

République Algérienne Démocratique et Populaire.

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire de Fin de Cycle

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Option : Biochimie appliquée

Thème

**Etude de l'effet antibactérien de l'extrait des feuilles de
Melia azedarach sur quelques souches *Erwinia***

Présenté par :

BAKDI Lynda (epse SAIDI)

Devant le Jury :

Président : Dr KHETTAL B. (M.C.B)

Promoteur : M^{me} AMROUCHE W. (M.A.A)

Examineurs M^r BOUGUEZZA Y. (M.A.A)

M^r TACHERFIOUT M. (M.A.B)

Année universitaire : 2011/2012

Remerciment

Au terme de ce modeste travail ; Mes remerciements ainsi ma profonde foi sont portés à mon Dieu le tout puissant qui m'a donné le courage, la force et la patience.

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

Je remercie également le Dr Khettal Bachra pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury et Mr Tacherfouit.M et Mr Bouguezza.Y qui ont accepté d'examiner mon travail. Et c'est un grand honneur pour moi d'être leur étudiante au long des années passées. Sans oublier Mr Bribri et M^{elle} Boubellouta pour leurs aides et leurs conseil.

Un grand merci à Mr Amrouche. F et les techniciens du laboratoire de microbiologie, biophysique et d'enzymologie pour leurs aides et leurs conseils.

Dedicasse

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, qui m'ont soutenu et m'ont guidé vers la bonne voie et surtout pour le grand amour qu'ils m'ont offert depuis mon enfance

À mon mari chéri Chouaib, qui a fait preuve d'être patient avec moi et qui m'a comblé d'amour

À ma future fille qui viendra à la vie après 3mois si dieu le veut, qui a partagé avec moi tous mes émotions aux long de la réalisation de ce travail ; que dieu me la garde

À mes chers frères et sœurs qui ont été un bon exemple pour moi et à tous mes neveux et nièces,

À ma belle famille, surtout Sayfeddine

À mes oncles et tantes et leurs familles,

À mes chères copines que je considère comme mes sœurs et à tous les gens que j'aime

« Que dieu les garde tous pour moi »

Liste des abréviations

CCM : Chromatographie sur couche mince

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO: Densité optique

BN: Bouillon nutritif

***Pcc**: Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*

***Pca**: Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum*

***Dk**: Dickeya spp.*

***M.Azedarach**: Melia Azedarach*

R_d : Rendement massique

R_f : Rapport frontale

MH : Muller Hinton

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Photographie descriptive de la bactérie du genre <i>Erwinia</i>	3
2	Schéma descriptif de l'interaction entre <i>Pectobacterium chrysanthemi</i> et la plante hôte.	9
3	Schéma représentant les différents déterminants de pouvoir pathogène d' <i>erwinia</i> pectinolitique	11
4	Schéma descriptif des enzymes pectinolytiques.	13
5	Symptôme de la pourriture molle de la pomme de terre.	15
6	Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne.	16
7	Photographie de <i>Melia azedarach</i> , (a) : vue globale de l'arbre, (b) : fruits, (c) : feuilles, (d) : fleures.	21
8	Les parties constituant de <i>Melia azedarach</i> qui ont des propriétés biologiques.	22
9	Photographie des feuilles de <i>Melia azedarach</i>	29
10	Protocole suivi pour l'extraction des feuilles de <i>Melia Azédarach</i>	31
11	Profil chromatographique de l'extrait des feuilles de <i>Melia Azedarach</i>	37
12	Résultats du l'étude de l'effet de l'extrait de <i>Melia azedarach</i> sur les <i>pectobacterium</i> dans les boîtes de petri, (A): avec Pcc, (B): avec Pca, (C): avec Dk	39

Liste des tableaux

N°		Page
I	Caractérisation physiologique et biochimique de souches <i>d'Erwinia Carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> obtenues à partir de Betteraves présentant des symptômes de pourriture molle.	5
II	Tests biochimiques et culturaux pour distinguer les <i>Erwinia</i> pectinolytiques	7
III	Signaux végétaux utilisés par <i>Erwinia</i> associées aux plantes, Ce tableau présente divers exemples de signaux végétaux identifiés <i>Erwinia</i> . Dans chaque cas, sont indiqués les régulateurs correspondants ainsi que les cibles et phénotypes impliqués dans l'interaction avec la plante régulés par ces signaux.	12
IV	Classification de <i>Melia azedarach</i> .	20
V	Préparations à base des feuilles de <i>M. Azédarach</i> pour traiter différentes maladies de peau.	24
VI	Résultats de la ccm	37
VII	Résultat des testes sur l'activité antibactérienne de Malia Azédarach sur les souches in vitro.	40

Sommaire

Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	<i>I</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>II</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>III</i>

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

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les *pectobacterium*

I.1 .Définition et description.....	02
I.2.Classification	03
I.2. 1. <i>Pectobacterium carotovorum subsp atrosepticum</i>	05
I.2.2. <i>Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum</i>	06
I.2.3. <i>Dickeya spp</i>	06
I.3.Mécanisme principal de la pathogénie.....	07
I.3.1. Différents facteurs de virulence.....	07
I.3.1.1.Facteurs de virulence précoces.....	09
I.3.1.2. Facteurs de virulence enzymatiques	12
I.3.2.Cas de pourriture molle du tubercule : (« soft-rot »)	14
I.4.moyens de lutte contre ces maladies.....	15
I.4.1. Lutte chimique	16
I.4.2.Lutte génétique	16
I.4.3.Lutte biologique	16

Sommaire

Chapitre II : Généralité sur *Melia azedarach*

II.1. Définition.....	17
II.2. taxonomie.....	17
II.3. Description botanique, biologique et écologique.....	18
II.4. Composition chimique de la plante.....	19
II .5. Intérêts et propriétés biologiques.....	20
II.5.1. Activité pharmacologique.....	21
II.5.2. Activité pesticide	23
II.5.3. Activité antiviral.....	24
II.5.4. Activité antimicrobienne	24
II.5.5. Autres propriétés.....	24
II.6. Toxicité de la plante.....	25
II.6.1. Molécules responsables de la toxicité de la plante.....	25

Partie pratique

Chqpitre III : Matériels et méthodes

III.1. Matériel végétal.....	26
III.1.1 Préparation de la poudre végétale.....	26
III.2. Matériel bactérien.....	26
III.3 Extraction	27
III.3.1 procédé d'extractions	27

Sommaire

III.4 Analyse par chromatographie sur couche mince	28
III.4.1 Principe.....	28
III.4.2 CCM sur gel.....	29
III.4.3 dépôt de l'échantillon	29
III.5 Dosage des polyphénols.....	30
III.5.1 Principe	30
III.5.2 Méthode	30
III.6 dosage des flavonoïdes.....	30
III.6.1 principe.....	30
III.6.2 Méthode.....	30
III.7 Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait des feuilles de <i>Melia azedarach</i>	31
III.7.1 Les souches bactériennes.....	31
III.7.2 Déroulement du test.....	31
III.7.2.1 Revivication des souches bactériennes.....	31
III.7.2.2 Préparation de l'inoculum standard bactérien.....	31
III.7.2.3 Test antibactérien.....	32
III.7.2.3.1 principe.....	32
III.7.2.3.2 Description de la méthode.....	32

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1 Rendement d'extraction.....	33
----------------------------------	----

Sommaire

IV.2 Chromatographie sur CCM.....	33
IV.3-Dosage des polyphénols.....	35
IV.4-Dosage des flavonoïdes.....	35
IV.5 Activité antibactérienne de l'extrait des feuilles de <i>Melia azedarach</i> sur les souches pectobacterium	36
<i>Conclusion</i>	39
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexe</i>	

Introduction

Introduction

Plusieurs cultures dans les champs, subissent des dommages liées aux ravageurs et aux maladies (Snaiki et *al.*, 2006). Ces maladies augmentent le coût des cultures, diminuent le rendement et la qualité des récoltes, et induisent des pertes économiques considérables, ainsi qu'une dégradation de l'environnement par l'utilisation excessive des produits chimiques comme alternatifs de lutte (Rahmoune; 2009).

Les bactéries *Erwinia Carotovora* et *Dickeya.spp* est parmi les agents pathogènes les plus fréquents des cultures (Ochsenbein et *al.*, 2007). Elles sont à redouter a cause des dégâts qu'elles peuvent provoquer, en végétation et en conservation; elles s'attaquent à une grande variété de plantes dont les carottes, les tomates, les oignons et les pommes de terre. Elles sont responsables de la maladie de la jambe noire et de la pourriture molle (Hélias, 2008).

Les dégâts et pertes économiques causés par les *Pectobacteria* peuvent être chiffrés en plusieurs millions d'euros, que ce soit sur le territoire national ou pour d'autres pays. Aujourd'hui le développement de recherches multidisciplinaires visant à protéger du mieux possible les cultures et de trouver des moyens de lutte efficaces et écologiques. Pour cela, les chercheurs ont eu recours à l'utilisation de plantes médicinales, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels doués d'un très large éventail d'activités biologiques (Zeghad, 2009).

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à étudier *Melia azedarach* qui est connue pour sa qualité phytosanitaire et ces propriétés biologique diversifiées (Hajaniaina, 1996).

Cette étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanoliques des feuilles de *Melia azedarach* sur les souches bactériennes pectinolitiques *Erwinia* responsables de la pourriture molle des cultures. Notamment, celle de la pomme de terre.

Le manuscrit est organisé en deux parties :

1. La synthèse bibliographique qui est constituée de deux chapitres :

- Généralités sur le genre *pectobacterium*.
- Généralités sur *Melia azedarach*.
-

2. La partie expérimentale qui est basée sur l'extraction des feuilles de *M. azedarach*, leur analyse par chromatographie sur couche mince puis de l'étude de leur effet antibactérien sur les trois souches de bactérie pectinolytique (*Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum* et *Dickeya.spp* in vitro.

Chapitre I
Généralités Sur Les Pectobacterium

I. Généralités sur les *Pectobacterium*

De nombreux types de bactéries sont associés à des plantes hôtes et profitent de cette association pour assurer leur nutrition en carbone et autres substances nutritives (Wlodarczyk, 2010). Il s'agit de bactéries appartenant aux genres *Clavibacter*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*, et *Streptomyces*. Parmi ces derniers, un regain d'intérêt est accordé aux bactéries macergènes appartenant au genre *Pectobacterium* ; plus connues sous le nom d'*Erwinia carotovora* (Latour et al., 2008).

Au cours des années passées, une augmentation de maladies dues aux bactéries *Erwinia* a été constatée. Les causes sont les suivantes : un éventail plus large des espèces d'*Erwinia* avec un comportement plus agressif, le réchauffement climatique et la rationalisation dans la culture (Rahmoune, 2009). Les bactéries se multiplient de façon explosive. Elles produisent assez d'enzymes pour dissoudre les parois cellulaires des tubercules et des pousses permettant ainsi à la maladie de s'installer (Ochsenbein et al., 2007).

I.1 .Définition et description

Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum, *Pectobacterium carotovorum subsp. Atrosepticum* et *Pectobacterium chrysanthemi* ont une large distribution géographique et sont des agents phytopathogènes ayant un impact économique important (Yahiaoui-Zaidi et al., 2009).



Figure1: La bactérie du genre *Erwinia* (Latour et al., 2008).

Les bactéries du genre *Erwinia* appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. Elles sont douées d'activité pectinolytique et se présentent sous forme de bâtonnets, généralement disposés par deux, sont Gram négatives, anaérobies facultatives, non sporulantes (Snaiki et al., 2006). Elles sont mobiles grâce à des flagelles péritriches (Anonyme, 2002),

Les *Erwinia* pectinolitiques sont des pathogènes de nombreux fruits et légumes (carotte, betterave, navet, tomate, pomme de terre ; ...); Elles sont associées aux végétaux en tant que saprophytes ou pathogènes. (Anonyme, 2002) et elles peuvent entraîner l'apparition de symptômes, même lorsqu'elles sont présentes en quantité réduite : la chlorose, le flétrissement, pourriture molle, jambe noire, la dessiccation et la mort de la plante (Latour et al., 2008).

I.2. Classification

Le genre *Erwinia*, nommé en 1920 en honneur du phytopathologiste Erwin F. Smith, réunissait les entérobactéries pathogènes des plantes (Włodarczyk, 2010).

La taxonomie du genre *Erwinia* et la nomenclature de ce genre ont été compliquées par l'hétérogénéité des souches incluses dans ce taxon (Starr et Mandel, 1969).

L'analyse d'une collection de souches d'*Erwinia* spp. associant des techniques moléculaires, phénotypiques et sérologiques ainsi que les analyses phylogénétiques ont conduit les auteurs à distinguer clairement *Erwinia carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*. Les bactéries pathogènes de la pomme de terre appartiennent dorénavant à deux genres différents. *E. carotovora* s'appelle *Pectobacterium* et *E. chrysanthemi* devient *Dickeya* spp. (Hélias, 2008).

En 2005, l'utilisation du test ELISA direct (méthode sandwich) a permis l'identification des bactéries *Erwinia carotovora* et *E. chrysanthemi* (Snaiki et al., 2006).

Les tests chimiques constituent une approche classique, mais particulièrement utile, pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces de bactéries phytopathogènes (Snaiki et al., 2006).

