

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

DEPARTEMENT MICROBIOLOGIE

Mémoire de fin de cycle

**En vue de l'obtention du Diplôme d'Etude
Supérieur**

Option : Ecologie Microbienne et Environnement

Thème

**Extraction et dosage des phytoalexines à partir de
tubercules de pommes de terre et des carottes
infectés par les espèces de genres *Dickeya* et
*Pectobacterium***

Membre de Jury :

Présenté par :

Président: Mr NABTI.H

M^{elle}: BARKOU Tiziri

Promoteur: Mr LADJOUZI. R

Examineur: Mr BELHADJ.D

M^{lle} OUANAS.S

Promotion 2012/ 2013

Remerciements



Avant tout, j'exprime mes remerciements au Bon Dieu de m'avoir donné le courage et la foi pour mener à bien ce travail et pour sa bienveillance.

*Ma profonde gratitude va à mon promoteur **Mr LADJOUZI. R** pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité, ses conseils et ses recommandations ainsi que pour toute l'aide qu'il m'a fournie.*

Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à ma formation durant mon cycle d'étude sans oublier:

*Mr **BELHADI**. Mon enseignant, je le remercie d'avoir accepté d'examiner et de juger mon travail, et également pour ses conseils durant les années d'études*

*Mr **NABTI**. Qui se trouve aussi mon enseignant, je le remercie pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury, et son aide.*

*Et je remercie très sincèrement **Mlle OUANAS** pour sa présence parmi les jurés.*

*Profert essentiellement **Melle Hachemi** pour son aide, et m'avoir gentiment accueillie*

L'ensemble du personnel de laboratoire de Mycologie, essentiellement

Djahida et fatima

Melle BARKOU Tiziri



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis fier de les avoir et tout les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte : mes très chers parents.

Mes très chères sœurs : Fouria, Sabrina, Tassadite, Tinhinane

Mes frères : Yamine, Slim, Salah, Takfarinas

Mes chers amis sans exception et à mon Promoteur

Et enfin, à mon cher ami, et mon âme sœur Mouad



Liste des figures

Figure 1: Aspect morphologique de la plante de la pomme de terre -----	04
Figure 2: Schéma descriptif de l'interaction entre <i>Erwinia chrysanthemi</i> et la plante-----	08
Figure 3 : voies de synthèse des Phytoalexines -----	13
Figure 4: tubercules de pommes de terre et carotte utilisés-----	15
Figure 5 : demi-tubercules et carottes avant l'inoculation -----	19
Figure 6 : tissus jaunis riches en phytoalexine sur pomme de terre -----	20
Figure 7 : aspect des colonies isolées sur milieu King B -----	22
Figure 8: Les différents tests biochimiques effectués sur les souches d' <i>Erwinia</i> -----	24
Figure 9: symptômes de pourriture molle sur demi- tubercules de pomme de terre -----	26
Figure 10 : Différence de poids des demi-tubercules infectés par <i>Dickeya</i> -----	28
Figure 11 : Différence de poids des demi-tubercules infectés par <i>Pectobacterium</i> -----	28
Figure 12 : symptômes de pourriture molle sur les carottes, A : <i>Ds</i> , B : <i>Dd</i> , C : <i>Pcc</i> , D : <i>Pca</i> , E : témoin -----	29
Figure 13 : Différence de poids des carottes infectées par <i>Pectobacterium</i> -----	30
Figure 14 : Différence de poids des carottes infectées par <i>Dickeya</i> -----	30
Figure 15: densité des souches sur tubercules de pommes de terre-----	31
Figure 16: densité des souches sur tubercules de pommes de terre (moyenne)-----	31
Figure 17 : densité des souches sur carottes -----	32
Figure 18: densité des souches sur carottes (moyenne) -----	32
Figure 19: teneurs en phytoalexines sur les tissus de pommes de terre -----	33
Figure 20: Teneurs en phytoalexines sur les tissus de pommes de terre (moyenne) -----	33
Figure 21: Teneurs en phytoalexines sur les tissus de carottes -----	33
Figure 22: Teneurs en phytoalexines sur les tissus de carottes (moyenne)-----	34

Liste des abréviations

CFBP : Collection Française de Bactéries Phytopathogène

CHS : Chalcone synthase

CVP : Crystal Violet Pectate

Dd : *Dickeya dadantii*

DO : Densité Optique

Ds : *Dickeya solani*

FAO : Food and Agriculture Organisation

HRGP : glycoprotéines riches en hydroxyproline

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

LB : Luria Bertani

LP : Levure Peptone

LPA : Levure Peptone Agar

LPS : Le lipopolysaccharide

Pa : *Pectobacterium atrosepticum*

PAMPs : motifs moléculaires associés aux pathogènes

Pc : *Pectobacterium carotovorum*

pH : Potentiel d'hydrogène

PLA : Phényalanine Ammonia Lyase

PR : Proteine relatead

rmp : tour par minute(revolution per minute, rotation per minute)

SRS : Substances Réductrices du Polymorphism

TMV : virus de la mosaïque de tabac

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : Ultrat violet

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rôle des composés chimiques dans la défense des plantes-----	09
Tableau 2 : Phytoalexines produites par les Solanacées -----	12
Tableau 3 : Identification biochimique des <i>Pectobacterium/Dickeya</i> -----	23

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ----- 01

Partie bibliographique

I) généralité sur pomme de terre ----- 03

I-1) Description morphologique ----- 03

 I-1-1) Partie aérienne ----- 03

 I-1-2) Partie souterraine ----- 03

I-2) Propriétés nutritionnelle de la pomme de terre ----- 04

II) Maladies et ravageurs de la pomme de terre ----- 04

III) Pourriture molle et jambe noire ----- 05

III-1) Méthode de control----- 05

 II-1-1-) Pratiques culturales et sanitaires ----- 05

 II-1-2-) lutte chimique----- 06

 II-1-3-) lutte biologique ----- 06

IV) Interactions Plante-Pathogène ----- 07

IV-1) Reconnaissance Pectobacterium- pomme de terre ----- 07

IV-2) Mécanismes de défense végétale----- 08

 IV- 2-1) Défense préformée ----- 08

 a) Barrière physique ----- 08

 b) Barrière chimique----- 09

 III-2-2) Défense induite ----- 09

 a) Le renforcement de la paroi cellulaire ----- 10

 b) la réaction hypersensibilité ----- 10

 c) Protéines- PR ----- 10

d) stimulation des voies métaboliques secondaires -----	10
V) Les Phytoalexines -----	11
V-1) Définition-----	11
V-2) Stimulation et synthèse des Phytoalexines -----	12
V-3) Mode d'action des Phytoalexines -----	13
V-4) importance des Phytoalexines dans la résistance aux maladies -----	14
Partie expérimentale	
I) Matériel-----	15
I-1) Matériel de laboratoire-----	15
I-2) Souches bactériennes utilisées-----	15
I-2) Matériel végétal-----	15
II) Méthodes -----	16
II-1) Mise en évidence des caractères morphologiques et biochimiques des cultures -----	16
II-1-1) Observation culturelle -----	16
II-1-2) Purification et conservation des cultures bactériennes-----	16
II-1-3) Caractéristiques chimiques-----	16
a) Détermination de l'activité pectinolytique sur le milieu de Sutton -----	17
b) Réduction du saccharose (milieu SRS)-----	17
c) L'utilisation de l'inuline -----	18
d) L'utilisation de l' α -méthylglucoside-----	18
II-1-4) Test de pathogénicité -----	18
a) Préparation de la solution mère -----	18
b)Préparation de l'inoculum standard -----	19
c) Préparation de matériel végétale-----	19
II-2) extraction/dosage des phytoalexines -----	20
II-2-1) Extraction -----	20

a) -----	Pri
ncipe -----	20
b) -----	Pr
otocole -----	21
II-2-2 Dosage -----	21
Résultats et discussions -----	22
I) -----	
Caractérisation phénotypique -----	22
I-1) Observation culturelle -----	22
II) -----	Id
entification biochimique -----	22
III) -----	Te
st de pathogénicité -----	25
III-1) Sur pomme de terre -----	25
III-2) Sur carotte -----	28
IV) -----	Ex
traction/ dosage des phytoalxines -----	30
Conclusion -----	35

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

La pomme de terre, originaire du continent sud-américain, fut introduite en Europe vers le début du seizième siècle. On doit sa découverte au scientifique Walter Raleigh, tandis qu'Augustin Parmentier est le premier à avoir propagé sa culture et à faire connaître ses bonnes qualités (Durand, 1834). Actuellement elle est parmi les légumes le plus cultivés au monde.

Ce n'est que vers la deuxième moitié du 19^{ème} siècle qu'elle fut introduite en Algérie, par des colons français ou commerçants algériens (Ramoul et Sedkaoui, 1978).

L'importance de cette espèce végétale est telle qu'elle est cultivée dans plus de 100 pays à travers le monde. En effet, elle figure au 4^{ème} rang des principales cultures vivrières après le maïs, le blé et le riz (Hawkes, 1992)

En 1962, la production de pommes de terre en Algérie était de 250 000 tonnes par an, dont un tiers destiné à l'exportation. En 2011, la quantité produite est passée à 3,99 millions de tonnes sur une surface de 161 200 ha, elle occupe la deuxième place en Afrique après l'Egypte (FAOSTAT, 2011).

La pomme de terre comme toute autre plante, est la cible de nombreuses maladies et ravageurs. Parmi les pathologies les plus répandues, la jambe noire et la pourriture molle dues aux bactéries du genre *Pectobacterium* (*Erwiniae* pectinolytiques), caractérisées par une importante activité de macération. Le développement massif de ces pourritures est à l'origine de préjudices économiques importants. A ce titre, on estime qu'en Algérie, environ 32% des refus d'importation sont dus aux pourritures molles (Yahiaoui-Zaidi, 2004).

Afin de préserver l'environnement et protéger la santé humaine, des mesures réglementaires se durcissent et tendent notamment à diminuer les quantités de produits phytopharmaceutiques répandus sur les cultures et le nombre de substances actives autorisées. Parallèlement, des phénomènes de résistance aux produits chimiques apparaissent.

Dans ce contexte, on assiste de plus en plus à l'apparition d'alternatives naturelles et des recherches de physiopathologie sur les mécanismes de défense de la pomme de terre contre les différents pathogènes sont en voie d'extension.

Notre travail est scindé en deux sections différentes :

La première partie englobe une synthèse bibliographique axée sur une description générale de la culture de pomme de terre et ses différentes pathologies, ainsi que sur la résistance des plantes face aux différents agents pathogènes, notamment par le biais de la synthèse et production de molécules induites : les phytoalexines.

La deuxième partie comprend un travail expérimental axé sur l'identification biochimique des souches bactériennes utilisées (*Pectobacterium* et *Dickeya* sp), suivi de tests d'infection et de pathogénicité *in vivo* sur tubercules de pomme de terre et sur carottes. Une extraction/dosage est réalisée afin de détecter et quantifier la présence de molécules phytoalexines à partir des tissus symptomatiques.

Nous finalisons notre travail par une conclusion générale sur le rôle des métabolites secondaires à l'instar des phytoalexines, dans la résistance naturelle des pommes de terre vis-à-vis des maladies de pourriture molle et jambe noire.

Partie bibliographique

I) Généralités sur pomme de terre

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L) est parmi les cultures les plus importantes, sur le plan alimentaire et économique. Elle appartient à la famille des Solanacées qui regroupe par ailleurs d'autres plantes d'une importance majeure comme l'aubergine, le piment, poivron tomate, belladone et tabac. Cette famille compte environ 2600 espèces, dont certaines sont médicinales et d'autres toxiques (Gurib-Fakim, 2006).

I-1) Description morphologique

La plante de pomme de terre est constituée de deux parties dont l'une est aérienne et l'autre souterraine (Figure1)

I-1-1) Partie aérienne

L'organe aérien comprend :

- Un calice à cinq divisions ; une corolle en roue; un ovaire supérieure ;
- Le fruit qui est une baie molle et succulente divisée en plusieurs cellules, par des cloisons intermédiaires, et refermant de nombreuses semences ;
- Des tiges tendres, herbacées, peu ramifiées, légèrement velues et garnies de feuilles glabres alternes ;
- Les lobes ou les folioles ovales, terminés en pointe, de grandeurs fortes inégales ;
- Des fleurs terminales, déposées à l'extrémité d'un long pédoncule (Durand, 1834).

I-1-2) Partie souterraine

Les racines sont longues, fibreuses, chargées de gros tubercules oblongs ou arrondis. Contrairement à ce qu'on pense généralement, le tubercule n'appartient pas à la racine de la plante, mais à sa tige enterrée dont partent des rameaux plus grêles appelés stolons, à l'extrémité desquels se forment les tubercules. Ces tiges souterraines fonctionnent comme organe de réserve de nutriments dans lesquels s'accumule 75 à 85 % de la matière sèche produite par la plante (Rossignol et Rousselle-Bougeois, 1996).

Les tubercules sont nombreux et assez petits, pèsent de 50g à 500g chacun. La couleur de la peau varie entre le blanc, le jaune, le rose, le rouge, le brunâtre et le violet (Bell *et al.*, 2000). Tandis que la couleur de la chaire est généralement blanche ou jaune. Ils existent plusieurs variétés de pommes de terre, chaque espèce se distingue par sa couleur, sa forme et

sa qualité qui dépend à la fois des conditions climatiques, des techniques culturales, et du cycle de vie (Grison, 1983). Les principales variétés sont présentées dans l'annexe 1.

