles. Le grignon d'olive est tamisé dans les mêmes conditions que précédemment.

Les poudres ainsi obtenues sont ensuite conservées dans des bocaux en verre, fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière.

II. Extraction des composés phénoliques

- **Principe**

L'extraction solide-liquide met en jeu des mécanismes complexes et moins bien connus. Le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide-liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et le soluté doit ressortir du solide (Mompon *et al.*, 1996).

Dans notre étude nous avons utilisé deux solvants organiques aqueux (le méthanol 80% et l'acétone 70%) ; nous avons également procédé à un délipidage selon l'échantillon au moyen de l'hexane ou de l'éther de pétrole.

- **Mode opératoire**

L'extraction est réalisée selon le protocole de Wong *et al.* (2006). 20g de poudre sont extraits au moyen de 400 ml de solvant à la température ambiante pendant 24 heures sous agitation. Le mélange est centrifugé à 3060 g pendant 15 minutes et le surnageant est filtré sous vide en utilisant du papier Wattman. L'extrait organique aqueux obtenu est concentré sous vide jusqu'à évaporation complète du solvant organique.

La délipidation et la dépigmentation de l'extrait aqueux de *P. lentiscus* L. sont réalisés selon la méthode de Djeridane *et al.* (2006) : trois lavages successifs de la phase aqueuse avec chaque fois un demi-volume d'éther de pétrole (20 ml chaque fois). Pour les extraits issus d'*O.europaea* L. (feuilles et grignon) nous avons utilisé trois lavages successifs avec 400 ml d'hexane (Mc-Donald *et al.*, 2001). Le lavage de chaque extrait donne naissance après décantation à deux phases : une phase organique et une autre aqueuse.

A l'issue du 3^{ème} lavage, la phase aqueuse est récupérée, puis soumise à une évaporation à 40°C jusqu'à stabilisation du poids. L'extrait sec obtenu (extrait brut) est conservé dans un dessiccateur maintenu sous vide. Le poids sec de notre extrait est rapporté à la matière sèche de l'échantillon pour déterminer le rendement d'extraction.

III. Dosage des composés phénoliques

III.1. Polyphénols totaux solubles

- **Principe**

La réaction est basée sur la réduction du mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et de l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) du réactif de Folin Ciocalteu, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de Tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (M_8O_{23}) dans une solution alcaline (Ribereau-Gayon, 1968). La coloration bleue produite est proportionnelle aux taux de composés phénoliques qui sont dosés spectrophotométriquement à 760nm.

- **Mode opératoire**

La quantité de polyphénols totaux solubles est déterminée selon la méthode de Singleton et Rossi (1965) rapportée par Singleton *et al.* (1999). A 100 μ l d'une solution d'extrait brut (préparée par dissolution de l'extrait sec dans de l'eau distillée à une concentration de 1mg/ml) 500 μ l du réactif de Folin Ciocalteu (1N) sont ajoutés. Le mélange est dilué avec 6 ml d'eau distillée. Après 5 minutes d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité, 1.5 ml de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3) (20%) sont ajoutés et le volume est ajusté à 10ml avec de l'eau distillée. Après 2 heures de réaction (température ambiante et obscurité), l'absorbance est lue à 760 nm.

La courbe standard est préparée de la même manière que l'extrait, en utilisant l'acide gallique (annexe II).

La concentration moyenne de l'extrait en polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g de MS).

III.2. Tannins

- **Principe**

Cette méthode repose sur l'aptitude des tannins à précipiter les protéines. Le complexe insoluble protéine-tannins obtenu est dissout dans une solution alcaline (SDS/TEA). Le chlorure ferrique réagit avec les tannins en présence du SDS pour former des chélates de couleur violette, déterminés par spectrophotomètre à 510 nm et la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité de tannins (Ribereau-Gayon, 1968 ; Hagerman et Butler, 1978).

- **Mode opératoire**

Les teneurs en tannins sont déterminées selon le protocole de Hagerman et Butler (1978). Une solution d'extrait brut (1mg/ml) est préparée par dissolution de l'extrait sec dans de l'eau distillée. 1 ml de cette solution et 2 ml de la solution de BSA (annexe III) sont introduits dans un tube à essai. Le mélange est incubé pendant 24 heures à 4°C pour l'extrait à analyser, et pendant 15 minutes à la température ambiante pour l'acide tannique utilisé comme standard. Après une centrifugation à 3060g pendant 15 minutes, le précipité est dissout dans 4 ml de solution SDS/TEA (annexe III) ; un ml de chlorure de fer (FeCl₃) (annexe III) est ajouté et le mélange est agité vigoureusement. Après 15 minutes d'incubation, les absorbances sont lues à 510 nm.

La concentration en tannins est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage préparée avec l'acide tannique (annexe II). La teneur moyenne en tannins est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/ g de MS).

III.3. Flavonoïdes

- **Principe**

La méthode repose sur le principe du dosage direct par le chlorure d'aluminium. En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al⁺³. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (Ribereau-Gayon, 1968).

- **Mode opératoire**

Les teneurs en flavonoïdes sont déterminées selon la méthode de Bahorun *et al.* (1996). Une solution d'extrait brut à une concentration de 1mg/ml est préparée par dissolution de l'extrait sec dans de l'eau distillée. 1ml d'extrait est mélangé avec 1ml d'une solution méthanolique à 2% de chlorure d'aluminium hydraté (AlCl₃, 6 H₂O). Après 10 minutes de réaction (la température ambiante et à l'obscurité), l'absorbance est mesurée à 430 nm.

La concentration en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée de la même manière que l'extrait, en utilisant la quercétine

(annexe II). La teneur moyenne en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/ g de MS).

IV. Activité antibactérienne

IV.1. Activation de la souche bactérienne

La souche *P.carotovorum* ssp. *carotovorum* utilisée pour cette étude provient de la Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (CFBP) d'Angers. Elle est conservée dans le milieu Luria Bertani (LB) (annexe III).

La souche est repiquée par ensemencement de 5 à 6 colonies dans 5 ml de bouillon de culture Levure Peptone (LP) (annexe III) répartis dans des tubes à essai. La pré-culture est incubée dans un bain marie thermostaté à 27°C, sous agitation et pendant 24 heures (Basim *et al.*, 2006). Après activation, la souche est ensemencée sur milieu king B (annexe III) et incubée à l'étuve (27°C) pendant 24 heures.

IV.2. Tests de confirmation de la souche

Des tests biochimiques caractéristiques ont été utilisés pour vérifier l'appartenance de la souche à l'espèce *P. carotovorum*. Il s'agit de l'activité pectinolytique sur le milieu Sutton (annexe III), l'activité fermentative sur milieu Hugh et Leifson (annexe III), la réduction des nitrates et l'utilisation du lactose, du tréhalose et de citrate. D'autres tests comme l'utilisation de mélibiose et la croissance à 37°C sont employés pour vérifier l'appartenance de la souche à la sous espèce *Pcc*.

IV.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

- **Principe**

La méthode repose sur la diffusion de l'extrait à partir des disques chargés et déposés sur le milieu solide, préalablement ensemencé par inondation avec une suspension bactérienne. L'extrait diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration faisant apparaître une zone claire. Plus la zone d'inhibition est grande, plus grande est la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'extrait étudié.

- **Mode opératoire**

Nous avons utilisé la technique de l'antibiogramme donnée par la méthode MSPRH (2005). Nous avons remplacé l'antibiotique (principe actif) par les extraits testés.

Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures est préparée dans l'eau distillée stérile, diluée et ajustée jusqu'à l'obtention d'une opacité de Mac Farland 0.5 (10^8 UFC/ml, correspondant à une DO de 0.1 à 600 nm). Cette suspension est diluée au 1/100 pour donner un *inoculum* de 10^6 UFC/ml.

100µl de cet *inoculum* sont uniformément étalés à la surface de la gélose de Mueller-Hinton (MH). Des disques stériles de 6 mm de diamètre, appliqués sur la gélose, sont imprégnés chacun avec 20 µl de l'extrait aqueux (200 mg/ml). Les disques témoins sont imprégnés avec 20 µl d'eau distillée stérile. Tous les extraits sont stérilisés par filtration sur membrane stérile de 0,45 µm de porosité, juste avant leur utilisation.

Nous avons également testé deux composés phénoliques de synthèse (acide tannique et acide gallique) à des concentrations de 25, 50, 100 et 200 mg/ml. Après 18 à 24 heures d'incubation à l'étuve (27°C), le diamètre des éventuelles zones d'inhibition autour des disques est mesuré au moyen d'une règle graduée.

IV.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur milieu gélosé

- **Principe**

La méthode de dilution en milieu gélosé est utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Une solution aqueuse de concentration connue de composés ou d'extraits testés est diluée dans un volume connu de gélose de MH en surfusion. Après solidification, une suspension bactérienne est déposée à la surface du milieu gélifié. L'extrait ou le composé est considéré inhibiteur lorsqu'il y a absence de colonies visibles à l'œil nu.

- **Mode opératoire**

Les CMI des extraits et des acides tannique et gallique vis-à-vis de *Pcc* sont déterminées selon Al-hebshi *et al.* (2006). Un volume de la solution aqueuse de chaque extrait (ou composé de synthèse) testé est mélangé avec 9 volumes de milieu MH à 50°C, et l'ensemble est coulé en boîte de Pétri. 10µl d'*inoculum* de 10^6 UFC/ml sont déposés en spot après solidification du milieu. La boîte est incubée à l'étuve (27°C) pendant 24 heures.

Nous avons testé plusieurs concentrations de la solution, jusqu'à observation d'une inhibition de la croissance. Des séries de dilutions allant de 1/2, 1/4, 1/8 1/16 à 1/32 ont

été effectuées à partir d'une solution mère de 204.8 mg/ml, pour les extraits de *P. lentiscus* L. ainsi que les composés phénoliques de synthèse, et à partir d'une dose de 819.2 mg/ml pour les extraits d'*O. europaea* L..

V. Influence des extraits sur la pathogénicité de *Pcc*

V.1. Test de pathogénicité

- **Principe**

La méthode repose sur l'observation du symptôme typique de la pourriture molle sur des demi-tubercules inoculés avec *Pcc*.

- **Mode opératoire**

Les tubercules de pomme de terre de variété « Désirée », sans blessures ni maladies, sont utilisés pour les tests de pathogénicité. La méthode d'inoculation des demi-tubercules, décrite par Ibrahim *et al.* (1978) est utilisée pour tester la sensibilité du cultivar à cet agent pathogène.

Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures est préparée avec de l'eau distillée stérile, diluée et ajustée à une concentration de 10^9 UFC/ml, correspondant à une DO de 1 à 600 nm selon Byers *et al.* (2002). La concentration de l'*inoculum* est confirmée par comptage sur King B.

Les tubercules préalablement lavés sont trempés dans l'éthanol à 20% (v/v) pendant 25 minutes puis rincés deux fois à l'eau stérile et séchés à l'air libre (Lulai et Corsini, 1998). Chaque tubercule est coupé longitudinalement en deux parties égales et un puit de 10mm de diamètre x 10mm de profondeur est creusé à l'emporte pièce au centre de chaque demi tubercule. Les puits formés sont inoculés par 100µl d'une suspension bactérienne prélevés à partir d'un *inoculum* de 10^9 UFC/ml. Les demi-tubercules témoins sont remplis avec de l'eau distillée stérile.

Les demi-tubercules ainsi préparés sont disposés dans des bacs en plastique sur du papier filtre humidifié avec 100 ml d'eau stérile et couverts à l'aide d'un film en plastique de façon à créer une atmosphère confinée et humide. Après 6 jours d'incubation à température ambiante (27à 28°C), nous avons procédé à des observations pour noter le développement de la maladie signe d'une pathogénicité de la souche. Cette dernière est testée sur 5 demi-tubercules.

V.2. Effet des extraits sur l'évolution de la pourriture molle sur demi-tubercules

Après confirmation de la sensibilité du cultivar « Désirée » à *Pcc*. L'effet des extraits sur le développement de la pourriture molle sur les demi-tubercules de pomme de terre est testé.

- **Mode opératoire**

Nous avons utilisé la même méthode décrite précédemment avec quelques modifications (Figure 8). Le dépôt des extraits est réalisé selon le protocole de Val *et al.* (2006) qui ont testé le rôle des LPS dans le contrôle du développement de la pourriture molle sur tubercules de pomme de terre. Il consiste à déposer d'abord 100µl de la solution aqueuse d'extrait (un témoin positif est réalisé avec 100µl d'eau distillée stérile), les demi-tubercules sont placés dans les bacs. Après 48 heures de contact, les puits sont remplis avec 100µl d'une suspension bactérienne (10^9 UFC/ml). Après 6 jours d'incubation à température ambiante (27 à 28°C), le développement de la maladie est noté et toute la pourriture est récupérée à l'aide d'une spatule et pesée.

Nous avons également testé les extraits seuls sur les demi-tubercules.

Différentes concentrations d'extraits ont été testées, de façon à avoir dans chaque puit une charge en extrait équivalente à la : CMI/4, CMI/2, CMI, 2xCMI et 4xCMI de chaque extrait, soit des concentrations de :

- 12.8, 25.6, 51.2, 102.4 et 204.8 mg/ml pour les extraits de *P. lentiscus* L.;
- 51.2, 102.4, 204.8, 409.6 et 819.2 mg/ ml pour les extraits acétoniques (EA) d'*O. europaea* L.;
- 102.4, 204.8, 409.6, 819.2 et 1638.4 mg/ml pour les extraits méthanoliques (EM) d'*O. europaea* L..