Au cours des dernières années ; Trois types d'*Erwinia* ont été reclassés et rebaptisés. Selon le type, les plants ont une importance différente. La distinction des

agents pathogènes nécessite fréquemment un diagnostic au laboratoire (Ochsenbein et al, 2007) :

1.2. 1.Pectobacterium carotovorum subsp atrosepticum

P. atrosepticum appelée aussi *Erwinia carotovora subsp. Atroseptica*, est généralement associée au symptôme de la jambe noire de la pomme de terre dans les régions tempérées. Elle se développe préférentiellement entre 15 et 25 °C, entraînant des pourritures des tubercules et des tiges. En climat tempéré, la bactérie a pour hôte principal la pomme de terre, bien que des souches ont été occasionnellement isolées de tomates, de choux chinois et de poivrons. Des isollements de cette bactérie ont également été réalisés à partir de choux et navets malades cultivés à proximité de cultures de pomme de terre affectées par la jambe noire en Ecosse. L'association préférentielle de *P. atrosepticum* à la pomme de terre peut être expliquée en termes de concordance entre les exigences écologiques de la bactérie et celles de cette culture (Helias, 2008).

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques correspondant à *Erwinia carotovora subsp. Carotovora* sont présentées sur le Tableau I (Snaiki et al., 2006).

Tableau I: Caractérisation physiologique et biochimique de souches d'*Erwinia Carotovora* subsp.*carotovora* obtenues à partir de Betteraves présentant des symptômes de pourriture molle.

Caractères	
Type respiratoire	Anaérobie facultative
Glucose	+
Catalase	+
Lactose	+
Gaz	+
H ₂ S	-
ONPG	+
Citrate	-
Indole	-
Urée	-
Rouge de Méthyle	-
Mobilité	+
Coagulation du lait	+
Utilisation du saccharose	+
Hydrolyse de la gélatine	+

1.2.2. Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum

P. carotovorum, ou *Erwinia carotovorum subsp. Carotovorum*, pathogène de la pomme de terre, est distribué dans une aire géographique étendue, aussi bien dans les zones tempérées que tropicales et sur une gamme d'hôtes très large (Helias, 2008).

Sur la pomme de terre, la bactérie s'exprime préférentiellement à des températures plus élevées que *P. atrosepticum*, allant de 20 à 30 °C. Le symptôme de jambe noire, connu comme étant caractéristique de *P. atrosepticum* en conditions fraîches, peut également être provoqué par *P.c. subsp. Carotovorum* lorsque les températures sont élevées (30-35 °C). Identifié aux États-Unis dans les années 1970, *P.c. subsp. Carotovorum* a été identifié plus récemment à partir de tels symptômes en Europe. *P.c.subsp. carotovorum* est par ailleurs

souvent l'agent associé aux pourritures aériennes des tiges probablement du fait de sa prédominance dans le sol, l'eau de pluie, les insectes et les aérosols. De même *P.c. subsp. Carotovorum* est majoritairement associé aux pourritures sur tubercules (Helias, 2008).

1.2. 3. Dickeya spp.

Erwinia chrysanthemi est une bactérie phytopathogène à large spectre d'hôtes. En effet, elle peut infecter de multiples plantes, mono- ou dicotylédones. Citons parmi d'autres la pomme de terre, l'endive, la pastèque, le concombre, le riz, le maïs, ananas, tomate, artichaut ou le chrysanthème et sur certaines plantes ornementales comme les dahlias, freesia, iris, kalanchoe ou œillet (Lallemand, 2010).

L'augmentation de l'incidence des *Dickeya* dans les cultures de pomme de terre est probablement liée aux températures estivales élevées ces dernières années. La diversité observée chez des souches de *Dickeya* isolée récemment en zones tempérées pourrait amener à identifier en zones tempérées de nouvelles espèces de *Dickeya* sur cet hôte (Helias, 2008)

Les bactéries se logent dans les blessures ou lenticelles de la plante hôte où elles peuvent rester en dormance (Pérombelon, 2002). Elles peuvent également survivre dans le sol, infectant la culture suivante aux champs. Le développement de la maladie atteint sa vitesse maximale à des températures de 25°C à 30°C mais sa distribution mondiale suggère une adaptation des bactéries (Pérombelon, 2002).

Des tests biochimiques et culturels ont été réalisés pour distinguer entre les trois souches pectinolytiques et les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau II : tests biochimiques et culturels pour distinguer les *Erwinia* pectinolytiques (Pérombelon, 2002).

Tests	Oxydase	Catalase	Oxydation/ Fermentation	Pectinase	α Méthyl- glucoside	Sucrose	Production d'indole	Croissance à 35°C
<i>Erwinia</i>								
<i>Erwinia caratovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Erwinia caratovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-	+	+	+	-	-	+	+

I.3.Mécanisme principal de la pathogénie

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

I.3.1. Différents facteurs de virulence

La mise en place d'un processus infectieux, régie par différentes étapes clés permettant au micro-organisme de coloniser son hôte. Il doit pouvoir survivre dans l'hôte, s'y multiplier et y causer des dommages. Pour ce faire, il doit être compétitif vis-à-vis des bactéries commensales, neutraliser les mécanismes de défense de l'hôte, et y assurer sa propagation. Une partie de ces propriétés est conférée par les facteurs de virulence (Wassenaar et Gaastre, 2001).

Avant d'initier une infection, les *Pectobacterium* se comportent comme des bactéries saprophytes dans le sol et l'eau. Elles peuvent pénétrer dans les plantes par l'intermédiaire des ouvertures naturelles (les stomates ou lenticelles), et artificielles (les blessures), ou elles peuvent alors rester latente ou proliférer. Par ailleurs, certaines bactéries peuvent résider dans les espaces intracellulaires, parfois pendant plusieurs mois, dans un état de quiescence (Rahmoune, 2009).

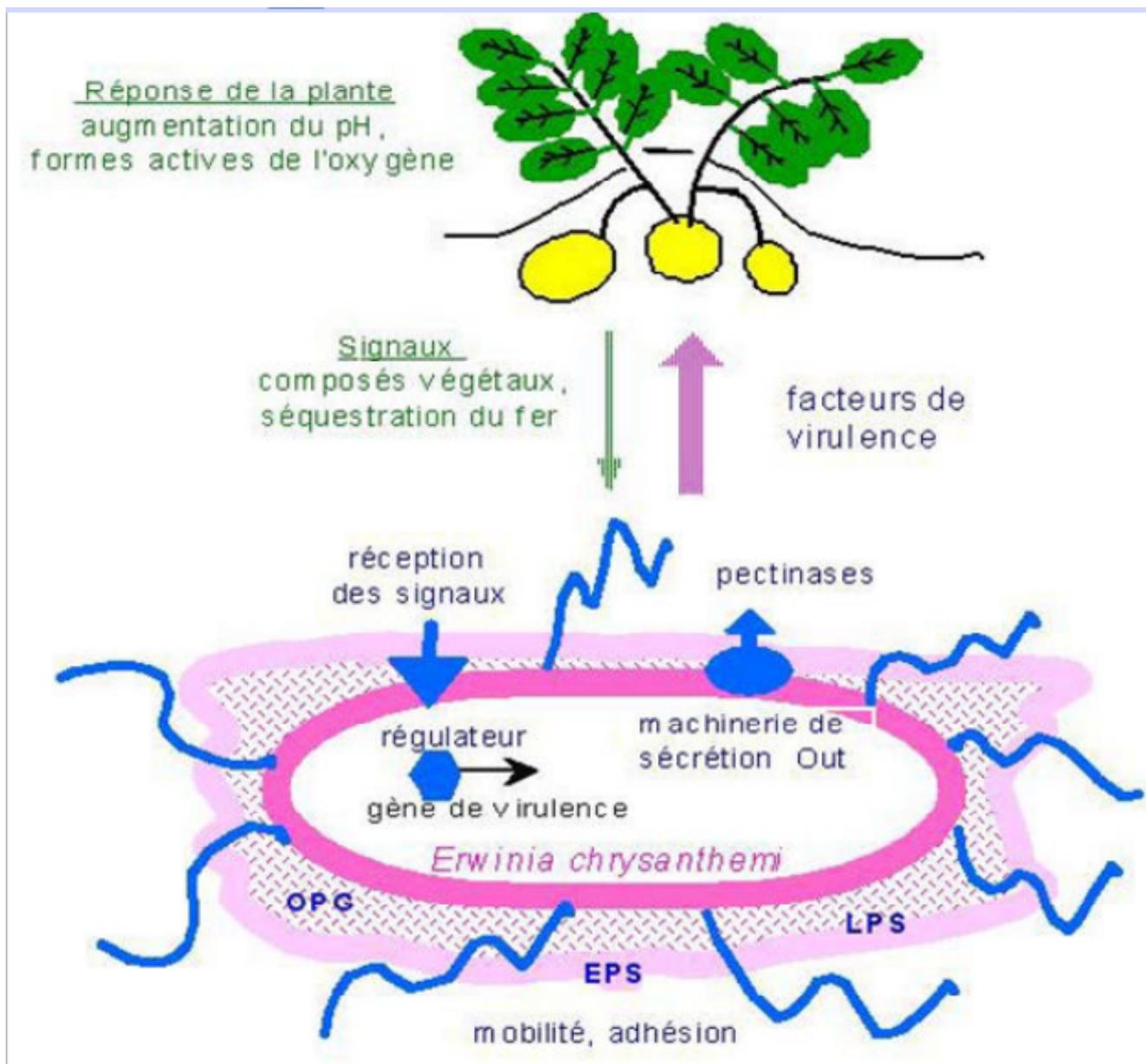


Figure2 : Interaction entre *Pectobacterium chrysanthemi* et la plante hôte (Sepulchre et al., 2007).

I.3.1.1. Facteurs de virulence précoces

Ils interviennent au début du processus infectieux et permettent aux microorganismes d'entrer en contact avec l'hôte, de s'y établir pour s'y multiplier.

1. La mobilité : grâce au flagelle qui est constitué de trois parties : le filament flagellaire, le crochet et le corps basal (Aizawa et *al.*, 2000), la bactérie se déplace dans le sol à la recherche d'une plante hôte et d'y pénétrer (Lautier, 2007) et de rejoindre sa niche écologique pour y adhérer (Mulholland et *al.*, 1993). Les flagelles peuvent également servir d'appendices adhésifs au début de la phase de colonisation de l'hôte (Josenhans et Suerbaum, 2002).

2. L'adhérence : le premier stade de l'infection passe par une étape d'adhésion de la bactérie à la surface de la plante qui implique des structures de surface telles que les lipopolysaccharides (LPS), les exo-polysaccharides (EPS) et l'adhésine (Lautier, 2007).

L'adhésion bactérienne requiert des interactions fortes et hautement spécifiques avec un ligand moléculaire situé sur la surface de la cellule hôte. La nature de ces facteurs conditionnent la spécificité (espèces cibles) et le tropisme (tissus cibles) (Lautier, 2007)

3. Les harpines : les harpines sont des protéines thermostables sécrétées dans le milieu extérieur par les bactéries phytopathogènes. Il a été démontré que la présence d'harpines perturbe les échanges ioniques des cellules végétales avec le milieu extérieur (EL-Maarouf et *al.*, 2001), et provoque l'inhibition rapide de la synthèse de l'ATP (Xie et Chen, 2000), ce qui conduit à une alcalinisation du milieu intracellulaire initialement acide, modification bénéfique pour la bactérie pathogène (Hoyos et *al.*, 1996).

4. Les sidérophores : la chrysobactine et l'achrombactine permettraient d'entrer en compétition avec les cellules végétales pour l'assimilation du fer. La chrysobactine a beaucoup plus d'affinité pour le fer, et sa synthèse est nécessaire lorsque la carence en fer est très sévère (Expert, 1999).

