

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABDERRAHMANE MIRA - Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires.

Mémoire

Présenté par

M^{me} BECHAR-AMIMER Samira

En vue de l'obtention du diplôme de

Magistère en Sciences Alimentaires

Soutenu publiquement le : 03/ Mars/2008

Thème

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

Devant le jury :

Président : **S. BENALLAOUA**

Professeur (UAMB)

Rapporteur : **R. YAHIAOUI-ZAIDI**

Maître de conférences (UAMB)

Co-Rapporteur : **F. ZAIDI**

Chargé de cours (UAMB)

Examineurs : **H. LOUAILECHE**

Professeur (UAMB)

M. KECHA

Maître de conférences (UAMB)

Promotion 2007/2008.

Remerciements

La réalisation de ce travail n'aurait pu devenir effective sans l'implication formelle de certaines personnes dont je ne saurais ignorer de souligner l'apport ici.

A ce titre, Je tiens à remercier très sincèrement madame le docteur R. YAHIAOUI- ZAIDI, ma promotrice d'avoir accepté de m'encadrer et m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce travail. Je la remercie également pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité quotidienne et pour son degré d'implication dans ce travail.

Je remercie également monsieur F. ZAIDI, mon co-promoteur qui s'est toujours soucié de m'amener vers la réflexion en faveur de l'intégration des connaissances. Je le remercie aussi pour la pertinence de ses remarques et recommandations continues dans le souci de mener à bien ce travail ainsi que pour sa disponibilité.

Merci à Monsieur le professeur S. BENALLAOUA pour avoir accepté de présider le jury chargé d'évaluer ce travail

Je remercie madame le professeur H. LOUAILECHE et monsieur le docteur M. KECHA d'avoir accepté d'examiner ce travail malgré leurs emploi de temps chargé.

Merci à tous mes camarades et amis ayant soutenue ou en cours de préparation de leurs diplômes de magistères. Je remercie particulièrement Sonia M, Naima H, Zina M, Samira L, , Nadia M, Farida D, et Farid B, pour leur sympathie convivialité et leur amitié manifeste tout le long de la préparation de ce travail.

Ma gratitude et mes remerciements vont également à mes parents d'avoir été présents tout au long de mon cursus et de m'avoir soutenu dans mes choix d'orientation.

Un merci particulier à mon cher mari, Rahim, qui s'est montrée très compréhensif, et m'a beaucoup encourager et soutenue durant toutes les épisodes difficiles que j'ai connus pendant la réalisation de ce travail. Ce travail n'aurait pas eu la même saveur sans lui.

Merci enfin pour tous et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre lors de mon travail.

*Je dédie ce travail à mes chers parents,
à mon cher mari, mes frères et sœurs
& à toute ma famille*

Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Généralité sur la pomme de terre	3
I.1. Importance de la pomme de terre	3
I.1.1. Production	3
I.1.2. Consommation.....	4
II. Maladies de la pomme de terre	4
II.1. Pourriture molle bactérienne de la pomme de terre.....	6
II.2. Description de l'agent pathogène	6
II.3. Description de la maladie	6
III. Facteurs de pathogénicité	8
III.1. Facteurs extrinsèques	8
III.1.1. La température.....	8
III.1.2. L'humidité	9
III.1.3. L'anaérobiose	9
III.2. Facteurs intrinsèques	10
III.2.1. Enzymes lytiques de <i>P. c. ssp. atrosepticum</i>	10
III.2.1.1. Enzymes pectinolytiques	10
III.2.1.1. a. La pectate lyase	10
III.2.1.1. b. Les polygalacturonases (Peh).....	11
III.2.1.2. Enzymes non pectinolytiques	11

III. 2.1.2.a. Les cellulases.....	11
III. 2.1.2.b. Les protéases.....	11
III. 2.2. Rôle du Qorum sensing.....	12
III. 2.3. Autres facteurs déterminants de la pathogénicité de <i>Pca</i>	12
III. 2.3.1. Mobilité.....	12
III. 2.3.2. Les lipopolysaccharides.....	13
III. 2.3.3. Les sidérophores.....	13
III.3. Molécules d'hôte impliquées dans le mécanisme de défense.....	13
III.3.1. Défense liée aux caractéristiques structurales de la plante.....	14
III.3.2. Production de molécules toxiques pour <i>Pca</i>	14
III.3.3. Réaction d'hypersensibilité (Mort cellulaire programmée ou Apoptose)....	14
IV. Moyens de luttés.....	15
V. Les composés phénoliques : Métabolites secondaires de plantes.....	17
V.1. Généralités sur les polyphénols.....	17
V.1.1. Principales classes de composés phénoliques et leurs propriétés.....	17
V.1.1.1. les composés phénoliques simples.....	17
V.1.1.1.A. Les acides phénoliques.....	17
V.1.1.1.B. Les flavonoïdes.....	18
V.1.1.2. Les composés phénoliques complexes : les tannins.....	19
V.1.1.2.A. Les tannins hydrolysés.....	20
V.1.1.2.B. Les tannins condensés.....	20

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal.....	24
I.1. Origine des échantillons.....	24
I.2. Séchage.....	24
I.3. Broyage et tamisage.....	26
II. Extraction des composés phénoliques.....	26
III. Dosages colorimétriques.....	28

III.1 Dosage des polyphénols totaux	28
III.2 Dosage des tannins	29
III.3. Dosage des flavonoïdes	30
IV. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits de plantes	31
IV.1. Culture bactérienne	31
IV.2. Préparation des extraits de plantes	31
IV.3. Détermination de l'effet antibactérien <i>in vitro</i>	32
IV.3.A. Diffusion sur milieu gélosé	32
IV.3.B. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu. Gélosé.	32
IV.4. Effet des extraits de plantes sur le développement de pourriture molle	33
sur demi-tubercule.	
IV.4.1. Inoculation des demi-tubercules de pomme de terre par <i>Pca</i> seule	33
IV.4.2. Inoculation des tubercules de pomme de terre par <i>Pca</i> en présence	34
d'extraits de plantes.	
V. Analyse statistique	34

Résultats et discussion

I. Teneurs en humidité	36
II. Rendement en extrait sec	37
III. Dosages colorimétriques des extraits de plantes	38
III.1 Concentration en polyphénols totaux	38
III.2 Concentration en tannins	40
III.3. Concentration en flavonoïdes	41
IV. L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits de plantes	43
IV.1. Confirmation de la pathogénicité de <i>P. c</i> ssp. <i>atrosepticum</i>	43
IV.2. Détermination de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i>	44
IV.2.A. L'activité antibactérienne par diffusion sur milieu gélosé	44
IV.2.B. La concentration minimale inhibitrice (CMI)	48

IV.3. Influence des extraits de plantes sur le développement de pourriture molle	51
Conclusion	56
Références bibliographiques	58
Annexe	

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Pourriture molle d'un tubercule de pomme de terre causée par <i>Pectobacterium carotovorum atrosepticum</i>	7
2	Structures chimique de base d'acides phénoliques	18
3	Structures chimiques des flavonoïdes	19
4	Structure chimique de tannins hydrolysable	20
5	Structure chimique de tannins condensés	21
6	Matériel végétal utilisé	25
7	Protocole d'extraction des polyphénols des échantillons	27
8	Extrait de plante délipidé	28
9	Schéma de test d'inoculation des demi tubercules	35
10	Taux d'humidité des échantillons	36
11	Rendement d'extraction avec l'acétone (70%) et le méthanol (80%)	37
12	Concentrations en polyphénoles totaux	38
13	Concentrations en tannins	40
14	Concentrations en flavonoïdes	42
15	Demi-tubercule de pomme de terre inoculé par <i>Pca 86/20</i>	43