Les résultats (poids des tissus pourris) sont exprimés en % du témoin pris comme base cent.

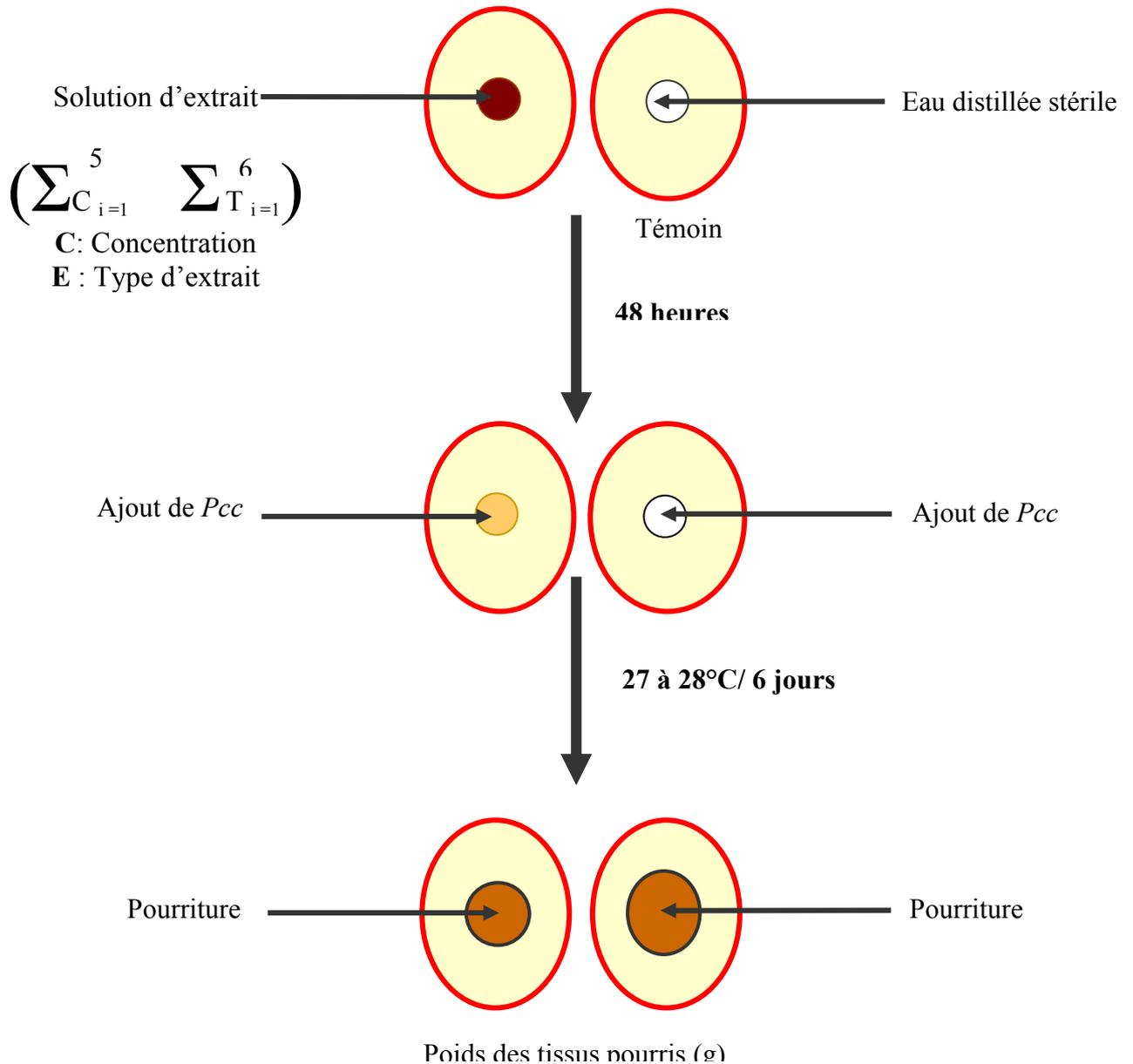


Figure 8 : Schéma d'inoculation des demi-tubercules

VI. Etude statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée au moyen du logiciel STATISTICA 5.5. Pour le test d'humidité nous avons procédé à une analyse de la variance à un facteur. Pour les résultats du dosage des composés phénoliques et les résultats de l'étude *in vitro* et *in vivo*, nous avons utilisé une analyse de la variance à deux facteurs (annexe IV). Tous les tests sont répétés trois fois excepté pour l'étude *in vivo*, chaque essai est testé sur 5 demi-tubercules.

I. Résultats

I.1. Teneur en humidité et rendement en extrait sec

Les résultats montrent que les trois échantillons utilisés présentent des teneurs en humidité significativement différentes entre elles ($P < 0.001$). La teneur en humidité des feuilles d'*O. europaea* L. est relativement la plus élevée. Elle est de $48.49 \pm 0.67\%$ contre $47.35 \pm 0.53\%$ pour les feuilles de *P. lentiscus* L. et $44.61 \pm 0.65\%$ pour le grignon d'olive.

La figure 9 montre que pour les trois échantillons utilisés, les rendements en extraits secs sont légèrement plus élevés avec l'acétone aqueux (AA) qu'avec le méthanol aqueux (MA). De même nous notons que quelque soit le solvant utilisé, les rendements en extraits secs sont plus élevés pour les feuilles de *P.lentiscus* L. que pour les deux autres substrats (feuilles d'*O.europaea* L. et grignon d'olive).

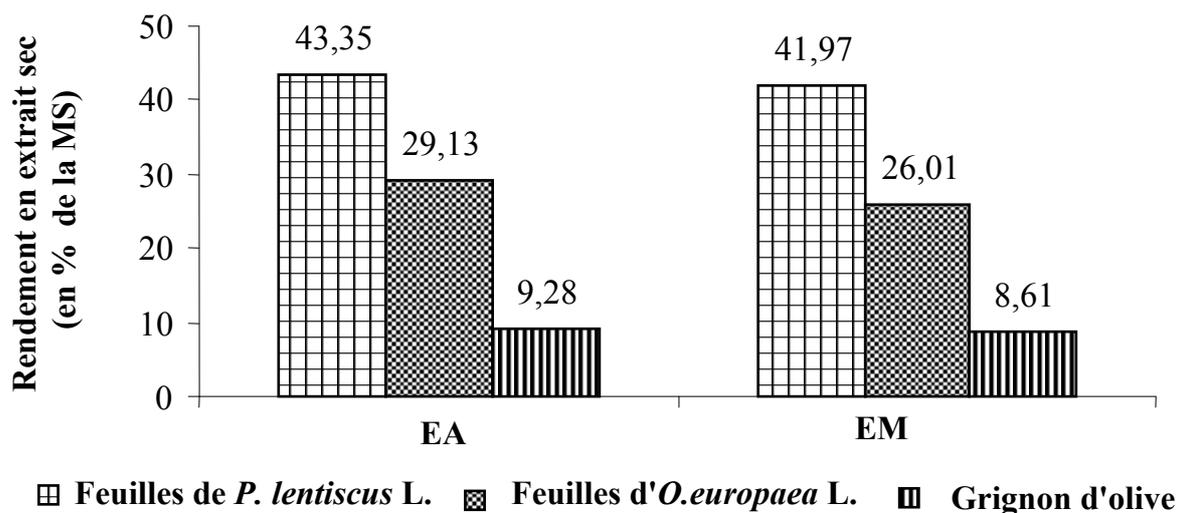


Figure 9 : Rendements en extraits secs avec l'acétone aqueux et le méthanol aqueux.

I.2. Teneur en composés phénoliques

Les différents dosages réalisés ont révélé la présence de composés phénoliques dans nos substrats expérimentaux, avec des proportions variables.

Les résultats rapportés dans le tableau II montrent un effet hautement significatif ($P < 0.001$) sur la teneur en composés phénoliques qui dépend tant de la nature du substrat végétal que du solvant d'extraction utilisé.

Quelque soit le solvant considéré, les feuilles de *P. lentiscus* L. présentent des teneurs en composés phénoliques nettement plus élevées comparativement aux feuilles d'*O. europaea* L. et au grignon ; 133.05 à 162.71 mg EAG/g de MS de polyphénols totaux solubles, 34.47 à 37.1 mg EAT/g de MS de tannins et 3.09 à 3.53 mg EQ/g de MS de flavonoïdes. Chez *O. europaea* L., les feuilles s'avèrent plus riches en composés phénoliques que le grignon. Les teneurs sont de 4.5 à 4.8 fois plus élevées pour les polyphénols totaux solubles, contre 2.3 à 2.7 pour les tannins. En ce qui concerne les flavonoïdes cette différence est nettement plus marquée : les teneurs sont de 15.8 à 36 fois plus élevées.

Tableau II : Teneurs en composés phénoliques des différents substrats

	Feuilles de <i>P. lentiscus</i> L.		Feuilles d' <i>O. europaea</i> L.		Grignon d'olive		Signification	
	E A	E M	E A	E M	E A	E M	Solvant	Matériel végétal
Polyphénols Totaux solubles (mg EAG/g de MS)	162.71 ^a ± 0.29	133.05 ^b ± 0.16	82.25 ^c ± 0.17	51.86 ^d ± 0.10	18.39 ^e ± 0.01	10.71 ^f ± 0.04	***	***
Tannins (mg EAT/g de MS)	37.16 ^a ± 0.04	34.47 ^b ± 0.02	1.32 ^c ± 0.05	0.43 ^d ± 0.02	0.48 ^d ± 0.01	0.19 ^e ± 0.01	***	***
Flavonoïdes (mg EQ/g de MS)	3.09 ^b ± 0.003	3.53 ^a ± 0.002	1.74 ^d ± 0.0005	1.80 ^c ± 0.002	0.11 ^e ± 0.001	0.05 ^f ± 0.001	***	***

*** : Effet significatif (P < 0.001).

Sur une même ligne, les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement (P > 0.001).

Pour un même substrat végétal, l'analyse de nos données montre que globalement l'AA extrait plus de polyphénols totaux solubles et de tannins que le MA. Toutefois, nous

notons le phénomène inverse pour les teneurs en flavonoïdes dans les feuilles de *P. lentiscus* L. et d'*O. europaea* L. De même pour le grignon, l'AA s'avère le meilleur extracteur des flavonoïdes que le MA.

L'AA améliore l'extraction des polyphénols totaux solubles de 22% pour *P. lentiscus* L., contre 59 et 71% respectivement pour les feuilles d'*O. europaea* L. et pour le grignon. Pour les tannins, le MA n'extrait environs qu'un tiers (1/3) des quantités révélées par l'AA chez *O. europaea* L. (feuilles et grignon) ; pour *P. lentiscus* L., cette diminution n'est que de 7.2%. Comparativement à l'AA, le MA améliore de 3% l'extraction des flavonoïdes pour les feuilles d'*O. europaea* L. et 14% pour les feuilles de *P. lentiscus* L. ; pour le grignon d'olive, le MA n'extrait que 54.5% des teneurs obtenues avec l'AA.

Les teneurs en composés phénoliques de nos substrats (exprimées en % de l'extrait sec) sont rapportées dans l'annexe V. Nous observons la même variabilité en notant toute fois que ces teneurs dépendent du rendement en extrait sec.

I.3. Activité antibactérienne

I.3.1. Confirmation de la souche

Les résultats de l'ensemble des tests biochimiques résumés dans le tableau III, confirment l'appartenance de la souche étudiée à la sous espèce *Pcc*.

Tableau III : Caractérisation biochimique de *Pcc*

Tests biochimiques	Réponses
Activité pectinolytique	+
Activité fermentative	+
Réduction des nitrates	+
Utilisation du lactose	+
Utilisation du tréhalose	+
Utilisation du mélibiose	+
Utilisation du citrate	+
Croissance à 37°C	+

I.3.2. Activité antibactérienne des acides tannique et gallique

Les résultats illustrés dans les figures 10 et 11 montrent une sensibilité de *Pcc* aux acides gallique et tannique.

C1 : 200mg/ml C2 : 100mg/ml C3 : 50mg/ml C4: 25mg/ml

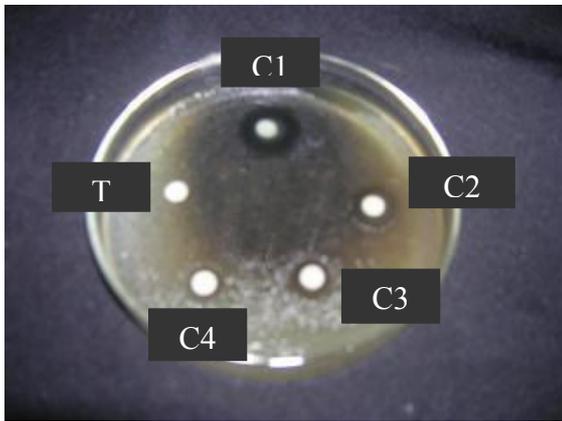


Figure 10 : Effet antibactérien de l'acide gallique contre *Pcc*.