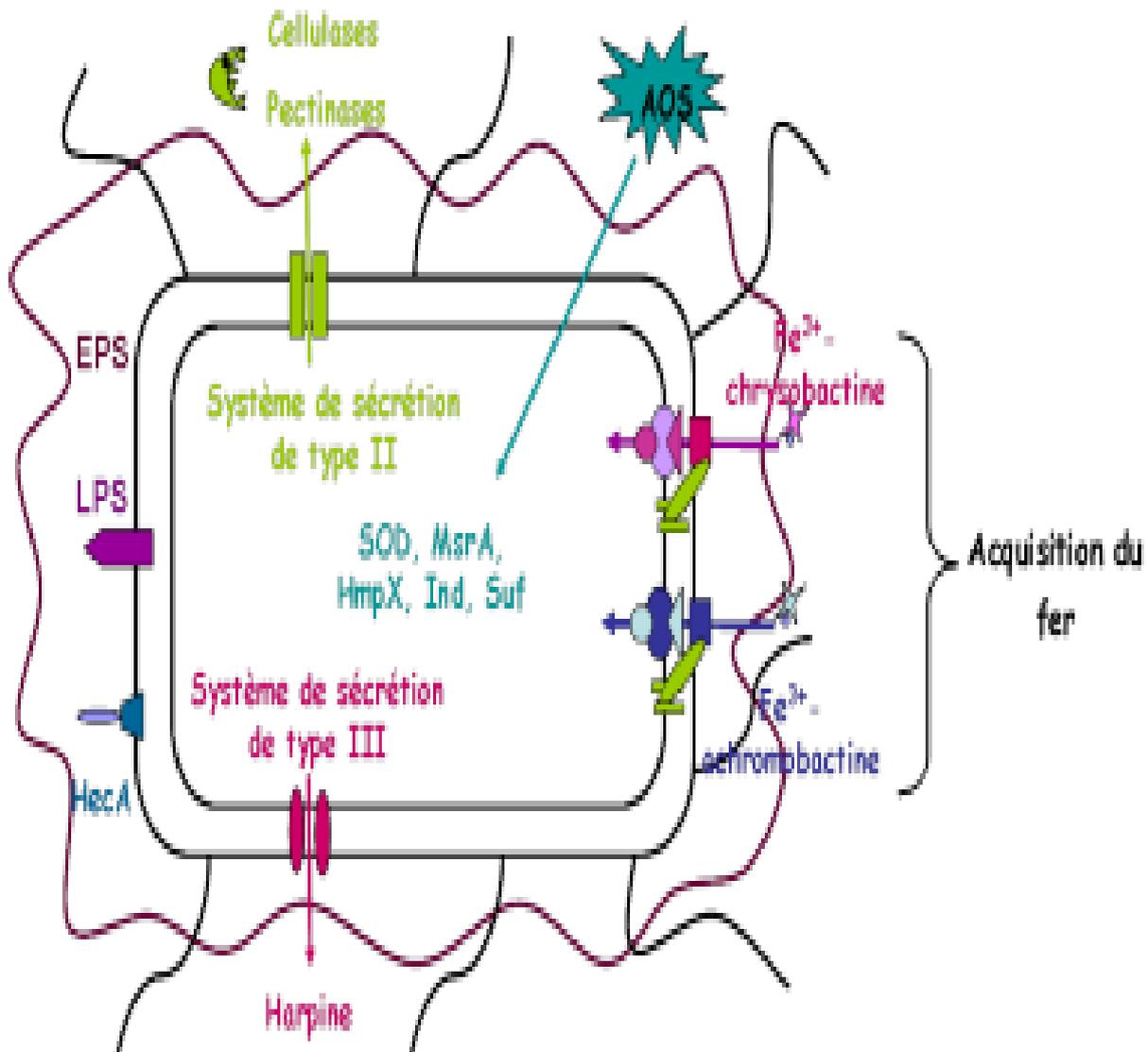


Figure3: schéma représentant les différents déterminants de pouvoir pathogène d'*erwinia pectinolitica*.

Les événements de contamination sont basés sur la reconnaissance de signaux moléculaires spécifiques des plantes. La détection de ces divers signaux par les bactéries est donc un processus qui réajuste en continu la réponse bactérienne lors de l'interaction. Dans de nombreux cas, en plus de protéines régulatrices spécifiques, des régulateurs globaux peuvent jouer un rôle important dans l'ajustement du métabolisme bactérien aux conditions de l'interaction (Wlodarczyk, 2010).

Le tableau suivant présente divers exemples de signaux végétaux identifiés par *Ewinia*. Dans chaque cas, sont indiqués les régulateurs correspondants ainsi que les cibles et

phénotypes impliqués dans l'interaction avec la plante régulées par ces signaux (Wlodarczyk, 2010).

Tableau III: Signaux végétaux utilisés par *Erwinia* associées aux plantes (Wlodarczyk, 2010).

Bactérie	Signal végétal	Régulateur(s)	Famille du régulateur	Opéron(s) cible	Phénotypes regales
<i>Erwinia Chrysanthemi</i>	métabolites de la pectine (DKI, DKII, KDG)	KdgR	Famille lclR	pel, pem, out,ogl, kduDI, kdgKA	Catabolisme de la pectin
	?	PecS	Famille MarR	peh, pel, cel, fli	pectate-lyases, mobilité
	?	PecT	Famille LysR	pel, del, prt, eps, fli	pectate-lyases, cellulases, protéases, production d'expolysaccharides, mobilité
	extraits de plantes	Pir	Famille lclR	pel	pectate-lyases
	Rhamnose	RhaS	Famille Arac	rhiE, rhiTN	Catabolisme du rhamnogalacturonane
<i>Erwinia Carotovora</i>	extraits de plantes	AepA	?	pel, cel, peh, prt	pectate-lyases, cellulases, protéases
	?	RexZ	Famille lclR	pel, cel, prt	pectate-lyases, cellulases, protéases
	agents endommageant l'AND	RdgA RdgB (RecA)	Famille LexA Famille Mu.C	PnIA	pectine lyases

I.3.1.2. facteurs de virulence enzymatiques

Dans un premier temps, les populations bactériennes vont d'abord se multiplier. Puis, les bactéries secrètent de façon synchrone et en réponse à un mécanisme de régulation, (le quorum sensing), un ensemble des enzymes dont l'activité est responsable des symptômes de macération observables sur plants et tubercules.

Chez les *Pectobacteria*, cet arsenal enzymatique est particulièrement bien adapté à la dégradation de tous les composants des parois cellulaires végétales, ce qui explique l'ampleur des dégâts observés et leur vitesse d'apparition. Il s'agit de protéases, de cellulases et de nombreuses enzymes pectinolytiques (pectine et pectate lyases, pectate hydrolase et pectine méthylesterases) (Smadja et al., 2004).

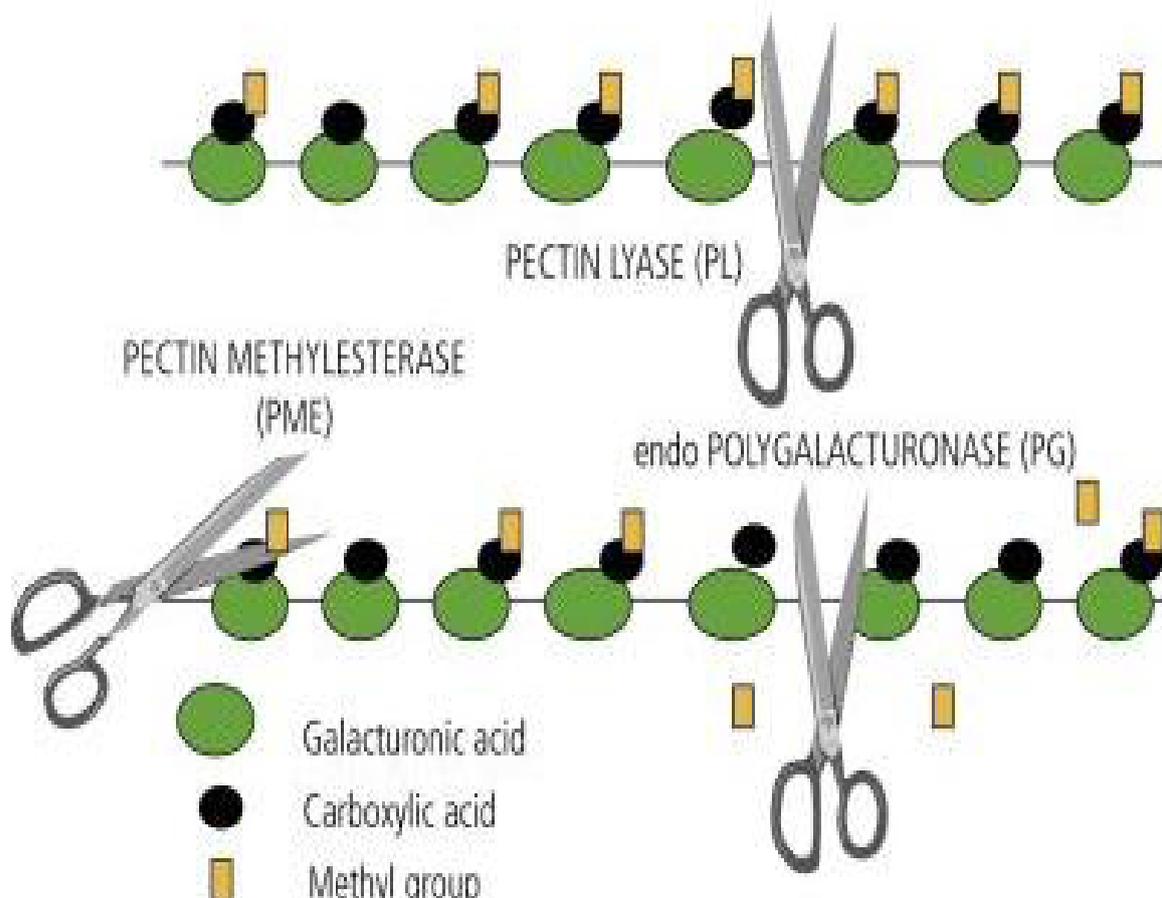


Figure4: Schéma descriptif des enzymes pectinolytiques (Van Vaerenbergh, 2012).

i-Les enzymes extracellulaires

Certaines enzymes vont aller directement au contact de la paroi végétale pour commencer le travail de dégradation. Pour cela, ils sont sécrétées par le système de sécrétion de type II, Out (Lallemand, 2010) :

- Une pectine méthylestérase PemA, et une pectine acétylestérase PaeY,
- Huit endo-pectate lyases PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL et PelZ,
- Une cellulase Cel5 (ou CelZ),
- Une rhamnogalacturonate lyase RhiE
- Une polygalacturonase PehN, supposée extracellulaire en raison de son homologie avec les endo-polygalacturonases qui sont la plupart du temps extracellulaires. (Mathilde Lallemand, 2010.)

ii- Les enzymes périplasmiques

Les oligogalacturonates sont transportées dans le périplasma par les porines KdgM et KdgN, spécifiques du transport des oligogalacturonates. Une fois dans le périplasma, des enzymes périplasmiques digèrent les substrats en di- et tri-galacturonates. Ces enzymes sont :

- Une pectine méthylestérase PemB, qui est ancrée à la face périplasmique de la membrane externe, et une pectine acétylestérase périplasmique, PaeX ;
- Une exo-pectate lyase PelX périplasmique dont le substrat préférentiel est un tétragalacturonate mais qui est aussi active sur des oligomères plus longs. Elle génère des digalacturonates insaturés en clivant l'extrémité réductrice du substrat ;
- Trois exo-polygalacturonases PehV, PehW et PehX périplasmiques, qui complètent l'activité de PelX en clivant l'extrémité non-réductrice des polygalacturonates. PehX est l'enzyme la plus active et génère des digalacturonates saturés;
- Une cellulase CelY périplasmique, moins abondante que la cellulase extracellulaire Cel5. (Lallemand, 2010).

iii- Les enzymes cytoplasmiques

Les transporteurs Tog MNAB de la famille des ABC transporteurs et TogT, permettent le passage de la membrane interne des digalacturonates saturés et insaturés. Deux autres transporteurs ExuT et KdgT permettent le transport de produits de dégradation plus petits comme le 5-céto-4-désoxyuronate (DKI), le 2,5-dicéto-3-désoxygluconate (DKII) et 2-céto-3-désoxygluconate (KDG). L'exo-pectate lyase PelW cytoplasmique dégrade les derniers oligogalacturonates en digalacturonates saturés ou insaturés. L'oligopectate lyase Ogl prend en charge l'ensemble des digalacturonates saturés ou insaturés et génère des galacturonates et des 5-céto-4-désoxyuronate (DKI). C'est pourquoi un mutant ogl est incapable de croître en milieu PGA (polygalacturonate comme seule source de carbone)(Lallemand, 2010).

I.4.2.Cas de pourriture molle du tubercule : (« soft-rot »)

Les bactéries pectinolitiques se multiplient dans l'espace intracellulaire et libèrent des enzymes protéolytiques qui dégradent les tissus du tubercule qui deviennent spongieux (Helias et *al.*, 2000). Les parties atteintes montrent d'abord une décoloration légèrement brune. Un halo brun, qui plus tard se creuse, apparaît sur les lenticelles infectées. La transformation de la chair en une bouillie aqueuse est typique de la maladie. Elle n'est retenue que par la peau d'une consistance de parchemin qui éclate à la moindre pression. La pourriture incolore qui en sort devient rapidement rougeâtre à brun foncé au contact de l'air. Elle dégage une odeur de moisi désagréable (Ochsenbein et *al.*, 2007).

