

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présentée par

Saïd HACHOUD

Induction des polyphénols de défense sur plante de pomme de terre traitée par l'acide salicylique, méthyl-jasmonate, chitosane et infectée par *Pectobacterium* spp.

Soutenue le **02 Juin 2022** devant le Jury :

Mr Kati Djamel Edine

Professeur

Univ. de Bejaia

Président

Mr Zaidi Farid

Professeur

Univ. de Bejaia

Rapporteur

Mr Ouchemoukh Salim

Professeur

Univ. de Bejaia

Examineur

Mr Aissat Kamel

Professeur

Univ. de Batna 2

Examineur

Année Universitaire : 2021/2022

En mémoire de mon père.

Tu n'es plus là où tu étais mais tu es partout là où je suis.

Que dieu t'accueille dans son vaste paradis.

“It does not matter how slowly you go as long as you do not stop.”

(Confucius, Chinese philosopher, 551 BC- 479 BC).

REMERCIEMENTS
ET
DÉDICACES

REMERCIEMENTS & DÉDICACES

Hommage

Je rends un vibrant hommage à ma défunte professeur YAHIAOUI-ZAIDI Rachida. Que dieu l'accueille dans son vaste paradis.

Remerciements

Mes plus vifs remerciements sont adressés au professeur *ZAIDI Farid* pour son aide précieuse en acceptant de prendre le relai comme directeur de thèse.

Mes remerciements vont à l'ensemble des membres du jury pour leur collaboration à l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance, en l'occurrence :

- ✚ Monsieur *KATI Djamel-Edin*, professeur à l'université Abderrahmane Mira ;
- ✚ Monsieur *OUCHEMOUKH Salim*, professeur à l'université Abderrahmane Mira ;
- ✚ Monsieur *AISSAT Kamel*, professeur à l'université de Batna 2.

J'exprime ma profonde reconnaissance au professeur *Rosa Maria COSIDO VIDAL* pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de Physiologie végétale à l'université de Barcelone, faculté de pharmacie, pour m'avoir épaulé tout au long de ce travail.

Je remercie les membres du conseil scientifique de l'université de Bejaia ainsi que le conseil scientifique de la faculté des Science de la Nature pour leur souci d'équité en particulier, le Professeur *TOUATI Abdelaziz*.

Mes profonds respects vont à mes professeurs de l'université de Bejaia pour leur travail, leurs sacrifices, leur disponibilité en particulier Pr. *MADANI Khouder.*, Pr. *OUCHEMOUKH Salim.*, Pr. *BEDJOU F.*, Dr. *KHETAL Ch*, ...

Mes remerciements vont également à toute l'équipe du laboratoire de Physiologie végétale à l'université de Barcelone, faculté de pharmacie : Professeur *Javier PALAZON*, Professeur *Mercè BONFILL* pour son aide dans la réalisation des cultures in-vitro des plantes.

Une grand merci à mes amis : Soraya *CHERFIOUI*, Mohamed *DJAOUUD*, Lounis *TOUATI*, Nourdine *ABARBOUR*, Farouk *BOUAKLIN* et Syfax *AOUKOUR*.

Une attention particulière à *Rosario* et sa fille *Yasmine* qui m'ont accueilli dans leur maison et pour la confiance qu'elles ont mis en moi, muchas gracias.

À tous mes amis de Barcelone à *Karla RAMIREZ-ESTRADA*, *Herberto Hidalgo VIDAL-Limon*, *Anna GALLIGO*, *diago HIDALGO*, *Raul SANCHEZ-MUNOZ*, *Patricia VIEIRA*, *Vincenzo De ROCCHIS* qui ont rendu cette belle aventure plus agréable.

REMERCIEMENTS & DÉDICACES

Je remercie de même toute l'équipe du laboratoire de d'analyse biochimie du parc scientifique de Barcelona, plus particulièrement *Eva Maria DEL ALAMO* de la Plataforma de Química y Análisis (PQA-PCB) pour m'avoir bien accueilli dans leur laboratoire et de m'avoir appris avec rigueur les analyses de caractérisation et d'identification de molécules bioactives.

Enfin, Je tiens à remercier le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien et l'université de Bejaia, qui m'ont accordé un stage de perfectionnement à l'étranger pour finaliser ma thèse.

REMERCIEMENTS & DÉDICACES

Dédicaces

Je dédie ce travail : I YEMMA, d kem id-kulci, toi, qui es toujours à mes côtés dans le bien et dans le pire, à tort ou à raison. Reste toujours belle d'âme et d'esprit.

À ma chère femme qui a toujours su m'écouter, m'épauler et me supporter dans toutes les conditions. Grade ton beau sourire sur ton visage éternellement.

À mon amour, à ma joie et à la lumière de ma vie, ma jolii adorable fille Damia la princesse.

À ma sœur Zakia, sa fille Dassine et son mari Boualem ;

À mes douces sœurs Kahina et kenza ;

À mon père, que la terre te soit légère.

SOMMAIRE

Sommaire

Synthèse bibliographique

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Synthèse bibliographique : Chapitre I

Chapitre I :

I. Pomme de terre et pathologies	5
I.1. Description de la plante de pomme de terre	5
I.2 Valeur nutritionnelle	6
I.3 Importance économique	6
I.4 Pathologies de la pomme de terre	7
I.5 Symptômes de la pourriture molle et de la jambe noire	8
I.5.1. Description et taxonomie	8
I.5.2. Symptômes	8
I.5.3. Déterminants de la pathogénicité et résistance	9
I.5.4. Management	10

Synthèse bibliographique : Chapitre I

Chapitre I : Les mécanismes de défense des plantes

II.1 Défense passive	11
II.1.a Défense structurale	11
II.2.b Défense chimique	11
II.2 Défense active	11
II.2.a Mécanismes de résistance chez les plantes	11
II.2.b Reconnaissance spécifique et concept gène-pour-gène.....	12
II.2.c Reconnaissance non spécifique	13
II.2.d La résistance systémique induite	15
II. 3 Voix de transduction de signal	15
II.3.a Perception du signal	15

II.3.b Transmission du signal	16
➤ signalisation précoce	16
➤ Protéines G	19
➤ Voie de l'acide jasmonique	21
➤ Voie de l'acide salicylique	24
II.4. Stratégie de résistance	27
II.4.a Renforcement de la paroi de la cellule hôte	27
II.4.b Production des protéines PR	28
II.4.c Les métabolites secondaires	29
II.4.c.1 Phytoalexines	29
II.4.c.2 Phénylpropanoïde et voie de biosynthèse	30
➤ Voie Malonate	30
➤ Voie du shikimate	31
➤ La voie générale des phénylpropanoïdes	33
➤ Synthèse de l'acide chlorogénique	33
➤ Lignine	35

Partie expérimentale : PARTIE I

I. Matériel et méthodes	38
I.1. Matériel végétal	38
I.2. Culture de cal	38
I.3. Cultures cellulaires en suspension	38
I. 4. Chitosane	39
I.5. Préparation des parois cellulaires bactériennes	40
I.6. Concept expérimentale	41
I.7. Extraction et quantification des métabolites secondaires	41
I.7.1. Extraction	41
I.7.2. Composés phénoliques totaux	42
I.7.3. Détermination des composés phénoliques par HPLC	42
I.8. Essai sur les protéines et le PAL	43
I.8.1. Protocole d'extraction	43
I.8.2. Quantification des protéines	43

I.8.3. Activité PAL	43
I.9. Analyses statistiques	44
II. Résultats	
II.1. Croissance cellulaires	45
II.2. Accumulation en phénols totaux solubles (PTS)	45
II.3. Teneur en composées phénoliques	49
➤ Acide gallique ($\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW)	49
➤ Acide chlorogénique ($\mu\text{g/g DW}$).....	49
➤ Pyrocatechol ($\mu\text{g/g DW}$)	52
➤ Acide <i>p</i> -coumarique ($\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW)	54
➤ Acide caféique ($\mu\text{g/g X}10^{-1}$ DW)	56
➤ Quercétine ($\mu\text{g/g DW}$)	56
II.4. Teneur en protéines.....	58
II.5. Activité PAL.....	61
III. Discussion	63
IV. Conclusion	66

Partie expérimentale : PARTIE II

I. Matériels et Méthodes

I.1 Matériel végétal	67
I.2 Culture de pomme de terre sur pots	67
I.3 Micro-propagation <i>IN VITRO</i> de pomme de terre	67
I.4 Acclimatation de plantes de pomme de terre dans vermiculite et Sable ...	68
I.5 Dispositif expérimental	69
I.6 Purification de chitosane	70
I.7 Préparation des bactéries	71
I.8 Détermination de l'acide phénolique par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	71 72
✓ Extraction	72
✓ Acides phénoliques individuels	72
I.9 Analyses statistiques	73

II. Résultats

II. RÉSULTATS.....	74
II.1 Etudes des paramètres de croissances	74
II.1.a Symptômes de l'infection bactérienne sur les deux variétés de plantes de pomme de terre	74
II.1.2 Effet de la stimulation sur la croissance des plantes de pomme de terre	75
✓ Red-Pontiac	75
✓ Agata	76
II.3 Effet de l'infection sur la croissance sur les deux variétés de plantes de pomme de terre	77
✓ Red-pontiac	77
✓ Agata	78
II.4 Effet combine de la stimulation et de l'infection	79
✓ Red-pontiac	79
✓ Agata	80
II.5 Accumulation de composés phénoliques	81
II.5.1 Effet de la stimulation sur l'accumulation des composés phénoliques sur la variété.....	83
✓ Red-Pontiac	83
✓ Agata	86
II.5.2 Effet de l'infection sur l'accumulation des composées phénoliques sur la variété	86
✓ Red-Pontiac	86
✓ Agata	87
II.5.3 Effet combiné de la stimulation et de l'infection sur la variété	87
✓ Red-Pontiac	88
✓ Agata	89
III. Discussion	92
IV. Conclusion	98
CONCLUSION GÉNÉRALE	99
V. Références	101

ABRÉVIATIONS

Liste des abréviations

[U-14C]Phénylalanine L-phénylalanine, uniformément marquée au C-14. La 14C-L-z phénylalanine est couramment utilisée dans les études sur le métabolisme de la phénylalanine, l'absorption d'acides aminés et la synthèse des protéines.

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AHL : N- acylhomoserine lactone

AOS : Allene oxide synthas

AP : Apoplast

At : *Arabidopsis Taliana*

ATPase : Adénosine triphosphatase

B

BA2H : benzoic acid 2-hydroxylase

C

C4H : Cinnamate 4-hydroxylase

CAD : cinnamyl alcohol dehydrogenase

CCoAOMT : caffeoil-CoA O-methyltransferase

CDPK Ca^{2+} : Dependant protein kinases

CERK1 : Chitin elicitor récepteur kinase 1

Cf : Cladosporium fulvum gene

CGA : Chlorogenic acid

CoA : Coenzyme A

COI1 : *Coronatine insensitive 1*

COMT : Caffeic acid O-methyltransferase

E

EDS1 : Enhanced Disease Susceptibility 1

EF-Tu : Elongation Factor Thermo Unstable

EFR : Elongation Factor RECEPTOR

ETH : Éthylène

F

F-box : complexe récepteur factor box

FLS : flagellin-sensitive

G

GEFs : Guanine nucleotide exchange factors

GPCR : G protein-coupled receptors

H

HCT: Hydroxycinnamoyl transferase Hydroxycinnamoyl CoA: shikimate

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

HR : Hypersensibilité

HRGP : Hydroxyproline riches glycoprotéine

I

InsP5 : Pentakisphosphate

J

JA-Ile : JA-isoleucine

JAR1 : Jasmonate resistant 1

JAZ : Jasmonates Zim domain

JMT : Jasmonic carboxyl acid méthyltransférase

L

LPS : Lipopolysaccharides

LRR-RLK : Leucine-Rich Repeat- Receptor Link kinases

M

MAMP : Microbe Associated Molecular Pattern

MAPK : mitogen-activated protein kinases

MeSA : salicylate méthyle

N

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NPR1 : Non expressor of Pathogenesis-Related Genes1

P

PAD4 : Phytoalexin Deficient 4

PCWD : Plant cell wall-degrading enzymes

PGPR Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PRR : Pattern Recognition Receptors

Protéine PR : Pathogenesis-Related Protein

R

RLA : Résistance locale acquise

RSI : Résistance systémique induite

S

SAGT : SA-glucosyltransférases UDP-Glc

SAMT1 : Carboxyl méthyltransférase 1

SGT1 : Salicylic acid glucosyltransferase1

SOD : Superoxyde dismutase

**LISTE DES FIGURES
ET
DES TABLEAUX**

1. Liste des figures

N° Fig	Titre	Page
1	Représentation de l'appareil caulino-foliaire de la pomme de terre	5
2	Principaux pays producteurs de pomme de terre en Million de tonne par an.	6
3	Jambe noire : pourriture intérieure de la tige (A) et pourriture humide du tubercule (B)	9
4	Interprétations biochimiques du modèle gène-pour-gène	13
5	Schéma illustrant l'induction des gènes de défense	14
6	Schéma illustrant les principaux mécanismes de défense chez les plantes	17
7	Modèle simplifié de transduction du signal dans les réponses de défense des plantes.	18
8	Topologie d'un GPCR typique	20
9	Activation de la signalisation de la protéine G via la liaison d'un ligand à un GPCR	21
10	Biosynthèses de l'acide jasmonate par la voie octadécanoïde	23
11	Voie de biosynthèse de l'acide salicylique	24
12	La défense systémique déclenchée par le salicylate de méthyle (MeSA	26
13	Voie de shikimate et synthèse de phe et de tyr	31
14	Métabolisme du phénylpropanoïde chez <i>Arabidopsis</i>	32
15	Voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique	35
16	Voie générale de la synthèse de la lignine	36
17	Procédure de stérilisation et induction de Cali sur pomme de terre de la variété Agata	39
18	Extraction des LPS de <i>Pectobacterium atrosepticum</i> .	40
19	Schéma expérimentale.	41
20	Courbe de croissances en masse de suspensions cellulaire de la variété Agata en fonction de temps.	45
21	Evolution de la croissance cellulaire	47
22	Évolution de la concentration en polyphénols totaux en fonction des traitements et du temps.	48
23	Évolution de la concentration en acide gallique en fonction des traitements et du temps.	50
24	Évolution de la concentration en CGA en fonction des traitements et du temps.	51
25	Évolution de la concentration en pyrocatechol en fonction des traitements et du temps.	53
26	Évolution de la concentration en acide <i>p</i> -coumarique en fonction des traitements et du temps.	55
27	Évolution de la concentration en l'acide caféique en fonction des traitements et du temps.	57
28	Évolution de la concentration en quercétine en fonction des traitements et du temps.	59
29	Évolution des concentrations protéiques en fonction des traitements et du temps.	60

30	Évolution de l'activité de la PAL en fonction des traitements et de temps.	62
31	Echantillons de tubercule de pomme de terre utilisés pour la culture.	67
32	Pots de culture de pomme de terre dans une chambre de contrôle.	68
33	Stérilisation et micro-propagation in vitro de pomme de terre	69
34	Acclimations des plantes de pomme de terre	70
35	Schéma expérimentale de la stimulation et l'inoculation de plante	71
36	Feuilles de <i>S. tuberosum</i> cv Red-Pontiac après inoculation avec Pc-5890	74
37	Feuilles de <i>S. tuberosum</i> cv AGATA après inoculation avec Pc-5890	75
38	Évolution des paramètres de croissance sous l'effet des éliciteurs chez Agata	76
39	Evolution de la croissance en poids.	77
40	l'effet de l'infection sur évolution des paramètres de croissance chez la variété Red-Pontiac	78
41	L'effet de l'infection sur évolution des paramètres de croissance chez la variété Agata	79
42 a	Profile chromatographiques des échantillons Agata correspondant au témoin	81
42 b	Profile chromatographiques des échantillons Red-Pontiac correspondant au témoin.	82
43a	Accumulation de l'acide gallique dans les deux variétés de pomme de terre	83
43b	Accumulation de l'acide chlorogénique	84
43c	Accumulation de pyrocatechol	84
43d	Accumulation de l'acide caféique	85
43e	Accumulation de l'acide p-coumarique	88
43f	Accumulation de l'acide férulique	89
43g	Accumulation de la quercétine	90
44	Oxydation de l'acide chlorogénique par la polyphénoloxydase (PPO)	95

2. Liste des tableaux

tableaux	Titre	Page
1	Corrélations Agata	95
2	Corrélations Red-Pontiac	96

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction Générale

Les productions agricoles sont sous l'influence de nombreux facteurs : Situation économique générale et autres nombreux risques dont les maladies des plantes responsables en moyenne de 20 à 30% des pertes annuelles de la production agricole mondiale (FAO, 2001). Afin d'optimiser la production, les agriculteurs ont recours à l'utilisation de fertilisants et de pesticides : herbicides, insecticides et fongicides (Walters et Hardwick, 2000). Selon Cherin et al., (2012), ces produits phytosanitaires se caractérisent par une toxicité d'intensité variable pour l'Homme et peuvent avoir de graves conséquences sur l'organisme, même avec une faible exposition: infertilité masculine chez le rat (Elbetieha et al., 2001) ; cancers et perturbations neurologiques chez l'Homme (Alavanja et al., 2004) et graves malformations congénitales (Ueker et al., 2016). Des contaminations importantes des eaux superficielles par les pesticides sont fréquemment observées : 37% des eaux brutes et 25% des eaux distribuées en France selon Arousseau et al., (1998).

Pour assurer une production biologique qui tient compte de la protection de l'environnement, de nouvelles stratégies de lutte contre les ravageurs et les maladies des plantes sont recherchées et mises au point.

En effet, les maladies des plantes sont l'un des obstacles les plus inquiétants pour la production agricole pouvant entraîner des pertes importantes pour les agriculteurs et menacer la sécurité alimentaire. Parmi ces cultures à risques, nous pouvons citer le blé, l'orge, le maïs, la pomme de terre,... etc.

La pomme de terre représente la quatrième culture mondiale avec une production de 368,30 millions de tonnes par an en 2019. Originaire de l'ancien empire Inca (autour du lac Titicaca entre la Bolivie et le Pérou), la pomme de terre a été introduite en Europe aux 16 siècles par la société des Andes (De Jong et al., 2011) ; en Afrique (Égypte, Malawi, Afrique du Sud, Algérie, Nigéria ...), la pomme de terre a été introduite par les colons. Les pays développés sont les principales régions productives de la pomme de terre dans le monde. En revanche, les pays sous-développés la production (Afrique, Amérique latine, le Proche-Orient) est nettement inférieure et représente moins de 10 % de la production mondiale.

La pomme de terre est un légume qui se cultive facilement sur une longue période de l'année. Néanmoins, les pommes de terre sont la cible de nombreux ravageurs et maladies parmi

lesquelles le mildiou, le doryphore, le taupin, la gale commune, l'alternariose, le rhizoctone et autres, réduisant dramatiquement les récoltes et la qualité des tubercules.

D'autres phytopathogènes bactériens tels que les *Pectobacterium* spp, et autres *Enterobacteriaceae* sont potentiellement nuisibles sur les cultures de pomme de terre en développant des pourritures molles ou des jambes noires (Yahiaoui-Zaidi et al., 2010). Ces bactéries peuvent survivre dans les sols d'où elles sont transmises aux plantes par l'eau, par les insectes ou par les techniques culturales. Leurs activités pathogènes sont caractérisées par une désintégration rapide des tissus parenchymateux, principalement, induite par les enzymes pectinolytiques (Taiz et Zeiger, 2002 ; Rendina et al., 2019).

Ces bactéries sécrètent l'ensemble des enzymes lytiques (Pectate lyases, pectinases, polygalacturonase, cellulase, protéase, etc.) dont l'activité est responsable des symptômes de macération observables sur les plantes et sur les tubercules (Yahiaoui-zaidi et al., 2010). Khayi, (2015) note qu'il existe d'autres mécanismes importants participant au pouvoir pathogène des *Pectobacterium* spp : mobilité, formation de biofilm, chimiotaxisme et acquisition du fer via la production des sidérophores (chélateurs de fer synthétisée et sécrétées par des micro-organismes).

En réponse aux attaques par les multiples agresseurs, les plantes ont développé des systèmes de protection tels que les barrières physiques et chimiques dont des métabolites secondaires variés pour arrêter la progression du pathogène (Heath, 2000 ; Thordal-Christensen, 2009). Selon Jourdan et al., (2008), ce phénomène d'induction de la résistance implique le déclenchement de cascades d'événements métaboliques et la mobilisation des mécanismes de défense constitutifs. Balmer et Mauch-Mani, (2012) et Pathan et al., (2004) notent que le système est alerté par des signaux déclencheurs qui activent une ou plusieurs réactions de défense pour se protéger du stress (biotique ou abiotique).

Le stimulus est transféré de la membrane à la cellule par un système de transduction de signal produisant des changements qui conduisent à la formation de composés de défense endogènes tels que les phytoalexines et les composés phénoliques (Baenas et al., 2014).

Les jasmonates (JAs) sont des molécules de signalisation spécifiques aux plantes qui activent plusieurs processus physiologiques et de développement importants (Farmer et al., 2003). Les JAs, en particulier le méthyl jasmonate (MeJa), jouent un rôle important dans les

processus de transduction du signal qui régulent les gènes de défense des plantes (Farmer et Ryan, 1990).

L'acide salicylique (SA) est une petite molécule jouant un rôle essentiel dans le système de régulation de la défense chez les plantes. Il est connu dans l'induction de résistance systémique acquise à de nombreux agents pathogènes (Durrant et Dong, 2004 ; Hayat et al., 2010 ; Pieterse et van Loon, 1999). Le signal se propage ensuite vers d'autres parties de la plante et provoque diverses réactions de défense, notamment la production de métabolites secondaires et des protéines de résistances (PR) (Vicente et Plasencia, 2011 ; Wasternack et Hause, 2013).

Rinaudo, (2006) rapporte que le chitosane est largement utilisé pour imiter les stress biotiques et abiotiques et dans l'induction du système de défense dans les fruits et légumes (avant et après la récolte) contre les champignons, les bactéries, les virus et autres stress abiotiques. De même, le chitosane améliore efficacement les propriétés physiologiques des plants et prolonge également la durée de conservation des produits après récolte. Le traitement au chitosane régule plusieurs gènes dans les plantes, en particulier, l'activation des voies de signalisation de défense des plantes : induction des phytoalexines et des protéines liées à la pathogénèse (PR) (Sharif et al., 2018 ; Rendina et al., 2019 ; Vanden Braber et al., 2020).

Ce travail traite de la stimulation des réactions de défenses sur de plants et sur des suspensions cellulaires de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Deux variétés Agata et Red-Pontiac ont été sélectionnées pour leur importance économique (large consommation, transformation industrielle) et leur réactivité vis-à-vis des agressions (La variété Agata est sensible à l'infection, tandis que Red-Pontiac est considérée comme résistante aux agents pathogènes).

Dans une première étape, nous allons présenter un état des lieux à la lumière des connaissances acquises dans ce domaine ; cette étape est suivie d'une étude expérimentale qui comporte, à son tour, deux parties :

Une partie consacrée à l'étude de l'effet du chitosane et des LPS's de *Pectobacterium* sur des suspensions cellulaires de pomme de terre. Nous nous focalisons sur l'induction de la voie des phénylpropanoïdes via l'induction de la PAL et la recherche de composés phénoliques accumulés.

Une partie consacrée à l'effet d'éliciteurs exogènes liés au stress (le méthyl-jasmonate, l'acide salicylique et chitosane) sur d'une part la croissance et la résistance à l'infection par

les *Pectobacterium* spp et d'autre part sur l'accumulation de composés phénoliques induits par ces éliciteurs, avant et après infection de plants de pomme de terre par les *Pectobacterium*.

Nous terminerons cette étude par une conclusion générale suivie de recommandations-perspectives.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE
CHAPITRE I
POMME DE TERRE ET PATHOLOGIES

I. Pomme de terre et pathologies

I.1. Description de la plante de pomme de terre

La plante de pomme de terre est constituée de deux parties (Figure 1) : partie aérienne et partie souterraine. La partie aérienne est composée de multiples tiges principales généralement ailées. Les feuilles sont alternes, elles comportent de 7 à 15 grandes folioles latérales qui se distinguent selon leur mode d'insertion sur le rachis. Les folioles primaires flanquées (lancées) de folioles secondaires, intercalaires et de foliolules (Delaplace, 2007). Les tiges peuvent être vertes, violettes ou marbrées. Les fleurs sont souvent stériles donc la production de fruits (baie sphérique) est donc généralement rare (Kechid, 2005). La partie souterraine constituée d'un tubercule mère desséché, les stolons portent au niveau de leur région subapicale des tubercules fils et des racines adventives. Il constitue la partie la plus importante de la plante puisqu'on y trouve les tubercules qui représentent environ 75 à 85 % de la matière sèche totale de la plante, ce qui confère à la pomme de terre sa valeur alimentaire (Bernhards, 1998 ; Delaplace, 2007).

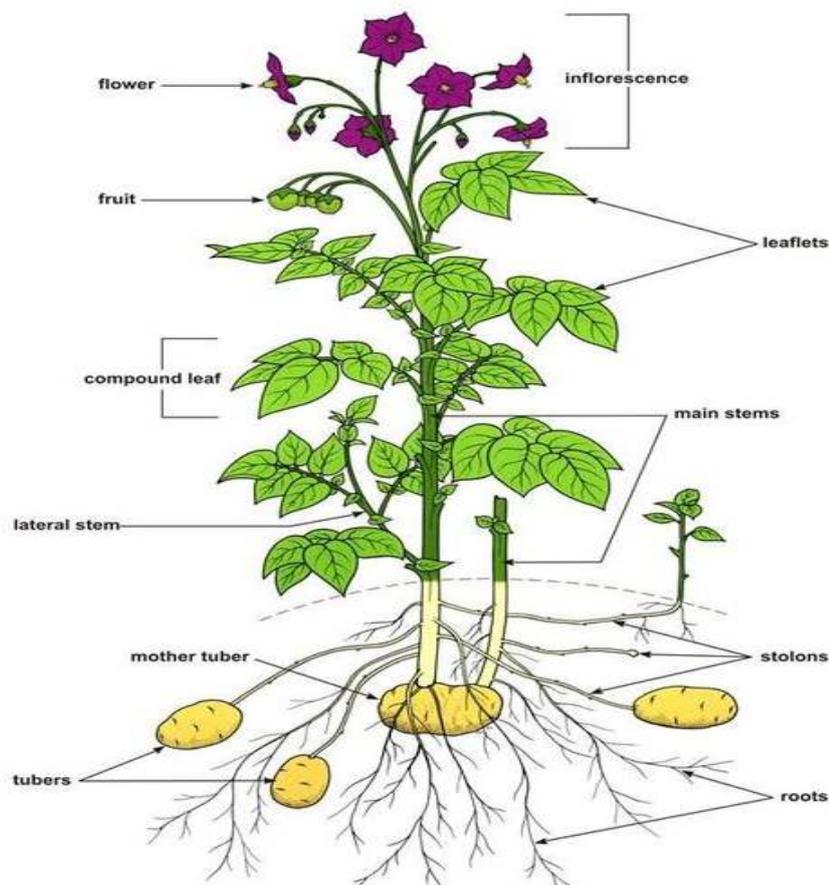


Figure 1 : Représentation de l'appareil caulino-foliaire de la pomme de terre (FAO, 2009).

I.2 Valeur nutritionnelle

Le tubercule de pomme de terre se compose de 80% d'eau et 20 % de matière sèche. Elle est connue pour sa richesse en amidon, environ 60 à 80 % de son poids sec. Sa teneur en protéine est égale à celle des céréales et elle est très élevée par rapport aux autres racines et tubercules. Mais, elle est très pauvre en lipides. Elle est riche en micronutriments (Vanderhofstadt et al., 2009). C'est une source de vitamines B1, B2, B3, B5, B6 et B9 ainsi que la vitamine C. Elle contient, en outre, des sels minéraux comme le potassium, le phosphore et le magnésium. Les pommes de terre renferment, par ailleurs, des antioxydants utiles dans la prévention des maladies liées au vieillissement et des fibres alimentaires essentielles au métabolisme (Lahouel, 2015).

I.3 Importance économique

La consommation mondiale de pommes de terre n'arrête pas d'augmenter. En 2009, la production mondiale est de 217,3 millions de tonnes (Figure 2). Autrefois, la pomme de terre fraîche était la base de la consommation de ce légume mais la croissance de la population urbaine a fait qu'elle est orientée vers les produits transformés (Déziel et al., 2014). Ceci est expliqué par la croissance de demande sur le marché international. Sur 3850 millions de tonnes de pommes de terre produites en 2014, la Chine est en tête avec 25% de la production mondiale suivie par l'Inde avec 12 % et la Russie avec 8 %. L'Algérie, quant à elle, est classée 15^{ème} sur 153 pays avec une production de 4,67 millions de tonnes par an,

(FAO, 2016).

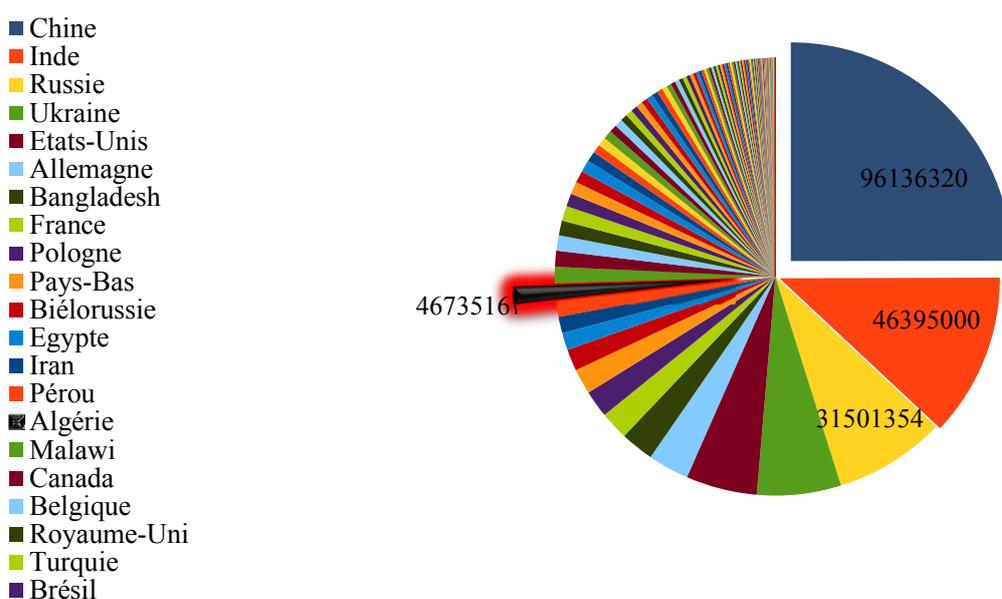


Figure 2 : Principaux pays producteurs de pomme de terre en Million de tonne par an (FAO, 2016).

I.4 Pathologies de la pomme de terre

Les pommes de terre sont sujettes à plusieurs pathologies causant d'importantes pertes de rendement d'une part, ainsi que la diminution de la qualité marchande et la valeur du produit d'autre part. Beaucoup de maladies peuvent affecter la culture de la pomme de terre à l'exemple des maladies fongiques telles que Le mildiou (*Phytophthora infestant*), rhizoctonie (*Rhizoctonia solani*) et la gale poudreuse (*Spongospora subterranea*). Ils se développent sous des températures favorables (entre 17 à 20°) couplées à une forte humidité. Ces maladies se manifestent par l'apparition de petites taches brunes sur le feuillage et le brunissement des tiges et des pétioles. Il finit par dessèchement des tubercules (Lahoual, 2015 ; Thomas, 2019).

Dans le groupe *phytovirus* pathogène, on trouve le virus x (*Potato virus X*) du groupe *Potexvirus* qui provoque des mosaïques foliaires légères (Nie et al., 2011) et virus M (*Potato virus M*) du groupe des *Carlavirus*, il provoque un enroulement mou des feuilles sommitales (feuilles en cuillère) et la formation de taches en mosaïque (Gabriel, 1988). Le virus PLRV (*Potato leafroll virus*) de la famille des *Luteoviridae* de groupe IV qui se manifeste par un léger enroulement des jeunes feuilles avec une décoloration jaunâtre et une face inférieure des feuilles tirant vers le violet (Eigenbrode et al., 2002).

Deux genres de nématodes menacent les pommes de terre : *Ditylenchus destructor* et les nématodes à kyste du genre *Globodera*. Ces petits vers parasitent le système racinaire des plants de pomme de terre ainsi que les tubercules : en cas d'attaque importante, la récolte est totalement compromise (Zheng et al., 2016 ; Chauvin et al., 2008).

Les pucerons, quant à eux, jouent un rôle de vecteurs pour de nombreuses maladies virales. Les pucerons de la pomme de terre tels que (*Macrosiphum Euphorbiae* (Thomas)), le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae* (Sulzer)), on les trouve partout dans le monde. Ils ont une grande capacité de multiplications (Metcalf et Flint, 1962). Habituellement, les plantes infestées par un grand nombre de pucerons de la pomme de terre flétrissent et leurs feuilles sont couvertes du miellat. Les pucerons attaquent surtout les fleurs et les pousses (Scurrah et al., 2005).

Plusieurs maladies bactériennes affectent la pomme de terre dans le monde et causent de graves dommages, en particulier, sur les tubercules, la partie économiquement importante de la plante. Le flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* sp. La pourriture molle et la jambe noire dues aux *Pectobacterium* spp et *Dickeya* spp sont considérées comme

les maladies les plus importantes (Rouffiange et al., 2014), tandis que la pourriture annulaire, l'œil rose et la gale commune sont des maladies mineures (Charkowski, 2020).

I.5 Symptômes de la pourriture molle et de la jambe noire

I.5.1. Description et taxonomie

Les genres *Pectobacterium* spp et *Dickeya* spp anciennement regroupés sous le genre *Erwinia*, appartiennent à la famille des *Entérobactériacées*. Ce sont des bactéries phytopathogènes Gram (-), anaérobiques facultatives ayant une forme de bâtonnet (0,5-1 µm de diamètre sur 1-3 µm de longueur) et munies de flagelles péritriches (Ahoussi, 2012 ; De Werra et al., 2015). *Pectobacterium Carotovorum* subsp *Atrosepticum* sp, *Pectobacterium Carotovorum* subsp *Carotovorum* et *Dickeya* spp sont les primaires pathogènes pour la pomme de terre. Ces espèces étaient, auparavant, classées comme *Erwinia Carotovora* subsp *Atroseptica*, *Erwinia Carotovora* subsp *Carotovora* et *Erwinia Chrysanthemi* respectivement (Panda, 2014).

Le genre *Pectobacterium* a été proposé par Waldee (1942). Les espèces incluses dans ce groupe sont les *Erwinia* pectinolytiques séparées des autres *Erwinia* (Ma et al, 2007). En cinq décennies, les *Pectobacterium* spp et *Dickeya* spp ont subi plusieurs changements de nomenclature. L'émergence de la génomique, plusieurs outils alternatifs de classification taxinomique ont été développés et basés sur l'information contenue dans la séquence génomique (Khayl, 2015 ; Sarfraz et al., 2020). Ces phytopathogènes se distinguent entre eux principalement dans l'arbre phylogénétique fait à partir des séquences de gènes uniques tels que l'ARNr 16S (Samone et al., 2005 ; Dadaşoğlu et Kotan, 2017).

I.5.2. Symptômes

La jambe noire est une nécrose de la tige qui provient de semence de tubercule planté et contaminé par le *pectobacterium* (Mantsebo et al., 2014). Les symptômes nécrotiques s'étendent souvent sur plusieurs centimètres de long sur la tige et le tissu vasculaire nécrotique à l'intérieur de la tige (Figure 3). La moelle de la tige est souvent pourrie. Les feuilles de la plante peuvent devenir jaune vif et la plante finira par se faner (flétrir) et mourir (Czajkowski et al., 2011). Les plantes infectées produisent peu ou pas de tubercules. La pectobactérie peut pénétrer dans les tubercules filles par le xylème ou par les blessures causées par les insectes, des dommages causés par le gel ou du matériel de récolte. Une fois à

l'intérieur de tubercule, il le décomposera provoquant une pourriture bactérienne molle. La bactérie attaque également les tiges endommagées par le matériel de culture ou les intempéries causant la pourriture aérienne de la tige. Dans tous les cas, il est courant de trouver plusieurs espèces de *Pectobacterium* ou *Dickeya* ensemble lors des symptômes de jambe noire, de pourriture aérienne de la tige ou de pourriture molle (Pitman et al., 2009 ; Yahiaou-zaidi et al., 2010).



Figure 3 : Jambe noire : pourriture intérieure de la tige (A) et pourriture humide du tubercule (B) (De Werra et al., 2015).

II.5.3. Déterminants de la pathogénicité et résistance

La pathogénicité des *pectobactériums* dépend des enzymes sécrétées pour dégrader la paroi cellulaire végétale, bien que plusieurs autres facteurs contribuent également à la virulence (Charkowski et al., 2012). Les genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sont des bactéries pectinolytiques capables de produire des enzymes PCWD (plant cell wall-degrading enzymes) impliquées dans la dégradation de la pectine (Khayati, 2015). Les *pectobactériums* peuvent se trouver à un état de latence, qui se situe dans l'espace intercellulaire dans le tissu vasculaire (xylème) au niveau des blessures. En cas d'excès d'eau en terre ou pendant le stockage, l'infection devient active quand les conditions d'anaérobioses et de températures deviennent favorables (Halabi, 2014).

La croissance de *Pectobacterium Atrosepticum* est limitée à des températures au-dessus de 35°C, alors *Pectobacterium Carotovorum* peut croître à des températures allant

jusqu'à 39°C et le *Dickeya* peuvent survivre à des températures encore plus élevées supérieures à 39°C (Panda, 2014). Ces bactéries sécrètent l'ensemble des enzymes lytiques (Pectate lyases, Pectinases, Polygalacturonase, Cellulase, Protéase, etc.) dont l'activité est responsable des symptômes de macération observables sur plantes et tubercules (Yahiaou-zaidi et al., 2010).

Il existe d'autres mécanismes importants participant au pouvoir pathogène des *Pectobacterium* spp, à savoir : la mobilité, l'acquisition du fer via la production des sidérophores (chélateurs de fer synthétisés et sécrétés par des micro-organismes), la formation de biofilm, le chimiotaxisme (Khayl, 2015). Les *Pectobacteriums* spp et les *Dickeya* spp pectinolytiques synthétisent des molécules signales diffusibles appelées la N- acylhomoserine lactone (AHL) à travers leurs membranes cellulaires. Lorsque la multiplication bactérienne atteint le quorum, la concentration en signaux AHL dans le milieu devient suffisamment élevée pour être perçue par les bactéries comme un signal d'activation de la synthèse des enzymes de pathogénicité (Ahoussi, 2012). L'identification récente de nombreuses nouvelles espèces de *Pectobacterium* suggère que d'autres espèces nouvelles potentiellement virulentes restent à découvrir et que ce niveau élevé de diversité entravera le développement de variétés de pommes de terre tolérantes (Czajkowski et al., 2009).

I.5.4. Management

La gestion des pectobactéries repose principalement sur les pratiques culturales. L'utilisation de plantule de pomme de terre issue de la micropropagation de haute qualité phytosanitaire exempte de toute contamination pourrait réduire le risque de maladie lors de la plantation. Les cultivateurs supervisaient les semences coupées et ils prévenaient de planter les semences froides dans un sol humide. Pendant la saison de croissance. Ils préférèrent l'irriguer avec de l'eau souterraine et avec peu fertilisant azoté (Çalışkan et al., 2004).

À la récolte, les bactéries se multiplieront sur les tubercules de pomme de terre à mesure qu'elles vieillissent, si bien que tuer rapidement les tubercules peut aider à réduire l'incidence de la maladie pour l'année suivante en les détectant rapidement avant l'entreposage (Czajkowski et al., 2009). Une bonne circulation de l'air et une humidité élevée dans les entrepôts de pommes de terre aideront également à réduire la pourriture molle pendant le stockage. Des niveaux élevés de dioxyde de carbone dans les entrepôts favoriseront le développement de la pourriture molle (Vanderhofstadt et al., 2009).

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE II

MÉCANISMES DE DÉFENSE CHEZ LES
PLANTES

II. Les mécanismes de défense des plantes

II.1. Défense passive

La barrière physique est la première des défenses qui empêche le pathogène d'envahir la plante et constitue une mesure de défense pré-invasive ; elle est essentiellement constituée de la cuticule et de la paroi cellulaire (Blanchard et Limache, 2005). Pour cela, le feuillage peut présenter une cuticule plus au moins épaisse, voire cireuse, ce qui rend l'accès plus difficile à l'intérieur des cellules de l'épiderme foliaire. La paroi pectocellulosique est une protection supplémentaire qui entoure chaque cellule végétale et freine la progression du bio-agresseur (Astier, 2011).

Les papilles peuvent fonctionner comme un mécanisme de résistance et agir comme une barrière physique contre la pénétration des pathogènes. L'efficacité de la formation de papilles en tant que mécanisme de résistance dépend de son déclenchement précoce. Une faible efficacité de pénétration des pathogènes fongiques a été corrélée avec les papilles qui se sont formées avant les chevilles de pénétration (Crang et al., 2018). En revanche, l'agent pathogène semble supprimer la synthèse de callose pendant son processus de pénétration en inhibant la β -1,3-glucane synthase. La β -1,3-glucane synthase est l'enzyme impliquée dans la synthèse du callose (Sanmartín et al., 2020).

II.1.b Défense chimique

La barrière chimique préformée incluant des composés antimicrobiens et des métabolites secondaires peuvent être toxiques pour le pathogène ou encore inactiver ses effecteurs. Les saponines, à titre d'exemple, (famille de métabolites secondaires glycosylés) sont présentes en très grande quantité dans les plantes sauvages comme l'avoine. Elles sont supposées avoir une activité antifongique importante (Amelot, 2010).

II.2. Défense active

II.2.a Mécanismes de résistance chez les plantes

Lorsqu'un agent pathogène réussit à contourner la première ligne de défense passive, un nouveau système de résistance se met en place. Ce système immunitaire se base sur des mécanismes de reconnaissance (Bouarab, 2000) pouvant se dérouler à deux niveaux et déboucher soit sur une interaction dite incompatible ; dans le cas d'une résistance à la

maladie, soit sur une interaction dite compatible en cas d'échec des mécanismes de défense permettant un développement de la maladie (Astier, 2011).

II.2.b Reconnaissance spécifique et concept gène-pour-gène

Le concept gène-pour-gène a été développé pour la première fois en 1955 par Harold Flor (Ramiro, 2009). Le modèle gène-pour-gène présume l'existence d'une interaction entre éliciteurs avirulence (**Avr**) de pathogène et une protéine résistance (**R**) à la surface de la cellule de l'hôte. L'interaction physique entre ces deux gènes (**R et Avr**) est très rare.

Le modèle de reconnaissance gène-pour-gène le plus étudié est celui de l'interaction entre la tomate et son pathogène *Cladosporium fulvum*. Les produits de deux gènes d'avirulence, *avr4* et *avr9* induisent une réaction hypersensible dans les cultivars de tomate portant respectivement les gènes de résistance *Cf-4* et *Cf-9* chez le pathogène *Cladosporium fulvum*. Chez les virus, le système le mieux connu est l'interaction entre le virus de la mosaïque du tabac (VMT) et le tabac, *Nicotiana sylvestris*. Dans cette interaction, la protéine de la coque du VMT induit une réaction hypersensible chez *N. sylvestris* possédant le gène de résistance *N* (Leister et Katagiri, 2000 ; Bouarab, 2000 ; Rocher, 2004).

En revanche, le «modèle de garde» a été proposé pour expliquer le fonctionnement des gènes *R* (Figure 4). Ce modèle conçoit les protéines *Avr* comme des effecteurs qui interagissent avec des protéines cibles de la plante pour manipuler les processus physiologiques en faveur du parasite et inhiber les défenses basales de la plante. La protéine *Avr* n'est pas la cible directe de la protéine *R* mais elle fait partie d'un complexe incluant une protéine de garde médiane d'interaction (Djebali, 2008).

Selon Pajerowska (2005), la pomme de terre possède seize homologues de gènes de signalisations de défense (DS) de protéines *R* qui sont cartographiés à proximité des loci de résistance quantitative connue (QRL) contre *Phytophthora infestans* et *Pectobacterium Atrosepticum*, parmi les cinq gènes sont des candidats positionnels pour la résistance quantitative connus et ils sont étroitement liés à la séquence des gènes d'*Arabidopsis AtSGT1b*, *AtPAD4* (Phytoalexin Deficient 4) et *AtAOS* (allene oxidesynthas). Des séquences génomiques et ADN complémentaires de full-longueur ont été obtenues pour les gènes de pomme de terre *StSGT1*, *StPAD4* et *StEDS1* (Enhanced Disease Susceptibility 1).

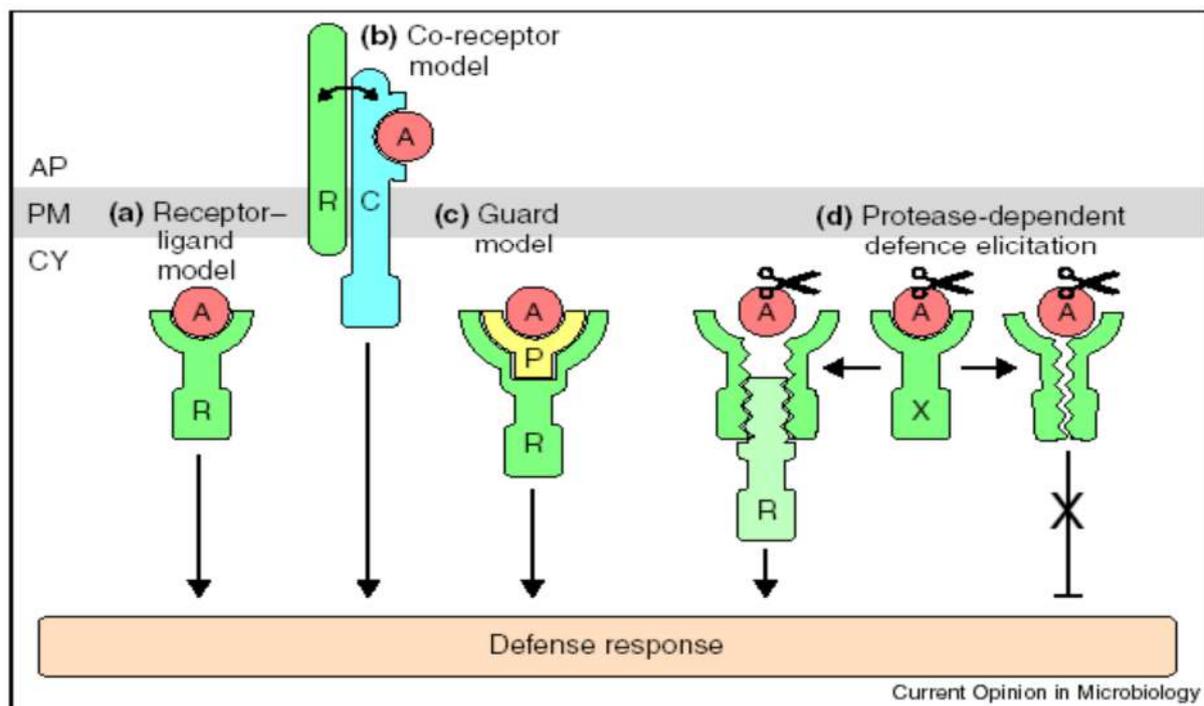


Figure 4 : Interprétations biochimiques du modèle gène-pour-gène (Bonas et Lahay, 2002). (a) Le modèle classique récepteur-ligand prédit que l'interaction directe entre une protéine **Avr** et une protéine **R** correspondante déclenche la réaction de défense. (b) Selon le modèle de co-récepteur, la protéine **Avr** (**A** ; rouge) se lie d'abord à un site de liaison de haute affinité du co-récepteur (**C** ; bleu), qui interagit (flèche grise à deux pointes) avec le Protéine **R** pour déclencher la réponse de défense. (c) Dans le cadre conceptuel du modèle de garde, la protéine de résistance protège une cible de pathogénicité correspondante (**P** ; jaune). (d) Étant donné que plusieurs gènes **avr** bactériens, fongiques et viraux sont prédits pour coder des protéases, nous proposons que les protéines hôtes traitées protéolytiquement déclenchent la défense des plantes. Veuillez noter que les modèles suggérés ne sont pas mutuellement exclusifs. Protéine **R**, **R** ; **X**, cible de protéase ; **AP**, Apoplast; **PM**, membrane plasmique; **CY**, cytoplasme.

II.2.c Reconnaissance non spécifique

L'absence ou l'altération de l'un ou de l'autre des gènes de résistance **R** conduit inévitablement à la résistance généralisée qui peut s'exercer au niveau local (résistance locale acquise, ou **RLA**). La réponse d'hypersensibilité (**HR**) est une réponse à l'invasion d'agents pathogènes (Figure 5). Ces réponses peuvent être responsables de la résistance à la maladie ou à la suite de l'activation d'une autre réponse de défense. L'hypersensibilité implique une nécrose localisée rapide des cellules végétales ou des tissus infectés ou des deux (Ziadi, 2001). Le but de ce sacrifice de soi est de priver le pathogène envahisseur d'un approvisionnement adéquat en nutriments ou de libérer des composés microbicides des cellules mourantes. Ce sacrifice est pour aussi restreindre l'agent pathogène dans des petites zones en entourant immédiatement les cellules initialement infectées (Jackson et al., 1996 ;

Watanabe et Lam, 2006). Une hypersensibilité peut impliquer juste une cellule signal ou entraînant la mort des tissus des régions étendues. Un autre événement constaté durant l'hypersensibilité est la production de nouvelles molécules de signalisation (méthyl-jasmonate ; éthylène et acide salicylique) qui aident à transmettre le signal à d'autres parties de la plante et induire la résistance systémique acquise (Benhamou et Patrice, 2012a).

D'autres éliciteurs généraux peuvent être de nature oligosaccharidique, glycoprotéique, peptidique et lipidique d'origine endogène à la plante tel que Methyl-Jasmonate ou exogène tel que chitine β (1-4) linked polymère N-acetyl-glucosamine issue de la paroi cellulaire des champignons qui joue un rôle dans la transduction du signal (Cervone et al., 1997 ; Newman et al., 2007 ; Koo et al., 2006 ; Benhamou et Rey, 2012a).

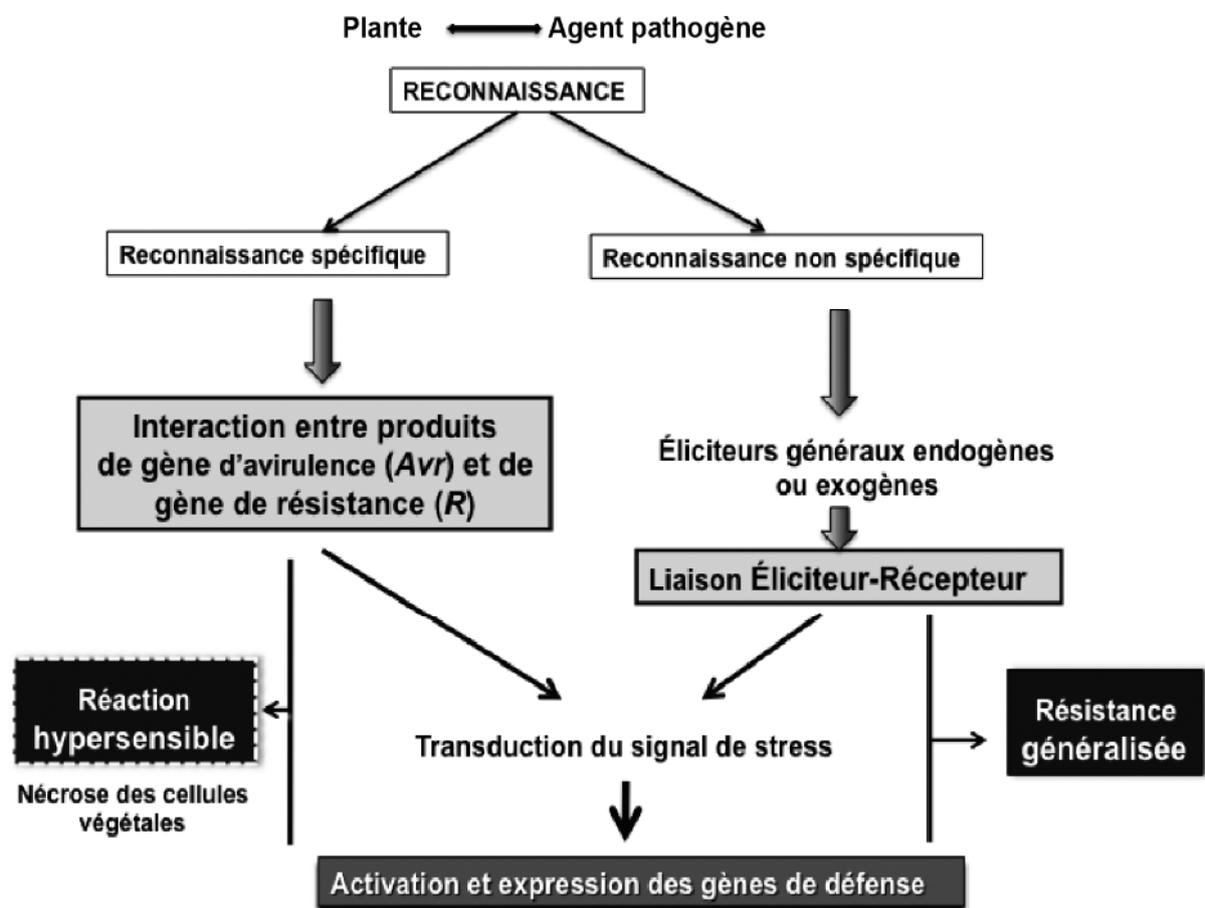


Figure 5 : Schéma illustrant l'induction des gènes de défense (Benhamou et Rey, 2012a).

Les éliciteurs sont des métabolites de signalisation qui préviennent des pathogènes reconnus par les cellules végétales. Ils déclenchent des réactions de défenses des plantes. Ils sont produits soit par l'agent pathogène, soit par l'action d'hydrolyse de l'agent pathogène par des composants cellulaires végétaux (Patel et al., 2020).

Les éliciteurs sont des composés de faible poids moléculaire qui déclenchent la réponse immunitaire des plantes en activant la cascade de signaux. Les éliciteurs sont classés en deux types, à savoir les éliciteurs dérivés de pathogènes (éliciteurs exogènes) et les éliciteurs dérivés de plantes (éliciteurs endogènes) (Patel et al., 2020).

II.2.d La résistance systémique induite

La résistance systémique induite (RSI) est une forme de résistance stimulée spécifiquement par des rhizobactéries plus connues sous l'appellation « PGPR » (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Benhamou et Rey, 2012b). Ces bactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (Adam, 2008). Cette résistance est efficace non seulement contre l'agent pathogène qui l'initie mais aussi contre une large gamme d'autres agents pathogènes. L'expression de la RSA implique nécessairement la diffusion du message de stress en direction des tissus sains (Pajot, 2011).

II.3. Voix de transduction de signal

II.3.a Perception du signal

La reconnaissance d'un agent pathogène par la plante est initiée par la perception de molécules appelées éliciteurs ou de molécules associées au pathogène (Figure 6). Les MAMP's (Microbe Associated Molecular Pattern) sont des molécules hautement conservées et cruciales présentes dans tout un groupe de microbes. Les MAMP's sont formellement appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Patter). Ces structures moléculaires ne sont pas réservées exclusivement aux agents pathogènes (Boller et Felix, 2009 ; Dufour, 2011). Les MAMP provoquent l'induction des mécanismes de défenses basales (Dufour, 2011). La perception des PAMP par les plantes se fait via des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptors) situés à la surface des cellules (Léger, 2010). L'un des récepteurs les mieux étudiés est le récepteur kinase 1 de l'éliciteur de chitine (CERK1) chez l'*Arabidopsis thaliana*. Il joue un rôle important dans l'immunité déclenchée par la chitine fongique (Miya et al., 2007). Les MAMP's d'enveloppe spécifique (les protéines de mouvement ou les réplicases) peuvent provenir de virus qui sont souvent transmis par des organismes vecteurs comme les pucerons ou les nématodes induisant principalement des réponses de défense spécifiques du virus (Nagy et al., 2016 ; Bragard et al., 2013). Cela comprend l'activation de

la machinerie de silençage de l'ARN et la mort cellulaire localisée afin de limiter la propagation virale (Vidhyasekaran, 2014b).