16	Activité antibactérienne de composés phénoliques de synthèse sur la croissance de <i>Pca</i>	44
17	Activité antibactérienne d'extraits de plantes	47
18	Effet des extraits de plantes sur la croissance de <i>Pca</i>	52
19	Effet d'extraits de <i>S. officinalis</i> sur l'évolution de la pourriture molle causée par <i>Pca</i> .	52
20	Effet d'extraits de des feuilles d' <i>O europaea</i> sur l'évolution de la pourriture molle causée par <i>Pca</i>	53
21	Effet d'extraits du grignon d'olive sur l'évolution de la pourriture molle causée par <i>Pca</i>	53

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
I	Principales maladies de la pomme de terre	5
II	Activité biologique des composés phénoliques	22
III	Action antibactérienne des polyphénols	23
IV	Inhibition de <i>P. c. ssp. atrosepticum</i> par des extraits phénoliques de synthèse	45
V	Effet antibactérien des extraits de plantes	47
VI	Concentration minimale inhibitrice de composés phénolique et extraits de plantes sur <i>P. c. ssp. atrosepticum</i>	49

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléotidique

AHL: Acyl Homoserine Lactone

ANOVA: Analysis Of Variance

BSA : Bovine Serum Albumin

Cels : Cellulases

CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

DO: Densité Optique

E ac: Extrait acétone

E MeOH: Extrait méthanolique

EAG: Equivalent acide gallique

EAT: Equivalent acide tannique

EPS: Exopolysaccharides

EQ: equivalent Quercétine

FAO: Food and Agriculture Organization

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HR: Hypersensitive Response

Hrp: Hypersensitive response protein

ITAFV: l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne

LB: Luria Bertani

LP: Levure Peptone

LPS: Lipopolysaccharides

MS: Matière Sèche

OG: Oligogallacturonates

PAL: Phenylalanine Ammonia Lyase

Pca : *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum*

Pcc : *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*

Pch : *Pectobacterium chrisanthemi*

Peh : Pectate hydrolase

Pel : Pectate lyase

Pme : Pectine méthyle estérase

Pnl : Pectine lyases

POD: Peroxydase

PPO: Polyphénol oxydase

Prts : Protéases

PVY: Potato Virus Y

QS: Quorum Sensing

SDS: sodium Dodecyl Sulfate

TEA: TriEthanolAmine

UFC: Unité Formant Colonie

Introduction

Introduction

La pomme de terre, légume par excellence, de part sa qualité gustative et sa valeur nutritive, constitue un produit de base dans la consommation des ménages Algériens (35% des légumes) (Boucaillou, 1992).

Malgré son importance, le secteur de la pomme de terre se trouve fréquemment confronté à plusieurs maladies dont la pourriture molle bactérienne causée par *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum*, qui occasionne d'importantes pertes économiques (Stevenson *et al.*, 2001).

Face à l'absence de moyens de lutte efficaces contre cette maladie, et au regard des inquiétudes grandissantes liées à l'utilisation de pesticides synthétiques, il s'avère urgent et nécessaire, pour le contrôle post-récolte des maladies de la pomme de terre, de développer des composés antimicrobiens d'origine naturelle, qui soient efficaces et sains, avec un impact escompté plus réduit sur l'environnement et la santé humaine, par rapport aux pesticides chimiques.

Les produits d'origine végétale sont d'un grand intérêt pour la santé humaine et l'environnement. En effet, durant les deux dernières décennies plusieurs études se sont focalisées sur les propriétés d'agents antimicrobiens des extraits des plantes, particulièrement les polyphénols. Ces derniers, ont longtemps été utilisés en médecine traditionnelle (Rios et Recio., 2005), mais très peu d'études se sont intéressées à leurs effets contre les bactéries phytopathogènes et les phytopathologies.

Notre travail porte sur la recherche d'extraits de plantes (extraits phénoliques) ayant une activité antibactérienne sur *Pectobacterium carotovorum atrosepticum* pouvant inhiber le développement de la pourriture molle sur pomme de terre.

Ainsi, deux plantes : *Salvia officinalis* L. et *Olea europaea* L. en raison de leur effets thérapeutiques, leurs apport en composés phénoliques (Aziz *et al.*, 1998 ; Savournin *et al.*, 2001) et larges disponibilités dans la région (Nord est algérien) ainsi qu'un co-produit de l'oléiculture (le grignon d'olive) ont été investi au cours cette étude.

Au cours du présent travail, nous nous sommes intéressé dans un premier temps au dosage des composés phénoliques extraits par deux solvants organiques différents à partir des trois échantillons. Ces composés (polyphénols) apparentés aux phytoalexines des plantes induisent des mécanismes de défense chez ces dernières et possèdent plusieurs effets biologiques dont des effets antibactériens.

La deuxième partie a été entreprise dans la perspective de trouver un traitement capable de minimiser l'impact de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* sur les tubercules de pomme de terre, en exploitant les extraits de plantes déjà citées. On s'est donc intéressé à l'effet de ces composés phénoliques, constituants majeurs des extraits étudiés, sur l'inhibition de la croissance de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* *in vitro* et leurs effet sur l'évolution de la pourriture molle sur demi tubercules de pomme de terre.

*Synthèse
bibliographique*

I. Généralité sur la pomme de terre

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est une plante dicotylédone tubéreuse, herbacée et annuelle, appartenant à la famille botanique des Solanacées, aux feuilles pointues, aux fleurs dont la couleur varie du blanc au violet.

Selon certains auteurs, la pomme de terre est originaire de la cordillère des Andes de l'Amérique du sud (le Chili, le Pérou, la Bolivie et l'Equateur) (Horton, 1987). Elle a longtemps été utilisée comme remède en Europe, où elle fut importée vers le 16^{ème} siècle. Elle fut ensuite introduite en Afrique du nord au tournant du 17^{ème} siècle (Dean, 1994).

I.1. Importance de la pomme de terre

La culture de la pomme de terre représente, après le maïs, le blé et le riz, la quatrième production végétale importante dans l'alimentation humaine (Stevenson *et al.*, 2001). Cette position prédominante tient à sa qualité nutritionnelle. Dans sa présentation la plus simple, la pomme de terre constitue une bonne source d'énergie par sa haute teneur en hydrates de carbone (environ 75% de matière sèche), en lysine (0.32-1.4 mg/g de matière sèche), acide aminé, souvent absent dans plusieurs légumes et céréales. Elle présente également une teneur non négligeable en vitamine C et en minéraux par rapport aux autres légumes (Rossignol et Roussel-Bourgeois, 1996 ; Machado *et al.*, 2007).

I.1.1. Production

La production mondiale de la pomme de terre a enregistré une forte croissance en Asie, Afrique et Amérique latine au cours des deux dernières décennies, où elle est passée de 30 millions de tonnes au début des années 60 à plus de 100 millions de tonnes au milieu des années 90 (FAO, 2005).

Cette production s'élève à plus de 327 millions de tonnes en 2005 et couvre plus de 18 millions d'hectares. La Chine occupe la 1^{ère} place des pays producteurs, avec environ 73,5 millions de tonnes suivie par la fédération de Russie et l'Inde avec une production de 37,3 et 25 millions de tonnes respectivement. L'Algérie quant à elle, occupe la 2^{ème} place en Afrique avec une production totale de 2 180 961 tonnes (FAO, 2006). Cependant, cette culture demeure sous développée au regard de son coût de production lié aux prix de semences élevés et à la faible maîtrise des maladies qui affectent ce légume.