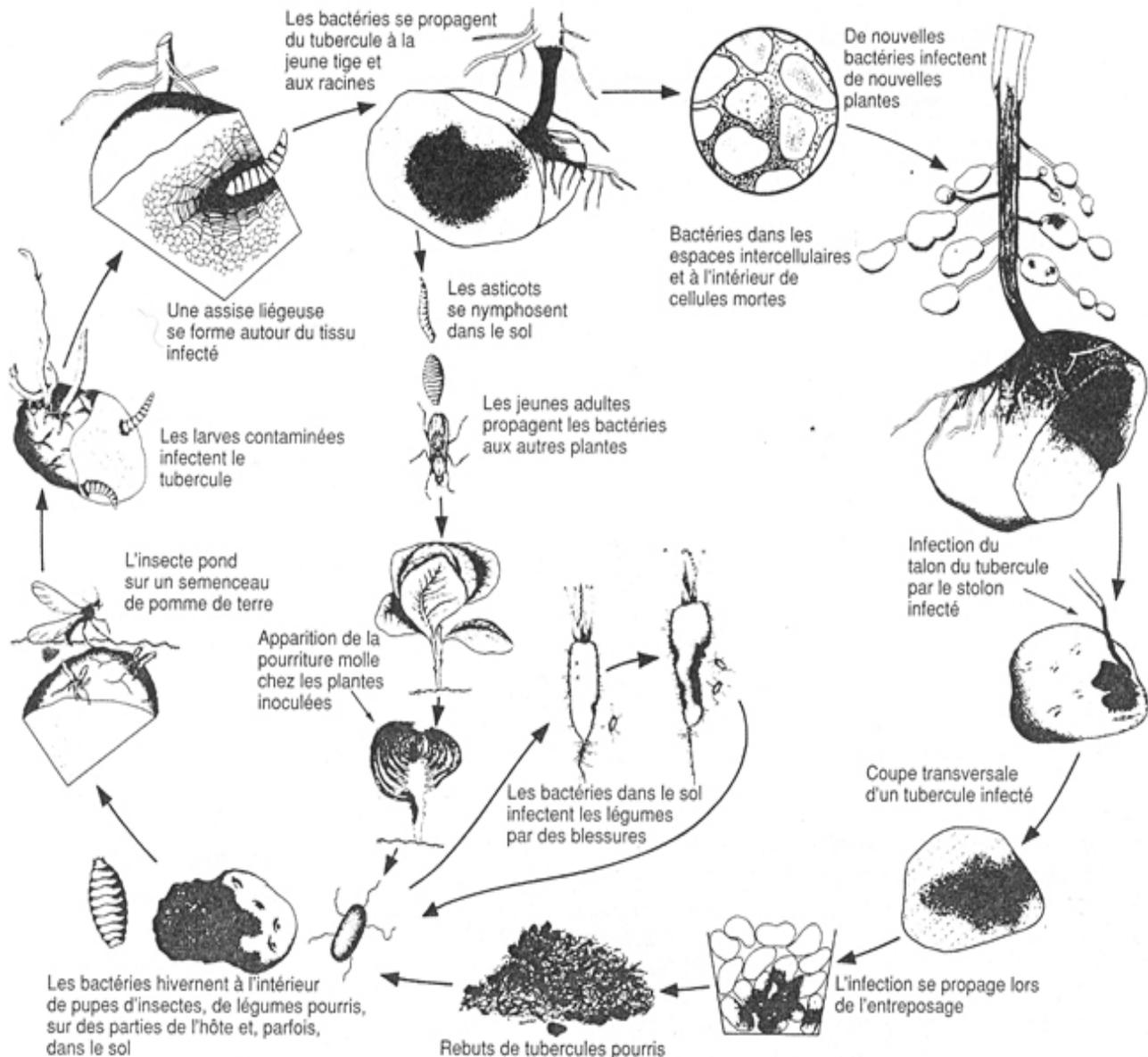


Figure6 : Cycle de développement de la pourriture molle bactérienne (Yaganza, 2005).

I.4.moyens de lutte contre ces maladies.

À l'heure actuelle, le contrôle des bactéries repose en pratique sur la mise en œuvre par le producteur de mesures prophylactiques au cours des étapes de la culture (Hélias, 2008).

Le producteur peut réduire le risque d'une infection avec *Erwinia* par une bonne pratique au champ et au stockage. Plus le risque est grand en raison des conditions atmosphériques, plus les mesures de culture et de stockage deviennent importantes (Ochsenbein et al., 2007).

Grâce à une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent l'apparition et le développement de la maladie, de nouvelles méthodes de lutte chimique, génétique et biologique ont été proposées. Certaines de ces méthodes ont montré leur efficacité au laboratoire et devront être validées au champ. (Latour et *al.*, 2008).

I.4.1. Lutte chimique

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

La lutte chimique est très efficace mais cette dernière engendre une dégradation de l'environnement et elle s'est avérée toxique pour l'être humain (Yaganza et *al.*, 2004).

I.4.2. Lutte génétique

Un espoir conséquent repose en particulier sur des nouvelles méthodes visant à perturber la communication cellulaire des *Pectobacteria*, que ce soit via l'utilisation de plantes modifiées, d'inocula antagonistes ou de stimulants organiques des bactéries dégradant les signaux quorum-sensing. Ces techniques ne sont pas exclusives et pourraient être associées dans une pratique de lutte intégrée. L'impact environnemental et l'efficacité de ces nouvelles stratégies de lutte doivent être évalués (Latour et *al.*, 2008).

I.4.3. Lutte biologique

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

Chapitre II

Généralités Sur Melia Azedarach

II. Généralité sur *Melia azedarach*

Melia azedarach a été découverte pour la première fois vers le début du vingtième siècle, durant les grandes invasions acridiennes : Palestine en 1915, Inde en 1926, Alger en 1888-1894, durant lesquelles l'arbre était épargné par les criquets. Depuis, nombreux sont les chercheurs qui ont consacré leurs investigations à ce sujet, et découvert divers effets caractéristiques de l'arbre sur différentes espèces d'organismes nuisibles (Hajaniaina, 1996).

La famille des méliacées compte 51 genres et 550 espèces (Timbo, 2003) dont *Melia azedarach* et *Azadirachta indica*, connue sous le nom de Lilas d'Inde ou Neem, qui sont deux plantes étroitement liées (Biswas et al. 2002).

II.1. Définition

Melia azedarach, le faux neem, arbre à chapelets, Chinaberry, lilas de Perse ou grand lilas, est une plante rudérale, de la famille des méliacées et d'origine asiatique (Hajaniaina, 1996), plus précisément de l'Inde mais il pousse également dans les régions méditerranéennes, européennes, dans toute l'Asie, l'Amérique du sud, l'Australie, en Afrique et dans les Mascareignes. De cette très large répartition géographique découle une vingtaine d'aptitudes à travers le monde (Hajaniaina, 1996).

Les arguments développés par Watt (1889), apparaissent plus convaincants. Selon sa thèse, les Perses étaient bien familiers d'un arbre : *Melia azedarach*, communément connu sous le nom de China Berry (Baie de Chine), mais appelé en perse "Azadirakhat" ; "Aza" signifie "amer" et "drakhat" signifie "arbre". Ainsi le nom de *Melia azedarach* (azadirakhat) devient en perse "l'arbre amer" (Faye, 2010).

II.2. taxonomie

La taxonomie de *Melia azedarach* est résumée sur le tableau suivant :

Tableau IV: Classification de *Melia azedarach* (Timbo, 2003).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Spermaphyte</i>
Division	<i>angiosperme</i>
Classe	<i>Dicotyledone</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Sapindale</i>
Famille	<i>Meliaceae</i>
Genre	<i>Melia</i>

II.3. Description botanique, biologique et écologique.

Melia azedarach est un arbre ramifié, au port érigé. Fréquemment, l'arbre mesure 8 à 15m de hauteur, mais il peut atteindre jusqu'à 25 à 30 m (Hajaniaina, 1996).

Il se reconnaît facilement par son feuillage léger, en buisson d'un beau vert, contrastant avec le tronc (Hajaniaina, 1996), composées bipennées, à disposition alternative (Gilman et Watson, 1994). Les feuilles sont caduques surtout au moment de la maturation des fruits (Hajaniaina, 1996). **(Figure c)**.

Son fruit rond, jaune acré a maturité de 1 à 1,5 cm de long : un noyau portant 5 sillons et contenant plusieurs graines noires (± 6 minimum), légèrement albuminées (Anonyme, 1963). Le péricarpe est composé de deux parties : le sarcocarpe, dérivée de l'exocarpe et du méricarpe, est charnue et de couleur jaune foncé; la seconde ou scléocarpe, caractéristique des drupes, est lignifiée et forme le noyau, qui contient et protège les graines (Sagoua, 2010), la masse de ces petits fruits est également d'un aspect agréable, ils restent sur l'arbre en bouquets jaunes pendant la floraison. (Anonyme, 1963). **(Figure b)**.

Ses fleurs mauves sont disposées en panicules odorantes (Anonyme, 1963). **(Figure d)**

Le bois est à zone poreuse plus ou moins nette ; Les rameaux sont assez cassants, l'arbre est parfois brisé par le vent (Anonyme, 1963).

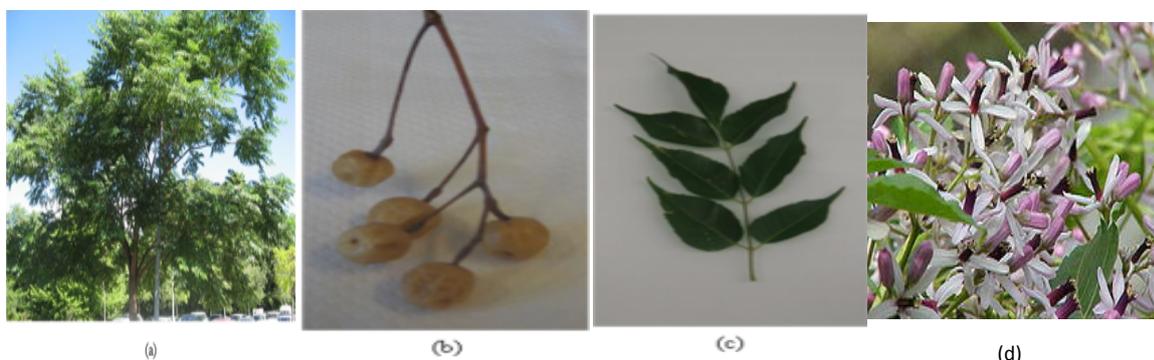


Figure7 : photographie de *Melia azedarach*, (a) : vue globale de l'arbre, (b) : fruits, (c) : feuilles, (d) : fleurs (Sagoua, 2010).

Melia azedarach, est une essence de lumière, il convient aux zones d'altitude moyenne ou basse ; il s'adapte bien aux différents types de sol (Anonyme, 1963)

Il rejette bien de souche et drageonne surtout aux endroits où les racines superficielles sont exposées à l'air. (Anonyme, 1963)

Melia azedarach, est quelque fois l'objet d'attaque assez sévère d'insectes foreuses du tronc et des rameaux, notamment par des Bostryches du genre appâte. (Anonyme, 1963)

Des attaques cryptogamiques sont parfois observées sur *Melia azedarach* (pourridies et chancre à *Nectria*) (Anonyme, 1963).

La floraison se déroule au mois de septembre, novembre (avant la saison des pluies), et la fructification, de novembre à mars. La maturation a lieu à partir du mois février jusqu'au mois de mai. Les fruits murs peuvent rester longtemps sur l'arbre. Ils sont globuleux comme des petites boucles ocre portés par des grappes pendantes. Les graines contiennent approximativement 40% d'huiles (Hajaniaina, 1996).

Melia azedarach, voisin de neem est souvent confondu avec lui, il se différencie du neem par son port érigé et ramifié ainsi que par les caractéristiques de son feuillage plutôt léger et caduc. Et par rapport au neem, *Melia azedarach* préfère les températures beaucoup plus basses (Hajaniaina, 1996).

Il a une haute tolérance à la sécheresse, cultive avec succès dans une large variété de conditions de vie (sécheresse, excès d'humidité,...) et dans tous les types de sol : argile, limon, sable, acide, alcalin et bien drainé, à l'exception du sol humide ; c'est vraiment un survivant urbain (Gilman et Watson, 1994). C'est une plante à grande fécondité et à pouvoir germinatif élevé. Tout ceci lui assure un envahissement rapide des diverses régions. C'est une plante des décombres et des abords des maisons, elle occupe parfois les <<tanety>> à proximité des lieux habités (Hajaniaina, 1996), et actuellement utilisée en tant qu'arbre de reboisement en Chine, en Inde, en Amérique du Sud et Centrale (Gilman et Watson, 1994).

II.4. Composition chimique de la plante.

La composition chimique et la quantité des composés biologiques actifs de *Melia azedarach* varient selon : l'environnement (Chiffle et al., 2009) et la méthode d'extraction (Chantal et al., 2003).

Signalons que l'isolation des matières actives des feuilles du *Melia azedarach* a commencé en 1946 par Chauvin qui a trouvé la substance amère appelée meliatine. Lavie et al ont isolé en 1967 les

tritrepénoides (Melinol et melianone) provenant des fruits. Le meliantriol montre de fortes propriétés antiappétantes vis-à-vis des locustes *Schistocerca gregaria*. Krauss, en 1987, avait trouvé trois composants ayant des effets IGR (dérégulateurs de croissance). Schmutterer et Wen en 1991 ont trouvé 93% et 100% de mortalité, suite à une application directe de l'extrait de feuilles et de graines sur les nymphes de premier stade de *Locusta migratoria migratorioides*. Plusieurs dérivés ont été isolés à partir des feuilles, écorce, tige, racines, fruits et graines dont les principaux constituants insecticides sont 1-cinnamyl-1,3, 11-dihydroxymeliacarpine et 1-cinnamoyl melianolone et dont les structures et l'action sont très proches de l'azadiractine (Hajaniaina, 1996).

Yaga a extrait trois fractions neutres de méthanol, responsable de l'activité anti-termite. Parmi ces fractions, la plus haute activité et plus haute polarité contiennent du niboline A et un composant inconnu $C_{23} H_{38} O_5$. (Hajaniaina, 1996).

II.5. Intérêts et propriétés biologiques.

Melia azedarach est utilisé pour divers usages. En effet, il est utilisé dans la pharmacologie traditionnelle (Kataria, 1994), il est également connu pour avoir des propriétés insectifuges (Valladares et al., 1997 ; Valladares et al., 1999 ; Huang et al., 1995). Ces propriétés sont dues, d'après (Bohnenstengel et al., 1999 ; Carpinella et al., 2002) aux limonoïdes qu'il contient (Sagoua, 2010). Elle sont des propriétés insecticides, antiappétantes (anti nutritionnelles), de régulation de la croissance, et de modification du développement (Al-Rubae, 2009).



Figure 8 : Parties constituant de *M.azedarach* qui ont des propriétés biologiques.

II.5.1. Activité pharmacologique

La famille des méliacées est connue depuis longtemps pour ses propriétés médicinales (Cella et al., 2004). *Melia azedarach* est utilisée en Algérie comme tonique et antipyrétique (Maciel et al., 2006).