Enfin, les MAMP's bactériens comprennent la flagelline bactérienne tel que flg22 qui est perçu par la plupart des espèces végétales via le récepteur de répétition riche en leucine kinase (Leucine-Rich Repeat-Receptor Link kinases (LRR-RLK) parmi eux flagellin-sensitive 2 (FLS 2) (Zipfel et al., 2004 ; Newman et al., 2013). Un autre MAMP bien connu est le EF-Tu (Elongation Factor Thermo Unstable), il est essentiel pour l'allongement lors de la synthèse des protéines. Il présente une homologie de 90% entre des centaines d'espèces de bactéries. EF-Tu est perçu via le PRR EF-Tu RECEPTOR (EFR) (Zipfel et al., 2006 ; Newman et al., 2013). En plus de ces exemples, des MAMP non protéiniques comme les peptidoglycanes (PGN), les β -glucanes et les lipopolysaccharides (LPS) ont été identifiés. Il s'est avéré qu'ils provoquent des réponses de défense contre l'agent qui les a initiés (Zipfel, 2009 ; Zipfel, 2014). Les LPS sont des macromolécules amphiphiles composées d'une hétéro-polysaccharide hydrophile à une partie lipophile appelée lipide A. La partie lipide A est considérée comme l'épitope de PAMP et fortement conservée dans différentes bactéries. Les *O*-chaîne dans les LPS peuvent également agir en tant que PAMP suggèrent que les cellules de plantes de *A. thaliana* puissent identifier le lipide A et les structures de noyau d'oligosaccharide des LPS pour déclencher des réponses de défense (Field, 2009 ; Zipfel, 2015 ; Vidhyasekaran, 2014a).

II.3.b Transmission du signal

Lors de la réception du signal, le récepteur est activé pour transmettre le signal davantage. Le récepteur activé transmet le signal à des composants généralement des protéines, plus en aval dans la voie de signalisation, qui s'activent ensuite eux-mêmes pour une transmission ultérieure du signal. Il en résulte une chaîne de processus de transduction de signaux intracellulaires fonctionnant en série. Enfin, un processus biochimique spécifique est déclenché dans la cellule qui représente le point final de la voie de signalisation (Figure 5 & 6).

✓ Signalisation précoce

La rencontre éliciteur-récepteur est suivie par des changements rapides et transitoires de la perméabilité de la membrane aux ions, un influx de Ca^{2+} , H^+ , K^+ et Cl^- ou encore NO_3^- (Ziadi, 2001 ;

Amelot, 2010 ; Vidhyasekaran, 2015a) via l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques (Figure 7). Ces mouvements d'ions déclenchent une dépolarisation membranaire.

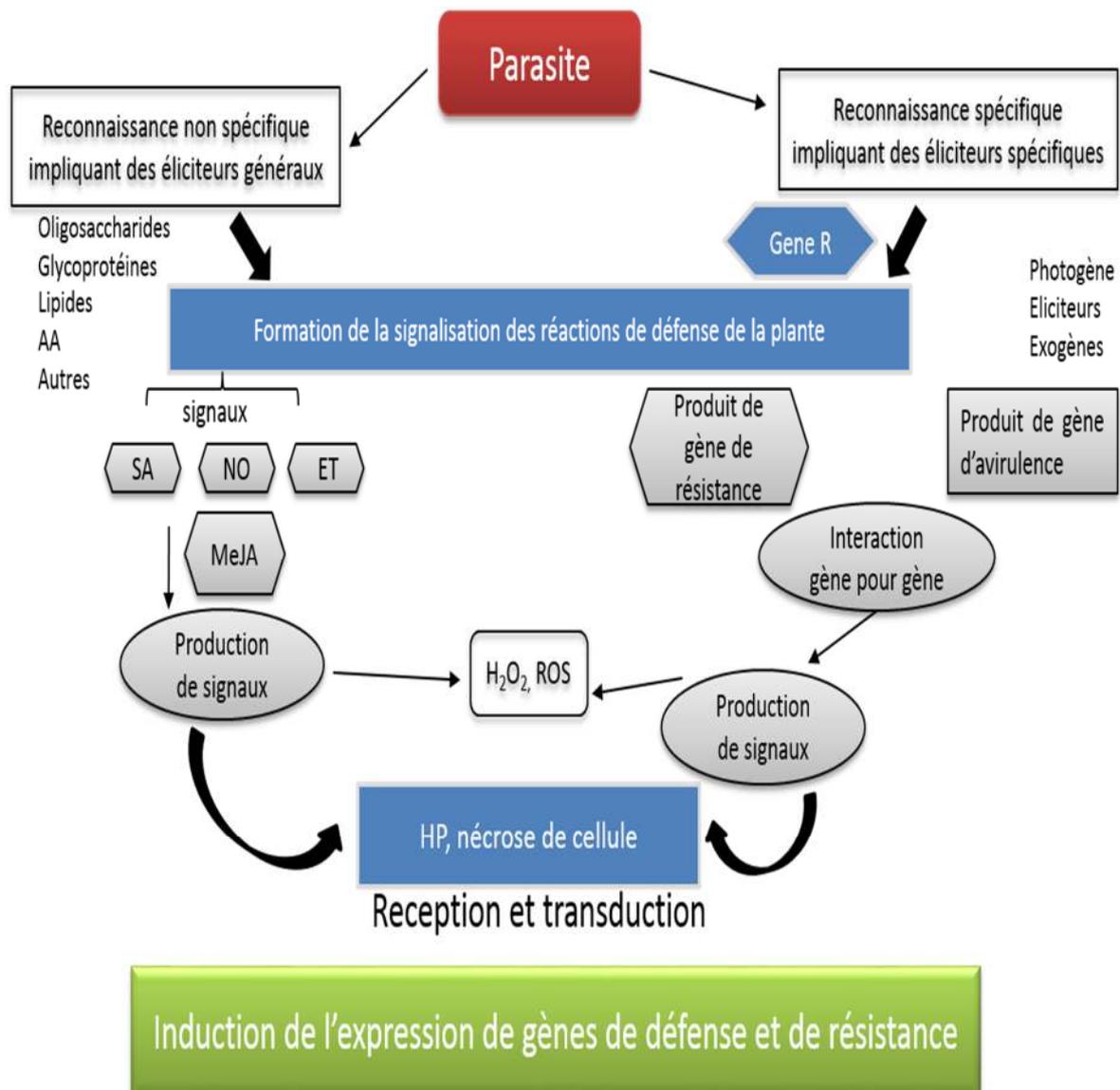


Figure 6 : Schéma illustrant les principaux mécanismes de défense chez les plantes (Smith et Boyko, 2007). SA : acide salicylique ; ET : éthylène ; MeJA : Methyl-jasmonate ; NO : Oxyde Nitrique ; ABA : Acide abscessique ; GA : acide gibbérannique ; ROS : espèce réactive d'oxygène.

Il est démontré que les PAMP déclenchent une alcalinisation apoplastique combinée à une acidification cytosolique dans les cellules végétales dont l'amplitude et la durée dépendent du signal élicité (Lanchard et Imache, 2005 ; Vidhyasekaran, 2015a). Les flux d'ions peuvent agir en amont et provoquer d'autres événements de signalisation incluant l'activation des modules MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et des CDPK (*Ca²⁺-Dependant Protein Kinases*).

Le MAPK et le CDPK sont responsables des processus de phosphorylation et déphosphorylation et provoquent les flux H^+ . Il en résulte l'alcalinisation extracellulaire et l'acidification cytosolique due à l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire (Halabi, 2014 ; Vidhyasekaran, 2015a). Ainsi qu'une accumulation rapide de formes réactives d'oxygène (ROS) tels que les anions superoxyde (O_2^-), H_2O_2 et de monoxyde d'azote (NO) impliqués dans la limitation et de l'enveloppement du pathogène de façon directe grâce à leur toxicité et éventuellement vers la mort de la cellule de l'hôte pour localiser l'infection (Figure 7) (Vidhyasekaran, 2014c). La génération du ROS dépend probablement de l'activation membranaire de NADPHoxydase plasmique et superoxyde dismutase (SOD) (Yinong et al., 1997 ; Huang et al., 2019).

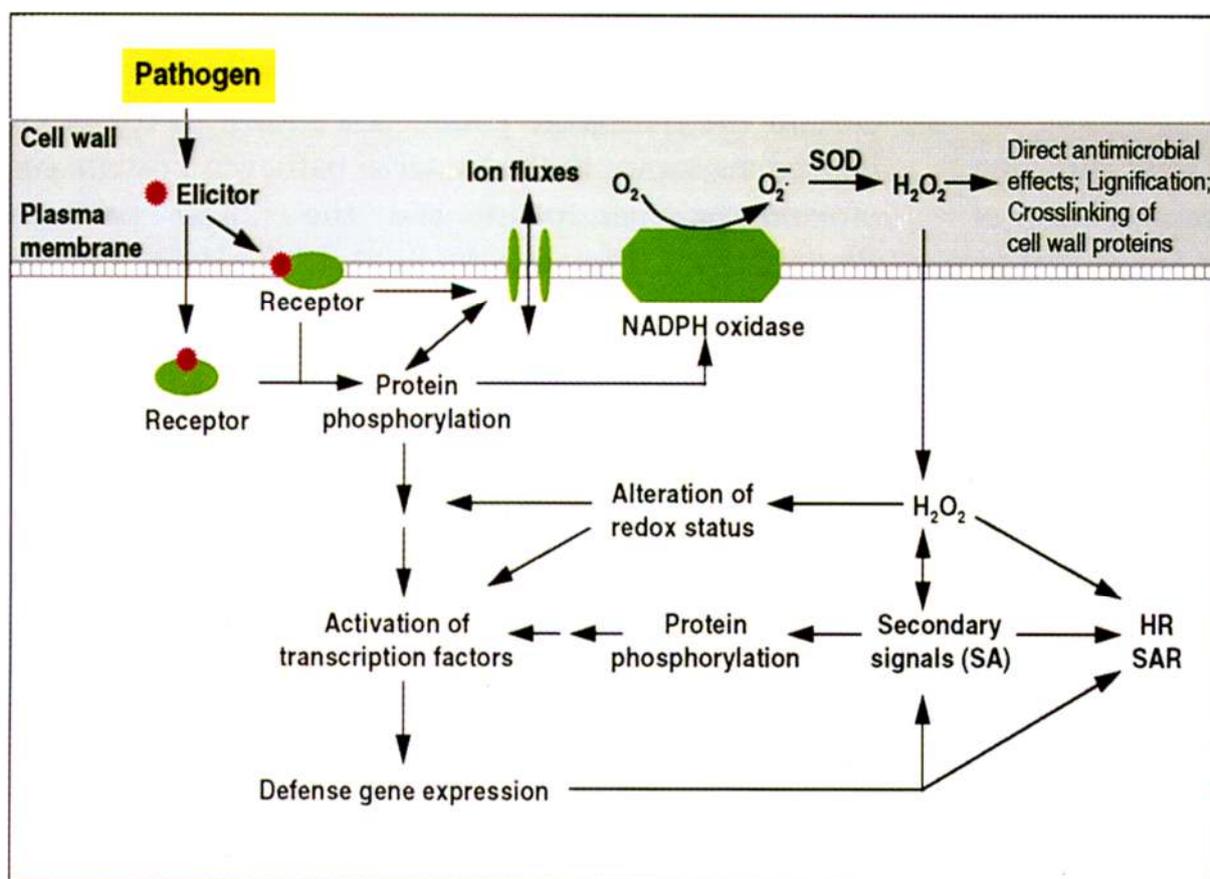


Figure 7 : Modèle simplifié de transduction du signal dans les réponses de défense des plantes (Yang et al., 2020). Reconnaissance par l'hôte des éliciteurs de pathogènes et déclenchement de signalisation précoces tels que la phosphorylation / déphosphorylation des protéines, les flux ioniques et la burst oxydative. L'activation transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle ultérieure des facteurs de transcription conduit à l'induction de gènes de défense végétale tels que GST et PAL, et à la biosynthèse de signaux secondaires endogènes tels que SA. En outre, le complexe NADPH oxydase activé génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que O_2^- et H_2O_2 qui modifient le statut redox des cellules végétales et affectent la signalisation de défense. SA, ROS, ainsi que les gènes de défense, contribuent tous au développement de HR et SAR lors d'interactions plante-pathogène. SOD : superoxyde dismutase.

✓ Protéines G

Les protéines G sont hétérotrimériques composées de sous-unités α , β , γ qui existent sous forme d'hétérotrimères associés dans leur état inactif (Figure 8). La signalisation hétérotrimériques de la protéine G commence par la liaison du ligand (signal MAMP) qui se traduit par un changement de conformation dans un récepteur couplé à la protéine G. Une fois activée par le GPCR (Protein-Coupled Receptors), la protéine $G\alpha$ qui possède un site de liaison au nucléotide GDP / GTP et une activité GTP-hydrolase, change de forme en une structure qui permet l'échange de GDP contre GTP (Figure 9). Le GPCR fonctionne comme un facteur d'échange de guanine (FEM) pour $G\alpha$ et permet à la sous-unité $G\alpha$ d'échanger du PIB contre du GTP et de devenir active. La liaison au GTP s'accompagne de réarrangements structurels qui désengagent l'interaction $G\beta\gamma$ et aboutissent à une dissociation des hétérotrimères.

Les sous-unités libres relient alors les signaux en interagissant avec des protéines en aval appelées effecteurs. La $G\alpha$ lié au GTP se sépare du dimère $G\beta\gamma$ associé et les protéines $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ libérées peuvent alors interagir avec des molécules effectrices en aval, seules ou en combinaison pour transduire le signal. $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ interagissent indépendamment en aval avec plusieurs effecteurs de médiation des voies de transduction de signaux spécifiques. Après la propagation du signal, l'activité GTPase intrinsèque de $G\alpha$ entraîne finalement une hydrolyse du GTP lié en GDP, ce qui inactive $G\alpha$ et permet sa réassociation avec le dimère $G\beta\gamma$ pour reformer le complexe inactif de la protéine G (Krauss, 2001 ; Luttrell, 2005 ; Vidhyasekaran, 2014a ; Mahoney et Sunahara, 2016).

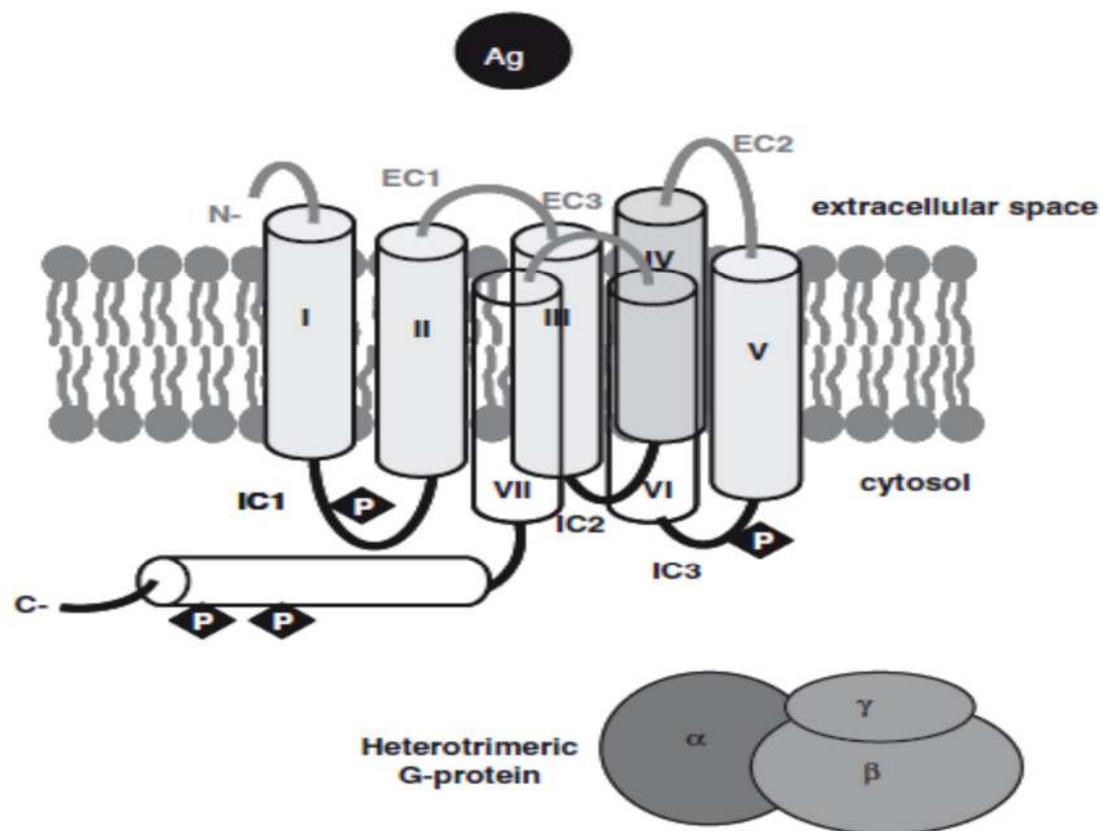


Figure 8 : Topologie d'un GPCR typique (Gilchrist et Mazzoni, 2010). L'extrémité N-terminale du récepteur est extracellulaire et son extrémité C est intracellulaire. Le récepteur traverse le plan de la membrane cellulaire sept fois. Les segments transmembranaires hydrophobes (couleur claire) sont désignés par des chiffres romains (I – VII). L'agoniste (Ag) s'approche du récepteur du côté extracellulaire, tandis que les protéines G interagissent avec les régions cytoplasmiques du récepteur, en particulier des parties de la troisième boucle cytoplasmique entre les régions transmembranaires V et VI. La queue terminale cytoplasmique du récepteur contient de nombreux résidus sérine et thréonine dont les groupes hydroxyle ($-OH$) peuvent être phosphorylés, et cette phosphorylation est souvent associée à l'internalisation du récepteur.

Cervone et al., (1997) ont démontré le rôle des protéines G dans l'activation des phosphatases en stimulant la H^+ ATPase dans les membranes plasmiques de cellules isolées d'une lignée de tomate résistante en réponse à un traitement par un extrait d'avirulente de *C. fulvum*. La guanidine est une nucléotidique analogue de la GTP (γ) S déterminant des augmentations de l'activité ATPase similaires à celles induites par l'éliciteur. Les mêmes composés se comportent comme des éliciteurs pour stimuler le système de génération d'oxygène actif de la membrane plasmique et pour désactiver l'activité scavenger de l'ascorbate peroxydase (Gilchrist et Mazzoni, 2010).

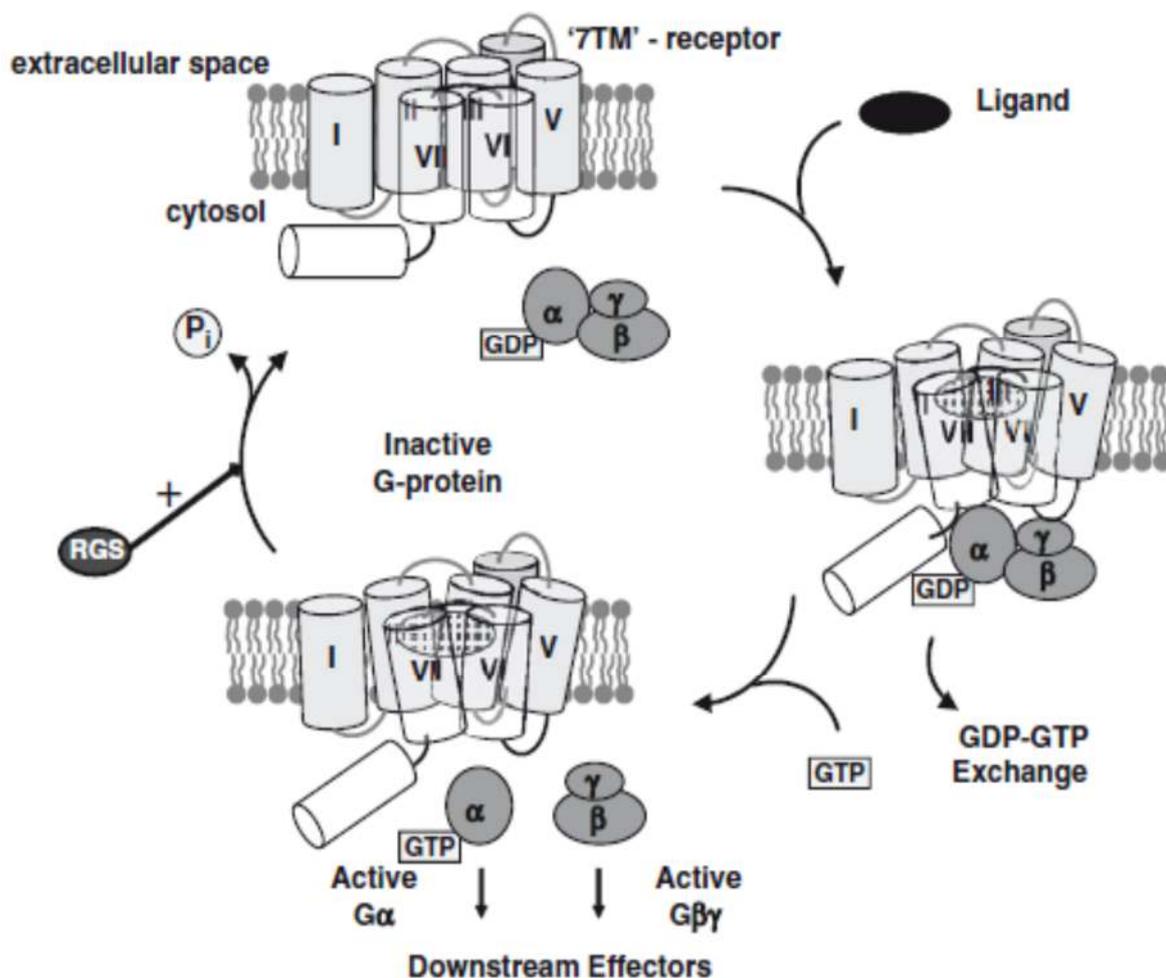


Figure 9 : Activation de la signalisation de la protéine G via la liaison d'un ligand à un GPCR (Gilchrist et Mazzoni, 2010). Suite à une stimulation initiée par un ligand, le récepteur 7TM devient activé et change sa conformation conduisant à une interaction entre $G\alpha\beta\gamma$ et le GPCR. Cette interaction induit un changement de conformation dans $G\alpha$ qui diminue son affinité pour le PIB par lequel il se dissocie et est remplacé par GTP. Une fois que GTP est lié, la sous-unité $G\alpha$ assume une conformation activée et se réorganise / se dissocie du récepteur et du $G\beta\gamma$. $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ déclenchent des événements de signalisation en aval. L'état activé dure jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en PIB par l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité $G\alpha$, résultant en l'association du $G\alpha$ -GDP avec des sous-unités $\beta\gamma$ pour former $G\alpha\beta\gamma$ inactif, et ce processus peut être influencé par les protéines RGS. GTPase.

✓ Voie de l'acide jasmonique

L'acide jasmonique (JA) est une phytohormone dérivée d'octadécanoïdes impliquée dans la régulation et l'activation des voies de signalisation spécifiques de défense chez les plantes (Figure 10). Mais aussi, il engage dans divers processus de développement, y compris dans la floraison, la croissance des racines, la sécrétion de nectar floral, la sénescence, le

développement, la croissance cellulaire, le développement des trichomes et la thermogénèse (Kachroo et Kachroo, 2013). L'acide jasmonique est synthétisé à partir de l'acide linoléique qui est un analogue structural des prostaglandines (Mueller, 1998). L'acide jasmonique est un cyclopentanoneoxylipine à 12 carbones qui a été isolé pour la première fois sous forme d'ester méthylique (MeJA) à partir d'huile de jasmin (*Jasminum grandiflorum*) (Korth et Thompson, 2006).

La synthèse de l'JA commence par l'oxygénation de l'acide α -linoléique (18: 3) dans les plastes végétaux (Figure 10). La α -linoléique (18: 3) générée par la désaturation de l'acide linoléique (18: 2) sur les glycolipides membranaires par les ω 3-désaturases d'acides gras est libérée par l'activité des phospholipases. L'acide α -linoléique est d'abord converti en acide 13-hydroperoxylinoléique par la 13-lipoxygénase (LOX), puis en 12,13-époxyoctadécatriénoïque par l'allène oxyde synthase (AOS) et enfin à l'acide 12-oxo-phytyldiénoïque (OPDA) par l'allène oxyde cyclase dans les plastes. L'OPDA est importé dans les peroxysomes où ils subissent trois cycles de β -oxydation catalysés par l'acyl-CoA oxydase en éliminant six carbones de l'extrémité carboxyle de la molécule pour donner enfin l'acide jasmonique (Vick et Zimmerman, 1984). JA est converti en MeJA volatil via l'activité d'une S-adénosyl-L- méthionine : acide jasmonique carboxyl méthyl transférase (JMT). La génération de JA-isoleucine (JA-Ile) se fait par la conjugaison de l'isoleucine au groupe carboxyle de JA par l'enzyme jasmonate résistant 1 (JAR1) (Staswick et Tiryaki, 2004 ; Vidhyasekaran, 2015b).

La signalisation en réponse à JA est initiée sur sa perception par un complexe récepteur comprenant la protéine F-box, COI1 (*coronatine insensitive 1*), et les facteurs de transcription JAZ (Jasmonates Zim domain). Bien que COI1 seul puisse se lier directement à JA, il s'est avéré que le complexe COI1-JAZ a une affinité significativement plus élevée pour JA-Ile par rapport au MeJa.

Il a été démontré que la détection à haute sensibilité de JA-Ile par le complexe COI1-JAZ1 nécessite la présence d'un cofacteur, appelé inositol pentakisphosphate (InsP5), dans le complexe récepteur (Sheard et al., 2010). Les plantes mutantes COI1 sont incapables de répondre à l'JA exogène et elles sont altérées dans l'induction des gènes sensibles à la JA. Elles sont aussi sensibles aux insectes herbivores et aux pathogènes nécrotrophes. La perte ou la régulation à la baisse de JAZ10 augmente la gravité des symptômes de la maladie en réponse à l'infection par *Pseudomonas syringae* (Demianski et al, 2012 ; Vidhyasekaran, 2015b).

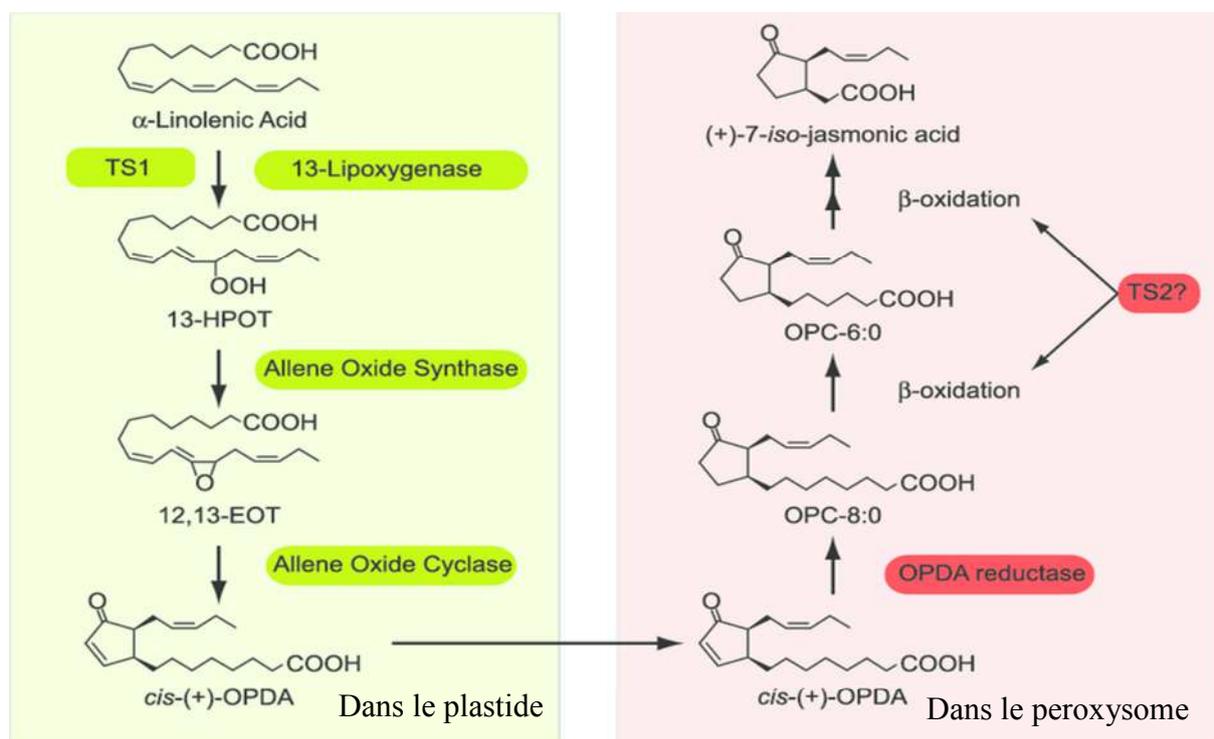


Figure 10 : Biosynthèses de l'acide jasmonate par la voie octadécanoïde (Acosta et al, 2009). La première étape dédiée à la biosynthèse du jasmonate est la peroxydation de l'acide α -linoléique (18:3) par la 13-lipoxygénase pour former de l'acide (13S)-hydroperoxy-octadécatriénoïque (13-HPOT). C'est la fonction putative de TS1. La 13-HPOT est transformée en acide stéréoisomère spécifique cis - (+) - 12-oxophytodiénoïque (OPDA) par l'action séquentielle de l'oxyde d'allène synthase [donnant l'acide (13S)-12,13-époxy-octadécatriénoïque (12,13-EOT) et l'oxyde d'allène cyclase. Ces étapes de la biosynthèse de JA se produisent dans les plastes végétaux où les enzymes correspondantes sont localisées. Des réactions ultérieures se produisent dans les peroxysoxes. Tout d'abord, le cycle cyclopenténone de l'OPDA est réduit en acide 12-oxophytoénoïque (OPC-8) par OPDA réductase. Ensuite, trois cycles de β -oxydation sont proposés pour raccourcir la chaîne latérale carboxylique de l'OPC-8 pour produire le JA à 12 atomes de carbone. Un cycle de β -oxydation est un ensemble de quatre réactions enzymatiques : oxydation, hydratation, oxydation et thiolysse. Toutes les enzymes agissant sur la β -oxydation lors de la biosynthèse de l'AJ n'ont pas été identifiées. Parce que l'oxydation dans la troisième étape est normalement réalisée par une activité de déshydrogénase, il est possible que TS2 puisse participer à cette étape de biosynthèse de JA.

✓ Voie de l'acide salicylique

L'acide salicylique (SA) est une hormone végétale qui joue un rôle majeur dans la signalisation et dans la résistance aux maladies (Vlot et al., 2009, Dempsey et al., 2011). L'acide salicylique (SA) est un composé phénolique synthétisé via la voie de l'acide shikimique qui dépend des métabolites dérivés de la glycolyse et de la voie du pentose phosphate (Figure 11). La voie de l'acide shikimique est divisée en deux branches après la biosynthèse de chorismate.

Ces deux voies enzymatiques distinctes conduisaient à la biosynthèse de SA. La voie phénylalanine ammonia lyase (PAL) qui convertit la phénylalanine en acide cinnamique puis l'acide cinnamique en acide benzoïque par décarboxylation suivi d'une 2-hydroxylation par benzoic acid 2-hydroxylase (BA2H) en SA (Silverman et al., 1995 ; Vermerris et Nicholson, 2006 ; Halim, 2006). La voie isochorismate synthase (ICS) consiste à la conversion directe de chorismate en SA via un intermédiaire isochorismate (Dempsey et al., 2011).

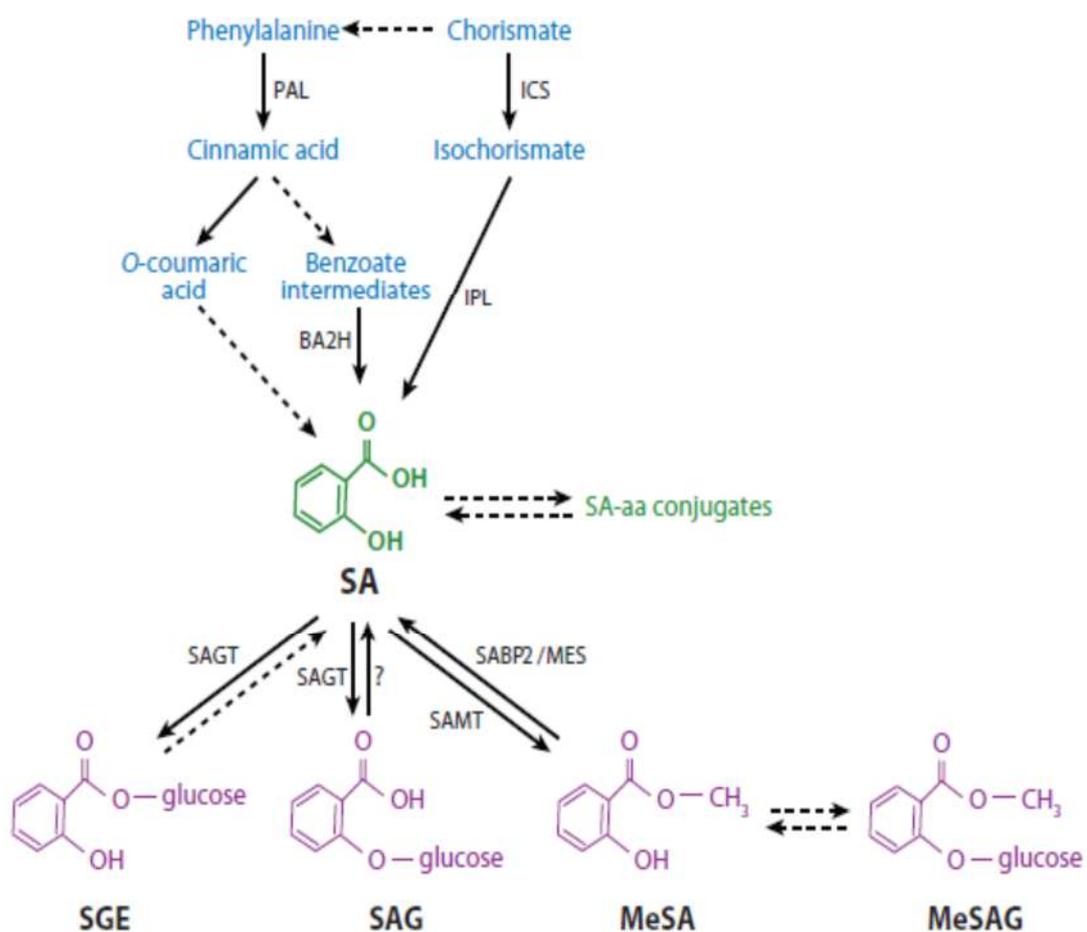


Figure 11 : Voie de biosynthèse de l'acide salicylique (Vlot et al., 2009).

L'acide salicylique *O*- β -glucoside (SAG) est la forme de stockage de SA dans la vacuole. La conversion de SA libre en SAG est catalysée par les UDP-Glc/SA-glucosyltransférases (SAGT) (Lim et al., 2002) qui peut être reconvertie en SA si nécessaire par SA-glucosyltransférase (Dean et Delaney, 2008 ; Ramiro, 2009).

Le salicylate méthyle (MeSA) est un dérivé de SA par l'action de SA carboxyl méthyle transférase 1 (SAMT1) qui sont impliqués dans le signal mobile lors de la reconnaissance des MAMP's de pathogènes (Li et al., 2018). Dans les feuilles de tabac inoculées par le TMV se développe des lésions nécrotiques et une accumulation de l'acide salicylique tardive de quelques heures. L'acide salicylique transmet le signal sortant de la feuille infectée via le phloème dans laquelle se forme MeSA et induit de multiples réponses de défense dans les parties non infectées de la plante.

A ce stade, la plante entière manifeste une résistance systémique acquise (Figure 12) pour montrer une résistance accrue non seulement à l'encontre de l'agent pathogène primaire mais également à divers agents pathogènes secondaires (Reuchlin, 2009 ; Vlot et al., 2009). L'apport exogène de SA a mis en évidence l'expression de PR anti-pathogène et suggère son implication dans la signalisation SAR. Nombreuses de ces protéines PR ont des activités anti-pathogènes : antifongique, antibactérienne et antiviral (Dempsey et al., 2011 ; Vidhyasekaran, 2015a). L'infection fongique induit l'expression des protéines osmotines antifongiques (Zhu et al., 1993 ; Dempsey et al., 2011), des chitinases et des glucanases par les cellules de plantes, de sorte que ces enzymes dégradent les parois fongiques et libèrent les fragments de chitine qui s'accumulent à emplacement de l'invasion. Ces produits de dégradation enzymatique deviennent à leurs tour des MAMP 's (Schulman, 2002 ; Eckardt, 2008).

Les Peptidoglycans de surface bactérienne peuvent être dégradés aux mucopeptides par des activités lysozymale de l'hôte. Les mucopeptides libérés sont fortement mobiles, alors que le peptidoglycan se répand lentement (Langham, 2004 ; Erbs et al., 2008). De plus, une activité nucléasique efficace est induite à l'encontre des virus (Park et al., 2004). Les plantes transgéniques possédant le gène de l'enzyme salicylate hydroxylase (issue de gène bactérien) étaient incapables d'accumuler du SA libre et d'induire la SAR en réponse à des agents pathogènes (Smirnov et al., 1997 ; Balmer et Mauch-Mani, 2012).

Néanmoins, le vrai récepteur SA n'est pas encore connu (Vlot et al., 2009). La séquence d'événements allant de la reconnaissance au niveau local de l'agent pathogène à

l'induction de l'expression des gènes de défense est extrêmement complexe. Mais, il est évident que le régulateur protéique NPR1 (Non expressor of Pathogenesis-Related Genes 1) est considéré comme un régulateur positif central de la cascade de signalisation du phénomène qui mène à l'expression des gènes de défense tels que ceux codant pour les protéines PR (Durrant et Dong, 2004 ; Pieterse et Van Loon, 2004).

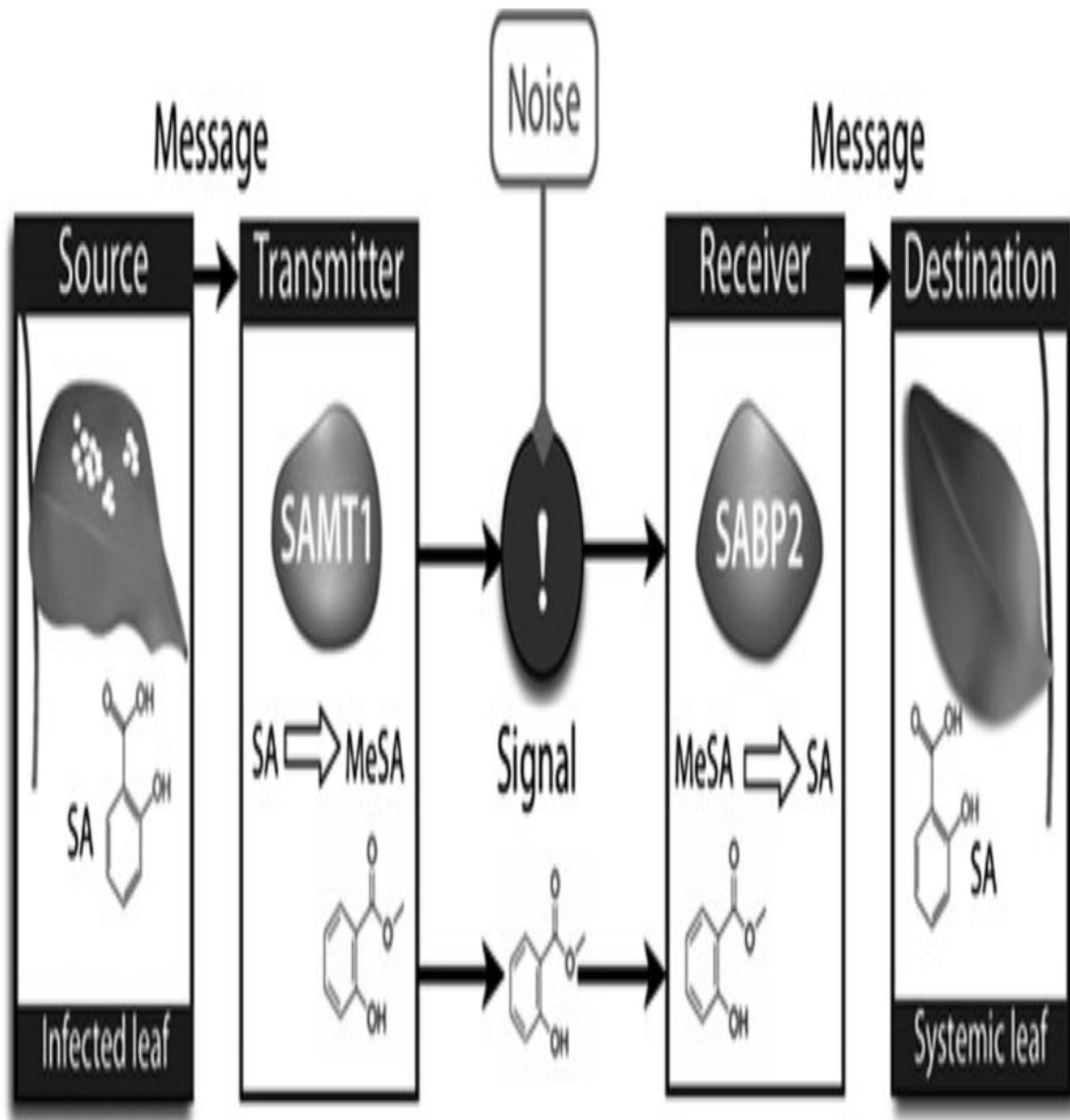


Figure 12 : La défense systémique déclenchée par le salicylate de méthyle (MeSA) établie au niveau d'une feuille de tabac infectée localement qui sert de source pour le message d'alarme (Balmer et Mauch-Mani, 2012). L'acide salicylique (SA) est induit et converti en MeSA par la SA carboxylméthyltransférase 1 (SAMT1). SAMT1 agit comme un émetteur modifiant le signal. MeSA fonctionne alors comme un signal mobile se translocalisant vers sa destination de part non infecté. Le message est perçu par la protéine 2 de liaison à l'acide salicylique (SABP2), qui reconvertit MeSA en SA. SA exerce alors sa fonction de signalisation de défense pour immuniser les feuilles du tabac. Model de Shannon et Weaver (1949).

Les plants d'*Arabidopsis* mutants en *npr1* ne répondent plus au SA. Ils ne peuvent déclencher l'expression de protéines PR comme ils sont rendus fortement susceptibles à divers agents pathogènes. Le NPR1 agit indirectement pour induire la transcription des gènes *PR*'s en agissant avec des facteurs de transcription de la famille TGA. Ces facteurs TGA activés se lient au promoteur de certains gènes *PR*'s et induisent leur transcription (Adam, 2008). Mosher et al., (2006), ont identifié chez *A. thaliana*, un régulateur négatif SNI1 (Suppressor of NPR1, Inducible) de la SAR qui est nécessaire pour amortir l'expression basale des gènes *PRs*. Cette protéine SNI1 s'accumule dans le noyau et, ensuite, provoque une répression des gènes stimulés par NPR1.

II.4. Stratégies de résistance

II.4.a Épaississement de la paroi

Le renforcement de la paroi au site d'infection est un évènement crucial pour la survie de la plante. Ce renforcement consiste en une réorganisation structurale et chimique de la paroi via le dépôt de molécules nouvellement synthétisées (Astier, 2012). La lignine est un composant majeur des parois secondaires. Elle joue un rôle dans des fonctions essentielles dont la croissance et le développement des plantes ainsi que dans la défense contre les envahisseurs (Bouarab, 2000). La lignine rend la paroi mécaniquement rigide et empêche la diffusion de composés hydrosolubles (enzymes, toxines) libérés par des agents pathogènes (Garcion et al., 2014).

Selon Hückelhoven, (2007), les preuves d'un rôle de la lignine dans la résistance sont principalement basées sur des études corrélatives (avec divers inhibiteurs) et les preuves génétiques utilisant la suppression de l'expression génique sont rares étant donné la redondance des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la lignine. Lorsque les racines de plante de tomate sont traitées par des éliciteurs du champignon *Fusarium oxysporum*, on observe une accumulation forte de la lignine qui permet à la plante d'isoler mécaniquement le champignon (Mandal et Mitra, 2007). Néanmoins, les agents pathogènes réussissent à contourner les moyens de défense des plantes et de développer des nouvelles stratégies pour dégrader et / ou de pénétrer les parois cellulaires.

Les plantes ont développé des stratégies pour contrecarrer ces attaques par une multitude de modifications de la paroi cellulaire avant ou après l'infection telle que le dépôt de callose (polysaccharide β -1,3 et β -1,6 Glucane) qui permet de former une papille péri-

plasmique. La production d'espèces réactives d'oxygène dans un burst oxidatif conduisant à la peroxydation des protéines par les acides phénoliques ou le dépôt de subérine ou de lignine en tant que véritable polymère. Il est extrêmement difficile de les dégrader enzymatiquement parlant. Les espèces réactives d'oxygène produites dans la paroi cellulaire ont également été supposées agir comme des seconds messagers induisant la réaction d'hypersensibilité (Moerschbacher, 2002). Entre autres, des protéines et des enzymes hydrolytiques sont des défenses. Elles ont également accumulé de protéines de renforcement de la paroi cellulaire telles que les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) et les PR (Ebrahim et al., 2011).

II.4.b Production des protéines PR (Pathogenesis related proteins)

Les protéines PR sont définies comme des protéines codées par la plante hôte induites dans des conditions pathologiques ou apparentées. Les conditions pathologiques font référence à tous les types de stress pathogène et pas seulement aux réponses hypersensibles résistantes dans lesquelles les PR sont plus courants (Sudisha et al., 2012). En plus de leur présence dans les tissus infectés, ils ont également été détectés dans des tissus végétaux sains sans aucune infection ou stress (Ebrahim et al., 2011). Les protéines liées à la pathogénèse peuvent être détectées dans presque toutes les plantes et un grand nombre de protéines liées à la pathogénèse appartenant à différentes classes ayant des fonctions différentes peuvent être présentes dans une seule espèce végétale (Lavrova et al., 2017). La stimulation des plantes d'aubergines par SA induit une expression plus élevée des enzymes de défense liées aux protéines PR notamment les β -1,3-glucanase et les chitinase (Mahesh, 2017). La résistance des racines de pomme de terre infestée par le nématode à kyste *Globodera rostochiensis* se traduit par le niveau d'expression génétique élevée des gènes R (H1 et Gro1-4), du gène PAL et des gènes de défense de la famille PR (PR1, PR2, PR3, PR6) tels que les PR1 de la supère famille de protéines riches en cystéine, PR2 (β -1,3-glucanases), PR3 (Chitinases) et la famille PR-6 tels que les inhibiteurs de protéase (Lavrova et al., 2017 ; Singh et al., 2014).

Zheng et al., (2020) ont rapporté que SA exogène initie la voie de résistance à la maladie similaire à celle initiée par les agents pathogènes en stimulant l'expression de panoplies de gènes de défense comme NPR, protéine thaumatine (PR-5, 4), chitinase (PR-3, 1) et thiorédoxine. Les protéines PR-2 sont des β -1,3-glucanases qui possèdent une activité 1,3- β -endoglucanase *in vitro*. Les β -1,3-glucanases sont des enzymes très abondantes qui catalysent le clivage hydrolytique de type endo des liaisons 1,3- β -D-glucosidiques dans les β -1,3-glucanes entraînant l'affaiblissement de la paroi cellulaire du pathogène provoquant sa

mort (Vierheilig et al., 1994 ; Colas, 2012). Les chitinases, quant à elles, catalysent l'hydrolyse de la liaison β -1,4 du polymère N-acétylglucosamine de la chitine. Les chitinases jouent un rôle dans la défense des plantes en inhibant directement ou indirectement la croissance des hyphes qui envahissent l'espace intercellulaire ou libèrent des éliciteurs de la paroi fongique qui servait de PAMP's (Levy et al., 2007 ; Balasubramanian et al., 2012 ; Singh et al., 2014).

II.4.c Les métabolites secondaires

II.4.c.1 Phytoalexines

Les phytoalexines sont des composés antimicrobiens de faible poids moléculaire. Ils sont synthétisés et accumulés par la plante en réponse à un stress ou interaction non-hôte (Alignan, 2006), contrairement aux phytoanticipines qui sont constitutives. Les phytoalexines ont des structures chimiques diverses. Plus de 350 ont été caractérisées parmi 30 espèces végétales (Ahuja et al., 2012). Il est admis que la voie de synthèse des phytoalexines est provoquée par l'acide jasmonique. L'acide jasmonique et son ester méthylique sont responsables de la synthèse des enzymes qui produisent les phytoalexines (Komaraiah et al., 2003). Les rishitines, lubimines, phytuberines et phytuberoles sont les principaux phytoalexines de la pomme de terre (Henfling et Kué, 1978 ; Mostafa, 2018). Cela représenterait pour la pomme de terre une meilleure résistance à certains agents pathogènes (Yao et al., 2003 ; Jeandet et al., 2013). Li Ran et al., (2015) ont identifié la voie de biosynthèse d'une phytoalexine sesquiterpénoïde de capsidiol 3-acétate comme une réplique antivirale contre l'ARN de virus de pomme de terre (Potato Virus X) chez *Nicotiana benthamiana*.

Néanmoins, certains agents pathogènes ont développé des mécanismes de tolérance, à cet égard. La *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) a la capacité de détoxifier les l'activité des phytoalexines de la pomme de terre, de même que son aptitude à provoquer la pourriture sèche. En effet, la capacité des phytoalexines de *Gibberella pulicaris* est inversement corrélée à la production de la pourriture sèche par les tubercules de pomme de terre infectée (Mostafa, 2018).

II.4.c.2 Phénylpropanoïde et voie de biosynthèse

Il existe deux types principaux de métabolisme chez les plantes, le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Le métabolisme primaire est le métabolisme des composés qui sont absolument nécessaires au fonctionnement normal et à la croissance de la plante, et il comprend le métabolisme des glucides, des protéines, des acides gras et des acides nucléiques. Le métabolisme secondaire est le métabolisme de composés qui ne sont pas manifestement vitaux pour la vie des plantes et il comprend la synthèse de composés tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les alcaloïdes, etc.

Les composés phénoliques comprennent les flavonoïdes, les ellagitannins, les coumarines, les furanocoumarines, les stilbènes, les lignines et les lignanes. Jusqu'à présent, quelques 9 000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes supérieures. Ils assurent diverses fonctions dans la biochimie, la physiologie et l'écologie des plantes. Ils forment les pigments des fleurs et des fruits et contribuent à la tolérance au stress biotique et abiotique. Ils fournissent aussi une protection anti UV et jouent un rôle dans la fertilité du pollen (Hanhineva, 2008 ; Castrillón et Délano, 2016).

Le marquage en ^{14}C du processus de biosynthèse des polyphénols a indiqué que le squelette de noyaux benzoïque est dérivé de deux voies distinctes impliquées dans le métabolisme primaire. Le malonyl-CoA produit via la voie du malonate (y compris l'acétate) et le précurseur du 4-coumaroyl-CoA via les voies de l'acide shikimique et du phénylpropanoïde (Fraser et Chapple, 2011). La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins de très haute complexité et de poids moléculaire élevé (Chira et al., 2008).

✓ Voie Malonate

La voie malonate consiste à réaliser non seulement un noyau benzénique mais aussi un ensemble de noyaux aromatiques par cyclisation de chaînes polycétoniques, elles-mêmes obtenues par la condensation tête-à-queue d'un acétyl-CoA et de deux malonyl-CoA pour former le cycle A (Croteau et al., 2000). L'acétyl-CoA est formé directement à partir d'hydrates de carbone en tant que partie intégrante du métabolisme primaire. Le malonyl-CoA est un précurseur de la biosynthèse des flavonoïdes et il fournit les unités C2 utilisées dans la synthèse du cycle A des flavonoïdes. Le malonyl-CoA a également un certain nombre d'autres utilisations dans la cellule, par exemple, il fournit les unités C2 utilisées pour la

synthèse des cires cuticulaires, des stilbénoides et des anthroquinones (Vermerris et Nicholson, 2006a ; Babenko et al., 2019).

✓ Voie du shikimate

La voie du shikimate commence par la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose 4-phosphate (E4P) pour former un heptose : le 3-désoxy-D-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) et le phosphate inorganique. Une suite des réactions faisant intervenir successivement une cyclisation, une déshydratation, puis une réduction par le NADPH, conduit au shikimate (Figure 13).

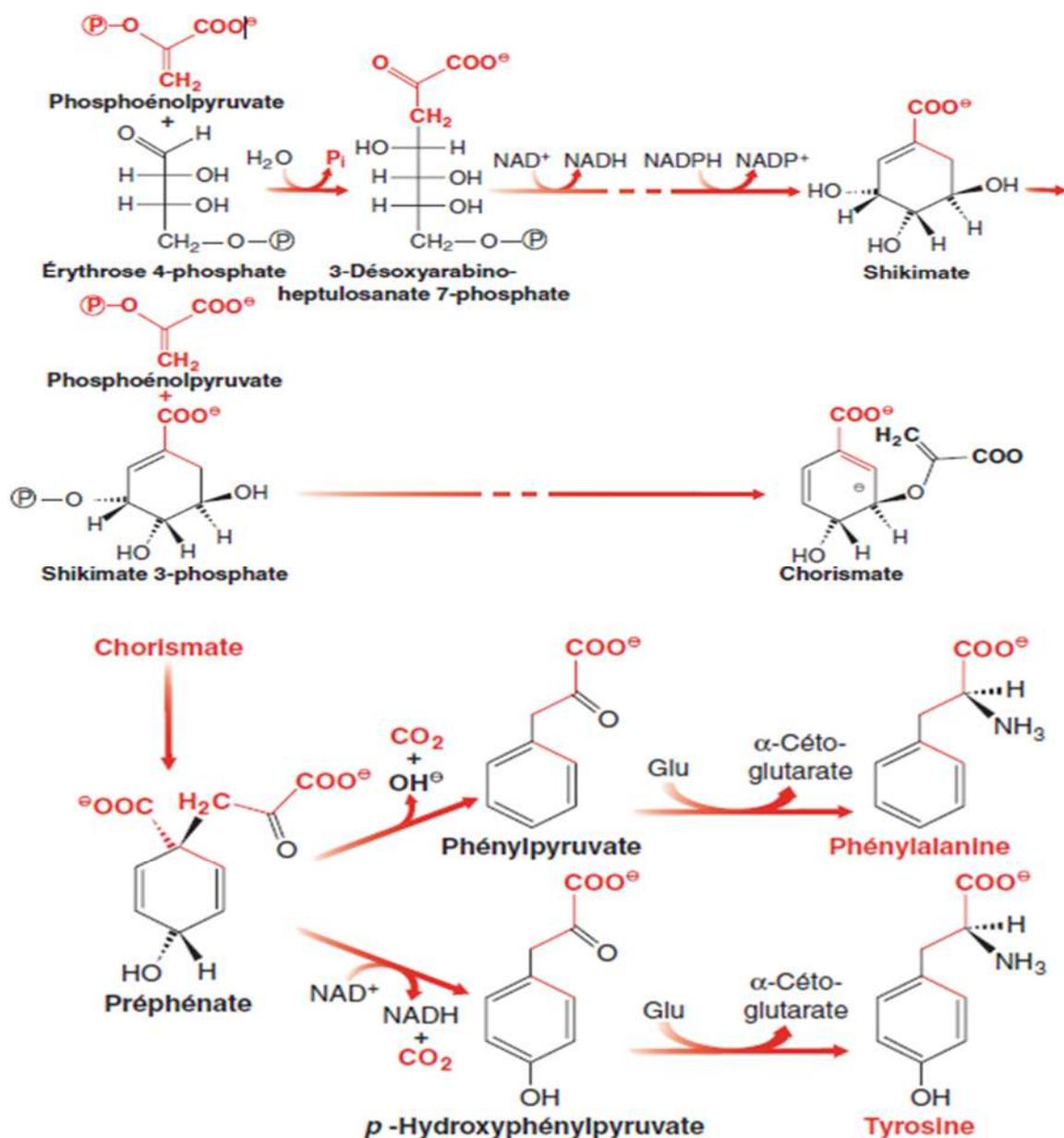


Figure 13 : Voie de shikimate et synthèse de phe et de tyr (Weinman et Méhul, 2004).

La phosphorylation produit alors le substrat de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthèse. La chorismate synthase catalyse ensuite une élimination 1,4-trans du groupement phosphate EPSP résultant en chorismate. Les voies de biosynthèse des trois acides aminés aromatiques divergent à ce stade.

Les étapes métaboliques conduisant à Phénylalanine et Tyrosine découlant indépendamment via le prephénate de celles conduisant à Tryptophane (Weinman et Méhul, 2004). L'élimination ultérieure des groupes carboxylate et hydroxyle du cycle via l'arogénate déshydratase comprend l'étape finale de la biosynthèse de la phénylalanine dans les plantes (Lewis, 1996).