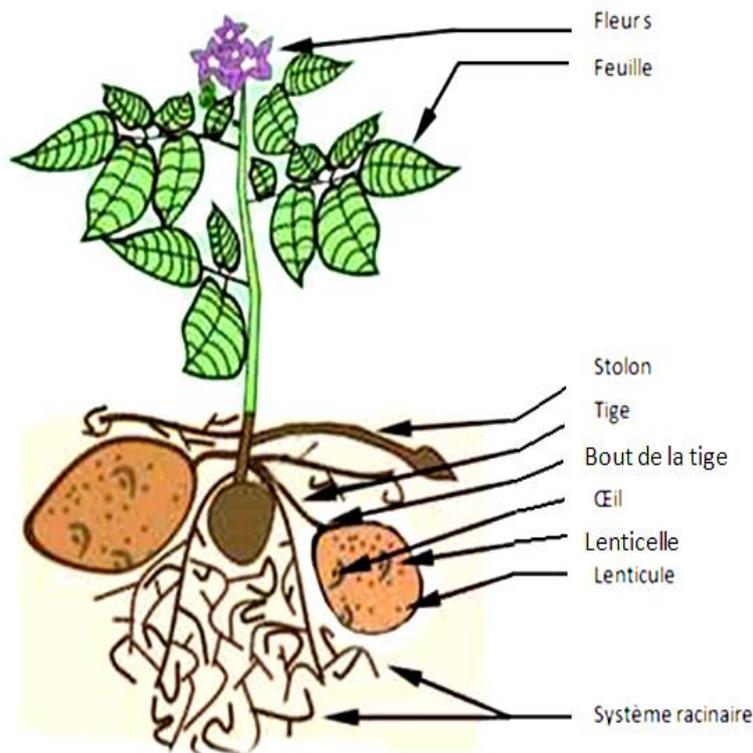


Figure 1: Aspect morphologique de la plante de la pomme de terre (Banks, 2008).

I-2) Propriétés nutritionnelles de la pomme de terre

La pomme de terre contient la plupart des acides aminés essentiels à l'exception de l'acide glutamique et des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), elle renferme aussi des composés antioxydants (Gravouelle, 1996).

La composition chimique de la pomme de terre est présentée dans l'annexe 1.

II) Maladies et ravageurs de la pomme de terre

De nombreuses maladies peuvent affecter les cultures de pommes de terre et par conséquent les qualités de la récolte en induisant des pertes économiques considérables (Degefu *et al.*, 2006). Ces attaques sont observées sur les différentes parties de la plante, que ce soit sur les racines, les tubercules ou le feuillage. Les dommages peuvent être de nature biotique (champignons, bactéries, virus, plantes parasites, nématodes, ravageurs) ou abiotique (stress hydrique, thermique, ionisant, pollution, carence ou excès de nutriments... etc.).

Les principaux ravageurs et maladies de la pomme de terre sont résumés en annexe 1

III) Pourriture molle et jambe noire

Les maladies bactériennes de pourriture molle et de jambe noire sont parmi les pathologies les plus répandues au champ et/ou en conditions de stockage, ou elles occasionnent des dégâts considérables (De Boer, 1995).

Ces deux maladies sont provoquées par les espèces appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sp (anciennement appelés *Erwinia* pectinolytiques), (Gans et al, 1991). Leur transmission est assurée par différentes sources d'inoculum biotiques (insecte) ou abiotiques (sol, eau, matériel et pratiques agricoles, tubercules infectés), voir annexe 1 (Perombelon et Salmond, 1995).

III-1) Méthodes de contrôle

Le contrôle de ces maladies vise essentiellement à réduire ses sources de contamination par un ensemble de mesures.

III-1-1) Pratiques culturales et sanitaires

- ✓ Eviter les conditions de culture humides qui influencent les niveaux de contamination par l'intermédiaire des lenticelles (Hélias *et al.*, 2000) ;
- ✓ Se débarrasser des plantes infectées, pour éviter les contaminations (Elphinstone et Pérombelon, 1986) ;
- ✓ Récolter à maturité et avec beaucoup de soins en évitant les blessures qui constituent autant de portes d'entrée (Pérombelon et Kelman, 1980) ;
- ✓ Laisser subériser les blessures et éviter d'exposer les tubercules longtemps au soleil ;
- ✓ Traitement à l'eau chaude (thermothérapie), les *Pectobacterium* meurent rapidement dans un sol dépassant les 25°C (Pérombelon et Hyman (1989) ;
- ✓ Privilégier les rotations longues ;
- ✓ Maintien d'une hygiène stricte de l'exploitation (désinfection régulière du matériel et des locaux, de son environnement, élimination des déchets), les repousses et résidus de culture permettant la survie et la multiplication des bactéries (Pérombelon et Kelman, 1980) ;
- ✓ Eliminer les auxiliaires capables de transmettre les germes, exemple drosophiles (Molina *et al.*, 1974 ; Harrison *et al.*, 1977) ;

- ✓ Amendement calcique du sol (Bartz *et al.*, 1992).

III-1- 2) Lutte chimiques

- ✓ Un composé chimique ; le 5-nitro-8-hydroxyquinoline est capable de diminuer l'incidence de pourriture molle sur les tubercules fraîchement blessés (Harris, 1979) ;
- ✓ La poudre blanchissante stable (SBP) qui contient 35 % de chlore est testée pour son efficacité dans le contrôle de la jambe noire et de la pourriture molle ;
- ✓ Traitement à base de cuivre ou d'organomercure, mais demeurant peu efficaces et déconseillés pour des raisons de protection d'environnement (Priou et Jouan, 1996) ;
- ✓ Solutions salées de chlorure d'aluminium et de métabisulfite de sodium (Yaganza *et al.*, 2004), ou de peptides de synthèses (Kamysz *et al.*, 2005), capables d'altérer l'intégrité cellulaire et la croissance bactérienne ;
- ✓ Activité inhibitrice de la chlorine sur les *Pectobacterium* (Barkai-Golan, 2001) ;
- ✓ Fertilisation par le chlorure et le sulfate de potassium (Davenport et Bentley, 2001).

III-1- 3) Lutte biologique

La lutte biologique est née d'un certain échec de la lutte chimique, essentiellement dû à de nombreux abus. Dès le début des années 1980, Kloepper (1983) proposa d'utiliser les capacités antagonistes de certaines bactéries vis-à-vis des *Pectobacteria*.

- ✓ L'isolement de *Pseudomonas* a permis de sélectionner quelques souches de *P. fluorescens* et *P. putida* antagonistes des *Pectobacteria in vitro* (Xu et Gross, 1986 ; Rhodes et Logan, 1987), leur pouvoir protecteur est dû à la production des sidérophores (Xu et Gross, 1986) et d'antibiotique (Cronin *et al.*, 1997) ;
- ✓ *Pectobacterium betavasculorum* produit des antibiotiques qui répriment la croissance de *P. carotovorum* au niveau des blessures des tubercules (Costa et Ioper, 1994) ;
- ✓ Certains bactériophages possèdent un pouvoir inhibiteur sur *P. carotovorum* (Bahi *et al.*, 2005) ;
- ✓ Jaynes *et al.* (1987) ont démontré que la protéine bactérienne « cecropine » de *Hyalophora cecropia* avait un potentiel anti-*Erwinia* ;
- ✓ Action et efficacité des antibiotiques produits par *Bacillus subtilis* sur *P. carotovorum* et *atrosepticum in vivo* et *in vitro* (Sharga et Lyon, 1998).

IV) Interaction plante pathogène

Dans leur environnement, les plantes sont confrontées à des micro-organismes pathogènes tels que des virus, bactéries, ou champignons. Toutefois, les plantes résistent efficacement à leurs agresseurs et développent rarement des symptômes sévères de maladies. Néanmoins un certain pourcentage de récoltes est perdu, et ce malgré l'emploi de produits phytosanitaires qui ne sont pas sans conséquences sur l'environnement (Gianinazzi *et al.*, 1991) (rapporté par Yahiaoui-Zaidi, 2004). Dans ce contexte des recherches récentes en biologie moléculaire et en transformation des végétaux ont démontré que sensibiliser une plante à répondre plus rapidement à l'infection pouvait lui conférer une protection accrue contre des microorganismes virulents (Benhamou et Picard, 2000). Laissant ainsi envisager de nouvelles stratégies de protection des végétaux, par une stimulation maîtrisée des défenses naturelles végétales (Dunez *et al.*, 1991).

IV-1) Reconnaissance *Pectobacterium*-pomme de terre

Les interactions plante-agent pathogène impliquent un échange d'informations. Tout d'abord, l'organisme pathogène est capable de reconnaître la plante grâce à certains facteurs portés par l'hôte (Thordal-Christensen, 2003), et ensuite de modifier son métabolisme pour fournir les conditions favorables à la pathogénicité (Alfano et Collmer, 2004 ; Chang *et al.* 2004).

Parallèlement, les plantes ont évolué pour identifier des motifs associés aux pathogènes (PAMPs), pour renforcer les défenses existantes et pour développer d'autres mécanismes de défenses puissants (Gomez-Gomez et Boller, 2002 ; Parker, 2003).

Les espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* secrètent de grandes quantités d'enzymes extracellulaires comme les pectinases, les cellulases et les protéases et aussi certains des constituants de la surface cellulaire (flagelles, pili communs, sidérophores, capsule et LPS) (Hasegawa *et al.*, 2005) (figure 2).

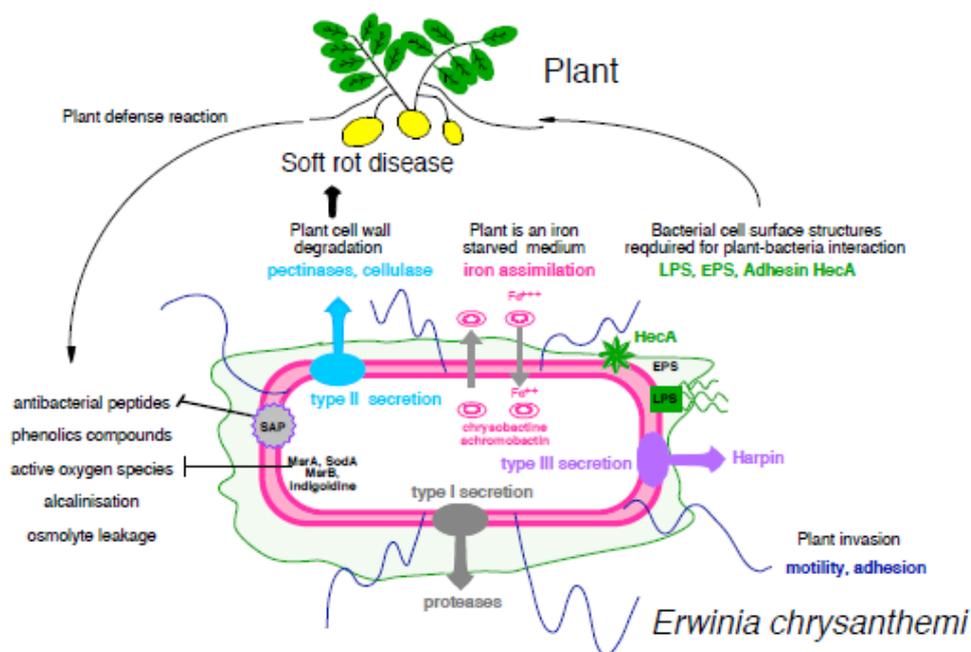


Figure 2: Schéma descriptif de l'interaction *Erwinia chrysanthemi*-pomme de terre (Sepulchre *et al.*, 2007)

IV- 2) Mécanismes de défense végétale

Les principes généraux des mécanismes impliqués lors des réactions de défense chez les plantes, correspondent à :

- La défense préformée (constitutive) ;
- La défense induite.

IV-2-1) Défense Préformée

a) Barrière physique

Parmi les mécanismes de résistance végétale face aux agents pathogènes, les barrières physiques préformées (comme la cuticule des feuilles), empêchent l'entrée de l'agent pathogène dans les tissus de la plante, obligeant ce dernier à recourir aux ouvertures naturelles (stomatess et hydathodes, blessures) pour pénétrer dans la plante. Cependant, une fois à l'intérieur, il doit persister dans l'espace apoplastique, où le bas pH, les enzymes de dégradation ou les composés antimicrobiens produits par la plante constituent une autre barrière que les agents pathogènes doivent surmonter (Mansfield, 1983 ; Osbourn, 1996).

b) Barrière chimique

Les plantes produisent aussi des composés constitutifs doués d'activité antimicrobienne, comme les phénols, glycosides phénoliques, lactones non saturées, composés sulfuriques, saponines, glycosides cyanogéniques et glucosinolates sont des composés constitutifs des plantes qui ont aussi une activité antifongique (Mansfield, 1983 ; Osbourn, 1996).

Tableau 1 : Rôle des composés chimiques dans la défense des plantes (Bouteau, 2009)

Substances	Actions
Lignine	<ul style="list-style-type: none">• Durcit les tissus• Gêne la digestion
Cuticule	<ul style="list-style-type: none">• Rend les feuilles coriaces
Tanins	<ul style="list-style-type: none">• Bloquent les enzymes digestives
Cires	<ul style="list-style-type: none">• Peuvent contenir des substances toxiques ou des métabolites secondaires
Inhibiteurs de protéase	<ul style="list-style-type: none">• Bloquent l'activité des enzymes digestives
Cyanure	<ul style="list-style-type: none">• Bloque la chaîne des transporteurs dans la respiration cellulaire
Histamine	<ul style="list-style-type: none">• Entraîne une réaction allergique

Toutefois, pour survivre dans la plante, accéder au cytoplasme et puiser des nutriments, les micro-organismes ont développé des mécanismes qui leur permettent de surmonter ou inactiver les défenses préformées et dégrader la paroi, ce qui contribue à la virulence de l'agent pathogène (Göhre et Robatzek, 2008).

IV-2-2) Défense induite

En plus des barrières physiques et chimiques préformées, les plantes possèdent des systèmes de reconnaissance et de réponses induites qui sont déclenchées immédiatement après le premier contact avec des molécules étrangères, et qui sont renforcées par l'interaction prolongée avec les agents pathogènes (Göhre et Robatzek, 2008). Différents composés participent à la mise en place de l'état de résistance de la plante (van Loon *et al.*, 2006).

a) Renforcement de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire et une barrière physique naturelle très efficace contre les agresseurs. Lors d'une infection par un agent pathogène, cette voie est renforcée par des dépôts de composés phénoliques (lignine), d'esters tel que la subérine, de polysaccharides tel que la callose et par l'accumulation de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) (Benhamou, 1996).