I.1.2. Consommation

La consommation de la pomme de terre revêt une importance capitale dans les pays où la production céréalière est faible, et où le niveau de vie est relativement bas (Yaganza, 2005).

A l'aube de l'indépendance, la production de pommes de terre en Algérie a atteint 250 000 tonnes par an. Depuis, la pomme de terre est devenue une des principales cultures destinées à la consommation domestique. Elle est surtout cultivée sur la côte méditerranéenne, où elle jouit d'un climat tempéré propice à sa culture tout au long de l'année (Yahiaoui-Zaidi, 2004).

La consommation annuelle de ce légume, qui était de 35 kg/par habitant en 1990, est passée à 57 kg en 2005 (FAO, 2006). Cependant, en dépit de son importance nutritionnelle, le marché de la pomme de terre en Algérie, comme partout dans le monde, fait face à de nombreuses difficultés, dues principalement aux coûts de production élevés et au manque fréquent de qualité. Par ailleurs le développement des industries de transformation de la pomme de terre expliquerait l'augmentation de sa consommation dans les pays industrialisés (Harris, 1992).

II. Maladies de la pomme de terre

De la mise en terre des semences jusqu'à la fin de l'entreposage, la pomme de terre représente l'une des productions végétales les plus affectées par les maladies (Agrios, 1997). Selon la 2^{ème} édition de *Compendium of potato disease*, plus de 60 maladies, causées par des champignons, bactéries et virus, affectent toute ou des parties de la plante (racines, tige, feuilles, tubercule), pendant la phase de végétation et/ou pendant la phase de conservation des tubercules. Ces maladies présentent des aspects très divers, allant de la nécrose isolée sur feuilles au flétrissement généralisé du système végétatif, et de l'altération superficielle à la pourriture destructrice des tubercules (Stevenson *et al.*, 2001).

Le tableau qui suit résume les principales maladies de la pomme de terre.

Tableau I : Principales maladies de la pomme de terre (Stevenson *et al.*, 2001)

Maladie	Agent pathogène	Symptômes
Pourriture molle	<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp <i>atrosepticum</i> et <i>P.</i> <i>carotovorum carotovorum</i> .	Pourriture molle sur tiges et tubercules
Pourriture brune	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Pourriture annulaire brune des tiges et tubercules
Flétrissement bactérien	<i>Clavibacter michiganese</i> subsp <i>sepedonicus</i>	Pourriture vasculaire des tubercules jaunâtre à brunâtre
Mildiou	<i>Phytophthora infestans</i> .	Marbrure violacées-brunes en surface et à l'intérieur des tubercules
Alternarienne	<i>Alternaria solani</i>	Pourriture sèche brune et affaissée sur tubercules peu profonde et bien délimitée du tissu sain
Fusariose (pourriture sèche)	<i>Fusarium</i> ssp	Plissement des tubercules en rides plus ou moins concentrique autour du point d'infection
Virus de la mosaïque	PVY	Petits tubercules, nécroses circulaires peu profondes
Virus de l'enroulement des feuilles	PLRV	Enroulement et durcissement des feuilles

La pourriture molle bactérienne causée par le genre *Pectobacterium* est considérée comme l'une des principales et redoutables maladies de la pomme de terre qui occasionne d'importants dégâts économiques (Helias *et al.*, 2000 ; Smadja *et al.*, 2004_b). L'ampleur de ces pertes varie largement d'un pays à un autre. En général, lorsqu'un entrepôt est affecté par cette maladie, les pertes peuvent atteindre plus de 2/3, voir la totalité des tubercules entreposés (Ranganna *et al.*, 1997).

II.1. Pourriture molle bactérienne de la pomme de terre

Trois différentes espèces du genre *Pectobacterium* sont communément associées aux pommes de terre, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* (*Pca*), *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pcc*) et *Pectobacterium chrysanthemi* (*Pch*) (Pérombelon et Salmond., 1995). Parmi ces trois espèces, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum*, qui fait l'objet de notre travail, est l'agent bactérien majeur qui présente de sérieuses menaces pour les cultures de pommes de terre en régions tempérées. Par ailleurs, elle est le principal agent causal de pourriture molle sur tubercules (Pérombelon, 2002).

II.2. Description de l'agent pathogène

Pectobacterium carotovorum ssp. *atrosepticum*, aussi appelée *Erwinia carotovora* *atroseptica* (*Eca*) est une bactérie phytopathogène de la famille des *Enterobacteriaceae*, à gram négatif, non sporulés, en bâtonnet droit de 0,5 à 1,0 par 1,0 à 3,0 µm. Les cellules sont mobiles grâce aux flagelles peritriches. elles peuvent être seules par paires et quelques fois en courtes chaînes. Les *Pca* sont caractérisée par un métabolisme fermentatif, le type respiratoire est aéro-anaérobie facultatif, oxydase négative, catalase positive et nitrate réductases positive (Yahiaoui-Zaidi *et al.*, 2003). C'est une bactérie psychrotrophe dont la température optimale de croissance est de 12 à 24°C et ne peut croître dans des températures supérieures à 36°C (Smadja *et al.*, 2004)_a.

Il y a eu remaniement dans la nomenclature des Pectobactéries, avec l'élévation de cette sous espèce au rang d'espèce : *Pectobacterium atrosepticum* (Gardan *et al.*, 2003). Toutefois, jusqu'à présent le nom de cette nouvelle espèce n'a pas encore été adopté unanimement par la communauté scientifique, et le nom *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* et *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* restent les plus couramment utilisés pour décrire cette espèce (Smadja *et al.*, 2004_a ; Sepulchre *et al.*, 2007).

Cette bactérie, associée spécifiquement à la pomme de terre ne survie pas généralement plus d'une année dans le sol, sauf si elle est contenue dans des tubercules infestés ou autres débris de la plante (Pérombelon et Kelman., 1980).

II.3 Description de la maladie

La pourriture molle causée par *P. c. atrosepticum* peut survenir aussi bien dans les champs ou après récolte pendant les périodes de stockage plus ou moins longues,

pouvant occasionner de grandes pertes qualitatives et quantitatives (Ranganna *et al.*, 1997).

La chronologie des étapes aboutissant à la pourriture molle est particulièrement importante. L'attaque bactérienne se déroule en deux phases distinctes : une étape primo invasive au cours de laquelle la bactérie se multiplie aux points d'infection, puis une phase lytique marquée par la production massive d'une grande variété d'enzymes exocellulaires (Maë *et al.*, 2001).

Dans la 1^{ère} phase, la bactérie se multiplie sans produire de molécules qui pourraient impliquer les mécanismes de défense de la plante. Les bactéries pénètrent généralement à travers les lenticelles ou les blessures mal cicatrisées des tubercules qui sont considérés comme principales portes d'entrée des bactéries. Pendant le stockage, les tubercules infestés paraissent sains et les bactéries présentes en état de latence dans les zones d'infection privilégiées, commencent une multiplication accrue sans macérer les cellules de la plante (Scotte *et al.*, 1996).

Quand un nombre critique, généralement estimé à 10^7 - 10^8 cellules/g de tissu pourri, est atteint (Smadja *et al.*, 2004_b), la bactérie sécrète une grande variété d'enzymes lytiques extracellulaires, essentiellement des enzymes pectinolytiques. La pectate lyase joue un rôle important dans la virulence de *P. c. atrosepticum* en dégradant les cellules et les tissus de la plante (Barras *et al.*, 1994).