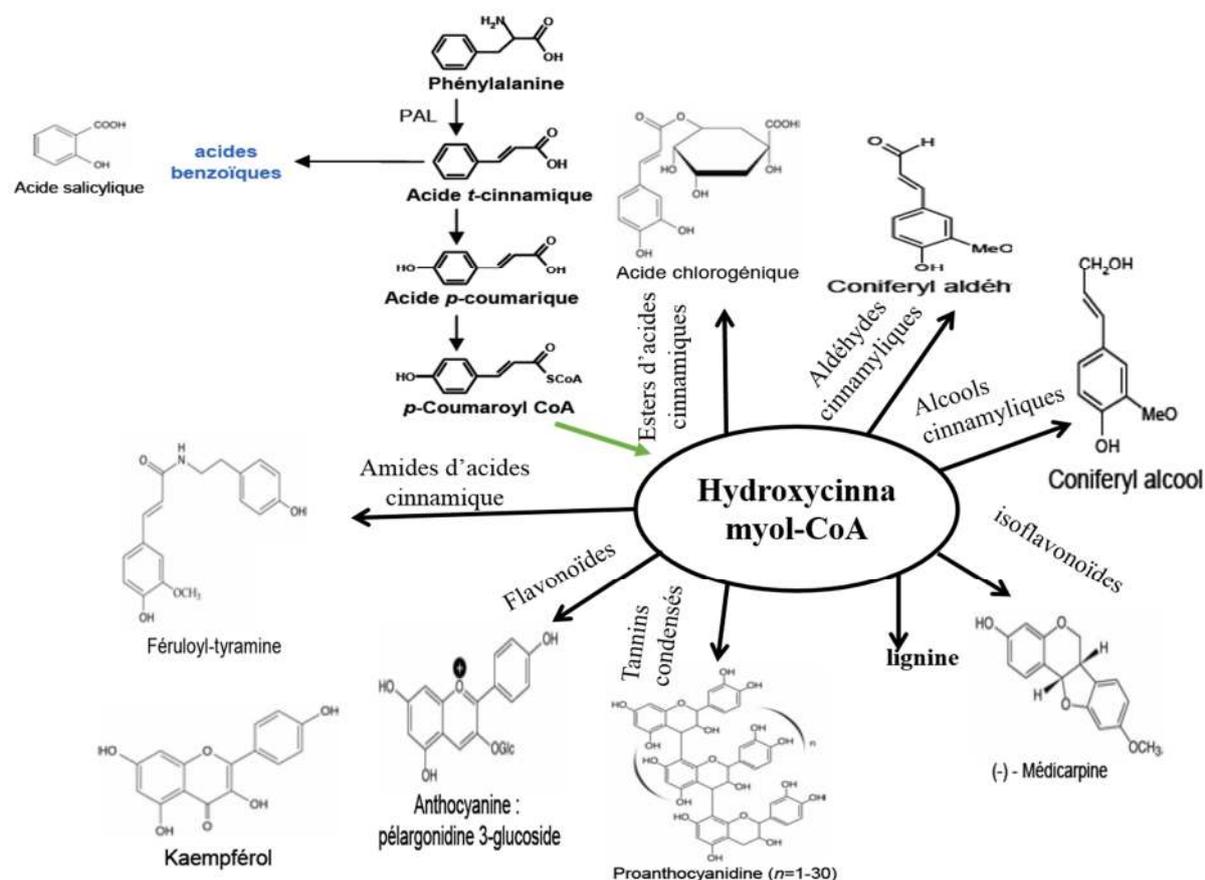


Figure 14 : Métabolisme du phénylpropanoïde chez *Arabidopsis* (Fraser et Chapple. 2011). Les réactions horizontales correspondent aux modifications du cycle, les réactions verticales correspondent aux modifications de la chaîne latérale. PAL, phénylalanine ammoniac-lyase; C4H, acide cinnamique 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate: CoA ligase; HCT, hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate: quinate hydroxycinnamoyl-transférase; C3'H, p-coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase; CCoAOMT, caféoyl CoA 3-O-méthyltransférase; CCR, cinnamoyl-CoA réductase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; COMT, acide caféique / acide 5-hydroxyférulique O-méthyltransférase; CAD, alcool déshydrogénase cinnamylique; HCALDH, hydroxycinnamaldéhyde déshydrogénase. La réaction catalysée par HCALDH conduit à la synthèse des esters de férulate et de sinapate.

Le métabolisme du phénylpropanoïde commence à partir de l'acide amine phénylalanine. La désamination de ces acides aminés conduit aux acides hydroxycinnamiques dont les esters-CoA sont à leur tour à l'origine de la plupart des classes de composés phénoliques (Figure 14). Bien que la phénylalanine soit le principal substrat de la voie phénylpropanoïde menant à la production de 4-coumaroyl-CoA, la tyrosine peut également être utilisée dans une réaction parallèle conduisant à la voie phénylpropanoïde et à la production de 4-coumaroyl-CoA.

✓ La voie générale des phénylpropanoïdes

Chez les plantes, la phénylalanine ammoniac-lyase (EC 4.3.1.5) joue un rôle clé dans la liaison du métabolisme primaire au métabolisme phénylpropanoïde en convertissant la L-phénylalanine en acide *trans*-cinnamique (Figure 14). Il est considéré comme un point d'entrée vers la biosynthèse d'un grand nombre de produits dérivés du squelette phénylpropane. La synthèse de phénylpropanoïde est activée en réponse au stress qui comprend le traitement par éliciteur, l'infection par un pathogène, les blessures, l'irradiation aux UV et comme des signaux moléculaires au cours des processus de reconnaissance dans les interactions plante-pathogène (Li et al., 2010).

L'acide cinnamique, quant à lui, est hydroxylé par cinnamate 4-hydroxylase (C4H) pour donner l'acide *p*-coumarique. Ce composé peut également résulter de la désamination de la tyrosine obtenu par l'activité des phénylalanine/tyrosine ammonialyases (PAL, TAL) (Petersen et al., 2010). L'acide *p*-coumarique est converti en *p*-coumaroyl coenzyme A par l'action de l'enzyme 4-coumarate CoA-ligase (4CL). La voie générale des phénylpropanoïdes (Figure 14 & 15) se termine par le *p*-coumaroyl coenzyme A. D'autres réactions conduisent à la biosynthèse de classes spécifiques de composés phénoliques (Vermerris et Nicholson, 2006a ; Fraser et Chapple, 2011).

✓ Synthèse de l'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique (acide 5-O-caféoyl-D-quinique) et ces trois autres isomères (acide 3-cafféoylquinique (3CQA); acide 4-cafféoylquinique (4CQA); acide 5-feruloylquinique (5FQA)) sont les principaux métabolites secondaires présents dans le tubercule de pomme de terre et les graines de café (Hoffman, 2003 ; Koshiro et al., 2007 ; Im et al., 2008). Ils sont un exemple de composé préformé qui ont un niveau de toxicité relativement efficace contre les microorganismes considérés comme de faibles pathogénités

pour la pomme de terre telle la galle (*Streptomyces scabies*) (Vermerris et Nicholson, 2006b).

Gamborg, (1967) a démontré sur des cultures de suspension cellulaire de pomme de terre que l'acide quinique et l'acide caféique servent de précurseurs directs dans la biosynthèse de l'acide chlorogénique et la formation de lignine dans les cellules de pomme de terre. La synthèse du 5CQA est dérivée d'hydroxycinnamoyl-CoA, bien qu'une voie alternative impliquant l'hydroxycinnamoyl-glucose ait également suggéré chez les patates douces (Hoffman, 2003).

Le gène *C3'H* encode pour la 4-coumaroyl-3-hydroxylase qui catalyse la conversion de l'acide 4-coumarique/4-coumaroyl-ester en acide caféique/caféoyl-ester respectivement, ainsi que le gène *CCoAMT* qui code pour la caffeoyl-CoA 3-O-méthyltransférase qui catalyse la formation de féruloyle-CoA à partir de caffeoyl-CoA sont mise en évidence par Koshiro et al., (2007).

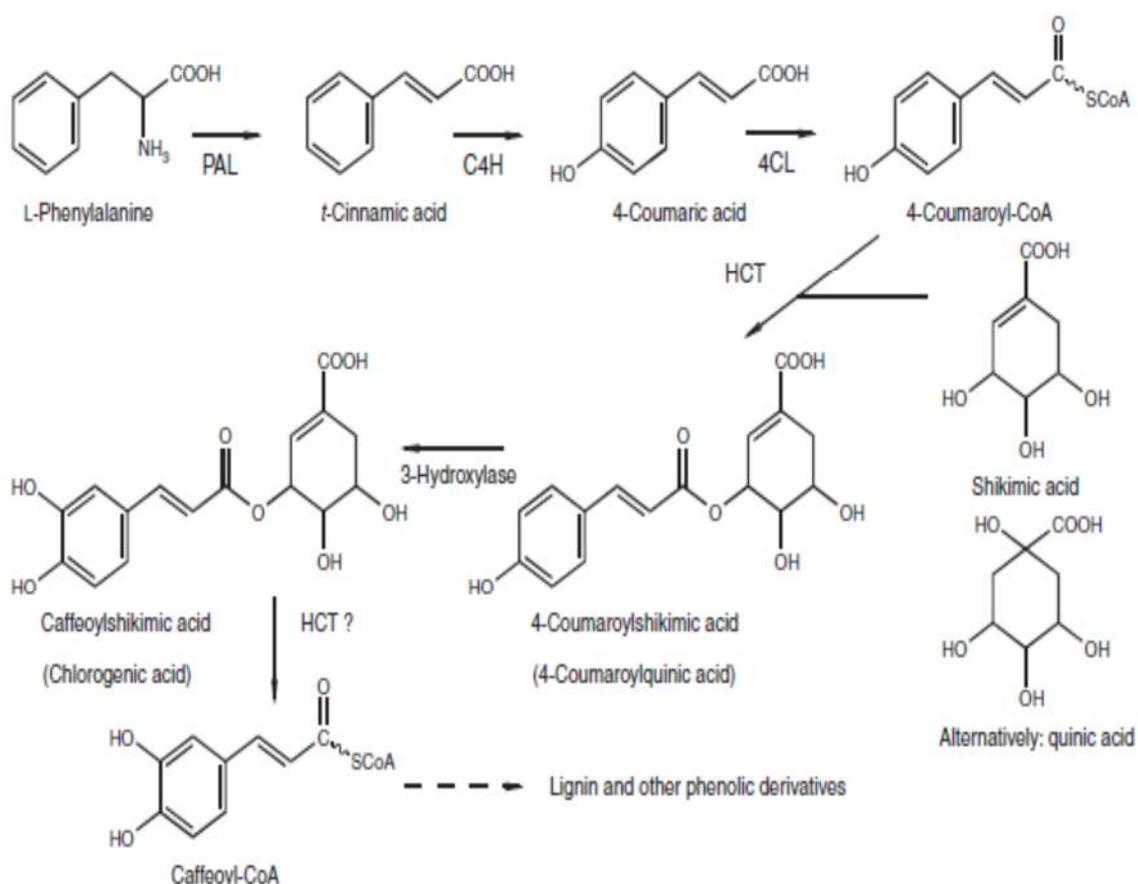


Figure 15 : voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique (Petersen et al., 2010). C4H : cinnamate 4-hydroxylase, 4CL : 4-coumarate : CoA-ligase, HCT : hydroxy cinnamoyl CoA: shikimate/quinate hydroxy cinnamoyl transférase, 3-hydroxylase, 4-hydroxy cinnamoyl shikimate / quinate 3-hydroxylase.

Des études ont montré que l'incorporation de la [U-14C] radioactive de la phénylalanine est détectée dans l'acide caféique et le 5CQA (Koshiro, 2006). Ces résultats suggèrent que la voie de synthèse de l'acide chlorogénique (Figure 15) suit le schéma suivant, phénylalanine → acide cinnamique → acide 4-coumarique → acide caféique → caféoyl-CoA → 5CQA opéré chez les plantes du café. Le 5FQA semble être formé à partir de caféoyl-CoA via la féruloyl-CoA sous l'action de caféoyl-CoA 3-ométyltransférase (Koshiro et al, 2007).

✓ Lignine

La lignine, après la cellulose, est le deuxième biopolymère terrestre le plus abondant (Boerjan et al., 2003). C'est un polymère phénolique dérivé principalement d'alcools hydroxy cinnamyl, il est omniprésent dans les trachéophytes (Weng et Chapple, 2010). Il se dépose dans plusieurs types et organes de cellules végétales, notamment, les tissus vasculaires, les cellules de sclérenchyme, les cellules endodermiques, les cellules de l'enveloppe des graines et les cellules siliques (Barros et al., 2015). La fonction principale de la lignine est de fournir un support mécanique et une hydrophobicité pendant la conduction de la sève, entre autres, et maintenir l'intégrité structurelle de la paroi cellulaire, la rigidité et la résistance de la tige. De plus, la lignine imperméabilise la paroi cellulaire permettant le transport de l'eau et des solutés à travers le système vasculaire et joue un rôle comme barrière protectrice contre les agents pathogènes (Boerjan et al., 2003 ; Lee et al., 2019). La lignine est cruciale pour l'intégrité structurelle de la paroi cellulaire, la rigidité et la résistance de la tige.

La lignine est le terme générique désignant un grand groupe de polymères aromatiques résultant du couplage aléatoire oxydatif sous l'action des enzymes phénoloxydases qui génèrent de radicaux monolignol formant les trois sous-unités de 4-hydroxyphénylpropanoïdes : p-hydroxyphényl (**H**), guaiacyl (**G**) et syringyl (**S**) (Figure 16) connus sous le nom de monolignols : alcool p-coumarylique, alcool coniférylique et sinapylique de l'alcool respectivement (Boerjan et al., 2003 ; Vanholme et al., 2010).

Les monomères de lignine sont synthétisés par la voie phénylpropanoïde (Figure 16). Cette voie ne produit pas exclusivement des monomères de lignine mais elle est également impliquée dans de nombreux autres processus tels que la synthèse d'hormones, de flavonoïdes, de subérines et de lignanes (Whetten et Sederoff, 1995 ; Weng et Chapple, 2010).

La voie phénylpropanoïde commence par le précurseur de la phénylalanine. Ce précurseur est ensuite converti en différents monolignols par des étapes enzymatiques séquentielles qui impliquent l'hydroxylation et la méthylation du cycle aromatique ainsi que l'élimination du groupement amine et la conversion du groupement acide carboxylique en un alcool (Serk, 2015).

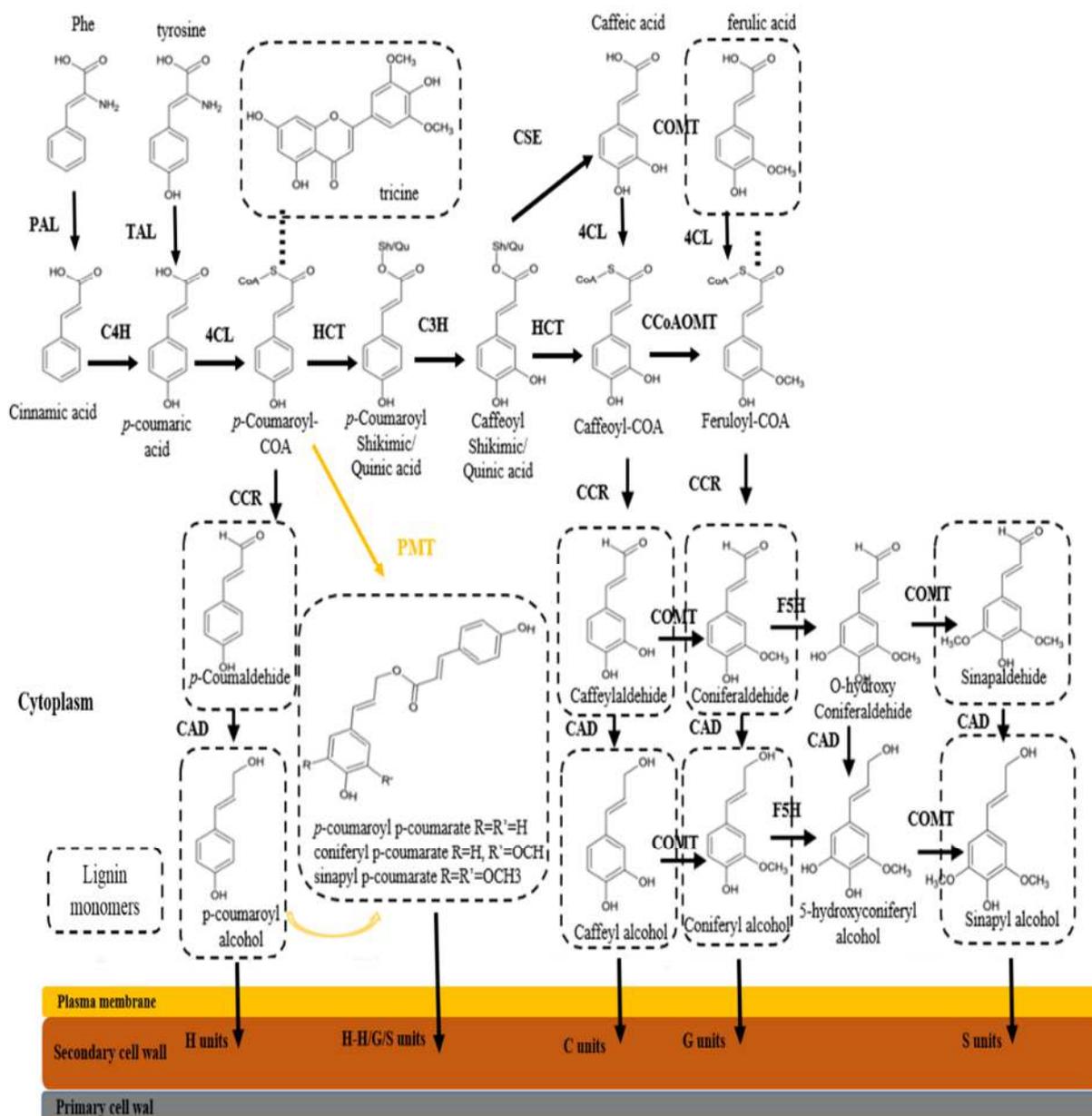


Figure 16 : Voie générale de biosynthèses de la lignine (Barros et al., 2015). Les cases en pointillé indiquent les monomères de lignine incorporés à la lignine. PAL, phénylalanine ammoniac-lyase; TAL, tyrosine ammoniac-lyase; C4H, cinnamate 4 hydroxylase; 4CL, 4-coumarate: CoA ligase; C3H, p-coumarate 3 hydroxylase; HCT, p-hydroxycinnamoyl-CoA: quinate / shikimate p hydroxycinnamoyl-transférase; CSE, cafféoyl shikimate esterase; CCoAOMT, caféoyl-CoA O-méthyltransférase; CCR, cinnamoyl-CoA réductase; CAD, alcool déshydrogénase cinnamylique; COMT, O-méthyltransférase d'acide caféique; F5H, ferulate 5-hydroxylase; PMT, p-coumaroyl CoA: monolignol transférase.

La *p*-hydroxylation du cycle aromatique est introduite par l'enzyme monogénique C4H qui donne l'acide *p*-coumarique, à son tour transformé en *p*-coumaryl-CoA, par l'enzyme 4CL (Yang et al., 2011). Le *p*-coumaryl-CoA est soit directement converti en monomère de lignine à motif H de l'alcool coumarylique par CCR et CAD ou bien en *p*-coumaroyl/shikimat/ acide quininc par l'enzyme HCT (Whetten et Sederoff, 1995), ensuite en caffeoyl /shikimat/acide quininc par C3H (figure 18). La *méta*-hydroxylation des produits HCT/C3H par l'enzyme CSE conduits à l'acide caféique (Serk, 2015).

Les enzymes CCoAMT et COMT sont capables de convertir la *méta*-hydroxylation en une *méta*-méthoxylation. CCoAOMT transfère le groupe méthyle de SAM au groupe 3-OH aromatique de caffeoyl-CoA et au groupe 5-OH de 5-hydroxyferuloyl-CoA. De ce fait, formant le feruloyl-CoA et le sinapoyl-CoA (Petersen et al., 2010). Par leurs actions et leurs fonctions de *méta*-hydroxylation vont méthyle le caffeoyl-CoA et l'acide caféique en feruloyl-CoA conduisant au motif G après l'intervention de CCR et DAD. Le motif S se forme soit par *méta*-hydroxylation de coniferaldehyde (produit de CCR sur feruloyl-CoA) par COMT conduisant ainsi au sinapaldehyde déshydrogéné par DAD pour donner sinapyl alcool (syringyl (S)) (Boerjan et al., 2003 ; Vanholme et al., 2010 ; Weng et Chapple, 2010 ; Barros et al., 2015).

La synthèse des monomères de lignine est localisée dans le cytosol près de la surface du réticulum endoplasmique (Lee et al., 2019). Récemment, une nouvelle sous-unité catéchyle (C) a été identifiée dans l'enveloppe des graines et elle dérive du monomère alcool de caféine. Cela montre que les lignines dérivées de plusieurs monomères de plus que les trois monolignols citées ainsi que d'autres ont été identifiées dans les plantes transgéniques (Serk, 2015 ; Lee et al., 2019).

PARTIE
EXPÉRIMENTALE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE I

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériel végétal

Des plants de pomme de terre Agata ont été cultivés sous serre à des fins expérimentales. Des jeunes tiges de plantes âgées de 2 mois ont été soigneusement lavées (eau courante du robinet) pendant 10 minutes. Des sections de tiges (1–1,5 cm de long) préalablement lavées ont été asséchées sous hotte température à flux laminaire sont trempées dans de l'éthanol 70% pendant 1 minute, elles sont rincées 3 fois à l'eau distillée stérile puis submergés dans une solution aqueuse de HgCl₂ à 0,1 % (p/v) pendant 20 minutes dans un bain-marie à ultrasons. Les sections de tiges ont été rincées 3 fois à l'eau distillée stérile puis immergées dans une solution d'hypochlorite de sodium contenant 3 gouttes de Tween 20 et remis au bain-marie à ultrasons pendant 30 minutes. Enfin, les sections de tiges ont été lavées 3 fois avec de l'eau distillée stérile et asséchés pendant 20 minutes sur papier stérile dans des conditions aseptiques. (Miriam Onrubia et al., 2010).

Les nodaux (bourgeons) ont été cultivés en baby-food Cristal contenant 100 ml de milieux solides Murashige et Skoog (MS) à pH 5,8 avec 10 g/l de saccharose et 2,7 g/l de phytigel (Murashige et Skoog, 1962) privés de régulateurs de croissance. Toutes les cultures *in vitro* ont été placées en chambre de croissance à 23±2°C sous photopériode de 16h (200 μmol/m²/s).

I.2. Culture de cal

Les bourgeons de plantules âgés de 4 semaines, obtenus après germination *in vitro* ont été excisés de manière aseptique et utilisés comme plants pour établir des cultures de calls (Figure 31). Ils ont été cultivés en boîtes de Pétri sur milieu MS à l'obscurité additionné de 2 mg/l d'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique, 2 mg/l de kinétine et 2 mg/l d'acide naphthalèneacétique, 1,5 % de saccharose et 2,7 g de phytigel. Des repiquages de cals (2 g) ont été effectués tous les 15 jours (Cusido et al., 2014)

I.3. Cultures de suspension cellulaires

Des cultures en suspension cellulaire ont été établies à partir de cultures de cals après 3 sous-cultures (Cusido et al., 2014). Pour cela, des cals blancs (2 g) du cultivar Agata ont été repiqués dans du baby-food Cristal contenant 20 ml de milieu liquide MS composé de micro et

oligonutriments de Murashing et Skoog, (1962) et additionné de 2,0 mg/l de 2-4 acide dichlorophénoxyacétique, 2,0 mg/l de kinétine et 2,0 mg/l d'acide naphthalèneacétique et 1,5 % de saccharose. Les cultures de cals en bébé-food ont été maintenues dans une chambre de culture à agitation rotative de 125 tr/min à 25 °C (Figure 17). La sous-culture a été effectuée toutes les 2 semaines.

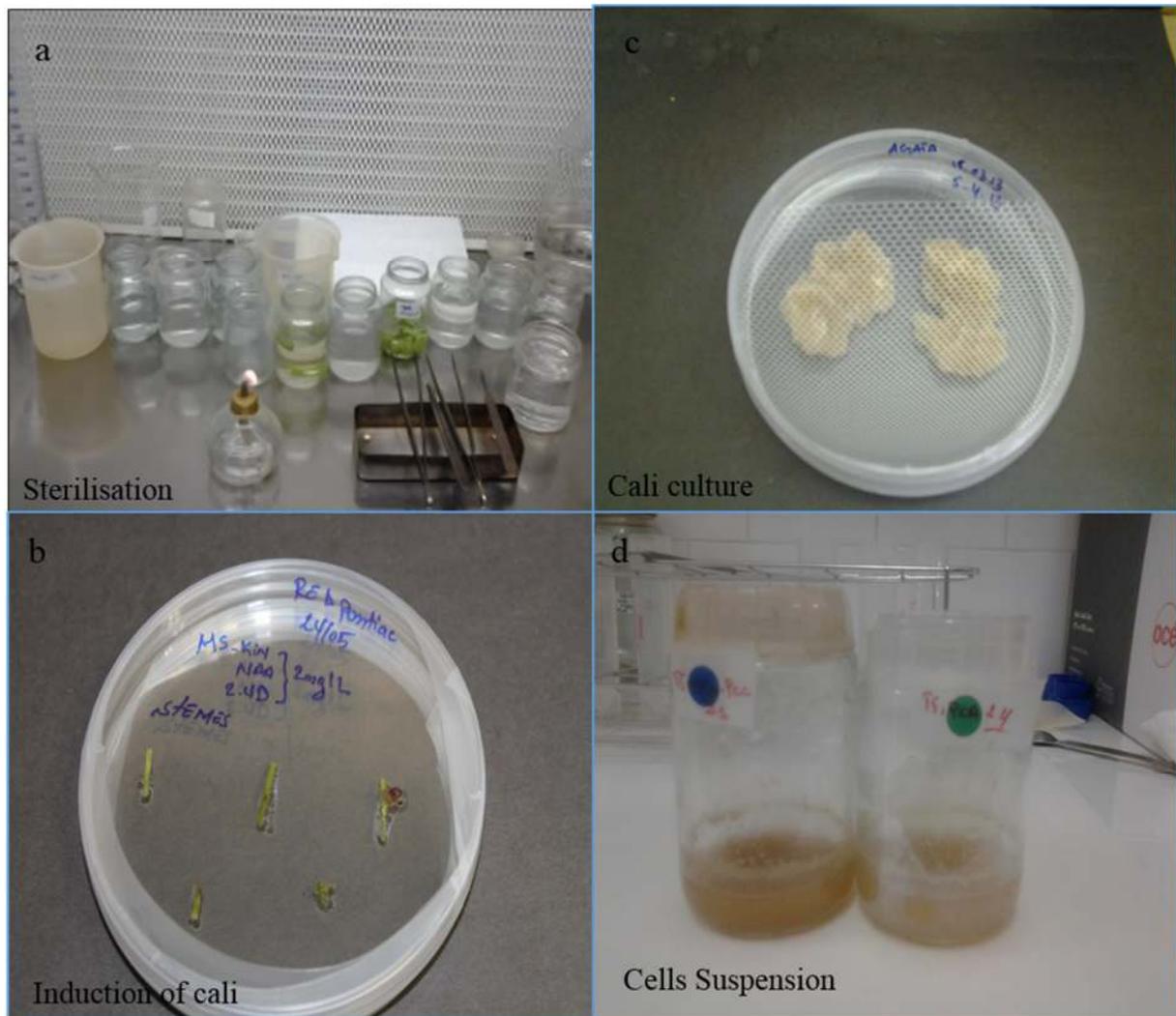


Figure 17 : Procédure de stérilisation et induction de Cali sur pomme de terre de la variété Agata. a : stérilisation ; b : induction de cali dans boîte de pétri ; c : repiquage de cali sous boîte de pétri ; d : suspension cellulaire dans un milieu liquide.

I.4. Chitosane

Le chitosane, un éliciteur bien connu pour les cultures de cellules végétales, a également été utilisé pour étudier l'accumulation de composés phénoliques. La solution mère a été préparée en dissolvant 1 g de chitosane de carapace de crabe (Sigma Chemical Company, USA) dans 2 ml d'acide acétique glacial en l'ajoutant goutte à goutte. Le volume final a été porté à 100 ml en

ajoutant de l'eau bidistillée. Le pH de la solution a été ajusté à 5,7 avec NaOH ou HCl avant autoclavage (Malerba et al., 2012).

I.5. Préparation des parois cellulaires bactériennes

Les parois cellulaires de *Pectobacterium atrosepticum* 5889 (Pa-5889) ont été isolés à partir de cultures sous milieu KB liquide à 27°C. Les bactéries ont été recueillies par centrifugation et remises en suspension dans 50 mM de Tris-HCl et 2 mM d'EDTA (pH 8,5). Les cellules ont ensuite été soniquées huit fois pendant 10 secondes sur de la glace à l'amplitude de résonance. Les cellules intactes ont été retirées de la suspension soniquée par centrifugation à $600 \times g$ pendant 20 min. Après centrifugation du surnageant à $8\,000 \times g$ pendant 60 min, le culot de parois cellulaires contenant du LPS a été remis en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate 10 mM (pH 7,2) plus 0,01% d'azoture de sodium et conservé à -80 °C jusqu'à une utilisation ultérieure (Figure 18). L'absence de bactéries vivantes a été vérifiée par étalement de culture sur KB solide (Saskia et al., 1997).

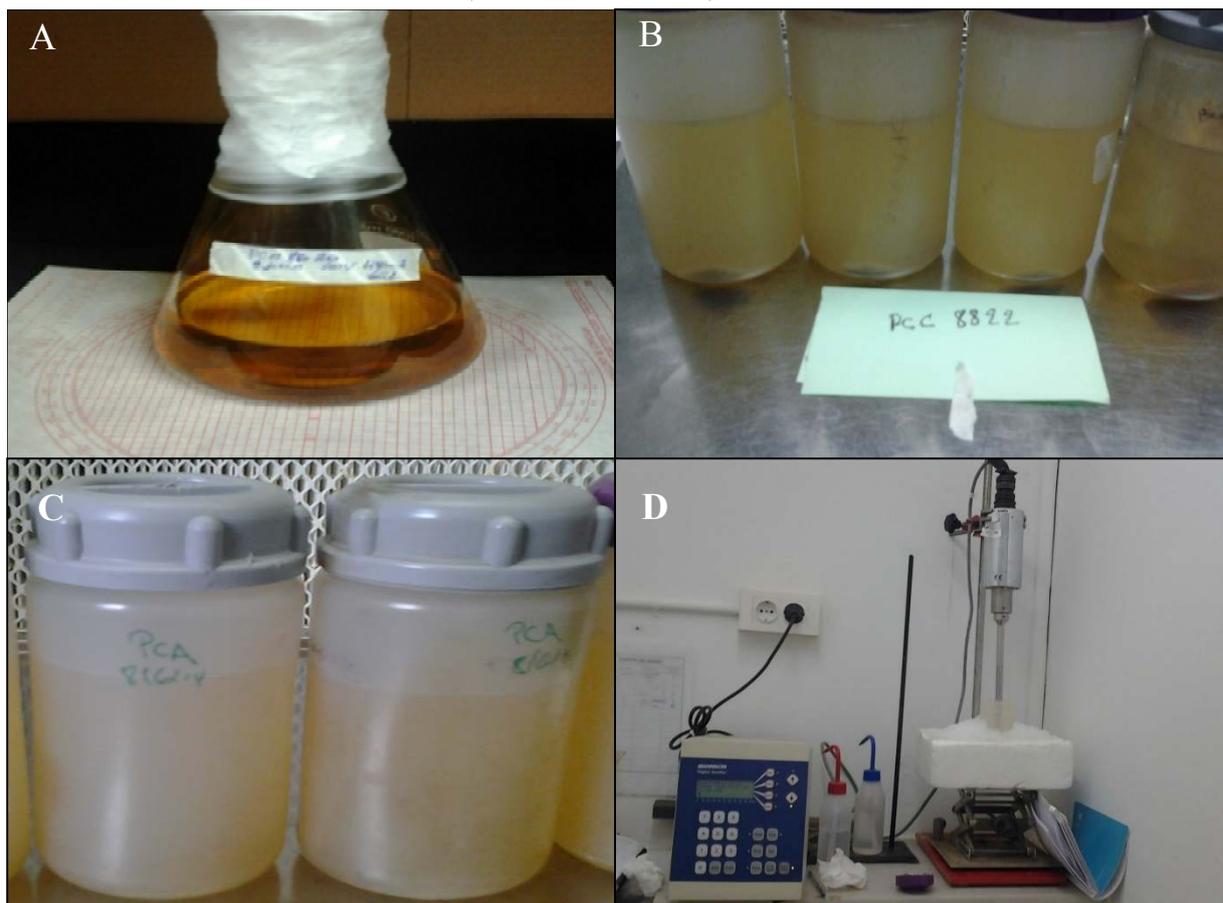


Figure 18 : Extraction des LPS de *Pectobacterium atrosepticum*. a : culture de *Pectobacterium atrosepticum* sur milieu King B liquide ; b : collecte bactérienne par centrifugation ; c : mise en suspension de cellule bactérienne dans une solution de Tris-HCl ; d : sonication de la suspension bactérienne sur de la glace.

I.6 concept expérimental

Les cultures cellulaires de pommes de terre ont été cultivées dans des flacons d'aliments pour bébés de 250 ml contenant 20 ml de milieu de croissance. 100 μ M de concentrations de chitosane ont été ajoutés le 8ème jour à la suspension cellulaire à la fin de la phase de croissance. 72 heures plus tard, les extraits (LPS) de Pa-5889 (125 mg/l) ont été ajoutés au milieu de culture et incubés pendant 96 heures supplémentaires. La récolte des cultures cellulaires a été réalisée au 8ème jour (T0) de culture, 11ème jour (T3), 13ème jour (T5) et au 15ème jour (T7) de l'expérimentation (Figure 19). Les cellules ont été séparées de milieu par filtration aspiration sous vide des cultures en suspension à l'aide de filtres Miracloth (Calbiochem, CA). La masse cellules pesées, puis lyophilisée pour obtenir le poids sec. La biomasse cellulaire lyophilisées ont été analysées pour déterminer la teneur et l'accumulation de composés phénoliques et les activités PAL.

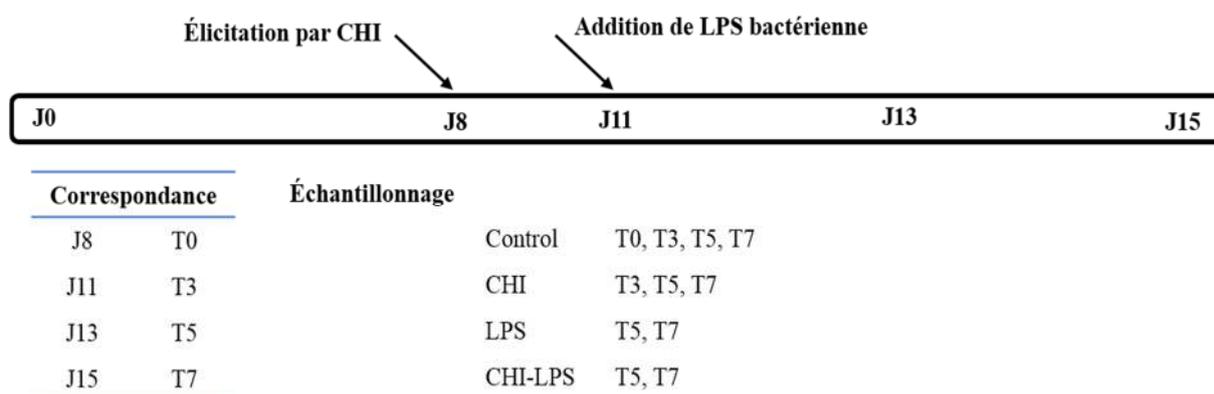


Figure 19 : schéma expérimentale.

I.7. Extraction et quantification des métabolites secondaires

I.7.1. Extraction

Les cellules lyophilisées réduites en poudre à l'aide de tissus-lyser. 1 mg de tissu de matière sec a été placé dans un tube à centrifuger Falcon de 5 ml et 2 ml du solvant d'extraction (méthanol 80 %) ont été ajoutés au tube. Les tubes ont été bouchés, immergés et soniqués dans un bain-marie à 40°C pendant 45 minutes et l'opération a été répétée deux fois. Les deux extractions ont été mélangées. Après avoir agité vigoureusement les échantillons, les tubes ont été refroidis et centrifugés à 10 000 tr/min pendant 5 minutes. Le volume final de surnageant clair a été porté à 1 ml et a été utilisé pour l'analyse des composés phénoliques. L'ajout d'hexane aux extraits méthanoïques a fin d'éliminé les lipides polaires et autres composés interférents.

Le surnageant alcoolique a été évaporé en utilisant un flux de gaz d'azote et le culot visqueux laissé dans le tube a été dissous dans 150 μ l de méthanol 80 %. La phase alcoolique a été utilisée pour l'analyse HPLC (Padda, 2006).

I.7.2 Composés phénoliques totaux

Teneur en composés phénoliques (PCC) a été déterminé avec la méthode folin-ciocalteu (Ouchemoukh et al., 2012), en utilisant l'acide gallique comme standard. Un volume de 0,5 ml d'extraits d'échantillons a été mélangé avec 0,625 ml de réactif folin-ciocalteu à 10 % (v/v). Après 2 min, 0,5 ml de Na_2CO_3 à 7,5% (p/v) sont ajoutés. Le mixte est incubé pendant 10 min à 50°C. L'absorbance de chaque réaction a été mesurée à une longueur d'onde de 765 nm dans un spectrophotomètre Genesys 20 Spectronic. L'équipement a été ajusté à une absorbance nulle en utilisant le blanc suivant : 2 ml d'eau plus 2,5 ml de réactif folin-ciocalteu à 10 % et 2 ml de Na_2CO_3 à 7,5 %. Un étalonnage standard a été préparé en utilisant de l'acide gallique (80 - 40 - 20 - 10 et 5 mg/ml) et le PCC dans chaque échantillon a été calculé et exprimé en milligrammes équivalents à l'acide gallique par gramme de poids de biomasse sèche, $\mu\text{g/g}$ GAE DW.

I.7.3 Détermination des composés phénoliques par HPLC (Padda et Picha, 2008)

Une aliquote du surnageant de l'extrait cellulaire a été filtrée à travers un filtre à membrane Nylaflo de 0,22 μm (Waters Millipore, Billerica, MA, USA). En utilisant le système de chromatographie liquide haute performance Waters Acquity (Waters, Milford, MA). L'analyse HPLC-UV a été réalisée selon la méthode de (Hachoud et al., 2019). Les acides phénoliques individuels ont été séparés à température ambiante en utilisant une colonne thermodynamique 18C (5 μm ODS, 250 x 4 mm) en utilisant un grade HLPC, les éluants étant l'acétonitrile 0,5% d'acide formique (A) et l'eau avec 0,5% d'acide formique (B) selon le profil suivant : 0-15 min, 50 % A ; 15-22 min, 40 % A ; 22-25 min, 40 % A ; 25-35 min, 50 % A.

Le débit était de 1 ml/min et le détecteur PDA était réglé à 275 nm. Une aliquote de 15 μ l d'échantillon a été injectée sur la colonne en utilisant un auto-échantillonneur Waters 717 plus connecté à une pompe Waters 600 (Waters Corp., Milford, MA). Les courbes d'étalonnage ont été obtenues à partir d'une solution mère avec les six acides phénoliques à 10 mg/ml dans un mélange méthanol-eau de qualité HPLC. À partir de cette solution mère, 15 μ l ont été injectés trois fois pour chaque concentration. Les pics détectés ont été identifiés et quantifiés en comparant le temps de rétention avec celui d'étalons connus (Acide chlorogénique,

Pyrocatechol, acide caféique, acide p-coumarique et acide gallique et quercitrine). L'analyse a été réalisée en triple.

I.8 Essai sur les protéines et le PAL

I.8.1 Protocole d'extraction

Broyer 1 à 2 g d'échantillon dans de l'azote liquide avec 50 mg de PVP et ajouter 5 ml de tampon phosphate de potassium (pH 8, 0,1 M) avec 50 µl de DTT (1 mM) puis soniqué 20 sec (3 fois, refroidi entre chaque sonication). L'ensemble a été centrifugé à 10.000 rpm pendant 25 min à 4°C puis le surnageant a été filtré à travers une seringue avec de la laine de verre et conservé à -80 °C (Vanitha et al., 2009).

I.8.2. Quantification des protéines

La quantification est réalisée à l'aide du RC DC™ Protein Assay Kit II. Un tube d'ependorf contenant 25 µl d'extrait d'échantillon mélangé avec 125 µl de RC réactif I et homogénéisé pendant 1 min. Ajouter 125 µl de RC réactif II, homogénéiser et centrifuger à 15000 rpm, 3 ou 5 min (si le culot est encore mou, centrifuger 6-10 min). Jeter le surnageant rapidement et ajouter 127 µl de RC réactif A, homogénéiser et laisser 5 min à température ambiante. Ajouter 1 ml de DC réactif B et homogénéiser à l'aide d'un vortex immédiatement et laisser reposer pour incubation pendant 15 min. Mettre 1 ml de la solution dans une cuve en quartz et lire l'absorbance à 750 nm. La concentration a été exprimée en mg/g de cellule (selon RC DC™ Protein Assay Kit II).

I.8.3 Activité PAL

L'activité de PAL a été déterminée comme le taux de conversion de la L-phénylalanine en acide trans-cinnamique. Un tube contenant 150 µl d'extrait brut a été incubé à 36 °C pendant 10 min avec 650 µl de tampon phosphate de potassium (pH8, 0,1M, sans glycérol) et 200 µl 0,1M de tampon phénylalanine-phosphate de potassium (pH8, 0,1 M). La valeur de densité optique (D.O) a été enregistrée à 290 nm pour mesurer l'accumulation d'acide cinnamique en tant que augmentation d'ABS. La courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide trans-cinnamique. L'activité enzymatique est exprimée en nanokatal, 1 katal représente la conversion de 1 mol de substrat en produit par seconde (Vanitha et al., 2009).

I.9 Analyses statistiques

Toutes les déterminations ont été menées en triple et les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart type. Les résultats ont fait l'objet d'une analyse de la variance (FACTORIAL ANOVA), suivie d'une comparaison multiple des moyennes (Test LSD) au moyen du logiciel Statistica version 5.5. Les résultats ont été classés par ordre décroissant a>b>c>d>e, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE I

RÉSULTATS

II. Résultats

II.1 Croissance cellulaires

Dans nos conditions expérimentales et en absence de tout traitement, l'évolution de la croissance cellulaire illustrée par la figure 34. Trois phases se distinguent :

- Une phase de latence qui dure de J0 à J3 ; le poids cellulaire varie (DNS, $p > 0.05$) de 2,01 g (J0) à 2,1 g (J3).
- Une phase de croissance exponentielle qui dure 9 jours (J3 à J12). Le poids cellulaire passe de 2,1 g (J3) à 11,62 g (J12) soit un gain de poids de 9,52 g en 9 jours.
- Une phase stationnaire de J12 à J15. Le poids cellulaire varie (DNS, $p > 0.05$) de 11,62 (J12) à 11,73 (J15).

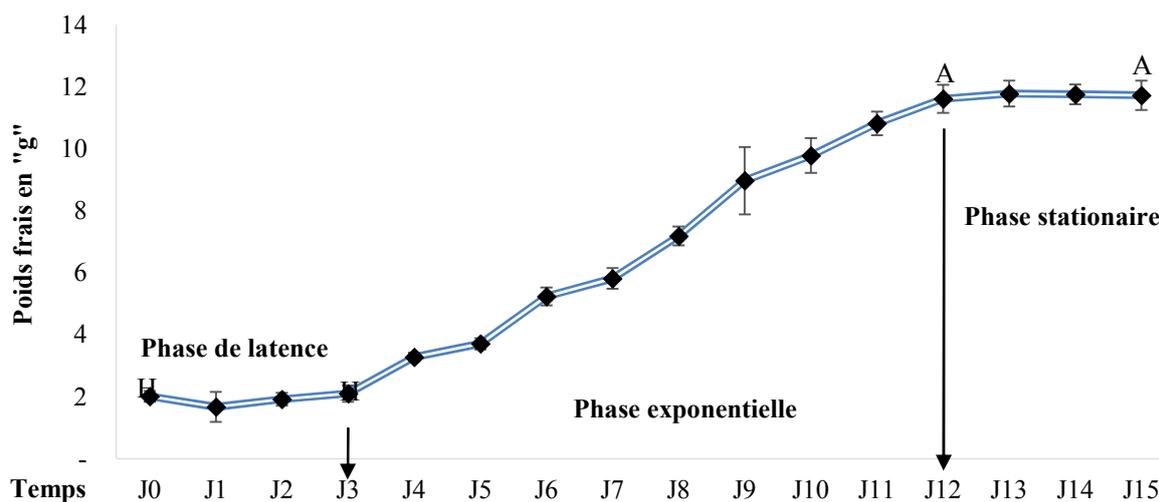


Figure 20 : Courbe de croissance cellulaire de témoin (poids cellulaire en gramme). (Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)).

Notre dispositif expérimental a introduit au cours de cette croissance un traitement au chitosane et au LPS qui ont induit des variations de croissance résumées par la figure 21. Ces traitements administrés aux temps notés T0, T3, T5 et T7 correspondant respectivement aux temps J8, J11, J13 et J15 rapportés par la figure 21. Globalement nous notons une similitude dans la croissance cellulaire entre les quatre traitements (Figure 21.1). La figure 21.2 met en évidence des différences entre les traitements appliqués : à T3, tous les lots enregistrent une croissance significative par rapport à T0 ($p < 0.05$). Au-delà de T3, nous notons une baisse significative de la croissance notée à T7 pour le traitement au LPS ; par contre la croissance

pour les lots témoin ou traités au chitosane (seul ou associé au LPS) n'est pas affectée ($p < 0.05$).

Les cellules stimulées par le chitosane montrent un schéma de croissance similaire au témoin ; Les suspensions cellulaires élicitées par le chitosane se caractérisent par une diminution de la biomasse cellulaire de 22,96% en T3, de 17,05% en T5 et de 15,82% en T7 comparativement au témoin correspondant.

L'analyse statistique a mis en évidence quatre groupes correspondant à chaque temps d'incubation (Figure 21.3). Pour un même traitement (Figure 21.3) la croissance cellulaire est significativement ($p < 0.05$) réduite par les traitements appliqués. À T5, le chitosane et le LPS réduisent avec la même intensité (DNS, $p > 0.05$) la croissance cellulaire.

II.2 Accumulation phénolique totale (PTS)

La figure 22 résume l'évolution de la concentration en composés phénoliques totaux en fonction des traitements appliqués et du temps d'incubation.

Les différents lots affichent une différence de comportement entre la phase T0-T3 et la phase T3-T7 (Figure 22.1). Au cours de la phase T0-T3, nous notons globalement une teneur en phénols totaux peu modifiée alors que la phase T3-T7 se caractérise par une grande variabilité de comportement.

De T0 à T3, La teneur en PTS passe de 4,20 à 4,22 $\mu\text{g GAE DW}$ pour chacun des les lots témoin et LPS. Nous notons par contre une baisse significative ($p < 0.05$) de 12,38 % de la teneur en composés phénoliques sous l'effet du chitosane (utilisé seul ou associé aux LPS). De T3 à T7, utilisé seul, le chitosane induit une élévation continue de la teneur en phénols totaux (42 % de T3 à T7) ; Associé aux LPS, cette teneur passe de 3,68 $\mu\text{g/g GAE}$ (T3), à 8,89 $\mu\text{g/g GAE}$ (T5) pour atteindre 5,27 $\mu\text{g/g GAE}$ à T7 (Figure 22.2).

L'analyse statistique a mis en évidence quatre groupes correspondant chacun à un temps d'incubation (Figure 22.3). À T5, c'est le traitement au chitosane associé aux LPS induit la teneur la plus élevée en phénols totaux (8,89 $\mu\text{g/g GAE}$) suivi du LPS (5,40 $\mu\text{g/g GAE}$) et du chitosane (4,96 $\mu\text{g/g GAE}$). À T7, les teneurs en phénols totaux sont similaires (DNS, $p < 0.05$) et varient de 5,26 $\mu\text{g/g GAE}$ à 5,59 $\mu\text{g/g GAE}$.

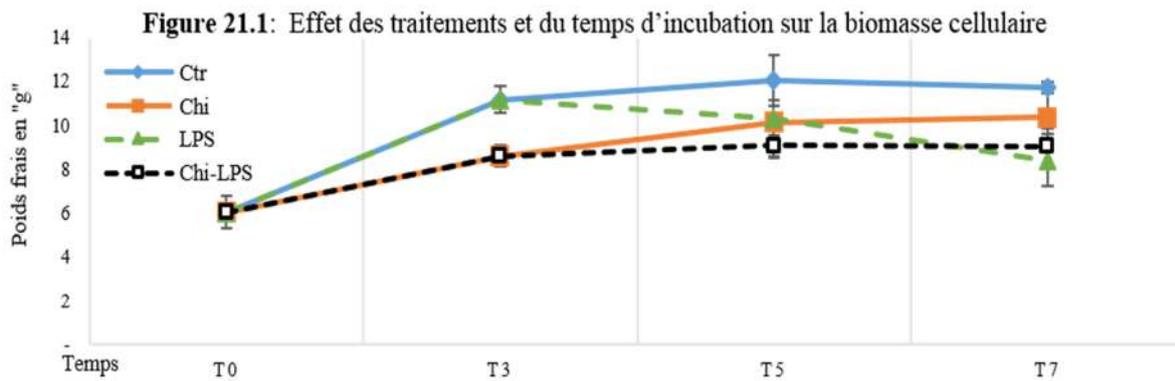


Figure 21.2 : Évolution de la biomasse cellulaire selon le traitement

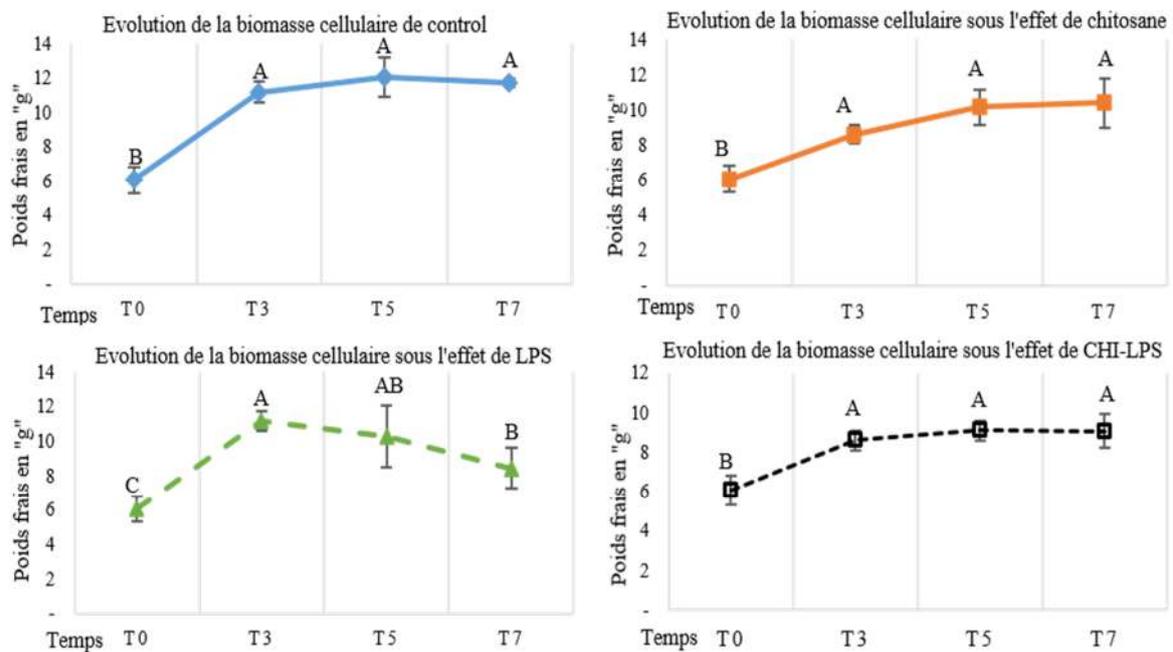


Figure 21.3: Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la biomasse cellulaire

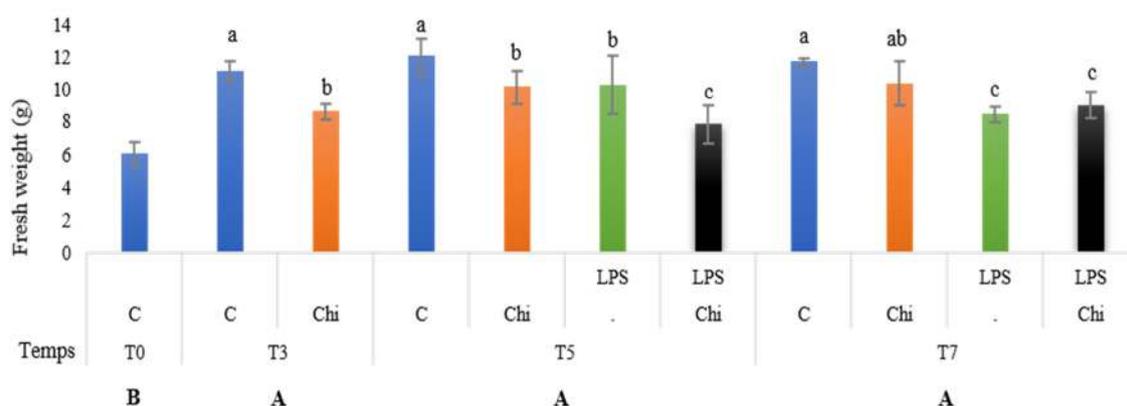


Figure 21 : Évolution de la biomasse cellulaire en fonction des traitements et du temps.

Figure 21.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la biomasse cellulaire.

Figure 21.2 : Évolution de la biomasse cellulaire selon le traitement

Figure 21.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la biomasse cellulaire. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

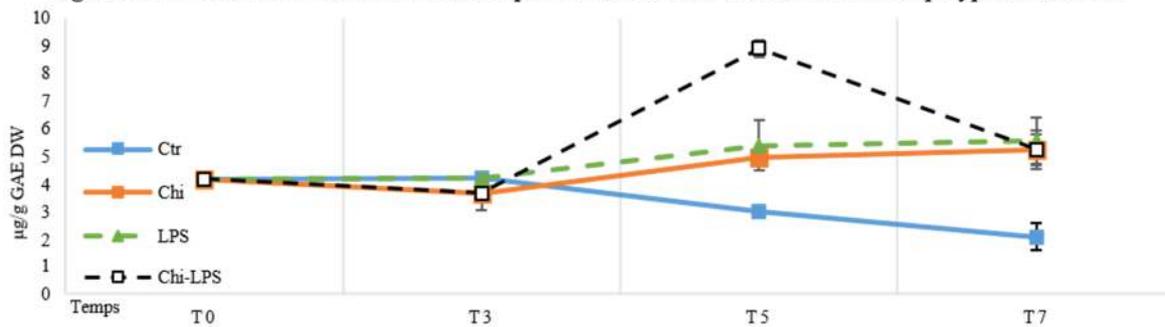
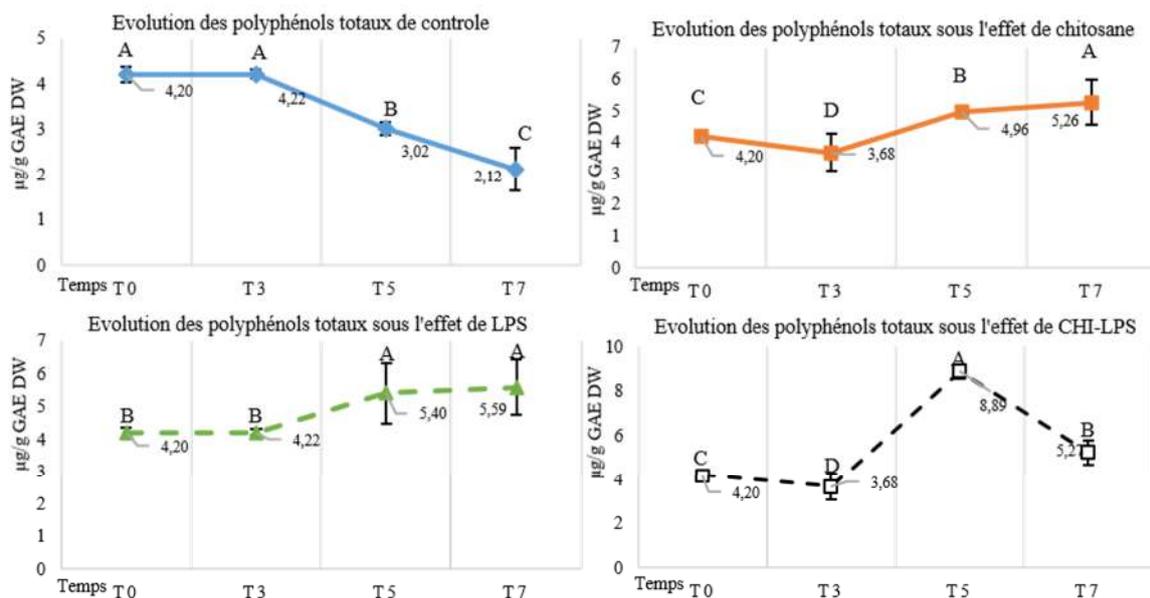
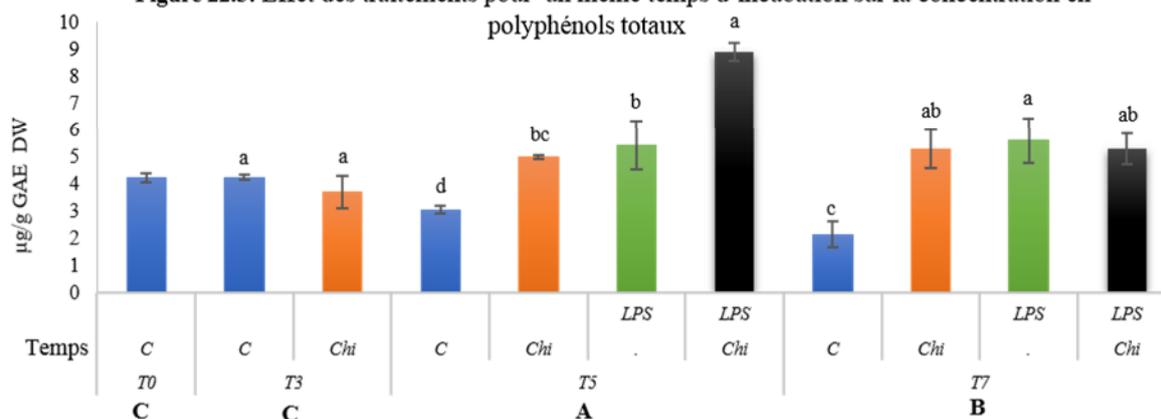
Figure 22.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration en polyphénols totaux**Figure 22.2 :** Évolution de la concentration en polyphénols totaux selon le traitement**Figure 22.3:** Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en polyphénols totaux**Figure 22 :** Évolution de la concentration en polyphénols totaux en fonction des traitements et du temps.