Le callose retarde la pénétration du pathogène, en formant une sorte de moule pour le dépôt de composés phénoliques qui, eux constituent une véritable barrière, limitant la progression de parasite dans la plante. Les HRGP quant à elles renforcent la paroi en établissant de nouvelles liaisons entre les composants protéiques déjà présents (Robert et Catesson, 2000).

b) La réaction hypersensibilité

C'est un mécanisme de défense caractérisé par une nécrose pigmentée, touchant peu de cellules, et se développant rapidement au niveau du point de pénétration du pathogène. Elle entraîne généralement une restriction du développement de celui-ci. C'est un phénomène complexe, s'accompagnant de nombreuses modifications physiologiques et biochimiques, parmi lesquelles des perturbations de la perméabilité cellulaire, une stimulation de la production d'éthylène et une synthèse intense de phytoalexines, composés antimicrobiens de faible poids moléculaire (Rouxel, 1989).

c) Protéines-PR

Protéines de petite taille, souvent sécrétées dans l'espace extracellulaire (Van Loon et Van Strein, 1999). Elles sont stables en milieu acide et résistent à l'action des protéases produites par la plante elle-même ou par les microorganismes pathogènes, ces deux propriétés leur confèrent une grande stabilité dans les environnements défavorables où elles peuvent s'accumuler dans l'espace intercellulaire occupé par les agents pathogènes (Kauffman et *al.*, 1999). Selon leurs homologies de séquences, leurs parentés sérologiques et leurs activités biologiques, on recense 14 familles de protéines-PRs.

d) Stimulation des voies métabolique secondaires

Une des singularités des végétaux est de produire de nombreux composés, dont le rôle, au niveau de la plante, est mal connu. Ces derniers ne se rencontrent pas chez toutes les espèces, ce qui indique qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général et qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal : ce sont des métabolites secondaires.

Les métabolites secondaires peuvent être classés en quatre grands groupes :

- Les composés aromatiques (huiles essentielles, tanins, flavones, anthocyanes ...);
- Les terpènes ;
- Les stéroïdes ;
- Les composés azotés.

De nombreux métabolites secondaires ont des propriétés physiologiques importantes pour l'homme et les animaux et constituent les « principes actifs » de diverses plantes médicinales (Guignard, 2000). Quelques exemples des métabolites secondaires synthétisés par la plante et leurs effets sur l'homme sont présentés dans l'annexe 1.

La pénétration de la plante hôte par la bactérie peut être arrêtée par stimulation des voies de métabolites secondaires et par la production d'antimicrobien (phytoalexines), d'éthylène ou d'acide abscissique, d'acide salicylique et d'acide jasmonique ainsi que des voies oxydatives et aromatiques dérivées de la phénylalanine (Yahiaoui-Zaidi, 2004).

D'autres métabolites secondaires antimicrobiens peuvent être constitutifs et exister dans les plantes sous des formes biologiquement inactives, comme les glucosides cyanogéniques et glucosinolates, qui sont activés en réponse aux blessures du tissu ou l'attaque par un agent pathogène. Cette activation s'effectue grâce à la libération d'enzymes de la plante lors de la rupture de l'intégrité de la cellule. VanEtten *et al.*, (1994) ont proposé le terme de phytoanticipines pour ce groupe de composés permettant de les distinguer des phytoalexines (Mansfield 1983; VanEtten *et al.*, 1994).

Les principes mécanismes de défense sont résumés dans l'annexe 1.

V- Les phytoalexines

V-1- Définition

Le terme phytoalexine a été introduit pour la première fois par Müller et Börger en 1940, avec la définition suivante « un composé chimique produit uniquement lorsque les cellules vivantes de la plante hôte sont envahies par un parasite et se nécrosent » (Corbaz, 1990). La dernière définition proposée, datant de 1981, est la suivante : « Composé antimicrobien, de poids moléculaire faible, à la fois synthétisé et accumulé par la plante après avoir été exposée à des microorganismes » (Cook *et al.*, 1983).

Un végétal peut élaborer plusieurs molécules de phytoalexines simultanément, certains en plus grandes quantités que d'autres (Corbaz, 1990).

La nature chimique de ces composés est spécifique d'une famille ou d'un groupe de plantes. Par exemple chez les légumineuses les phytoalexines sont des isoflavonoïdes, tandis que chez les solanacées on trouve des terpénoïdes (Lepoivre, 2003).

Tableau 2: Phytoalexines produites par les Solanacées (Corbaz, 1990)

Pomme de terre (<i>solanum tuberosum</i>)	- Rishitine
Tabac - (<i>N. tubaccum</i>)	- Lubimine
- (<i>N.glutinosa</i>)	- Phytuberine
	- Capsidiol (provoqué par TMV)
	- Glutinosome (provoqué par TMV)
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	- Lubimine
Aubergine (<i>Solanum melongena</i>)	- Capsidiol
Stramoine (<i>Datura stramonium</i>)	- Lubimine

V-2- Stimulation et synthèse des Phytoalexines

L'induction de la formation des phytoalexines dans les tissus végétaux et les cultures cellulaires est le résultat de la perception par les cellules végétales des molécules élicitrices qui peuvent être d'origine biotique ou abiotique (Keen, 1989). Les éliciteurs sont très divers tant sur le plan structural que par leur spécificité d'action. Exemple des pectates lyases produites par les espèces *Erwinia carotovora* (Gregory et Abigail, 1995), traitement avec de la lumière UV (Monde et Takasugi, 1991), les ions des métaux lourds (Hargreaves, 1979), substances xénobiotiques (Stossel et Magnolato, 1983), blessures mécaniques (Arora et Strange, 1991) et congélation et chauffage (Bailey, 1980).

Les phytoalexines n'existent pas naturellement dans la plante, mais sont synthétisées par les cellules voisines du site d'infection; elles y sont accumulées en grande quantité ; lorsque la cellule meurt, elles sont ainsi libérées dans le milieu, à proximité immédiate de l'agent pathogène, le détruisant ou limitant son développement.

Elles sont de nature chimique diverse, souvent des composés cycliques, dont la production est dérivée des voies de métabolites secondaires. Beaucoup sont produites à partir de la voie Phénylpropanoïde, voie à partir de laquelle sont synthétisées les flavones, les lignines. Les enzymes clés de cette voie sont la PLA (phényalanine ammonia lyase) et la chalcone synthase qui sépare les voies des phytoalexines flavoniques de celle de la lignine (Robert et Catesson, 2000).

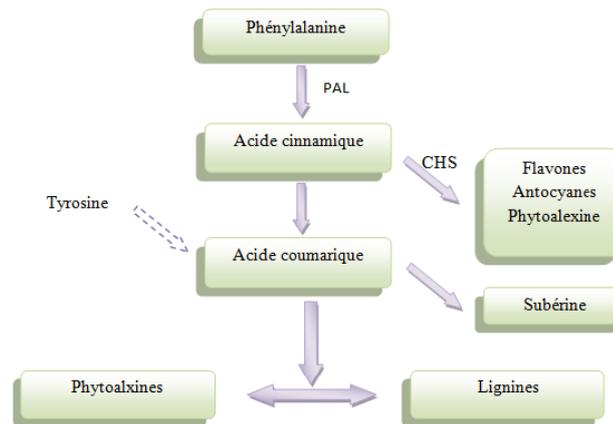


Figure 3: voies de synthèse des Phytoalexines (Robert et Catesson, 2000).

V-3- Mode d'action

Action antifongique : Les phytoalexines (isoflavonoïdes, terpenoïdes et furanoacétyle) perturbent l'écoulement cytoplasmique, provoquant la granulation du cytosol, une désorganisation du contenu cellulaire et la rupture de la membrane cellulaire chez les colonies fongiques (Van Etten *et al.*, 1971 ; Grisebach *et al.*, 1978).

Les phytoalexines peuvent également agir en inhibant les enzymes fongiques qui dégradent les parois cellulaires végétales, empêchant ainsi la propagation du champignon dans les tissus environnants (Bull *et al.*, 1981).

Action anti-bactérienne : Les phytoalexines isoflavonoïdes, flavonoïdes et furanoacétyle semblent être sélectivement toxiques pour les bactéries gram-négatives (Gnanamanickam *et al.*, 1981).

Action contre les ravageurs : une phytoalexine (la glyceolline) inhibe la motilité, ainsi que l'absorption d'oxygène du parasite des légumineuses *Meloidogyne incognita* perturbant ainsi sa respiration (Kaplan *et al.*, 1980).

En outre, les phytoalexines sont non seulement toxiques sur les micro-organismes pathogènes, mais également sur les plantes elles-mêmes, Les sesquiterpéniques et la rishitine sont aussi capables d'empêcher la germination des trois espèces de pommes de terre induisant mort cellulaire et assombrissement des tranches de la pomme de terre (Lyon, 1980).

V-4- Importance des phytoalexines dans la résistance aux maladies

Le rôle des phytoalexines dans la résistance globale d'une plante à un pathogène varie selon le couple hôte-pathogène considéré (Lepoivre, 2003). Keen (1982) cite 16 systèmes hôte-parasite dans lesquels différents auteurs ont montré une accumulation plus importante de

phytoalexines lors de relations incompatibles que lors de relations compatibles. L'hypothèse d'un rôle des phytoalexines en tant que mécanisme de défense vis-à-vis des agents pathogènes est encore renforcée par diverses observations:

- l'ubiquité de ce type de synthèse en réponse à un stress (au moins chez les dicotylédones) ;
- les propriétés antibiotiques des phytoalexines ;
- leur absence dans les plantes saines et leur synthèse active ;
- la forte corrélation existant entre la limitation de la croissance de l'agent pathogène dans les lésions hypersensibles nécrotiques et l'accumulation rapide de quantités toxiques de phytoalexines précédant cette restriction de croissance (Bailey et Deverall, 1971; Bailey, 1974; Yoshikawa *et al.*, 1978 ; Bailey *et al.*, 1980)
- Enfin, l'inversion de compatibilité observée lorsque des inhibiteurs suppriment la synthèse de phytoalexines chez des plantes résistantes (Yoshikawa *et al.*, 1978; Keen *et al.*, 1981).

Partie Experimentale

Matériels et Méthodes

I) Matériel

I-1) matériel de laboratoire

- Le matériel utilisé serait introduit au fur et à mesure de l'avancement du Travail.

I-2) Souches bactériennes utilisées

Collection de quatre souches de références :

- *Dickeya dadantii* 3937-(470), issue de l'UMR Microorganismes, Adaptation et Pathogénie-Université Lyon 1-France ;
- *Dickeya solani* (99) provient du Laboratoire de Protection végétale et de Biotechnologie- Université de Gdansk, Pologne ;
- *Pectobacterium atrosepticum* (86.20) et *Pectobacterium carotovorum* (88.22) de la Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (CFBP)-INRA de Rennes (France).

I-3) Matériel végétal

Les échantillons utilisés sont composés de tubercules de pommes terre de consommation (*Solanum tuberosum* L.), variété à peau et à chair blanche. Des carottes sont également échantillonnées.

Les pommes de terre et les carottes sélectionnés sont de dimensions moyennes et uniformes, et dépourvus de maladie et de blessures (figure 4).

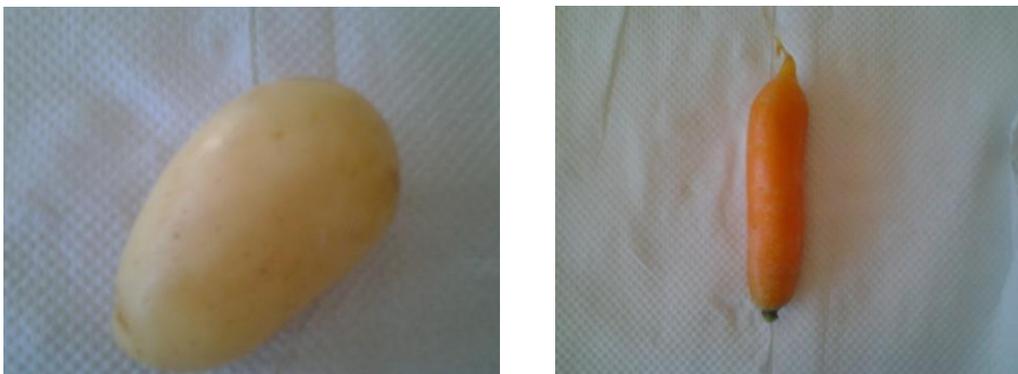


Figure 4: tubercules de pommes de terre et carotte utilisés

II) Méthodes

II-1) Mise en évidence des caractères morphologiques et biochimiques des cultures

II-1-1) Observation culturelle

L'observation des colonies bactériennes se fait à l'œil nue, en tenant compte de certains critères. En effet, sur le milieu King B, les colonies de *Pectobacterium-Dickeya*, sont d'aspect blanc crémeux de forme ronde et lisse avec des bords réguliers et qui ont une croissance rapide.

II-1-2) Purification et conservation des cultures

Des repiquages successifs sont réalisés sur milieu King B en boîtes de Pétri, ainsi sur gélose inclinée en tubes afin d'éviter tout risque de perte ou de contamination.

Les cultures sont conservés dans les milieux minimum : le milieu LB (Luria Bertani) et LPA (Levure Peptone Agar) en gélose inclinée. La composition de tous les milieux de culture et réactifs chimiques utilisés pour la caractérisation biochimique est donnée en annexes.

II- 1-3) Caractérisation biochimique

Après culture sur milieu King B pendant 24h, des suspensions bactériennes sont préparées pour la réalisation des tests biochimiques classiques.

Cette étape est assurée par les tests suivants :

- Détermination de l'activité pectinolytique ;
- réduction du saccharose ;
- utilisation de l'inuline ;
- fermentation de l' α -méthylglucoside.

a) Détermination de l'activité pectinolytique sur le milieu de Sutton

Le test pectinase permet de mettre en évidence l'activité pectinolytique d'une bactérie c'est-à-dire sa capacité à dégrader la pectine contenue dans le milieu de culture. Le substrat utilisé est généralement l'acide polygalacturonique (Lacroix et Vésina, 2003).