Les symptômes sur tubercules se caractérisent par des pourritures molles internes qui se développent principalement dans les lenticelles (Lapwood et Hering., 1968).



Figure 1 : Pourriture molle d'un tubercule de pomme de terre causée par *Pectobacterium carotovorum atrosepticum*. (Yaganza, 2005).

L'infection débute par une invasion des espaces intercellulaires du parenchyme du tubercule. Occasionnellement, elle peut atteindre des éléments du xylème et du phloème s'accompagnant d'une formation localisée de mélanine (Fox *et al.*, 1972). La zone infectée peut rapidement se développer et s'élargir, et les tissus internes du tubercule deviennent spongieux, de couleur blanc crème à marron foncé avec des bords noirâtres délimitant une frontière avec les tissus sains. La pourriture est humide, légèrement granulaire et généralement inodore dans les stades précoces de la maladie. Une odeur nauséabonde se développe quand d'autres bactéries et levures saprophytes envahissent les tissus pourris (Morgan, 2000).

III. Facteurs de pathogénicité

Actuellement une grande attention est consacrée essentiellement à la pathogénicité de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* couplée à la résistance de *Solanum tuberosum* L. (Perombelon et salmond, 1995 ; Hugouvieux-cotte-patate *et al.*, 1996 ; Wegener et Olsen., 2004).

Le développement de la maladie, comprenant la transition de l'état de latence à une infection active, dépend de deux facteurs essentiels :

- Conditions environnementales.
- Implication de molécules de pathogénicité de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* et la réaction de l'hôte

III.1. Facteurs extrinsèques

L'interaction entre la plante de pomme de terre et *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* est largement liée aux conditions environnementales (Salmond., 1992). Les facteurs favorisant la maladie incluent trois paramètres : la température, l'humidité et l'anaérobiose.

III.1.1. La température

Elle a le plus grand effet sur la capacité de *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum* à infecter les tubercules de pommes de terre et sur le développement de la maladie (Pérombelon et Kelman, 1980). Celle-ci influence la croissance de *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum* et détermine les espèces et sous-espèces de pectobactéries prédominantes responsables des symptômes. En effet, dans les tubercules infectés, *P. c. atrosepticum* est

plus prévalente à des températures allant de 22 à 25°C (Salmond, 1992 ; Smadja *et al.*, 2004_a), tandis qu'à des températures plus élevées, *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* est prédominante (Pérombelon *et al.*, 1987).

Selon Hasegawa *et al.* (2005), la température joue un rôle important dans la sévérité de la maladie en influant sur le système de production des enzymes pectinolytiques. Smadja *et al.* (2004)_a, suggèrent que la température optimale de pathogénicité de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* est inférieure à sa température optimale de croissance, elle est proche de sa température maximale d'activité enzymatique.

III.1.2. L'humidité

La présence de molécules d'eau sur les tubercules implique une cascade d'événements aboutissant à la pourriture molle. En effet, la formation d'un film d'eau sur les tubercules empêche la lignification des parois des cellules et la subérisation des tubercules réduisant ainsi la protection de la plante vis-à-vis des enzymes pectiques de macération (Pérombelon, 2002).

Après absorption de l'eau libre, la bactérie entre en contact direct avec les parois cellulaires hydratées de la plante ; la population bactérienne peut ainsi augmenter en présence d'humidité. Cependant, cet inoculum n'excède pas généralement un niveau critique de macération estimé aux environs de 10^7 cellules/g de tissus pourris (Perombelon *et al.*, 1987).

III.1.3. L'anaérobiose

En entrepôt, la pourriture débute généralement sur des tubercules situés au fond de la pile de pommes de terre (Yaganza, 2005). Le faible pourcentage en oxygène contribue à l'apparition de la maladie et à l'étendue des dégâts (Smadja *et al.*, 2004_a).

Selon Pérombelon (2002), l'anaérobiose en elle-même n'aboutie pas au déclenchement de la pathogénicité, mais la présence d'eau libre est indispensable.

Une fois que l'oxygène est épuisé par la respiration des tissus de tubercules, il n'est plus renouvelé à cause de la présence d'un film d'eau sur les tubercules, il s'ensuit l'inhibition du système de résistance de la plante hôte (Maher et kelman, 1983). Ainsi la bactérie peut proliférer dans les tissus, se multiplier et produire des enzymes pectiques de dégradation.

Aussi, la production *in vitro* de ces enzymes est double en anaérobiose qu'en aérobie, même si le taux de croissance de *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum* en anaérobiose est 2 à 3 fois plus faible que sous des conditions aérobies (Perombelon, 2002) rendant ainsi les symptômes de la maladie plus sévères en anaérobiose.

III. 2 Facteurs intrinsèques

Le pouvoir pathogène des souches de *P. c. atrosepticum* sur pomme de terre nécessite l'intervention des facteurs de virulence ainsi que des mécanismes de résistance de plante aussi variés que multiples dont les principaux sont les suivants.

III. 2.1. Enzymes lytiques de *P. c. ssp. atrosepticum*

L'arsenal de pathogénicité de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* est constitué d'une multitude d'enzymes extracellulaires de macération, comprenant des pectinases, des cellulases (Cel) et des protéases (Prt) (Barras *et al.*, 1994). Cependant, *P. c. atrosepticum* produit moins de forme isoenzymes comparé aux autres bactéries pectinolytiques, la rendant ainsi inféodée à une gamme d'hôtes restreinte généralement à la pomme de terre (Perombelon, 2002).

III.2.1.1. Enzymes pectinolytiques

Les pectinases sont considérées les principaux facteurs de pathogénicité, elles sont responsables de la macération des tissus par la désintégration des parois et de la lamelle moyenne des cellules de la plante hôte, induisant ainsi la mort cellulaire (Le Poivre, 2003). Une fois les parois rompues, les fluides cellulaires sont accessibles aux bactéries, ce qui favorise leur croissance (Sepulchre *et al.*, 2007).

Quatre types d'enzymes sont produites par *P. c. atrosepticum* : polygalacturonases (Peh), pectine lyases (Pnl), pectine méthyl estérases (Pme) et pectate lyases (Pl) (Wegener, 2002). Cette dernière est considérée comme la principale enzyme responsable de pathogénicité (Smadja *et al.*, 2004_b).

III.2.1.1.a. La pectate lyase (Pl)

C'est une dépolymérase des parois cellulaires (Wegener et Olsen, 2004) qui dégrade la pectine en oligogalacturonates (OG) par β -élimination après déméthylation de l'acide pectique par la pectine méthyle estérase (Pme) (Schober et Vermeulen., 1999). La

pectate lyase cause ainsi une diminution rapide de la viscosité de l'acide polygalacturonique.

Le séquençage récent de l'ADN génomique de *P. c. atrosepticum* a révélé 3 gènes codant pour trois différents isoenzymes de pectate lyase (Bell *et al.*, 2004). Les analyses biochimiques des trois isoenzymes ont montrés que les produits de réaction des isoenzymes Pl₁ et Pl₂ comprennent principalement des hepta et pentamères avec une dépolymérisation supplémentaire par Pl₃. Cette dernière agit préférentiellement sur la pectine de la lamelle moyenne des parois cellulaires de la pomme de terre aboutissant à une augmentation du taux de tri et dimères d'oligogalacturonates (Bartling *et al.*, 1996). Ces derniers sont connus pour être responsables de l'induction de la réaction de défense contre la pourriture molle dans la pomme de terre (Wegner et Olsen, 2004).