D'après Terrac en 1947, toutes les parties de la plante peuvent être utilisées en pharmacopée (Hajaniaina, 1996).

Une décoction de 10 feuilles dans 1L d'eau sert à guérir la constipation et la gastrite pour cette dernière il s'agit d'un traitement journalier durant une semaine, ceci, régulièrement deux fois par mois. Les feuilles écrasées sont posées en cataplasme contre les retentions d'urine, les affections nerveuses et spécialement l'hystérie (Hajaniaina, 1996).

Des expériences effectuées sur des rats ont montré que l'extrait alcoolique de ces feuilles empêche le changement induit par l'éthanol sur les paramètres du stress oxydatif, et l'effet a été comparable à celui de la vitamine E et C ; ses feuilles pourraient être une source potentielle d'antioxydant naturel. (Ahmed et al., 2008).

Certains triterpènes isolés de ces fruits ont une activité cytotoxique tandis que d'autres ont montré un effet additionnel antiprolifératif modéré contre une variété de cellules épithéliales du poumon humain, l'adénocarcinome A549, suggérant *M.azedarach* comme potentiel pour d'autres investigations comme une source naturelle d'agents anticancéreux (Ntalli et al., 2010).

Les extraits de ces fruits testés sur des rats albinos normaux ont présenté une activité hypoglycémiant (Chaturvedi et Segale, 2007).

Selon Saikia et al. (2006), des préparations de feuilles de *M.azedarach* sont utilisées en Inde pour traiter différentes maladies de peau : escarboucle, gale, fièvre miliary, cellulite, abcès, rougeole et pédiculose. Les différentes préparations sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau V: Préparations a base des feuilles de *M. azedarach* pour traiter différentes maladies de peau (Saikia et *al.*, 2006).

Préparation	Maladies de Peau traitées
<p>Les feuilles sont frisées et oralement prises.</p> <p>Les feuilles sont bouillies dans l'eau et cette eau est employée pour laver l'endroit infecté.</p>	Gale
<p>les feuilles sont bouillies dans l'eau et employée après refroidissement pour se baigner</p>	Fièvre miliaire
<p>le jus est employé pour laver l'infection.</p>	Cellulite
<p>La pate (forme écrasée des feuilles) est posée sur l'abcès et le jus extrait est employée pour laver l'infection.</p>	Abscess
<p>Les feuilles sont frisé et oralement prises.</p> <p>Le jus est ajoute à l'eau et cette eau est employée pour se laver</p>	Rougeole
<p>Les feuilles sont imbibées dans l'eau et cette eau employée pour laver les cheveux.</p>	Pédiculose

II.5.2. Activité pesticide

L'activité insecticide de *Melia azedarach* est due aux triterpénoïdes biologiquement actifs avec un effet antinutritionnel, c'est-à-dire il inhibe l'alimentation des insectes phytophages provoquant la mort et la malformation des générations suivantes (Chifelle et al., 2009).

De sa propriété insecticide découle l'utilisation des feuilles fraîches en protection des végétaux et dans la lutte contre les insectes parasites de l'homme et des volailles, et les feuilles fraîches jetées au feu peuvent éloigner les moustiques (Hajaniaina, 1996).

Carpinella et al. (2003) ont également démontré que les extraits éthanolique et hexanoïque de différentes parties de *Melia azedarach* (fruits, graines, feuilles) avaient un effet fongistatique sur *Aspergillus Flavus*, *Diaporthe Phaseolorum Var. Meridionales*, *Fusarium Oxysporum*, *Fusarium Verticillioïdes*, *Fusarium Solani* et *Sclerotinia Sclerotiorum*, qui sont des phytopathogènes, pour des doses minimales d'inhibition de l'ordre de 0,5 à 25 mg.ml⁻¹ et de 0,5 à 5 mg.ml⁻¹ respectivement pour les extraits hexanoïque de feuilles et éthanolique de graines (Sagoua, 2010).

Les extraits de ses graines et de ses feuilles (séparément) ont présenté une inhibition de l'éclosion des œufs et du développement larvaire de *Haemonchus contortus*, helminthe, après les avoir testés, *in vitro*, à différentes doses (Maciel et al., 2006).

Les feuilles broyées ou non, épandues dans la chambre, sous les matelas, tuent les puces et les punaises. Des expériences *in vitro* ont démontré l'efficacité de l'extrait de fruit de *Melia azedarach* contre *Pediculus humanus capitis*, poux de tête, et la possibilité d'utiliser des produits à base de *Melia azedarach* pour contrôler les poux de tête qui sont difficiles à contrôler en raison de leur résistance aux anti-poux couramment utilisés (Carpinella et al., 2007).

Les extraits des feuilles et des fruits de *Melia azedarach* ont présenté une activité antiappétante (anti nutritionnelle) contre *Xanthogaleruca luteola*, parasite des feuilles d'orme (Defago, 2006).

Les extraits au méthanol de ses graines et de ses feuilles testés sur *Anophèles stephensi*, vecteur de la malaria, ont montré une forte activité larvicide, pupicide, adulticide, anti ponte, répulsive et dissuasive de piqûres. Les extraits de graine ont montré une activité élevée avec toutes les doses testées, tandis que les extraits de feuille se sont avérés actifs seulement avec la dose la plus élevée (Nathan et al., 2005).

Les extraits de son fruit testes sur *Ocneridia volxemi*, parasite des feuilles de céréales et autres cultures, ont présenté des propriétés antiappétante et adulticides importantes (Bounechada et Fenni, 2007).

Par piétinement des bœufs ou enfouissement lors du labour, les feuilles du *Melia Azedarach* peuvent servir du moyen de lutte préventive contre les nématodes (Hajaniaina, 1996).

II.5.4.Activité antivirale

Kim et *al.*, en 1999 ont rapporté que des composés comme le 28-déacétylsendanine extrait des fruits de *Melia Azedarach* entraîne une inhibition de la réplication de virus (Sagoua, 2010).

Ses extraits ont inhibé la multiplication des virus *Sindbis*, *Junin*, *Tacaribe*, *Pichinide*, virus de l'herpes et le virus de la stomatite vésiculaire dans des cultures cellulaires. (Alche et *al.*, 2003).

II.5.5.Activité antimicrobienne

L'activité microbienne de *Melia Azedarach* sur plusieurs types de bactéries et protozoaires comme *Bacillus Coagulans*, *Anterobacter Aerogenes*, *Proteus Mirabillis*, *Staphilococcus*, *Escherichia Coli*, *Salmonella Typhi* Et *Trichomonas Vaginalis* a été évaluée en obtenant de bon résultats. (Maciel et *al.*, 2006).

Les extraits aqueux et chloroformique des feuilles de *Melia azedarach* ont montré une activité antibactérienne contre : *Bacillus Subtilis*, *Pseudomonaas Aeruginosa*, *Staphilococcus Aureus* (Gram positif), *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae* (Gram négatif) avec de meilleurs résultats pour l'extrait aqueux (Suresh et *al.*, 2008).

II.5.6.Autres propriétés

Les feuilles de *Melia azedarach* accélèrent la maturation des fruits climatériques : avocats, bananes, kakis, mangue. Il s agit d'entreposer les feuilles entre les fruits, soit a l'intérieur des trous de maturation (pour la banane), soit dans les corbeilles même pour les autres fruits (Hajaniaina, 1996).

Les feuilles broyées peuvent remplacer les savons locaux. La méthode consiste à tremper, pendant au moins une heure, le linge dans l'extrait aqueux de feuille de *Melia azedarach* (10L d'eaux pour 1 gobelet de feuilles broyées) (Hajaniaina, 1996).

Les feuilles mélangées avec les pailles de couvaion peuvent prévenir ou tuer les mallophages parasites des poules couveuses. Les fourrages composés avec des feuilles de *Melia azedarach* (moitié

moitié) servent à entretenir la santé bovine et présentent aussi des effets antihelminthiques (Hajaniaina, 1996).

II.6. Toxicité de la plante

Les travaux menés par Mendez et *al.*, (2002), ont mis en évidence une forte toxicité de l'écorce, des fleurs, et des feuilles de *Melia azedarach* et une faible toxicité du fruit. Des expériences effectuées en Australie suggèrent que la toxicité de la plante pourrait varier en fonction de la région où elle est poussée et quelques arbres peuvent être non toxiques. Il a été rapporté en Argentine que les enfants et les animaux domestiques ayant ingéré les fruits provenant de cette plante n'ont pas été intoxiqués.

II.6.1. Molécules responsables de la toxicité de la plante

Différentes molécules ont été caractérisées en tant que principe actif responsable de la toxicité de *Melia. azedarach*. Pour quelques auteurs la toxine est dans la pulpe du fruit et pourrait être un alcaloïde de structure chimique inconnue. D'autres chercheurs ont isolé des saponines avec des propriétés hémolytiques, et plusieurs limonoïdes potentiellement toxiques. D'autres chercheurs ont encore trouvé l'alcaloïde azaridine, une résine, un tannin, et des acides meliotoniques et benzoïques. Quatre substances de triterpènes extraites à partir de ses fruits sont identifiées et dénommées comme meliatoxine A₁, A₂, B₁, et B₂ qui sont supposées être responsables des signes nerveux, d'autres molécules isolées mais pas encore identifiées seraient responsables des perturbations digestives (Mendez et *al.*, 2002). Il n'y a pas de traitement spécifique ou antidotes, le traitement est au mieux symptomatique (Kiat, 1969).

Chapitre III
Matériels et méthodes

III Matériel et méthode

III.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Melia azedarach* (**figure9**) ont été récoltées le mois d'Avril 2011 à proximité de l'université de Bejaïa.



Figure9 : les feuilles de *Melia azedarach*

III.1.1 Préparation de la poudre végétale

Après la collecte du matériel végétal, les feuilles préalablement débarrassées de toute poussière et toute autre impureté, ont été séchées à l'étuve à 40°C pendant 10 jours.

Pour permettre l'obtention d'une poudre végétale fine et homogène. Les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière a été tamisée avec un tamis<<Retsh-AS 200>> de diamètre 0,5mm. La poudre obtenue a été conservée à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

III.2. Matériel bactérien

Les souches bactériennes utilisées sont des *Pectobacterium Carotovorum Carotovorum* (Pcc), *Pectobacterium Carotovorum atropicum* (Pca) et *Dickeya* ont été fournis par professeur Zaidi.:

III.3 Extraction

A fin d'extraire les principes actifs de la plante utilisée, une extraction à reflux a été utilisée avec un solvant polaire, l'éthanol à 100%.

Le système à reflux comporte un chauffe-ballon de type<<HEATING MANTLESS MODEL 655>> avec un bras de soutien, du condenseur, un ballon, et un système réfrigérant.

III.3.1 procédé d'extractions

10g de poudre ont été mélangés avec 100ml d'éthanol dans un ballon. L'extraction a été réalisée dans un chauffe-ballon pendant 15mn. Après refroidissement, l'extrait obtenu a été filtré à travers un filtre wattman N⁰2. Le filtrat est récupère dans un flacon recouvert avec du papier aluminium, puis mit dans une étuve réglée a 40⁰C pendant 2jours. L'extrait brute est conservé a température ambiante et a l'abri de la lumière. Le rendement d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

$$R_d(\%) = [(P_1 / P_0) \cdot 100]$$

P₀: masse en gramme de la poudre utilisée

P₁: masse en gramme de l'extrait sec à traiter

R(%): rendement d'extraction exprimé en %

Les étapes suivies pendant l'extraction sont récapitulées sur le schéma suivant :

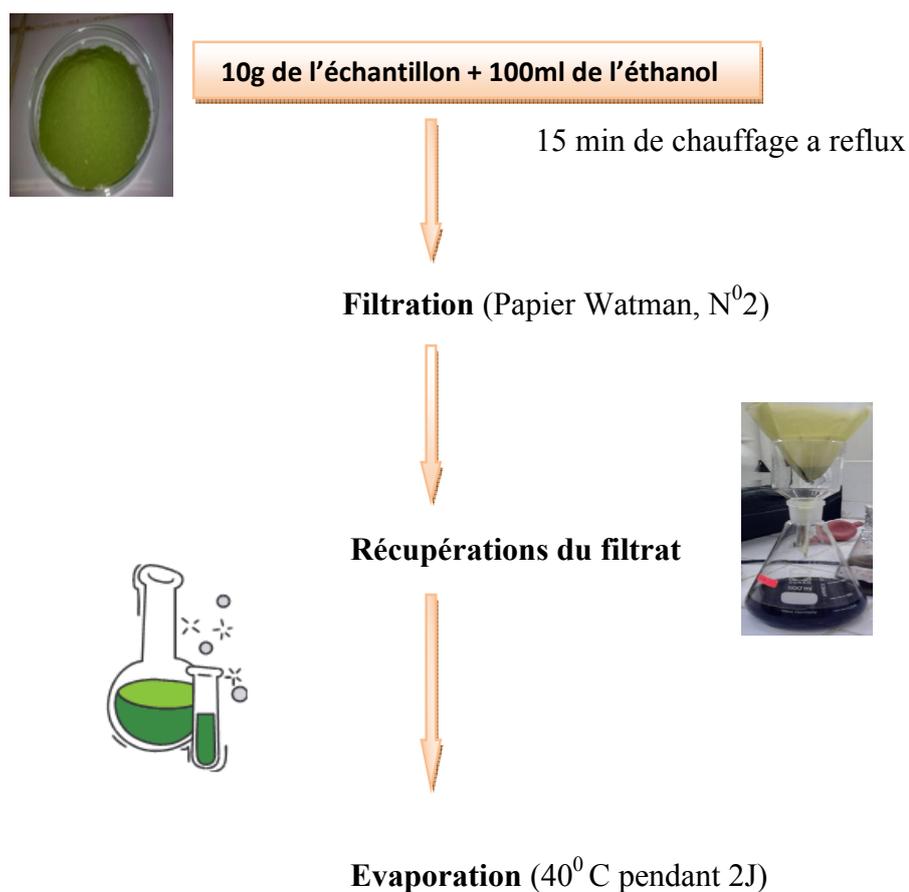


Figure10: Protocol suivi pour l'extraction des feuilles de *Melia Azedarach*

III.4 Analyse par chromatographie sur couche mince

III.4.1 Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique courante de caractérisation. Elle est basée sur la différence d'affinités (au sens d'interactions intermoléculaires) d'un constituant d'un mélange entre une phase solide (silice le plus souvent, mais aussi alumine ou cellulose) et une phase liquide, un éluant, constituée d'un mélange de solvants organiques.