Différents milieux sélectifs à base de pectine et de polypectate de sodium sont utilisés pour l'isolement et la détection des bactéries pectinolytiques à partir du sol et des tissus végétaux. Les principaux sont les milieux CVP et Pectate Tergitol (Liao et Shollenberger, 2004).

Ces milieux sont basés sur la liquéfaction de la pectine comme principal critère de diagnostic, mais différent dans leurs propriétés sélectives (substrats carbonés et azotés) (O'Neill et Logan, 1975 ; rapporté par Ladjouzi, 2007).

Dans notre travail, l'activité pectinolytique des souches est déterminée sur le milieu de Sutton, un milieu semi-solide à base de polypectate.

- Mode opératoire

Les souches sont ensemencées par piqûre centrale dans 3ml de milieu en tubes à essai. L'incubation est faite à 27°C pendant 24h à 48h.

- Lecture du test

La présence d'une activité pectinolytique se traduit par le virage de l'indicateur de couleur (Bleu de bromothymol) du bleu au jaune, indiquant une acidification du milieu. Après 48h, la liquéfaction du milieu désigne la dégradation de la source de pectine (Hélias, 1999).

b) Réduction du saccharose (milieu SRS)

- **Mode opératoire :** Des colonies fraîches de 24h sont inoculées dans 2ml du milieu SRS. Après incubation à 27°C pendant 24h, la révélation se fait par ajout de 2ml du réactif de révélation de Benedict.

Les tubes sont mis dans un bain marie bouillon pendant 5 minutes et le changement de couleur est suivi.

- **Lecture du test :**

L'apparition d'un précipité de couleur jaune-orange met en évidence la présence de sucres réducteurs du saccharose (Lacroix et Vésina, 2003).

c) L'utilisation de l'inuline

- **Mode opératoire**

Les amas de culture sont ensemencés dans 2ml du milieu inuline, puis incubés à 27°C pendant 24h.

- **Lecture de test**

L'hydrolyse de l'inuline se traduit par le virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune (Hélais, 1999).

d) L'utilisation de l' α -méthylglucoside

- **Mode opératoire**

Les amas de colonies sont cultivés dans 2ml du milieu α - méthylglucoside en tube à essai. Puis incubés à 27°C pendant 24h à 48h.

- **Lecture de test**

L'utilisation de ce sucre se traduit par une acidification du milieu (couleur jaune), l'absence d'un virage de couleur signifie une réaction négative (Hélais, 1999).

II-1-4) Test de pathogénicité

a) Préparation de la solution mère

Après une culture de 24h sur le milieu LP à 27°C, 1ml de cette suspension bactérienne est ajusté à 9ml dans de l'eau physiologique.

La standardisation de l'inoculum de départ est réalisée à partir d'un prélèvement d'une colonie sur une culture de 24h à 27°C sur milieu King B.

b) Préparation de l'inoculum standard

A partir d'une colonie bactérienne ou d'un ensemble de colonies identiques, une préculture est réalisée sur bouillon Levure Peptone (LP), après 24h d'incubation à 27°C, une série de dilutions est réalisée dans 9ml d'eau physiologie.

100µl de dilution sontensemencés sur 2 boites de pétri du milieu King B, et la densité optique (D.O) est mesurée à 600nm. Les boites sont incubées à 27°C pendant 18 à 24h, et les colonies sont dénombrées, la dilution correspondant à une population bactérienne de 10^8 cellules/ml est déterminée.

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

c) Préparation de matériel végétal

L'inoculation est réalisée selon les protocoles d'Ibrahim *et al.* (1978) et Priou *et al.* (1992), avec quelques modifications.

Les tubercules de pommes de terre ainsi que les carottes sont préalablement lavés, puis trempés dans l'éthanol à 10% pendant 5 minutes, ensuite ils sont rincés à l'eau et séchés, chaque tubercule est coupé longitudinalement en deux parties identiques, puis mis dans du papier humidifié.

Des puits de dimensions 5/5mm sont réalisés, puis remplis par 50µl de suspension bactérienne. Les demi-tubercules et les carottes sont ensuite incubés à l'abri de la lumière afin de créer une atmosphère humide et confinée. Cinq répétitions sont réalisées pour chaque essai (figure 5).



Figure 5 : demi-tubercules et carottes avant l'inoculation

L'incubation se fait durant 3 à 5 jours à température ambiante. Le développement des symptômes est suivi visuellement, et les différences de pathogénicité entre les souches utilisées sont estimées en fonction des poids des demi-tubercules ainsi que des carottes. Par ailleurs, les demi-tubercules et carottes infectés sont quotidiennement pesés durant l'incubation. Les différences de poids enregistrées correspondent aux volumes d'eau libérés suite à la macération tissulaire.

Les tissus symptomatiques sont prélevés, ensuite les couches de tissus se trouvant au-dessous de ces derniers (entre les tissus malades et les tissus sains) sont excisées afin de procéder à l'extraction des phytoalexines.



Figure 6 : tissus jaunis riches en phytoalexines sur pomme de terre

II-2) extraction/dosage des phytoalexines :

II-2-1) Extraction

a) 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 (Ribereau- Gayon, 1968 ; Mompon *et al.*, 1996). Le solvant organique utilisé dans cette expérience est un mélange binaire méthanol/ chloroforme selon le protocole modifié de Henfling et Kuc. (1979).

b) Protocole :

Broyage des tissus : 0,5 g des tissus prélevés sont hachés et broyés à l'aide d'un pilon en verre.

1^{er} macération : ajout de 5ml d'un mélange de solvants organiques (chloroforme/ méthanol : 2/1) aux tissus et laissé macérer pendant 1heure sous agitation, et à l'abri de la lumière.

2^{ème} macération: 25ml du même mélange de solvants sont ajoutés et laissés macérer sous agitation pendant 20 à 30 minutes.

Centrifugation : la solution préparée est répartie dans des tubes pour être ensuite centrifugée à 5000 rmp pendant 5minutes.

Evaporation : après récupération du surnageant dans des béchers, le chloroforme est évaporé sous hôte à flux laminaire, et les résidus (riches en phytoalexines) sont suspendus dans du méthanol. L'évaporation est réalisée pendant 1 à 4 heures selon le type de tissus.

II-2-2) Dosage

Les extraits sont conservés à une température de 4°C*, et à l'obscurité, puis ensuite quantifiés spectrophotométriquement, en mesurant leur absorbance à 270 nm (spectre UV).

Résultats et Discussion

V) Caractérisation phénotypique

I-1) Observation culturelle

On se basant sur les critères d'observation macroscopiques précédemment établis, les colonies de *Pectobacterium/Dickeya* présentent les caractéristiques morphologiques suivantes :

- ✓ Couleur blanchâtre avec une consistance crémeuse ;
- ✓ Surface lisse avec bords réguliers ;
- ✓ Forme bombées à semi-bombée ;
- ✓ Aspect irisé et translucide ;
- ✓ Suspensions homogènes ;
- ✓ Colonies de même taille, avec des dimensions plus réduite pour les espèces *Dickeya* ;
- ✓ Présence d'une odeur de pourri sur certaines cultures.

A l'issue de ces observations, nous pouvons conclure que ces colonies correspondent au type S (Smooth ou lisses).

Les colonies sont ensuite repiquées sur milieu King B en boîtes de Petri, puis conservées sur milieu LB incliné. La figure suivante montre l'aspect externe des colonies sur le milieu King B.

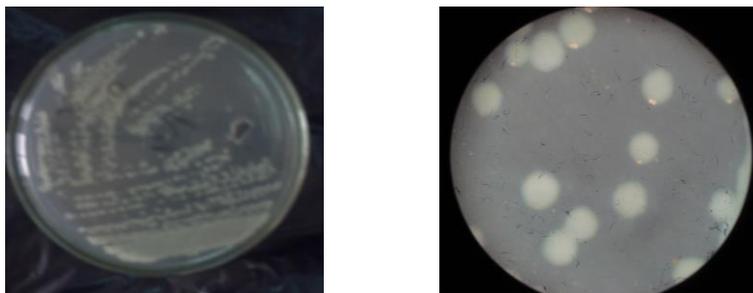


Figure 7 : aspect des colonies isolées sur milieu King B.

VI) Identification biochimique

Dans le but de déceler toute contamination et de purifier les colonies de *Pectobacterium/Dickeya*, des tests de caractérisation biochimique sont indispensables.

Ces souches ont répondu positivement aux principaux tests biochimiques ; ainsi elles possèdent une activité pectinolytique sur milieu Sutton et sont incapables de métaboliser et de

produire des acides à partir de l'inuline, α -méthylglucoside et du sucrose et, à l'exception de la souche *P. atrosepticum* qui est positive pour les deux derniers sucres (Tableau 3).

Le test de dégradation de l'inuline est spécifique pour les souches du genre *Dickeya* qui montrent une réaction variable, à la fois positive ou négative vis-à-vis de ce substrat (Holt *et al.*, 1994 ; Hyman *et al.*, 1998). Les résultats des tests biochimiques sont confirmés par d'autres études ultérieures, ainsi Tavasoli (2011) et Sarris (2011) sont arrivés aux mêmes conclusions.

Tableau 3: Identification biochimique des *Pectobacterium/Dickeya*

Test \ Souche	<i>Ds</i>	<i>Dd</i>	<i>Pc</i>	<i>Pa</i>
Activité pectinolytique (milieu Sutton)	+	+	+	+
Réduction du saccharose (SRS)	-	-	-	+
L'utilisation de l'inuline	+	+	-	-
l'utilisation de l' α -méthylglucoside	-	-	-	+

La figure suivante illustre les réactions de virage de couleur pour les différents milieux ensemencés.

Réaction négative	Réaction positive
--------------------------	--------------------------

	
Activité pectinolytique (milieu Sutton)	
	
réduction du saccharose (SRS)	
	
l'utilisation de l'inuline	
	
L'utilisation de l'α-méthylglucoside	

Figure 8: Les différents tests biochimiques effectués

VII) Test de pathogénicité

Les résultats du test d'inoculation sur carottes et de demi-tubercules de pommes de terre par l'ensemble des souches de notre collection ont montré un net effet pathogène de ces dernières. Ce pouvoir pathogène varie d'une souche à l'autre tant au regard de la nature de l'hôte infecté que par l'étendue des nécroses formées.

Les souches de *Pectobacterium* et *Dickeya* sont distinguables par l'apparence de la pourriture occasionnée sur les tubercules et les carottes.

III-1) sur pomme terre

Les symptômes sur les demi-tubercules de pomme de terre infectés par les espèces *solani* et *dadantii* sont plus importants et plus intenses que ceux observés sur ceux occasionnés par les espèces du genre *Pectobacterium*.

Sur tubercules, alors que les symptômes causés par *atrosepticum* sont caractérisés par une pourriture foncée et humide entourée d'un halo noir marquant une frontière avec les tissus sains, ceux provoqués par *carotovorum* sont de nature plutôt sèche, de couleur marron clair avec une zone nécrosée plus réduites.

Les souches du genre *Dickeya* sp ont engendré une étendue de nécrose plus vaste, à la fin de la période d'incubation, occupant presque toute la surface des demi-tubercules.

La figure N°9 montre les différents aspects des tissus macérés sur demi-tubercules.

A ce titre, il apparait clairement que les souches de *Dickeya*, notamment l'espèce *solani* est de loin la plus virulente sur pommes de terre, suivi de près par *D. dadantii*. Par ailleurs, les espèces *Pectobacterium* sont les moins pathogènes, en particulier *P. atrosepticum*.

Ainsi, on distingue les souches hautement agressives qui ont la capacité de macérer fortement les pommes de terre (*Ds, Dd*), des souches moyennement agressives qui ont une capacité de macération plus limitées (*Pa, Pc*)

Des tests d'inoculation subséquentment réalisés ont confirmé cette donnée, à savoir le potentiel pathogénique élevé des souches de *Dickeya*, par rapport aux *Pectobacterium*, ce qui pourrait s'expliquer par une température d'incubation plus favorable aux *Dickeya*. En effet, le test d'inoculation a été réalisé vers fin Mars-Mi Avril, période plus appropriée à la croissance des espèces de *Dickeya*.

En outre, les espèces *D. dadantii* et *D. solani* sont connues pour leur grande production d'enzymes pectinolytiques, en plus d'autres facteurs de virulence.

Ces observations sont confirmées par un certain nombre d'auteurs. Ainsi selon Woltrers et Collins en 1994, les souches de *Dickeya* et *Pc* sont beaucoup plus agressives par rapport aux souches de *Pa*. Par ailleurs, une étude réalisée par Marquez-Villavicencio et

Charkowski, (2011) a démontré la virulence de deux souches *Pc* et *Pa* sur 9 variétés de pommes de terre ont conclut que la souche *Pc* est toujours plus agressive que *Pa*.