III.2.1.1.b. Les polygalacturonases (Peh)

Ce sont des hydrolases qui clivent les liaisons α (1-4) entre les acides galacturoniques, elles sont inhibées par les ions Ca^{2+} contrairement aux pectates lyases qui nécessitent la présence de Ca^{2+} pour leur activation. (Le poivre, 2003).

Par ailleurs, très peu d'études ont été effectuées sur les autres enzymes pectinolytiques de *P. c. atrosepticum*.

III. 2.1.2. Enzymes non pectinolytiques

III. 2.1.2.a. Les cellulases

Deux cellulases ont été mise en évidence chez *P. carotovorum* (Cel S et Cel V). Ces enzymes agissent par la dégradation des liaisons D- glucopyranosyl de la cellulose (Salmond, 1992). Cependant, leur rôle dans la pathogénicité de *P. c. atrosepticum* vis à vis de la pomme de terre n'est pas clairement établi (Laurent *et al.*, 2000).

III. 2.1.2.b. Les protéases

L'importance de ces enzymes dans la pathogénicité sur pommes de terre a été récemment étudiée par Martis *et al* (2002), qui ont montré que des souches de *Pectobacterium carotovorum* mutantes dans la production de protéases se sont avérées moins virulentes que les souches sauvages.

Ces métalloenzymes, Zn dépendantes, ne sont pas impliquées dans la macération des tissus de pomme de terre; mais sont cependant produites pendant l'infection bactérienne (Ghigo et Wanderson, 1992). Durant cette phase, certaines protéines contenues dans les

cellules, parois cellulaires et membranes cytoplasmiques de la plante hôte, peuvent être dégradées par ces protéases pour libérer des acides aminés qui constituent une source d'azote pour le pathogène (Martis *et al.*, 2002). L'activité des protéases pourrait également être nécessaire pour inhiber les réactions de défense de la plante par dégradation des protéines de cette dernière impliquées dans les mécanismes de résistance telles les lectines (Zhang *et al.*, 1999).

III.2.2. Rôle du Quorum sensing

La production des enzymes lytiques est activée, une fois la population bactérienne a atteint un certain niveau exprimé en terme de densité de population, par Quorum sensing (Qs) (Murata *et al.*, 1994). Celle-ci représente la communication intercellulaire *via* des signaux moléculaires de la famille des *N*-acyl homosérine lactones (AHL_S) qui sont au nombre de trois chez *P. c. ssp atrosepticum* : 3-OXO-C₈-AHL, C₈-AHL et C₁₀-AHL.

Le C₃-OXO-C₆-AHL est le signal ayant une plus grande activité biologique importante dans la survie de la bactérie (Smadja *et al.*, 2004_b). Celui-ci est impliqué dans la régulation des gènes de production d'enzymes exocellulaires lytiques (Chatterjee *et al.*, 2005).

III.2.3 Autres facteurs déterminants de la pathogénicité de *Pca*

Plusieurs facteurs secondaires tels que les exopolysaccharides (EPS), les lipopolysaccharides (LPS), l'assimilation du fer (sidérophores) et la mobilité peuvent avoir un rôle plus ou moins prononcé dans la pathogénicité de *P. c. atrosepticum* bien qu'il soit difficile de différencier entre leur rôle comme déterminants de pathogénicité et leur fonction générale dans la cellule bactérienne (Pérombelon, 2002).

III.2.3.1. Mobilité

La mobilité de *P. c. atrosepticum* est assurée par les flagelles. Ceux-ci sont constitués majoritairement d'une protéine la flagelline, qui serait impliquée dans la virulence de cette bactérie sur les pommes de terre. En effet, des souches mutantes de *P. c. atrosepticum*, déficientes en protéines flagellaires, se sont révélées moins virulentes que des souches sauvages (Mulholland *et al.*, 1993).

Selon les travaux de Toth *et al.* (1999), des défauts dans la synthèse de trois protéines membranaires externes dont la flagelline, réduisent la synthèse des cellulases et des pectate lyases chez *P. c. atrosepticum* et réduisent par conséquent leur virulence dans

la pomme de terre. De même, la flagelline, reconnue par des récepteurs localisés sur les membranes plasmiques de l'hôte, serait impliquée dans l'activation d'une cascade de phosphorylation menant à l'induction d'une résistance primaire précoce de l'hôte (Dangl et Mc Dowell, 2006).

III.2.3.2. Les lipopolysaccharides

Les LPS, composants de la surface de la membrane cellulaire des bactéries Gram négatives, ont été étudiés par rapport à leur effet sur la virulence (Perombelon, 2002).

Les LPS des *Pectobacterium* peuvent être rapidement reconnus par la plante hôte qui induit des réactions de défense (Shah, 2005). En effet, selon l'étude réalisée par Mishina et Zeier (2007), une augmentation des métabolites régulatrices des réactions de défense de la pomme de terre a été observée après l'application de LPS.

III.2.3.1.3. Les sidérophores

Les sidérophores, système d'assimilation de fer chez les bactéries, seraient également un déterminant de virulence chez les *Pectobacteries* (Perombelon, 2002). Leur implication directe dans la virulence des *P. c. atrosepticum* n'est pas encore élucidée ; cependant, selon Dellagi *et al.*, (1998), les sidérophores produits par *Erwinia amylovora* (desferridoxamine) interagissent avec les peroxydases des tissus affectés des plantes hôtes pour protéger les cellules bactériennes en inhibant la génération des radicaux libres.

III.3. Molécules d'hôte impliquées dans le mécanisme de défense

Une fois les défenses passives de la pomme de terre, représentées par ses parois pectocellulosiques et ses revêtements, ont échoué (Le Poivre, 2003) ; la plante met en place une défense active et spécifique à *P. c. atrosepticum* aussitôt la perception du pathogène. Celle-ci implique la reconnaissance des éliciteurs générés par *P. c. atrosepticum* (Montesano *et al.*, 2005), dont principalement les penta et heptamères d'OG_S et l'activation d'une cascade de réactions chimiques au sein des cellules atteintes (Wegener, 2002 ; Tourte *et al.*, 2005).

Les mécanismes de défense de la plante peuvent être classés en deux catégories : défense liée aux caractéristiques structurales de la plante et défense liée à la production de molécules toxiques pour *P. c. atrosepticum*.

III.3.1. Défense liée aux caractéristiques structurales de la plante

Les différentes couches constitutives de la pomme de terre présentent une barrière physique pour ralentir la croissance de l'agent pathogène (Le Poivre, 2003). Sous l'effet indirect de la phénylalanine ammonia lyase (PAL), la production de lignine et de subérine augmente (Wegener, 2002 ; Wegener et Olsen, 2004), limitant ainsi la diffusion des enzymes pectinolytiques de la bactérie vers son milieu extracellulaire, et le passage d'eau et nutriments de l'hôte vers les cellules bactérienne (Duchoux et Nicol, 2004).

Aussi, les protéines des parois cellulaire de *Solanum tuberosum* L, riches en glycine (GRP : Glycine Rich Proteine), en proline (PRP :Proline Rich Protein), en hydroxyproline (HPRP) (Kim et Beer, 1998), sont oxydées et insolubilisées sous l'effet de la peroxydase induite lors de l'infection, et sous l'effet du H₂O₂ produit lors du choc respiratoire et lors de la réaction d'hypersensibilité (HR). Ce qui contribue à renforcer les liaisons covalentes assurant la réticulation des parois (Tourte *et al.*, 2005).