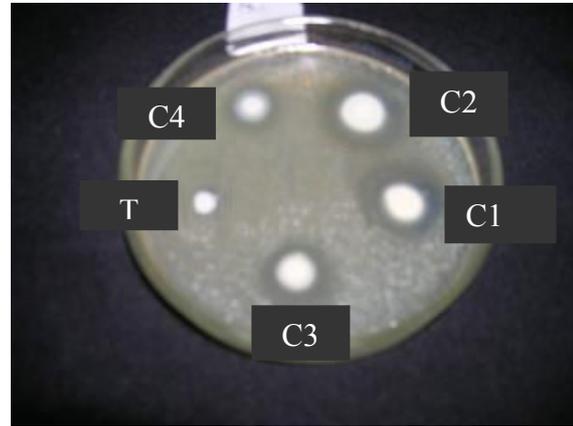
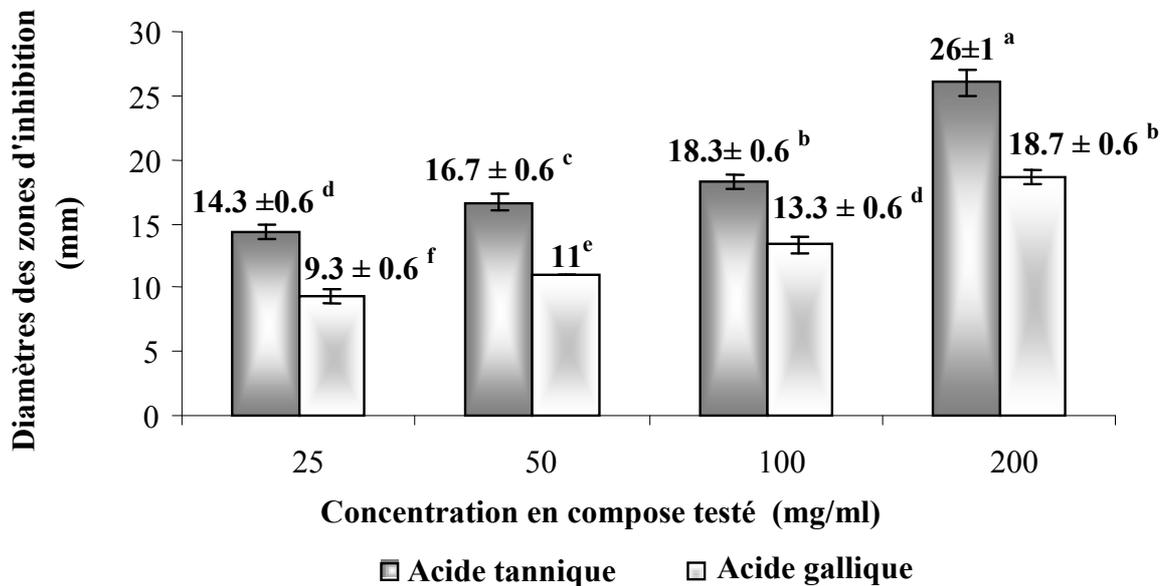


Figure 11 : Effet antibactérien de l'acide tannique contre *Pcc*.

Les résultats de la figure 12 montrent que le comportement de cette souche bactérienne varie en fonction du composé phénolique et de la dose ($P < 0.001$).

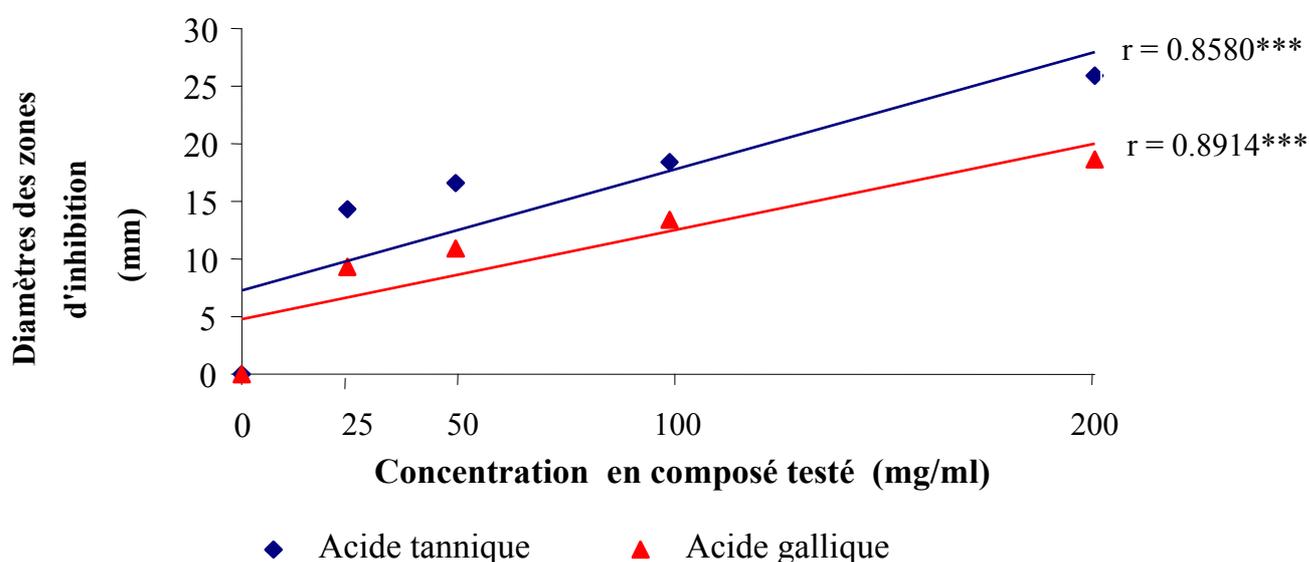


Les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement ($P > 0.05$).

Figure 12 : Représentation de l'activité antibactérienne des acides tannique et gallique contre *Pcc*.

L'acide tannique présente l'activité antibactérienne la plus élevée ($P < 0.05$). Nous relevons des différences dans les diamètres des zones d'inhibition allant de 34-35% pour les concentrations en composés testés de 25 et de 50 mg/ml et de 27-28% pour les concentrations de 100 et de 200 mg/ml, en faveur de l'acide tannique.

L'activité antibactérienne des deux composés augmente avec la dose utilisée. Ainsi, des corrélations linéaires positives significatives ($P < 0.001$) (figure 13) sont observées entre les concentrations d'acides tannique et gallique et les diamètres des zones d'inhibition.

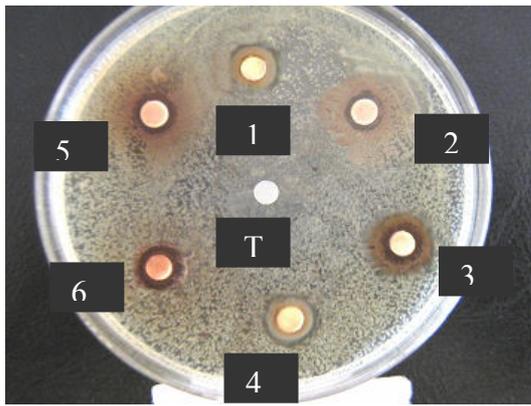


*** : Corrélation significative ($P < 0.001$).

Figure 13 : Corrélations linéaires entre les concentrations d'acides tannique et gallique et les diamètres des zones d'inhibition.

I.3.3. Activité antibactérienne des extraits

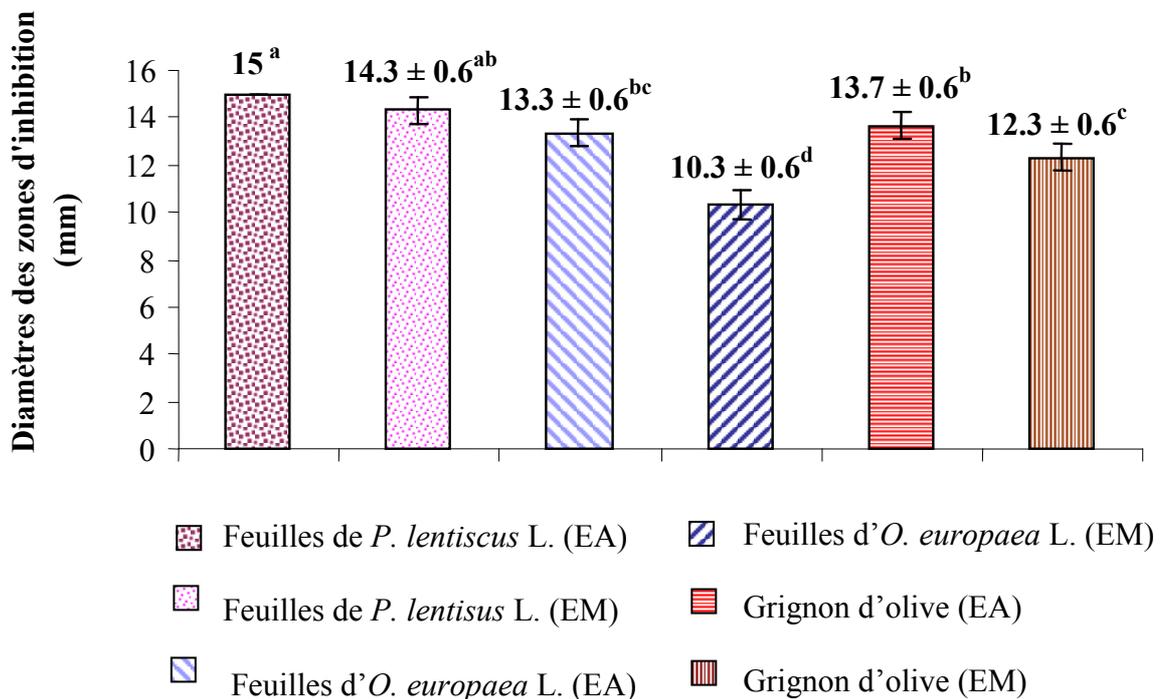
La figure 14 montre que les EA et les EM de feuilles de *P. lentiscus* L. et des produits d'*O. europaea* L. manifestent une activité antibactérienne vis-à-vis de *Pcc*.



- 1 : Feuilles de *P. lentiscus* L. (EM)
- 2 : Feuilles d'*O. europaea* L. (EM)
- 3 : Feuilles d'*O. europaea* L. (EA)
- 4 : Feuilles de *P. lentiscus* L. (EA)
- 5: Grignon d'olive (EM)
- 6: Grignon d'olive (EA)
- T:Témoin

Figure 14 : Effet antibactérien des extraits contre *Pcc*.

Les résultats de la figure 15 montrent que l'effet inhibiteur diffère significativement ($P < 0.01$) d'un extrait à un autre et varie en fonction de la nature du matériel végétal et du solvant d'extraction.



Les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement ($P > 0.01$).

Figure 15 : Représentation de l'activité antibactérienne des extraits contre *Pcc*.

L'effet inhibiteur le plus élevé est obtenu avec l'EA de *P. lentiscus* L et l'effet le plus faible est obtenu avec l'EM de feuilles d'*O. europaea* L. Une similitude (différences non significatives ($P > 0.01$)) d'action est observée d'une part entre l'EM de *P. lentiscus* L., l'EA des feuilles d'*O. europaea* L. et EA du grignon, et d'autre part entre l'EM du grignon et l'EA des feuilles d'*O. europaea* L..

I.3.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les résultats de l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices (tableau IV), montrent que l'acide tannique présente la plus faible CMI (1.28 mg/ml).

Tableau IV : CMI des composés phénoliques de synthèse et des extraits vis-à-vis de *Pcc*.

concentration minimale inhibitrice (mg/ml)							
Composés phénoliques de synthèse		Extrait acétonique			Extrait méthanolique		
Acide tannique	Acide gallique	Feuilles de <i>P. lentiscus</i> L.	Feuilles d' <i>O. europaea</i> L.	Grignon d'olive	Feuilles de <i>P. lentiscus</i> L.	Feuilles d' <i>O. europaea</i> L.	Grignon d'olive
1.28	5.12	5.12	20.48	20.48	5.12	40.96	40.96

Quelque soit le solvant utilisé, l'extrait sec de *P. lentiscus* L. manifeste un même effet inhibiteur que l'acide gallique (CMI de 5.12 mg/ml). Les extraits acétoniques d'*O. europaea* L. présentent un pouvoir inhibiteur nettement plus prononcé que les extraits méthanoliques (CMI de 20.48 mg/ml contre 40.96 mg/ml respectivement).

I.4. Effet des extraits sur la pathogénicité de *Pcc*

I.4.1. Pathogénicité de *Pcc*

L'observation visuelle des symptômes après inoculation, a montré une sensibilité de tous les tubercules vis-à-vis de *Pcc*. Les symptômes obtenus, présentés dans la figure 16, se caractérisent par l'apparition d'une zone nécrosée d'aspect liquide et de couleur crème, entourée d'un halo noir marquant une frontière avec les tissus sains.



Figure 16 : Symptôme de pourriture molle provoqué par *Pcc*.

Pour la majorité des demi-tubercules, la quantité de tissus pourris varie de 2 à 2,5 g après 6 jours d'incubation à la température ambiante (27 à 28°C). Les résultats du test de normalité (**figure 17**) montrent que la distribution de la sensibilité à la pourriture molle entre les demi-tubercules est normale.