Figure 22.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration en polyphénols totaux.

Figure 22.2 : Évolution de la concentration en polyphénols totaux selon le traitement

Figure 22.3 : effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en polyphénols totaux. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

II.3 Teneur en composées phénoliques

➤ Acide gallique ($\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW)

L'évolution des concentrations en acide gallique en fonction des traitements et du temps d'incubation est représentée par la figure 23. Nos données montrent une plus grande variabilité des teneurs en acide gallique au cours de la phase T3-T7 comparativement à la phase T0-T3 (Figure 23.1).

La figure 23.2 montre une augmentation significative ($p < 0.05$) de l'accumulation de l'acide gallique pour chacun des lots control, CHI, LPS et le CHI-LPS de T0 à T7 ; le traitement CHI-LPS présente une diminution significative ($p < 0.05$) en T7 mais significativement supérieure ($p < 0.05$) aux concentrations de T0 et T3 de CHI-LPS.

L'optimum d'accumulation de l'acide gallique est noté à T7 pour le lot control ($8,91 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW), lot chitosane ($16,70 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW) et le lot LPS ($13,45 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW) ; le lot chitosane-LPS se distingue par un optimum d'acide gallique ($27,56 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW) noté à T5.

L'analyse statistique des données à l'intérieur de chacun des groupes mis en évidence révèle des différences significatives ($p < 0.05$) entre lots (Figure 23.3). Le chitosane induit les plus fortes concentrations d'acide gallique à T3 ($4,50 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW) et T7 ($16,70 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW) ; par contre à T5, cet effet est noté pour le traitement au chitosane associé aux LPS ($14,65 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW).

➤ L'acide chlorogénique ($\mu\text{g/g DW}$)

La figure 24 résume l'évolution de la concentration en acide chlorogénique en fonction des traitements appliqués et du temps d'incubation. Les différents lots affichent un même comportement au cours de la phase T0-T3 caractérisé par une diminution de la concentration en CGA ; la phase T3-T7 se distingue par une variabilité de comportement de chacun des 4 lots (Figure 24.1).

Le control montre, une diminution continue de la concentration en CGA qui passe de $2,27 \mu\text{g/g DW}$ (T0) à $0,71 \mu\text{g/g DW}$ (T7).

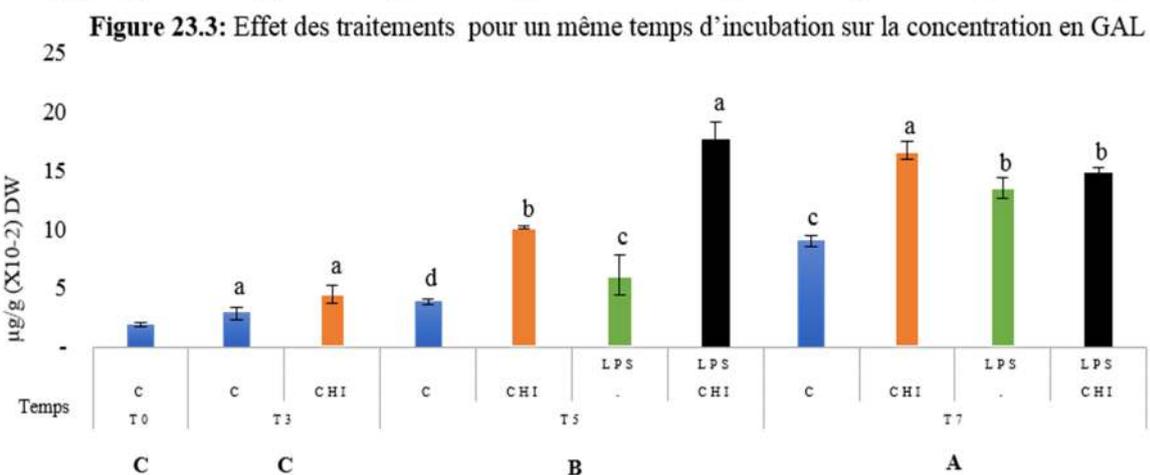
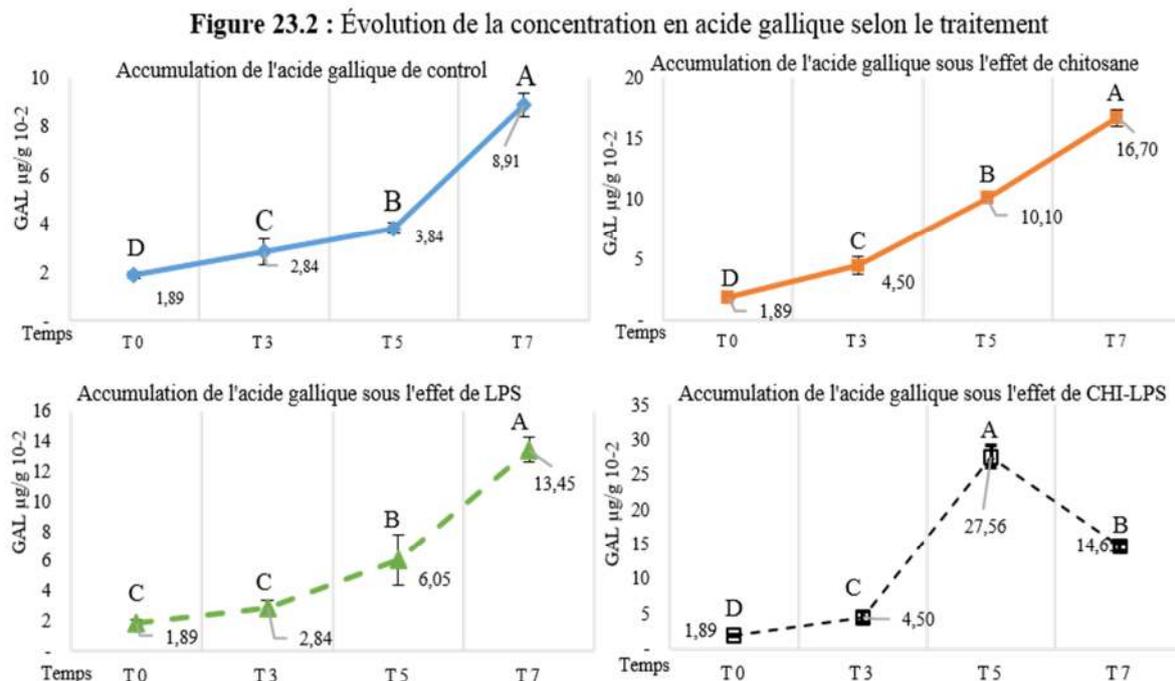
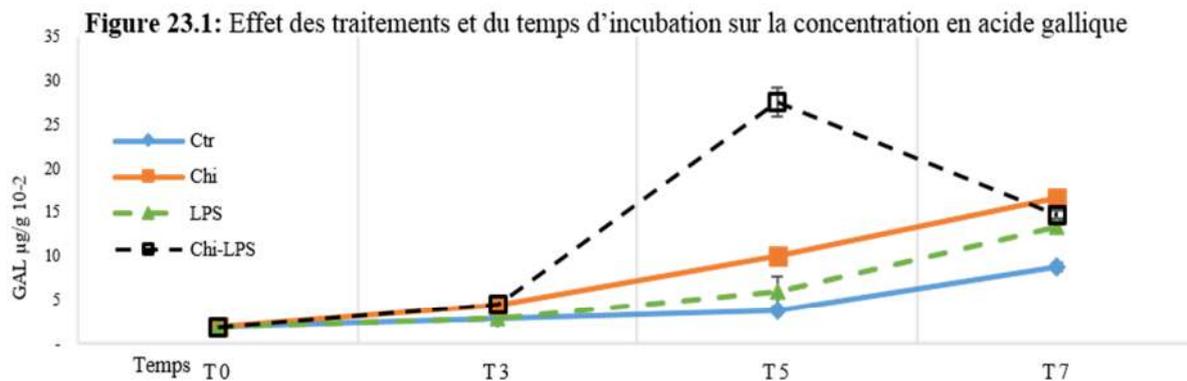


Figure 23 : Évolution de la concentration en GAL en fonction des traitements et du temps.

Figure 23.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration en acide gallique.

Figure 23.2 : Évolution de la concentration en acide gallique selon le traitement

Figure 23.3 : Effet des traitements pour même temps d'incubation sur la concentration en acide gallique. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

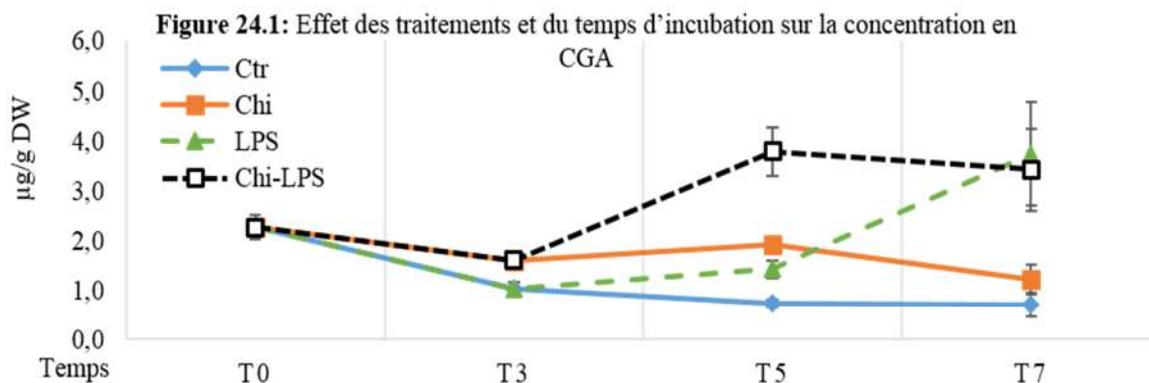


Figure 24.2 : Évolution de la concentration en CGA selon le traitement

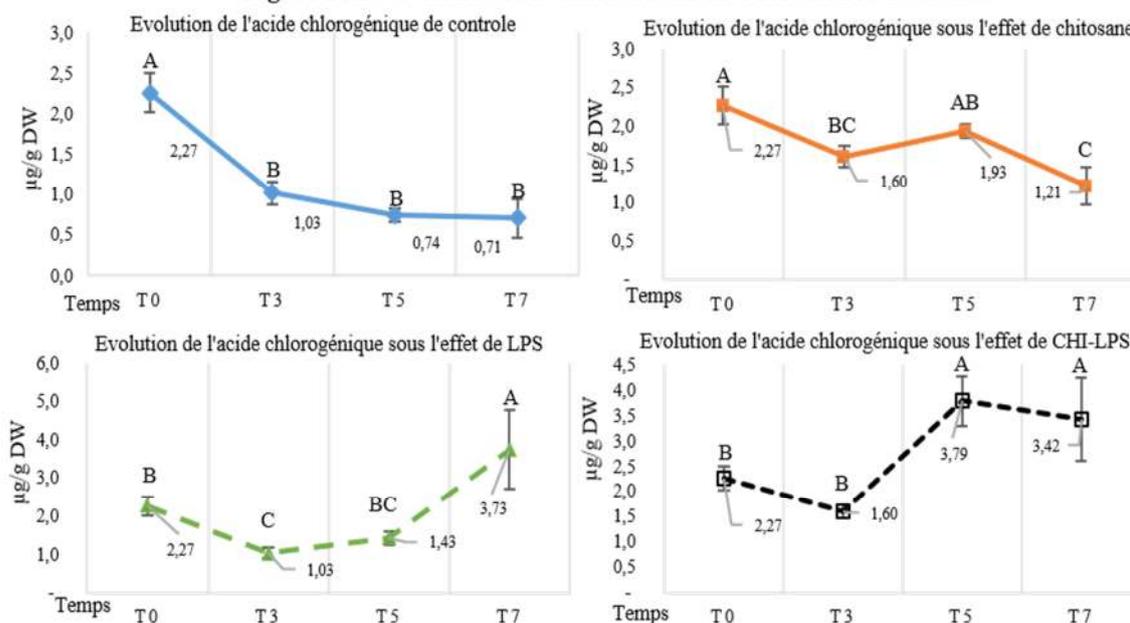


Figure 24.3: Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en CGA

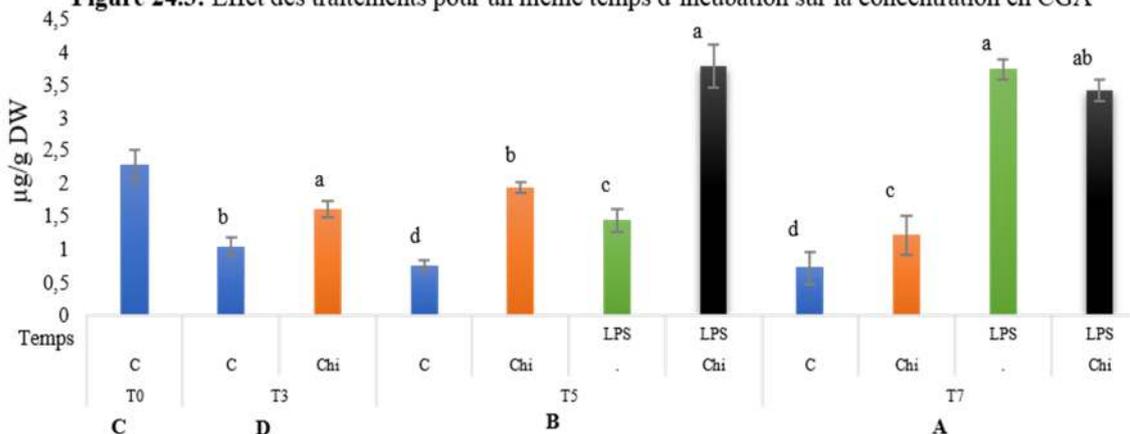


Figure 24 : Évolution de la concentration en CGA en fonction des traitements et du temps.

Figure 24.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration en CGA.

Figure 24.2 : Évolution de la concentration en CGA selon le traitement

Figure 24.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en CGA. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

La phase T3-T7 se caractérise par une grande fluctuation de comportement (Figure 24.2). De T3-T5, la teneur en CGA augmente de 1,6 $\mu\text{g/g DW}$ à 1,93 $\mu\text{g/g DW}$ pour le traitement en CHI et de 1,03 $\mu\text{g/g DW}$ à 1,43 $\mu\text{g/g DW}$ pour LPS.

Pour le traitement combiné CHI-LPS, la concentration de CGA augmente significativement ($p < 0.05$) pour atteindre à T5 un optimum de concentration de 3,79 $\mu\text{g/g DW}$.

De T5-T7, L'accumulation de l'acide chlorogénique diminue pour atteindre 1,21 $\mu\text{g/g DW}$ pour le CHI (DS, $p < 0.05$) et à 3,42 $\mu\text{g/g DW}$ pour CHI-LPS (DNS, $p > 0,05$). En revanche, le traitement par LPS induit une élévation significative ($p < 0.05$) pour atteindre le pic à 3,73 $\mu\text{g/g DW}$.

La figure 24.3 montre les effets de différents traitements en fonction du temps d'incubation sur la concentration en CGA. L'analyse statistique de nos résultats révèle des différences significatives ($p < 0.05$) dans l'accumulation de CGA entre les groupes T7, T5, T0, T3 dans l'ordre décroissant.

En T5, nous relevons une induction de CGA significativement ($p < 0.05$) plus élevée par le traitement associant le CHI et LPS. En T7, le LPS induit une élévation de la concentration en CGA de 61,66% par rapport au T5 ; associé au CHI, leurs teneurs est significativement ($p < 0.05$) élevée des autres lots.

➤ **Pyrocatechol ($\mu\text{g/g DW}$)**

La figure 25 résume l'évolution de la concentration en pyrocatechol en fonction des traitements appliqués et du temps d'incubation. Les différents lots affichent le même comportement dans la phase T0-T3 qui se caractérise par l'augmentation de la concentration en PYR mais avec une amplitude variable d'un lot à un autre ; la phase T3-T7 se caractérise par une grande variabilité de comportement de chaque lot (Figure 25.1).

Les différents lots affichent une différence de comportement tout au long de l'expérimentation (Figure 25.2). Le traitement par le CHI montre une accumulation linéaire de PYR passant de 1,00 $\mu\text{g/g DW}$ en T3 à 1,43 $\mu\text{g/g DW}$ en T5 et à 2,26 $\mu\text{g/g DW}$ en T7. Dans la phase T3-T5, le LPS booste la production de PYR qui enregistre un maximum de 2,36 $\mu\text{g/g DW}$; associé au chitosane (CHI-LPS), cette teneur atteint 2,71 $\mu\text{g/g DW}$.

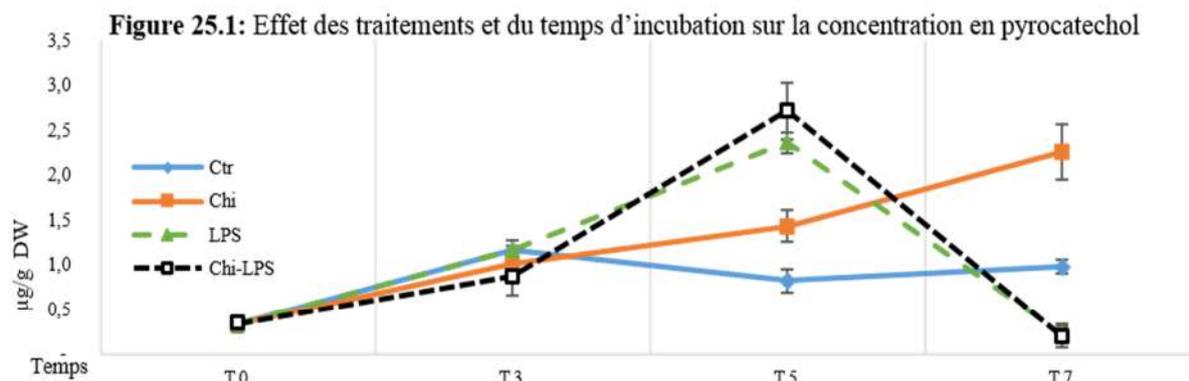


Figure 25.2 : Évolution de la concentration en pyrocatechol selon le traitement

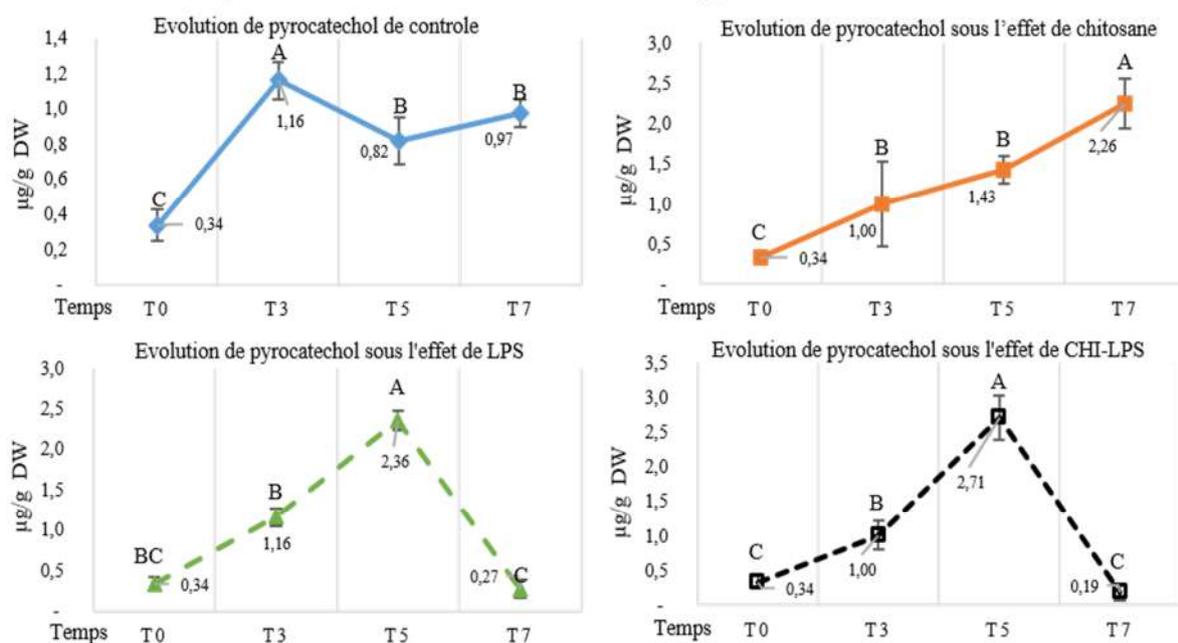
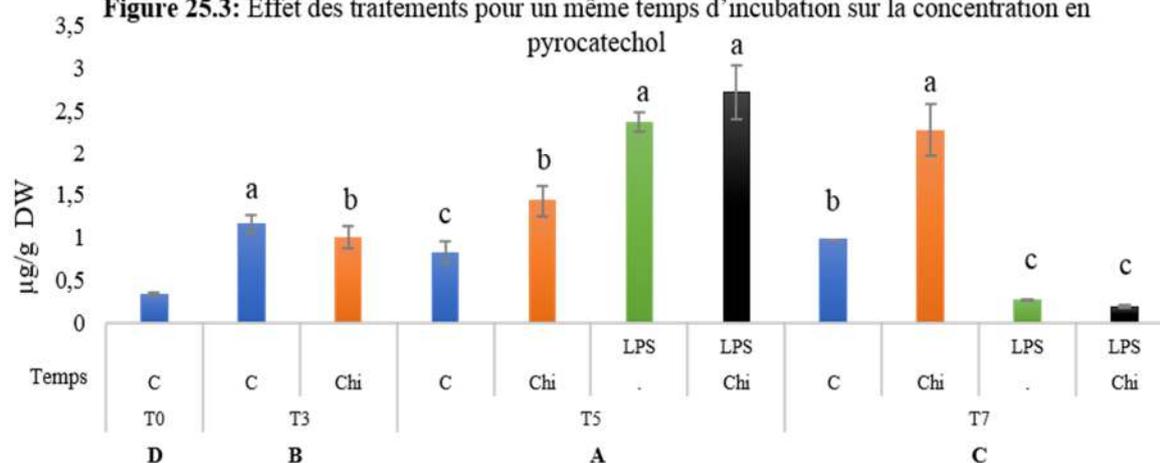


Figure 25.3: Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en pyrocatechol



Figures 25 : Évolution de la concentration en PYR en fonction des traitements et du temps.

Figure 25.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration en PYR.

Figure 25.2 : Évolution de la concentration en pyrocatechol selon le traitement

Figure 25.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en pyrocatechol. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

De T5-T7, la teneur en PYR diminue significativement ($p < 0.05$) de 88,55% (0,27 $\mu\text{g/g DW}$) et 92,98% (0,19 $\mu\text{g/g DW}$) pour LPS et CHI-LPS respectivement.

L'analyse statistique a mis en évidence quatre groupes (Figure 25.3) correspondant chacun à un temps d'incubation et significativement différents entre eux ($p < 0,05$). À T5, c'est le traitement au chitosane associé aux LPS qui induit la teneur la plus élevée en pyrocatechol suivi du traitement par LPS, sans différence significative ($p > 0,05$). À T7, seul de le CHI induit une teneur important de PYR (DS, $p < 0.05$).

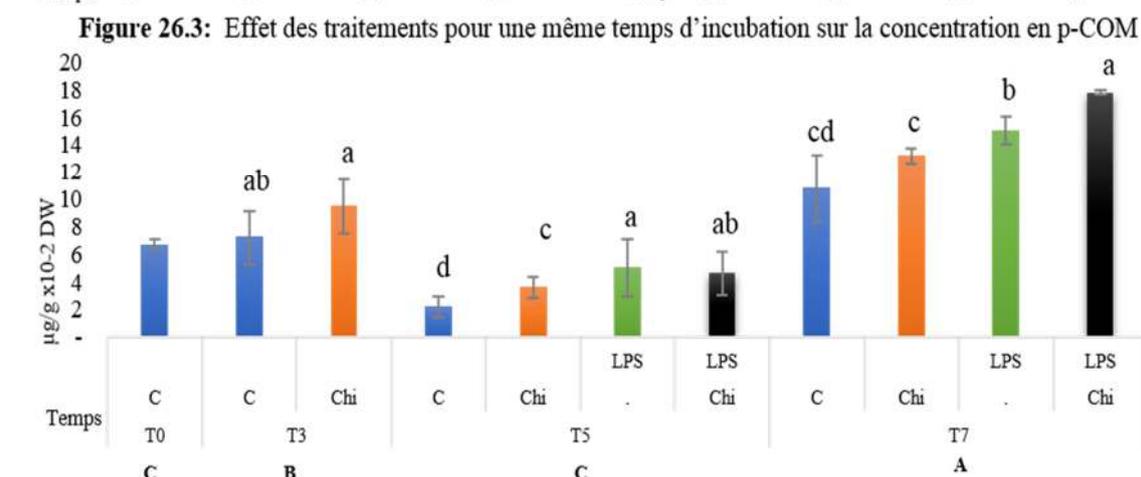
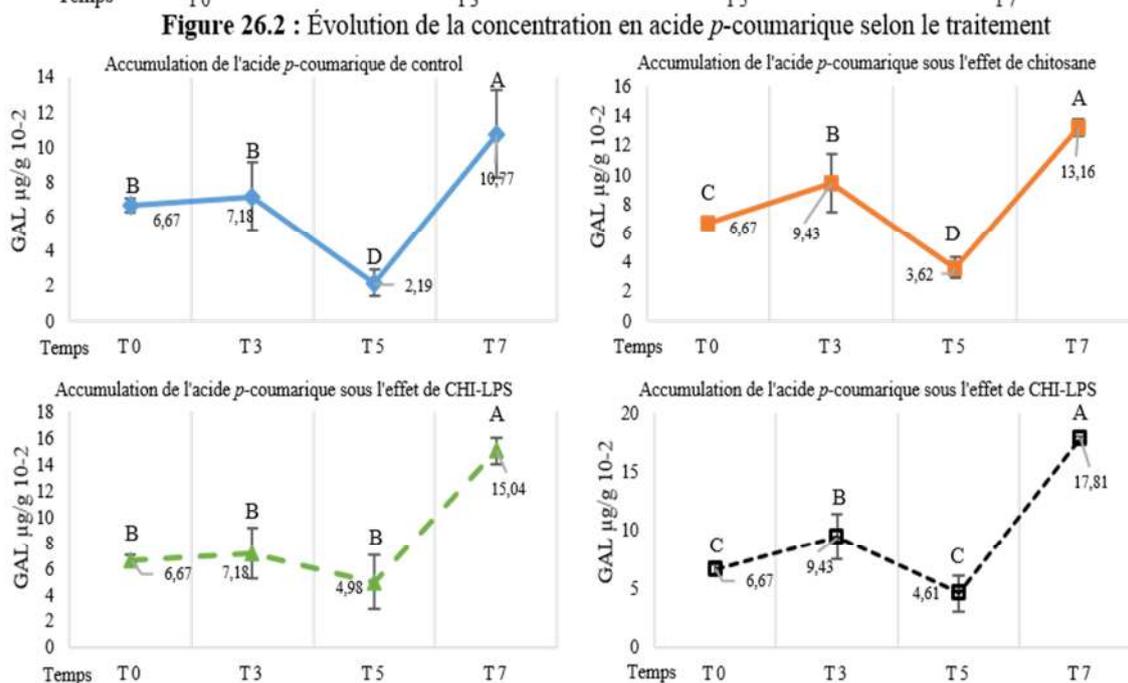
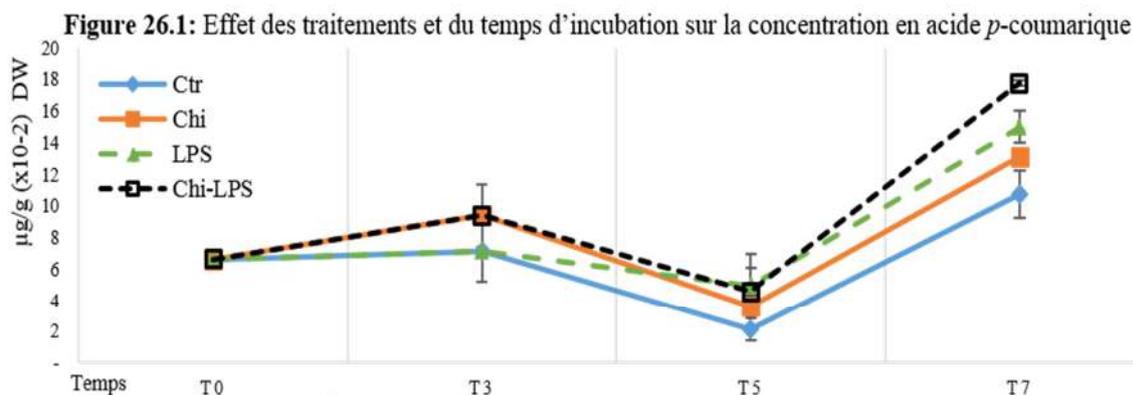
➤ **Acide *p*-coumarique** ($\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW)

La figure 26 résume l'évolution de la concentration en acide *p*-coumarique en fonction des traitements appliqués et du temps d'incubation.

Nous notons une similitude dans l'évolution de l'accumulation de p-COM entre les différents traitements dans le temps expérimental (Figure26.1). Nous remarquons une irrégularité de l'accumulation de p-COM en fonction de temps dans les différents traitements, qui est débuté par une élévation de la concentration de p-COM de T0 à T3, suivi d'une phase de décroissance de T3 à T5, et finir par une hausse de la concentration de p-COM de T5-T7.

Les différents lots affichent une différence (similitude) de comportement tout au long de l'expérimentation (Figure 26.2). De T0 à T3, le control et le LPS présentent une augmentation (DNS, $p > 0.05$), de la concentration en p-COM de 6,67 $\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW à 7,18 $\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW. Pour le CHI et CHI-LPS l'induction de p-COM passe de 6,67 $\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW à 9,43 $\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW. En T5, une décroissance (DS, $p < 0.05$) de 69,49% et 61,61% ont été observées dans le control et le CHI respectivement. En T7, des fortes hausses de concentration en p-COM sont obtenue pour chaque lot, soit de 10,77 $\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW pour le control, 13,16 $\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW pour le CHI, 15,04 $\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW pour le LPS. Le traitement combiné de CHI-LPS engendre la concentration la plus élevé de tous les autres lots soit 17,81 $\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW soit 39,52% de control de T7.

L'analyse statistique des données à l'intérieur de chacun des groupes à mis en évidence des différences significatives ($p < 0.05$) entre lots (Figure 26.3). Les différents traitements induisent les plus fortes concentrations en acide *p*-coumarique en T7. Le traitement par le CHI associé au LPS entraîne une meilleure réaction de l'accumulation de p-COM.



Figures 26 : Évolution de la concentration en *p*-COM en fonction des traitements et de temps.

Figures 26.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration en *p*-COM.

Figures 26.2 : Évolution de la concentration en acide *p*-coumarique selon le traitement

Figures 26.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en acide *p*-coumarique. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

➤ **Acide caféique** ($\mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW)

La figure 27 résume l'évolution de la concentration en acide caféique en fonction des traitements appliqués et du temps d'incubation. Les différents lots affichent un comportement distinct entre eux en fonction du temps (Figure 27.1).

Pour le control, la concentration la plus élevée de CAF ($72,05 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW) est relevée en T3 avec une augmentation de 21% par rapport à T0 ; cette teneur diminue significativement ($p < 0.05$) pour atteindre $52,27 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW à T5 et $50,43 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW à T7 (Figure 27.2). L'optimum de teneur en CAF des lots traités (CHI, LPS et le CHI-LPS) ont été enregistrés en T5 avec des teneurs respectives de $91,33 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW, $91,73 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW et $104,45 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW respectivement. En T7, les concentrations diminuent significativement ($p < 0.05$) pour tous les lots dans des proportions allant de 18,61% (CHI), de 34,96% pour le LPS et 49,07% pour le CHI-LPS.

L'analyse statistique a mis en évidence quatre groupe correspondant chacun à un temps d'incubation (Figure 27.3). En T5, les éliciteurs (CHI, LPS et CHI-LPS) induisent une augmentation comparable montrent de la teneur en acide caféique (DNS, $p > 0,05$). En T7, le lot traité au CHI présente la teneur en acide caféique de $74,33 \mu\text{g/g X}10^{-2}$ DW significativement la plus élevée ($p < 0.05$) comparativement aux autres groupes.

➤ **Quercétine** ($\mu\text{g/g DW}$)

La figure 28 résume l'évolution de la concentration en quercétine (QRC) en fonction des traitements appliqués et du temps d'incubation.

Les différents lots affichent une différence de comportement tout au long de l'expérimentation (Figure 28.1). Nous observons une élévation significative ($p < 0,05$) en QRC du lot control de T0 à T5 avec un optimum de $76,15 \mu\text{g/g DW}$ noté en T5 suivie d'une baisse significative ($p < 0.05$) de 20% en T7.

Les concentrations optimales de QRC sous l'action des différents stimulateurs sont enregistrées à des temps différents (Figure 28.2). Le CHI entraîne une baisse continue de la teneur en QRC de T0 à T5 suivie d'une augmentation de T5 à T7. Après la réduction significative (DNS, $p > 0,05$) relevée pour le lot LPS, nous notons de T3 à T7 une élévation continue de la concentration en QRC.

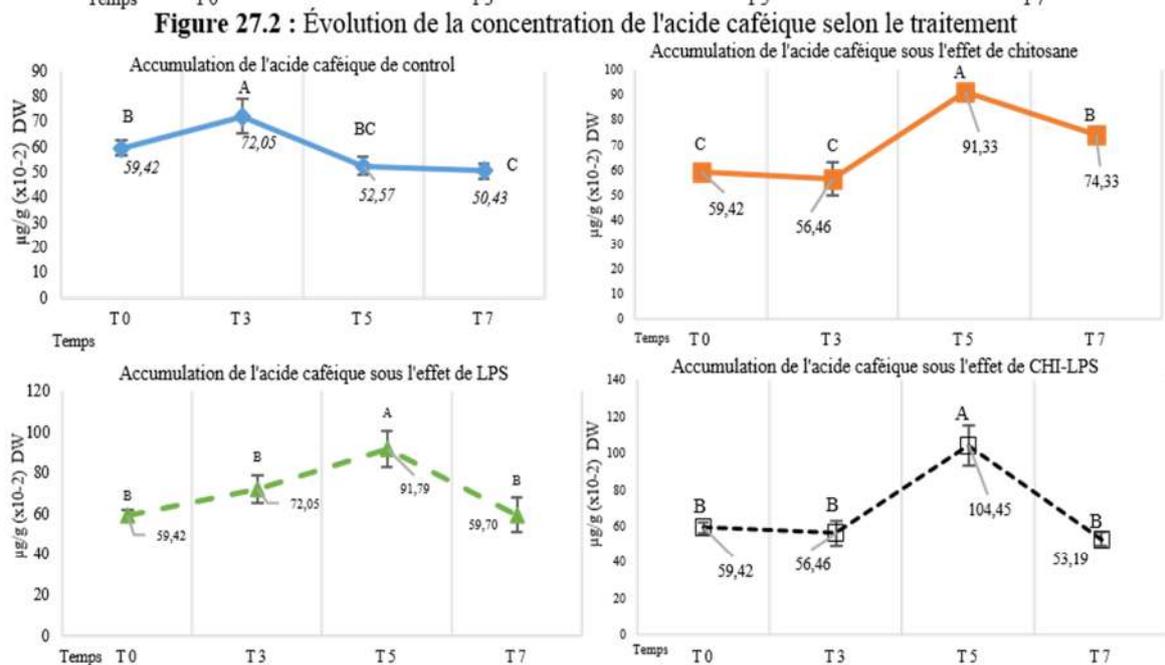
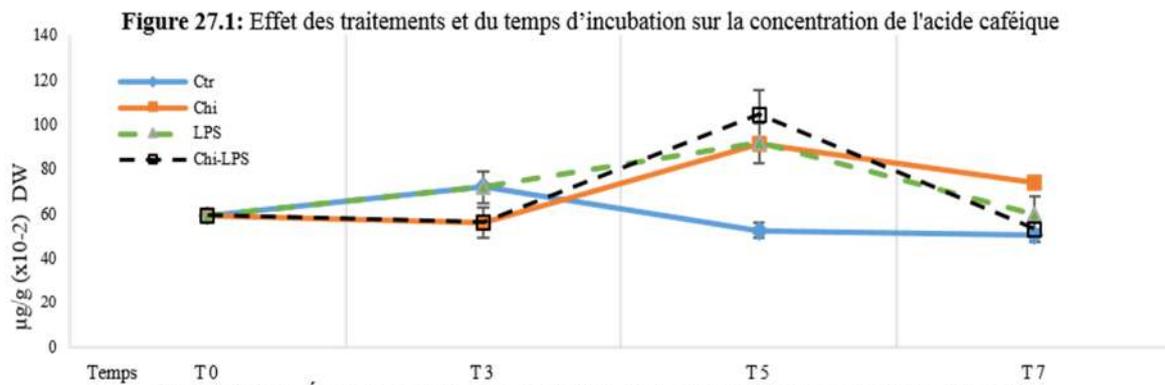


Figure 27.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration de l'acide caféique.

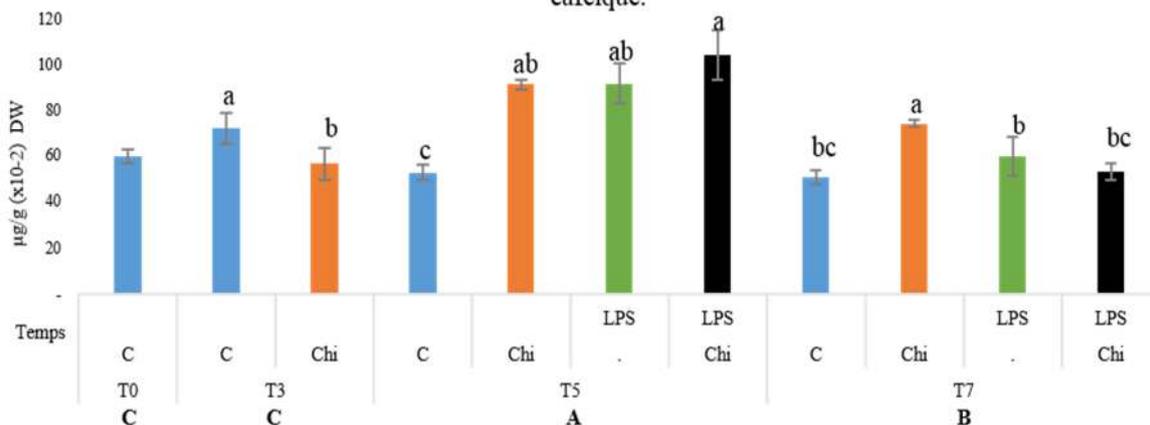


Figure 27 : Évolution de la concentration de CAF en fonction des traitements et du temps.

Figure 27.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration de l'acide caféique.

Figure 27.2 : Évolution de la concentration de l'acide caféique selon le traitement

Figure 27.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration de l'acide caféique. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

Après une baisse de 12,65% observée à T3, l'utilisation du CHI associé aux LPS entraîne une forte et significative élévation ($p < 0,05$) de la teneur en QRC qui passe de 44,11 $\mu\text{g/g DW}$ à 81,11 $\mu\text{g/g DW}$ à T5 suivie d'une légère baisse (DNS, $p > 0,05$) à T7 (77,85 $\mu\text{g/g DW}$).

L'analyse statistique a mis en évidence quatre groupes correspondant chacun à un temps d'incubation : T5 et T7 ne sont pas significativement différents entre eux ($p > 0,05$) ; il en est de même pour T0 et T3 (Figure 27.3). À T5, c'est le traitement au chitosane associé aux LPS qui induit la teneur la plus élevée en quercétine (81,11 $\mu\text{g/g DW}$) similaire ($p > 0,05$) à celle relevée pour le control (76,15 $\mu\text{g/g DW}$). À T7, le LPS et CHI-LPS affichent les teneurs de QRC les plus élevées ($p < 0,05$) : 75,88 à 77,85 $\mu\text{g/g DW}$ contre 60,88 à 61,30 $\mu\text{g/g DW}$ (respectivement pour le contrôle et le CHI).

II.5. Teneur en protéines

Nos données expérimentales relatives aux teneurs en protéines de nos échantillons (control, chitosane, LPS et CHI-LPS) en fonction du temps sont illustrées dans la Figure 29. Nous notons une différence de comportement entre les différents traitements et le temps d'incubation (Figure 29.1).

De T0 à T3, nous enregistrons une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration protéique quel que soit le traitement appliqué. Les baisses les importantes sont relevées dans le control et le traitement aux LPS (46,15 %) contre 34,86% pour le traitement par le CHI et CHI-LPS. Au-delà de T3, nous relevons une augmentation continue de la concentration protéique cellulaire dans le control et sous l'effet de chitosane (Figure 29.2).

De T3 à T7, nous observons une augmentation significative ($p < 0,05$) de 43,38% de la concentration protéiques dans le control et LPS, contre 40,55% pour le traitement par le chitosane et 26,47% pour le traitement par le CHI-LPS d'autre part. Il est à noter que pour un même traitement les données enregistrées à T0 et T7 ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

L'analyse statistique a mis en évidence quatre groupes correspondant chacun à un temps d'incubation (Figure 29.3). Le traitement par le chitosane s'accompagne d'une augmentation significative ($p < 0,05$) de la concentration protéique par rapport au control en T3 et T7. Cette augmentation n'est pas observée lorsque le chitosane est associé au LPS.

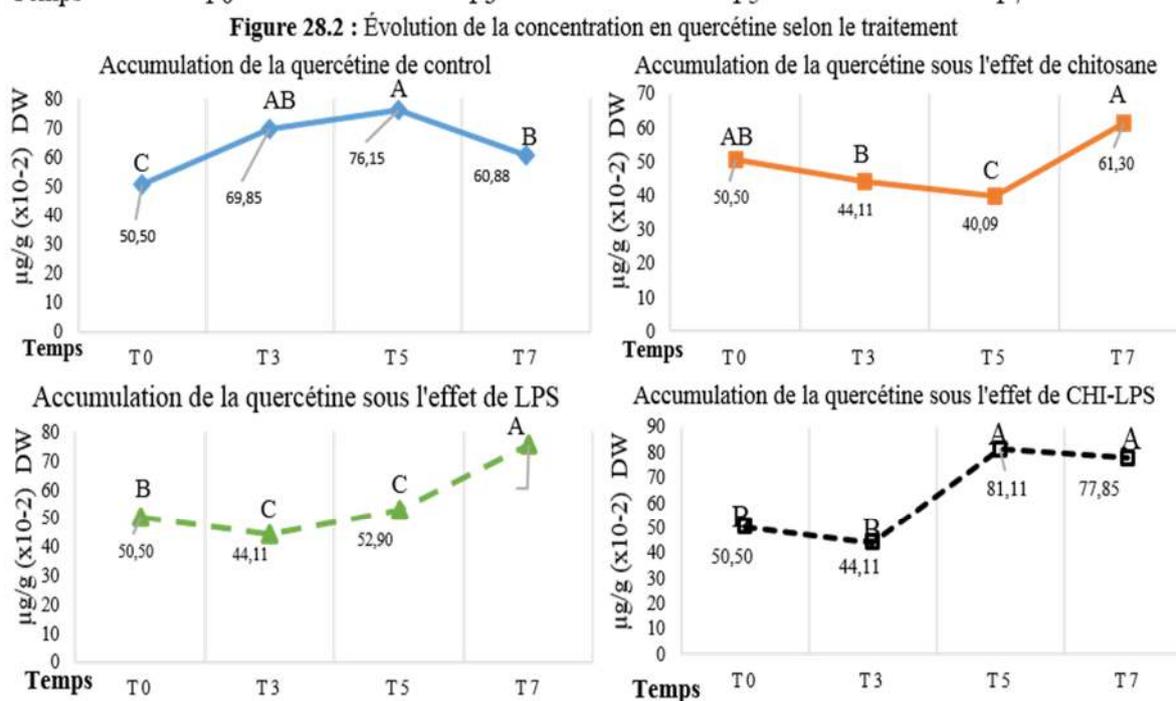
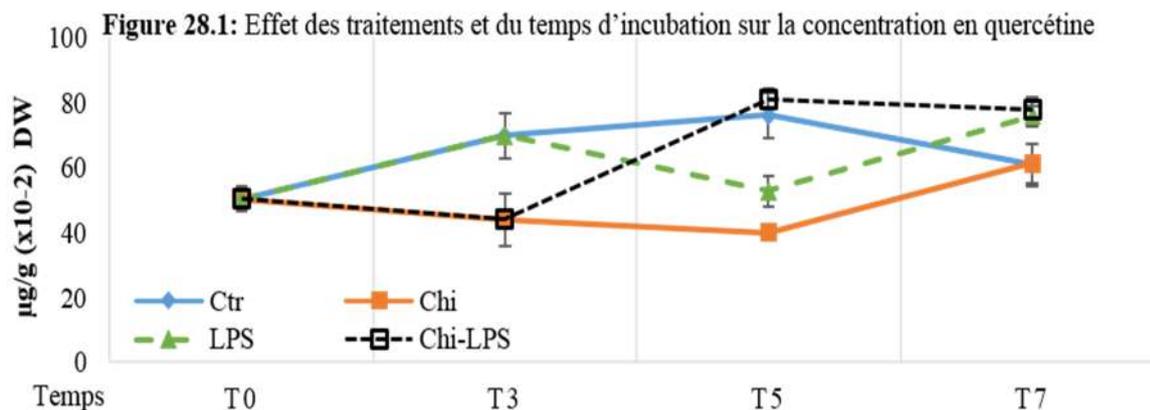


Figure 28.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en quercétine.

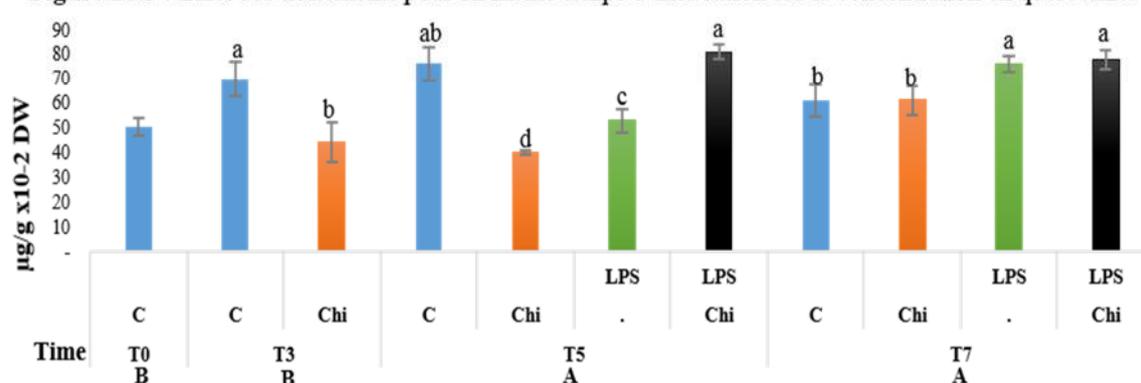


Figure 28 : Évolution de la concentration en quercétine en fonction des traitements et du temps.

Figure 28.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration en quercétine.

Figure 28.2 : Évolution de la concentration en quercétine selon le traitement

Figure 28.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur la concentration en quercétine. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)).

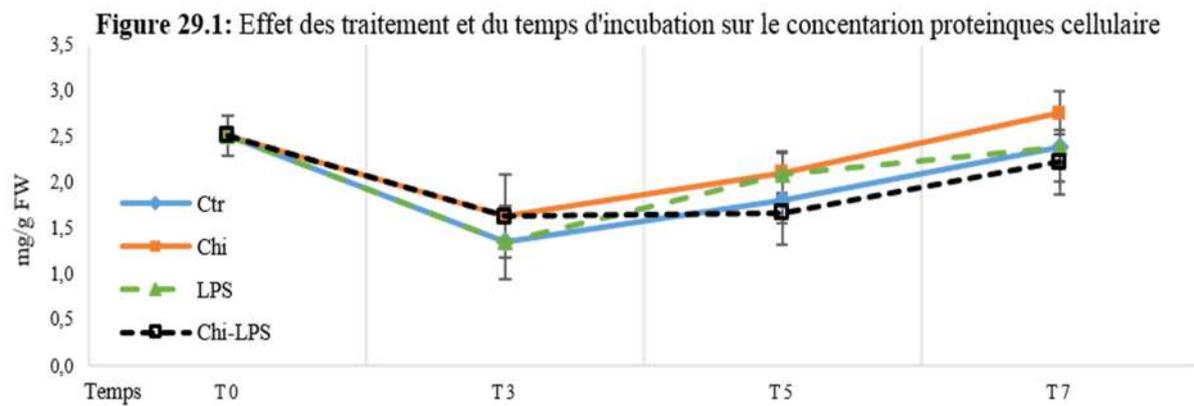
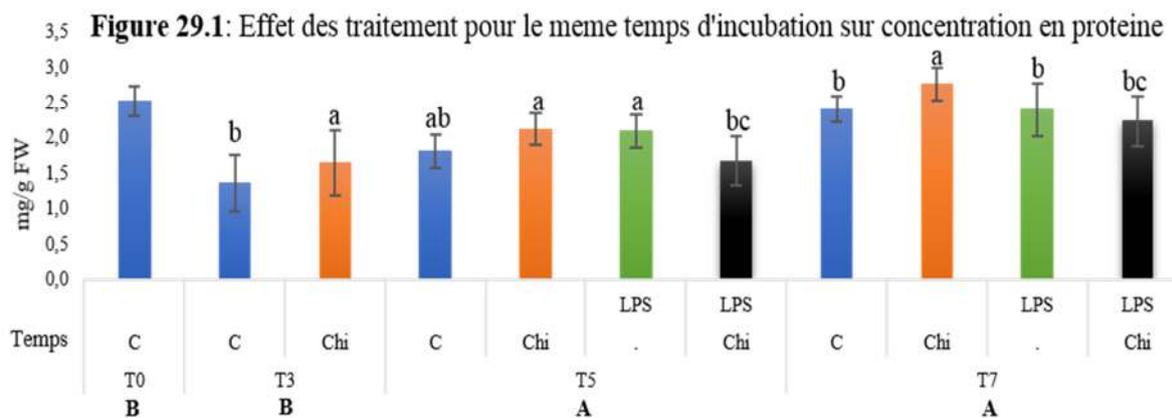
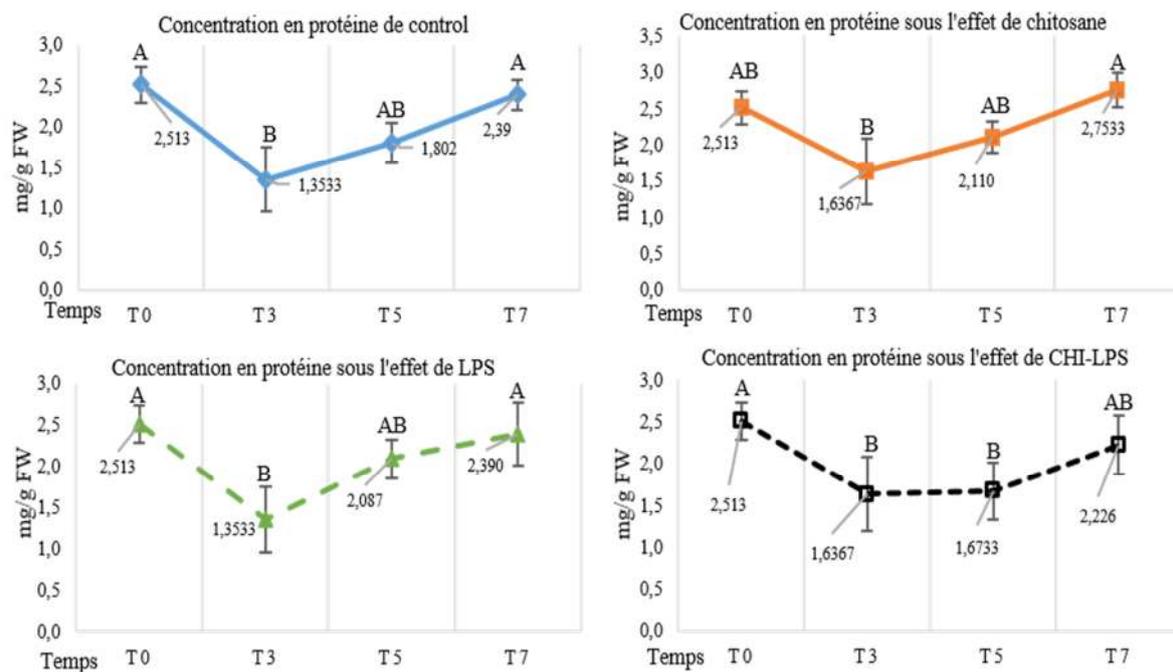


Figure 29.2 : Évolution de la concentration protéique selon le traitement



Figures 29 : Évolution des concentrations protéiques en fonction des traitements et du temps.

Figures 29.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur la concentration protéique cellulaire.

Figures 29.2 : Évolution de la concentration protéique selon le traitement

Figures 29.3 : effet des traitements pour un même temps d'incubation sur concentration en protéine. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne

sont pas significativement différentes ($p > 0.05$). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

II.4. Activité PAL (nkat/mg prot)

La variation de l'activité de la PAL des données expérimentales (control, chitosane, LPS et CHI-LPS) en fonction du temps est illustrée par la Figure 30. Nous notons une différence de comportement entre les différents traitements mis en œuvre.

Une similitude d'évolution de l'activité de la PAL est observée entre le control et le LPS (Figure 30.1) : nous observons une augmentation similaire ($p > 0.05$) de 17,52% de l'activité en T3. Le traitement par le chitosane utilisé seul et le CHI-LPS ont induit une évolution similaire de l'activité de la PAL (Figure 30.2) : À T0, nous observons une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité de la PAL qui passe de 5,32 nkat/mg prot (T0) à 2,54 nkat/mg prot de (T3). De T3 à T5, une légère augmentation (DS, $p < 0.05$) de l'activité PAL est relevée : l'activité PAL passe de 2,54 nkat/mg prot à 3,37 nkat/mg prot (pour le chitosane) et 4,84 nkat/mg prot sous l'effet de CHI-LPS. En T7 nous notons une diminution de l'activité PAL qui est relevé à 2,29 nkat/mg prot pour le chitosane et 3,39 nkat/mg prot pour le CHI-LPS.

L'analyse statistique a mis en évidence quatre groupe correspondant chacun à un temps d'incubation (Figure 30.3). En T5, le control et le traitement par le CHI-LPS s'accompagnent par une hausse significative ($p < 0.05$) de l'activité PAL par rapport au traitement par LPS et CHI. À T5, le chitosane et le LPS affichent des valeurs similaires ($p > 0,05$) entre eux ; il en est de même pour les lots control et le lot CHI-LPS. À T7, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est notée entre les traitements testés.