III.3.2. Production de molécules toxiques pour *Pca*

Les acides oligogalacturoniques produits sous l'action des pectinases libérés par *P. c. atrosepticum* participent comme éliciteurs dans l'amplification des réactions de défense. Ces oligomères déclenchent, sous l'effet de la polyphénol oxydase (PPO), phénylalanine ammonia lyase (PAL) et peroxydase (POD), la production de composés antibactériens appelés phytoalexines dont la plus importante est la rishitine (sesquiterpénoïde) chez la pomme de terre (Chisholm *et al.*, 2006).

La polyphénols oxydase, qui est très importante durant les premiers stades de défense de la pomme de terre, libère des substances à noyau phénoliques comme la tyrosine et l'acide chlorogénique qui sont impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques (Wegner et Olsen, 2004). La PAL quand à elle, est impliquée dans la formation d'acide cinnamique qui est très important dans la biosynthèse des polyphénols et de lignine (Hahlbrock et Sheel, 1989). Le rôle de POD n'est pas très clair mais elle serait également impliquée dans la résistance.

III.3.3. Réaction d'hypersensibilité (Mort cellulaire programmée ou Apoptose)

L'hypersensibilité est caractérisée par une mort cellulaire rapide et l'apparition des nécroses dans les tissus au site d'invasion par le pathogène (Le poivre, 2003). Elle fait suite à une production importante de formes actives d'oxygène, principalement H₂O₂

déclanchés sous l'action d'éliciteurs induits par le contact *Pca* – pomme de terre. Les formes réactives d'oxygène présentent une toxicité directe vis-à-vis de *Pca* ainsi que sur tubercule de pomme de terre, ce qui va entraver ou pour le moins ralentir la progression de *P. c. atrosepticum* (Ślesak *et al.*, 2007).

Ce temps de répit est mis à profit par les cellules voisines pour activer l'expression des gènes de défense qui codent pour la synthèse de protéines à activité antibactérienne (protéines PR) et gènes susceptibles de transmettre des signaux à l'ensemble de la plante. On parle alors de résistance systémique acquise. Ces signaux seraient de nature hormonale dont les trois plus importants sont l'acide salisique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Karola *et al.*, 2003). Ces phytohormones se répandent dans tout le tubercule et stimulent le processus de production de phytoaloxines et de protéines PR (Navarre et Mayo, 2004).

IV. Moyens de lutttes

L'essor des rendements agricoles de pomme de terre a été considérable depuis le début du 20^{ème} siècle tant dans les quantités récoltées que dans la qualité des productions. La difficulté majeure liée aux bactérioses vient du faible nombre de méthodes de lutte disponibles (Rossignol et Rousselle-Bourgeois., 1996). En effet, contrairement aux maladies fongiques, pour lesquelles des moyens de lutte peuvent inclure des traitement chimiques en cours de végétation (mildiou) ou traitement préventif par enrobage du tubercule de semence (gale argentée, fusariose) qui s'avèrent généralement efficaces, les maladies bactériennes ne peuvent faire l'objet de tels traitement pour des raisons d'efficacité ou de réglementation (l'utilisation de produits de synthèse comme les antibiotiques étant interdites dans de nombreux pays) (Helias *et al.*, 2000).

Des moyens existent déjà mais ne sont utilisés que de manière marginale et méritent donc d'être mieux exploités.

Un premier moyen de lutte alternatif envisagé est l'utilisation de plantes génétiquement modifiées permettant d'introduire une résistance à une ou plusieurs maladies. La culture de certaines variétés de pommes de terre ou de courges résistantes aux virus, commercialisées par la société MONSANTO, est déjà autorisée aux Etats-Unis. Cependant, ce moyen de lutte est essentiellement utilisé pour les virus, et dans une moindre mesure pour les champignons (Reiter *et al.*, 2002). Aussi, l'opinion publique est globalement opposée à l'idée de " manger transgénique ", en absence de certitudes sur

l'innocuité de la consommation de ces plantes pour l'homme et sur les risques de pollution de l'environnement.

Une deuxième voie alternative consiste en l'utilisation de la lutte biologique. Elle utilise des organismes vivants susceptibles d'interférer avec les bioagresseurs. Cette stratégie est utilisée avec succès dans la lutte contre certains insectes ravageurs. De même, un certain nombre de micro-organismes permettant de lutter contre certaines maladies sont déjà disponibles à la vente.

Actuellement, la lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre et de la pourriture molle en particulier, fait appel presque exclusivement à des mesures prophylactiques (Yaganza, 2005). Les mesures culturales incluant des rotations, l'élimination de résidus de cultures et éventuellement de mauvaises herbes ou la désinfection régulière du matériel agricole et des locaux de conservation comptent parmi ces mesures.

Il s'avère donc nécessaire de développer de nouveaux traitements pour le contrôle post-récolte des maladies de la pomme de terre, qui soient à la fois bénéfiques pour le producteur, le consommateur et l'environnement.

De nombreux travaux ont montré que plusieurs métabolites secondaires des végétaux, dont les polyphénols, jouent un rôle important dans la défense de la plante contre les stress biotiques et abiotiques. L'utilisation de ces composés pourrait donc constituer une alternative intéressante pour contrôler les maladies des tubercules entreposés

V. Les composés phénoliques : Métabolites secondaires de plantes

Tout comme les éléments nutritifs, les plantes produisent des composés non nutritifs nommés composés secondaires ou allélochimiques. Ces composés secondaires se divisent en deux catégories principales à base de carbone: les terpénoïdes et les composés phénoliques. Ces métabolites sont généralement produites en réponse à des stress biotiques et abiotiques incluant les attaques de microorganismes pathogènes (Fiehn, 2002). Dans le présent travail on s'intéressera uniquement aux polyphénols comme métabolites secondaires.

V.1. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols, également dénommés composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances ayant des structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Mompon *et al.*, 1998). Plus de 8000 composés naturels, qui ne représentent pas plus de 10% des composés présents dans la nature, ont été isolés (Hennebelle *et al.*, 2004).

Structuralement, ils sont caractérisés par la présence d'au moins d'un cycle aromatique (C6), auquel sont directement liés un ou plusieurs groupement hydroxyles (OH) libres ou engagés dans d'autres fonctions (glucosidique, esters, éther ...etc.) (Bruneton, 1999 ; Ryan *et al.*, 2002).

V.1.1. Principales classes de composés phénoliques et leurs propriétés

Les composés phénoliques, souvent sous forme glycosilée, se répartissent dans différentes classes qui présentent un grand nombre de structures, différente par le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthoxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées) (Bruneton, 1999). Les représentants les plus nombreux (plus de 6000 molécules isolées) et dont les propriétés sont plus connus en sont les flavonoïdes (Erlund, 2004). Néanmoins, de nombreuses autres structures existent, tels que les acides phénoliques, tanins hydrolysables, coumarines, lignanes et quinones.

La classification récente de ces composés les sépare, basée sur le nombre de noyaux phénols, en deux catégories : les polyphénols complexes et les composés phénoliques simples (Clifford, 1999).

V.1.1.1. Les composés phénoliques simples

V.1.1.1.A. Les acides phénoliques

Ce sont des composés possédant une fonction acide en plus de la fonction phénol (Hennebelle *et al.*, 2004), représentés par deux groupes essentiels: les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ils sont constitués d'un noyau phénolique et d'une chaîne latérale insaturée en C₃ (Bruneton, 1999). Ces acides abondant dans les aliments se présentent sous forme d'esters, soit solubles s'accumulant dans les

vacuoles, ou bien insolubles comme constituants de la paroi cellulaire (Manach *et al.*, 2004).