La ccm sépare les composés organiques de faible poids moléculaire, selon leur polarité (Schéma et *al.*, 2009). Elle est basée sur la formation de liaisons momentanées entre les espèces chimiques des extraits et la phase fixe. La façon dont chaque espèce chimique migre dépend de sa solubilité dans la phase mobile (l'éluant) et de son adsorption sur la phase fixe (gel). La

séparation est basée sur la différence de vitesse de déplacement des espèces chimiques sur la phase stationnaire (Browning, 1971 ; Sine, 2003).

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (Rf) :

$$R_f(\%) = \frac{\text{Hauteur de la tache}}{\text{Hauteur du front du solvant}}$$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques au même Rf).

III.4.2 CCM sur gel

On a coupé des petites plaques de (10x5) cm , qui ont été régénérées en les déposant dans une étuve réglée à 100⁰ C pendant 5mn.

Phase stationnaire : HPTLC gel de silice 60F254. Merck. KGaA. Lot: 013 333 609.

Phase mobile: (toluene/ methanol) (v /v) (2ml).

L'éluant a été versé dans la cuve. Sa hauteur correspond à environ 0.5cm du fond de la cuve. Cette dernière est refermée de manière à former un environnement saturé de vapeur de solvant.

III.4.3 dépôt de l'échantillon

La préparation de l'échantillon se fait par l'intermédiaire de solvants volatils qui peut être différent de l'éluant. Ici on a choisi le DMSO pour solubiliser notre extrait.

Une goutte de l'échantillon (10mg /ml) a été déposée sur la plaque a environ 1 cm de la bordure. Une fois séchée, la plaque a été introduite dans la cuve. A la fin de la migration du

solvant, la plaque est retirée de la cuve et séchée. La visualisation des spots (taches) a été réalisée sous lampe UV à deux longueurs d'ondes différentes (253 et 360 nm).

III.5 Dosage des polyphénols

III.5.1 Principe :

La méthode de dosage des polyphénols utilisée est celle de Lister & Wilson (2010). Elle consiste à mélanger l'extrait avec le réactif de Folin-ciocalteu et la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3).

III.5.2 Méthode :

1ml d'extrait de l'échantillon a été mélangé à 0,5ml du réactif de Folin-ciocalteu et à 0,5ml d'une solution de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3). Le mélange a été agité vigoureusement et incubé pendant 2h à une température ambiante ; puis l'absorbance à 760 nm a été calculée.

La teneur de l'extrait en polyphénols a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage, établie dans les mêmes conditions, avec l'acide gallique.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EQ AG/g d'extrait sec).

III.6 dosage des flavonoïdes

III.6.1 principe

L'analyse quantitative des flavonoïdes a été réalisée selon le protocole de (Quettier-Deuleu et al, 2000) qui est basée sur la formation d'un complexe flavonoïd-aluminium, qui donne à la solution une coloration jaunâtre.

III.6.2 Méthode

1ml d'une solution méthanolique d' AlCl_3 à 2% est rajouté à 1ml de l'extrait éthanolique des feuilles de *Melia azedarach*.

Après 15 minutes d'incubation à une température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 430 nm, la quercétine est utilisée comme un standard, la quantité des flavonoïdes est estimée en mg EQ/g d'extrait sec de la plante.

III.7 Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait des feuilles de *Melia azedarach*

L'étude de cette activité consiste à tester les effets antibactériens de l'extrait éthanolique des feuilles de *Melia azedarach*. Pour cela on a utilisé les méthodes de diffusion sur disque et de dilution en milieu solide.

III.7.1 Les souches bactériennes

Les tests antibactériens ont été effectués sur des germes phytopathogènes responsables de la pourriture molle et jambe noire des cultures telles que la pomme de terre. Les souches utilisées sont rapportées comme suit :

- *Pectobacterium carotovorum carotovorum*
- *Pectobacterium carotovorum atrosepticum*
- *Dickeya ssp*

III.7.2 Déroulement du test

Les souches bactériennes ont été repiquées selon la méthode des stries sur le milieu King B, puis incubées à l'étuve à 26⁰C pendant 24h, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui vont servir à préparer l'inoculum bactérien.

III.7.2.1 Préparation de l'inoculum standard bactérien

L'activité de tout agent antimicrobien est dépendante de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée. L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 24h/26⁰C sur milieu d'isolement (King B). Quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur, puis mises en suspension dans un brouillon nutritif.

Des dilutions de 10⁻¹ et 10⁻² ont été préparées, et utilisées pour effectuer le test antibactérien. La dilution à 10⁻² ayant une DO de 0,5 (qui correspond à 10⁸ unités de colonies bactériennes) a été utilisée.

III.7.2.2 Test antibactérien

III.7.2.2.1 principe

Le principe de ce test repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide, dans une boîte du pétri, à partir d'un point précis, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme (Billerbeck, 2007 ; Kaloustian et *al.*, 2008).

L'effet de la substance antimicrobienne sur la cible a été évalué par la mesure d'une zone d'inhibition.

III.7.2.2.2 Description de la méthode

La gélose Mueller Hinton(MH) a été coulée en boîtes du pétri sur une épaisseur de 4mm. Après solidification, une suspension bactérienne de 10^8 a été étalée sur la gélose en utilisant un râteau.

Des disques de 4mm de diamètre, découpés du papier Wattman N°01, stérilisés et imprégnés de 20µl d'extrait éthanolique ; préalablement solubilisé dans 10% de DMSO. Les concentrations utilisées sont : 20, 10 et 5mg/ml/disque.

Dans les mêmes conditions, des disques imprégnés de DMSO sont utilisés comme témoin négatif. Chaque test a été effectué deux fois. Les boîtes ont été incubées durant 48 heures à 26°C.

L'activité antibactérienne de l'extrait a été évaluée par la recherche d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extrait.

Chapitre IV
Résultats Et Discussion

IV. Résultats et discussion

IV.1 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction par l'éthanol des feuilles de *Melia azedarach* est calculé comme suit :

$$\begin{aligned}\text{Le rendement d'extractions } R(\%) &= [(P_1/ P_0)].100 \\ &= 8,11\%\end{aligned}$$

L'extraction à l'éthanol a permis d'obtenir 0.811g d'extrait sec à partir de 10g de poudre de la plante qui correspond à 8,11%

Le taux d'extraction à l'éthanol est élevé, ceci indique que les feuilles de *Melia azedarach* sont moyennement riches en composés solubles dans l'éthanol, comme les polyphénols.

D'après les travaux de Munir et *al.* (2012), le taux de rendement des extraits méthanoliques (méthanol à 80%) de tige, des feuilles et des fruits de *Melia azedarach* séchés au soleil et à température ambiante est de l'ordre de 10.11 à 17.30 et de 8,20 à 15,60%, respectivement. Il a été constaté que les échantillons séchés sous le soleil ont des rendements d'extraction plus élevés.

A partir de ces résultats on déduit que le taux d'extraction varie en fonction de la partie de la plante et du solvant utilisé.

Selon Cowan (1999) et Raghvan et Richards (2006), l'éthanol est le meilleur solvant d'extraction des polyphenols et le moins toxique par rapport aux autres solvants organiques tels que l'acétone. En plus, Martini et Eloff (1998) ont rapporté que l'éthanol permet d'extraire des composés doués d'activité antibactérienne à partir de différentes plantes médicinales avec un rendement d'extraction plus élevé que les autres solvants (Martini et Eloff ; 1998).

IV.2 Chromatographie sur CCM

Les résultats obtenus après la migration sur les plaques de ccm sont présentés dans la figure suivante :



Figure11: Profil chromatographique de l'extrait des feuilles de *Melia azedarach*

L'observation de la plaque sous la lampe UV (253 et 360) a montré 4 taches, bien séparées. Les Rf ont été calculés et présentés dans le tableau suivant :

TableauVI : Les résultats de la ccm

	Absorbance a UV		Rapport frontale
	253	360	
1ere tache	+	+	0,142
2eme tache	+	-	0,328
3eme tache	+	+	0,742
4eme tache	+	+	0,914

Le système utilisé: toluène, méthanol, en volumes 1,1 respectivement s'est avère efficace pour séparer certains types de composés de *Melia azedarach*.

Ces résultats montrent que les feuilles de *Melia azedarach* sont relativement riches en composés. En effet, les travaux menés par Ntalli et *al.* (2010), sur *Melia azedarach* ont permis de mettre en évidence la présence de quatre limonoïdes de nature tri-terpénique dans les extraits méthanoliques. Ces composés correspondent aux : 3-a-tigloylmelianol, melianone, 21-B-acetoxy-melianone et méthyle kulonate.

Signalons que l'isolation des matières actives des feuilles de *Melia azedarach* a commencé en 1946 par Chauvin qui a extrait une substance amère qui l'a appelé : meliatine.

D'autres travaux menés par Chiffelle et *al.* (2009), rapportent que *Melia azedarach* contient également de nombreux composés phénoliques parmi lesquels trois seulement ont été identifiés (la catéchine et deux types de karampherol).

IV.3-Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu avait pour objectif la détermination de la teneur totale des feuilles de *Melia azedarach* en polyphénols.

A partir de courbe d'étalonnage de l'acide gallique (annexe1), la concentration a été calculée et exprimée en mg EQ/d'extrait sec ; la proportion en polyphénols dans *Melia azedarach* est de 1.426 ± 0.97 mg EQ/ g d'extrait sec.

IV.4-Dosage des flavonoïdes

A partir de courbe d'étalonnage de la quercétine (annexe2), la concentration a été calculée et exprimée en mg EQ/g d'extrait sec. La proportion en flavonoïdes de l'extrait est de 0.16 ± 0.68 mg EQ/g d'extrait sec.

Selon Munir et *al.* (2012), Les quantités en polyphénols (PTC) et en flavonoïdes (TFC) dans les extraits méthanoliques (méthanol à 80%) des différentes parties : tige, feuilles et fruits de *Melia azedarach*, séchés au soleil, sont de l'ordre de 74,43 à 112,10 mg GAE / g DW et de 13,32 à 28,11 mg CE / g DW, respectivement.

Les parties de la plante séchées à température ambiante, présentent des taux des PTC et TFC de l'ordre de 66.89 à 103.34 mg GAE / g DW et de 10,67 à 23,45 mg CE / g DW, respectivement.

La comparaison du séchage au soleil, et à température ambiante a montré que toutes les parties de *Melia azedarach* séchées au soleil présentent des valeurs plus élevées de PTC et TFC. La valeur maximale des flavonoïdes totaux (28.11mg / g DW) a été obtenue à partir de tige séchés à température sous le soleil tandis que la valeur minimale (10,67 mg / g DW) a été obtenue à l'air ambiante pour l'échantillon de fruits secs.

La quantité des composés phénoliques des extraits éthanoliques de la plante étudiée dépend essentiellement : de son origine , la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante et la durée de conservation (Zeghad, 2009).

IV.5 Activité antibactérienne de l'extrait des feuilles de *Melia azedarach* sur les souches *pectobacterium*

Les résultats du test antibactérien sont présentés sur la figure suivante

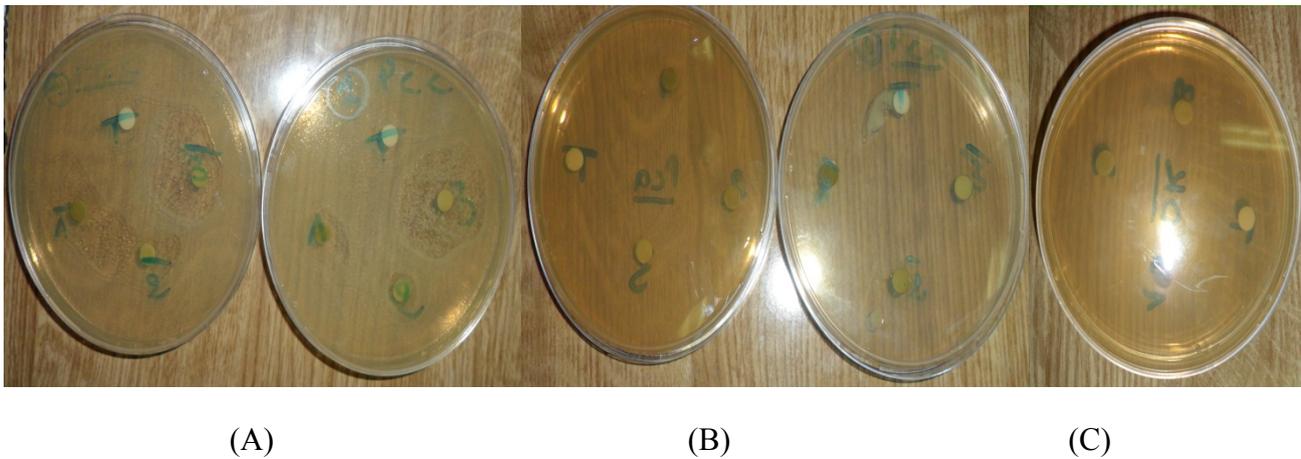


Figure 12: résultats de l'étude de l'effet de l'extrait de *Melia azedarach* sur les *pectobacterium* dans les boîtes de pétri, (A): avec Pcc, (B): avec Pca, (C): avec Dk

Les zones d'inhibition de la croissance des souches bactériennes Pcc, Pca et Dk par l'extrait des feuilles de *Melia azedarach* sont rapportées dans le tableau suivant :

TableauVII : Résultat des testes sur l'activité antibactérienne de *Melia azedarach* sur les souches pectinolitiques in vitro.