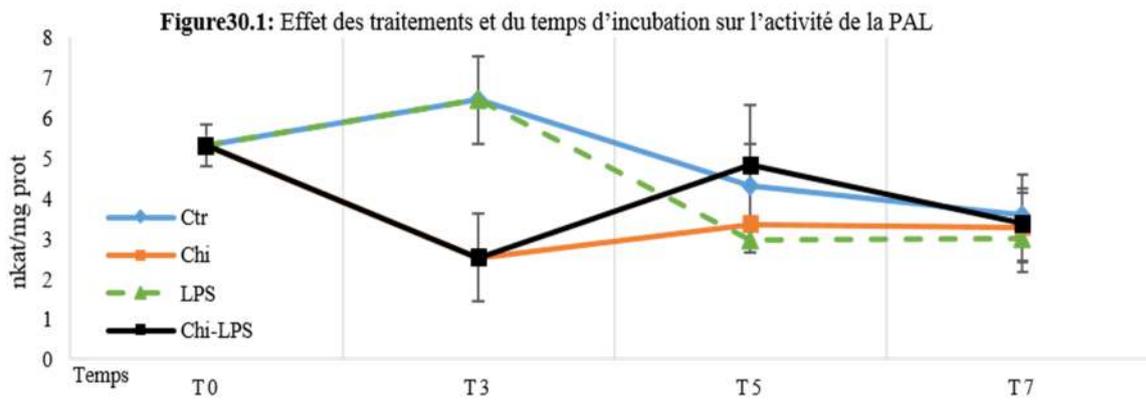


Figure 30.2 : Effet des traitements et le temps d'incubation sur l'activité de la PAL

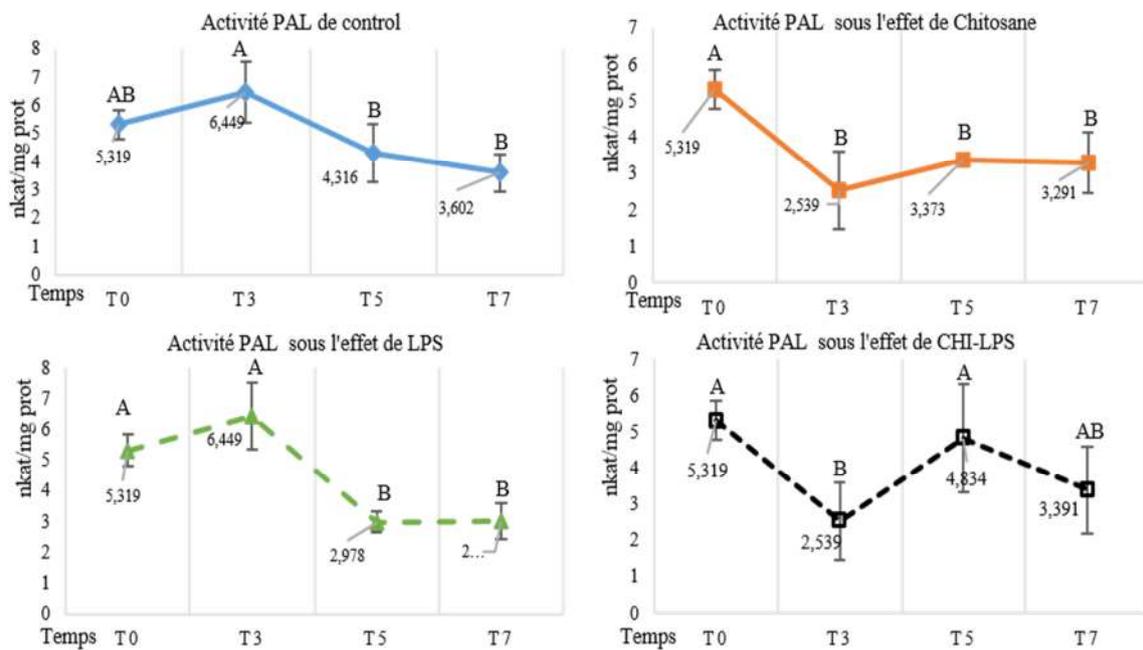
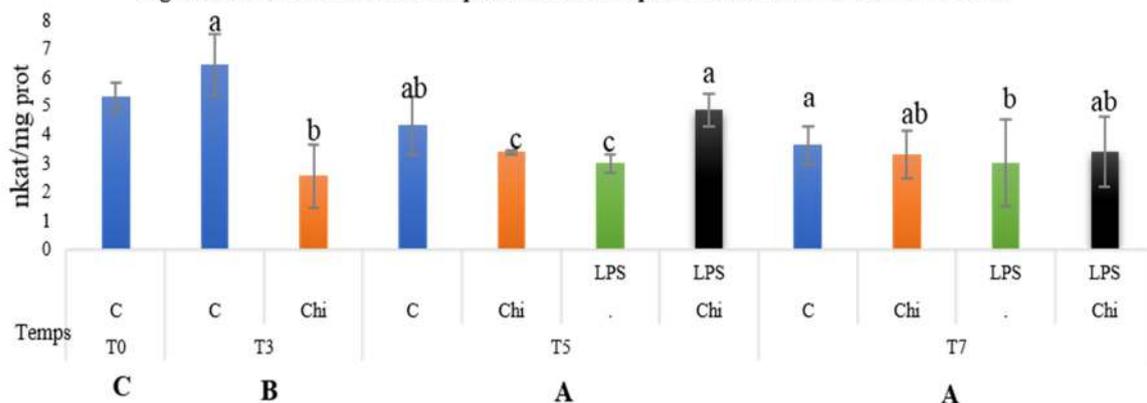


Figure 30.3: Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur l'activité de la PAL



Figures 30 : Évolution de l'activité de la PAL en fonction des traitements et du temps.

Figures 30.1 : Effet des traitements et du temps d'incubation sur l'activité de la PAL.

Figures 30.2 : Évolution de l'activité de la PAL selon le traitement

Figures 30.3 : Effet des traitements pour un même temps d'incubation sur l'activité de la PAL. (Pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$)). C : control, Chi : chitosane, LPS : lipopolysaccharide.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE I

DISCUSSION

III. Discussion

L'évolution de la croissance cellulaire (Figure 21) a montré des comportements différents à l'exposition aux CHI, LPS et CHI-LPS. La croissance en poids dans les suspensions exposés au LPS et au CHI séparément, a démontré une meilleure croissance cellulaire que dans l'exposition au traitement combiné (CHI-LPS). Cependant la croissance des suspensions cellulaires témoins été supérieure à tous les traitements. Cela peut-être dû au stress oxydatif (oxidative burst) dû à l'ajout de CHI et LPS à la fin de la phase exponentielle (phase préstationnaire) ce qui a bouleversé les paramètres physiologique dans les suspensions traitées. Cette effet oxydative a été rapporté par García-Brugger et al., (2006) sur la réaction des suspensions de cellulaires de tabac aux effecteurs microbiens. Cependant le traitement au chitosane montre une favorise la croissance chez plants d'*Alternaria solani* et les plants de tomates dans la lutte contre l'agression de l'agent pathogène (Sathiyabama et al., 2014).

Les plantes développent une variété complexe d'événements qui impliquent la synthèse et l'accumulation de nouveaux composés phénoliques qui peuvent avoir une action directe ou indirecte au cours de la pathogenèse. Cette stratégie de défense activée par les cellules végétales contre les PAMP d'un pathogène envahisseur peut limiter la colonisation de la plante en inhibant la croissance du pathogène (Sharma et Gupta, 2020). La phase stationnaire de la culture a commencé au 12^{ème} jour et l'éliciteurs a été ajouté au jour 8 (T0), dans le but de préparer les suspensions cellulaires pour atteindre la stabilité de la croissance cellulaire (en phase stationnaire) durant laquelle les métabolites secondaires sont généralement synthétisés (Bonfille et al., 2011).

Les composées phénoliques sont généralement renforcées lorsque le milieu est supplémenté avec l'éliciteur lié au stress comme CHI et l'extrait de LPS de *Pa-5889*, notamment en T5 (48h après le traitement au LPS) où nous observons un effet synergique du prétraitement combiné pour accélérer et augmenter l'accumulation des composées phénoliques. La production de composées phénoliques a diminué dans les suspensions de cellules témoins non traitées. La production de GAL, CGA, PYR, CAF et la QRC, était plus élevé en T5 dans les suspensions exposées aux CHI/LPS et il en est de même pour les polyphénols totaux ; toutefois, ces pics d'accumulation s'effondrent en T7, suggérant que la stimulation a bien eu lieu déclenchant une réponse de défense cellulaire rapide et efficace, en accélérant la production de composée phénolique de défense. L'acide gallique et l'acide chlorogénique montrent leurs

plus grandes valeurs induites par le traitement combine de CHI/LPS en T5. Néanmoins, en T7 le LPS induit la concentration maximale en CGA (3,73 $\mu\text{g/g DW}$), en revanche le CHI induit la concentration optimale de GA en T7. Le pic de synthèse en de *p*-COM a été observée en T7, particulièrement dans le traitement combine par CHI/LPS qui est en correspond aux valeurs élevés de CGA, GAL et de QRC qui sont boosté par l'effet combine de CHI et LPS.

Les résultats obtenus indiquent que dans les suspensions cellulaires traitées par le CHI et le LPS ont activées la voie de l'acide shikimique, la formation de phénylpropanoïde et la voie de l'acide benzoïque dans une mesure similaire, puisque GA, CGA et PYR ont augmenté à un rythme similaire, bien que les teneurs finales soient différentes. Au moment où la production du *p*-COM s'accumule de façon accrue en T7, les autres composés diminuent, et inversement en T5. Deux hypothèses peuvent être émises : épuisement de l'éliciteurs dans le milieu de culture ou bien accumulation tardive de *p*-COM est dû au fait qu'il est rapidement converti vers d'autre voies de synthèse en réponse à la stimulation par le chitosane et par le LPS (T5). Cette réaction aux stimulateurs permet de surcroît l'accumulation d l'acide gallique, chlorogénique, et de la quercétine permettant ainsi le renforcement de la paroi cellulaire et l'effet toxique du CGA sur la paroi cellulaire du pathogène suggéré par différents auteurs (Miedes et al. 2014 ; Vermerris et Nicholson. 2006b).

La stimulation des suspensions cellulaires de pomme de terre avec du chitosane puis avec l'extrait bactérien de *Pa*-5889 créerait une synergie importante dans le déclenchement de la cascade métabolique conduisant à l'accumulation de produits de défense. Les cellules végétales sont capables de se défendre contre les agents phytopathogènes en produisant un large spectre d'enzymes telles que la PAL impliquée dans la protection cellulaire et la résistance aux maladies. Dans le présent travail, le traitement combiné de suspensions cellulaires avec CHI et LPS assure une bonne croissance cellulaire et laisse penser à une stimulation de la voie des phénylpropanoïdes via l'accroissement de synthèse de PAL et de ces dérivées.

Nous avons également noté que la stimulation par le LPS dure plus longtemps au niveau de l'induction de l'activité PAL, de l'accumulation de composés phénoliques (polyphénols totaux, CGA, CAF, *p*-COM...). Le traitement par Chi conduit à une augmentation de ces produits de défense après 72h d'élicitation (T5) suivie d'une régression dans une deuxième étape notée près 120h d'élicitation (T7) ; l'accumulation de ces composées phénoliques et l'activité de PAL induits par le traitement CHI est rapide mais elle dure moins longtemps.

A l'inverse le traitement combiné de CHI et de LPS prolongeait l'accumulation et l'activité PAL plus longtemps (T7). CHI et LPS joueraient un rôle dans la transduction du signal primaire qui conduit à la production de ces composés phénoliques et l'augmentation de l'activité du PAL. La diminution sous l'effet du CHI peut être due à son épuisement dans le milieu. Nos résultats corroborent ceux de Trotel-Aziz et al. (2006) qui ont montré que le traitement des feuilles de vigne par le chitosane conduit à une induction remarquable de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et chitinase, les deux marqueurs de réponse de défense des plantes. Le même schéma de comportement est observé par Nandeeshkumar et al. 2008 dans induction de la PAL en résistance au mildiou causé par *Plasmopara halstedii* chez le tournesol traité au chitosane. Le chitosane a été utilisé dans le traitement des semences et de germination des semences. Des résultats d'étude ont clairement indiqué que la germination des graines des plantules de tournesol pouvait être améliorée par le traitement des graines. Il a été observé que la germination maximale (85%) a été observée dans un traitement de semences à 5 % de chitosane, suivi d'un traitement à 3 % de chitosane qui a offert 83 % de germination (Nandeeshkumar et al. 2008). Sur racines de pomme de terre, Reitz et al. 2000 ont montré que les LPS de *Rhizobium etli* étaient en grande partie responsables de la résistance systémique induite de la pomme de terre à l'infestation par *G. pallida*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE I

CONCLUSION

IV. Conclusion

Nos travaux ont pu mettre en évidence l'induction d'une réponse aux chitosane et aux *P. atrosepticum* sur suspensions cellulaires de pomme de terre.

Nous avons étudié le comportement de l'accumulation des composées phénoliques et l'activité de la phénylalanine ammonia lyase et son implication dans la résistance induite en fonction du temps sous l'effet de chitosane et l'extrait bactérienne (LPS).

Le chitosane a manifesté un effet réducteur de la biomasse cellulaire par rapport au témoin et significativement supérieur aux suspensions traitées avec l'extrait LPS de Pa-5889. Globalement, le traitement des suspensions avec le chitosane associé à l'extrait de Pa-5889 induit les plus fortes accumulations de composée phénoliques. L'activité PAL la plus élevée est relevée dans les suspensions traitées avec l'extrait LPS. C'est avec le chitosane qu'est enregistrée une teneur en protéines élevée dans ces suspensions.

Le mode de traitement combiné de chitosane et de l'extrait bactérienne (LPS) a montré un effet synergique dans le contrôle de l'induction des composées phénoliques et l'activité enzymatique de PAL. La double pré-stimulation des suspensions cellulaires de pomme de terre nous renseignons sur l'effet et l'efficacité de ce type dans l'induction de la réponse de défense. L'induction de réponse par le chitosane et le LPS est obtenue d'une façon rapide et qui perdure dans le temps ; la synthèse de polyphénols et acides phénoliques ont connu une augmentation considérable 48h après leurs applications.

L'étude a mis en évidence que la stimulation par le chitosane et par l'extrait bactérienne a activée la voie de l'induction de la réaction de défense.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériel végétal

Les travaux de la présente étude sont effectués sur deux variétés de plants de pomme de terre très répandues localement (Figure 31). Les deux variétés de pomme de terre sont issues de culture biologique naturelle. Elles sont fournies par le groupe MONDRAGON qui est une coopérative espagnole de finance, d'industriel et de la recherche.

Variété Red-Pontiac : Couleur rouge.

Variété Agata : Couleur blanche.



Figure 31 : Échantillons de tubercules de pomme de terre utilisés pour la culture.

I.2. Culture de pomme de terre sur pots

Les deux variétés de pomme de terre ont été cultivées dans des pots contenant un sol organique d'origine végétale dans une chambre de culture à paramètres contrôlés : Une période photosynthétique de 16 heures et une période respiratoire de 8h à température de 23 °C à 25 °C pendant 35 jours (Figure 32). Les plants de pomme de terre des deux variétés ont été récoltés pour la micro-propagation.



Figure 32 : Pots de culture de pomme de terre dans une chambre de contrôle. A : pot de culture de pomme de terre ; B : les 1^{er} poussé ; C : tige prête à la recule pour la micro-propagation.

I.3. Micro-propagation *in vitro* de pomme de terre

Les tiges de deux cultivars de plante de pomme de terre ont été récupérées, lavées et coupées en sections nodales. Les sections nodales ont été stérilisées (les nœuds de 1 à 1.5 cm de longueur) selon le procédé de Onrubia et al., (2008) : Trempage des nœuds dans de l'éthanol 70 % pendant 1 minute. Après avoir été rincées avec de l'eau distillée stérile, elles sont traitées avec une solution de chlorure de mercure à 1 % (p/v) dans un bain d'eau à ultrasons de marque Branson 5200 pendant 20 minutes. Ensuite, elles sont rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile. Les sections nodales ont été immergées dans une solution d'hypochlorite de sodium contenant trois gouttes de Tween 20 et placées dans un bain-marie à ultrasons pendant 30 minutes. Puis rincées de nouveau trois fois avec de l'eau distillée stérile et asséchées sur du papier stérile dans une zone aseptique (Figure 33). Les nœuds ont été mis en culture *in vitro* dans des boîtes de compotes pour bébé contenant 100 ml de milieu de culture solide Murashige et Skoog (MS) à pH 5,8 avec 15 g/l de saccharose et 2,7 g/l de

Phytigel (Murashige et Skoog, 1962), sans régulateur de croissance. Les plantules obtenues à partir des bourgeons latéraux des sections nodales de la tige ont été maintenues pendant 4 semaines à 23 ± 2 °C et à $160 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de flux de photons photosynthétiques de 16h par jour. Les plantules obtenues ont été micropropagées toutes les 4 à 5 semaines en plaçant des boutures de nœud dans des boîtes de culture stériles contenant MS avec 15 g/l de sucre (Figure 33). Les plantules ont été gardées dans une chambre de croissance à 25°C pendant 4 semaines et elles sont maintenues à 16h par jour de photons photosynthétiques avec un flux de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Mangas et al., 2008).

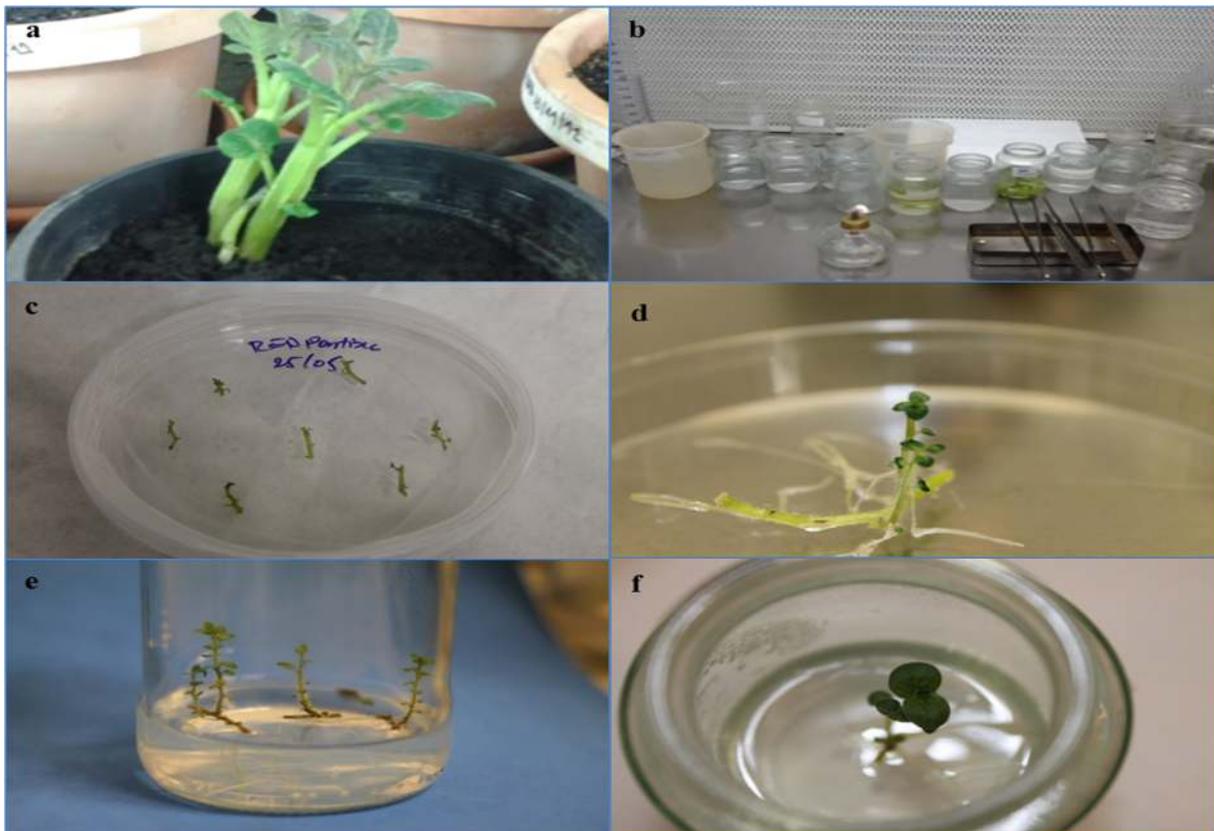


Figure 33 : Stérilisation et micro-propagation *in vitro* de pommes de terre ; a : culture en pots ; b : hotte de stérilisation ; c : micro propagation des tiges sous boîte de pétri ; d : vitro plante de pomme de terre ; e : micro propagation des tiges en baby-food ; e : uni-plantule en baby-food.

I.4. Acclimatation de plants de pomme de terre dans vermiculite et sable

Les plantules de pomme de terre de 5 à 6 cm de long issues de la micro-propagation *in vitro* ont été mises en pots de culture *ex-vitro* dans un mélange de vermiculite et de sable (1: 1; v/v) et arrosées tous les deux jours avec la solution nutritive (pH 6) de Ben-Zioni et al., (1967). Les plantes de pomme de terre ont été placées dans des conditions : d'humidité à 60%, de densité un flux photon photosynthétique de $300 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ et avec une journée de 16

heures de luminosité à 25 °C et 8 heures d'obscurité à 23 °C pendant 30 jours sous une chambre de contrôle (Figure 34).

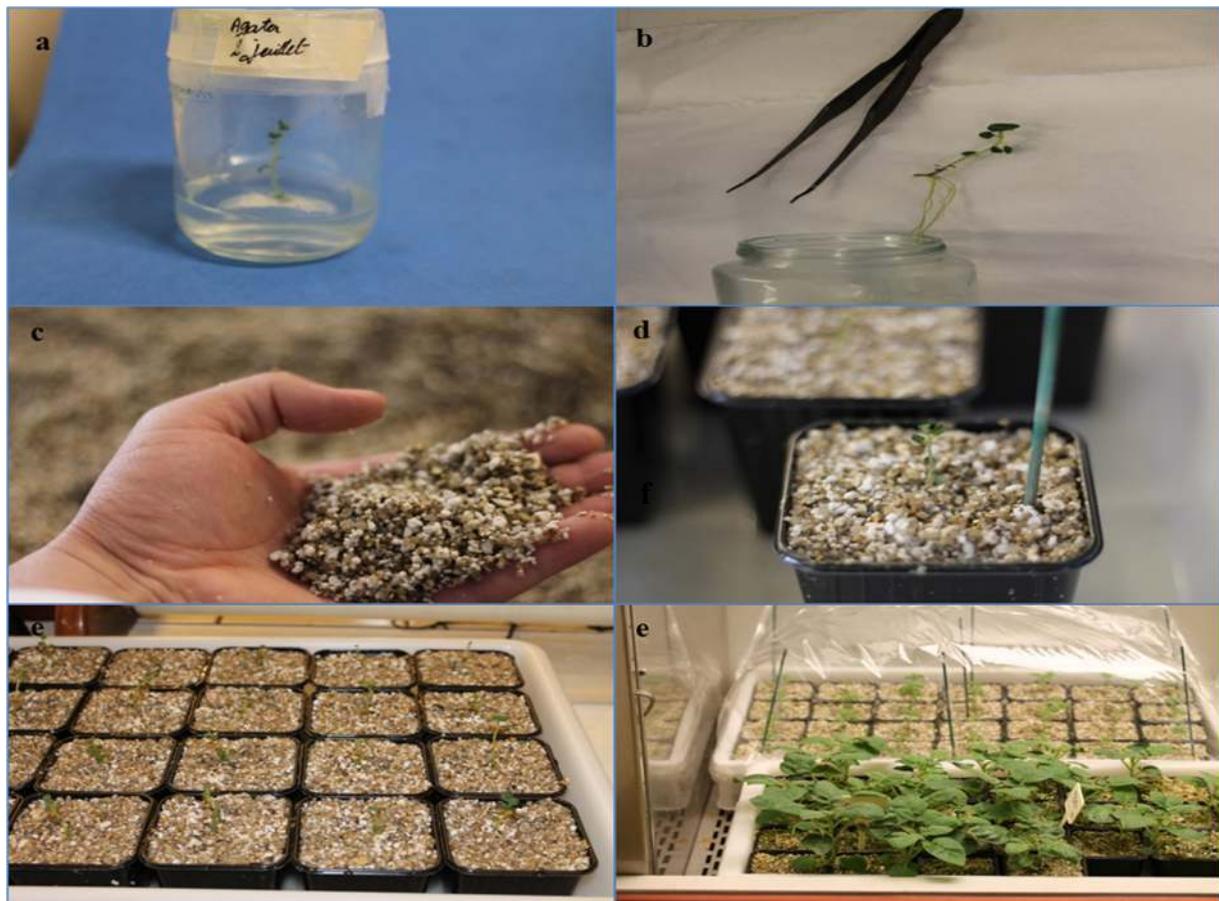


Figure 34 : Acclimations des plantes de pomme de terre : a : Plante en compote pour bébé ; b : préparation de la plante pour l'acclimatation. c : Mixte vermiculite-sable ; d : Plante en vermiculite-sable ; e : lot de plantes ; f : Transfer de plante en chambre de culture.

1.5. Dispositif expérimental

Les plants de pomme de terre cultivés sur le substrat de vermiculite-sable ont été acclimatés pendant 30 jours dans la chambre de culture puis arrosés avec une solution de Ben Zioni contenant 100 μM de l'un des stimulateurs de défenses naturelles des plants : Metyl-Jasmonate (MeJa) ou Chitosane (Chi) ou l'acide salicylique (SA). En revanche, les témoins ont été arrosés uniquement par la solution de Ben Zioni à $\text{pH}= 5,8$ (témoin : Ctr). Deux jours plus tard, les plants des deux variétés de pomme de terre ont été inoculés avec 100 μl d'une solution bactérienne, soit avec *Pectobacterium carotovorum* 5890 (Pc-5890), soit avec *Pectobacterium atrosepticum* (Pa-5889) à une concentration de 10^8 ufc/ml. L'inoculum est déposé au niveau de la troisième feuille supérieure. Trois plants de chaque variété (Agata et Red-Pontiac) ont été récoltés dans chaque lot pour chaque traitement. Les plants ont été

récoltées au deuxième jour (T2) après l'élicitation et au jour 3 après l'inoculation (après 5 jours de l'élicitation : T5). À chaque récolte, la taille des plants, leur poids et leur nombre de feuilles sont mesurés (Figure 35). Les échantillons des deux variétés ont été congelés dans de l'azote liquide et conservés immédiatement à -80°C . Les feuilles ont été utilisées pour toutes les analyses suivantes (Hachoud et al., 2019).

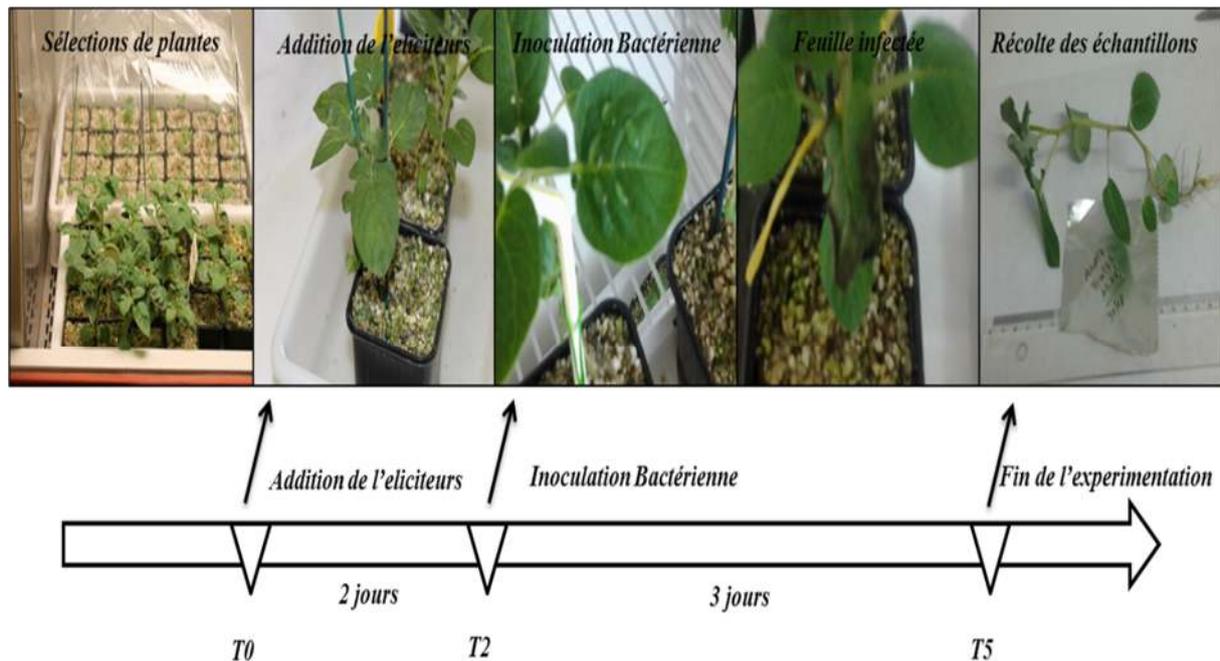


Figure 35 : Schéma expérimental de la stimulation et de l'inoculation de plante de pomme de terre (Hachoud et al., 2019).

I.6 Purification de Chitosane

Le chitosane a été broyé en une poudre fine et purifié par dissolution dans de l'acide acétique à 1%; les particules non dissoutes ont été éliminées par centrifugation. La solution a ensuite été neutralisée avec du NaOH pour précipiter le chitosane. Le chitosane est récupéré par filtration et lavé abondamment à l'eau désionisée pour éliminer les sels, puis lyophilisé. Une solution de chitosane de 10 g/l a été préparée par dissolution du chitosane lyophilisé dans 0,05 mol/l de HCl et le pH a été ajusté à 5,6 (Reddy et al., 2000).

I.7 Préparation des bactéries

Deux souches de *Pectobacterium carotovorum* 5890 (*Pc*-5890) et *Pectobacterium atrosepticum* 5889 (*Pa*-5889) proviennent de la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP, Angers, France) ces souches ont été isolées en Algérie (Yahiaoui-Zaidi et al., 2010). Les bactéries ont été repiquées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu

King B pendant 48h à 26 °C. Les cellules bactériennes ont été collectées dans une solution de tampon phosphate (0,85 % NaCl ; 0,02 % NaH₂PO₄ ; 0,29 % Na₂HPO₄, 12H₂O ; 0,02% KCl ; pH=7,2) et la suspension centrifugée à 10000 x g pendant 10 min. Le culot a été remis en suspension dans 5 ml d'un tampon phosphate stérile et la concentration bactérienne a été ajustée à 1 x 10⁸ ufc/ml à 580 nm, un inoculum de 1ml à 10⁸ ufc/ml correspondant à une densité optique (DO) de 0,2 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Ouanas et al., 2017).

I.8 Détermination des composés phénoliques HPLC

Les phénols solubles sont extraits des feuilles de plants de pomme de terre. Les plants non stimulés et non infectés sont utilisés comme témoins. Les phénols extraits sont séparés par HPLC-DAD. Ils sont détectés par spectrophotométrie et fluorimétrie (Waters, USA), puis identifiés sur la base de leur temps de rétention et de leur spectre d'absorption, en comparaison avec les standards.

✓ Extraction :

Les échantillons de tissus végétaux récupérés à chaque étape de l'expérimentation ont été lyophilisés, broyés en une poudre fine à l'aide d'un tissu-lyser. 40 à 60 mg de poudre d'échantillon est placé dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 1 ml de solvant d'extraction (solution à 80 % de méthanol). Les tubes fermés ont été immergés dans un bain-marie à ultrason à 40 °C pendant 45 minutes et l'opération est répétée deux fois. Les deux extraits méthanoïques ont été mélangés. Les tubes ont été refroidis puis agités vigoureusement.

Le surnageant contenant les phénols solubles est clarifié par centrifugation à 7600 g pendant 5 minutes. Le surnageant est concentré au maximum sous azote (air) puis repris dans 1 ml de méthanol/eau (80:20). Un lavage à l'hexane (1 ml) est ajouté au surnageant de l'extrait méthanolique afin d'éliminer les lipides et autres composés interférents. La phase méthanolique a été utilisée pour l'analyse HPLC (Padda et Picha, 2008).

✓ Identification et dosage des phénols

Les extraits méthanoliques ont été filtrés à travers membrane Nylaflo de 0,22 µm (Waters Millipore, Billerica, MA, USA). L'analyse HPLC-UV a été réalisée selon la méthode de Bonfill et al., (2011). Les acides phénoliques individuels ont été séparés à température ambiante avec une colonne thermodynamique 18 C (ODS 5 µm, 250 x 4,6 mm) en utilisant

une élution en gradient ; les éluants utilisés sont :

A : Acétonitrile (99,5 %) et de l'acide formique (0,5 %)

B : Eau (99,5%) et l'acide formique (0,5 %)

Après la charge, on procède pendant 35 minutes à une élution lente par un gradient linéaire allant selon le profil suivant :

0-15min, 95 % de B ;

15-22min, 74 % de B ;

22-25min, 60 % de B ;

25 27 min, 60 % de B ;

27 à 35 min, 95 % de B.

Le débit est de 1 ml / mn et le détecteur PDA est réglé à 275nm. L'échantillon (15 μ l) a été injecté sur la colonne en utilisant un échantillonneur automatique Waters 717 plus connecté à une pompe Waters 600 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Les courbes d'étalonnage ont été obtenues à partir d'une solution mère des sept composés phénoliques à 10 mg / ml dans du méthanol-eau de grade HPLC. À partir de cette solution mère, cinq dilutions ont été préparées et un volume de 15 μ l été injectés trois fois pour chaque concentration. Les pics détectés ont été identifiés et quantifiés en comparant le temps de rétention à celui d'étalons connus des acides chlorogéniques, caféiques, *p*-coumariques, galliques et féruliques, ainsi que pour le pyrocatechol et la quercétine. L'analyse a été réalisée en triple.

I.9 Analyses statistiques

Les données sont exprimées par la moyenne \pm écart-type ($n = 3$). Le traitement des données est fait à l'aide du logiciel STATISTICA 5.5. Le test LSD (différence significative minimale) de l'ANOVA (analyse de la variance) est utilisé pour la comparaison des résultats. Les résultats ont été considérées comme statistiquement significatifs aux seuils $p < 0,05$. Les résultats seront classés par ordre décroissant $a > b > c > d > e$. Les valeurs portant la même lettre ne présentent aucune différence significative ($p > 0,05$) entre elles.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE II

RÉSULTATS

II. Résultats

II.1. Études des paramètres de croissances

II.1.1. Symptômes de l'infection bactérienne sur les deux variétés

Après 72 heures d'inoculation, des lésions distinctes en été visibles sur les feuilles des deux variétés de pomme de terre infectée par *Pectobacterium* sp. (Figures 36 & 37). Les feuilles des plantes non traitées inoculées avec des bactéries ont présenté de grande zone nécrotique allant jusqu'au pétiole. Diallo et al., (2009) ont signalé que les attaques pectinolytiques de *Pectobacterium* causent la maladie de la jambe noire chez les plants de pomme de terre.

Des lésions moins graves ont été également visibles sur les feuilles des plantes pré-stimulées et inoculées par les *Pectobacterium* sp. Les lésions sont plus petites sur les plants arrosées avec une solution contenant de chitosane et encore plus limitées sur les plantes prétraitées par l'acide salicylique (Figure 36 & 37).



Figure 38 : Feuilles de *Solanum tuberosum* cv Red- Pontiac après inoculation avec *Pc*-5890 ou *Pa*-5889 (Hachoud et al. 2019). *Pc* : feuille infecté par *P. carotovurum* ; MeJa-*Pc* : feuille élicité par MeJa et infecte par *P. carotovurum* ; Chi-*Pc* : feuille élicité par chitosane et infecte par *P. carotovurum* ; Sa-*Pc* : feuille élicité par l'acide salicylique et infecte par *P. carotovurum* ; *Pa* : feuille infecté par *P. atrosepticum* ; MeJa-*Pa* : feuille élicité par MeJa et infecte par *P. atrosepticum* ; Chi- *Pc* : feuille élicité par chitosane et infecte par *P. atrosepticum* ; Sa-*Pc* : feuille élicité par l'acide salicylique et infecte par *P. atrosepticum*.



Figure 37 : Feuilles de *Solanum tuberosum* cv Agata après inoculation avec *Pc*-5890 ou *Pa*-5889 (Hachoud et al. 2019). *Pc* : feuille infecté par *P. carotovurum* ; *MeJa-Pc* : feuille élicité par MeJa et infecte par *P. carotovurum* ; *Chi-Pc* : feuille élicité par chitosane et infecte par *P. carotovurum* ; *Sa-Pc* : feuille élicité par l'acide salicylique et infecte par *P. carotovurum* ; *Pa* : feuille infecté par *P. atrosepticum* ; *MeJa-Pa* : feuille élicité par MeJa et infecte par *P. atrosepticum* ; *Chi-Pa* : feuille élicité par chitosane et infecte par *P. atrosepticum* ; *Sa-Pa* : feuille élicité par l'acide salicylique et infecte par *P. atrosepticum*.

I.1.2. Effet de la stimulation sur la croissance des plants

✓ Red-Pontiac

Les plants de Red-Pontiac cultivées au milieu contenant de méthyl-jasmonate ont présenté une réduction significative ($p < 0,05$) des paramètres de croissance ; la taille, le poids et le nombre de feuilles. On observe que la taille et le poids des plants témoins ont été respectivement 1,3 et 6 fois plus élevées à la fin de l'expérience (T5) par rapport à ceux traitées avec le méthyl-jasmonate. En revanche, la taille des plants traités avec l'acide salicylique ou le chitosane n'a pas été réduite de manière significative ($p > 0,05$), bien que l'acide salicylique ait eu un effet plus net que le chitosane en favorisant la croissance en taille. Cependant, le poids des plants était réduit davantage par le chitosane (Figure 38 a & b). Une diminution de 25 % de nombre de feuilles été observé chez les plantes Red-Pontiac traitées par l'acide salicylique par rapport aux plantes de contrôle, mais le traitement avec le chitosane n'affecte pas la croissance en nombre de feuilles qui reste inchangé comparé au contrôle (Figure 38c).

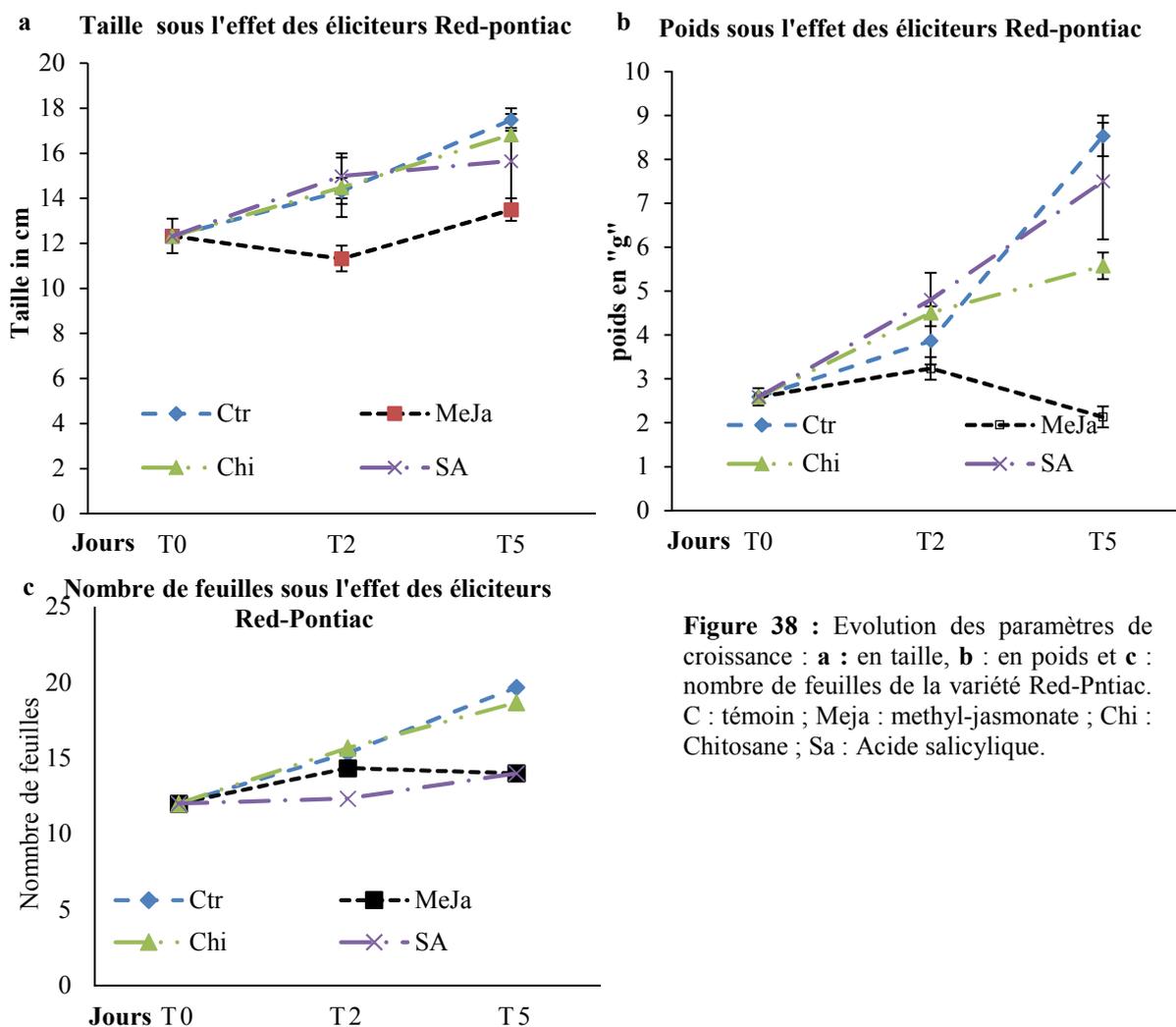


Figure 38 : Evolution des paramètres de croissance : **a** : en taille, **b** : en poids et **c** : nombre de feuilles de la variété Red-Pontiac. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique.

✓ **Agata**

Nous remarquons des courbes de croissances linéaires pour l'accroissement en longueur, en poids et en nombre de feuilles pour les plants de control (sans stimulateurs et sans infections). Les plants Agata élicitées avec du méthyl-jasmonate ont présenté des réductions significatives ($p < 0.05$) de la croissance en hauteur (taille), en poids et en nombre de feuilles de 28 %, 65 % et 45,8 % respectivement par rapport aux valeurs de control correspondantes en T5 (Figure 39 a, b & c). En revanche, les plants élicitées par l'acide salicylique montre une croissance significativement ($p < 0.05$) élevée comparées aux plants de contrôles et du chitosane. Nous observons, que l'acide salicylique et le chitosane ont eu un rôle stimulateur de croissance en augmentant la taille et le poids des plants à des degrés distingués (Figure 39).

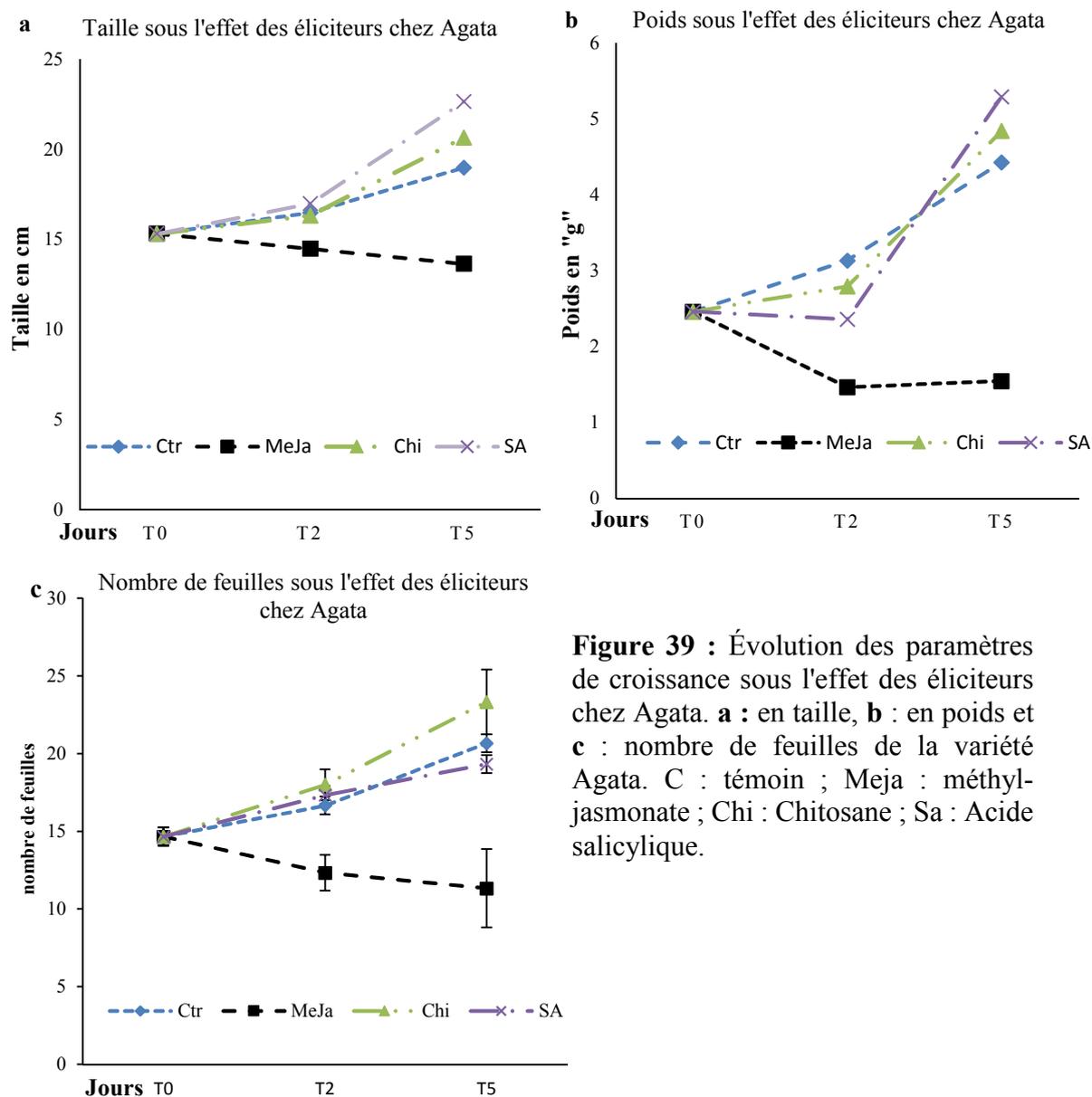


Figure 39 : Évolution des paramètres de croissance sous l'effet des éliciteurs chez Agata. **a** : en taille, **b** : en poids et **c** : nombre de feuilles de la variété Agata. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique.

II.3. Effet de l'infection sur la croissance de deux variétés de plants

✓ Red-pontiac

Des modifications liées à la croissance ont été observées au troisième jour (T5) d'inoculation chez les plants non stimulés. En moyenne, les plants Red-Pontiac infectés par Pc-5890 avaient 12 feuilles et celles infectées par Pa-5889 avaient 13,7 feuilles, alors que les plantes témoins ont eu 19,7 feuilles au T5 (Figure 40c). De même, l'infection par les *pectobacteriums* a induit une réduction nette de la taille et du poids (Figure 40a, b) chez les plants Red-Pontiac. Le paramètre de croissance en taille des plants infectés par Pc-5890 ou Pa-5889 a subi une diminution de 26,7 % et 12,4 %, respectivement, compare au contrôle, ainsi

qu'une perte de la biomasse significative ($p < 0,05$) effleure 83 % et 69 % chez les plantes infectés par les deux souches bactériennes *Pc*-5890 et *Pa*-5889, respectivement, à la fin de l'expérience (Figure 40a).

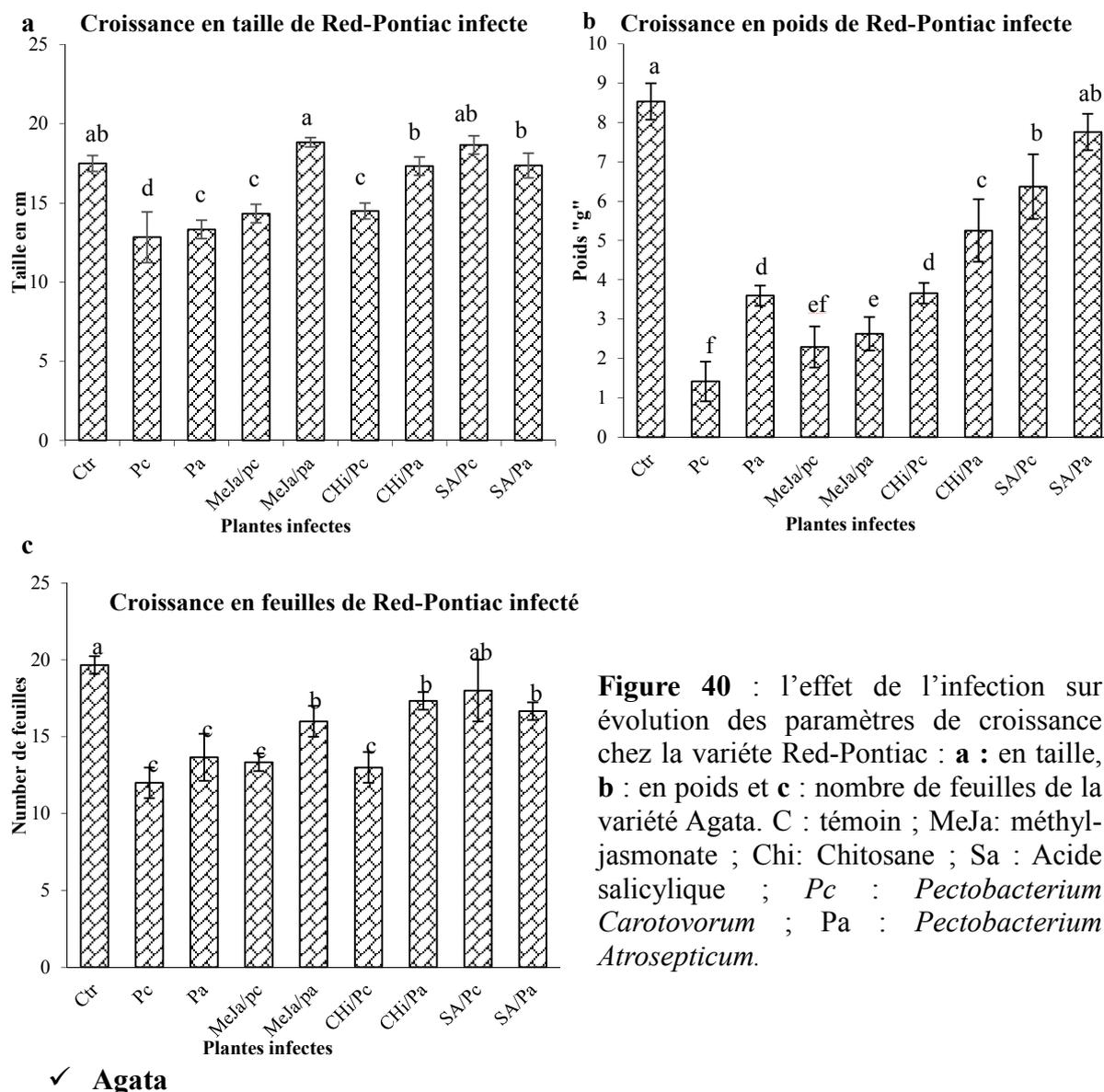


Figure 40 : l'effet de l'infection sur évolution des paramètres de croissance chez la variété Red-Pontiac : **a** : en taille, **b** : en poids et **c** : nombre de feuilles de la variété Agata. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; *Pc* : *Pectobacterium Carotovorum* ; *Pa* : *Pectobacterium Atrosepticum*.

Les plants Agata inoculés et non élicités ont développé les mêmes symptômes liés à l'infection par les *pectobacteriums* que ceux observés chez Red-Pontiac. Les plants témoins (control) de la variété Agata avaient en moyenne 21 feuilles, mais leur nombre était réduit à 13 et 15 après l'inoculation par *Pc*-5890 et *Pa*-5889, respectivement, en T5 (Figure 41c).

La taille et le poids des plants de la variété Agata (Figure 41 a & b) inoculés avec *Pc*-5890 indiquant un déficit de 32 % et 75.4 %, respectivement, en rapport aux valeurs de plants témoins. Tandis que l'inoculation avec *Pa*-5889 avait pour effet la chute de 25% en taille des plants et 35% en poids comparé au témoin (Figure 41 a & b).

Ces résultats suggèrent que les plants de variétés Agata ont été beaucoup plus sensibles et moins résistants à l'infection vis-à-vis de *Pectobacterium Carotovorum* (*Pc*-5890) et *Pectobacterium Atrosepticum* (*Pa*-5889) comparés aux plants de la variété Red-pontiac.

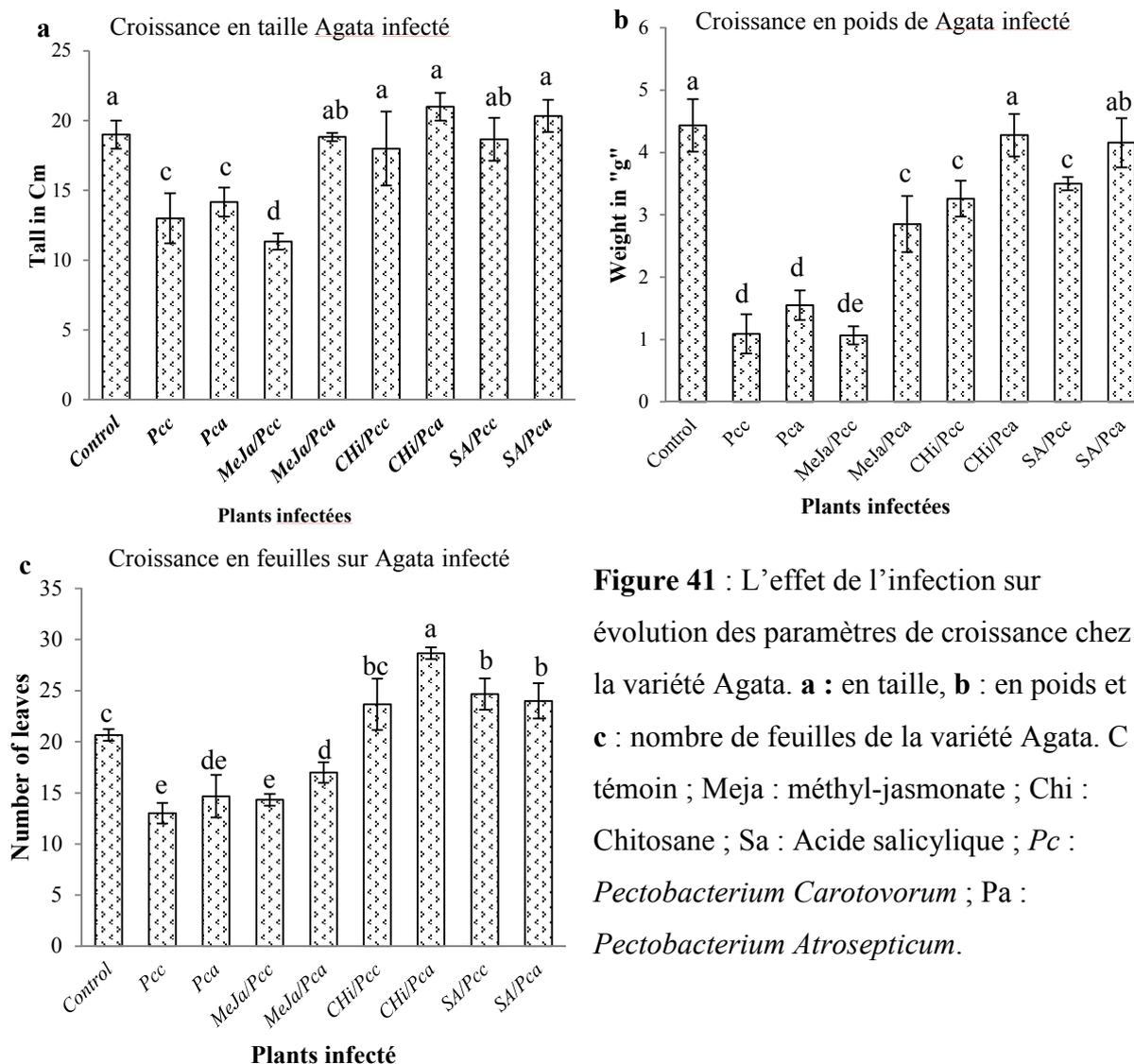


Figure 41 : L'effet de l'infection sur évolution des paramètres de croissance chez la variété Agata. **a** : en taille, **b** : en poids et **c** : nombre de feuilles de la variété Agata. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; *Pc* : *Pectobacterium Carotovorum* ; *Pa* : *Pectobacterium Atrosepticum*.

II.4. Effet combine de la stimulation et de l'infection

✓ Red-pontiac

Lorsque les plants prétraitées sont infectées par le *Pc*-5890 ou par *Pa*-5889, leurs poids été supérieurs à celui des plants infectés non stimulés. Les plants élicités par l'acide salicylique ont eu une augmentation de la biomasse de 2,5 et 2,9 fois supérieure à celle des plantes inoculées par le *Pc*-5890 ou par *Pa*-5889, respectivement, à la fin d'expérimentation (Figure 40 b). Bien que les plantes ont subi l'agression du pathogène des deux souches de *Pectobacteriums* pectinolytiques, la stimulation par le chitosane ou l'acide salicylique a permis une augmentation

significative ($p < 0,05$) des paramètres de croissance : de la taille, du poids et du nombre de feuilles (Figure 40). Par contre, les plants infectés non stimulés ont montré une chute considérable (diminution significative ($p < 0,05$)) des valeurs des paramètres de croissances allons jusqu'à 32% pour la réduction de la taille, à 75 % pour la diminution du poids et à 30,5 % pour diminution du nombre de feuilles.