Figure 2 : Structures chimique de base d'acides phénoliques (Zuo *et al.*, 2002)

• Propriétés

Les acides phénoliques présentent plusieurs activités biologiques dont des propriétés antibactériennes.

Selon Ahn *et al.* (1998), l'acide gallique et ses esters méthylés ont des effets inhibiteurs prononcés sur plusieurs bactéries intestinales. D'autres acides phénoliques simples, dont l'acide vanillique et caféique se sont avérés des composés antimicrobiens actifs contre plusieurs bactéries, certains champignons ainsi que sur l'inhibition de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* (Aziz *et al.*, 1998).

Aussi, d'après King *et al.* (1999), certaines dérivés de l'acide caféique sont des inhibiteurs potentiels de l'intégrase du HIV (enzyme catalysant l'intégration de l'ADN du virus HIV dans la chromatine de l'hôte).

D'autres propriétés sont également attribuées aux acides phénoliques. Ces derniers ainsi que leurs esters, pourraient avoir des activités antitumorales contre le cancer du colon (Rao *et al.*, 1993). Des activités antioxydants remarquables leurs sont attribuées (Rice-Evans *et al.*, 1996). Les principales propriétés biologiques de ces composés sont résumées dans le tableau II

V.1.1.1.B. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent un groupe de polyphénols complexes dont la structure comprend deux noyaux aromatiques et un hétérocycle oxygéné de structure C6-C3-C6. Ces substances existent à l'état libre sous forme liposolubles ou d'hétérosides hydrosolubles (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Selon la nature de l'hétérocycle on distingue : Les flavones dont font partie la lutéoline et l'apigénine (Manach *et al.*, 2004), les flavonols (exemple la quercétine), les flavanones représentés principalement par la naringénine, hespéritine sous forme d'aglycone et les flavanes (Ghedira, 2005),

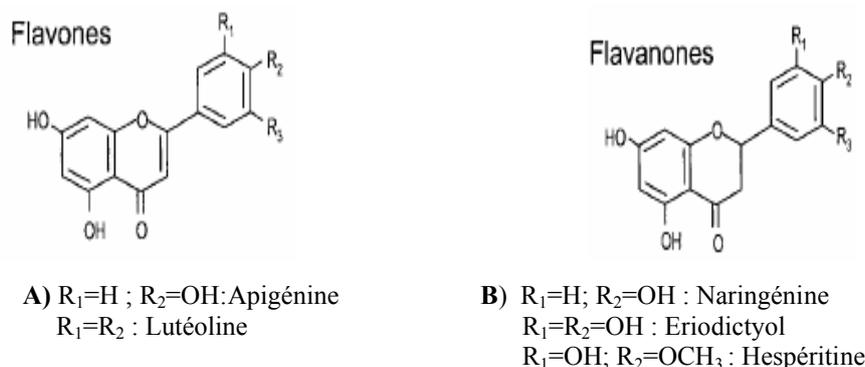


Figure 3 : Structures chimiques des flavonoïdes (Manach *et al.*, 2004)

• Propriétés

Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical. Etant synthétisés par les plantes en réponses à des attaques microbiennes, il n'est pas surprenant que les flavonoïdes soient dotés de propriétés antimicrobiennes (Rauha *et al.*, 2000). En effet, certains flavonoïdes dont la lutéoline sont reconnus pour être des antibactériens efficaces contre plusieurs bactéries (Tsuchiya *et al.*, 1996). L'activité antibactérienne de ces composés sont résumés dans le tableau III.

D'autres propriétés biologiques leurs sont également attribuées. Yamasaki *et al.* (1997) ont montré que certains flavonols sont de puissants antioxydants en piégeant directement le H_2O_2 en présence de la peroxydase. Ces composés peuvent aussi empêcher l'apparition du diabète ou du moins le réduire (Halliwell *et al.*, 2005). Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduire le risque des maladies cardiovasculaires (Hertog, 1993).

V.1.1.2. Les composés phénoliques complexes : les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques complexes largement répandus dans le régime alimentaire d'origine végétal obtenus à partir de la condensation des phénols simples (Makkar, 2003). Ils représentent des composés phénoliques secondaires connus

essentiellement pour leur capacité de se lier et de précipiter les protéines et autres macromolécules (Hagerman *et al.*, 1998). Swain (1979) a divisé les tannins en quatre groupes dont deux groupes principaux

1. les tannins hydrolysables,
2. les tannins condensés (les proanthocyanidines),
3. les oxytannins,
4. les beta-tannins et les prototannins.

Les oxytannins, les beta-tannins et les prototannins ont des poids moléculaires faibles et sont considérés comme étant les précurseurs de molécules tanniques (Haslam, 1996). Les deux principaux groupes, les tannins hydrolysés et les tannins condensés, sont largement distribués dans différentes familles de plantes vasculaires.

V.1.1.2.A. Les tannins hydrolysables

Ce groupe de tannins est constitué des formes désoxydées des acides phénoliques simples, comme l'acide gallique et sa forme dimère (gallotannin), l'acide éllagique (ellagitannin), qui s'agglomère avec le glucose (généralement avec D-glucose) (Bruneton, 1999).

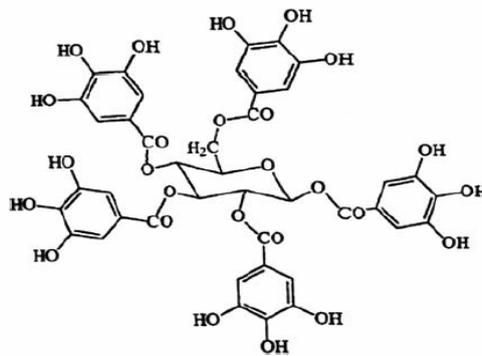


Figure 4 : Structure chimique de tannins hydrolysable (Smith *et al.*, 2005)

V.1.1.2.B. Les tannins condensés :

Les tannins condensés (proanthocyanidines) forment le groupe de tannins le plus important dans plusieurs espèces de plantes vasculaires (Swain, 1979). Ce sont des oligomères et polymères de flavan-3-ol (catechines) liés entre eux par des liaisons carbone (Bruneton, 1999).

Les tannins condensés les plus communément présents dans les plantes sont les procyanidines, qui dérivent de catechines ou d'epicatechines pouvant contenir des esters d'acide gallique.

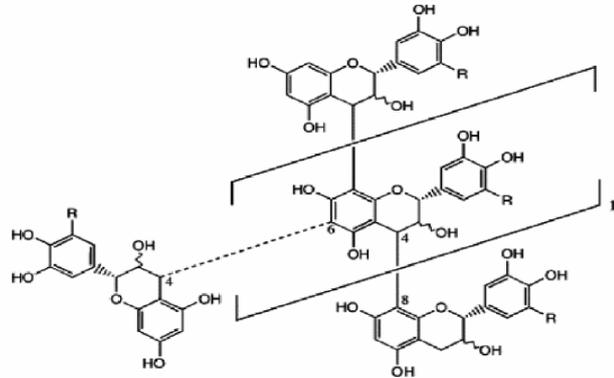


Figure 5 : Structure chimique de tannins condensés (Smith *et al.*, 2005)

• Propriétés

La caractéristique la plus déterminante des tannins est leur capacité de former des complexes (par précipitation) avec les polymères naturels comme les protéines nutritives, les enzymes digestives, les polysaccharides (l'amidon, la cellulose, l'hémicellulose etc.) (Makkar, 2003).