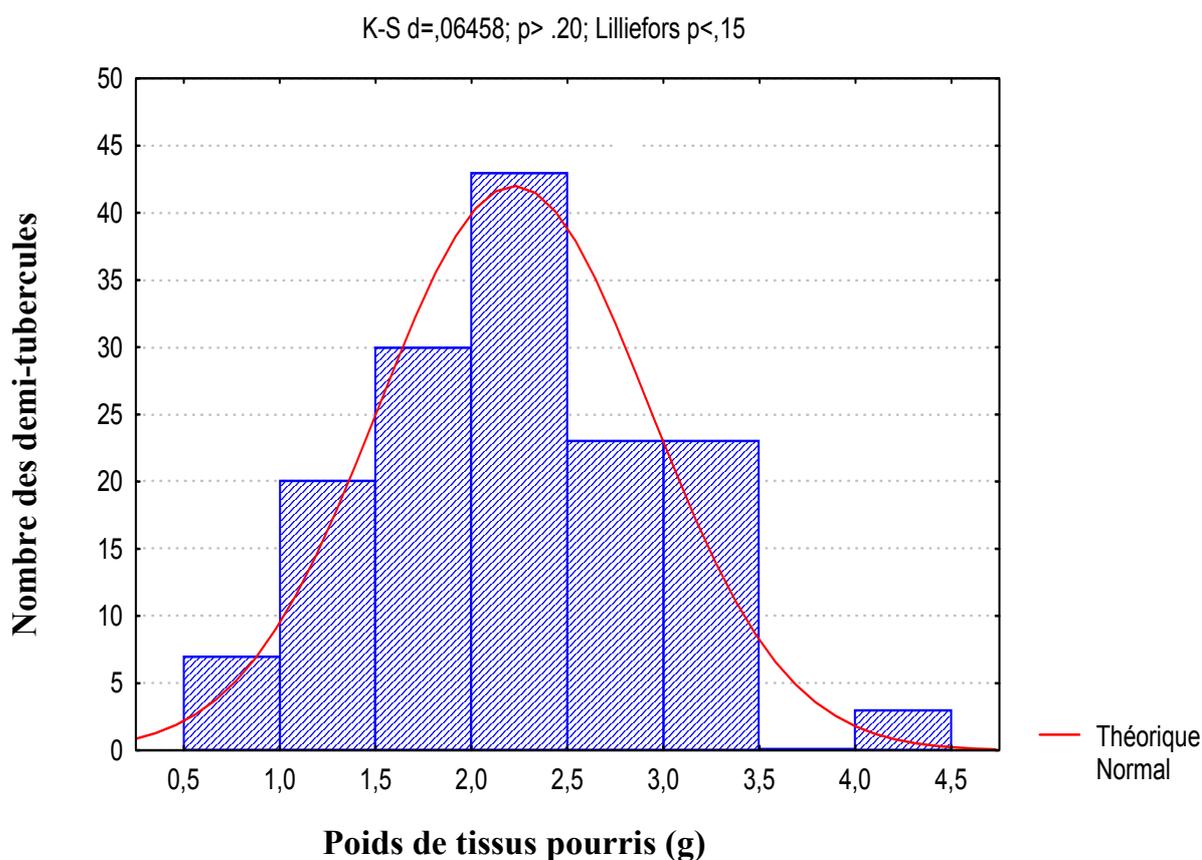


Figure 17 : Distribution de la sensibilité des demi-tubercules à la pourriture molle

I.4.2. Effet des extraits sur l'évolution de la pourriture molle

Les résultats de l'inoculation des demi-tubercules après traitement des ces derniers par les différentes concentrations d'extraits montrent une réduction du poids des tissus pourris. Cette réduction est nettement plus importante en présence des extraits de *P. lentiscus* L. comparativement aux extraits d'*O. europaea* L. Nous notons également une diminution remarquable de la quantité de tissus pourris en présence des extraits acétoniques d'*O. europaea* L. par rapport à leurs équivalents méthanoliques.

Les différents résultats obtenus montrent un effet net de la concentration de l'extrait sur l'inhibition du développement de la pourriture molle quelque soit le solvant et le substrat utilisé ($P < 0.001$). L'analyse statistique des résultats montre que seul les extraits méthanoliques d'*O. europaea* L. présentent des différences significatives entre eux ($P < 0.001$).

Pour les extraits de *P. lentiscus* L. (tableau V), nous notons une réduction graduelle de la pourriture molle avec l'augmentation de la concentration en extrait pour atteindre à 204.8 mg/ml une inhibition totale.

Tableau V : Effet des extraits de *Pistacia lentiscus* L. sur l'évolution de la pourriture molle causée par *Pcc*.

Concentration (mg/ml)	<i>P. lentiscus</i> L.		Signification	
	EA	EM	Solvant	Concentration
	Poids des tissus Pourris (en % des témoins)			
0	100 ± 1.78	100 ± 1.91	***	***
12,8	92,5 ± 0.92	93,7 ± 1.49		
25,6	86,2 ± 0.71	88,2 ± 1.50		
51,2	74,8 ± 0.71	77,4 ± 1.95		
102,4	51,2 ± 0.79	53 ± 1.49		
204,8	0	0		

Pour les extraits acétoniques des feuilles d'*O. europaea* L. et du grignon d'olive (tableau VI), le poids de la pourriture diminue de 25% et de 50% à des concentrations de 204.8 et 409.6 mg/ml respectivement. A une concentration de 819.2 mg/ml, l'inhibition totale est atteinte.

Tableau VI : Effet des extraits acétoniques d'*O. europaea* L. sur l'évolution de la pourriture molle causée par *Pcc*.

Concentration (mg/ml)	<i>O. europaea</i> L. (EA)		Signification	
	Feuilles	Grignon	Substrat	Concentration
	Poids des tissus Pourris (en % des témoins)		***	***
0	100 ± 1.12	100 ± 1.95		
51,2	94,04 ± 0.77	92,62 ± 1.61		
102,4	88,02 ± 3.43	87,4 ± 0.18		
204,8	71,8 ± 0.08	75,82 ± .20		
409,6	50,2 ± 0.26	49,42 ± 0.15		
819,2	0	0		

Pour l'extrait méthanolique du grignon d'olive (tableau VII), la réduction du poids des tissus pourris est observée à partir de la concentration 204.8 mg/ml. Avec une réduction de la croissance de l'ordre de 10, 25 et 50% avec les concentrations de 409.6, 819.2 et 1638.4 mg/ml respectivement.

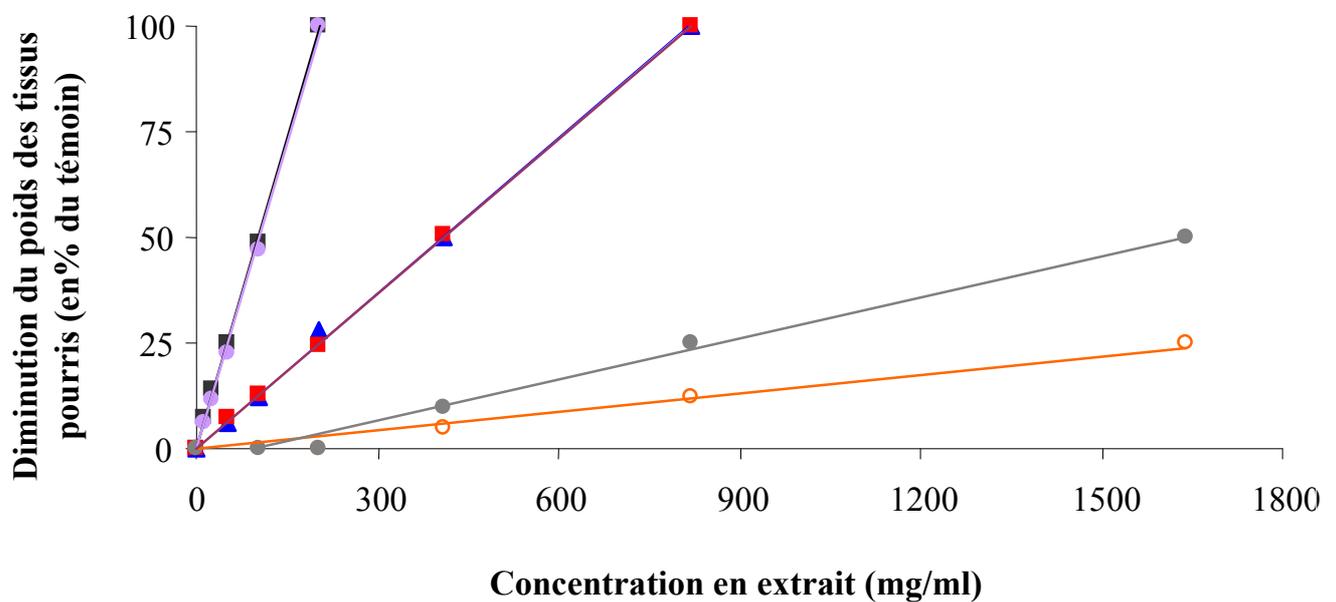
Tableau VII : Effet des extraits méthanoliques d'*O. europaea* L. sur l'évolution de la pourriture molle causée par *Pcc*.

Concentration (mg/ml)	<i>O. europaea</i> L. (EM)		Signification	
	Feuilles	Grignon	Substrat	Concentration
	Poids des tissus Pourris (en % des témoins)		***	***
0	100 ± 1.07 ^a	100 ± 2.82 ^a		
102,4	105 ± 3.66 ^a	100,02 ± 0.14 ^a		
204,8	100,3 ± 0.24 ^a	100,02 ± 3.9 ^a		
409,6	94,92 ± 0.17 ^b	90,24 ± 1.43 ^c		
819,2	87,98 ± 0.23 ^c	75 ± 0.08 ^d		
1638,4	75 ± 0.85 ^d	50 ± 0.41 ^e		

Les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement ($P > 0.001$).

Pour l'extrait méthanolique de feuilles d'*O. europaea* L., la réduction du poids de la pourriture est observé à partir d'une concentration en extrait de 409.6 mg/ml, et le taux atteint une valeur de 5, 12 et 25 % à des concentrations de 409.6, 819.2 et 1638.4 mg/ml.

La réduction de la pourriture molle par les différents extraits augmente significativement avec les concentrations. Ainsi, des corrélations linéaires positives significatives ($P < 0.001$) (figure 18) sont observées entre les différentes concentrations d'extraits et la réduction du poids des tissus pourris.



- (a) *P. lentiscus* L. (EA) ● (b) *P. lentiscus* L. (EM) ▲ (c) Feuilles d'*O. europaea* L. (EA)
 ○ (d) Feuilles d'*O. europaea* L. (EM) ■ (e) Grignon (EA) ● (f) Grignon (EM)

(a): $r = 0.9997^{***}$ (b) : $r = 0.9993^{***}$ (c) : $r = 0.9993^{***}$

(d): $r = 0.9781^{***}$ (e) : $r = 0.9998^{***}$ (f) : $r = 0.9938^{***}$

*** : Corrélation significative ($P < 0.001$).

Figure 18 : Corrélations linéaires entre les concentrations d'extraits et les diminutions des poids des tissus pourris.

II. Discussion générale

Le but du présent travail est d'étudier le comportement de *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* vis-à-vis des tubercules de pomme de terre, en présence d'extraits bruts des feuilles de *P. lentiscus* L. et d'*O. europaea* et du grignon d'olive. Ces derniers sont obtenus par extraction solide-liquide au moyen de solvants organiques aqueux (AA et MA) recommandés par de nombreux chercheurs car meilleurs extracteurs des composés phénoliques que les solvants organiques purs (Chavan *et al.*, 2001 ; Luthria et Mukhopadhyay, 2006).

L'extraction étant différée dans le temps par rapport à la récolte de nos échantillons, la conservation de ces derniers (par voie sèche et selon les recommandations de Silanikove *et al.* (1996)) s'est avérée nécessaire. Les teneurs en humidité de nos substrats expérimentaux sont élevées (44.6 à 48.5%) et comparables aux données bibliographiques Delgado-Pertinez *et al.* (2000) pour les feuilles d'*O. europaea* L., Doymaz *et al.* (2004) pour le grignon et Silanikove *et al.* (1996) pour les feuilles de *P. lentiscus* L..

L'extraction n'est qu'une étape de transformation de la matière première végétale en un extrait ou en un produit pur (Mompon *et al.*, 1996). Son but est de faire diffuser les composés phénoliques présents dans cette matière végétale dans la phase liquide (Escribano-Bailón et Santos-Buegla, 2003). Les rendements en extraits secs par l'AA et par le MA dépendent de la quantité de composés solubilisée par les solvants. Les rendements d'extraction les moins élevés sont obtenus avec le grignon d'olive, substrat pauvre en contenu cellulaire solubles. Ce dernier est connu pour sa richesse en lignocellulose qui représente 50 à 83% de la MS (Zaidi *et al.*, 2007), contre 39.9 à 62.6% de la MS pour les feuilles d'*O. europaea* L. (Delgado-Pertinez *et al.* 2000) et 39.9 à 44% de la MS pour les feuilles de *P. lentiscus* L. (Silanikove *et al.*, 1996).

Les différents dosages réalisés ont mis en évidence la présence de polyphénols totaux solubles, de tannins et de flavonoïdes dans les trois substrats utilisés.

Il est difficile de comparer nos résultats avec les données bibliographiques. En effet, l'extraction des composés phénoliques de leur matrice naturelle est compliquée par leur diversité et leur sensibilité à l'oxydation et à l'hydrolyse (Naczki et Shahidi, 2004). De même, plusieurs facteurs peuvent influencer les quantifications tels que le cultivar, le

degré de maturation des feuilles et du fruit (Amiot *et al.*, 1986 ; Makkar *et al.*, 1988), les conditions d'environnement (Zimmer, 1995), le mode de conservation des substrats d'extraction (séchage), ainsi que de nombreux paramètres liés à la méthode d'extraction (température, durée et nombre de répétitions d'extraction, etc.) (Levizou *et al.*, 2004 ; Pinelo *et al.*, 2005).

Nos résultats révèlent un effet significatif ($P < 0.001$) tant de la nature du matériel végétal utilisé que du solvant d'extraction. Les résultats du dosage montrent que les feuilles de *P. lentiscus* L. sont très riches en composés phénoliques (polyphénols totaux solubles, tannins et flavonoïdes) comparativement aux produits d'*O. europaea* L. (feuilles et grignon).