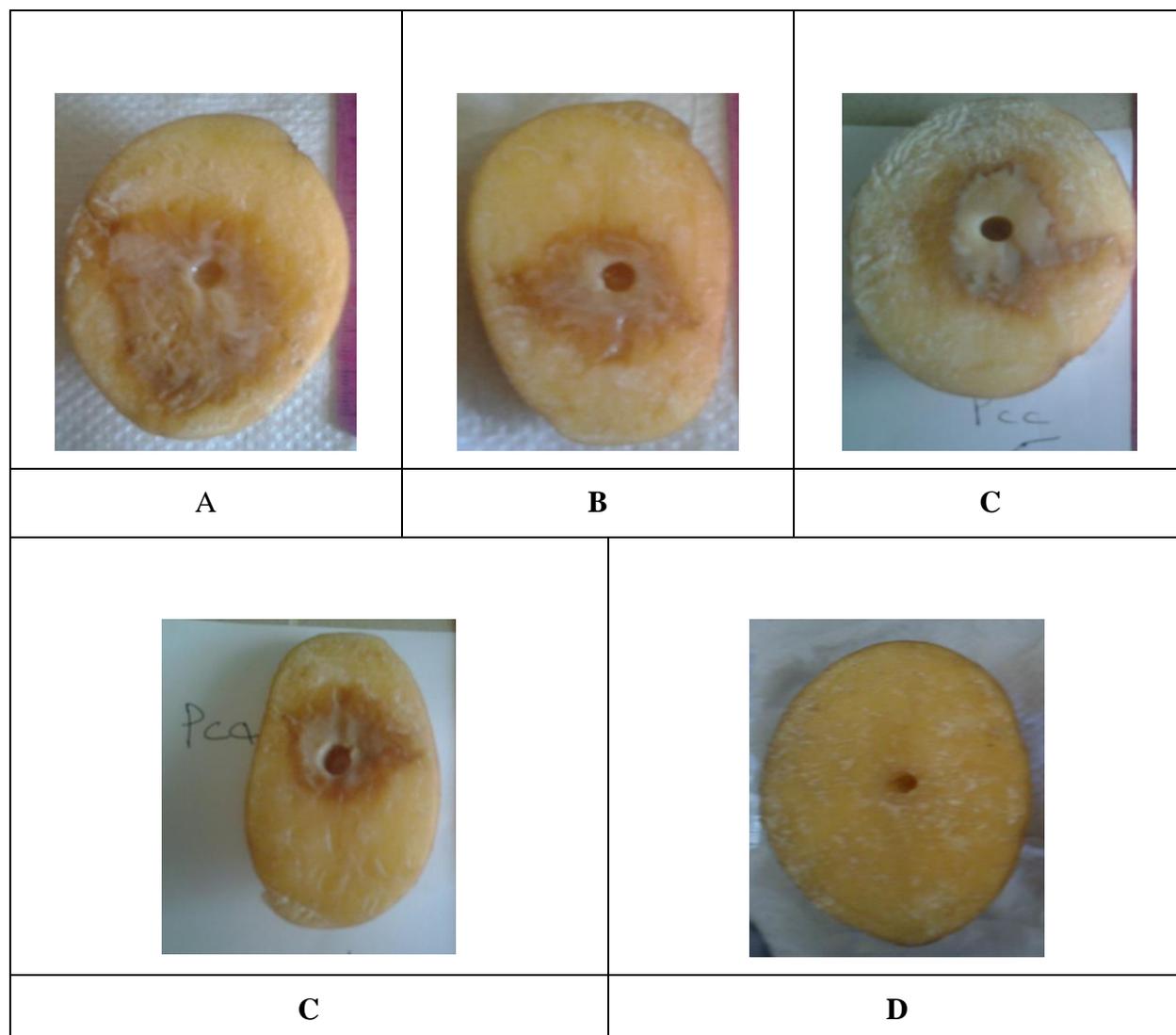


Figure 9: symptômes de pourriture molle sur demi- tubercules de pomme de terre, **A** : *Ds*, **B** : *Dd*, **C** : *Pcc*, **D** : *Pca*, **E** : témoin

Par ailleurs, la pourriture molle a induit une exsudation, et une fuite d'eau, ainsi selon Van Vaerenbergh en 2012, Un tubercule atteint perd environs 100 à 200 ml de liquide. En se basant sur cet aspect, une autre approche du test d'inoculation, consiste à mesurer quotidiennement le poids des demi-tubercules et des carottes au fur et à mesure de la propagation de l'infection.

Après 24 heures d'incubation on remarque que le poids des demi-tubercules augmente pour les quatre souches, et ceci s'explique par la production d'enzymes de

macération (pectinases) induisant une dégradation du substrat, engendrant une masse élevée de tissus pourris et libérant ainsi une quantité d'eau qui contribue à l'augmentation du poids des demi-tubercules.

Cependant, après 48h d'incubation, on observe une diminution des poids, et cette régression continue jusqu'au dernier jour d'infection, elle est due à la perte d'eau qui est expulsée à l'extérieur des cellules végétales. La diminution des poids est d'autant plus accentuée chez les souches de *Dickeya* que pour les *Pectobacterium* (figures N° 10 et 11).

Cette réduction de poids peut aussi s'expliquer par la diminution de la quantité d'enzymes pectinolytiques synthétisées au cours du temps. Ainsi, Parthiban et al en 2012 ont testé l'effet de quatre différentes pectinases produites par l'espèce *carotovorum* sur 9 cultivars de pommes de terre, et on conclut que les quantités d'enzymes diminuent notamment au cours du 5^{ème} et dernier jour d'incubation, ce qui occasionne des symptômes réduits.

La diminution des poids des tubercules est également due à l'activation des réactions de défense végétale au cours du temps. En effet, après 24 à 48h d'infection, des mécanismes de résistance se mettent en place, limitant la progression du pathogène, et réduisant par la même occasion, les masses des tissus macérés.

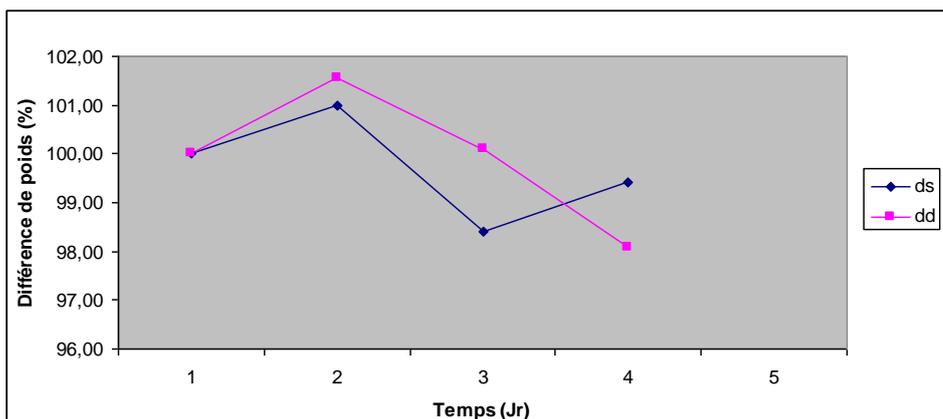


Figure 10 : Différence de poids des demi-tubercules infectés par *Dickeya*

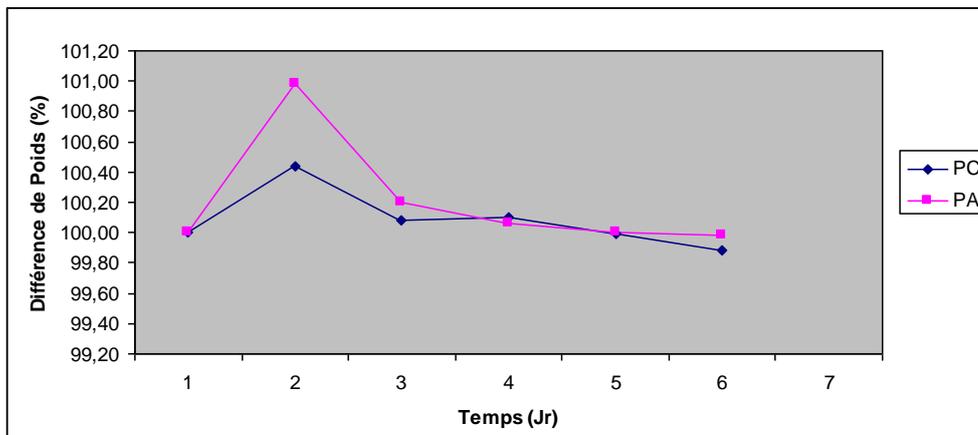


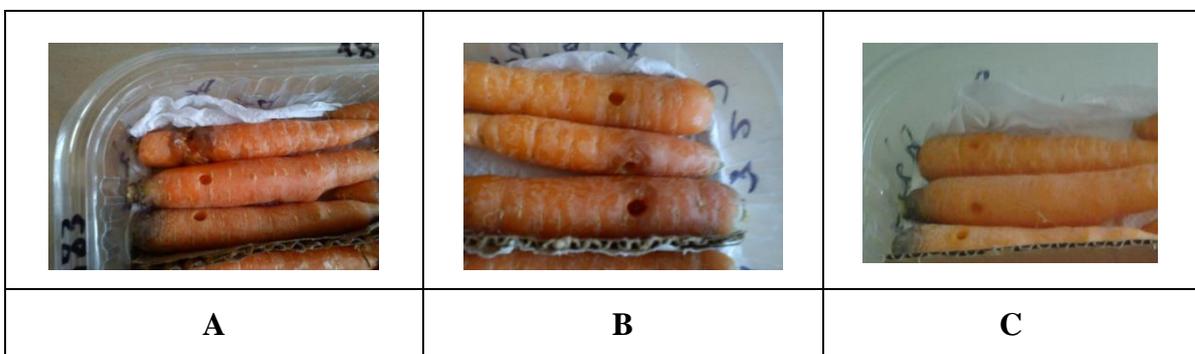
Figure 11 : Différence de poids des demi-tubercules infectés par *Pectobacterium*

III-2- Pathogénicité sur les carottes

Sur les carottes, les souches inoculées ont engendré des symptômes de macération plus circonscis, avec une pourriture brune clair autour du site d’infection. Cependant, la propagation de la macération est plus importante sur carottes que sur pommes de terre favorisée par la forme cylindrique, ainsi que la surface plus réduite des carottes (figure 12).

Ces données sont confirmées par Rukshima et Siddiqui (2013), qui ont testé la virulence de l’espèce *atrosepticum* sur carottes, et qui ont décrit les mêmes types de symptômes.

Par ailleurs, comme pour les pommes de terre, ce sont les souches de *Dickeya* et en particuliers *D. solani* qui ont induit les quantités de tissus macérés. Alors que *P. atrosepticum* est la moins virulente



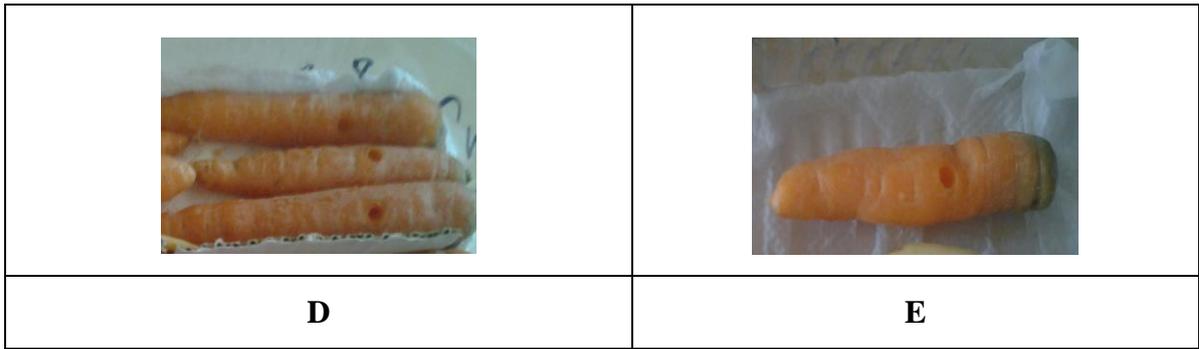


Figure 12 : symptômes de pourriture molle sur les carottes, **A** : *Ds*, **B** : *Dd*, **C** : *Pc*, **D** : *Pa*, **E** : témoin

Pour les mesures des poids des carottes après incubation, on est arrivé aux mêmes constats que sur pommes de terre, à savoir que les souches de *Dickeya* sp (espèce solani) ont enregistré le plus grand écart de poids comparé aux espèces de *Pectobacterium*.

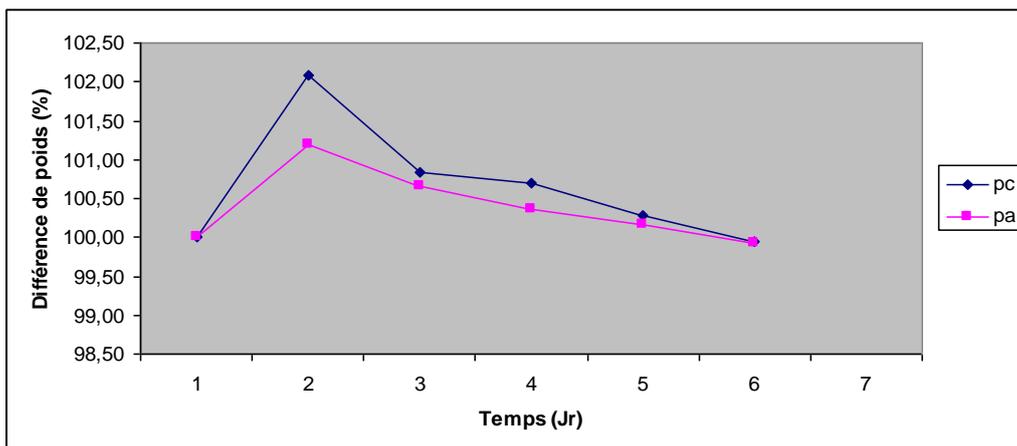


Figure 13 : Différence de poids des carottes infectées par *Pectobacterium*

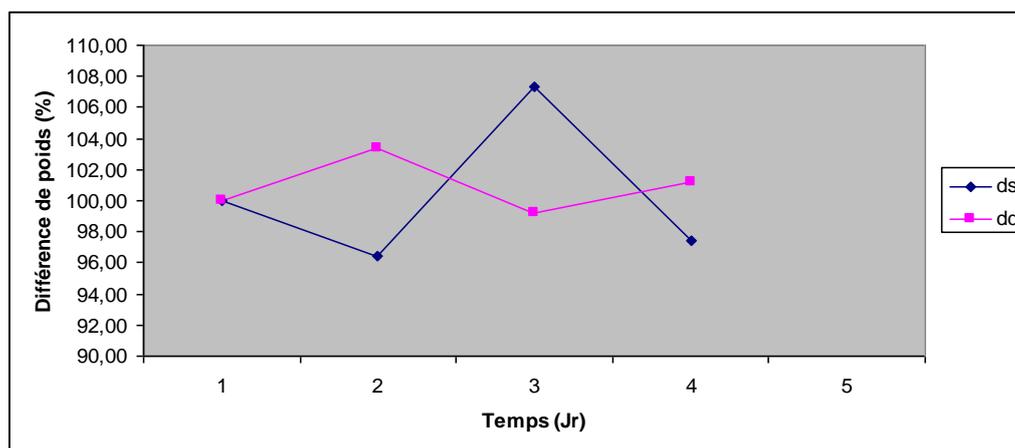


Figure 14 : Différence de poids des carottes infectées par *Dickeya*

VIII) Extraction/dosage des phytoalexines

Le dosage des suspensions bactériennes de *Dickeya* et *Pectobacterium* à partir des pomme de terre et des carottes, à une absorbance de 600 nm nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans les figures 15 et 16.