✓ **Agata**

La stimulation des plants de pomme de terre avec les différents éliciteurs, en particulier avec l'acide salicylique (SA), a eu des effets positifs de protection contre *Pectobacterium carotovorum*. Les plants sont 1,4 fois plus grandes en hauteur que les plants infectés non élicités. Les plants infectés par *Pectobacterium atrosepticum* précédemment stimulés par le chitosane ou l'acide salicylique ont une croissance de la biomasse très similaire (DNS, $p > 0,05$) à ceux des plants de témoins en T5 (Figure 41b). Les résultats suggèrent que l'élicitation a accéléré la croissance et le développement des plants, comme l'ont rapporté Godoy-Hernandez et Vazquez-Flota, (2006) et Salachna et Zawadzńska, (2014).

Nge et al., (2006) ont également signalé un effet positif du chitosane sur la croissance de *Freesia* spp. et des orchidées, mais aussi, permettent à la plante de se préparer aux éventuelles attaques en actionnant les voies de transductions du signal et du métabolisme secondaire (Chevrier, 2005 ; Hidangmayum et al., 2019). Notant que la biomasse des plants infectés par *Pectobacterium carotovorum* (Pc-5890) était trois fois plus élevée après prétraitement par le chitosane ou par l'acide salicylique par rapport aux plants inoculés non traités.

Lorsque l'acide salicylique est ajouté au milieu de culture induit une élévation de la croissance du nombre de feuilles chez tous les plants de pomme de terre et, en particulier, chez les plants qui sont infectés par Pc-5890 et Pa-5889 (Figure 41c)

Les résultats de la présente étude montrent que l'addition externe de méthyl-jasmonate à un effet inhibitoire sur la croissance des deux variétés de pomme de terre au début de l'expérimentation (T2), par contre le chitosane et l'acide salicylique la favorise. Pruski et al., (2002) ont signalé qu'une haute concentration en méthyl-jasmonate réduisait l'expansion de la partie aérienne des plants de pomme de terre tout en améliorant la biomasse des racines et la ramification. Beaulieu, (2007) a signalé que le chitosane joue un rôle dans l'activation des réactions antibactérienne et antifongique chez les plantes.

II.5. Accumulation de composés phénoliques

L'identification de composés phénoliques est une mission compliquée en raison de leur diversité, leur structure et leurs propriétés dans le matériel végétal. Dans cette étude, les métabolites secondaires ont été extraits de plants de pomme de terre aux jours T0, T2 et T5 comme indiqué dans matériel et méthodes. Les extraits de plants sont analysés par HPLC.

Nous avons suivi la biosynthèse des composés phénolique en fonction du temps suivant : acide gallique (GA : acide gallique formé principalement par la voie shikimique chez les plantes supérieures). Acide chlorogénique (CGA : l'ester des acides caféique et quinique), pyrocatechol (PYR : 1,2-benzène diol formé par la voie de formation de l'acide benzoïque), acide caféique (CAF), acides p-coumarique (p-COM) et férulique (FRU) et la quercétine (QRC : un flavonol biosynthétisé par les voies shikimique et polycétide). Tous ces composés ont été déterminés et quantifiés en se basant sur leur temps de rétention chromatographiques (RT) appropriés (Figure 42 a & b), à savoir GA (RT : 5,082 min), CGA (RT : 10,1 min), PYR (RT : 10,5 min), CAF (RT : 11,8 min), p-COM (RT : 15 min), FRU (RT : 16 min) et QRC (RT : 22,2 min).

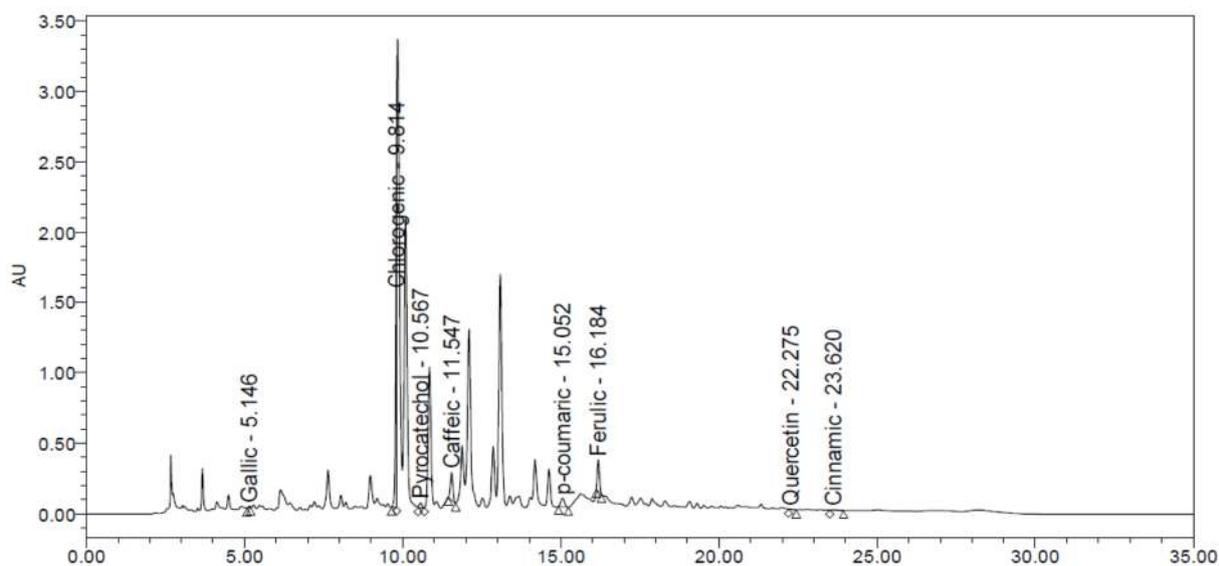


Figure 42 a : Profils chromatographiques des échantillons Agata correspondant au témoin.

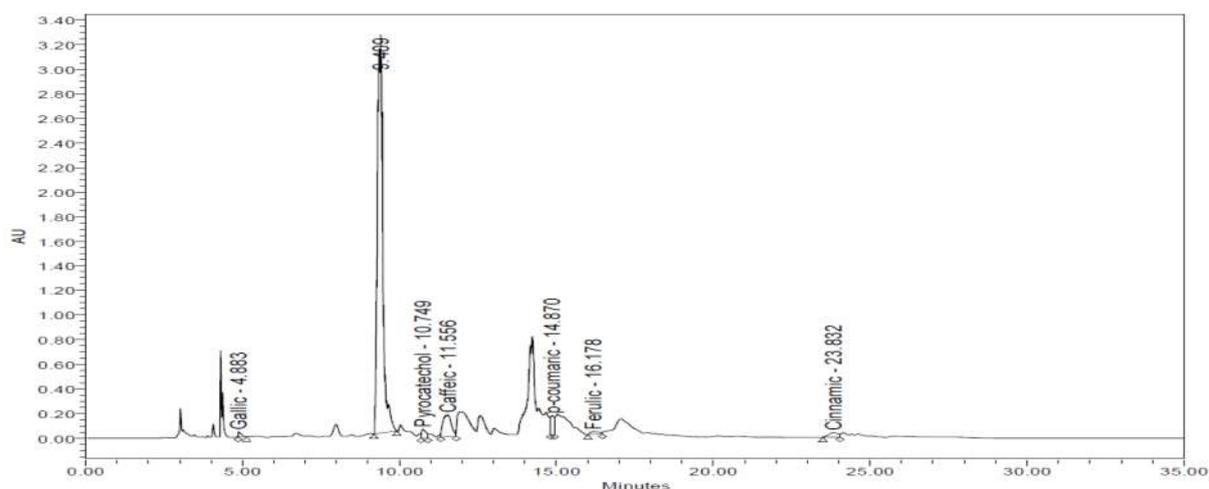


Figure 42 b : Profils chromatographiques des échantillons Red-Pontiac correspondant au témoin.

Nous avons suivi les effets des éliciteurs le méthyl-jasmonate, l'acide salicylique et le chitosane sur les paramètres de croissance et l'accumulation des composés phénoliques.

Dans la présente étude, les concentrations des composés phénoliques étudiés diffèrent généralement selon les conditions expérimentales. La CGA était prédominante, représentant 70 % à 80 % du total des composés phénoliques considérés dans cette étude pour la variété Red-Pontiac et 85 à 95 % pour la variété Agata (Figure 43b). En revanche, la teneur en GA était faible dans les deux variétés pendant toute l'expérimentation, n'excédant pas les 0.8 % du total des composés phénoliques considérés (Figure 43a). Im et al., (2008) ont rapporté que la CGA et son isomère constituant environ 96 à 98% du total des phénols. La CGA est le composé phénolique le plus abondant et le plus efficace formé contre les attaques de pathogènes constituants environ 90 % du total des phénols chez les tubercules de pomme de terre en bonne santé (Friedman, 2004).

L'expérimentation a montré que chaque variété de pomme de terre a un modèle d'accumulation phénolique différent dans des conditions de control. Il est apparu que les taux les plus élevés de l'acide *p*-coumarique (*p*-COM) (Figure 43e) et de l'acide férulique (Figure 43f) ont été observés chez les plants Agata. Les teneurs les plus élevés de l'acide gallique (Figure 43a) et de la quercétine (Figure 43g) ont été enregistrés chez les plants Red-Pontiac. Ainsi, il y a une légère différence entre les deux cultivars concernant l'accumulation de PYR (Figure 43c) et de CAF (Figure 43d) au deuxième jour de l'expérimentation (T2).

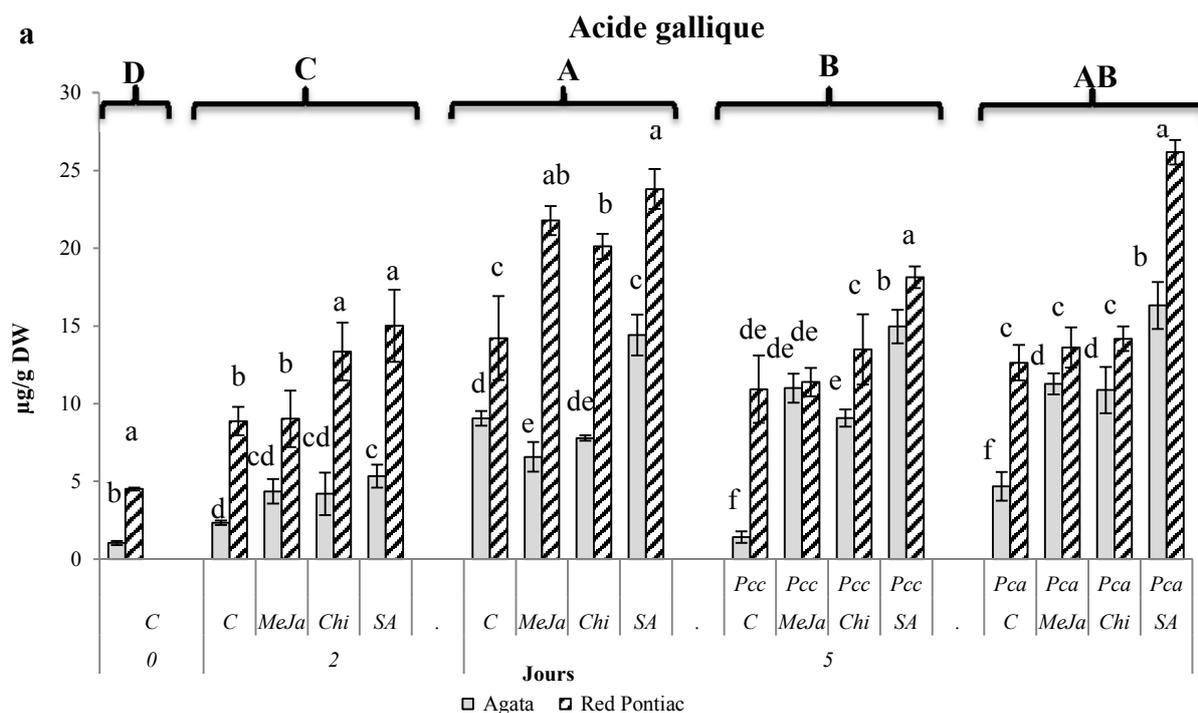


Figure 43a : Accumulation de l'acide gallique dans les deux variétés de pomme de terre. **a** : Agata, **b** : Red-Pontiac. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; Pcc : *Pectobacterium Carotovorum* ; Pca : *Pectobacterium Atrosepticum*. Les valeurs sont représentées en moyennes \pm écart type (n=3). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

II.5.1. Effet de la stimulation sur l'accumulation des composés phénoliques :

✓ Red-Pontiac

Dans les plants de la variété Red-Pontiac, les teneurs en composés phénoliques en fonction de temps sont représentées dans la figure 43 a & g. L'étude de l'évolution de l'acide gallique en fonction de temps a démontré la faible fréquence de sa présence. Néanmoins, il joue un rôle très important dans la défense contre les microorganismes, en particulier chez les plantes supérieures (Lattanzio et al., 2006) en raison de son implication dans le renouvellement de la paroi végétale et de son efficacité en tant qu'agent antimicrobien (Taiz et Zieger, 2002).

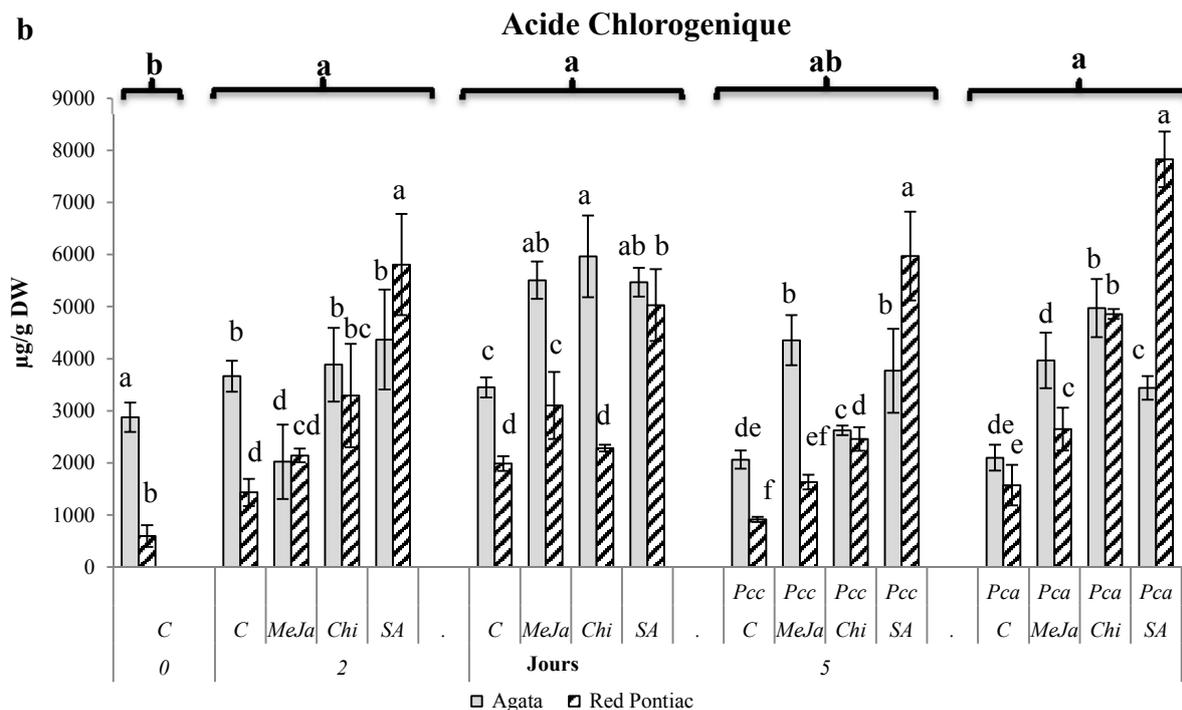


Figure 43b : Accumulation de l'acide chlorogénique. **a** : Agata, **b** : Red-Pontiac. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; Pcc : *Pectobacterium Carotovorum* ; Pa : *Pectobacterium Atrosepticum*. Les valeurs sont représentées en moyennes \pm écart type (n=3). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différente ($p > 0,05$).

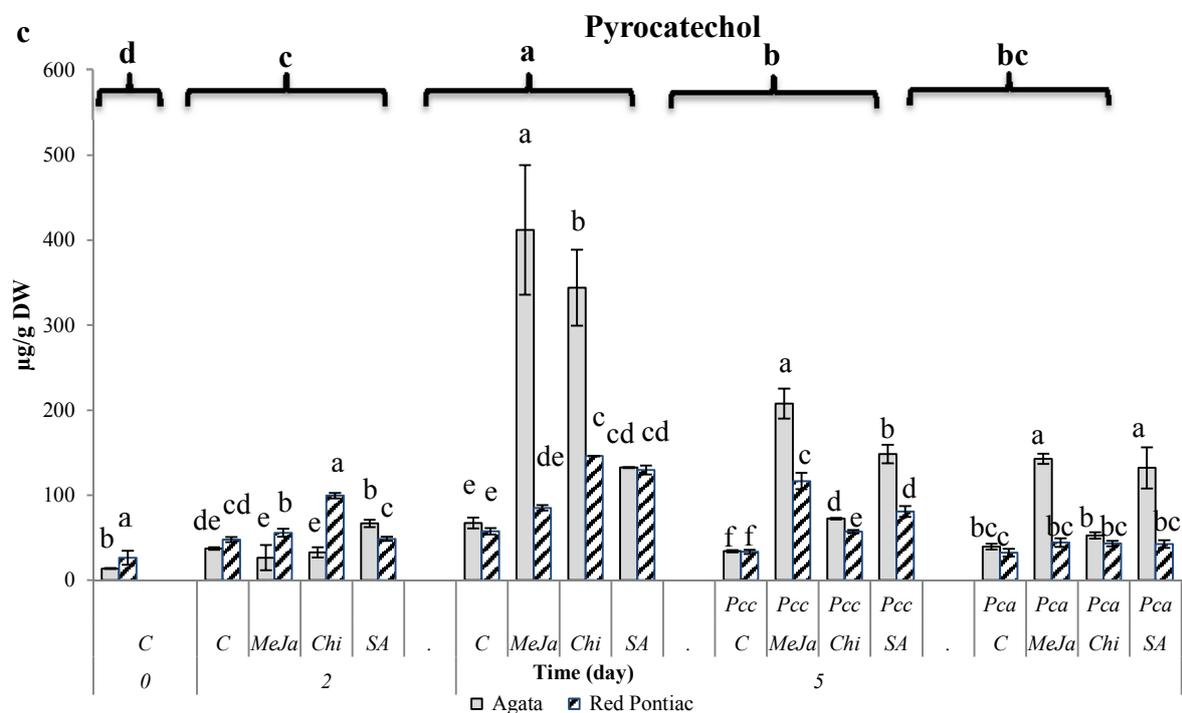


Figure 43c : Accumulation de pyrocatechol dans les deux variétés. **a** : Agata, **b** : Red-Pontiac. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; Pcc : *Pectobacterium Carotovorum* ; Pa : *Pectobacterium Atrosepticum*. Les valeurs sont représentées en moyennes \pm écart type (n=3). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Le niveau de l'acide gallique (Figure 43a) dans les plants Red-Pontiac est accru de manière significative ($p < 0,05$) sous l'effet de la stimulation (T5). L'acide gallique a évolué d'un taux initial de $14,2 \mu\text{g/g}$ du poids sec (T5 témoin) à $20,1 \mu\text{g/g}$, $21,8 \mu\text{g/g}$ et $23,8 \mu\text{g/g}$ du poids sec dans les plantes élicitées par le chitosane, le méthyl-jasmonate et l'acide salicylique, respectivement. De même, l'acide chlorogénique (CGA) est 2,5 et 1,5 fois plus élevé respectivement chez les plants stimulés par l'acide salicylique et méthyl-jasmonate que chez les plantes-témoins en T5 ($1990,1 \mu\text{g/g}$). L'étude a montré que les teneurs en acide chlorogénique (Figure 43b) dans les conditions de contrôle sont supérieures à celles rapportées par Friend et al., (1973), mais deux fois moins que ceux rapportés par Mattila et Hellstrom, (2007). En revanche, Chen et al., (2006) ont observé que le traitement par méthyl-jasmonate n'a pas d'effet significatif sur les niveaux de l'acide chlorogénique dans les tissus des feuilles de la tomate.

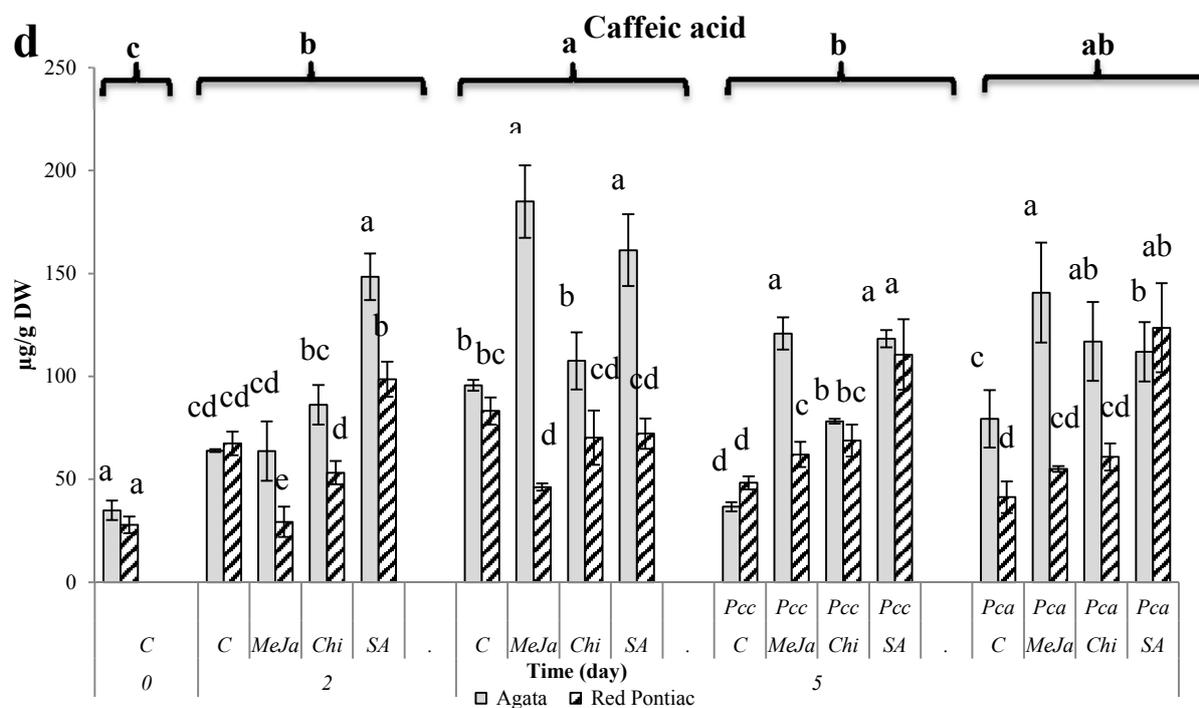


Figure 43d : Accumulation de l'acide caféique de deux variétés. **a** : Agata, **b** : Red-Pontiac. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; Pc : *Pectobacterium Carotovorum* ; Pa : *Pectobacterium Atrosepticum*. Les valeurs sont représentées en moyennes \pm écart type ($n=3$). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

La quercétine est l'un des principaux composés phénoliques trouvés dans les plants Red-Pontiac au cours de l'expérimentation (Figure 43g) sur le total des composés phénoliques étudiés. Il affiche un taux d'accumulation proche de 20 % chez les plantes-témoins et les plants traités par le chitosane, 6 % chez les plantes traitées avec méthyl-jasmonate et 12 % chez celles traitées par l'acide salicylique.

Le pyrocatechol, quant à lui, (Figure 43c) représente 2 % à 4 % du total des composés phénoliques pris en compte dans les extraits Red-Pontiac au cinquième jour du traitement, atteignant 146 µg/g de poids sec dans les plants élicités avec le chitosane et 129,6 µg/g de poids sec dans les plants élicités avec l'acide salicylique. Les trois autres composés phénoliques étudiés : les acides caféique, le p-coumarique et férulique représentaient entre 1,2 à 3% du total des composés phénoliques (Figure 43d, e & f). Dans les conditions de control, la teneur en phénols déterminés au cours de la culture des plants suit une logique d'accumulation progressive au fil du temps.

✓ **Agata**

Les résultats de la teneur en composés phénoliques de la variété Agata durant l'expérimentation sont représentés dans les figures 43. Au cours de l'élicitation au méthyl-jasmonate et au chitosane, le taux de l'acide chlorogénique est respectivement de 5467 µg/g et 5963 µg/g de poids sec. La concentration en pyrocatechol été de 411 µg/g du poids sec et l'acide caféique été de 184,94 µg/g du poids sec sous l'effet stimulateur de MeJa en T5. Cependant, l'acide férulique a considérablement diminué sous l'effet de traitement par le méthyl-jasmonate par rapport aux témoins. En effet, on observe une réduction de l'accumulation de l'acide gallique (GA) et de la quercétine (QRC) chez les plantes traitées avec le méthyl-jasmonate ou le chitosane. En général, l'élicitation avec l'acide salicylique (SA) génère un accroissement des niveaux des composés phénoliques ; Particulièrement, l'acide gallique (AG) qu'est 2,3 fois élevé par rapport au témoin au jour T2 et des taux de QRC supérieurs à 3,8 et 15 fois à ceux des traitements par Chitosane et/ou par méthyl-jasmonate, respectivement. Au deuxième jour de l'expérimentation, les taux élevés de pyrocatechol et de l'acide férulique ont été enregistrés (66,88 µg/g et 148,38 µg/g, respectivement) chez les plantes sous l'effet de l'élicitation par l'acide salicylique.

II.5.2. Effet de l'infection sur l'accumulation des composés phénoliques

✓ **Red-Pontiac :**

L'infection des plants de la variété Red-Pontiac par *Pectobacterium carotovorum* ou *Pectobacterium atrosepticum* ont montré une réduction considérable des composés phénoliques, cela est dû à l'action des enzymes pectinolytiques des *Pectobacterium* sur la paroi cellulaire des feuilles de pomme de terre. En effet, une réduction de 20 % à 27 % de l'acide gallique est notée dans les plants infects. L'acide p-coumarique et l'acide férulique ont

enregistré une diminution de 15 % à 20 % sous l'effet de l'infection bactérienne des plants Red-Pontiac. L'acide chlorogénique, le pyrocatechol, l'acide caféique et la quercétine subissent un abaissement de leurs concentrations adjacentes les 50 % en comparaison aux plants témoins non infectés à la fin de l'expérimentation.

✓ **Agata**

L'inoculation des plants Agata par *Pectobacterium carotovorum* ou *Pectobacterium atrosepticum* a induit une réaction similaire à celle observée chez les plants Red-Pontiac, avec une diminution générale des concentrations en polyphénols (Figure 43 a & g). Le niveau de l'acide gallique a diminué de 84 % en T5 en réponse à l'infection par *Pectobacterium* spp. L'acide férulique, quant à lui, continue de chuter après l'infection des plantes par *Pectobacterium carotovorum* à 87 % et à 85 % lors de l'infection par *Pectobacterium atrosepticum*. La quercétine a baissé de 61 % et 63 % chez les plantes infectées par *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* respectivement en T5 (Figure 43 a, f & g) par rapport au témoin.

Les teneurs en acides chlorogénique, caféique et *p*-coumarique et pyrocatechol, représentées dans les plantes infectées par *Pc-5890* approximativement 59 % pour CGA, 81 % pour CAF et 32 % pour *p*-COM et 50 % pour PYR comparés aux plantes-témoins non infectés en T5. Les plantes infectées par *Pa-5889* ont souffert d'une perte de 56 % de CGA, 89 % de CAF et 28 % de *p*-COM et de 58 % de PYR par rapport au plantes-témoins T5 (Figure 43 b, c, f & g).

II.5. 3. Effet combine de la stimulation et de l'infection

Le taux des composés phénoliques dans les plants de Red-Pontiac induit par le méthyl-jasmonate lors de l'inoculation avec *Pectobacterium carotovorum* (*Pc-5890*) est inférieur à celui des plants témoins non infectés, mais significativement plus élevé que celui des plants infectés non stimulés. En particulier, les taux de PYR (116,68 µg/g du poids sec) et de QRC (845,20 µg/g du poids sec) sont respectivement 3,5 et 2,7 fois plus élevés que celle des plantes infectées sans élicitation. Les plants pré-élicités avec l'acide salicylique et infectés par *Pc-5890* présentent un surcroît de tous les composés phénoliques étudiés, atteignant des taux particulièrement élevés tels que les acides chlorogénique (5971 µg/g du poids sec), caféique (110,6 µg/g du poids sec) et férulique (104,4 µg/g poids sec) en T5 (Figure 43 b, d & f).

✓ **Red-pontiac**

Les plants de Red-Pontiac cultivés en présence des éliciteurs dans le milieu de culture puis infectés par *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*-5889) ont accumulé des niveaux plus élevés de composés phénoliques que ceux infectés par *Pc*-5890 (Figure 43 a & g). Le pyrocatechol et l'acide caféique ont été en déclin dans les plants infectés malgré le prétraitement par le méthyl-jasmonate ou le chitosane. Cependant, les taux des acides gallique (26,19 µg/g du poids sec), chlorogénique (7492,7 µg/g) et *p*-coumarique (74,8 µg/g) et de la quercétine (630,3 µg/g) ont été considérablement augmentés lorsque les plants infectés par *Pa*-5889 ont reçu dans leur milieu de cultures de l'acide salicylique par rapport à celles qui n'ont pas été élicités.

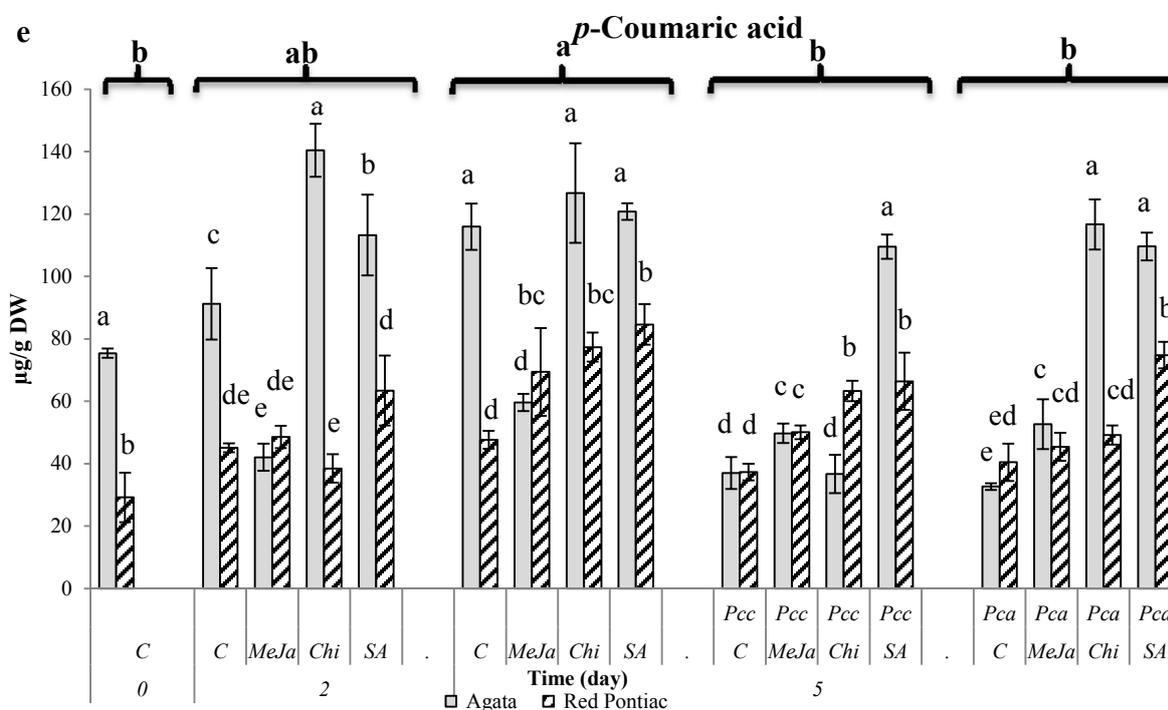


Figure 43e : Accumulation de l'acide *p*-coumarique de deux variétés. **a** : Agata, **b** : Red-Pontiac. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; *Pc* : *Pectobacterium Carotovorum* ; *Pa* : *Pectobacterium Atrosepticum*. Les valeurs sont représentées en moyennes ± écart type (n=3). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

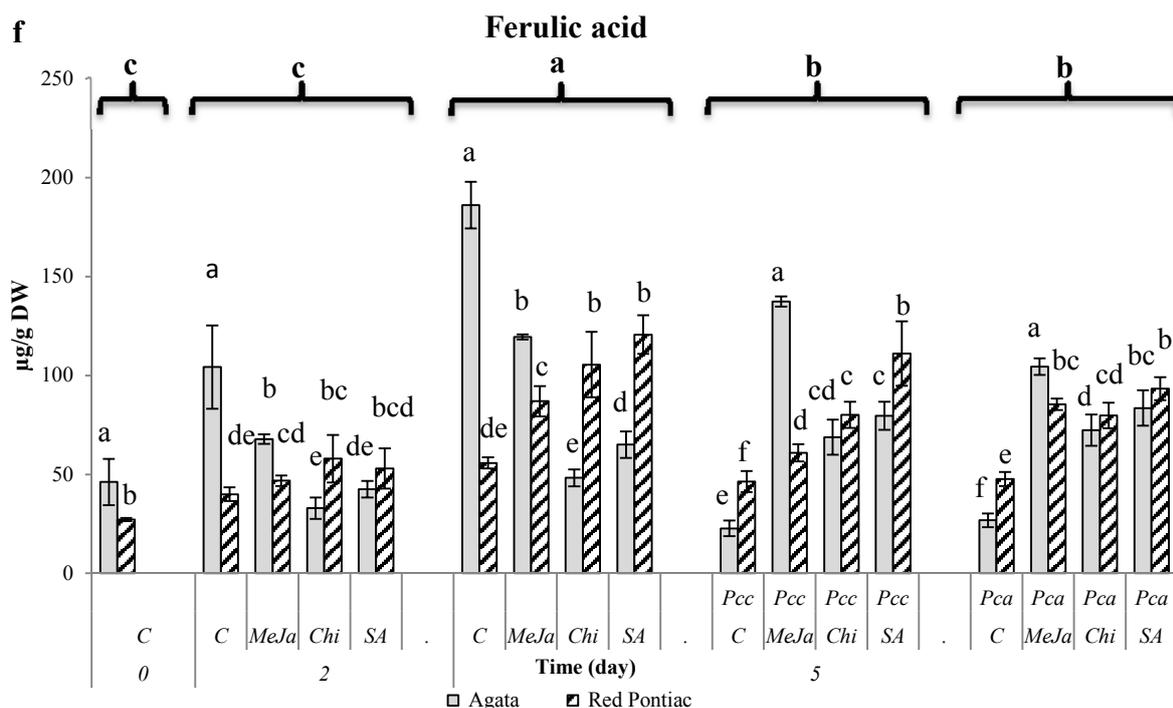


Figure 43f : Accumulation de l'acide férulique deux variétés. **a** : Agata, **b** : Red-Pontiac. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; Pc : *Pectobacterium Carotovorum* ; Pa : *Pectobacterium Atrosepticum*. Les valeurs sont représentées en moyennes \pm écart type (n=3). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

✓ Agata

Comme dans la variété Red-Pontiac, l'impact de l'infection sur les teneurs en composés phénoliques dans les plants prétraités est significativement différent en comparaison aux plants infectés non traités variant selon le traitement. Chez les plants infectés par le *Pc-5890* arrosés à l'acide salicylique, les teneurs en acides phénoliques sont comme suit : 18 $\mu\text{g/g}$ ms pour l'acide gallique, 6304 $\mu\text{g/g}$ ms pour l'acide chlorogénique, 110 $\mu\text{g/g}$ ms *p*-coumarique et 80 $\mu\text{g/g}$ ms pour le pyrocatechol et 351 $\mu\text{g/g}$ ms pour la quercétine sont significativement plus élevés que chez les plants infectés sans aucun prétraitement (Figure 43 a, c, e & g). L'exposition des plants au méthyl-jasmonate a également induit des augmentations de CGA (4355 $\mu\text{g/g}$ ms), de PYR (207 $\mu\text{g/g}$ ms) et de CAF (120 $\mu\text{g/g}$ ms) chez les plants infectés par *Pc-5890* (Figure 43b & d).

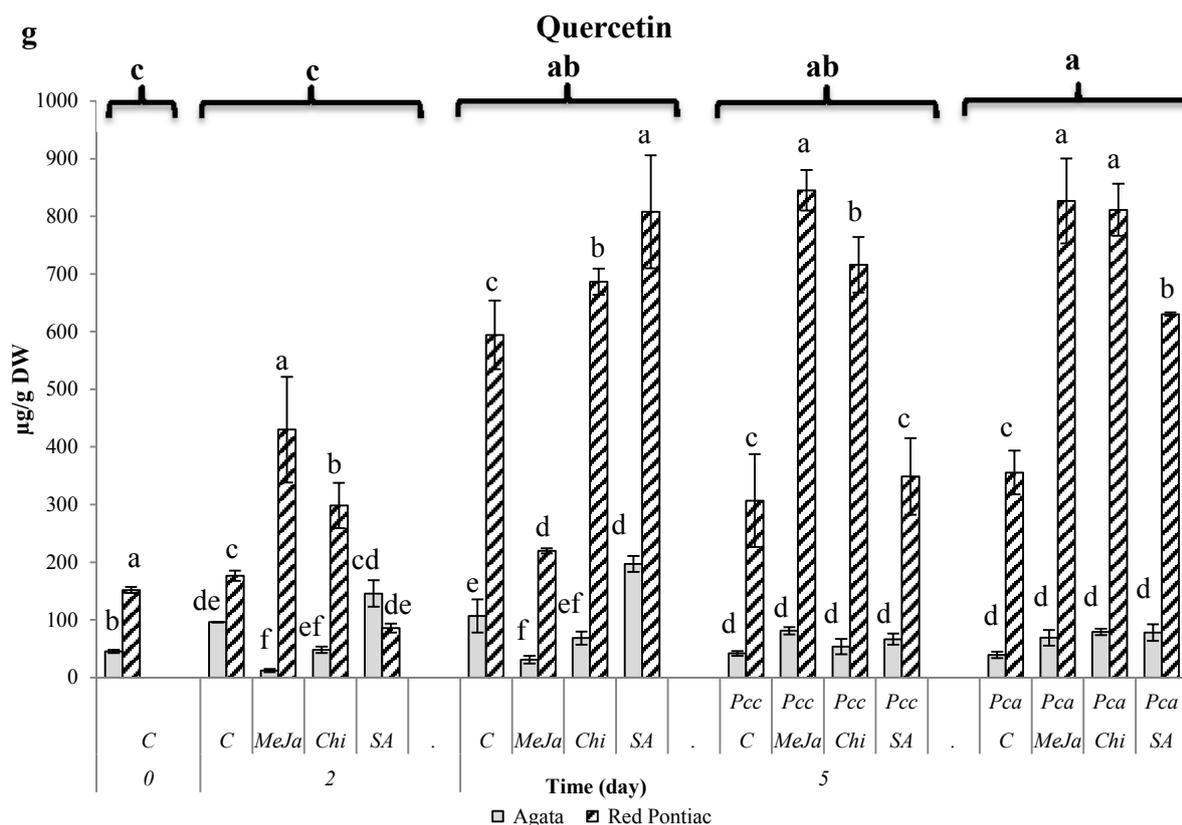


Figure 43g : Accumulation de la quercétine de deux variétés. **a** : Agata, **b** : Red-Pontiac. C : témoin ; MeJa : méthyl-jasmonate ; Chi : Chitosane ; Sa : Acide salicylique ; Pcc : *Pectobacterium Carotovorum* ; Pa : *Pectobacterium Atrosepticum*. Les valeurs sont représentées en moyennes \pm écart type (n=3). Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

L'accumulation de grandes quantités de l'acide gallique (Figure 43a) dans les plants Agata infectés et prétraités est comparable à la réponse à l'élicitation dans des suspensions de cellules de tabac dans lesquelles une résistance systémique aux agents pathogènes est induite après l'activation de la voie phénylpropanoïde (Van Loon et al., 2008). De plus, l'acide gallique est le composant principal des tanins (Daneshfar et al., 2008) qui forme des composés très stables après liaison aux protéines, il participe probablement à l'inhibition des enzymes pectinolytiques de *Pectobacterium* chez les plants traités. Après le prétraitement avec le chitosane, les niveaux de l'acide férulique (Figure 43f) a augmenté significativement ($p < 0,05$).

Chez les plants infectés, comme ce fut le cas chez les plants stimulés par l'acide salicylique et inoculés avec la Pa-5889. Dans les plants infectés par Pa-5889, seuls deux composés ont entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) des leurs taux : les acides caféiques et p-coumarique (Figure 43d & e). Cependant, l'acide chlorogénique demeure inchangé dans les plants traités avec du chitosane ou avec du l'acide salicylique.

Les concentrations de l'acide gallique sont significativement différentes ($p < 0,05$) chez les plantes prétraitées avec de l'acide salicylique par rapport à celles recevant le méthyl-jasmonate ou chitosane, alors que la teneur en quercétine ne variait pas d'une manière significative par rapport à l'infection dans les conditions de traitement (Figure 43g).

Ainsi, dans les deux cultivars de pomme de terre, un changement significatif ($p < 0,05$) dans la composition phénolique est observé après que les plants sont infectés avec le *Pc-5890* ou le *Pa-5889*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hukkanen et al., (2007) qui ont signalé des changements dans la teneur totale en composés phénoliques solubles de fraisiers prétraités au benzothiadiazole, 7 jours après l'inoculation avec l'oïdium. Les plants de Red-Pontiac ou d'Agata infectés par l'une ou l'autre souche présentent des taux de phénols cibles inférieurs à ceux des témoins non traités et non inoculés et des plants prétraités et non inoculés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE II

DISCUSSION

III. Discussion

Les polyphénols sont un important groupe de métabolites secondaires chez les plants qui participent à la défense contre les infections des agents pathogènes tels les bactériennes. Ils sont doués d'une activité toxique anti-microorganisme. Ils affectent leur perméabilité membranaire et leur activité enzymatique (Walton, 1997). Les composés impliqués dans les processus de défense sont généralement produits de manière constitutive dans la plante mais leur biosynthèse peut être améliorée par stimulation ou après une attaque par un agent pathogène (Hukkanen et al., 2007). Le phénomène de résistance induite impliquant souvent un métabolisme phénolique accru présente un grand intérêt en tant que méthode de contrôle des maladies bactériennes des plantes. Les mécanismes de défense endogènes des plantes peuvent être activés par des produits chimiques non toxiques pour induire une résistance à long terme et à spectre large (Pourcel et Grotewold, 2009). La résistance induite aux agents pathogènes varie selon les familles de plantes et des espèces, ce qui se traduit par une gamme variable de métabolites secondaires et de protéines liées à la pathogénicité (*Pathogenesis Related Proteins*) synthétisée. La résistance induite est fréquemment impliquée dans l'accumulation de composés phénoliques solubles ou liés à la paroi cellulaire (Hukkanen et al., 2007).

Dans cette étude, les changements dans les modèles de croissance et d'accumulation de polyphénols chez des plants de pomme de terre infectés par des *Pectobacterium* spp préalablement stimulées avec méthyl-Jasmonate, l'acide salicylique ou le chitosane ont été déterminés et comparés à ceux obtenus dans des conditions de contrôle (Plants non infectés, non élicités). Les concentrations de l'acide salicylique et de méthyl-Jasmonate ajoutées au milieu de culture, bien qu'elles soient faibles (100 μ M), elles sont beaucoup plus élevées que les concentrations endogènes chez les plantes précédemment déterminées chez les plantes-témoins et même infectées (Coquoz et al., 1998 ; Hoysted et al., 2017 ; Klessig et al., 2016). L'objectif principal de cette expérience est d'étudier les effets protecteurs de méthyl-jasmonate, l'acide salicylique et le chitosane ajoutés de manière exogène dans la solution d'arrosage des plants de pomme de terre infectés par les *Pectobacterium*. Notant que les deux cultivars de pomme de terre Red-Pontiac et Agata ont réagi différemment aux éliciteurs et à l'exposition aux souches bactériennes.

La réponse à l'infection dépend également du fait que le cultivar est prétraité (stimulé) deux jours auparavant ou non. La stimulation des deux variétés aurait permis d'accroître la croissance des plantes et de minimiser les zones de lésion d'infection, ainsi que l'accumulation

en composées phénoliques qui sont bien plus élevées comparées aux plantes non prétraitées. L'efficacité de l'acide salicylique et méthyl-Jasmonate dans l'induction des réactions de défenses des plantes contre les agents pathogènes est démontrée avec différents pathosystèmes (Cueto-Ginzo et al., 2016), mais des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer quels composés phénoliques sont les plus actifs contre les infections bactériennes chez la pomme de terre. D'après, Ruelas et al., (2006), l'acide chlorogénique semble être l'élément de réponse à une série de stress environnementaux, ce qui est démontré par son accumulation élevée en réponse à l'attaque de l'agent pathogène et représentant un mécanisme de défense contre cet agent. La synthèse de CGA est également induite par des blessures ou par le traitement avec un éliciteur comme observé dans le tubercule de pomme de terre (Matsuda et al., 2005). L'acide chlorogénique est présent dans le péri-derme de la pomme de terre possédant un effet toxique sur la *Streptomyces scabies*, l'organisme responsable de la gale de la pomme de terre (Vermerris et Nicholson, 2006a).

En général, il y a plus de composés de CGA dans les tubercules de cultivars résistants au pathogène que dans les tubercules de cultivars sensibles (Vermerris et Nicholson, 2006b), ce qui explique l'accumulation élevée dans la variété Red-pontiac par rapport à la variété Agata. Des études menées sur le comportement alimentaire sur *Heliothis zea*, un vers de fruits de la tomate et sur *Spodoptera exigua*, légionnaire de la betterave ont démontré le mécanisme par lequel les composés phénoliques tels que l'acide chlorogénique fournissent une défense vis-à-vis de ces insectes (Vermerris et Nicholson, 2006b). Lors de l'interaction plante pathogène, les polyphénols oxydases qui sont séparées par compartiments de l'acide chlorogénique dans les cellules de la plante entrent en contact avec leur substrat et transforment l'acide chlorogénique en chlorogénoquinone toxique.

Cette quinone est un électrophile hautement réactif et réagira avec les groupements nucléophiles -SH et -NH₂ dans les protéines. Il en résulte la réticulation des protéines avec l'acide chlorogénique, ce qui réduit la disponibilité d'acides aminés et de protéines libres pour l'agent pathogène (Vermerris et Nicholson, 2006b). D'après, Hoffman, (2003), l'acide chlorogénique pourrait être rapidement mobilisé pour conduire, à partir de l'acide caféique libéré, aux dérivés hydroxycinnamiques notamment lors de la réaction d'hypersensibilité (RH) de *Nicotiana tabacum*, induite par le VMT à de nombreux composés phénoliques qui s'accumulent à proximité du site d'infection. Parmi ces molécules, on retrouve les différentes isoformes de CGA et des esters quiniques d'acide férulique et d'acide *p*-coumarique et d'acide gallique.

L'accumulation des composés phénoliques étudiés dans les deux cultivars de pomme de terre, en général, accroit lorsque le milieu contient des hormones liées au stress : L'acide salicylique et méthyl-jasmonate ainsi que l'éliciteur tel le chitosane. En revanche, la production de phénol décroît dans les plantes non traitées après l'inoculation avec l'une des deux souches de *Pectobacterium*. Les taux les plus élevés de l'acide chlorogénique sont obtenus dans les plantes de Red-Pontiac, tandis que l'accumulation de l'acide *p*-coumarique, d'acide caféique et de l'acide férulique sont plus élevés dans la variété Agata. Une corrélation positive est trouvée entre ces trois composés phénoliques : l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique (tableau 1, 2).

Les résultats obtenus indiquent que dans les plantes Red- Pontiac stimulées par le Méthyl-jasmonate ou par le chitosane ou par l'acide salicylique ont un rôle dans l'activation de la voie shikimique, la formation de phénylpropanoïde et la voie de l'acide benzoïque dans une mesure similaire puisque les acides férulique et le *p*-coumarique et le Pyrocatechol ont enregistré des augmentations à des taux similaires en T2, bien que le contenu final est différent T5.

En ce qui concerne les paramètres de croissance, il existe un coefficient de corrélation élevé avec l'acide *p*-coumarique pour la variété Agata (tableau 2) et un coefficient de corrélation inférieur pour Red-Pontiac (tableau 1). En revanche, un coefficient très élevé entre les paramètres de croissances et l'acide férulique pour la variété Red-Pontiac est trouvé.

La voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique dépend de la synthèse précédente des acides *p*-coumarique, caféique et férulique (Figure 44). La production de l'acide chlorogénique est probablement plus rapide ou plus favorisée chez la variété Red-pontiac que la variété Agata. Les étapes de biosynthèse précédentes étant plus actives que chez Agata où elles peuvent être plus restrictives. La faible augmentation générale de l'accumulation de l'acide caféique lorsque les plantes sont prétraitées par les trois éliciteurs peut être due à la formation élevée de l'acide chlorogénique puisque cet acide caféique est transformé en caféoyl-CoA (Koshiro et al., 2007) pendant la formation de l'acide chlorogénique (voir synthèse CGA). La forte corrélation entre les niveaux des trois intermédiaires phénoliques et l'acide chlorogénique dans les deux cultivars (tableaux 1, 2) corroborerait cette explication.

<i>Agata</i>	<i>GAL</i>	<i>CGA</i>	<i>PYR</i>	<i>CAF</i>	<i>P_COM</i>	<i>FRU</i>	<i>QRC</i>	Taille	Poids	Feuilles
<i>GAL</i>	1									
<i>CGA</i>	0.42**	1								
<i>PYR</i>	0.32*	0.69***	1							
<i>CAF</i>	0.46**	0.56**	0.57**	1						
<i>P_COM</i>	0.30*	0.57**	0.07	0.29*	1					
<i>FRU</i>	0.35*	0.17	0.29*	0.25	0.03	1				
<i>QRC</i>	0.40**	0.43**	-0.02	0.41**	0.51**	0.17	1			
Taille	0.56**	0.38*	0.04	0.21	0.64***	0.03	0.52**	1		
Poids	0.54**	0.46**	0.09	0.15	0.72***	0.14	0.56**	0.88***	1	
Feuilles	0.59**	0.33*	-0.03	0.03	0.55**	0.03	0.27	0.71***	0.73***	1

Tableau 1 : tableau de corrélation entre les paramètres de croissance et paramètres physiologiques pour la plante Agata. En rouge : corrélation positive. En noir pas de corrélation. Corrélations significatives marquées à $p < ,05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

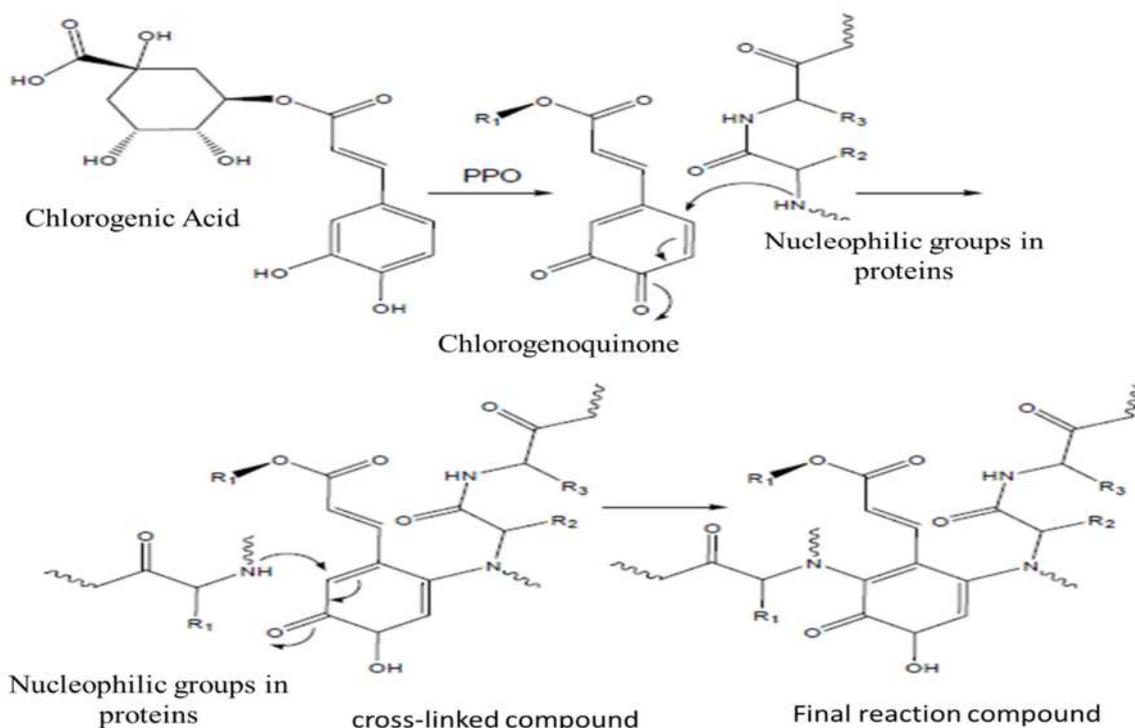


Figure 44 : Oxydation de l'acide chlorogénique (Vermerris et Nicholson. 2006b) par la polyphénoloxydase (PPO), entraînant chlorogénoquinone, qui peut réagir avec les groupes nucléophiles dans les protéines pour donner le composé intermédiaire (the cross-linked compound), qui peut réagir avec une autre molécule de protéine pour donner le compose finale (protéines inactives). R représente le résidu quinate tandis que R1 et R2 indiquent différents résidus d'acides aminés.

Cependant, comme les acides *p*-coumarique, férulique et caféique sont également impliqués dans la production de lignine (Mahesh et al, 2007 ; Steck, 1968), il est nécessaire d'en savoir plus sur le métabolisme de ces composés dans nos conditions expérimentales pour confirmer cette possibilité. Zhou et al, (2018) ont également montré que l'acide salicylique et l'oligochitosane induisent des activités significativement plus élevées des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides phénoliques et de la lignine dans les agrumes inoculés avec des spores de champignons au bout de quelques jours réduisant, ainsi, l'incidence de l'infection et le diamètre des lésions.

<i>RP</i>	<i>GAL</i>	<i>CGA</i>	<i>PYR</i>	<i>CAF</i>	<i>P_COM</i>	<i>FRU</i>	<i>QRC</i>	Taille	Poids	Feuilles
<i>GAL</i>	1									
<i>CGA</i>	0.70***	1								
<i>PYR</i>	0.45*	0.10	1							
<i>CAF</i>	0.59**	0.75***	0.12	1						
<i>P_COM</i>	0.82***	0.60**	0.55**	0.55**	1					
<i>FRU</i>	0.80***	0.56**	0.57**	0.47*	0.77***	1				
<i>QRC</i>	0.32*	0.13	0.37*	0.14	0.32*	0.52**	1			
Taille	0.48*	0.49*	0.13	0.58**	0.30*	0.58**	0.46*	1		
Poids	0.56**	0.59**	0.32	0.68**	0.53**	0.50**	0.35*	0.57**	1	
Feuille	0.34*	0.27	0.24	0.41*	0.23	0.38*	0.32*	0.64**	0.58**	1

Tableau 2 : tableau de corrélation entre les paramètres de croissance et les paramètres physiologiques pour la plante Red-Pontiac. En rouge : corrélation positive. En noir pas de corrélation. Corrélations significatives marquées à $p < 0,05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

D'autre part, l'étape de l'hydroxylation convertissant l'acide cinnamique en acide *p*-coumarique est activé à un degré similaire par le chitosane et l'acide salicylique chez Agata et Red-Pontiac car l'augmentation de l'acide *p*-coumarique dans chaque cultivar n'est pas significativement différente après la stimulation (Figure 30e). Cependant, Agata avait des niveaux constitutifs de ce composé significativement plus élevés que dans le Red-Pontiac. De plus, les niveaux de l'acide *p*-coumarique chez les plantes d'Agata traitées avec le chitosane ou l'acide salicylique et infectées par *Pa*-5889 ne sont que légèrement inférieures (116 $\mu\text{g/g ms}$ et 109 $\mu\text{g/g ms}$ respectivement) à celles des plantes élicités non inoculées. Pour Red-Pontiac, l'infection par *Pa*-5889 et *Pc*-5890 ont entraîné une nette diminution de l'acide *p*-coumarique par rapport aux plantes élicités non inoculées. Chez les plantes Agata non élicitées, l'inoculation

avec l'une des souches bactériennes induit une diminution de tous les composés phénols cibles, ce qui indique une défaillance de résistance aux deux souches bactériennes. Un effet similaire est également observé chez la variété Red-Pontiac non traités après infection par Pc-5890. Cependant, l'inoculation avec *Pa*-5889 a entraîné une augmentation de 30% de la pyrocatechol, dû à l'acide caféique et de teneur en quercétine presque quatre fois plus élevés que dans les plantes non-inoculées aux 5 jours de culture.

En effet, les taux de quercétine sont nettement plus élevés chez les Red-Pontiac prétraités que chez les plantes Agata, ce qui indique l'activation de la voie des flavonoïdes dans la variété Red-Pontiac. Cette grande réponse métabolique de Red-Pontiac à la souche bactérienne *Pa*-5889 suggère une résistance plus élevée. Les agents pathogènes sécrètent des acides organiques pour faciliter leurs colonisations des tissus des plantes. Cette dernière produit des substances pectiques susceptibles d'hydrolysées les enzymes pectolytiques sécrétées par la bactérie ou le champignon (Reddy et al., 2000).