Les teneurs en polyphénols totaux des feuilles de *P. lentiscus* L. 13.3% à 16.3% sont inférieures à celle rapportée par Decandia *et al.* (2000) qui est de 17.3%. Les teneurs en tannins 3.45% à 3.72% sont inférieures à la teneur rapportée par Romani *et al.* (2002): 6 à 7%.

Chez *O. europaea* L., connue comme une source de biophénols (Micol *et al.*, 2005 ; Bianco *et al.*, 2006 ; Ranalli *et al.*, 2006), les feuilles sont plus riches en composés phénoliques (polyphénols totaux solubles, tannins et flavonoïdes) que le grignon. Pour les feuilles d'*O. europaea* L., les teneurs en polyphénols totaux solubles 8.22 à 5.18 % représentent 4 à 6.5 fois celles signalées par Ferreira *et al.* (2006). Škerget *et al.* (2005) rapportent que les feuilles d'*O. europaea* L. contiennent 0.12% de proanthocyanidines ; cette valeur est proche de celle obtenue avec l'AA (0.13%) et plus élevée que la teneur obtenue avec le MA (0.04%). Les teneurs en flavonoïdes des feuilles d'*O. europaea* L. (0.17 à 0.18%) sont supérieures aux données rapportées en 2005 par Škerget (0.038%).

Pour le grignon, la teneur en polyphénols totaux solubles obtenue avec l'AA (1.84%) est proche de celle rapportée par Cardoso *et al.* (2004) alors que notre extrait méthanolique se compare aux résultats de Martin-Garcia *et al.* (2003). Les teneurs en tannins (0.02 à 0.05%) sont inférieures à la teneur rapportée par Nefzaoui (1985) qui est de 0.52% pour un grignon tamisé épuisé à l'hexane.

Les bases de données investies ne rapportent pas d'études sur les teneurs en flavonoïdes pour les feuilles de *P. lentiscus* L. et le grignon.

L'AA extrait significativement ($P < 0.001$) plus de polyphénols totaux solubles et de tannins que le MA pour les trois échantillons utilisés. Notre résultat est en accord avec les données de la littérature ; Turkmen *et al.* (2006), rapportent que les rendements d'extraction des composés phénoliques à partir du thé noir et du thé vert sont plus élevés avec l'AA (50% et 80%) qu'avec le MA (50% et 80%). Ces données corroborent les observations rapportées par Avallone *et al.* (1997) pour les fruits, les graines et le germe de *Ceratonia siliqua* L., Chavan *et al.* (2001) pour les *Lathyrus maritimus* L. frais et séché et Areias *et al.* (2005) pour la sauge.

Les extraits phénoliques des plantes sont généralement des mélanges des différentes classes de composés phénoliques qui sont solubles dans le solvant utilisé. La solubilité de ces composés est gouvernée par le type de solvant (polarité), le degré de polymérisation des composés à diffuser ainsi que leurs interactions avec d'autres constituants et la formation de complexes insolubles (Naczki et Shahidi, 2004). La variabilité de l'extraction des tannins par l'acétone et par le méthanol peut s'expliquer par la capacité de l'acétone à dissocier les complexes formés entre les protéines et les tannins ce qui augmente l'extrahibilité de ces derniers (Hagerman, 1989). Selon Mueller-Harvey (2001), le méthanol réagit avec les tannins hydrolysables particulièrement les gallotannins et les scinde à pH neutre en acide phénolique et en glucides ce qui diminue leur extrahibilité.

La plupart des flavonoïdes existent sous forme d'hétérosides dans lesquels un ou plusieurs groupements hydroxyles sont combinés à des sucres (Rice-Evans *et al.*, 1997). La présence d'une fraction osidique qui rend les flavonoïdes très solubles dans l'eau explique le résultat obtenu dans les extraits de *P. lentiscus* L. et les extraits de feuilles d'*O.europaea* L. Selon Escribano-Bailón et Santos-Buegla (2003), l'utilisation du mélange méthanol/eau (50/50) suffit souvent pour obtenir une bonne extraction des hétérosides phénoliques à partir de la plupart des plantes. Une quantité importante de flavonoïdes sous forme libre non liée à une fraction osidique est extraite par l'acétone dans le cas du grignon.

Les effets antimicrobiens d'extraits de plantes ont été rapportés par de nombreux chercheurs (Hayder *et al.*, 2005 ; Parekh *et al.*, 2005). Ainsi, des extraits de feuilles de *P. lentiscus* L., *Pelargonium sidoide* et *Thymus spathulifolius* se sont avérés efficaces contre un grand nombre de micro-organismes tels que les bactéries (*Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, etc.), les moisissures (*Aspergillus niger*, *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Phythium ultimum* etc.) et les levures (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc.) (Kordali *et al.*, 2003 ; Sokmen *et al.*, 2004).

Il a été montré que l'activité antibactérienne des extraits de plantes est attribuée à leurs composés phénoliques (Van Der-Watt et Pretorius, 2001 ; Panizzi *et al.*, 2002). Ainsi, les extraits phénoliques de *Robus ulmifolius* L. et de *Satureja hortensis* L. ont montré une activité antimicrobienne à l'égard d'une large gamme de pathogènes tels que *Pseudomonas aerogenosa*, *Bacillus cereus*, *A.spergillus flavus*, *Pectobacterium carotovorum* , *Erwinia amylovora*, etc. (Panizzi *et al.*, 2002 ; Sahin *et al.*, 2003).

Nos résultats avec les acides tannique et gallique montrent que *Pcc* est sensible au deux composés phénoliques. Une étude réalisée par Chung *et al.* (1993) a montré que l'acide tannique inhibe la croissance de certaines bactéries intestinales (*Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*). Rodriguez-Vaquero *et al.* (2007) rapportent que l'acide gallique inhibe la croissance d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* à des concentrations de 25mg/ml et 10mg/ml respectivement.

L'effet antibactérien plus prononcé révélé pour l'acide tannique à différentes concentrations testées ($P < 0.05$) s'accorde avec les résultats obtenus par Ait Bessai (2005) sur *Pectobacterium chrysanthemi*. Ce dernier note une réduction de la croissance de cette souche bactérienne allant de 28 à 47% en présence respectivement de 0.4 et 3.2 mg/ml d'acide gallique contre 91% pour 0.2 mg/ml d'acide tannique.

Cette variabilité de sensibilité s'explique par la différence de taille et du nombre de groupement hydroxyles entre les deux acides ; les acides tanniques ($C_{76} H_{52} O_{46}$) sont un mélange complexe contenant en proportion importante divers ester de l'acide gallique et du glucose (Hodek *et al.*, 2002).

Cette variabilité de sensibilité aux acides tannique et gallique est également observée en présence des six extraits testés, l'effet inhibiteur des extraits de *P. lentiscus* L. s'est avérée plus élevée que ceux d'*O. europaea* L.. Le même phénomène est observé par Bassim *et al.* (2006) en présence des extraits méthanoliques de pollen et de propolis.

En accord avec ces mêmes auteurs, l'importante activité antibactérienne montrée par les extraits de *P. lentiscus* L. serait en relation avec leur forte teneur en composés phénoliques (polyphénols totaux solubles, flavonoïdes et tannins) comparés aux autres extraits de feuilles d'*O. europaea* L. et du grignon d'olive. Rodriguez-Vaquero *et al.* (2007) ont montré que, l'effet antibactérien de 3 types de vins est proportionnel à leur teneur en composés phénoliques.

Nous avons noté toute fois que l'extrait le plus riche en composés phénoliques (l'extrait méthanolique de *P. lentiscus* L.) a montré la même activité antibactérienne que l'extrait acétonique du grignon d'olive (pauvre en ces composés) ; les composés de ce dernier diffuseraient mieux à partir du disque que celui de l'extrait méthanolique de *P. lentiscus* L.. Ce facteur diffusion influence le diamètre de la zone d'inhibition et par conséquent l'estimation de l'effet antibactérien (Proestos *et al.*, 2006).

Les CMI, exprimées en mg d'ES, montrent un pouvoir inhibiteur plus marqué pour les extraits acétonique et méthanolique de *P. lentiscus* L. suivi des extraits acétoniques d'*O. europaea* L. devant leurs équivalents méthanoliques. Ce classement est totalement modifié lorsque la CMI est exprimée en rapport avec la quantité de polyphénols totaux, tannins et flavonoïdes apporté.

Comme le rapportent plusieurs auteurs (Romani *et al.*, 2002 ; Sampedro *et al.*, 2004 ; Silva *et al.*, 2006), plusieurs composés ont été identifiés dans les produits d'*O. europaea* L. et dans les feuilles de *P. lentiscus* L. tels que l'hydroxytyrosol, tyrosol, catéchine, acides caféique et vanillique, rutine, verbascoside, oleuropeine, luteoline, etc. (feuilles d'*O. europaea* L. et grignon), acides gallique et quinique, myricétine glycosides, quercétine glycosides, delphinidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O-glucoside, catéchine, etc. (feuilles de *P. lentiscus* L.).

Certains de ces composés (acides coumarique, vanillique, protocatéchique, caféique syringique, férulique, acide *p*-hydroxybenzoïque) sont connus pour leur effet antimicrobien sur *Pcc*. Cette dernière est également inhibée par les acides gentistique et veratique (Elorrieta *et al.*, 2003).

La majorité des composés identifiés dans les produits d'*O. europaea* L. et les feuilles de *P. lentiscus* L. sont connus pour leur potentiel antimicrobien, comme l'ont montré les travaux de Aziz *et al.* (1998) pour les différents composés isolés du grignon, Hayder *et al.* (2005) et Rodriguez-Vaquero *et al.* (2007) pour les différents composés isolés des feuilles de *P. lentiscus* L. et Bisignano *et al.* (1999) et Micol *et al.* (2005) pour les composés isolés des feuilles d'*O. europaea* L..

Nous n'avons pas procédé à une identification et quantification des différents composés phénoliques présents dans ces extraits. Il est admis que le profil (qualitatif et quantitatif) en composés phénoliques de chaque extrait peut varier en fonction du solvant utilisé (Unal, 1994). Ainsi que, l'effet antibactérien observé serait la résultante d'une action synergique de l'ensemble des composés phénoliques présents, comme le souligne Puupponen- Pimia *et al.* (2001).

Nous avons observé sur tubercules une diminution significative de la quantité de tissus pourris en présence des différents extraits. Une telle réduction des symptômes est rapportée par Baysal et Zeller (2004), pour le symptôme de la rouille causée par *E. amylovora* sur le pommier, le tabac, les tomates, etc., en présence des extraits d'*Hedira helix*. Ces chercheurs notent qu'un traitement du matériel végétal (par les extraits) 48 heures avant inoculation était suffisant pour une détection de la résistance éventuelle à *E. amylovora* par le végétal six jours après l'inoculation.

La virulence de *Pcc* dépend de la production et la sécrétion d'une large gamme d'enzymes extracellulaires (pectinases, protéases et cellulases) responsables de la dégradation des constituants de la paroi végétale et de la macération des tissus.

La quantité des tissus pourris récoltée des tubercules de pomme de terre au sixième jour d'incubation, inversement proportionnelle à la concentration d'extraits ($P < 0.001$) varie d'un extrait à un autre. Les symptômes observés en présence de *P. lentiscus* L. sont moins marqués qu'en présence d'*O. europaea* L..

Nos données sur tubercules corroborent les résultats observés *in vitro*. La synergie d'action des composés phénoliques serait plus forte dans les extraits de *P. lentiscus* L..

Nous avons mis en évidence la présence de composés phénoliques dans nos extraits. Ces derniers sont connus comme moyen de défense des plantes contre les agressions externes (Scehovic, 1990 ; Remesy *et al.*, 1996) et pour leurs activités antimicrobiennes (Panizzi *et al.*, 2002 ; Sahin *et al.*, 2003 ; Ghedira, 2005).

La baisse du taux de tissus pourris sur les tubercules due à l'action des extraits utilisés s'expliquerait par l'effet de ces derniers sur la croissance de *Pcc*. Trois mécanismes biochimiques d'action seraient mis en jeu par les composés phénoliques pour freiner le développement de la pourriture molle : action directe sur les membranes cellulaires de la bactérie, action indirecte par le blocage des activités enzymatiques bactériennes et interaction avec les tubercules de pomme de terre à l'origine d'une induction des réactions de défense de cette dernière.

Les composés phénoliques peuvent agir directement sur la bactérie en affectant la membrane cellulaire. Leinmüller *et al.* (1991) ont noté qu'à des concentrations supérieures ou égales à 5mM d'acides phénoliques (ferruliques et *p*-coumarique, etc.), certaines lésions et une libération du contenu cellulaire sont observés chez *Ruminococcus albus* et *Veillonella alcalescens*

Les composés phénoliques peuvent inhiber *Pcc* indirectement par leur action sur les enzymes pectinolytiques qui jouent un rôle important dans la pathogenécité des *Pectobacterium*. En plus de ces enzymes pectinolytiques, les composés phénoliques peuvent avoir également un effet sur les protéases produites par *Pcc* lors de l'infection du tubercule. Ces protéases sont connues pour être impliquées dans la suppression des mécanismes de résistance de l'hôte en dégradant les protéines de défense de ce dernier, induisant ainsi indirectement la macération et la perte de cohésion des tissus (Kyöstiö *et al.*, 1991 ; Marits *et al.*, 1999).