Ainsi, on constate que c'est justement les souches *atrosepticum* pourtant les moins virulentes, et ayant induit des symptômes réduits sur les deux échantillons qui présentent les concentrations les plus élevées, tandis que les espèces *solani* et *dadantii* qui sont plus virulentes et qui produisent plus de pectinases, ont montré une densité inférieure. Une exception est faite pour *P. carotovorum* qui présente les taux de populations les plus bas sur pommes de terre.

Ces résultats suggèrent que la pathogénicité de ces bactéries *pectinolytiques* ne dépend pas de la concentration de population bactérienne, mais de la quantité d'enzymes produites, ainsi que de la nature de l'hôte infecté. Ces observations sont confirmées par Ishi (1976) et Corbaz (1990) qui ont démontré que l'activité enzymatique est plus question de l'environnement et de l'interaction plante-pathogène que du pathogène lui-même.

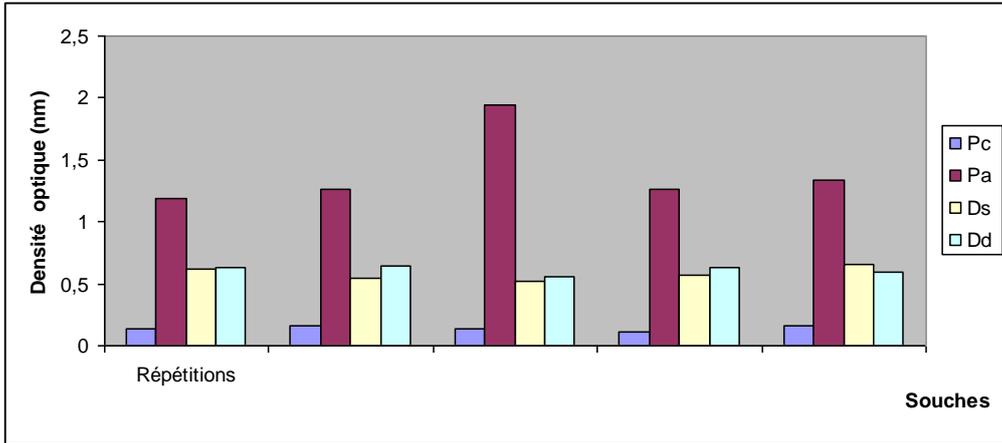


Figure 15: densité des souches sur tubercules de pommes de terre

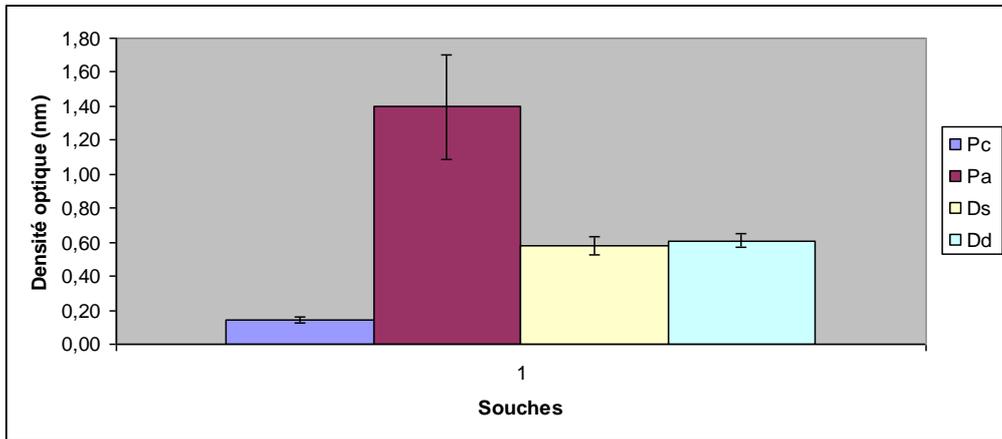


Figure 16: densité des souches sur tubercules de pommes de terre (moyenne)

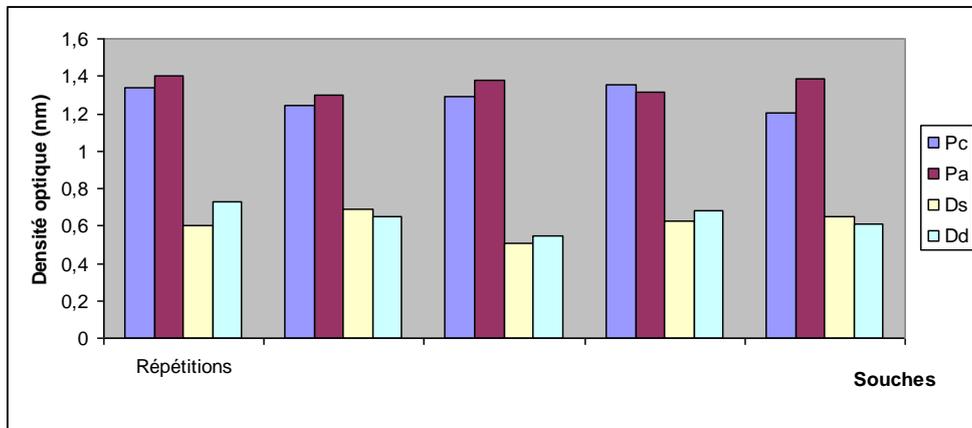


Figure 17 : densité des souches sur carottes

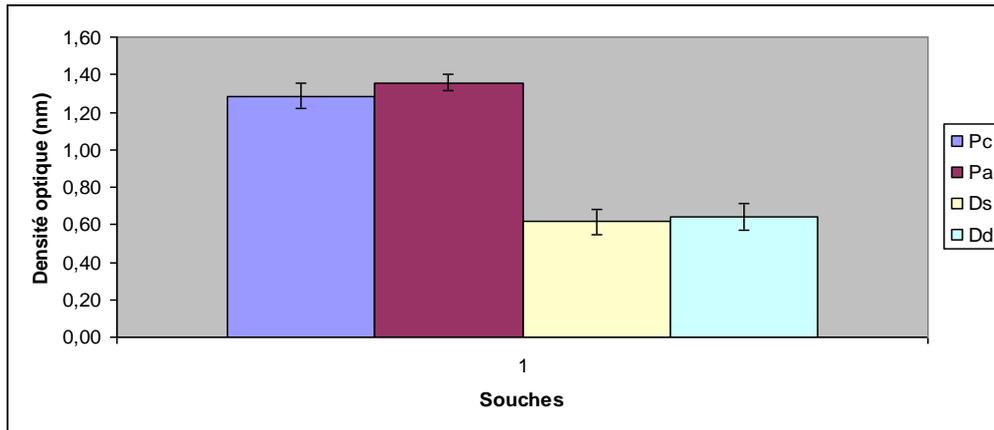


Figure 18: densité des souches sur carottes (moyenne)

Le dosage des phytoalexines est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 270 nm dans le spectre UV, ceci est dû à la nature terpénique de ces composés. En effet, la nature et la structures des phytoalexines induites dépendent plus des tissus de l'hôte et non du pathogène inducteur. Ainsi, beaucoup de travaux ont conclu que la plupart des molécules phytoalexines produites par la pomme de terre après stress biotique ou abiotique sont des terpénoïdes, plus précisément des sesquiterpènes comme la rishitine, phytuberine, phytuberol et lubimine (Shih *et al.*, 1973 ; Henfling, *et al.*, 1977 ; Ghanekar *et al.*, 1984 ; Brooks et Watson, 1989).

Les taux de phytoalexines dosés sont donnés dans les figures suivantes :

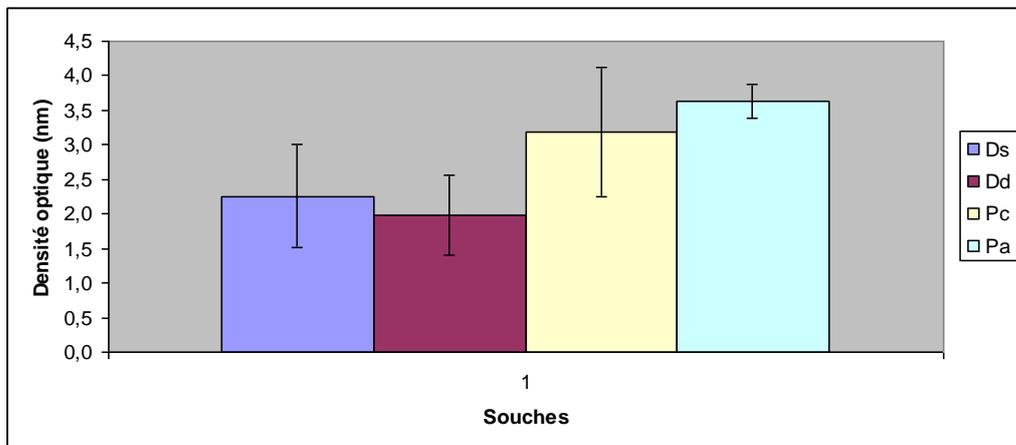


Figure 19: Teneurs en phytoalexines sur les tissus de pommes de terre

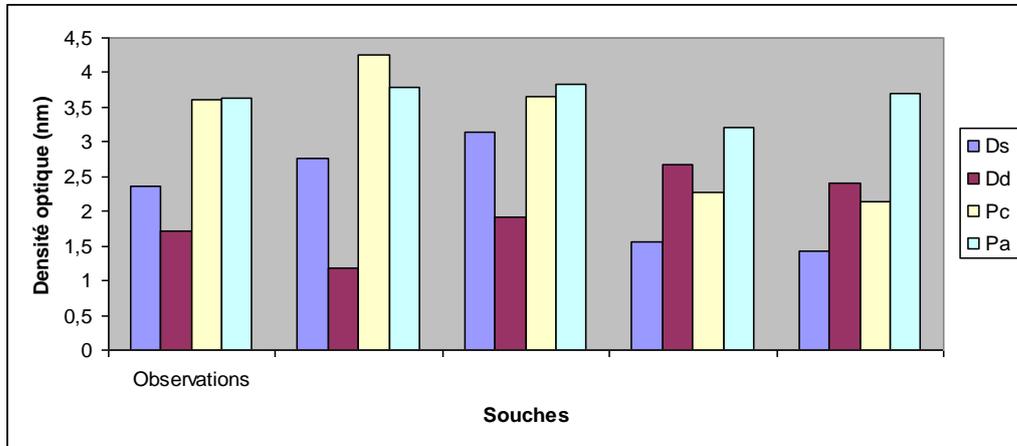


Figure 20: Teneurs en phytoalexines sur les tissus de pommes de terre (moyenne)

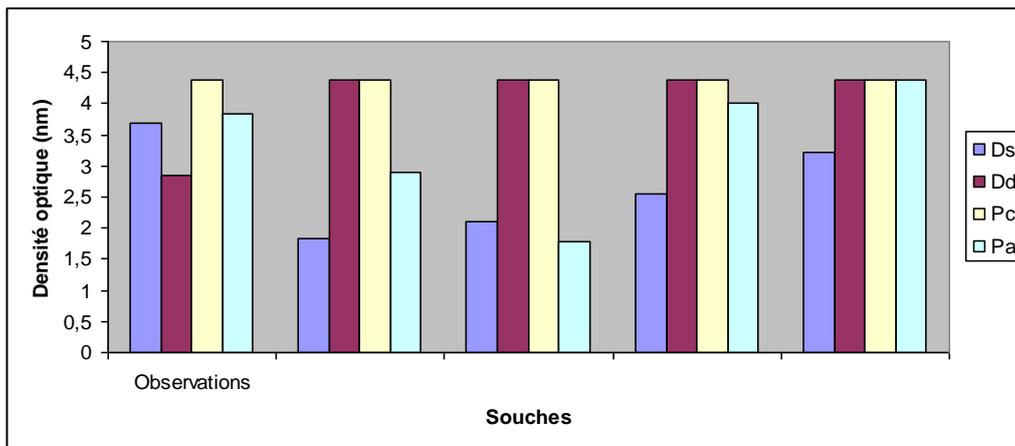


Figure 21: Teneurs en phytoalexines sur les tissus de carottes

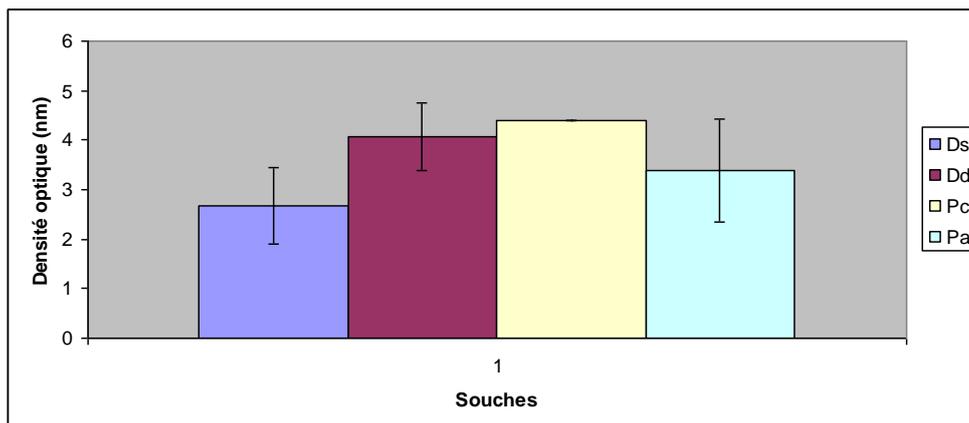


Figure 22: Teneurs en phytoalexines sur les tissus de carottes (moyenne)

Les résultats du dosage indiquent clairement que les tissus infectés par les souches du genre *Pectobacterium* ont enregistré les taux les plus élevés en phytoalexines, Alors que les espèces *Dickeya dadantii* et *solani* sont de faible inducteurs, ceci peut être expliqué par le pouvoir antimicrobien des phytoalexines qui ont réduit la progression des pathogènes et limité l'étendue des zones macérées. Ainsi les teneurs élevées de ces métabolites ont contribué à la résistance à la fois des tubercules et des carottes, vis-à-vis de ces germes. Par ailleurs, les faibles quantités de phytoalexines induites par les *Dickeya* sont principalement dues à la virulence élevée de ces dernières.