Zone d'inhibition Souches bac	Disque1 (5mg/ml)	Disque2 (10mg/ml)	Disque3 (20mg/ml)	Témoin DMSO
Pcc	14mm	185mm	275mm	0mm
Pca	0mm	0 mm	0 mm	0 mm
Dka	0mm	0 mm	0 mm	0 mm

Les résultats de l'étude de l'effet antibactérien de l'extrait éthanolique des feuilles de *Melia azedarach* montre que cette dernière exerce une action antibactérienne sur la souche *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (Pcc) avec toutes les concentrations testées (20, 10, 5 mg/ml). Le taux d'inhibition vari en fonction de la concentration utilisée.

Par contre, aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les deux autres souches (Pca et Dka) et ce avec les trois concentrations.

Le témoin (DMSO à 10%) n'a donné aucune zone d'inhibition ceci explique que le DMSO n'exerce aucun effet sur les trois souches bactériennes.

Il a été rapporté que la méthode de diffusion sur disque est la plus utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des substances naturelles des extraits des plantes médicinales (Gulçin et al., 2004 ; Van Vuuren, 2008).

Selon Maciel et al. (2006), l'activité antimicrobienne de *Melia azedarach* a été évaluée sur plusieurs types de bactéries et protozoaires comme *Bacillus coagulans*, *Anterobacter aerogenes*, *Proteus mirabillis*, *Staphilococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* Et *Trichomonas vaginalis* (Maciel et al., 2006).

Selon Suresh et al. (2000), les extraits aqueux et chloroformiques des feuilles de *Melia azedarach* ont montré une activité antibactérienne contre : *Bacillus subtilis*, *Pseudomonaas*

aeruginosa, *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Gram négatif) avec de meilleurs résultats pour l'extrait aqueux.

Viqar Khan *et al* en 2011 a démontré que les extraits de graines de *Melia azedarach* sont efficaces pour contrôler l'infection causée par les bactéries à Gram négatives. Tous les extraits de graines ont montré une importante activité antibactérienne lorsqu'ils ont été testés sur des souches à Gram + et à Gram - (Khan *et al.*, 2011).

L'activité antibactérienne de n'importe quelle plante peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al.*, 2005).

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Les analyses qualitatives effectuées par la chromatographie sur couche mince sur gel de silice, ont montré sous UV la présence d'une multitude de variétés de composés (quatre taches). Quantitativement, l'évaluation du contenu des phénols totaux en utilisant la méthode de Folin-ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols ($1,43 \pm 0,97$ mg EAG /g d'extrait sec) De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 qui nous mène à conclure que cette plantes contient principalement des flavonoïdes (0.16 ± 0.68 mg EQ /g d'extrait sec).

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antibactérien vis-à-vis des bactéries pectinolitique *Erwinia* (Pcc, Pca, Dk) pathogènes redoutables des culture, responsables des pourritures molles des tubercules et de jambe noire ; les résultats microbiologiques ont montré que l'extrait éthanolique des feuilles de cette plante (*Melia azedarach*) exerce un effet antibactérien sur la souche *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* et non pas sur les deux autres souches (*Pectobacterium carotovorum subsp. atroscopicum* et *Dickeya spp*).

Comme perspectives, il serait intéressant de purifier et de caractériser les composés actifs obtenus à partir des feuilles de *Melia azedarach* et d'orienter l'étude vers la réalisation des tests approfondis et complémentaires sur l'activité antibactérienne de ces composés dans le but de trouver des molécules efficace contre les maladies des cultures végétales, notamment, la pourriture molle de la pomme de terre et de remplacer les pesticides chimiques utilisés.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Ahmed M.F., Ahmed M.A, Thayyil H., Zameeruddin K., & M. (2008). Antioxidative Activity of *Melia Azedarach* Linne Leaf Extract. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*.7: 31-34.

Aizawa.S.I., Harwood.C.S et Kadner.R.J. (2000). Signaling components in bacterial locomotion and sensory reception. *J Bacteriol* **182**:1459-1471.

Alche L.E., Assad Ferek G., Meo M., Coto C.E., & Maier M.S. (2003). An Antiviral Meliacarpin from Leaves of *Melia Azedarach* L. *Zeitschrift fur Naturforschung*. **58**: 215-219.

Al-Mahmadi R.M & Al-Khalaf A.A. (2010). Larvicidal and histological effects of *Melia Azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (dipteral: culicidae). *Journal of King Saud University Science*. **22**: 77-85

Al-Rubae A.Y. (2009). The Potentiel Uses of *Melia Azedarach* L. as Pesticidal and Medicinal Plant, Review. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. **3(2)**: 185-194.

Anonyme, (1963), *Azadirachta indica*, A. DE JUSSIEU et *Melia Azedarach* LINNE : Caracteres sylvicoles et methodes de plantation, *revue Bois et forets des tropiques*, **88**: 23-30.

Anonyme, (2002). Les tubercules de pomme de terre risque de pourrit, article en ligne, RTBF

B

Bailey KL, Boyetchko SM et Lãngle T. (2009). Social and economic drivers shaping the future of biological controle: A Canadian perspective on the factors effecting the development and use microbial biopesticides. *Biological control*. **52**: 221-229.

Biswas K., Chattopdhyay I., Benerjee K.R., & Bandyopadhyay U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Sciense*. **82(11)**: 1336-1345.

Boughammoura.A. (2012). Contrôle de l'homéostasie du fer au cours du cycle infectieux d'*Erwinia chrysanthemi* 3937 ; these pour obtenir le grade de docteur en sciences ; Université Paris 11.

Bounechada M. & Fenni M. (2007). Laboratory evaluation of *Melia Azedarach L.* extracts on *Oncideria volxemi* Bolivar (Orthoptera, Pamphaginae) adults. *African Crop Science Conference Proceedings*. **8**: 10-11.

Browning, D.R. (1971). Chromatographie. *Edition.masson et cie*, paris **6**: 5-75.

C

Carpinella M.C., Miranda M., Almiro'n W.R., Ferrayoli C.G., Almeida F.L., & Palacios S. M. (2007). In vitro pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia Azedarach L.* *American Academy of Dermatology*. **56 (2)**: 250-275.

Cella M., Riva D.A., COulombie F.C., & Mersich S. E. (2004). Virucidal activity presence in *Trichilia glabra* leaves. *Revista Argentina de Microbiologia*. **36**: 136-138.

Chantal J. & Efat A-F.H. (2003). The efficacy of enhanced aqueous extracts of *Malia Azedarach* leaves and fruit integrated with the *Camptotylus reuteri* releases against the sweet potato whitefly nymphs. *Bulletin of Insectology* **56 (2)**: 269-275.

Chaturvedi P. & Segale M. (2007). Effets of different types of water decoctions of fruit of *Melia Azedarach* on glucose induced hyperglycemia, liver transaminases, lipid peroxidation and reduced glutathione in normal albino rats. *Scientific research and essay*. **2 (9)**:384-389.

Chiffelle G.I., Huerta F.A., & Lizana R.D. (2009). Physical and chemical characterization of *Melia Azedarach L.* fruit and leaf for use as botanical insecticide o. *Chilean Journal of Agricultural Research*. **69 (1)**: 38-45.

Coria C., Almiron W., Valladares G., Carpinella C., Luduen –a F., Defago M., & Palacios S. (2008). Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia Azedarach L.* on *Aedes aegypti* (L)? (Diptera:Culicidae). *Bioresource Technology*. **99**: 3066-3070.

Czajkowski,R, Grabe.G, van der Wolf.J.M. (2009). Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium Carotovorum* Subsp. *Carotovorum* in naturally infected seed potatoes; *European Journal of Plant Pathology* , **125(3)**: 263-275.

D

Defago M. Valladares G. Banchio E. Carpinella C., & Palacios.S. (2006). Insecticide and antifeedant activity of different plant parts of *Azedarach* on *Xanthogaleruca Luteola* *Fitoterapia* **77**: 500-505.

E

EL-Maarouf,H., Barny,M.A, Rona,JP. et Bouteau,F.(2001). Harpina hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett*; **497**:82-84.

Expert,D.(1999). Withholding and exchanging iron: interactions between *Erwinia spp.* and their plant hosts.*Annu Rev Phytopathol* **37**: *in press*.

F

Faye.M. (2010). nouveau procédé de fractionnement de la graine de neem (*Azadirachta Indica A.Jussi*) senegalais : Production d'un bio-pesticide d'huile et de tourteau, Sciences des Agroressources , Institut National Polytechnique de Toulouse.

G

Gallois.A, Samson.R., Ageron.E. And Grimont,P.(1992). *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., Associated with Odorous Soft Rot of Chicory (*Cichorium intybus L.*); *international journal of systematic bacteriology* ; Institut National de la Recherche Agronomique, France ; Vol. 42, N° 4: 582-588

Garden, L., Gouy,C., Christen,R. & Samson,R.(2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.**53**: 381-391.

Gilman.E.F. et Watson.D.G. (1994). *Melia Azedarach*: Chinaberry.Fact Sheet ST-406, Université de Floride.

Gulçin,I., Uguz,M.T.,Oktay,M., Beydemir,S. Et Kufrevioglu,O.I. (2004) evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia Sclaria L.*) *Turk J Agric For*, **28**:25-33.

H

Hajaniaina,O. (1996). le faux neem(*Melia Azedarach*) et son utilisation a Madagascar ; documentation déposé ; Projet DPV/GTZ « promotion de la protection intégrée des cultures et des denrées stockées a Madagascar » : 158-163

Hauben,L., Moore,E.R.B., Vauterin,L., Steenackers,M., Mergaert,J., Verdonck,L. and Swings. (1998). phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst.Appl.Microbiol.***21**: 384-397.

Hélias.V. (2008). *Pectobacterium spp.et Dikeya spp.* de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia spp.*, syptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. *Cah Agric* ; **17**:349-54.

Hibar,K., Remadi,D., and El Mahjoub,M. (2007). First report of *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* on tomato plants in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection* **2**: 1-5.

Hoyos M.E., Stanley C.M., He S.Y., Pike S., Pu X.A. et Novacky A. (1996). The interaction of harpin (Pss) with plant cell walls. *Mol Plant Microb Interact* **9**: 608-616.

J

Josenhans C. et Suerbaum S. (2002). The role of motility as a virulence factor in Bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 605-614.

K

Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L. Et Vergnes M.F. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytotherapie*, **6**:160-164.

Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. S. (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. Ouagadougou. 8-11.

Kiat T.K. (1969). *Melia azedarach* poisoning. *Singapore Medical Journal*. **10 (1)**:24-28.

L

Lallemand, M. (2011) ; Dissection des interactions entre les composants du système de sécrétion de type II chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) ; Thèse pour obtenir Le grade de docteur Lyon ; UMR 5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie.

Latour X., Faure D., Diallo S., Cirou A., Smadja B., Dessaux Y., Orange N. (2008). Lutte contre les maladies bactérienne de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*).

LAUTIER T. (2007). Rôle de la protéine associée au nucléoïde Fis dans le contrôle de la virulence chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*. 2007-ISAL-0116. pp19-36 :71-84.

M

Maciel M.V., Morais S.M., Bevilaqua C.M.L., Camurça-Vasconcelos A.L.F., Costa C.T.C. et Castro C.M.S. (2006). Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. **140**: 98-104.

Martini N. et Eloff J.N. (1998). The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **62**: 255-263.

Méndez M.D.C., Aragao M., Elias F., Riet-Correa F., et Gimeno E.J. (2002). Experimental intoxication by the leaves of *Melia Azedarach* (Meliaceae) in cattle. *Pesq. Vet. Bras.* **22 (1)**: 19-24.

Mulholland V., Hinton J.C., Sidebotham J., Toth I.K., Hyman L.J., Perombelon M.C., Reeves P.J. et Salmond G.P.(1993). A pleiotropic reduced virulence (Rvi-)mutant of *Erwinia carotovora subspecies atroseptica* is defective in flagilla assembly proteins that are conserved in plant and animal bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **10**:11-54.

Munir A., Sultana B., Babar T., Bashir A., Amjad M. and Ul Hassan Q. (2012). Investigation on the Antioxidant Activity of Leaves, Fruit and Stem Bark of Dhraik (*Melia azedarach*) ; *European Journal of Applied Sciences* **4**; Research Laboratory, Pakistan, **2**: 47-51.