En effet, des travaux réalisés précédemment par Ait Bessai (2005) sur *P. chrysanthemi*, ont montré clairement l'effet des composés phénoliques de synthèse (acide tannique et gallique) non seulement sur la croissance de *Pectobacterium* mais également sur son activité enzymatique. En effet, l'inhibition de l'activité protéasique peut atteindre les 80% pour des concentrations en acide gallique de 400µg/ml, et 86% pour la même concentration d'acide tannique. L'inhibition de l'activité pectate lyase peut atteindre les

80% pour des concentrations d'acide gallique de 800µg/ml et elle est estimée à 87% pour des concentrations d'acide tannique de 200µg/ml.

Lojkowska et Holubovsca (1992), ont montré que l'inactivation des enzymes membranaires par les composés phénoliques entraînerait une modification de la perméabilité cellulaire, suivie d'une lyse de la cellule bactérienne.

Le mécanisme d'inhibition de l'activité enzymatique bactérienne par les composés phénoliques est lié probablement à une diminution de la disponibilité des substrats par complexation des polysaccharides (cellulose, pectines, etc...) et des protéines (Hagerman, 1989), par chélation des cofacteurs métalliques qui peut être en partie responsable de l'activité inhibitrice des enzymes et par conséquence de l'inhibition de l'activité microbienne (Liu *et al.*, 2003). L'inhibition de la croissance des bactéries intestinales (*Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*) par l'acide tannique est expliquée par la capacité élevée de ce dernier à fixer le fer (Chung *et al.*, 1998). Le fer étant essentiel pour tous les micro-organismes dont l'acquisition se fait par la synthèse de sidérophores qui permettent de le véhiculer à l'intérieur de la cellule bactérienne (Expert, 1999). Selon Akiyama *et al.* (2001), l'acide tannique rentre en compétition avec les sidérophores, chélate le fer et entraîne une diminution de sa disponibilité dans l'environnement immédiat des micro-organismes.

Dans le cas des *Pcc*, la baisse de leurs activités enzymatiques au contact des composés phénoliques serait liée à leur fixation aux sites actifs des enzymes qui deviennent inactives ou à la précipitation des protéines enzymatiques ou tout simplement à l'encombrement stérique autour des molécules d'enzymes, les empêchant ainsi d'accéder aux substrats. Selon Hatano *et al.* (1990) et Leinmuller *et al.* (1991), les tannins possèdent une infinité de liaison importante pour les protéines notamment les α -amylases, cellulases, β -glucosidases et les protéases, et engendrent généralement la formation d'un complexe protéines-polyphénols qui précipite et devient non fonctionnel.

Selon Baysal et Zeller (2004), le temps de contact des extraits avec le tubercule (48 heures), avant l'inoculation était suffisant pour permettre aux récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique de l'hôte de reconnaître les éliciteurs produits par les extraits. Ce phénomène entraîne une activation des gènes de défense de la pomme de

terre. Selon Plutot *et al.* (1999), en plus des éliciteurs oligosaccharidiques, il existe plusieurs autres éliciteurs de nature chimique variable (glycoprotéines, protéines, lipides, etc.).

Les extraits phénoliques appliqués sur tubercules pourraient induire le renforcement de la paroi végétale par des dépôts de lignines, de polysaccharides et par l'accumulation des glycoprotéines riches en hydroxy-prolines qui forment un réseau serré, empêchant ainsi la pénétration du pathogène (Benhamou, 1996). Ils induisent également la synthèse d'une multitude de molécules antimicrobiennes telles que, les protéines PR, les peptides antimicrobiens, les phytoalexines, etc. Selon Hildenbrand et Ninneman (1994), les phytoalexines (rishitine, solavétine, phytubérine, hydroxysolavativone, hydroxyphytobérol, solanascone et lubinine) sont détectées dans des extraits de tissus pourris de pomme de terre.

L'activation des gènes spécifiques de défense de la pomme de terre entraîne la libération de polyphénoloxydase et de la peroxydase, qui peuvent manifester une activité accrue en présence des extraits phénoliques de feuilles de *P. lentiscus* L. et des produits d'*O. europaea* L., et interviennent dans l'oxydation de ces composés phénoliques en quinones, très toxiques pour les *Pectobacterium* (Lojkowska et Holubovsca, 1992). Les composés phénoliques oxydés inhiberaient les activités enzymatiques de la bactérie notamment celles qui interviennent dans la dégradation des parois cellulaires de l'hôte telles que, la polygalacturonase (PG) qui joue un rôle important dans la pathogénicité de *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*. Cette inhibition augmente avec la concentration du milieu en composés phénoliques (Basham *et al.*, 1987). Ce qui explique l'effet inhibiteur élevé démontré par les extraits de *P. lentiscus* L. en comparaison avec les extraits de produits d'*O. europaea* L.. Selon Baysal et Zeller (2004), les composés phénoliques sont des éliciteurs des réactions de défense des plantes, ils induisent une stimulation de la polyphénoloxydase et des protéases (chitinases) qui jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux pathogènes.

Conclusion

Les différents résultats enregistrés dans cette étude ont montré une sensibilité variable de l'agent phytopathogène *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* aux extraits testés.

Le matériel végétal utilisé pour l'extraction se caractérise par une richesse en composés phénoliques (polyphénols totaux solubles, tannins et flavonoïdes) dans des proportions variables. Les feuilles de *Pistacia lentiscus* L. se distinguent par une teneur plus élevée. Dans nos conditions expérimentales, l'acétone aqueux (70%) s'avère globalement meilleur extracteur des composés phénoliques que le méthanol aqueux (80%).

Les résultats de l'étude *in vitro* révèlent une sensibilité de *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* aux composés phénoliques de synthèse (acides tannique et gallique) ; l'effet antibactérien est plus prononcé pour l'acide tannique. Cette variabilité de sensibilité observée avec les acides tannique et gallique est également révélée en présence des six extraits testés.

L'effet inhibiteur des extraits de *P. lentiscus* L. s'est avéré plus élevé que ceux d'*O. europaea* L.. Les données des CMI montrent un pouvoir inhibiteur plus marqué pour les extraits acétonique et méthanolique de *P. lentiscus* L. suivi des extraits acétoniques d'*O. europaea* L. devant leurs équivalents méthanoliques.

Ces résultats sont confirmés par l'étude sur tubercules avec observation d'une baisse de pathogénicité en présence des extraits, une inhibition totale est observée avec 204.8 et 819.2 mg/ml d'extraits de *Pistacia lentiscus* L. et d'extraits acétoniques d'*Olea europaea* L. respectivement.

Il serait intéressant de pousser et d'approfondir ce travail pour mieux comprendre les facteurs et les mécanismes mis en jeu.

Une caractérisation qualitative approfondie de ces extraits mérite une attention particulière par une étude de la structure chimique des polyphénols des différentes fractions obtenues. Ainsi que l'étude des modifications biochimiques induites sur tubercules pour mettre en évidence les réactions de défense.

Références bibliographiques

Ait Bessai A. 2005. Recherche de molécules biologiques ayant un effet sur la croissance et l'activité enzymatique des *Erwinia* pectinolytiques, agents pathogènes de la pomme de terre. Mémoire de Magistère, Université de Béjaia.

Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Ooni T. et Iwatsuki K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 487-491.

Al-hebshi N., Al-haroni M. et Skaug N. 2006. *In vitro* antimicrobial and resistance modifying activities of aqueous crude extracts against oral micro-organisms. *Archives of Oral Biology*, 51: 183-188.

Alzoreky N.S. et Nakahara K. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 223-230.

Amiot M.J., Fleuriet A. et Macherix J.J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 34 (5): 822-826.

Andersen M.D., Chen Z. et Klessig D.F. 1998. Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochemistry*, 47: 555-566.

Avallone R., Plessi M., Baraldi M. et Monzani A. 1997. Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10 : 166–172.

Aziz N., Farag S.E., Mousa L.A. et Abo-Zaid M.A. 1998. Effets antibactériens et antifongiques comparatifs de certains composants phénoliques. *Microbios*, 93 (374) : 43-54.

Baba-Aissa F. 1991. Les plantes médicinales en Algérie. Co Ed. Bouchène et Ad. Diwan : 101, 117.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. et Pinkas M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from

hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch Drug Research*, 46: 1086–1108.

Balasundrum N., Sundrum K. et Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99 (1): 191-203.

Barras F., Van Gijsegem F. et Chatterjee A. K. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 201-234.

Basham Y., Okon Y. et Henis Y. 1987. Peroxidase, polyphenols oxydases and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato plants. *Canadian Journal of Botanic*, 65: 366-372.

Basim E., Basim H. et Ozcan M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Food Chemistry*, 77 (4): 992-996.

Benhamou N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sciences*, 1: 233-240.

Baysal O. et Zeller W. 2004. Extract of *Hedera* induces resistance on apple roots to M 26 similar to acibenzolar-s-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Physiological and molecular Plant Pathology*, 65: 305-315.

Bennick A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13 (2): 184-196.

Berrocal-Lobo M., Segura A., Moreno M., Lope-Olmedo G. et Molina A. 2002. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato locally induced by wounding and responds to pathogen. *Plant Physiology*, 128(3): 951-961.

Bianco A., Chiacchio M. A., Grassi G., Iannazzo D., Piperno A. et Romeo R. 2006. Phenolics compounds of *Olea europea*: isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, 95:562-565.

- Bisignano G., Tomaino A., Lo-Cascio R., Crisafi G., Uccella N. et Saija A. 1999. Activité antimicrobienne *in vitro* de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8):971-974.
- Bohlmann H. et Apel K. 1991. Thionins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 227-240.
- Brader G., Sjoblom S., Hytiainen H., Sims-Huopaniemi K. et Palva E. 2005. Alternating substrate chain length specificity of an acylhomosérine lactone synthase in bacterial communication. *Journal of Biochemistry*, 280: 10403-10409.
- Broekaert W.F., Cammune B.P.A. De Bolle M.F.C., Thevissen K., de Samblanx G.W. et Osborn R.W. 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16: 297-323.
- Byers J.T., Luca C., Salmond G.P.C. et Welch M. 2002. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum sensing signalling molecule. *Journal of Bacteriology*, 184: 1163–1171.
- Cardoso S.M., Guyot S., Marnet N., Lopes-Da-Silva J.A., Mgc Renard C. et Coimbra M.A. 2004. Characterisations of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of Science and Food Agriculture*, 84: 1-12.
- Chavan U.D., Shahidia F. et Naczkb M. 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry, Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section*, 75: 509–512.
- Chung K.T., Stevens S.E., Jr-Lin WF. et Wei C.I. 1993. Growth inhibition of selected food borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 17: 29-32.
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W. et Lin W. 1998. Tannins and human health : a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 38: 421-464.
- Cuq J.L. et Jaussan V. 1991. Oxydation de l'acide cafeique et activité antimicrobienne. *Sciences des Aliments*, 11 : 25-35.

- Dave Oomah, B. 2003. Les plantes curatives, isolation, caractérisation et l'évaluation des métabolites secondaires dérivés des plantes pour utilisation dans le domaine de la santé humaine. *Bulletin IBP*, 1: 1-4.
- De Boer S. H. 1994. Prospects for control of potato diseases caused by pectolytic *Erwinias*. In: "Advances in potato pest management". Ed. APS Press. Zehnder G.W., Powelson M.L. et Jansson K.V. Pp: 136-148.
- Decandia M., Sitzia M., Cabiddu A., Kababya D. et Molle G. 2000. The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in goats fed woody species. *Small Ruminant Research*, 38: 157-164.
- Delgado-Pertiñez M., Gómez A. et Garrido A. 2000. Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and *in vitro* studies. *Animal Feed Science and Technology*, 87: 187-201.
- Despande S., Cheryan M. et Salunkhe D.K. 1986. Tannins analysis of food products. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 24: 401-449.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97 (4): 654-660.
- Doymaz I., Gorel O. et Akgun N.A. 2004. Drying characteristics of the solid by product of olive oil extraction. *Biosystems Engineering*, 88 (2): 213-219.
- Elorrieta M.A., Suárez-Estrella F., López M.J., Vargas-García M.C. et Moreno J. 2003. Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 96: 141-146.
- Escribano-Bailón M.T. et Santos-Buegla C. 2000. Polyphenol extraction from foods. In : "Method in polyphenol analysis". Ed. Royal Society of Chemistry. Pp: 1-16.
- Expert D. 1999. With holding and exchanging iron: interactions between *Erwinia* spp and their plant hosts. *Annual Review of Phytopathology*, 37: 307-334.

- FAO, 2005. FAO. FAOSTAT. Agriculture. Rome. ([http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/)). (Consulté en 2007).
- Frenay J., Flerette J. et Reverdy M.E. 1995. Antisepsie et désinfection. Ed Eska. Pp: 635.
- Fritig B., Heitz T. et Legrand M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defence. *Current Opinion in Immunology*, 10: 16-22.
- Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Pharmacognosie*, 4 : 162-169.
- Greenberg J.T. 1997. Programmed cell death in plant –pathogen interactions. *Annual Review of Plant Pathology Plant Molecular Biology*, 48: 525-545.
- Grison C. 1983. La pomme de terre caractéristiques et qualités alimentaires. Ed. Apria. Pp: 5-110.
- Hagerman A.E. 1989. Chemistry of tannin-protein complexation. In: “Chemistry and Significance of Condensed tannins”. Ed Plenum Press. Hemingway R.W., Carshesy G.G. et Bradhams J. Pp: 323-333.
- Hagerman A.E. et Butler L.G. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 26 (4): 809-812.
- Hagerman A.E. et Butler L.G. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 9 (256): 4494-4497.
- Hatano T., Yoshida T., Yoshida T., Agata ., Noro T. et Okuda T. 1990. Effect of interaction of tanins with co-existing substances: inhibitory effect of tannins and related polyphenols on xanthine oxydase. *Chemical and Parmaceutical Bulletin*, 5: 1224-1229.
- Hayder N., Ben Ammar R., Abdelwahed A., Kilani S., Mahmoud A., Ben Chibani J., Mariotte A.M., Ghedira K., Dijoux-Franca M.G. et Chekir-Ghedira L. 2005. Antibacterial and antimutagenic activitiy of extracts and essential oil from (Tunisian) *Pistacia lentiscus* *Toxicological & Environmental Chemistry*, 87: 567 – 573
- Hildenbrand S. et Ninnemann H. 1994. Kinetics of phytoalexin accumulation in potato tubers of different genotypes infected with *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*

Physiological and Molecular Plant Pathology, 44 (5): 335-347.