Nos résultats sont en conformités avec les études réalisées par Kuc (1972), Hammerschmidt en 1999 ; et Bokshi et Jobling (2000).

Conclusion

Conclusion

La pomme de terre étant la cible privilégiée de nombreux pathogènes, Et dans le but de limiter l'impact des espèces *Pectobacterium/Dickeya* sur cette culture, une meilleure maîtrise de l'interaction pathogène-hôte est indispensable.

Au terme de notre étude, nous sommes en mesure d'attester du haut degré d'infection des souches de notre collection, et en particulier, les espèces du genre *Dickeya* sp (*solani* et *dadantii*), qui ont induit de sévères symptômes de pourriture à la fois sur tubercules et sur carottes, les souches *Pectobacterium atrosepticum* et *cartovororum* étant moyennement virulentes. Il ressort clairement que, les tubercules de pommes de terre sont plus sensibles à l'action de ces pathogènes.

D'autres parts, les mesures quotidiennes des différences de poids des tissus pourris au cours de l'infection pourrait s'avérer un test d'inoculation assez fiable vu sa bonne corrélation avec les autres mesures d'infection comme le calcul de la masse des tissus macérés et les volumes de pourritures.

Par ailleurs, on a aussi mis en évidence la relation existant entre pathogénicité et concentration d'inoculum, ainsi il a été prouvé que l'intensité de symptômes de pourritures dépendent plus de l'activité enzymatique que de la densité bactérienne.

Enfin, concernant le rôle des métabolites secondaires, dans la limitation de la virulence bactérienne, il a été constaté que, après extraction et dosage des phytoalexines induites, la sévérité de la maladie est potentiellement restreinte. En effet, les concentrations les plus élevées en phytoalexines sont observées chez les tissus les moins affectés, notamment ceux inoculés par les *Pectobacterium*.

Pour terminer, nous souhaiterions que pour les travaux ultérieurs, certains aspects soient mis en évidence, notamment :

- ✓ La caractérisation et fractionnement des différentes classes de phytoalexines ;
- ✓ La quantification/dosage d'autres métabolites secondaires, avec optimisation des conditions d'extraction ;
- ✓ Utilisation d'échantillons végétaux, autres que la pomme de terre et les carottes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Bahi , W. M. Lapointe et C. Beaulieu (2005) : Lutte biologique contre la pourriture molle de la pomme de terre provoquée par *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* à l'aide des bactériophages.

Centre Sève, Université de Sherbrooke, Sherbrooke(Québec), Canada J1K 2R1

Bailey, J. A. (1980): "Constitutive elicitors from *Phaseollus vulgaris*; a possible cause of phytoalexin accumulation."

Annual Review of Phytopathology. 12.

Banks, E. (2008): Factors influencing potato emergence.

Retrieved from <http://www.omafra.org>. (Consulté le 15 Mars 2009).

Barkai-Golan, R. (2001): Host protection and defense mechanisms.

In: Postharvest diseases of fruits and Vegetables, chapters 6, 6-93, 1st edition 442p.

Bartz, L. A., Locascio, S. J. & Weingartner, D. P. (1992): calcium and potassium fertilisation of potatoes grown in north Florida. 11: effect in the bacteria soft rot potential in tubers.

American Potato journal 69: 39-50

Bell, A., Muck, O. and Schuler, B. (2000): Les richesses du sol: les plantes à racines et tubercules en Afrique, une contribution au développement des technologies de récoltes et d'après-récolte.

German Foundation for International Development, 330 p.

Benhamou, N. et Karine Picard, K. (2000) : La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes

PHYTOPROTECTION 80 : 137-168.

Bouteau. H (2009): Réactions de défense de la plante aux micro-organismes

Cook, R.J., Baker, K.F.(1983): the nature and practice of biological control of plant pathogen.

Ed. Americ. Phytopathol. 539p.

Corbaz, J. (1991) : Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes.

Presses phytotechnique et universitaires, Romands, p 224- 205

Darasse, A., Kotoujansky, A. and Bertheau, Y. (1993): Isolation by genomic subtraction of Dna probes specific of *Erwinia carotovora subsp. Atroseptica*.

Applied and Environmental Microbiology 60: 298- 306.

De Boer,S.H., and Ward, L.J. (1995): PCR detection of *Erwinia carotovora subsp.atroseptica* associated with potato tissue

Phytopathology 85: 854-858.

Degefu, Y., Jokela, S., Tokola, E-J. and virtanen, E. (2006): DNA based detection of blackleg and soft rot disease causing *Erwinia* strains in seed potatoes. Phytopathology 69: 324-329.

D'hondt-Defrancq,M. (1984) : Les principales maladies bactériennes et cryptogamiques de la pomme de terre.

préparé a l'occasion du Cours International sur la culture de la Pomme de Terre. Cambrène

Dunez, J., Bompeix, G., and Friting, B. (1991): Les mécanismes de défense des plantes.

Dans les dossiers de l'INRA, Les relation Plante- Microorganismes (INRA, Paris), 20p

Durand, J.C. (1834) : Pomme de terre, considérations sur les propriétés médicamenteuse, nutritives et chimiques de cette plante.1-40p.

Dye, D. W. (1968): A taxonomic study of the genus *Erwinia*.

I.The “ amylovora” group. *New Zealand Journal of Science* 11: 590-607.

Elphinstone, J. G. & Pérombelon, M. C. M. (1986): Contamination of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading.

Plant pathology 35: 25-33.

Gallois, A., Samson, R. Ageron, E., and Grimont, P.A.D. (1992): *Erwinia carotovora* subsp. *Odorifera* subsp.nov., associated with odorous soft rot of chicory (*Cichorium intybus* L.).

International Journal of Systematic Bacteriology 42: 582-588

Gans, P. T., Jellis, J., Little, J. G., Logan, C. & Wastie, R. L. (1991) : A comparison of methods to evaluate the susceptibility of potato cultivars to Blackleg in the field at different sites.

Plant Pathology 40: 238- 248.

Gnanamanickam, S. S. and J. W. Mansfield.(1981): "Selective toxicity of wyerone and other phytoalexins to gram positive bacteria." *Phytochemistry*. 20: 997-1000.

Göhre, V., Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46:189-215.

Gomez-Gomez L and Boller T. (2002):Flagellin perception : a paradigm for innate immunity.

Trends Plant Sci, 7: 251-256

Gravouelle J.M., (1996) : Utilisation pour l'alimentation humaine In Rousselle R, Robert Y.,Crosnier J.C,

éd. *La pomme de terre*, Paris: INRA éditions, p. 451-498.

Grison, C. (1983) : Conservation de La pomme de terre, caractéristiques et qualités alimentaires, Apria Edition, 292 p.

Gurib-Fakim, A. (2006) : Medicinal plants; Traditions of yesterday and drugs of tomorrow.

Molecular Aspects of Medicine 27: 1-93

Grisebach, H., P. Moesta and M. G. Hahn. (1986): "Radioimmunoassay for a soybean phytoalexin." *Immunology in Plant Sciences*. H.F. Linskens and Jackson ed. Springer-Verlag. Berlin-London.

Harris, R. I. (1979): Chemical control of bacteria soft rot of wounded potato tubers. *Potato research* 22: 245-249

Hasegawa, H., Chatterjee, A., Cui, and chatterjee, A. K. (2005): Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* strain EC 153 to plants and stimulates production of the quorum-sensing signal, N-acyl homoserine lactone, and extracellular proteins.

Applied and environmental Microbiology 71: 4655- 4663.

Hélais, V. (1999): Mise au point d'outils de caractérisation et de détection d'*Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* agent de la jambe noire et de la pourriture molle de pomme de

terre. Application à l'étude de la transmission de la bactérie, via la plante. Thèse de doctorat, Rennes, France, 190p.

Hélias, V. (2008) : *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre :

nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie.

Cahiers Agricultures vol. 17, N° 4, p 353

Hélias, V., Andrivon, D. and Jouan, B. (2000): Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* under field conditions and influence of their effects on the yield of individual potato plants.

Plant pathology 49: 23-32

Hélais, V., Croizat, F. and Montfort, F. (2005) : Evaluation of a new polypectate formulation for isolation of soft rot *Pectobacterium* on CVP medium.

European Association for Potato Research, Bilbao 17-22.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

9th edition Williams & Wilkins, 787 p.

Hyman, L., J., Toth, I. K. and Pérombelon, M. C. M. (1998): Isolation and identification section 6, 66-77. In: Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual.

Jaynes, A. Xanthopoulos, K. Destefano Beltran, G. L. & Dodds, J.H. (1978): Increasing bacterial disease resistance in plants using antibacterial genes from insects.

Bioassays 6: 263-270

Kamysz W., Krolicka A., Bogucka K., Ossowski T., Lukasiak J., Lojkowska E. (2005):

Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic *Pectobacterium*

species.

Journal of Phytopathology **153**, 313-7.

Kaplan, D. T., N. T. Keen and I. J. Thomason (1980): "Studies on the mode of action of glyceollin in soybean incompatibility to the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*." *Physiological Plant Pathology*. 16: 319-325.

Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B. (1987): Biological function of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J*, 6: 3209-3212.

Keen, N. T. (1989): "Phytoalexins and their elicitors." *Microbes and Microbial Products as Herbicides*.

Hoagland, R.E. ed. American Chemical Society. Washington DC.

Kloepper, JW. (1983): Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers.

Phytopathology; 73 : 217-9.

Lacroix, Cet Vézina, L. (2003) : test biochimiques classiques pour l'identification des *Pectobacterium* (*Erwinia pectinolytica*) et des *Pseudomonas fluorescents*.

Laboratoire de diagnostic en phytoprotection pour la détection et l'identification des bactéries phytopathogènes.

Ladjouzi, R. (2007) : Recherche et identification des *Pectobacterium*, agents de la pourriture molle sur différentes plantes hôtes : pommes de terre, tomates et carottes.

Mémoires magister, université de Béjaia, Algérie 74p.

Lepoivre, P. (2003) : Phytopathologie.

Les presses agronomiques de Gembloux, Ed. de Boeck, 244-300p

Liao, C-H. and Shollenberger, L.M. (2004): Enumeration, resuscitation and infectivity of the sublethally injured *Erwinia* cells induced by mild acid treatment.

Phytopathology 94: 76- 81.

Lyon. G. D. (1980): ."Evidence that the toxic effect of rishitin may be due to membrane damage."

Journal of Experimental Biology. 31: 957-966,

Madamanchi, N. R. and Kuc, J. (1983). Induced systemic resistance in plants. In *The Fungal*

Spore and disease Initiation in Plant and animals.

edited by G. T. Cole and H. C. Hoch. New York: Plenum.

Mansfield J.W. (1983) : Antimicrobial compounds.

In: Biochemical Plant Pathology (Callow J.A., ed.). John Wiley & Son, Chichester, pp. 237-265

Molina, J.J & Harrisson, M. D. (1977): the rol of *Erwinia carotovora* in the epidemiology of potato blackleg 1. Relationship of *E.carotovora var. carotovora* and *E. carotovora var. atroseptica* to potato blackleg in Colorado.

American potato journal 54: 587- 791

Mompon B., Lemaire B., Mengal P. et Surbled M. (1996) : extraction des polyphenols du laboratoire à production industrielle.

Ed. INRA. In : « Polyphenols 96: 31-43.

Montesano, M. (2002): Molecular characterization of plant defense responses to *Erwinia carotovora*.

Academic Dissertation, University of Helsinki 60p.

O'Neill, R. and Logan, C. (1975): A comparison of various selective isolation media for their efficiency in the diagnosis and enumeration of soft rot coliform bacteria.

Journal of Applied Bacteriology 39: 139- 146.

Parker, J.E. (2003). Plant recognition of microbial patterns.

Trends Plant Sci. 8(6):245-247.

Pérombelon, M.C.M. and Kelman, A. (1980): Ecology of the soft rot *Erwinias*.

Annual Review of phytopathology 18: 361-87.

Pérombelon, M.C.M. and Salmond, G.P.C. (1995): Bacterial soft rots. In Pathogenesis and host specificity in plant disease.

Edited by U.S. Singh, R.P. Singh, and K. Kohmoto. Vol. I. Pergamon

University of Oxford, U.K. I pp 1–20.

Platt, B. (2008) : Maladies de la pomme de terre causées par des oomycètes.

Cahiers Agricultures vol 17, N° 4 : 363-365.

Platt, H.W., Peters, R.D., Medina, M. et al,(1999): Impact of seed potatoes infected with *Phytophthora infestans* (US-1 or US-8 genotypes) on crop growth and disease risk.

Am J Potato Res 76: 67-73.

Robereau-Gayon P. (1968): metabolism des végétaux: physiologie et biochimie.

Ed. Dunod, 292p

Priou,S.et Jouan, B. (1996): Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. In *La pomme de terre*. Edited by P. Rousselle, Y. Robert, and J.C. Crosnier. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. pp. 260-265.

Radtke, W. et Rieckmann, W. (1991) : Maladies et ravageurs de la pomme de terre.
Editions Th.Mann. Gelsenkirchen-Buer: 16-82.

Rossignol,L. et Rousselle-Bougeois, F. (1996) : la Pomme de terre : botanique, morphologie et taxonomie.
Eds.La pomme de terre, Paris :INRA éditions, p. 49-55.

Rouxel, T.(1989) : Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes.
INRA, Station de pathologie végétale.