La résistance des plantes aux attaques d'agents pathogènes s'exprime généralement par le nombre réduit de sites infectés, la gravité de la maladie (Dann et Deverall, 2000) et l'accumulation accrue de métabolites secondaires tels que les phytoalexines (Verhagen et al., 2010).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE II

CONCLUSION

IV. Conclusion

L'infection par la souche *Pc-5890* a eu un effet plus négatif sur les cultivars de pomme de terre que *Pa-5889*, précisément, en ce qui concerne la croissance des plantes. Par conséquent, certains des composés phénoliques étudiés se sont accumulés à des niveaux plus élevés que d'autres dans les plantes infectées par *Pa-5889*. Compte tenu de tous les résultats, y compris de la capacité de croissance et de l'accumulation phénolique dans les plantes prétraitées et non prétraitées après une infection bactérienne, Red-Pontiac a produit une réponse métabolique plus grande contre l'infection à *Pectobacterium* qu'Agata, entraînant une plus grande résistance contre les agents pathogènes. La souche *Pc-5890* est plus virulente que *Pa-5889*.

L'amélioration de la croissance et de la santé des plantes prétraitées après l'infection suggère que les réponses de défense des plantes de pomme de terre peuvent être efficacement augmentées par un traitement avec des éliciteurs de biosynthèse et l'accumulation des métabolites secondaires. Parmi les composés étudiés, l'acide salicylique est le plus efficace en termes d'induction de synthèses des composées phénoliques.

Les données obtenues suggèrent que l'acide salicylique joue un rôle clé dans la défense des plants de pomme de terre contre les pathogènes *Pectobacterium*. Bien que les niveaux de ce composé après élicitation (à l'exclusion du traitement par SA) et/ou l'inoculation par l'agent pathogène ne soient pas quantifiés, il serait d'un grand intérêt de quantifier les niveaux à l'avenir et de mesurer d'autres composés clés impliqués dans la défense des plantes contre les agents pathogènes. Bien que MeJa soit également efficace à cet égard, son impact négatif sur les paramètres de croissance constitue un inconvénient majeur pour les applications pratiques. Une telle stratégie pourrait constituer la base d'une solution contre les agents pathogènes des cultures de pommes de terre car elle constitue un système respectueux de l'environnement et susceptible de limiter l'utilisation de pesticides ayant des effets agressifs sur celui-ci.

CONCLUSION GÉNÉRAL

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude réalisée sur l'induction des réactions de défense est effectuée sur des plants de pomme de terre (variétés Red-pontiac et Agata) et de suspension cellulaire (seul la variété Agata est testée). L'étude comparative des effets des éliciteurs sur la croissance, l'induction de la PAL et la synthèse de composé phénolique nous conduit à tirer les conclusions suivantes :

- ✓ L'analyse des paramètres de croissance dans la présente étude n'a révélé aucune toxicité des produits utilisés comme éliciteurs sur les plants ou sur les suspensions cellulaires de pomme de terre, à l'exception de MeJa qui inhibe temporairement et légèrement la croissance des plants de pomme de terre. Les deux autres éliciteurs (Chitosane et acide salicylique) et l'extrait des LPS bactérienne se sont avérés bénéfiques pour la croissance.
- ✓ L'association de l'éliciteur à l'infection par le *pectobacterium* où l'extrait bactérienne induit des teneurs élevées en composés phénoliques et une meilleure résistance à l'infection.
- ✓ Lorsque les plants élicités sont infectés par le *pectobacterium* spp, nous apercevons une réponse de résistance au pathogène intense et accrue au niveau d'accumulation de composés phénolique. Elle est de même chez les suspensions cellulaires avec une augmentation de l'activité PAL qui accompagne le traitement par le LPS bactérienne.

Perspectives.

- ✓ L'examen de meilleures façons d'incorporer ces produits naturels dans les stratégies de lutte intégrée contre les ravageurs reste à poursuivre dans de nombreuses grandes cultures. Celles-ci conduiront à la conception d'applications/formulations spécifiques adaptées à divers stades de croissance et de développement des plantes afin d'obtenir un meilleur contrôle d'une maladie spécifique ou d'un complexe de maladies cohabitantes.
- ✓ D'un point de vue plus général, des analyses approfondies des réponses aux éliciteurs devraient permettre d'identifier leurs cibles moléculaires.
- ✓ L'intégration des différentes approches menées avec différents éliciteurs et extraits bactériennes (LPS), devraient contribuer à définir les bases génétiques et moléculaires du phénomène de stimulation de défense.
- ✓ Dans le souci de la protection de l'environnement, il est recommandé de faire des tests de biodégradabilités de l'acide salicylique, du chitosane et de méthyl-jasmonate dans le

CONCLUSION GÉNÉRALE

sol afin de préserver la nature ainsi que le produit (rendement et qualité des produits alimentaires).

Ce travail a permis de tester une nouvelle approche d'étude des phénomènes d'induction de la réaction de défense chez la pomme de terre et de démontrer l'importance de l'activité de la PAL et les composées phénoliques dans la résistance aux *pectobacteriums* spp et la biosynthèse de composés phénoliques.

RÉFÉRENCES

Références

1. **Adam A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non-pathogènes, Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique, p 165.
2. **Ahoussi A.M. (2012).** Etude des facteurs ecologiques influençant la croissance et le développement des *Pectobacterium* spp. infectant les tubercules de pomme de terre. Thèse Doctorat ; Gembloux agro-bio tech. Université wallonie-europe université de Liège. p110.
3. **Ahuja I., Kissen R., Bones Atle M. (2012).** Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* 17(2):73-90.
4. **Alavanja M.C.R., Hoppin J.A., Kamel F. (2004).** Health effects of chronic pesticide exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health.* 25:155–97.
5. **Alignan M. (2006).** Phoma du tournesol : Déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. P 297.
6. **Amelot N. (2010).** Couplage entre signalisation calcique et modulation du transcriptome en réponse à la cryptogéine chez des cellules de tabac. Thèse doctorat. Université de Toulouse III. p 375.
7. **Astier J. (2011).** Identification et étude du rôle des protéines cibles du monoxyde d'azote (NO) dans les réponses de défense chez le tabac. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne, 235 ; 11-12.
8. **Aurousseau P., Gascuel-Oudoux C., Squidant H. (1998).** Eléments pour une méthode d'évaluation d'un risque parcellaire de contamination des eaux superficielles par les pesticides. *Etude et gestion des sols.* 5 (3) : 143-156.
9. **Babenko L.M., Smirnov O.E., Romanenko K.O., Trunova O.K., Kosakivska I.V. (2019).** Phenolic compounds in plants: biogenesis and functions. *Ukr Biochem J,* (91): 3: 5-18.
10. **Baenas, N., Garcia-Viguera C., Moreno D.A. (2014).** Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules* 19: 135141–13563.
11. **Balmer D. et Mauch-Mani B. (2012).** Plant hormones and metabolites as universal vocabulary in plant defense signaling. In: Witzany G, Baluška F (eds) *Biocommunication of plants. Signaling and communication in plants.* Springer, Berlin, 37–50.
12. **Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N. (2012).** Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi, *Biotechnol Lett.* 34:1983–1990.
13. **Barros, J., Serk, H., Granlund, I. et Pesquet E. (2015).** The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany.* 115: 1053-1074.

14. **Beaulieu C. (2007).** Les effets multiples du chitosane. *Phytothérapie* ; 5:38.
15. **Ben-Zioni A., Itai C., Vaadia Y. (1967).** Water and salt stress, kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. *Plant Physiol* 42:361–365.
16. **Benhamou N. et Rey P. (2012a).** Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection* ; 92 :1-17.
17. **Benhamou N. et Rey P. (2012b).** Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. II. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection* ; 92 : 24-35.
18. **Bernhards U. (1998).** La pomme de terre *Solanum tuberosum* L. Monographie. Institut biotechnologies de la multiplication végétative. Cahiers Agricultures. *Biotechnology and Forestry*: 7 :447-458.
19. **Blanchard A. et Limache F. (2005).** Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). Institut national agronomique paris-grignon. pp.18. hal-01857661.
20. **Boerjan W., Ralph J., Baucher M. (2003).** Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:519–46.
21. **Boller T. et Felix G. (2009).** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379-406.
22. **Bonas U. et Lahaye T. (2002).** Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology*, 5:44–50.
23. **Bonfill M., Mangas S., Moyano E., Cusido R.M., Palazon J. (2011).** Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 104:61–67.
24. **Bouarab K. (2000).** Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus* *Acrochaete operculata*. Thèse de doctorat : *Biochimie, Biologie Moléculaire*. Paris 6. Français.
25. **Bragard C., Caciagli P., Lemaire O., Lopez-Moya J.J., MacFarlane S., Peters D., Susi P., Torrance L. (2013).** Status and Prospects of Plant Virus Control through Interference with Vector Transmission. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51(9): 1-5.
26. **Çalışkan M.E., Caliskan S., Arıoğlu H. (2004).** Effects of Presprouting and Planting Date on Growth and Yield of Potato Crop in a Mediterranean Type Environment. Conference: Agronomy Section Meeting of the European Association for Potato Research At: Mamaia, Romania. p: 189-196.
27. **Castrillón-Arbeláez A.P. et Délano-Frier J.P. (2016).** Secondary Metabolism in *Amaranthus* spp. A Genomic Approach to Understand Its Diversity and Responsiveness to Stress in Marginally Studied Crops with High Agronomic Potential. Book: *Abiotic and biotic stress in plants recent advances and future*

- perspectives*. Ch 8 : 185-228.
28. **Cervone F., Castoria R., Leckie F. et De Lorenzo G. (1997).** Perception of fungal elicitors and signal transduction. In Aducci, P. (ed.), *Signal Transduction in Plants*. Birkäuser Verlag, Basel, Switzerland, p: 153-177.
 29. **Charkowski A., Sharma K., Monica L.P., Secor Gary A., Elphinstone J. (2020).** Bacterial Diseases of Potato. *The Potato Crop*. Ch 10: 351-389.
 30. **Chauvin L., Caromel B., Kerlan M.C., Rulliat E., Sylvain F., Chauvin J.É., Grenier E., Ellissèche D., Mugniéry D. (2008).** La lutte contre les nématodes à kyste de la pomme de terre *Globodera Rostochiensis* et *Globodera Pallida*, *Cahiers Agricultures*, 17 (4) : 368-374.
 31. **Chen H., Jones A.D., Howe G.A. (2006).** Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Lett.* 5 (80): 2540-2546.
 32. **Cheng X.Y., Zhou H.Y., Cui X., Ni W., Liu C.Z. 2006.** Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *J. Biotechnol.* 121, 253–260.
 33. **Cherin P., Voronska E., Fraoucene N., De Jaeger C. (2012).** Toxicité aiguë des pesticides chez l'homme. *Médecine et longévité.* 4 : 68-74.
 34. **Cheung Randy C. F., Ng T.B., Wong J. H., Chan W.Y. (2015).** Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*; 13: 5156-5186.
 35. **Chevrier N. (2005),** Salicylic acid synthesis in ozone-exposed tobacco plants. *Phytoprotection.* 86: 80-85.
 36. **Chira K., Suh J.H., Saucier C., Teissèdre P. L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie.* 6: 75-82.
 37. **Claverie J., Teyssier L., Brulé D., Héloir M-C., Connat J-L., Lamotte O., Poinsot B. 2016.** Lutter contre les infections bactériennes : le système immunitaire des plantes est aussi très efficace ! *Med Sci (paris).* 32 (4) : 335-339. DOI : 10.1051/medsci/20163204008.
 38. **Colas S. (2012).** Expression spatio-temporelle de deux protéines PR du grain de raisin -Dégradation au cours de l'infection par *Botrytis cinerea*. Thèse de doctorat. Biologie et Pathologie Végétales, Université de Reims Champagne Ardenne, France. p : 382.
 39. **Coquoz J.L., Buchala A., Métraux J.P. (1998).** The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol.* 117:1095-1101.
 40. **Crang R., Lyons-Sobaski S., Wise R. (2018).** *Plant Anatomy: A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants*. P: 732.
 41. **Croteau Rodney, Kutchan Toni M., Lewis Norman G. (2000).** *Natural Products*

- (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists*. Ch 24: 1250-1318.
42. **Cueto-Ginzo A.I., Serrano L., Bostock R.M., Ferrio J.P., Rodríguez R., Arcal L., Achon M.A., Falcioni T., Luzuriaga W.P., Medina V. (2016).** Salicylic acid mitigates physiological and proteomic changes induced by the SPCP1 strain of *Potato virus X* in tomato plants. *Physiol Mol Plant Pathol*. 93:1-11.
 43. **Cusido R.M., Onrubia M., Sabater-Jara A.B., Moyano E., Bonfill M., Goossens A., Pedreño M.Angeles., Palazon J.2014.** A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology Advances*. 32 (6) : 1157-1167.
 44. **Czajkowski R., Perombelon M.C. M., Van Veen J.A., Van DerWolf J.M. (2011).** Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species. *Plant Pathology*. 60 : 999-1012.
 45. **Dadaşoğlu F. et Kotan R. (2017).** Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 27(2): 647-654.
 46. **Daneshfar A., Ghaziaskar H.S., Homayoun N. (2008).** Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *J Chem Eng Data*. 53: 776-778.
 47. **Dann E.K. et Deverall B.J., (2000).** Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathol*. 49: 324-332.
 48. **De Jong H., Sieczka J.B., De Jong W. (2011).** The Complete Book of Potatoes: What every grower and gardener needs to know. *Timber Press Portland-London*. Ch 1 : 15-22
 49. **De Werra P., Bussereau F., Kellenberger I., Dupuis B., Schaerer S., Keiser A. (2015).** Pomme de terre : l'Empire *Pectobacterium* contre-attaque. *Recherche Agronomique Suisse*. 6 (6) : 256-263.
 50. **Delaplace P. (2007).** Caractérisation physiologique et biochimique du processus de vieillissement du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Thèse de doctorat. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux. p 171.
 51. **Demianski A.J., Chung K.M., Kunkel B.N. (2012).** Analysis of Arabidopsis JAZ gene expression during *Pseudomonas syringae* pathogenesis. *Mol Plant Pathol*. 13: 46-57.
 52. **Dempsey D.A., Vlot A.C., Wildermuth M.C., Klessig D.F. (2011).** Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*, 9:e0156. doi: 101199/tab0156.
 53. **Deverall B.J. (1995).** Plant protection using natural defence systems of plants. In: Andrews JH, Tommerup IC (eds) *Advances in plant pathology. Academic Press*, London. p 211-225.
 54. **Déziel M.H., Rioux M.C., Dionne A., Dufour S., Leclerc L. (2014).** Monographie

de l'industrie de la pomme de terre au Québec. Bibliothèque et Archives nationales du Québec. ISBN 978-2-550-69167-980:p12.

- 55. Diallo S., Latour X., Groboillot A., Smadja B., Copin P., Orange N., Feuilloley M.G.J., Chevalier S. (2009).** Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *Eur J Plant Pathol.* 125: 349-354.
- 56. Dixon R.A. (2001).** Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 411: 843–847.
- 57. Djebali N. (2008).** Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. These Doctorat. L'Université Toulouse III - Paul Sabatier. p 203.
- 58. Dufour M.C. (2011).** Etude de l'efficacité des défenses de différents génotypes de *Vitis* induites par élicitation face à la diversité génétique de bioagresseurs (*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*) du gène au champ. Thèse Doctorat, Universités Bordeaux. p 299.
- 59. Durrant W.E. et Dong X. (2004).** Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 42:185–209.
- 60. Ebrahim S., Usha1 K., Singh B. (2011).** Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, eds: A. Méndez Vilas. *Formatex Research Center.* 1043-1056.
- 61. Eckardt N.A. (2008).** Chitin signaling in plants: insights into the perception of fungal pathogens and rhizobacterial strains. *Plant Cell* 20:241–243.
- 62. Eigenbrode S.D., Ding H., Shiel P., Berger P.H. (2002).** Volatiles from potato plants infected with potato leaf roll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae), *Royal Society London.* 269 : 455–460.
- 63. El Hadrami A., Adam L., Hadrami I., Daayf F. (2010).** Chitosan in Plant Protection. *Marine drugs.* 8: 968-987.
- 64. Elbetieha A., Daas S.I., Khamas W., Darmani H. (2001).** Evaluation of the Toxic Potentials of Cypermethrin Pesticide on Some Reproductive and Fertility Parameters in the Male Rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 522–528.
- 65. Erbs G., Silipo A., Aslam S., De Castro C., Liparoti V., Flagiello A., Pucci P., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A., Newman M.A., Cooper R.M. (2008).** Peptidoglycan and muropeptides from pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* elicit plant innate immunity: structure and activity. *Chem Biol.* 15: 438-448.
- 66. FAO. (2001).** Impact économiques des ravageurs des plantes et des maladies animales transfrontières. P 60. www.fao.org/3/x9800f/x9800f14.htm#TopOfPage

67. **FAO. (2009).** International year of the potato 2008: new light on a hidden treasure. <http://www.fao.org/potato-2008/en/events/book.html>.
68. **FAO. (2014).** FAO statistical databases FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org>.
69. **FAO, (2016).** FAO, statistical databases FAOSTAT.
70. **FAO. (2020).** Ravageurs et maladies des plantes. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
71. **Farmer E.E. et Ryan C.A. (1990).** Interplant communication : airborne methyl-jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 87:7713–7716.
72. **Farmer E.E., Alméras E., Krishnamurthy V. (2003).** Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol.* 6:372–378.
73. **Ferri M., Tassoni A., Franceschetti M., Righetti L., Naldrett M.J., Bagni N. 2009.** Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics* , 9, 610–624.
74. **Field R.A. (2009).** Oligosaccharide Signalling Molecules. A.E. Osbourn and V. Lanzotti (eds.), *Plant-derived Natural Products. Springer.* Ch 16: 349-360.
75. **Fraser C.M. et Chapple C. (2011).** The Phenylpropanoid pathway in *arabidopsis*. *American Society of Plant Biologists: The Arabidopsis Book.* P 1-19.
76. **Friedman M. (2004).** Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *J Chromatogr A.* 1054:143–155.
77. **Friend J., Reynolds S.B., Aveyard M.A., (1973).** Phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol.* 3:495–507. **Fernald, M. L. 1970.** Gray's manual of botany. A handbook of the flowering plants and ferns of the central and northeastern United States and adjacent Canada. 8th ed. *American Book Company,* New York. p1251.
78. **Gabriel W. (1988).** Les Carlavirus de la pomme de terre, virus M et virus S: épidémiologie et protection, *Potato Research.* 31: 667–680.
79. **Gamborg O.L. (1967).** Aromatic metabolism in plants V. The biosynthesis of chlorogenic acid and lignin in potato cell cultures. *Canadian Journal of Biochemistry.* 45 (9): 1451-1468.
80. **Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., et Pugin A. 2006.** Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *The American Phytopathological Society.* Vol. 19, No. 7, 2006, pp. 711–724. DOI: 10.1094 / MPMI -19-0711.
81. **Garcion C., Lamotte O., Cacasand J.L., Métraux J.P. (2014).** Mechanisms of

- Defence to Pathogens: Biochemistry and Physiology. Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection, Second Edition: 106-136.
- 82. Gilchrist A. et Mazzoni M.R. (2010).** Traditional GPCR Pharmacology and Beyond. Signal Transduction: Pathways, Mechanisms and Diseases, edited by A. Sitaramayya. *Springer*. Ch1 : 3-24.
- 83. Godoy-Hernández G. et Vázquez-Flota F.A. (2006).** Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion. In: Loyola-Vargas VM, Vazquez-Flota FA (eds) Methods in molecular biology: plant cell culture protocols. *Humana Press*, Totowa. p 51–58.
- 84. Hachoud S., Sanchez-Munoz R., Cusido R.M., Palazon J., Yahaoui Zaidi R., Zaidi F. (2019).** Stimulation of defense reactions in potato against *Pectobacterium* sp. *Journal of General Plant Pathology*. 85: 257-272.
- 85. Halabi M.K. (2014).** Etude de la diversité de *Pectobacterium* spp et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes. Thèse de Doctorat. Sciences agricoles. Université Paris Sud. p 218 : 46-51.
- 86. Halim V.A., Hunger A., Macioszek V., Landgraf P., Nürnberger T., Scheel D., Rosahl S. (2004).** The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and - independent defense reactions in potato. *Physiol Mol Plant Pathol*, 64: 311-318.
- 87. Halim V.A. (2006).** The Role of Salicylic Acid and Octadecanoids for Pathogen Defense in Potato. Thèse de doctorat. Faculté Mathématiques-Naturelles-Scientifiques-Techniques, Université Martin Luther Halle- Wittenberg, p72.
- 88. Hammond-Kosack K.E. et Jones J.D.G. (2000).** Responses to plant pathogens. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds) Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiology*. Rockville, pp 1102–1156.
- 89. Hanhineva K. (2008).** Metabolic Engineering of Phenolic Biosynthesis Pathway and Metabolite Profiling of Strawberry (*Fragaria x ananassa*). *C. Nat. and Environ. Sci.* 231:1-89.
- 90. Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. (2010).** Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environ Exper Bot.* 68:14-25.
- 91. Heath M.C. (2000).** Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol.* 44:321–334.
- 92. Henfling J.W.D.M. et Kuc J. (1978).** A semi-micro method for the quantification of sesquiterpenoid stress metabolites in potato tuber tissues. *Phytopathology*. 69: 609-612.
- 93. Hidangmayum A., Dwivedi P., Katiyar D., Hemantaranjan A. (2019).** Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiol Mol Biol Plants*. 25(2): 313-326.
- 94. Hoffman L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de

- l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Biologie cellulaire. Université Louis Pasteur - Strasbourg I. Français. tel-00003598.
95. **Hoysted GA, Lilley CJ, Field KJ, Dickinson M, Hartley SE, Urwin PE. (2017).** A plant-feeding nematode indirectly increases the fitness of an aphid. *Front Plant Sci.* 8:1897.
 96. **Huang H., Ullah F., Zhou D.X., Yi M., Zhao Y. (2019).** Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science.* 10: 1-10.
 97. **Hückelhoven Ralph. (2007).** Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 101-127.
 98. **Hukkanen A.T., Kokko H.I., Buchala A.J., McDougall G.J., Stewart D., Kärenlampi S.O., Karjalainen R.O. (2007).** Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. *J Agric Food Chem* 55:1862–1870.
 99. **Im H.W., Suh B.S., Lee S.U., Kozukue N., Ohnisi-Kameyama M., Levin C.E., Friedman M. (2008).** Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry in potato plant flowers, leaves, stems, and tubers and in home-processed potatoes. *J Agric Food Chem.* 56:3341–3349.
 100. **Jackson R.B., Canadell J., Ehleringer J.R., Mooney H.A., Sala O.E., Schulze E.D. (1996).** A global analysis of root distributions for terrestrial biomes. *Oecologia.* 108:389-411.
 101. **Jaleh Tahsili, Mozafar Sharifi, Naser Safaie, Sedigheh Esmailzadeh-Bahabadi & Mehrdad Behmanesh. 2014.** Induction of lignans and phenolics compounds in cell culture of *Linum album* by culture filtrate of *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Interactions.* 9:1, 412-417, DOI: 10.1080/17429145.2013.846419.
 102. **Jeandet Philippe, Clément Christophe, Courot Eri, Cordelier Sylvain. (2013).** Modulation of Phytoalexin: Biosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 14136-14170.
 103. **Jourdan Emmanuel, Ongena Marc, Thonart Philippe. (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 12(4):437 449.
 104. **Kachroo P. et Kachroo A. (2013).** The Roles of Salicylic Acid and Jasmonic Acid in Plant Immunity. *Molecular Plant Immunity*, First Edition. *Editor* Guido Sessa. Ch: 4. 55-69.
 105. **Kechid M. (2005).** Physiologie et Biotechnologie de la Microtubérisation de la Pomme de Terre *Solanum tuberosum*. L. Mémoire de Magister : Département des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri de Constantine. P: 158.

- 106. Korth K.L. et Thompson G.A. (2006).** Chemical Signals in Plants: Jasmonates and the Role of Insect-Derived Elicitors in Responses to Herbivores. Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants, Editors: Tuzun Sadik et Bent Elizabeth. Springer. Ch: 11: 259-278.
- 107. Khayi Slimane. (2015).** Génomique comparative des bactéries *Dickeya solani* et *Pectobacterium wasabiae*, pathogènes émergents chez *Solanum tuberosum*. Thèse doctorat l'université moulay ismaïl et l'université paris-saclay. 146: 18-26.
- 108. Klessig D.F, Tian M., Choi H.W. (2016).** Multiple targets of salicylic acid and its derivatives in plants and animals. *Frontiers in Immunology*. 7(206): 1-10.
- 109. Komaraiah P., Reddy G.V., Reddy S.P., Raghavendra A.S., Ramakrishna S.V., Reddanna P. (2003).** Enhanced production of antimicrobial sesquiterpenes and lipoxygenase metabolites in elicitor-treated hairy root cultures of *Solanum tuberosum*. *Biotechnology Letters*. 25: 593–597.
- 110. Koo Abraham J.K., Chung H.S., Kobayashi Y., et Howe G.A. (2006).** Identification of a Peroxisomal Acyl-activating Enzyme Involved in the Biosynthesis of Jasmonic Acid in Arabidopsis. *The Journal Of Biological Chemistry*. 44(33): 511-520.
- 111. Koshiro Y., Zheng X.Q., Wang M.L., Nagai C., Ashihara H. (2006).** Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. *Plant Science*, 171(2), 242-250.
- 112. Koshiro Y., Jackson M.C., Katahira R., Wang M.L., Nagai C., et Ashihar H. (2007).** Biosynthesis of Chlorogenic Acids in Growing and Ripening Fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* Plants. *Zeitschrift fur Naturforschung. C*. 62:731-742.
- 113. Krauss G. (2001).** G-protein Coupled Signal Transmission Pathways. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation 2^{ed} edition. *Wiley-VCH Verlag GmbH*. 173-215.
- 114. Lahouel Z. (2015).** Etude diagnostique de la filiere pomme de terre dans la region de tlemcen, Cas de deux fermes pilotes: Hamadouche et Belaidouni. Mémoire de Magister. Département des Sciences Agronomiques. Université de TLEMCEM P: 113.
- 115. Langham M.A.C. (2004).** Mechanical Inoculation of Plant Viruses. *Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises*, Edited by Trigiano Robert N., Windham Mark T., Windham Alan S. *CRC Press*. Ch5: 54-68
- 116. Lattanzio V., Lattanzio V.M.T., Cardinali A. (2006).** Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: Imperato F (ed) *Phytochemistry: advances in research*. Research Signpost, Kerala, 372: 23-67.
- 117. Lavrova V.V., Matveeva E.M., Zinovieva S.V. (2017).** Expression of genes, encoded defense proteins, in potato plants infected with the cyst-forming nematode *Globodera rostochiensis* (Wollenweber 1923) Behrens, 1975 and modulation of their

- activity during short-term exposure to low temperatures. *Biology Bulletin*. 44:128–136.
- 118. Lee M.H, Jeon H.S., Kim S.H, Chung J.H., Roppolo D., Lee H.J., Cho H.J., Tobimatsu Y., Ralph J., Park O.K. (2019).** Lignin-based barrier restricts pathogens to the infection site and confers resistance in plants. *The EMBO Journal*. e101948, 1-17.
- 119. Leendert C. van Loon, Peter A. H. M. Bakker, Walter H. W. van der Heijdt, David Wendehenne, and Alain Pugin. 2008.** Early Responses of Tobacco Suspension Cells to Rhizobacterial Elicitors of Induced Systemic Resistance. *MPMI*. 21 (12) : 1609-1621.
- 120. Léger A. (2010).** Analyse fonctionnelle d'AtMYB30, un régulateur transcriptionnel impliqué dans la mort cellulaire hypersensible chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse doctorat, université de Toulouse ; p203.
- 121. Leister R.T. et Katagiri F. (2000).** A resistance gene product of the nucleotide binding site-Leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo. *Plant J*. 22: 345–354.
- 122. Levy A., Guenoune-Gelbart D., Epel B.L. (2007).** β -1,3- Glucanases : Plasmodesmal Gate Keepers for Intercellular Communication. *Plant Signaling & Behavior*. 2(5): 404-407.
- 123. Lewis C.E. (1996).** Anthocyanins and Related Compounds in Potatoes (*Solanum tuberosum* L.). These de doctorat: University of Canterbury Christchurch, New Zealand. P 392.
- 124. Li H.P., Fischer R., Liao Y.C. (2010).** Molecular evidence for induction of phenylalanine ammonia-lyase during *Puccinia graminis* infection and elicitation in wheat. *Can. J. Plant Pathol*. 23: 286–291.
- 125. Li R., Tee C.S., Jiang Y.L, Jiang X.Y., Venkatesh P.N., Rajani S., Ye J. (2015).** A terpenoid phytoalexin plays a role in basal defense of *Nicotiana benthamiana* against Potato virus X. *Scientific Reports*. 5: 9682. DOI: 10.1038
- 126. Li Y.X., Zhang W., Dong H.X., Liu Z.Y., Zhang X.Y. (2018).** Salicylic acid in *Populus tomentosa* is a remote signalling molecule induced by *Botryosphaeria dothidea* infection. *Scientific reports*. 8:140-159.
- 127. Lim E.K., Doucet C.J., Li Y., Elias L., Worrall D., Spencer S.P., Ross J., Bowles D.J. (2002).** Arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid and other benzoates. *J Biol Chem*. 277:586–592.
- 128. Loon L.C., Bakker Peter., Pieterse Corné. (1998).** Systemic resistance induced by Rhizobacteria. Annual review of phytopathology. 36. 453-83. 10.1146/annurev.phyto.36.1.453.
- 129. Luttrell L.M. (2005).** Regulators of GPCR Activity: The Arrestins. The G Protein-Coupled Receptors Handbook edited by Lakshmi A. Devi. Ch8: 159- 198.

130. **Ma B., Hibbing M.E., Kim H.S., Reedy R.M., Yedidia Iris, Breuer J., Breuer J., Glasner J.D., Perna N.T., Kelman A., Charkowski A.O. (2007).** Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*. 97: 1150-1163.
131. **Mahesh H.M., Murali M., Anup M., Chandra P., Prasad M., Sharada M.S. (2017).** Salicylic acid seed priming instigates defense mechanism by inducing PR-Proteins in *Solanum melongena* L. upon infection with *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Physiology and Biochemistry*. 117 : 12-23.
132. **Mahesh V., Million-Rousseau R., Ullmann P., Chabrillange N., Bustamante J., Mondolot L., Morant M., Noirot M., Hamon S., De Kochko A., Werck-Reichhart D., Campa C. (2007).** Functional characterization of two *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. *Plant Mol Biol*. 64:145–159.
133. **Mahoney J.P. et Sunahara R.K. (2016).** Mechanistic insights into GPCR-G protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 41: 247–254.
134. **Malerba M., Crosti P., Cerana R. 2012.** Defense/stress responses activated by chitosan in sycamore-cultured cells. *Protoplasma*. 249 : 89–98.
135. **Mandal S. et Mitra A. (2007).** Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 201-209.
136. **Mantsebo C.C., Mazarura U., Goss M., Ngadze E. (2014).** The epidemiology of *Pectobacterium* and *Dickeya* species and the role of calcium in postharvest soft rot infection of potato (*Solanum tuberosum*) caused by the pathogens. *Journal of Agricultural Research*. 9(19):1509-1512.
137. **Marchand P.A. (2015).** Le chitosane, un SDN multifonction. *Alter Agri*. 129. 30-31.
138. **Matsuda F., Morino K., Ano R., Kuzawa M. (2005).** Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue. *Plant analysis and Cell Physiology*. 46(3): 454-466.
139. **Mattila P. et Hellstrom J. (2007).** Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J Food Compost Anal*; 20:152–160.
140. **Metcalf C.L., Flint W. P. (1962).** Destructive and useful insects. Their habits and control. 4th edition. *McGraw-Hill Book*. 108.
141. **Miedes E., Vanholme R., Boerjan W., Molina A. 2014.** The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci*. 5: 358-371.|
142. **Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. (2007).** CERK1 a LysM receptor kinase is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 104:19613–19618.

143. **Moerschbacher B.M. (2002).** The Plant Cell Wall—Structural Aspects and Biotechnological Developments. *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* Edited by Oksmah-Caldentey Kirsi-Marja and Barz Wolfgang H. *Marcel Dekker*, ch19: 452-482.
144. **Mosher R.A., Durrant W.E., Wang D., Song J., Dong X. (2006).** A comprehensive structure-function analysis of Arabidopsis SN11 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *Plant Cell*. 18:1750–1765.
145. **Mostafa M.H. (2018).** Elicitation of phytoalexin rishitin in potato tuber slices infected by fusarium spp., does it consider a factor of pathogenicity? *Int. J. Phytopathol.* 07 (02) 2018. 53-61.
146. **Mueller M.J. 1998.** Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. *Chimistry & biology*. 5: 323-333
147. **Murashige T. et Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473–497.
148. **Nagy Z.Á., Kátay G., Gullner G., Ádám A.L. (2016).** Evaluation of TMV Lesion Formation and Timing of Signal Transduction during Induction of Systemic Acquired Resistance (SAR) in Tobacco with a Computer- Assisted Method. Abiotic and biotic stress in plants -Recent advances and future perspectives edited by arun k. Shanker and chitra shanker. *InTech*. Ch 15: 363- 372.
149. **Nandeeshkumar P., Sudisha J., Ramachandra Kini K., Prakash H.S., Niranjana S.R., Shekar Shetty H. 2008.** Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72 :188–194
150. **Newman M.A., Dow J.M., Molinaro A., Parrilli M. (2007).** Priming induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Plant Immun.* 13:69–84.
151. **Newman M. A., Sundelin T., Nielsen J.T., Erbs G. (2013).** MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in plant science*, 4, 139-153.
152. **Nge K.L., New N., Chandrkrachang S., Stevens W.F. (2006).** Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Sci*. 170:1185–1190.
153. **Onrubia M., Moyano E., Bonfill M., Expósito O., Palazon J., Cusido R.M. (2008).** An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: the role of *txs* and *bapt* gene expression. *Biochem Eng J*. 53:104–111.
154. **Ouanas S., Hamelin G., Hervet M., Andrivon D., Val F., Yahiaoui-Zaidi R. (2017).** Protection against bacterial soft rot by olive extracts is related to general defence induction in potato tubers. *Plant Pathol*. 66:404–411.
155. **Ouchemoukh S., Hachoud S., Boudraham H., Mokrani A., Louaileche H. 2012.** Antioxidant activities of some dried fruits consumed in Algeria. *LWT - Food*

- Science and Technology. 49. 329-332. 10.1016/j.lwt.2012.07.022.
156. **Padda M.S. et Picha D.H. (2008).** Phenolic composition and antioxidant capacity of different heat-processed forms of sweetpotato cv. 'Beauregard'. *Int J Food Sci Tech.* 43:1404–1409.
 157. **Pajerowska-Mukhtar K. et Parker J. (2005).** Potato Homologs of Arabidopsis thaliana Genes Functional in Defense Signaling-Identification. *Genetic Mapping, and Molecular Cloning. MPMI* ; 18 (10):1107-1119.
 158. **Pajot E. (2011).** Stimulateurs des Défenses Naturelles des plantes : états des lieux et perspectives de recherche et développement pour sécuriser leur efficacité sur le terrain. *Association Française de Protection des Plantes (AFPP)*. 342- 352.
 159. **Panda P. (2014).** The role of genomic islands in virulence of Pectobacterium carotovorum subspecies brasiliensis on potatoes. Degree of Doctor. Lincoln University. p243.
 160. **Papagiannopoulos M., Wollseifen H.R., Mellenthin A., Haber B., Galensa R. (2004).** Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UVESI/ MSn. *J Agric Food Chem.* 52:3784–3791.
 161. **Park C.H., Kim S., Park J.Y., Ahn I.P., Jwa N.S., Im K.H., Lee Y.H. (2004).** Molecular characterization of a pathogenesis-related protein 8 gene encoding a class III chitinase in rice. *Molecules and cells.* 17(1):144-150.
 162. **Pathan M.S., Nguyen H.T., Subudhi P.K., Courtois B. (2004).** Molecular dissection of abiotic stress tolerance in sorghum and rice. In: Nguyen HT, Blum A (eds) Physiology and biotechnology integration for plant breeding. *Marcel Dekker*, NY, pp 525–570.
 163. **Petersen M., Hans J., Matern Ulrich. (2010).** Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. Annual Plant Reviews. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition.* 40: 182–257.
 164. **Pieterse Corné M.J. et Van Loon L.C. (1999).** Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4:52–58.
 165. **Pieterse Corné M.J et Van Loon L.C. (2004).** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology.* 7(4): 456-464.
 166. **Pitman A.R., Harrow S.A., Visnovsky S.B. (2009).** Genetic characterisation of Pectobacterium wasabiae causing soft rot disease of potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology.* 126: 423–435.
 167. **Pourcel L. et Grotewold E. (2009).** Participation of phytochemicals in plant development and growth. In: Osbourn AE, Lanzotti V (eds) Plant-derived natural products: synthesis, function, and application. *Springer*, Dordrecht, pp 269–279.
 168. **Trotel-Aziz P., Couderchet M., Vernet G., Aziz Aziz. 2006.** Chitosan

- Stimulates Defense Reactions in Grapevine Leaves and Inhibits Development of Botrytis Cinerea. *Eur J Plant Pathol.* 114: 405–413.
169. **Pruski K., Astatkie T., Nowak J. (2002).** Jasmonate effects on *in vitro* tuberization and tuber bulking in two potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) under different media and photoperiod conditions. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 38:203–209.
170. **Ramirez-Estrada K., Vidal-Limon H., Hidalgo D., Moyano E., Golenioswki M., Cusidó R.M., Palazon J. (2016).** Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive highadded value compounds in plant cell factories. *Molecules* 21:182.
171. **Ramiro D. (2009).** caracterisation des mecanismes de resistance impliquees dans les reponses du cafeier (*coffea arabica*) a l'agent de la rouille orangee (*Hemileia vastatrix*). These doctorat. *Geosciences, Hydrosciences, Environnement.* 226 : 9-23.
172. **Ravichandra N. G. (2013).** Fundamentals Of Plant Pathology. PHI Loring Delh. Chapter 1: 1-12, P693.
173. **Reddy M.V.B., Angers P., Castaigne F., Arul J. (2000).** Chitosan effects on blackmold rot and pathogenic factors produced by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes. *J Am Soc Hortic Sci* 125:742–747.
174. **Reichling J. (2009).** Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Annual plant reviews.* 39: 214–347.
175. **Reitz M., Rudolph K., Schroder I., Hoffmann-Hergarten S., Hallmann J., et Sikora R. A. 2000.** Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* Strain G12 Act in Potato Roots as an Inducing Agent of Systemic Resistance to Infection by the Cyst Nematode *Globodera pallida*. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(8): 3515–3518.
176. **Rendina N., Nuzzaci M., Scopa A., Cuypers A., Sofò A., (2019).** Chitosan-elicited defense responses in Cucumber mosaic virus (CMV)-infected tomato plants. *Journal of Plant Physiology ;* 234–235 : 9–17.
177. **Rinaudo M. (2006).** Chitin and chitosan: properties and applications. *Progr Polym Sci* 31:603–632.
178. **Rocher F. (2004).** Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation du systémier phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense. Thèse de doctorat. Université de Poitiers. p151.
179. **Rouffiange J., Gerardin D., Riot G., Thévoz E., Kellenberger I., Schaerer S., Dupuis B. (2014).** Sensibilité de la pomme de terre à la maladie de la jambe noire provoquée par *Dickeya* spp. *Recherche Agronomique Suisse*, 5 (3): 96–103.
180. **Rousselle P., Robert Y., Crosnier J.C. (1996).** La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. Paris : INRA Editions. P605.

181. **Ruelas C., Tiznado-Hernandez M., Sanchez-Estrada A., Robles-Burgueno M. (2006).** Changes in phenolic acid content during *Alternaria alternata* in tomato fruit. *Journal of Phytopathology*, 154:4: 236-244.
182. **Salachna P. et Zawadzińska A. (2014).** Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *J Ecol Eng.* 15:97–102.
183. **Sanmartín N., Pastor V., Pastor-Fernández J., Flors V., Jose Pozo M., Sánchez-Bel P. (2020).** Role and mechanisms of callose priming in mycorrhiza-induced resistance. *Journal of Experimental Botany.* 71(9): 2769–2781.
184. **Samson R. Legendre J.B., Christen R., Fischer-Le S.M., Achouak W., Gardan L. (2005).** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al., 1953) Brenner I. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1415-1427.
185. **Sarfraz S., Sahi Shahbaz T., Oulghazi S., Riaz K., Rajput Nasir A., Atiq M., Tufail M.R., hameed A., faure D. (2020).** Species Diversity of *Dickeya* and *Pectobacterium* Causing Potato Blackleg Disease in Pakistan. *Plant Disease*, 104:5, 1492-1499.
186. **Sathiyabama M., Akila G. and Einstein Charles R. 2014.** Chitosan-induced defence responses in tomato plants against early blight disease caused by *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Sorauer. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 47(16) : 1963-1973
187. **Schulman Alan H. (2002).** Transgenic Plants As Producers Of Modified Starch And Other Carbohydrates. *Plant biotechnology and transgenic plants*, Edited by oksmah-caldentey kirsi-marja and Barz Wolfgang h. Marcel Dekker, Inc. chapter 11: 247-275.
188. **Scurrah Maria I., Niere B., Bridge J. (2005).** Nematode Parasites of Solanum and Sweet Potatoes. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 2nd Edition (eds M. Luc, R.A. Sikora, J. Bridge). Ch : 6 : 193-220.
189. **Seo Shigemi, Ishizuka Kozo, Ohashi Yuko. (1995).** Induction of Salicylic Acid β -Glucosidase in Tobacco Leaves by Exogenous Salicylic Acid. *Plant and Cell Physiology.* 36 (3): 447–453.
190. **Serk H. (2015).** Cellular Aspects of Lignin Biosynthesis in Xylem Vessels of *Zinnia* and *Arabidopsis*. *Umeå Plant Science Centre.* P99.
191. **Sharma, S., Gupta, N. 2020.** Defense signaling in plants against micro-creatures. *Indian Phytopathology.* 73: 605–613. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00249-4>.
192. **Silverman P., Seskar M., Kanter D., Schweizer P., Métraux J.P., Raskin I. (1995).** Salicylic Acid Biosynthesis, Conjugation, in Rice and Possible Role. *Plant Physiol.* 108: 633-639

193. **Singh R., Tiwari Jagesh K., Sharma V., Singh B.P., Rawat S. (2014).** Role of Pathogen related protein families in defence mechanism with potential role in applied biotechnology. *International Journal of Advanced Research*. 2 (8): 210- 226.
194. **Smith C.M. et Boyko E.V. (2007).** The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: Current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 122: 1-16.
195. **Smirnov S., Shulaev V., Tumer N.E. (1997).** Expression of pokeweed antiviral protein in transgenic plants induces virus resistance in grafted wild-type plants independently of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related protein synthesis. *Plant Physiol*. 114: 1113–1121.
196. **Spooner D.M. et Knapp S. (2013).** *Solanum stipuloideum* Rusby, the Correct Name for *Solanum circaeifolium* Bitter. *American Journal of Potato Research*. 90:301–305.
197. **Staswick P.E., Tiryaki I. (2004).** The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell*. 16:2117–2127.
198. **Steck W. (1968).** Metabolism of cinnamic acid in plants: chlorogenic acid formation. *Phytochemistry*. 7:1711–1717.
199. **Sudisha J., Sharathchandra R.G., Amruthesh K.N., Kumar A., Shekar Shetty H. (2012).** Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response, Plant Defence: Biological Control, Progress in Biological Control. 12: 379-402.
200. **Taiz L. et Zeiger E. (2002).** *Plant physiology*, 3rd edn. Sinauer, Sunderland. P 675.
201. **Thomas C. (2019).** Interactions entre résistance induite chez *Solanum tuberosum* et traits d’histoire de vie et effecteurs de *Phytophthora infestans*. These de doctorat. Université de Rennes 1, P217.
202. **Thordal-Christensen H. (2009).** Vesicle trafficking in plant pathogen defence. In: Baluška F, Mancuso S (eds) *Signaling in plants*. Springer, Berlin, pp 287– 301.
203. **Torres, M. A., Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006.** Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol*. 141:373-378.
204. **Ueker Marly E., Silva Vivianne M., Moi Gisele P., Pignati Wanderley A., Mattos Ines E., Cândido Silva A.M. (2016).** Parenteral exposure to pesticides and occurrence of congenital malformations: hospital-based case–control study. *BMC Pediatrics*. 16:125.
205. **Uppalapati S.R., Ayoubi P., Weng H., Palmer D.A., Mitchell R.E., Jones W., Bender C.L. (2005).** The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant J* 42:201–217.
206. **Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Van de Heijdt W.H.W., Wendehenne D., Pugin A. (2008).** Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial

- elicitors of induced systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact.* 21:1609–1621.
- 207. Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. (2010).** Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology.* 153: 895–905.
- 208. Vanden Braber N.L., Di Giorgio L., Aminahuel C.A., Díaz Vergara L.I., Martín Costa A.O., Montenegro M.A., Mauri Adriana N. (2021).** Antifungal whey protein films activated with low quantities of water soluble chitosan. *Food Hydrocolloids* ; 110 : 106156.
- 209. Vanderhofstadt B., Bernard jouan, Rottlan Jordi Tio. (2009).** Culture de la pomme de terre en Afrique de l’ouest. Guide technique. Centre pour le Développement de l’Entreprise. *Guide technique* 79: P13.
- 210. Vanitha S.C., Niranjana S.R., S. Umesha. 2009.** Role of PAL and PPO in host resistance to bacteriam wilt of tomato. *Journal of phytopathology.* 157: 552-557.
- 211. Venkatesan J. et Kim S.K., (2010).** Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering-An Overview. *Marine Drugs,* 8 : 2252-2266.
- 212. Verhagen B.W.M., Trotel-Aziz P., Couderchet M., Hofte M., Aziz A. (2010).** *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *J Exp Bot.*61:249–260.
- 213. Vermerris W. et Nicholson R. (2006a).** Biosynthesis of Phenolic Compounds. Phenolic Compound Biochemistry. *Springer.* Ch 3: 63-149.
- 214. Vermerris W. et Nicholson Ralph. (2006b).** The role of phenols in plant defense. Phenolic Compound Biochemistry. *Springer.* Ch 6: 212-234.
- 215. Vick Brady A. And Zimmerman Don C. (1984).** Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several *Plant Species.* *Plant Physiol.* 75: 458-461.
- 216. Vidhyasekaran P. (2014a).** PAMP Signaling in Plant Innate Immunity. Signal Perception and Transduction, Signaling and Communication in Plants. *Springer Dordrecht Heidelberg New York, London.* Volume 1, **Ch 2** : 17- 164.
- 217. Vidhyasekaran P. (2014b).** Calcium Ion Signaling System: Calcium Signatures and SensorsPAMP. Signaling and Communication in Plants. *Springer Dordrecht Heidelberg New York, London.* Volume 1, **Ch4:** 207- 283.
- 218. Vidhyasekaran P. (2014c).** Reactive Oxygen Species and Cognate Redox Signaling System in Plant Innate Immunity. Signaling and Communication in Plants. Springer Dordrecht Heidelberg New York, London. Volume 1**Chapter 5,** 284-206.
- 219. Vidhyasekaran P. (2015a).** Salicylic Acid Signaling in Plant Innate Immunity. Signaling and Communication in Plants. Springer Dordrecht Heidelberg New York, London. Volume 2, Ch 2: 27-122.
- 220. Vidhyasekaran P. (2015b).** **Jasmonate Signaling System in Plant Innate Immunity.** Signaling and Communication in Plants. Springer Dordrecht Heidelberg

New York, London. Volume 2, Ch3: 122- 194.

- 221. Vierheilig, H., Alt, M., Mohr U., Boller T., et Wiemken A. (1994).** Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and β -1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *Journal of Plant Physiology* 143:337–343.
- 222. Vlot A.C., Dempsey D'Maris A., Klessig Daniel F. (2009).** Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177-206.
- 223. Walters K., et Hardwick N. (2008).** Principles of Pest and Disease Management in Crop Protection. Ed: Alford David, Black well science. Chapter 1. 1-28.
- 224. Walton J.D. (1997).** Biochemical plant pathology. In: Dey P, Harborne J (eds) *Plant biochemistry*. Academic Press, San Diego, pp 487–502
- 225. Wasternack C. et Hause B. (2013).** Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot.* 111:1021-1058.
- 226. Watanabe N. and Lam E. (2006).** The Hypersensitive Response in Plant Disease Resistance. Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants, Editors Sadik Tuzun and Elizabeth Bent. Springer. Ch : 5: 83-112.
- 227. Weinman S. et Méhul P. (2004).** Biosynthèse des aminoacides. *Toute La Biochimie. Dunod.* Ch :15 : 292-305.
- 228. Weng J.K. Chapple C. (2010).** The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist.* 187: 273–285.
- 229. Whettena R. et Sederoffa R. (1995).** Lignin Biosynthesis. *The Plant Cell.* (7) 1001-1013.
- 230. Yahiaoui-Zaidi R., Ladjouzi R., Benallaoua S. (2010).** Pathogenic variability within biochemical groups of *Pectobacterium carotovorum* isolated in Algeria from seed potato tubers. *Int J Biotechnol Mol Biol Res.* 1:001–009.
- 231. Yagi S. (2009).** Étude diagnostique de la filière pomme de terre dans les communes de Doutchi, Koré Maïroua et Soukougoutane (département de Dogondoutchi). Mémoire de Maîtrise. universite abdou moumouni de niamey Faculté des Lettres et Sciences Humaines Département de Géographie. 81:P39.
- 232. Yang J., Chen F., Yu O., Beachy, R.N. (2011).** Controlled silencing of 4-coumarate:CoA ligase alters lignocelluloses composition without affecting stem growth. *Plant Physiology and Biochemistry.* 49: 103-109..
- 233. Yinong Y., Jyoti S., Klessig Daniel F. (1997).** Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development.* 11:1621-1639.
- 234. Yao M.K., Silets H.D., Charles M.T., Boulanger R., Tweddell R.J. (2013).** Effect of mycorrhization on the accumulation of rishitin and solavetivone in potato

- plantlets challenged with *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza*. 13:333–336.
235. **Zhang B., Zheng L.P., Wang J.W. (2012)**. Nitric oxide elicitation for secondary metabolite production in cultured plant cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:455–466.
236. **Zheng J., Yang Y., Guo X., Jin L., Xiong X., Yang X., Li G. (2020)**. Exogenous SA Initiated Defense Response and Multi-signaling Pathway in Tetraploid Potato SD20. *Horticultural Plant Journal*. 6 (2): 99–110.
237. **Zheng J., Peng D., Chen L., Liu H., Chen F., Xu M., Ju S., Ruan L. Sun M. (2016)**. The *Ditylenchus destructor* genome provides new insights into the evolution of plant parasitic nematodes, *Proc. R. Soc.* 283: 09-42.
238. **Zhou Y, Ma J., Xie J., Deng L., Yao S., Zeng K. (2018)**. Transcriptomic and biochemical analysis of highlighted induction of phenylpropanoid pathway metabolism of citrus fruit in response to salicylic acid, *Pichia membranaefaciens* and oligochitosan. *Postharvest Biol Technol* 142:81–92.
239. **Zhu B., Chen T.H.H., LI P.H. (1996)**. Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta*. 198:70-77.
240. **Ziadi S. (2001)**. Les gènes PR-10 du pommier (*Malus domestica*) : identification, caractérisation et analyse de l'expression spatio-temporelle en réponse à une induction par l'acibenzolar-S-méthyl (ASM), un analogue fonctionnel de l'acide salicylique. Thèse doctorat. École doctorale de Rennes 1, France : 92.
241. **Zipfel C. (2009)**. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol*. 12:414-420.
242. **Zipfel C. (2014)**. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol*. 35: 345–351.
243. **Zipfel C. (2015)**. A new receptor for LPS. *Nature immunology*; 16 (4): 340-341.
244. **Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones Jonathan D.G. (2006)**. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell*. 125: 749-760.
245. **Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D.G., Felix G., Boller T. (2004)**. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*. 428: 764–767.

Annexes

Annexes 1

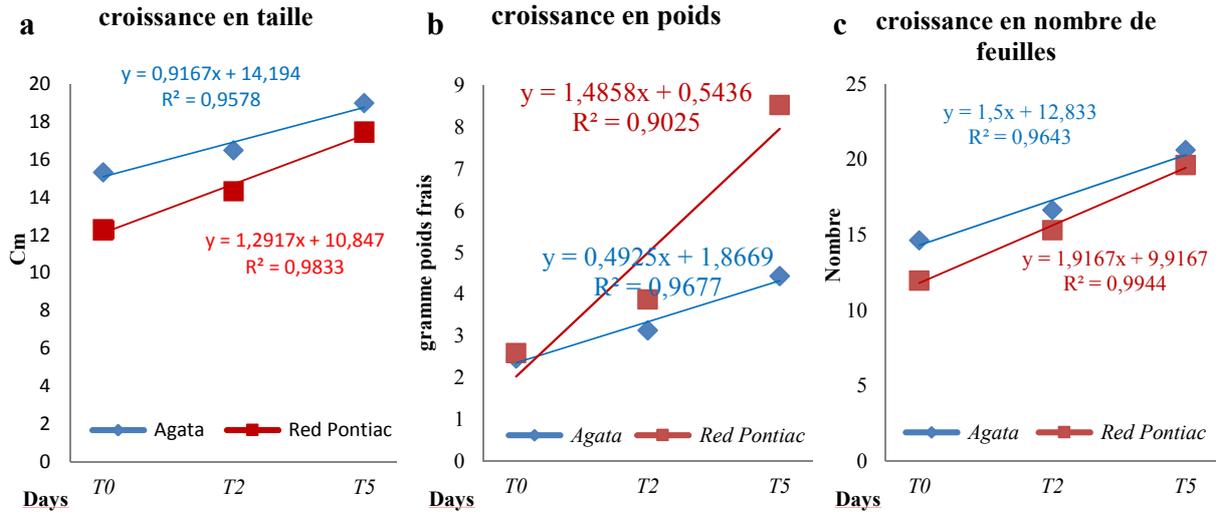


Figure 29 : évolution de la croissance dans les conditions de contrôle : a : taille, b : poids, c : nombre de feuilles

Annexes 1. Courbes d'étalonnages



LC Calibration Report

Processing Method: Polifenols_SAID_3	System: UPLC_2
Processing Method ID: 1504	Channel: 275.0nm
Date Calibrated: 29/May/14 11:26:47 CEST	Proc. Chnl. Descr.: PDA 275.0 nm

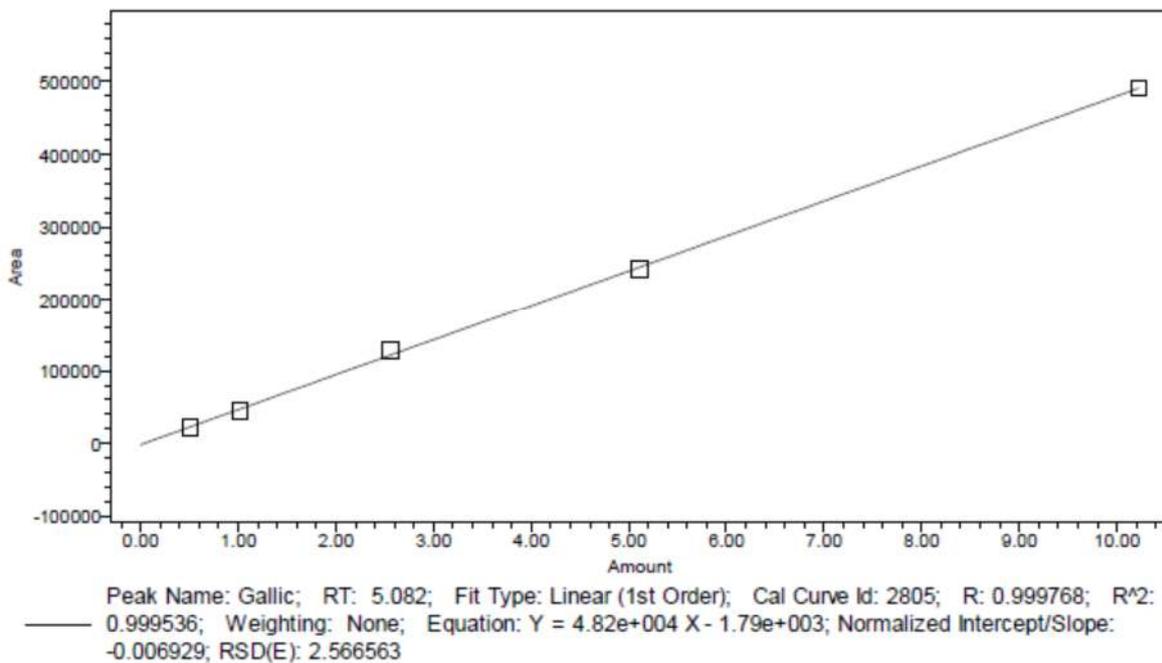


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage de GA.