Hodek P., Pavel T. et Marie S. 2002. Flavonoids potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P 450. *Chemico-Biological Interactions*, 139: 1-21.

Hossain M. D. M., Shibata S., Aizawa S.I. et Tsuyumu S. 2006. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66: 134-143.

Hugouvieu-Cotte-Pattat N., Domenguez H. et Robert-Baudouy J. 1992. Environmental conditions affect the transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology*, 174: 7807-7818.

Hurrell R.F., Finot P.A. et Cuq J.L. 1982. Protein polyphenol reactions. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *British Journal of Nutrition*, 47: 191-211.

Ibrahim M., Jouan B., Samson R., Poutier F. et Saily M. 1978. Prospect of a pathogenicity test concerning *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on half tubers. In: Proceeding. 4th *International Plant Conference plant pathogenic Bacteria*. Angers, 591-602.

Katz V.A., Thulke O.U. et Contrath U. 1998. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiology*, 117: 1333-1339.

Klessig D.F., Durner J., Noard R., Navarre D.A., Wendhenne D., Kumar D., Zhou I.M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E. et Silva H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defence. *Proceeding National Science*, 97: 8849-8855.

Kordali S., Cakir A., Zengin H. et Duru M.E. 2003. Antifungal activities of the leaves of tree *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia, Short report*, 74: 164-167.

Kumar R. et Vaithyanathan S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30: 21-38.

- Kyöstiö S.R.M., Cramer C.L. et Lacy G.H. 1991. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* extracellular protease: characterization and nucleotide sequence of the gene. *Bacteriology*, 173: 6537–6546.
- Leinmüller E., Steingass H. et Henke K.H. 1991. Tannins in ruminant feedstuffs. Ed. Metzinger. *Animal Research and Developpement*, 33: 9-56.
- Levizou E., Petropoulou Y. et Manetas Y. 2004. Total carotenoid amount in crude twig extracts may be overestimated due to interference by high contents of Co-extracted phenolics. *Photosynthetica*, 42 (2): 295-297.
- Liu IC., Hsu F.L., Tsai T.C., Chan P., Liu J.Y.H., Thomas G.N., Tomlinson B., Lo M.Y. et Lin J.Y. 2003. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Journal of Bacteriology*, 73: 1543-1555.
- Liu Y., Cui Y., Mukherjee A. et Chatterjee A.K. 1997. Activation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase structural gene *pnlA*: a role for RdgB. *Microbiology*, 143: 705–712.
- Lojkowska E. et Holubovska M. 1992. The role of polyphenol oxidase and peroxydase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Journal of Phytopathology*, 136: 319-328.
- Lulai E.C. et Corsini D.L. 1998. Differential desposition of Suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum*) wounds healing. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53: 209-22.
- Luthria D.L. et Mukhopadhyay S. 2006. Influence of Sample Preparation on Assay of Phenolic Acids from Eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 41-47
- Makkar H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49: 241-256.

Makkar H.P.S., Singh B. et Dawra R.K. 1988. Effect of tannins rich leaves of Oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovin rumen. *British Journal of Nutrition*, 60: 287-296.

Marits R., Koiv V., Laasik E. et Mäe A. 1999. Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*, 145: 1959–1966.

Markin D., Duek L. et Berdicevsky I. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern *in vitro*. *Mycoses*, 46: 132–136.

Martin-Garcia A.I., Moumen A., Yanez-Ruiz D.R. et Molina-Alcaide E. 2003. Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107: 61-74.

Matsui T., Lbuchi S., Kobaysashi M., Fukui K., Sugita K., Terahara N. et Matsumoto K. 2002. Anti-hyper-glycemic effect of diacylated anthocyanin from *Ipomea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved by through the α -glucosidase inhibitory action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1941-1950.

Mastumoto H., Jitareerat P., Baba Y. et Tsuyumu S. 2003. Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 3: 37-226.

Mc Donald S., Prenzler P.D., Antolovich M. et Robards K. 2001. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73: 73-82.

Mc Dougall G., Shpto F., Dobson P., Smith P., Blake A. et Stewart D. 2005. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α - amylase and α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2760-2766.

Meyer A., Deiana J. et Leclere H. 1999. Cours de microbiologie nouveau programme. Ed. Doin. Pp: 365.

Michiko E., Bonnie L. et Bassler T. 2003. Chemical communication among bacteria. *Journal of Bacteriology*, 100: 14549-14554.

- Micol V., Caturla N., Pérez-Fons L., Màs V., Pérez L. et Estepa A. 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research*, 66: 129-136.
- Ministère de la Santé, de la Population et de la Reforme Hospitalière (MSPRH). 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine. Ed 4. Pp : 7-8.
- Mompon B., Lemaire B., Mengal P. et Surbled M. 1996. Extraction des polyphenols du laboratoire à la production industrielle. Id. INRA. In : « Polyphenols 96 ». Vercauteren J. Pp: 31-43.
- Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-20.
- Naczki M. et Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography*, 1054: 95-111.
- Nefzaoui A., Molina E., Outmani A. et Vanbelle M. 1985. *Archivos de Zootecnia*, 127 (33): 219-230.
- Newman M.A. et Roenpenack E.V. 2000. The induction of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Pathology*, 1: 25-31.
- Özçelik B.,Asian M., Orhan I. et Karaoglu T. 2005. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiology Research*, 160:159-164.
- Panizzi L., Caponi C., Catalano P.L. et Morelli I. 2002. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Robus ulmifollius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 165-168.
- Parekh J., Jadeja D. et Chanda S. 2005. Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants. *Turk Journal Biology*, 29: 203-210.
- Pérombelon M.C.M. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51: 1-12.

- Pinelo M., Rubilar M, Jerez M, Sineiro J. et Nunez M. J. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2111-2117.
- Plutôt V., Robaglia C. et Pernollet, J.C. 1999. La résistance des agents aux plantes pathogènes. *Phytoma-La défense des végétaux*. 521: 10-14.
- Ponstein A.S., Bres-Vloemans S.A., Sela-Burlage M.B., Vanden-Elzen P.J.M., Melchers L.S. et Cornelissen B.J.C. 1994. A novel pathogen and wound inductible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiology*, 104: 109-118.
- Priou S. 1992. Variabilité phytotypique et génétique et caractérisation des sous espèces d'*Erwinia carotovora* en relation avec leur pouvoir pathogène sur pomme de terre. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, France.
- Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G-J.E. et Komaitis M. 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95: 664-671.
- Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A. et Oksman-Caldentey K.-M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries *Journal of Applied Microbiology*, 90: 494-507.
- Ranalli A., Contento S., Lucera L., DI Febo M., Archegiant D. et DR Fonzo V. 2006. Factor affecting the content of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 438-448.
- Reed J.D. 1995. Nutritional toxixology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal and Sciences*, 73: 1516-1528.
- Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O. et Regeat F. 1996. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Médecine et Nutrition*, 1 (32) : 17-27.
- Rice Evans C.A., Miller N.J. et Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science Reviews*, 2(4) : 152-159.

- Richter G. 1993. Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie. Ed. Louis. Pp: 317-339.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. et Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436
- Robereau-Gayon P. 1968. Notion générale sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. Pp : 1-27.
- Rodriguez-Vaquero M.J., Alberto M.R. et Manca de Nadra M.C. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18: 93-101.
- Rogers E.E., Glazebrook J. et Ausubel F.M. 1996. Mode of action of the *Arabibopsis thaliana* camalexin and its role in *Arabibopsis*-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9: 748-757.
- Romani A., Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N. et Tattini M. 2002. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 2 (13):79-86.
- Rossignol L., et Rousselle-Bourgeois F. 1996. Botanique, morphologie et taxonomie. In : «La pomme de terre ». Ed. INRA. Rousselle P., Robert Y., et Crosnier J.C. Pp : 62-232.
- Rousselle P., Robert Y., et Crosnier J.C. 1996. La pomme de terre production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. In : «La pomme de terre ». Ed. INRA. Rousselle P., Robert Y., et Crosnier J.C. Pp : 164.
- Rowe R.C., Miller S.A. et Riedel R.M. 1995. Blackleg, Aerial Stem Rot, and Tuber Soft Rot of Potato. *Plant Pathology*, 6 : 360.
- Ruimy R. et Andremont A. 2004. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation*, 13: 176–184.
- Sahin F., Karaman I., Güllüce M., Öçgütçü H., Sengül M., Adygüzel A., Öztürk S. et Kotan R. 2003. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L.. *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 61–65.

Salmond G.P.C. 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 181-200.

Sampedro I., Romero C., Ocampo J.A., Brenes M. et Garcia I. 2004. Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4487-4492.

Scehovic J. 1990. Tannins et autres polymères phénoliques dans les plantes de prairies : détermination de leur teneur et de leur activité biologique. *Revue Suisse de l'Agriculture*, 22 (3) : 179-184.

Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A. et Olmedo F.G. 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against pathogens. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 12 (1):16-23.

Sharga B. M., et Lyon G. D. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 44 : 777-783.

Silanikove N., Gilboa N., Nir I., Perevolotsky. et Nitsan Z. 1996. Effect of daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus*, and *Ceratonia siliqua*) by goats. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 44: 199-205.

Silva S., Gomes L., Leitão F., Coelho A.V. et Vilas Boas L. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International*, 5(12): 385-395.

Singleton V.L., Orthofer R. et Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 29: 152-178.

Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner –Hras A., Simonic M. et Knez Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89: 191-198.

Smadja B., Latour X., Trigui S., Burini J.F., Chevalier S. et Orange N 2004. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two

Erwinia carotovora subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 19–27.

Sokmen A., Gullure M., Akpulat H.A., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. et Sahin F. 2004. The in vitro antimicrobial and antioxydant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15: 627-634.

Spichiger R., Savolainen V.V., Figeat M. et Jeanmonod D. 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs (une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales). Presses polytechniques et universitaires Romandes. Pp : 280-363.

Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 96: 141–146.

Thevissen K., Ghazi A., De Samblanx G.W., Brownlee C., Osborn R.W. et Broekaert W.F. 1996. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 15018-15025.

Thomas J.D., Reeves P.J. et Salmond G.P.C. 1997. The general secretion pathway of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: analysis of the membrane topology of OutC and OutF. *Microbiology*, 143 : 713–720.

Toth I.K., Bell K.S., Holeva M.C. et Birch P.R.J. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4 (1): 17–30.

Turkmen N., Sari F. et Velioglu Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxydant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 99 (4): 835-841.

Unal M.K. 1994. Polyphenol, O-diphénols et acides phénoliques totaux dans les grignons d'olive et les margines. *Oliveae*, 51.

Val F., Barziem R., Desender S., Hamelin G. et Andrivon D. 2006. Stockage des pommes de terre: Un lipopolysaccharide bactérien... anti-bactérien ? (Bacterial diseases of potatoes: What about bacterial lipopolysaccharide for biological control?). *Phytoma, la défense des végétaux*, 596: 33-36

Van der Watt E. et Pretorius J.C. 2001. Purification and identification of active antibacterial compounds in *Carpobrotus edulis* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 76 (1): 87–91.

Van Loon L.C. et Van Striein E.A. 1999. The families of pathogenesis related proteins their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 85-97.

Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W. et Chen F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97 (4): 705-711.

Wong Y.Y.P. et Kitts D.D. 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97: 505-515.

Yaganza E.S. 2005. Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre: base physico-chimique. Université Laval. Thèse de Doctorat.

Yahiaoui –Zaidi R., Jouan B., et Andrivon D. 2000. Biochemical and molecular variability among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*, 52: 28-40.

Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T. et Newmark H.L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21: 381-406.

Zaidi F., Khima O., Hassissene N., Iguer-Ouada M, Grongnet J.F., Bellal M.M. et Youyou A. 2007. Les grignons d'olives : composition physico- chimique et digestibilité à la cellulase des fractions granulométriques. (Soumis à publication).

Zimmer N. 1995. Influence des tannins et de leurs interactions avec les protéines sur la valeur nutritive des aliments chez les ruminants. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

Annexe I : Données générales sur le matériel végétal utilisé

1. *Pistacia lentiscus* L.

Pistacia lentiscus L. une dicotylédone de l'ordre des Sapindales, est l'une des 11 espèces de la famille d'Anacardiaceae de genre *Pistacia* (Spichiger *et al.*, 2004 ; Ozçelik *et al.*, 2005). Il s'agit du lentisque pistachier, arbrisseau résineux de 1 à 3 m de haut avec des tiges ramifiées et des feuilles persistantes à forte odeur de résine, composées (4 ou 5 paires de folioles) et courtement pétiolées ; des fleurs rougeâtres en grappe denses très discrètes naissent en grand nombre à la base des feuilles de Mars en Juin. Les fruits sont très petits et globuleux, de couleur rouge virant au noir à maturité (Baba-Aissa, 1991 ; Munné-Bosch et Penuelas., 2003).