Sepulchre, A, Reverchon , S. & Nasser, W (2006): Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium
Journal of Theoretical Biology 244 : 777-257

Sharga, B . M. and 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.

Thordal-Christensen, H. (2003): Fresh insights into processes of nonhost resistance.
Curr. Opin. Plant Biol. 6(4):351-357.

VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E. (1994): Letter to the editor.

Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus “phytoanticipins.”

Plant Cell 6, 1191-1192.

Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defenselated proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44:135-162

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

Potato Research 37: 143-149.

Xu G.-W., Gross D.C. (1986): Field evaluations of the interactions among fluorescent pseudomonads, *Erwinia carotovora* and potato yields.

Phytopathology 76, 423-30.

Yaganza E-S., Rioux, D., Simard, M. (2004) : Ultra structural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite.

Applied Environmental Microbiology 70: 6800-6808.

Yahiaoui-Zaidi, R. (2004): Contribution à l'étude des *Erwinia* pectinolytiques isolées chez *Solanum tuberosum* L. en Algérie.

Thèse Doctorat, Université de Sétif, Algérie, 1, 4, 29p.

Yoshikawa M, Yamauchi K, Masago H.(1978): Glyceollin: its role in restricting fungal growth in resistant soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma* var *sojae*. *Physiol. Plant Pathol.* 12:73–82

Annexes

ANNEXE 1

Figure 1 : Principales variétés de la pomme de terre (FAO; 2008)



1. Atahualpa Cultivée au Pérou, rendement élevé, convient cuite au four ou frite



2. Nicola Variété hollandaise courante, savoureuse bouillie ou en salade



3. Russet Burbank Un classique américain, excellente cuite au four et pour les frites



4. Lapin puikula Cultivée en Finlande, dans des champs baignés par le soleil de minuit



5. Yukon Gold Variété canadienne, chair jaune et crémeuse, convient frite, bouillie



6. Tubira Cultivée en Afrique de l'Ouest. Chair blanche, peau rose, bon rendement



7. Vitelotte Variété française, prisée des gourmets, peau bleu foncé et chair violette



8. Royal Jersey De Jersey, c'est le seul légume anglais doté d'une appellation d'origine de l'UE



9. Kipfler Originaire d'Allemagne, forme allongée, chair crème, bonne en salade



10. Papa colorada

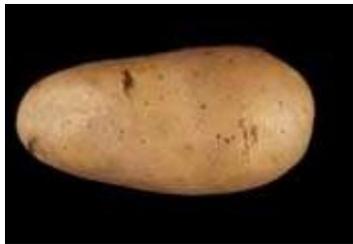
Introduite aux îles Canaries en 1567 par des bateaux espagnols de passage



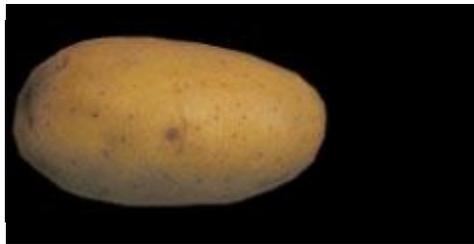
11. Maris Bard Cultivée au R.-U., chair blanche, texture douce et ferme, convient pour bouillir



12. Désirée Peau rouge, chair jaune, saveur caractéristique



13. Spunta Variété commerciale, convient pour bouillir et rôtir



14. Mondial Variété hollandaise à la peau lisse. A consommer bouillie ou en purée



15. Inconnu Une des 5 000 variétés encore cultivées dans les Andes

Tableau 1 : Maladies de la pomme de terre

(Radtke & Rieckman., 1991)

Agents pathogène	Nom des maladies	Espèce responsable	Symptômes engendrés
BACTERIES	Gale commune	<i>Streptomyes scabies</i>	Taches ou croutes subéreuses, brune Nécrose sur les racines, pustules sur le tubercule
	Pourriture molle	<i>Erwinia carotovora</i>	Pourriture molle sur tiges et tubercules
	Jambe noire	<i>Erwinia carotovora</i> Var. <i>atrospectica</i> , <i>E.chrysanthemi</i>	Lésion noire et visqueuse Les feuilles s'enroulent, jaunissent et finalement flétrissement
	Le flétrissement bactérien ou pourriture annulaire	<i>Corynbacterium sepedonicum</i>	Décoloration ou déformation de la partie basse de la tige. Feuilles panachées de jaune, tout en restant vertes Nécroses brun clair sur le bord des folioles. Pourriture vasculaire des tubercules jaunâtre à brune
	La bactériose vasculaire ou pourriture brune	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Flétrissement et jaunissement des feuilles, nécrose et le dépérissement de la plante. Pourriture annulaire des tiges et

	Virus A	PVA	Mosaïque des clair, gaufnage des folioles
	Virus X	PVX	Feuilles déformées avec des taches claires en mosaïque, décoloration des nervures
	Virus M	PVM	Décoloration des nervures des folioles apicaux ; enroulement des folioles terminales

Tableau 2: Les principaux ravageurs de la pomme de terre (Soltner 1998)

Nom de la maladie	Espèce responsable	Symptômes engendrés
DORYPHORE	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	- Feuilles dévorées
NEMATODES DORES DE LA POMME DE TERRE :	<i>Heterodera rostochiensis</i>	- Plantes rabougrie, - Racines peu développées et fourchues, - Les radicelles portent les nématodes (boules lanches) - Tubercules de petites tailles
PUCERONS	<i>Myzus persicae</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Aphis frangulae</i>	- Petites taches sur les feuilles - Feuilles pales et enroulées
TAUPINS	plusieurs espèces d'Agriotes	- Galeries étroites de 1 à 2mm dans les tubercules
VERS BLANS	Larve du Hanneton, <i>Melolontha melolontha</i>	- Galeries larges, tapissées de fils soyeux, et refermant des excréments noirâtres

figure3 : exemples des métabolites secondaires synthétisé par la plante et leur effet sur l'homme

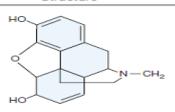
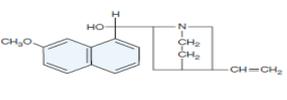
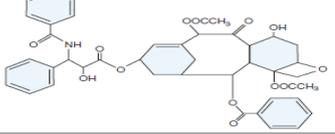
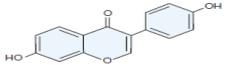
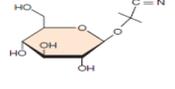
Composé	Source	Structure	Effet sur l'homme
Morphine (alcaloïde)	 Pavot somnifère <i>Papaver somniferum</i>		Antalgique
Quinine (alcaloïde)	 Ecorce de quinquina <i>Cinchona officinalis</i>		Médicament antipaludique
Taxol (terpénoïde)	 If du Pacifique <i>Taxus brevifolia</i>		Médicament anticancéreux
Génistéine (phyto-œstrogène)	 Soja <i>Glycine max</i>		Effets proches de ceux des œstrogènes
Manihotoxine (glycoside cyanogène)	 Manioc <i>Manihot esculenta</i>		Effet létal du cyanure libéré

Tableau 4: Les différentes classes des protéines PR (d'après Van Loon et Van Strien,1999).

Family	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	unknown
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco "R"	chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	thaumatin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P _{6g}	endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase type III
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	peroxidase
PR-10	Parsley "PR1"	"ribonuclease-like"
PR-11	Tobacco class V chitinase	chitinase type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	thionin
PR-14	Barley LTP4	lipid-transfer protein

Tableau 5 : Composition chimique moyenne de la pomme de terre
(Yaganza, 2005)

Composant	Proportion (% de matière sèche)
Matière sèche	22.5
Fibres brutes	2-8
Amidon	60-80
Sucres réducteurs	0.1-2
Saccharose	0.5-1.5
Azote total	1.2
Azote protéique	0.5-1
Acide citrique	0.5-7
Acide ascorbique (vitamine C)	0.092
Niacine (vitamine B3)	0.01
Thiamine (vitamine B1)	0.78 (mg/100g)
Riboflavine (vitamine B2)	0.12 (mg/100g)
Cendres	4-6
Calcium	0.019
Magnésium	0.084
Potassium	1.47
sodium	0.022

ANNEXE 2

I) Milieu gélosés pour la culture et la conservation des *Pectobacterium/ Dickeya*

Milieu King B (pH 7,2):

Composition	Par litre
Peptone (source de carbone et d'azote)	20g
K ₂ HPO ₄ (tampon)	1,145g
MgSO ₄ (source pour les enzymes)	1,5g (7H ₂ O)
Glycérol (pour la conservation)	15ml
Agar (support)	15g à 20g
Eau distillée	1000ml

Bouillon LP (Levure Peptone)

Composition	Par litre
Peptone	5g
L'extrait de levure	3g
Eau distillée	1000ml

Bouillon nutritif

Composition	Par litre
Bouillon nutritif	15g
Eau distillée	1000ml

Milieu LB (Luria Bertani) (pH 7,2)

Composition	Par litre
Tryptone	15g
Extrait de levure	5g
Nacl	5g

Milieu LPA (Levure Peptone Agar) (pH 7,2)

Composition	Par litre
Peptone	5g
L'extrait de levure	3g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

II) Milieux utilisés pour l'identification biochimique des *Erwinia* pectinolytiques

Milieu de sutton (pH 7,2)

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

pH 7.2 (bleu)

répartir 3ml /tube

autoclaver à 30°C, 30min

L'ensemencement des tubes se fait en piquant le milieu Sutton à l'aide d'une anse de platine après prélèvement d'un peu de culture bactérienne.

Lecture du test

Une réaction positif se traduit par un jaunissement du milieu en 24h, suivi de liquéfaction.

III) Milieu de différenciation des sous-espèces d'*Erwinia carotovora*

Milieu SRS

Mise en évidence d'une production de substances réductrices du saccharose pour donner glucose et galactose (Dye, 1968)

Composition	Par litre
Bactopeptone	10g
Extrait de bœuf	5g
Saccharose	40g
Eau distillée	1000ml

pH7.2

autoclaver à 120°C, 20min

Lecture de test

La révélation des sucres réducteurs est faite en ajoutant 2ml de réactif de Benedict.

Plonger les tubes dans un bain marie bouillant et suivre le changement de couleur. L'apparition d'une couleur jaune-orange met en évidence la présence de sucres réducteurs du saccharose.

Réactif de benedict

Solution A :

$C_6H_5Na_3O_7, 2H_2O$	173g
$Na_2CO_3, 10H_2O$	269.6g
Eau distillée	800ml

Dissoudre en chauffant, filtrer si nécessaire., Compléter à 850ml

Solution B :

$CuSO_4, 5H_2O$	173g
Eau distillée	100ml

Verser la solution B dans A en agitant. Compléter à 1litre.

Milieu inuline

Mise en évidence de l'utilisation de l'inuline (Gallois et all, 1992)

Composition	Par litre
$(NH_4)_2SO_4$	2g
Extrait de levure	0,5g
Tryptone	1g
Rouge de phénol	0.18g

Inuline	3g
Eau distillée	1000ml

pH 7- 7.2

autoclaver à 120°C, 20min

Répartir 2ml /tube

Lecteur du test

L'hydrolyse de l'inuline est visualisée par le virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune.

Milieu α -méthylglucoside

Mise en évidence de l'utilisation de l' α -méthylglucoside

Composition	Par litre
Peptone	10g
NaCl	5g
α-méthylglucoside	10g
Bleu de bromothymol à 0.5%	6ml
Eau distillée	1000ml

pH 7-

vert)

autoclaver à 110°C, 30min

Répartir 2ml/tube

Lecture de test

L'utilisation de **α -méthylglucoside** provoque une acidification du milieu pour donner une couleur jaune.

7.2 (bleu-

Résumé

Les bactéries *pectinolytiques* appartenant aux espèces *P.carotovorum*, *P. atrosepticum*, *D. dadantii* et *D. solani* sont responsables des dégâts important engendrant la jambe noire au champ et la pourriture molle lors le stockage. Les méthodes de control employées jusqu'ici ne visent pas à une élimination complète du pathogène mais en le réduisant seulement et devant l'échec des méthodes chimique, il devient impératif de développer et de mettre au point des méthodes et des procédés de diagnostic et d'identification de ces pathogènes. Dans ce contexte, on assiste de plus en plus à l'apparition d'alternatives naturelles et des recherches de physiopathologie sur les mécanismes de défense de la pomme de terre contre les différents pathogènes sont en voie d'extension. Les résultats de pathogénicité réalisés sur demi-tubercule et sur carotte, ont montré une différence dans la réponse de ces pathogènes vis-à-vis de ces différents hôtes. Les deux sous espèces *dickeya* s'avère être la plus virulente, que les espèces *Pectopacterium*. Notre étude est réalisé afin d'évaluer le comportement des pommes de terre ainsi que des carottes vis-à-vis de souches *Pectobacterium/ Dickeya*. Les résultats illustrent que la synthèse des phytoalexines augmentent quand le nombre des cellules de l'agent pathogène augmente aussi.

Mots clefs : Erwinia pectinolytique, pomme de terre, pourriture molle, extraction des phytoalexine, identification biochimique

Abstarct

Pectinolytic bacteria belong to *P.carotovorum*, *P. atrosepticum*, *D. dadantii* and *D. solani* strains is responsible for significant damage causing blackleg field and soft rot during storage. The control methods used so far are not aimed at the complete elimination of the pathogen but by reducing and at the failure of chemical methods only, it becomes imperative to develop and develop methods and methods of diagnosis and identification of these pathogenes. In this context, there is more to the development and research of natural alternatives pathophysiology of the defense mechanisms of the potato against different pathogens is being extended. The results of pathogenicity performed on half-tuber and carrot showed a difference in the response of these pathogens vis-à-vis these different hosts. Both subspecies *Dickeya* proves to be the most virulent species that *Pectopacterium*. Our study is conducted to evaluate the behavior of potatoes and carrots vis-à-vis *Pectobacterium / Dickeya* strains. The resaults show that the synthesis of phytoalexins increase when the number of cells of the pathogen also increases.

Keywords: pectinolytic Erwinia, potato soft rot, extraction phytoalexin, biochemical identification