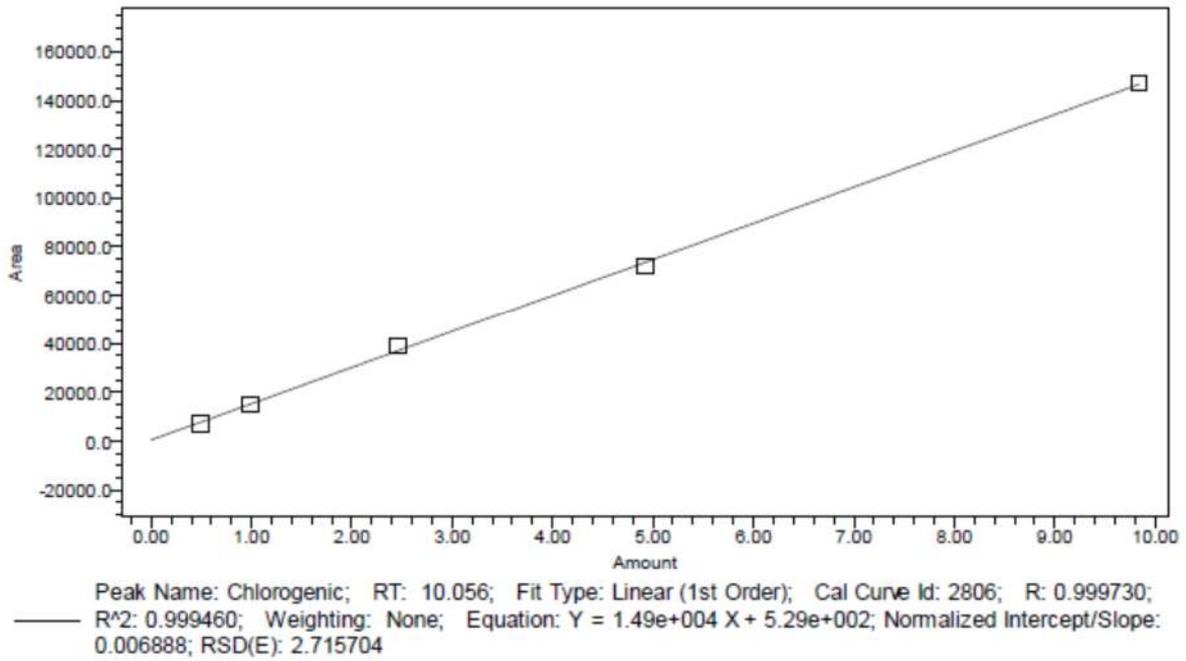


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de l'acide chlorogénique pour la quantification de CGA.

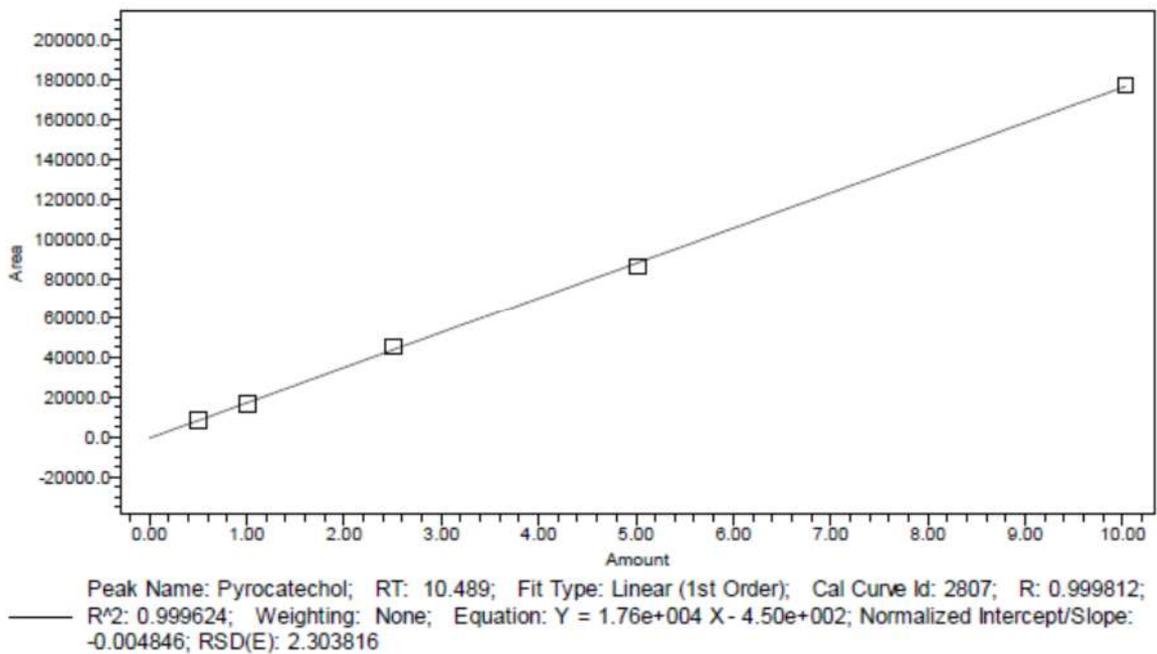


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de Pyrochatechol pour la quantification de PYR.

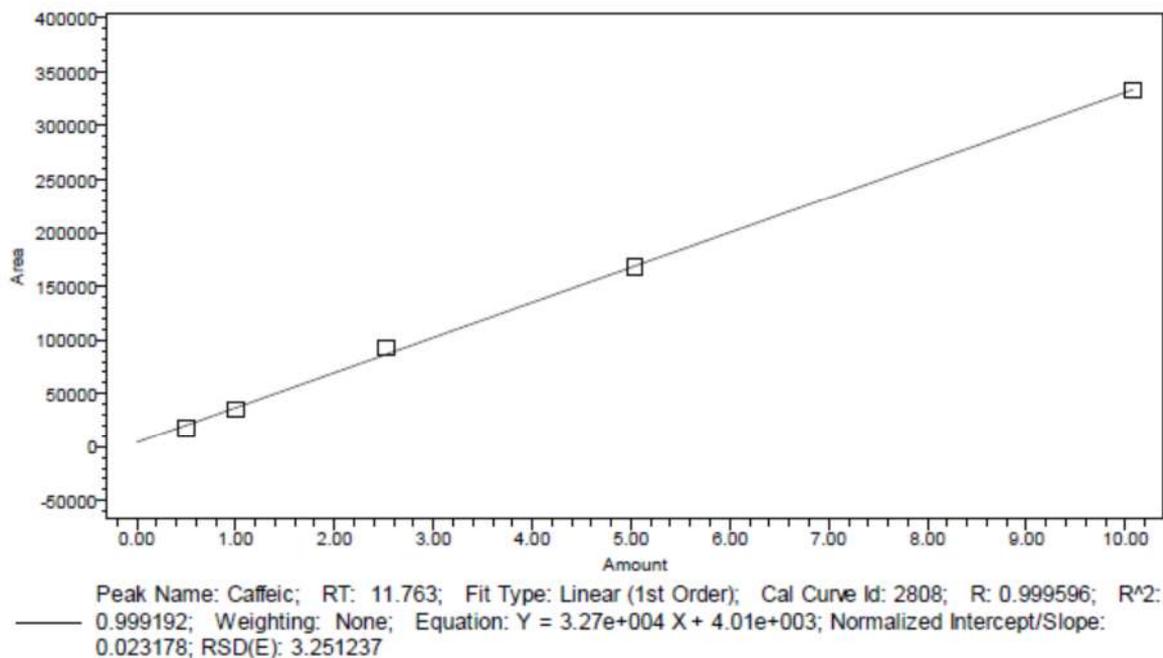


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique pour la quantification de CAF

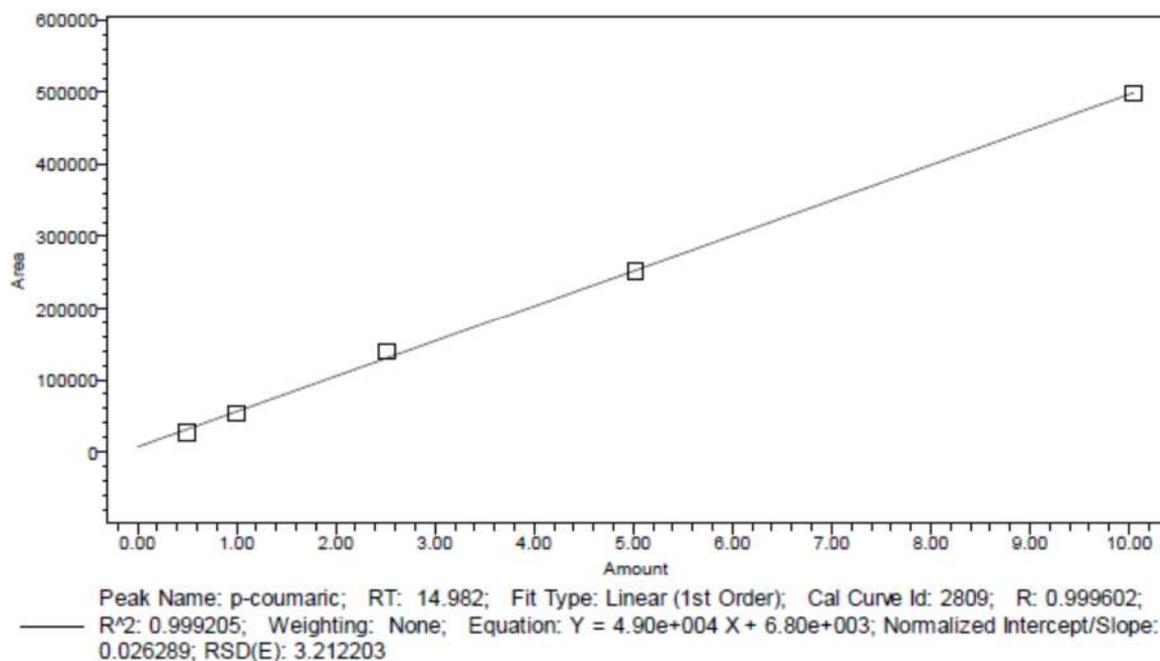


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide *p*-coumarique pour la quantification de *p*-COM

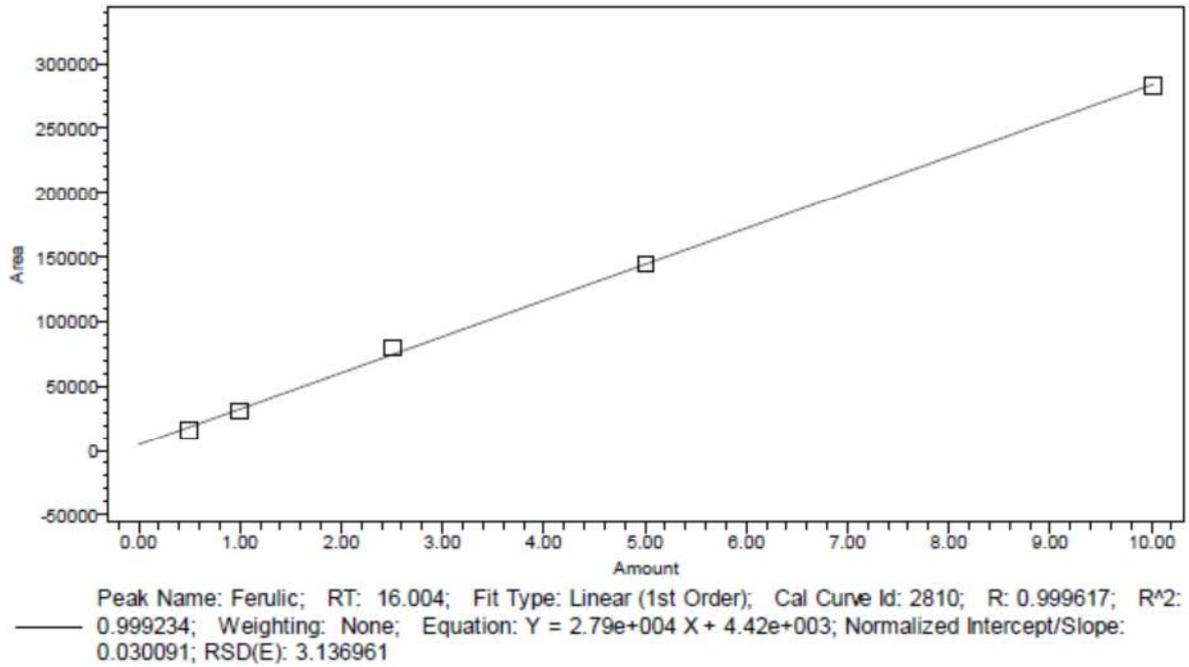


Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'acide Ferulique pour la quantification de FRU.

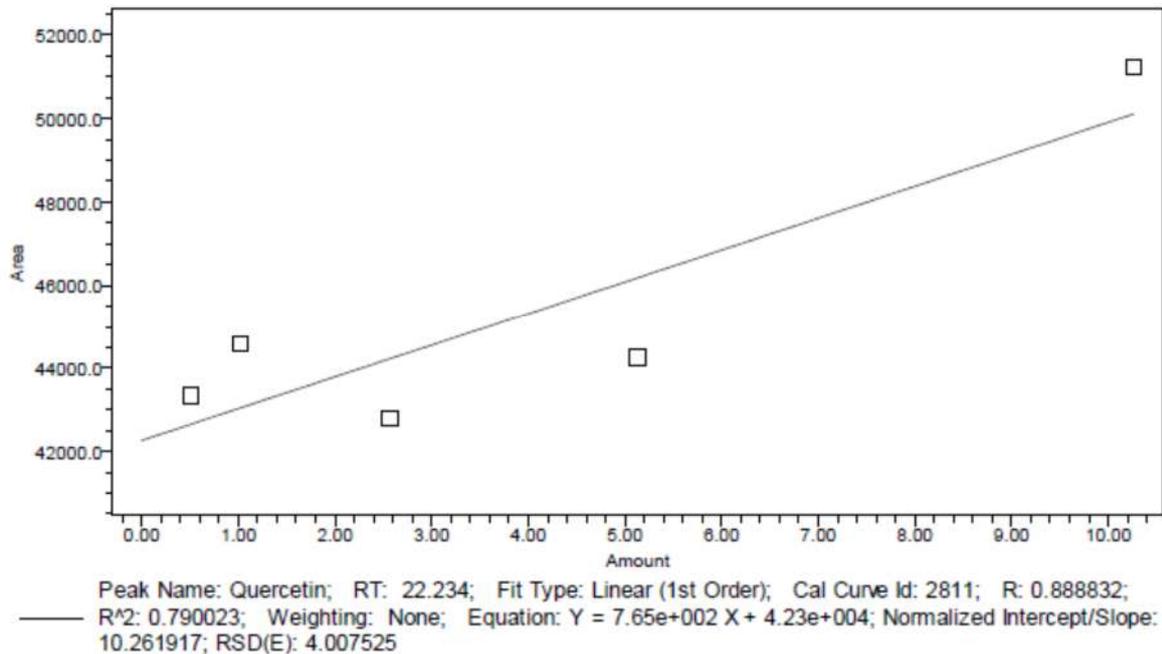


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de quercétine pour la quantification de QRC

Annexe 2. Profile Chromatogrammes de quelques échantillons de plante de pomme de terre par HPLC-DAD

1. Variété Agata :

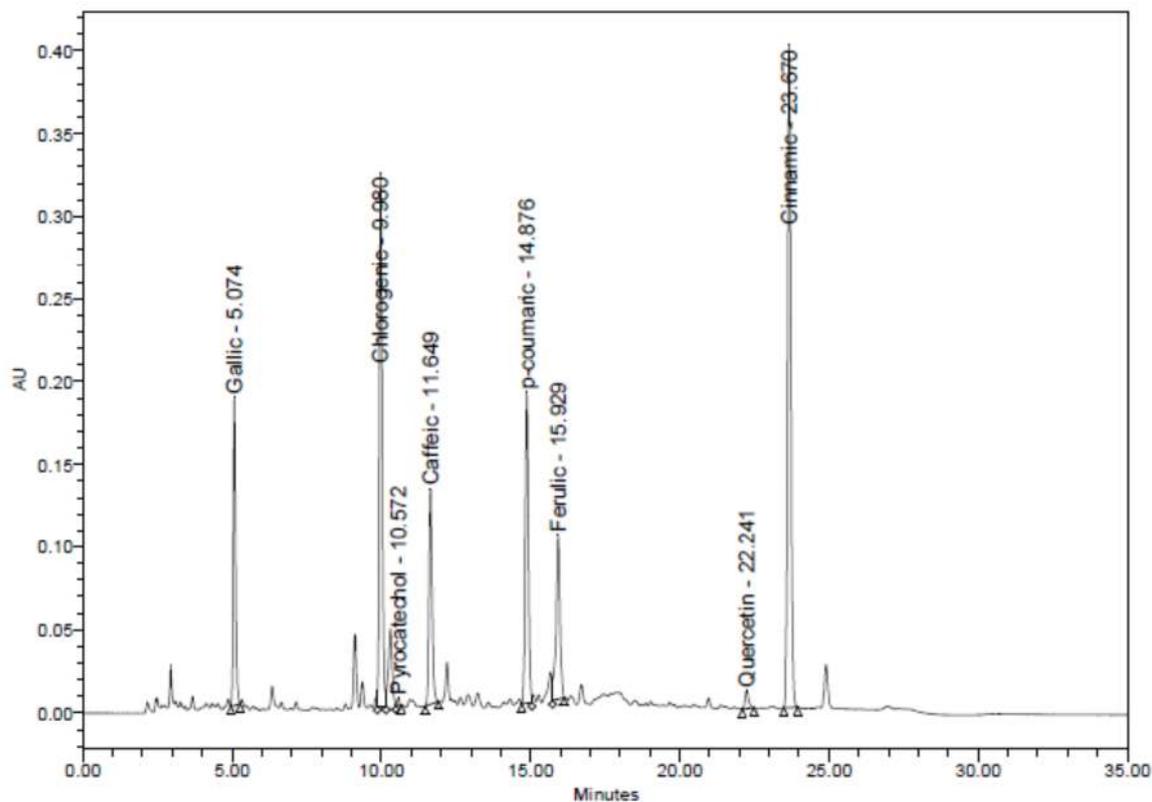


Figure 8. Profile chromatographiques de l'échantillons Ag 1 correspondant T0-Ctr.

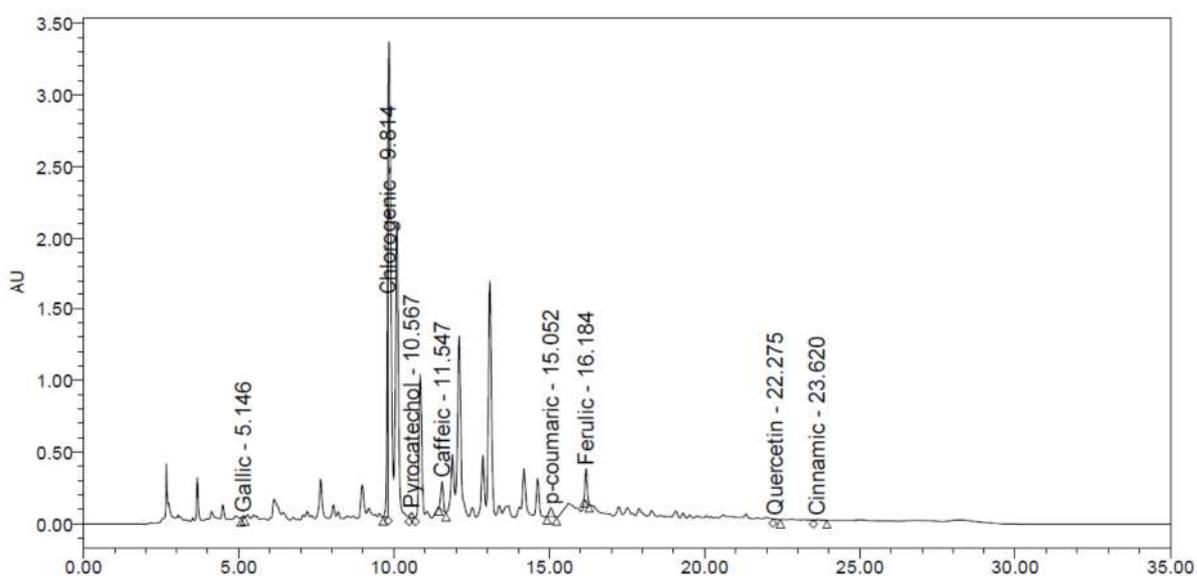


Figure 9. Profile chromatographiques des échantillons Ag 11 correspondant T5-Ctr

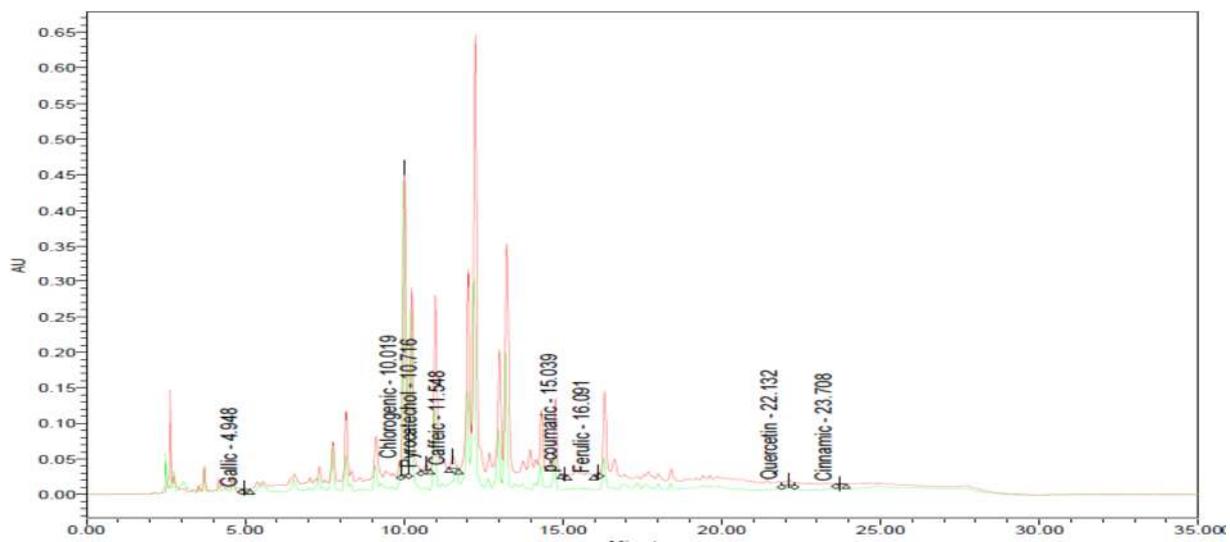


Figure 10. Profile chromatographiques des échantillons Ag 45 correspondant T5-Chi-Pc

2. Variété Red-Pontiac

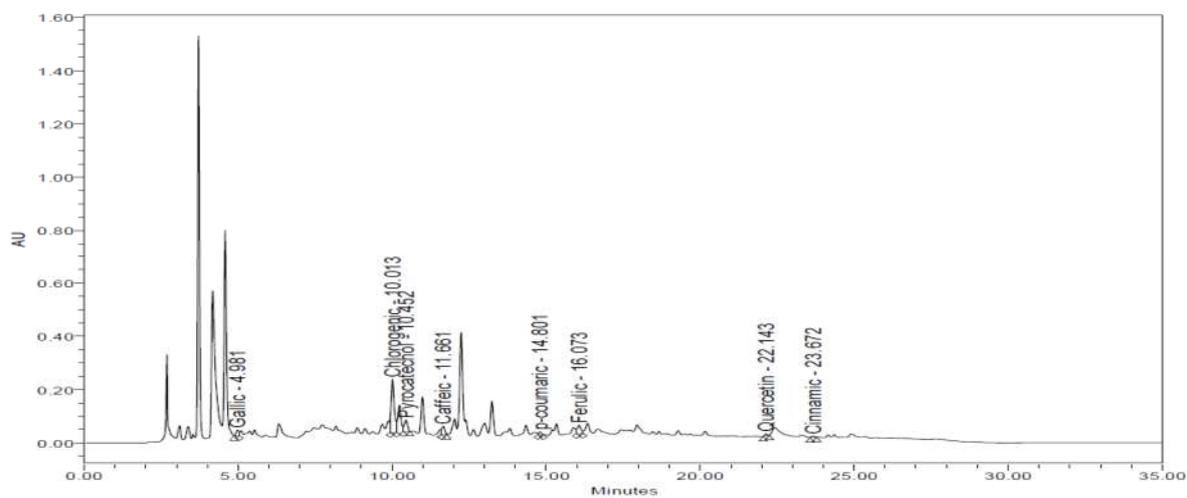


Figure 11. Profile chromatographiques des échantillons RED 3 correspondant T0-Ctr

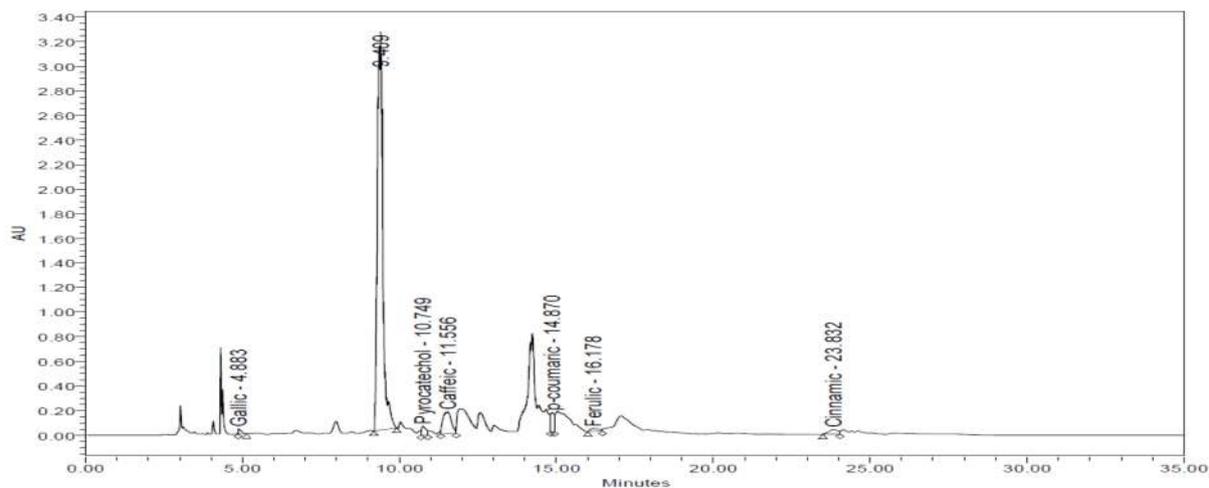


Figure 12. Profile chromatographiques des échantillons RED 11 correspondant T2-Ctr

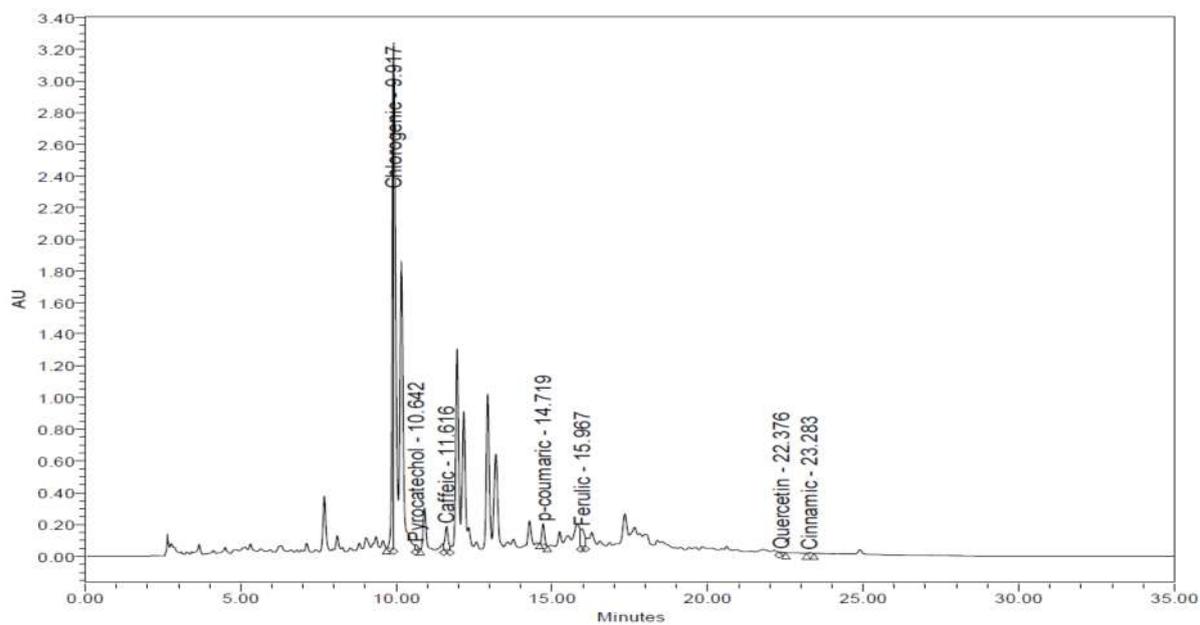
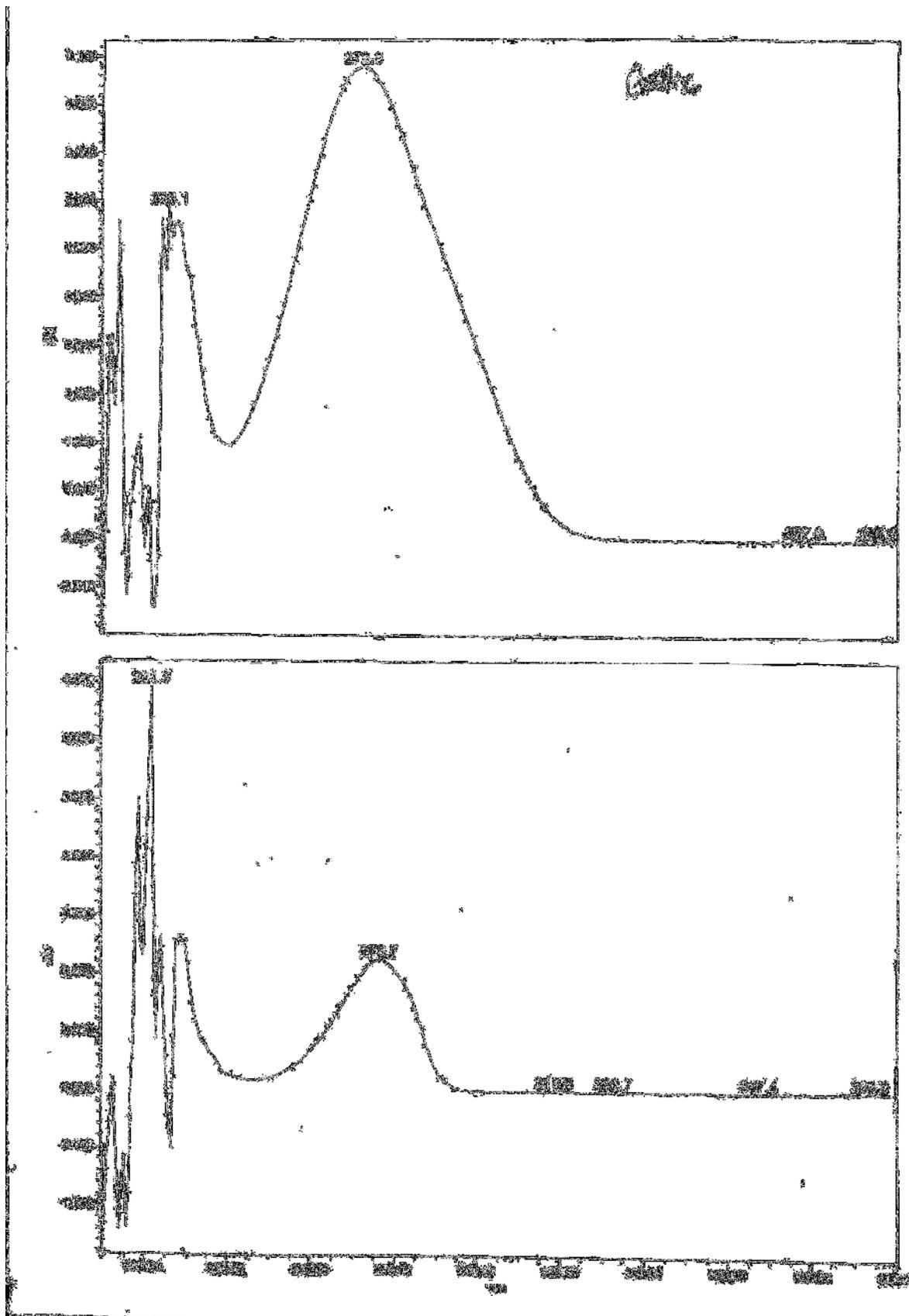
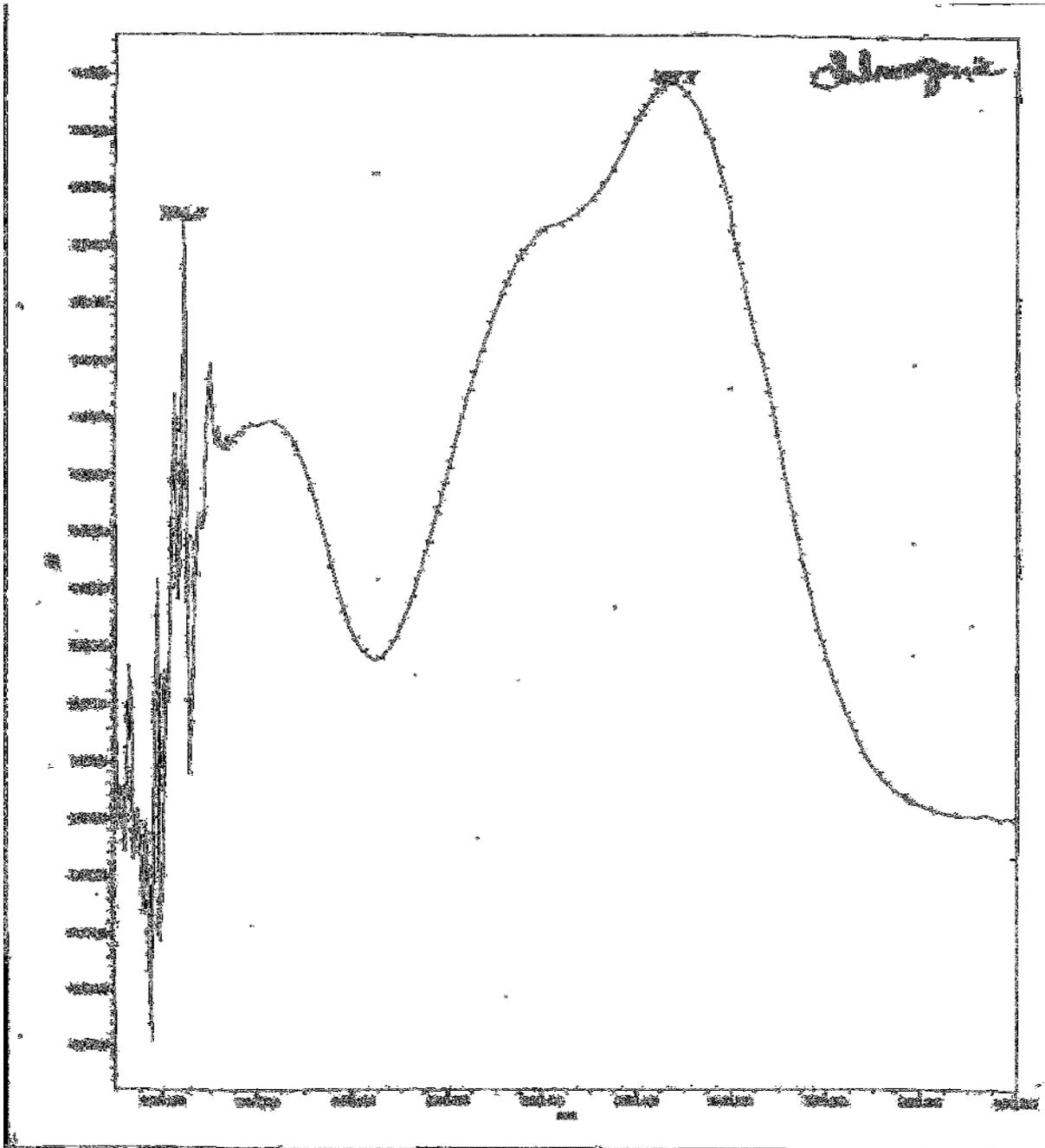


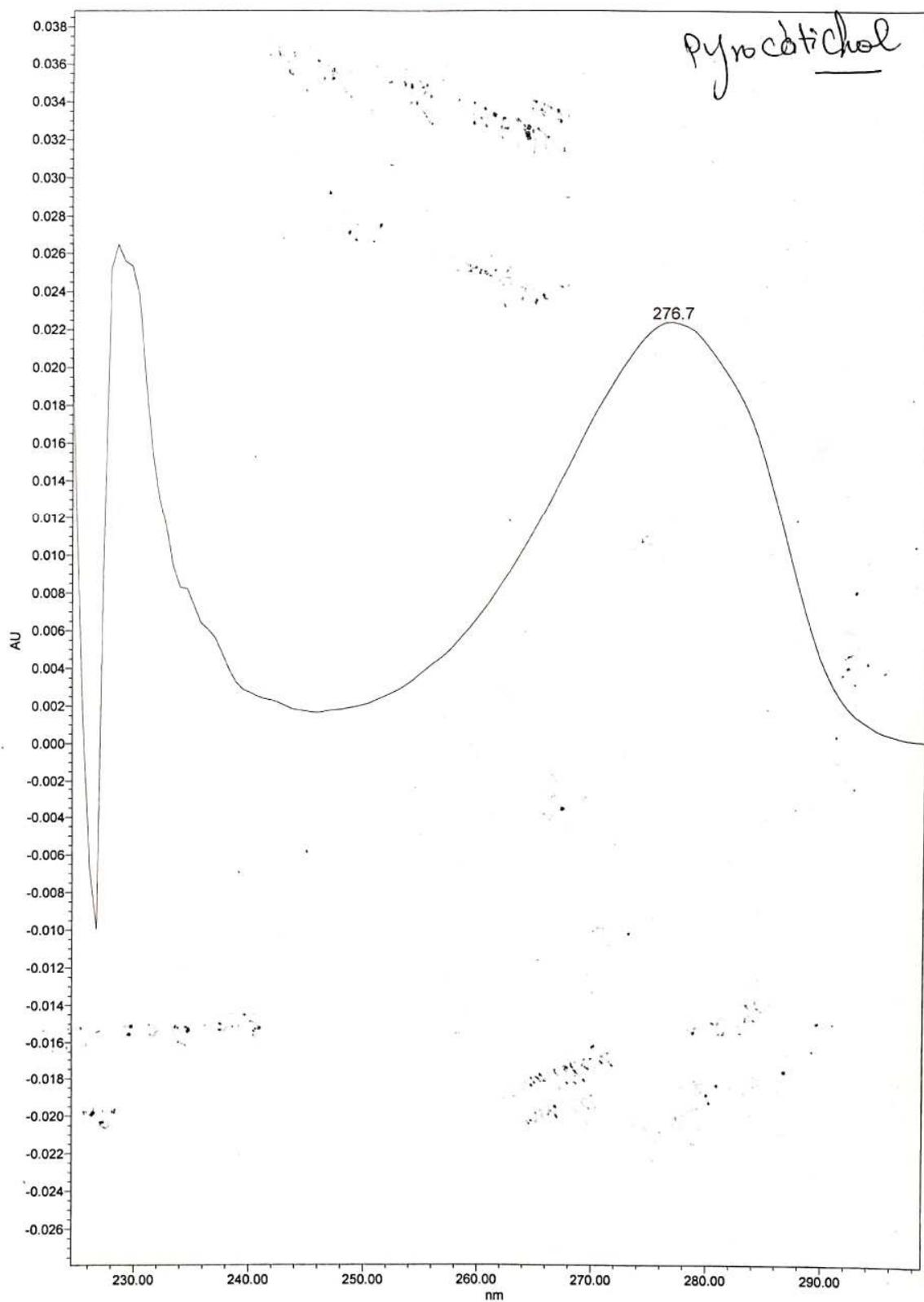
Figure 14. Profile chromatographiques des échantillons Red 81 correspondant T5-SA-Pa

Annexe 3 : Spectres ultraviolet (UV) des standards**1. Gallic acid**

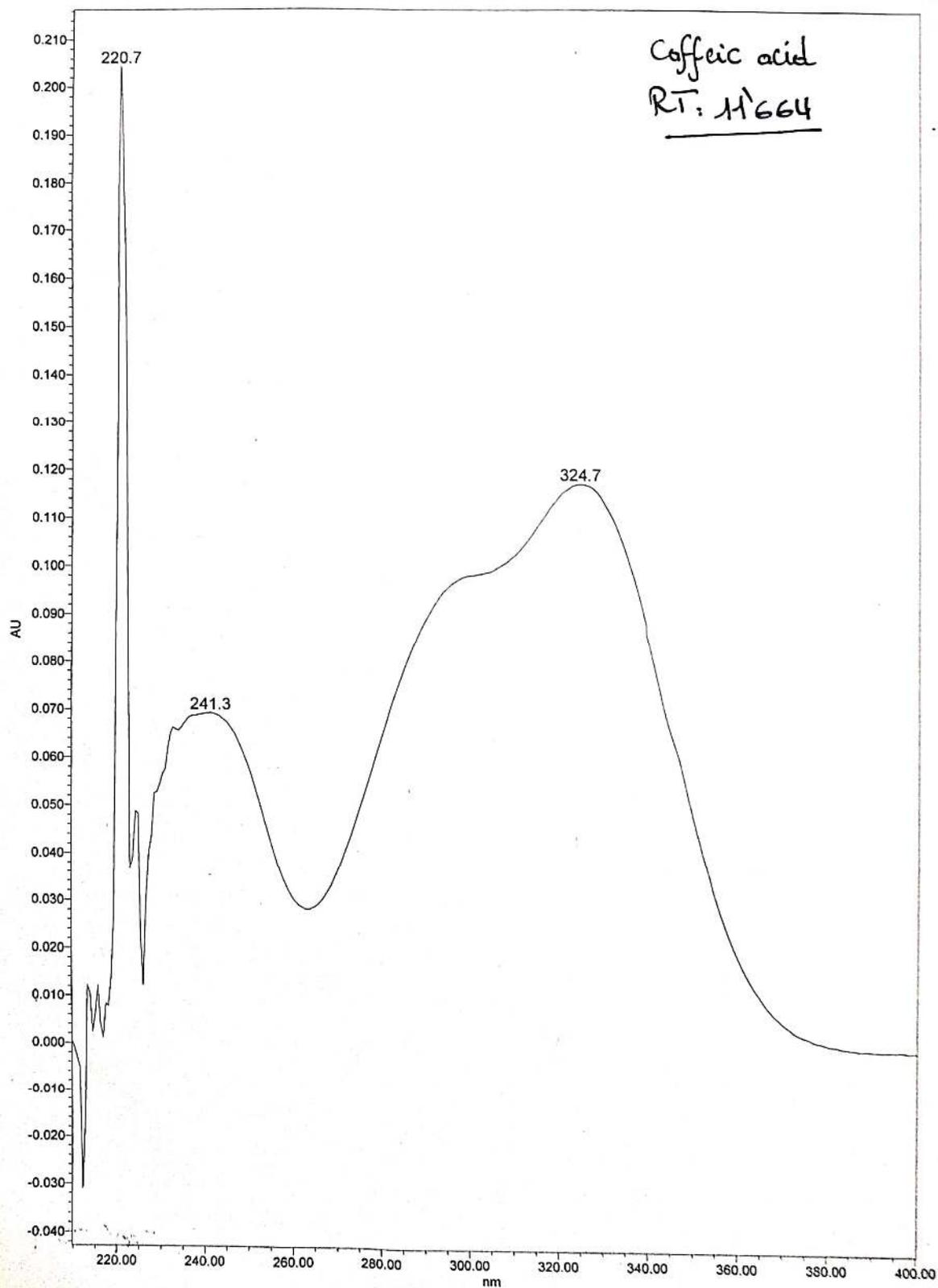
2. Chlorogenic acid

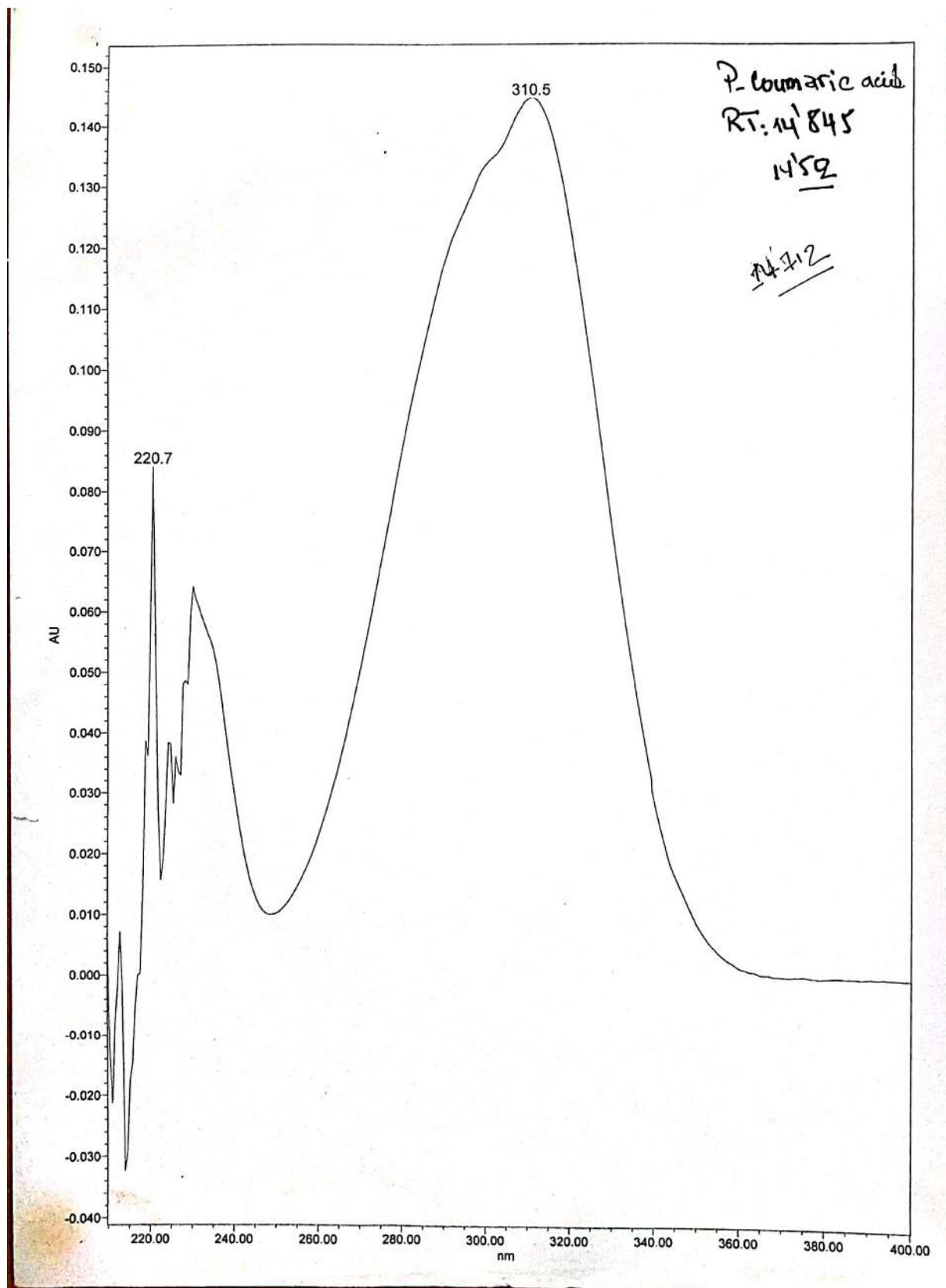


3. Pyrocatechol

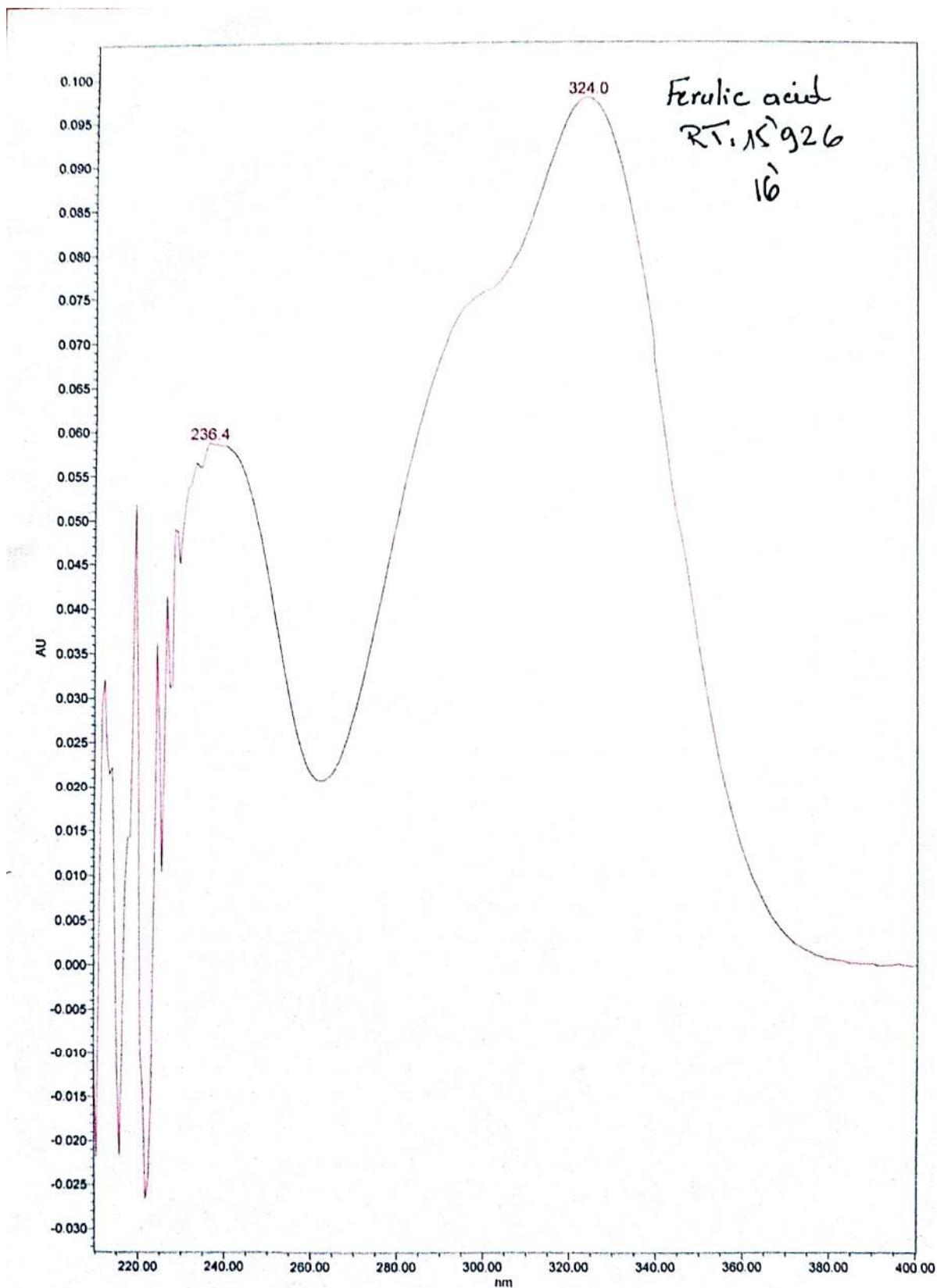


4. Caffeic acid



5. *p*-coumaric acid

6. Ferulic acid



ANNEXES

Annexe 4: Murashige and Skoog Medium

Catalog Number M5519

Storage Temperature 2–8 °C

Produced by sigma aldrich

Product Description: Classic plant cell culture medium containing macro and micronutrients, and vitamins.1

Macronutrients	Mg/ L
Ammonium nitrat	1,65
Calcium chloride	332.20
Magnesium sulfate (anhydrous)	180.70
Potassium phosphate monobasic	170.0
Potassium nitrate	1,900
Micronutrients	
Boric acid	6.20
Cobalt chloride	0.0250
Ferrous sulfate	27.80
Manganese sulfate monohydrate	16.90
Potassium iodide	0.830
Sodium molybdate dihydrate	0.250
Zinc sulfate heptahydrate	8.60
NaFe-EDTA	37.260
Cupric sulfate pentahydrate	0.0250
Vitamins and organic compounds	
<i>myo</i> -Inositol	100
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine hydrochloride	0.50
Thiamine hydrochloride	0.10
Glycine	2.0

Résumé

Les *pectobacteriums* exercent une action directe provoquant la pourriture molle et la jambe noire sur le végétal mais surtout indirecte en facilitant l'action de nombreux autres phytopathogènes. Conscients de cette problématique, nous avons adopté la stimulation par le méthyle-jasmonate, l'acide salicylique ainsi que le chitosane afin d'induire les mécanismes de défenses naturels sur les plants et sur les suspensions cellulaires de pomme de terre. En première temps, on étudie l'effet de chitosane sur des cultures cellulaires en suspension traitées par l'extrait de Pa-5889. En deuxième lieu, on suit l'effet des éliciteurs sur deux cultures de plants de pomme de terre (Agata et Red-pontiac) inoculées par Pc-5890 ou Pa-5889.

La croissance et la production de plusieurs composés phénoliques de défense sont déterminées chez des plantes traitées et non traitées ainsi que sur des plantes inoculées ou pas. L'acide salicylique et le chitosane offrent plus de protection contre les attaques bactériennes sans nuire à la croissance des plantes on se basant sur les niveaux élevés de composés phénoliques et les symptômes de l'infection sur les feuilles des plantes inoculées. La stimulation par le chitosane et les LPS de Pa-5889 sur les suspensions cellulaires offrent une activité PAL et une accumulation de CGA élevées.

Les plantes et les suspensions cellulaires produisent et accumulent ces métabolites secondaires pour prévenir toute attaque préalable contre les infections. Une production élevée de métabolites secondaires est accompagnée de moins de dommages observés sur les feuilles, les tiges de plante et une meilleure croissance de la biomasse cellulaire vis-à-vis des *Pectobacteriums*.

Abstract

Pectobacteriums exerts a direct action causing soft rot and blackleg on the plant, but above all indirectly by facilitating the action of many other phytopathogens. Aware of this problem, we have adopted stimulation with methyl jasmonate, salicylic acid and chitosan, in order to induce natural defense mechanisms on potato plants and cell suspensions. First, we study the effect of chitosan on cell cultures in suspension treated with the extract of Pa-5889 and secondly we follow the effect of elicitors on two-potato plant cultures (Agata and Red-pontiac) inoculated with Pc-5890 or Pa-5889.

Growth and production of several defense phenolic compounds were determined in treated and untreated plants as well as in inoculated and uninoculated plants. Salicylic acid and chitosan offer more protection against bacterial attack without harming plant growth based on the high levels of phenolic compounds and the symptoms of infection on the leaves of inoculated plants. Stimulation with chitosan and LPS (Pa-5889) on cell suspensions provide high PAL activity and high CGA accumulation.

Plants and cell suspensions produce and accumulate high secondary metabolites to prevent any prior infection attack. High production of secondary metabolites are accompanied by less observable damage in leaves, plant stems against *Pectobacteriums* and better cell biomass growth.

ملخص

تمارس بكتوبكتيريوم عملاً مباشراً يسبب تعفنًا ناعمًا وساقًا سوداء على النبات، ولكن قبل كل شيء بشكل غير مباشر عن طريق تسهيل عمل العديد من مسببات الأمراض النباتية الأخرى. وإدراكًا لهذه المشكلة، فقد اعتمدنا على تحفيز النباتات باستخدام الميثيل جاسمونيت وحمض الساليسيليك والشيتوزان، من أجل تحفيز آليات الدفاع الطبيعي في معلمات خلايا البطاطس. أولاً، ندرس تأثير الشيتوزان على مزارع معالق الخليوية المعالجة بمستخلص Pa-5889. وثانياً، نتابع

تأثير المحفيزات على نباتات البطاطس (Agata و Red-pontiac) الملحقين بـ Pc-5890 أو Pa-5889. تم تحديد نمو وإنتاج العديد من المركبات الفينولية الدفاعية في النباتات المعالجة وغير المعالجة وكذلك في النباتات الملحقة وغير الملحقة. يوفر حمض الساليسيليك والشيتوزان مزيداً من الحماية ضد الهجوم البكتيري دون الإضرار بنمو النبات وهذا بناءً على المستويات العالية من المركبات الفينولية وقلت أعراض العدوى على أوراق النباتات الملحقة بـ Pc-5890. يوفر التحفيز باستخدام الشيتوزان و LPS (Pa-5889) على معالق الخليوية إلى ارتفاع نشاط PAL وتراكم CGA.

تنتج النباتات والمعلقات الخليوية هذه المستقلبات الثانوية وتراكمها لمنع أي هجوم أو عدوى مسبقاً. يصاحب الإنتاج العالي من المستقلبات الثانوية تلف أقل على لأوراق وسيقان النبات ضد البكتيريا ونمو أفضل للكتلة الحيوية للخلية.