2. *Olea europaea* L.

Olea europaea L. est une dicotylédone de l'ordre des Lamiales, appartenant à la famille des Oléacées et au genre *Olea* (Spichiger *et al.*, 2004). Il s'agit de l'olivier, arbre pouvant atteindre 10 m de hauteur et doué d'une très longue longévité. C'est un arbre à rameaux cylindroïdes, à troncs noueux, à feuilles allongées et étroites ; ses fleurs sont minuscules et ses fruits sont ovoïdes, de grosseurs variables (suivant la variété) et noirs à pleine maturité. Cet arbre pousse sur le pourtour méditerranéen même dans les terrains rocaillieux et secs (Baba-Aissa, 1991).

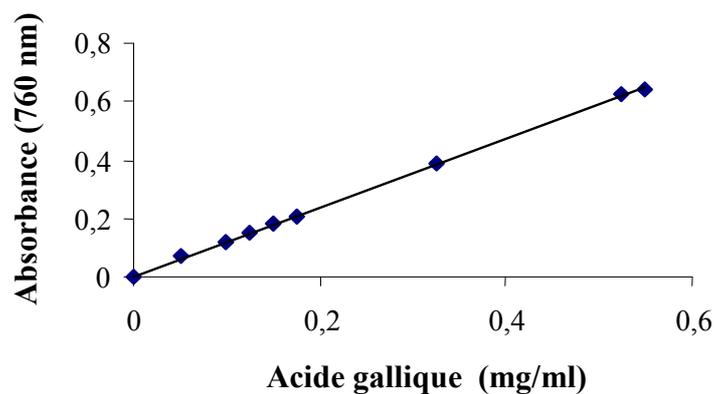
• Grignon d'olive

Le tourteau d'olive appelé communément « grignon » est le résidu industriel solide recueilli après extraction de l'huile. Il comporte la pellicule du fruit (épicarpe), la pulpe (mésocarpe), la coque du noyau (endocarpe) et l'amandon ou graine (Doymaz *et al.*, 2004).

3. *Solanum tuberosum* L. variété « Désirée »

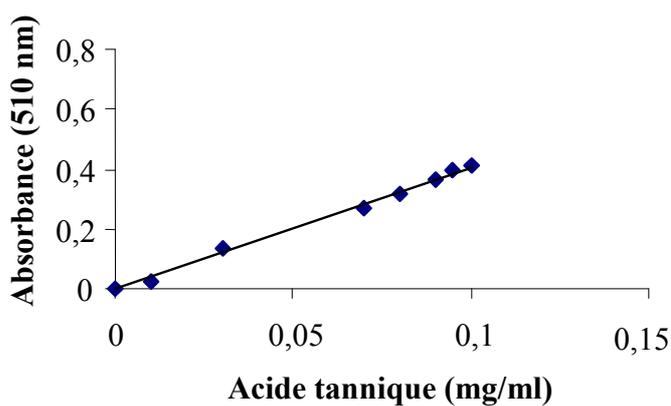
De taille haute et à port dressé, la plante de ce cultivar est à tiges très pigmentées et à ailes assez étroites, le plus souvent rectilignes. Les feuilles, peu divisées sont de couleur verte assez foncée et à pétioles et nervures pigmentés. Les fleurs sont rouges violacées et à pointes blanches. Le tubercule est de forme oblongue, à peau rouge, à chair jaune et à yeux assez superficiels. Le germe est de forme cylindrique, de couleur rouge violacée, légèrement plus coloré à la base (Spichiger *et al.*, 2004).

Annexe II. Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques.



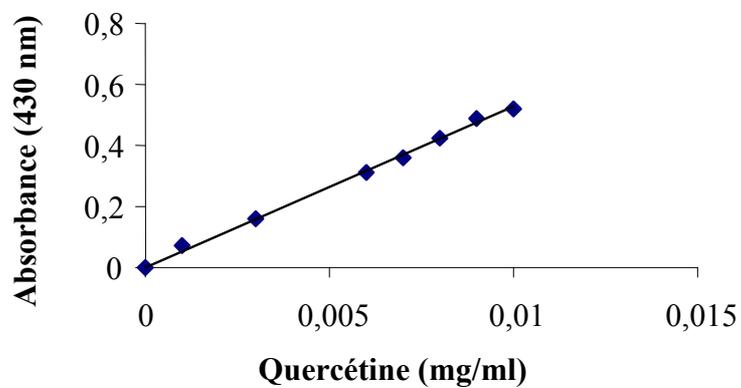
$$y = 1,1798x, R^2 = 0,9994$$

Figure 1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux solubles.



$$y = 4,0533x, R^2 = 0,9951$$

Figure 2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins.



$$y = 52,708x, R^2 = 0,9978$$

Figure 3 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe III : Préparation des solutions et des milieux de cultures

1. Préparation des solutions

Solutions	Réactifs	Conservation
Tampon acétate	0.20 M d'acide acétique 170 mM de NaCl pH ajusté à 4.9	Température ambiante
SDS/TEA	5% (V/V) de triéthanolamine 1% (P/V) SDS pH ajusté à 9.4	Température ambiante
Solution de BSA	1 mg /1mL de BSA dissous dans le tampon acétate	4°C
Chlorure ferrique (FeCl ₃)	0.01 M de FeCl ₃	Température ambiante

2. Préparation des milieux de cultures

Milieu Hugh et Leifson

Composition	Par litre
Bacto tryptone	2 g
Na Cl	5 g
Bleu de Bromothymol	0.3 g
Glucose	0.03 g
Agar	10 g
Eau distillée	3 g
	1000 ml

King B

composition	Par litre
Protéose peptone	20. g
Phosphate de K dibasique (K ₂ HPO ₄)	1.145 g
Sulfate de Mg (Mg SO ₄ , 7H ₂ O)	1.5 g
Agar	15. g
Glycérol	15 ml
Eau distillée	1000 ml

Milieu Levure Peptone (LP)

composition	Par litre
Extrait de levure	3 g
Peptone	5 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu Luria Bertali (LB)

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

Milieu de Sutton

composition	Par litre
NaOH 1N	6 à 10 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O à 10%	6 à 21 m
Bleu de Bromothymol à 0,5%	6 ml
Extrait de levure	5 g
Polypectate de sodium	15 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe IV : Etude statistique

1. Taux d'humidité des échantillons

Facteur	DL_EFFET	DL_ERREU	F
Matériel végétal	2	27	103.1402

2. Dosage des composés phénoliques

2.1. Exprimés en mg /g d'ES

Paramètres	Solvant	Matériel végétal	Solvant x Matériel végétal
	DL_EFFET 1 DL_ERREU12	DL_EFFET 2 DL_ERREU 12	DL_EFFET 2 DL_ERREU 12
	F	F	F
Phénols totaux	100812.1	225328.3	1015.2
Tannins	3086.1	897909.7	14.6
Flavonoïdes	19503	1274943	25784

2.2. Exprimés en mg /g de MS

Paramètres	Solvant	Matériel végétal	Solvant x Matériel végétal
	DL_EFFET 1 DL_ERREU 12	DL_EFFET 2 DL_ERREU 12	DL_EFFET 2 DL_ERREU 12
	F	F	F
Phénols totaux	90002	1062124	9816
Tannins	7203	2387182	2243
Flavonoïdes	27425	4598456	30861

3. Activité antibactérienne

3.1. Activité antibactérienne des acides tannique et gallique

Facteurs	DL_EFFET	DL_ERREU	F
Composé phénolique	3	16	331.6667
Concentration	1	16	529.0000
Composé phénolique x Concentration	3	16	4.8519

3.2. Activité antibactérienne des extraits

Facteurs	DL_EFFET	DL_ERREU	F
Solvant	1	12	45.00000
Matériel végétal	2	12	43.80000
Solvant x Matériel végétal	2	12	7.80000

4. Effet des extraits sur le développement de la pourriture molle

4.1. Effet des extraits de *P. lentiscus* L.

Facteurs	DL_EFFET	DL_ERREU	F
Solvant	1	40	20.014
Concentration	4	40	9842.858
Solvant x Concentration	4	40	1.646

4.2. Effet des extraits acétoniques de feuilles d'*O. europaea* L. et du grignon d'olive

Facteurs	DL_EFFET	DL_ERREU	F
Matériel végétal	1	40	1.224
Concentration	4	40	8546.175
Matériel végétal x Concentration	4	40	1.024

4.3. Effet des extraits méthanoliques de feuilles d'*O. europaea* L. et du grignon d'olive

Facteurs	DL_EFFET	DL_ERREU	F
Matériel végétal	1	40	299.4114
Concentration	4	40	755.8021
Matériel végétal x Concentration	4	40	748878

Annexe V : Teneur en composés phénoliques des différents extraits

	Feuilles de <i>P. lentiscus</i> L.		Feuilles d' <i>O. europaea</i> L. variété « Aimel »		Grignon d'olive Variété « Aimel »		Signification	
	E A	E M	E A	E M	E A	E M	Solvant	Matériel végétal
Polyphénols Totaux solubles (mg EAG/ g d'ES)	375.31 ^a ± 0.67	317.00 ^b ± 0.39	282.34 ^c ± 0.59	199.36 ^d ± 0.37	198.06 ^d ± 0.13	124.43 ^e ± 0.52	***	***
Tannins (mg EAT/ g d'ES)	85.72 ^a ± 0.10	82.14 ^b ± 0.06	4.54 ^d ± 0.17	1.65 ^f ± 0.08	5.21 ^c ± 0.14	2.24 ^e ± 0.12	***	***
Flavonoïdes (mg EQ/g d'ES)	7.13 ^b ± 0.01	8.42 ^a ± 0.004	5.99 ^d ± 0.002	6.92 ^c ± 0.01	1.24 ^e ± 0.01	0.58 ^f ± 0.01	***	***

*** : Significative (P< 0.001).

Sur une même ligne, les valeurs portant des mêmes lettres ne diffèrent pas significativement (P>0.001).

Résumé

L'activité antibactérienne des extraits acétoniques et méthanoliques de feuilles de *Pistacia lentiscus* L. et des produits d'*Olea europaea* L. (feuilles et grignon d'olive) est testée vis-à-vis de *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*, *in vitro* et sur tubercules de *Solanum tuberosum* L.. Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent que l'extraction à l'acétone aqueux donne un meilleur rendement en composés phénoliques que l'extraction au méthanol aqueux, avec un rendement d'extraction relativement élevé pour les feuilles de *P. lentiscus* L. Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits montrent que, tous possèdent une activité antibactérienne à une concentration de 200 mg/ml. Les résultats relatifs à l'étude *in vivo* révèlent que tous les extraits montrent une baisse dans le développement de la pourriture molle estimée en gramme de tissus pourris, avec une inhibition complète en présence de 204.8mg/ml et 819.2 mg/ml d'extraits de *Pistacia lentiscus* L. et des extraits acétoniques d'*Olea europaea* L. respectivement.

Mots clef : *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*, extraits de plantes, pomme de terre, activité antibactérienne.

Summary

Antibacterial activity of acetonic and methanolic extracts of *Pistacia lentiscus* L. leaves and *Olea europaea* L. products (leaves and olive cacke) is tested against *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*, *in vitro* and on *Solanum tuberosum* L. tuber. The obtained results from this investigation showed that extraction with aqueous acetone give a best yield of phenolic compounds than extraction with aqueous methanol with a higher yield of *Pistacia lentiscus* L. leaves. The result of antibacterial activity of extracts showed that all extracts have an antibacterial activity in a concentration of 200 mg/ml. The obtained results from the *in vivo* study reveal that all extracts show a decrease in soft rot development which is estimated as gramme of rotten tissue, with complete inhibition in presence of 204.8 mg/ml and 819.2 mg/ml of extracts of *Pistacia lentiscus* L. and *Olea europaea* L. acetonic extracts respectively

Key words: *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*, plants extracts, potatoes, antibacterial activity.

المستخلص

النشاط المضاد للبكتيريا بالنسبة للمستخلصات الأسييتونية و الميثانولية لأوراق الذرو ومنتجات الزيتون (الأوراق و عصيدة الزيتون) خارج المادة الحية وعلى مستوى أنصاف حبات *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* جرب ضد بكتريا البطاطا، النتائج المحصلة علما تظهر أن استخلاص المواد الفينولية بالأستون المائي (70%) يعطي مردود أحسن مقارنة بالميثانول المستخلصات أظهرت نشاط تثبيطي ضد هذه المائي (80%)، حيث أن أعلى نسبة مردود محصل عليها من خلال أوراق الذرو قياس قطر التثبط يظهر نشاط أكثر أهمية مع المستخلص الأسييتوني لأوراق الذرو. مقارنة الضد. البكتيريا عند التركيز 200مغ/ملل النتائج المتعلقة بتجريب النشاط التثبيطي على مستوى أنصاف حبات البطاطا تظهر أن كل المستخلصات تقلل من أعراض التعفن المقدر بملغ النسيج المتلف مع اختفاء كامل للأعراض عند استعمال مستخلصات اوراق الذرو عند التركيز 204.8 ملغ/ملل واستعمال المستخلصات الأسييتونية لمنتجات الزيتون عند التركيز 819.2 ملغ/ملل.

المفاتيح :

مستخلصات نباتية، بطاطا، نشاط تثبيطي *P. carotovorum* ssp. *carotovorum*.