N

Ntalli N.G., Cottiglia F., Bueno C.A., Alché L.E., Leonti M., Vargiu S., Bifulco E., Menkissoglu-Spiroudi U. et Caboni P. (2010). Cytotoxic Tirucallane Triterpenoids from *Melia Azedarach* Fruit. *Molecules*. **15**: 5866-5877.

P

Perombelon M. (2002). Potato diseases caused by soft rot *Erwinia*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* **51**: 1-72.

S

Sagoua W. (2009). Etude synergique du couplage du Système Lactoperoxydase avec d'autres molécules naturelles actives ayant des propriétés antifongiques pour l'amélioration de la conservation en frais des bananes, thèse pour obtenir le grade de docteur en sciences de L'université d'Avignon et des pays de Vaucluse, Marseille

Saika A.P., Ryakala V.K., Sharma P., Goswami P., et Bora U.(2006). Ethnobotany of medicinal plants used by Assamese people for various skin ailments and cosmetics. *Journal of Ethnopharmacology*. **106**:149-157.

Samson R., Legendre J.B., Christen R., Fischer-LeSaux M., Achouak W., & Gardan L. (2005). Transfer of *pectobacterium chrysanthemi* and *brenneria paradisiaca* to the genus *Deckeya chrysanthemi* comb.nov and *Deckeya paradisiaca* comb.nov and delineation of four novel species, *Deckeya dadantii* sp nov., *J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**: 1415-1427.

Sen,A. (2012). *In vivo* and *in vitro* comparative study of total phenol content and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. *Antara Sen and Amla Batra; Journal of Pharmacy Research Rajasthan*, **1**: 47-50.

Senthil Nathan S. (2006). Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée)(Lepidoptera:Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*.**84**:98-108.

Sepulchre J-A., Reverchon,S. and Nasser,W.(2007): Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *Journal of Theoretical Biology* **244**:239-257.

Sine J. P. (2003). Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Marketing S A, *Ellipses editions*, Paris, 99-101.

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

Snaiki,J., Nadif,A., Ouhssine,M. (2006). détection biochimique *D'erwinia Carotovora Subsp.Carotovora* de tubercules de betterave sucrière atteints de pourriture molle ; *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, Maroc* ; **145**: 53-60.

Starr M.P., et Mandel M. (1962). DNA base composition and taxonomy of phytopathogenic and other enterobacteria. *J.Gen. Microbiol.* **56**:113-123.

Suresh K., Deepa P., Harisaranraj R., et Vaira Achudhan V., 2008. Antimicrobial and Phytochemical investigation of the leaves of *Carica papaya* L., *Cyndon dactyl o (L) Pers.*, *Euphorbia hirta* L., *Melia azedarach* L. and *Psidium guajava* L. *Ethnobotanical Leaflets.* **12**: 1184-1191.

T

Tavasoli E., Marefat A.R. and Hassanzadeh N. (2011). Identity and genetic diversity of *Pectobacterium spp.*, causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran ; *Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Academic Journals* ; ISSN 1996-0824

Timbo B. (2003). Etude phytochimique et des activités biologique de *Trichilia emetica Vahl (Meliaceae)*.Thèse de Docteur en Pharmacie, Université de Bamako, Mali.112p.

V

Van Vaerenbergh J. (2012). “*Erwinia*” et Co: la pomme de terre dans la purée. Institut voor Landbouw-en visseryonderzoek.

Van Vuuren S.F. (2008). Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**: 462-472.

Viqar Khan A., Uddin Ahmed Q., Mir M.R., Shukla I., Khan A.A. (2011). Antibacterial efficacy of the seed extracts of *Melia azedarach* against some hospital isolated human pathogenic bacterial strains, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 452-455.

W

Wassenaar T.M. et Gaastra W. (2001). Bacterial virulence: can we draw the line? *Microbiol Lett* **201**:1-7.

Wlodarczyk A. (2010). Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l’induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*) ; Thèse pour obtenir le grade de Docteur ; L’Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

X

Xie Z. et Chen Z. (2000). Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**:183-190.

Y

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. Thèse de Doctorat en sciences et technologie des aliments. Université Laval, *Faculté des sciences de l’agriculture et de l’alimentation, Québec, Canada.*

Yaganza E.S., Rioux D., Simard M. et al. (2004). Ultrastructural alterations of *Erwinia catotovora* subsp. *Atrospica* caused by treatment with aluminium chloride and sodium metabisulfite. *Appl Environ Microbiol*; **70**:6800-8.

Yahiaoui – Zaidi R., Ladjouzi R. et Benallaoua S. (2009). Pathogenic variability within biochemical groups of *Pectobacterium Carotovorum* isolated in Algeria from seed potato tubers. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*. **1**:1-9.

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

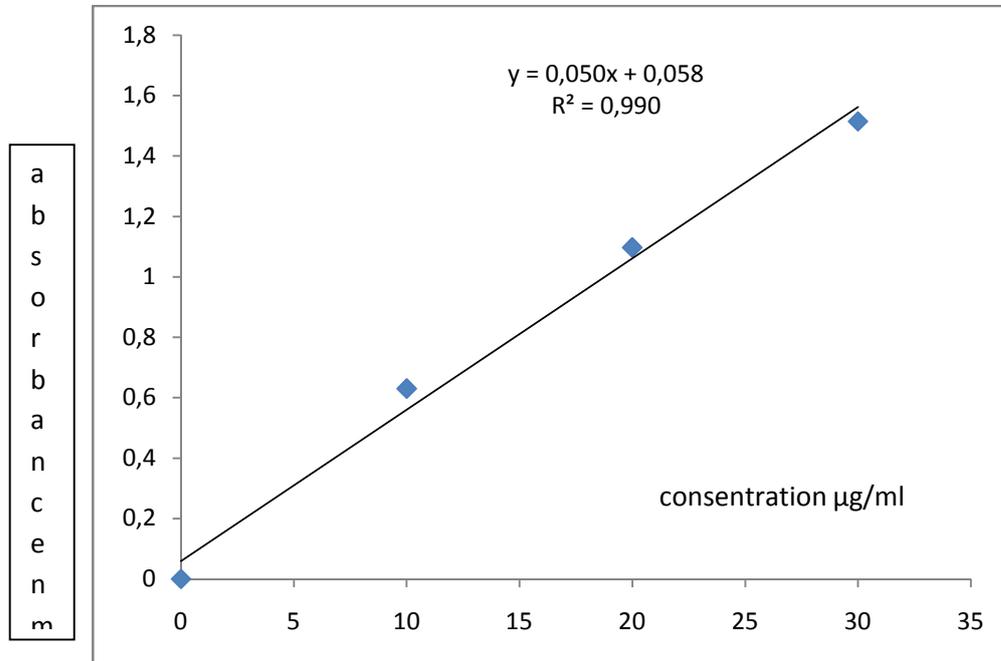
Z

Zeghad,N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale) Option : Biotechnologie végétale, *Université Mentouri Constantine*.

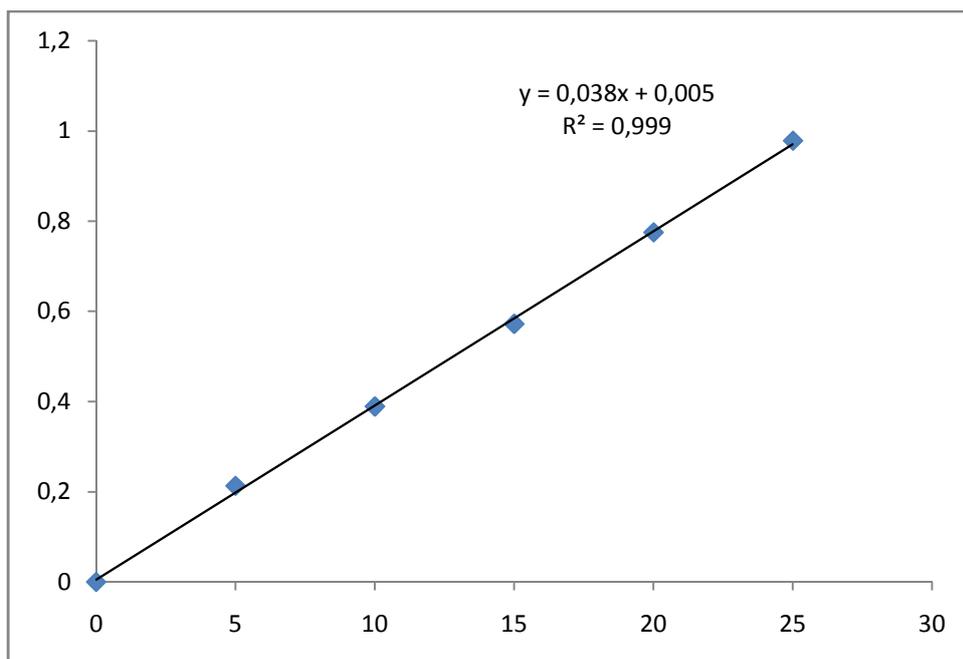
Zhu L., Xie H., Chen S. and Ma. (2010). rapid isolation, identification and phylogenetic analysis of *Pectobacterium Carotovorum* Ssp.; *Journal of Plant Pathology* , China, **2**: 479-483

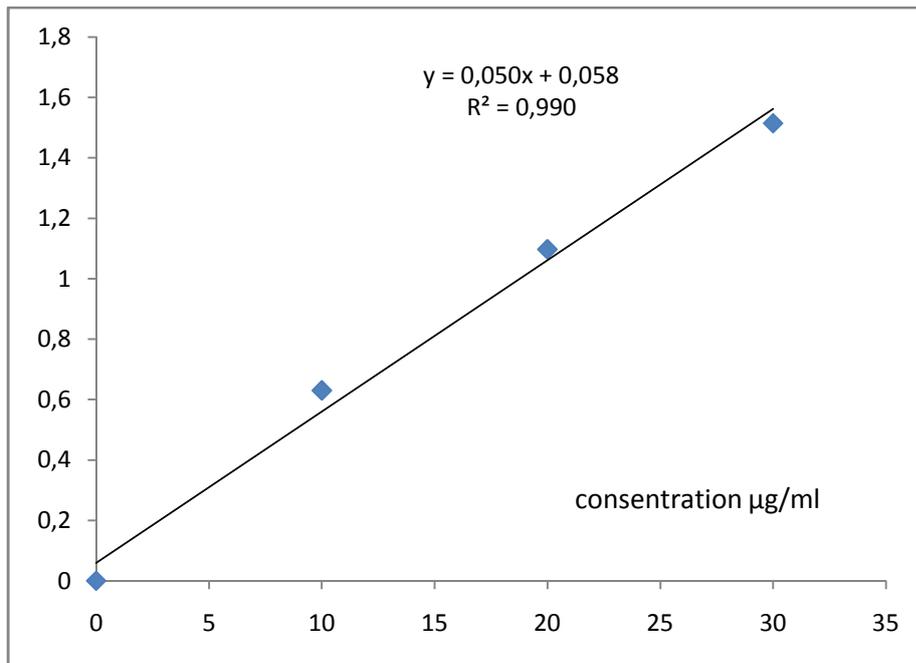
Annexe

Annexe



Annexe1 : Courbe détalonnage de l'acide gallique





Annexe2 : Courbe d'étalonnage de la quercitrine

Resumé

Erwinia est parmi les agents pathogènes les plus importants. Elle est responsable de la pourriture molle et la jambe noire qui induisent des pertes économiques considérables, ainsi qu'une dégradation de l'environnement par l'utilisation excessive des produits chimiques comme alternative de lutte. C'est pour cela les chercheurs se sont adressés à la phytothérapie et dans ce travail nous avons étudié une plante appelée *Melia azedarach* connue pour son très large éventail d'activités biologiques. Notre travail est constitué de l'analyse, le dosage et l'étude de l'activité antibactérienne contre les souches *Erwinia* de l'extrait éthanolique des feuilles de cette plante.

La ccm nous a révélé la richesse de cette plante en composés métaboliques. Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait éthanolique des feuilles de *Melia azedarach* sont de: $1,43 \pm 0,97$ mg EAG /g et $0,16 \pm 0,68$ mg EQ /g d'extrait sec, respectivement et les résultats microbiologiques ont montré que les feuilles de *M. azedarach* ont une activité antibactérienne sur la souche Pcc et non pas sur Pca et Dka.

Mots clef : *Melia azedarach*, *Pectobacterium*, ccm, flavonoïde, polyphénols, activité antibactérienne.

Abstract:

Erwinia pathogens is among the most economically important crops. It is responsible for soft rot and blackleg that cause considerable economic losses, as well as degradation of the environment through excessive use of chemicals as an alternative control. That is why the researcher is interested in phytotherapy. In this work we have studied a plant called *Melia azedarach* known for its wide range of biological activities. Our work is based on the analysis, the dosage and study of antibacterial activity against *Erwinia* strain of the ethanolic extract of the leaves of this plant.

The TLC has revealed the richness of this plant metabolic compounds, the content of polyphenols and flavonoids in ethanolic extracts of *Melia azedarach* leaves was 1.43 ± 0.97 mg EAG / g and 0.16 ± 0.68 mg EQ / g dry extract, respectively, and microbiological results showed that *M. azedarach* leaves have antibacterial activity of strain Pcc and not on Pca and Dka.

Keywords: *Melia azedarach*, *Pectobacterium*, TLC, flavonoids, polyphenols, antibacterial activity.