Ces composés peuvent créer des liaisons avec les autres macromolécules de quatre façons : Des interactions covalentes, des interactions ioniques, des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobiques. La grandeur et la structure de la molécule polyphénolique est importante dans cette interaction (Hagerman et Butler., 1981).

De plus, ces derniers sont capables de précipiter les ions métalliques et particulièrement le fer (Hagerman *et al.*, 1998). Ces caractéristiques leur confèrent des propriétés biologiques importantes. Leur potentiel antimutagenique et anticarcinogénique pourrait être relié à leurs propriétés antioxydatives, importantes dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Okuda *et al.*, 2005). L'activité antimicrobienne des tannins a été également rapportée par plusieurs auteurs (Cowan, 1999 ; Taguri *et al.*, 2004 ; Taguri *et al.*, 2006).

Le tableau II résume les différentes activités biologiques principales des composés phénoliques.

Tableau II : Activité biologique des composés phénoliques

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénoliques (cinnamique et benzoïque)	<ul style="list-style-type: none"> √ Antibactériennes √ Antifongiques √ Antioxydantes √ Anticarcinogène 	<ul style="list-style-type: none"> - Aziz <i>et al.</i> (1998). - Rice-Evans <i>et al.</i>, 1996 - Yamada et Tomita., 1996
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> √ Antitumorales √ Anticarcinogènes √ Anti-inflammatoires √ Hypotenseurs et diurétiques √ Antioxydantes. √ Réduction des maladies cardiovasculaires chroniques 	<ul style="list-style-type: none"> - Cowan. (1999) - Okamura <i>et al.</i> (1993) - Tsuchiya <i>et al.</i>(1996) - Bruneton (1999) - Halliwell <i>et al.</i> (2005) - Rauha <i>et al.</i> (2000)
Tannins gallique et catéchiques	<ul style="list-style-type: none"> √ Antioxydantes 	<ul style="list-style-type: none"> - Okuda <i>et al.</i> 1983 - Okamura <i>et al.</i> 1993

Malgré leur fonction de métabolites secondaires répandus dans le règne végétal, les composés phénoliques sont d'ores et déjà connus pour leurs propriétés biologiques diverses mais aussi leurs activités antimicrobiennes (Okuda *et al.*, 2005). Les différentes classes des composés phénoliques présentant des activités antibactériennes, avec leurs modes d'actions sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau III : Action antibactérienne des polyphénols

Classe	Exemple	Mécanisme d'action	Auteur (s)
Composé phénolique simples (Acides phenoliques)	Acides cinnamique	<ul style="list-style-type: none"> √ Prévation du substrat √ Rupture de membrane cellulaire √ Inhibition d'enzyme bactérienne 	<p>Toda <i>et al</i> (1992)</p> <p>Fernandez <i>et al</i> (1996)</p> <p>Peres <i>et al</i> (1997)</p>
Flavonoides Flavones	Cryisine	<ul style="list-style-type: none"> √ Liaison aux adhesine √ Complexation avec la paroi cellulaire √ Innactivaon d'enzymes 	<p>Rojas <i>et al.</i> (1992)</p> <p>Perrett <i>et al</i> (1995)</p> <p>Cowan (1999)</p>
Tannins		<ul style="list-style-type: none"> √ Liaison aux proteines √ Liaison aux adhesine √ Prévation du substrat √ Rupture de membrane cellulaire √ Complexation avec la paroi cellulaire √ Inhibition d'enzymes √ Complexation aux ions metaliques 	<p>Ikigai <i>et al</i> (1993),</p> <p>Hagerman (1998),</p> <p>Cowan (1999),</p> <p>Yoshida (2000),</p> <p>Okuda (2005)</p>

*Partie
expérimentale*

Matériel & méthodes

I. Matériel végétal

I.1. Origine des échantillons

Les feuilles de *Salvia officinalis* L. (sauge) ont été récoltées aléatoirement pendant le mois de février 2006 au niveau de la wilaya de Bejaia.

Les feuilles d'*Olea europaea* L. (olivier) sont récoltées aléatoirement en fin février 2006 à partir d'arbres identifiés comme étant appartenant à la variété Chemlal dans un verger oléicole à Taourirt Larbaa, au niveau de la commune de Oued Ghir, wilaya de Bejaia.

Un échantillon du grignon d'olive de la variété Chemlal, fraîchement extrait par un système à trois phases, est récolté en fin janvier 2006 dans une huilerie moderne au niveau de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV) de Takrietz, située dans la commune de Souk-Oufella, wilaya de Bejaia.

I.2. Séchage

Juste après récolte, l'humidité des échantillons a été évaluée par dessiccation à $105 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 4 heures dans une étuve de marque BINDER (Doymaz *et al.*, 2004).

Les feuilles de *S. officinalis* et d'*O. europaea* sont lavées à l'eau potable pour éliminer tous débris de poussière et de sol, et diminuer la charge microbienne sur les feuilles.

Les trois échantillons ont subi un séchage à l'air libre pendant 20 jours pour les feuilles *S. officinalis* et d'*O. europaea* et 45 jours pour le grignon d'olive (figure 5), dans un endroit ombragé sec pour atteindre un taux de matière sèche avoisinant 90% (Pereira., 2000).

Le taux de matière sèche de chaque échantillon est évalué selon la méthode de Doymaz *et al.* (2004). Avant broyage, les échantillons sont conservés dans des sacs de polyéthylène à l'abri de la lumière en présence de gel de silice.



Feuilles de *S. officinalis* non séchées



Feuilles de *S. officinalis* séchées



Feuilles d'*O. europaea* variété Chemlal non séchées



Feuilles d'*O. europaea* séchées



Grignon d'olive non séché



Grignon d'olive après séchage



Pomme de terre variété Désiré

Figure 6 : Matériel végétal utilisé

I.3. Broyage et tamisage

Les feuilles de *S. officinalis* et d'*O. europaea* sont d'abord broyées avec un broyeur de marque IKA basic 11A, avant d'être tamisées par un tamis de porosité 0,5mm. Tandis, qu'un simple tamisage (porosité 0,5 mm) est pratiqué sur l'échantillon du grignon d'olive afin de séparer les débris de la coque et de la pulpe (Pereira, 2000).

Les poudres obtenues sont conservées à température ambiante, à l'abri de la lumière dans des bocaux en verre opaques préalablement séchés à l'étuve.

II. Extraction des composés phénoliques

Après une étude bibliographique sur les différents solvants et procédés d'extraction utilisés, nous avons opté pour le protocole de Wong *et al* (2006) basé sur la séparation des composés phénoliques solubles par diffusion, à partir d'une matrice solide (plante) en utilisant une matrice liquide (acétone et méthanol aqueux), pour libérer les polyphénols présents dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion (Robards, 2003).

20g de poudre, de chaque échantillon, sont extraites au moyen de 400 ml de solvant organique aqueux, méthanol/eau (80%) et acétone/eau (70%) à température ambiante pendant 24 heures et sous agitation magnétique. Le mélange est centrifugé à 3060g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse (SIGMA 2-15). Le surnageant est filtré sous vide en utilisant une membrane en nylon, suivi d'une concentration sous vide au rotavapeur (RV 05- ST) à 40°C (figure n°6).

Pour éviter toutes possibilités d'interférence avec des pigments et lipides, une dépigmentation, délipidation est effectuée sur les extraits concentrés en utilisant l'éther de pétrole pour l'extrait de feuilles de *Salvia officinalis* (Djeridane *et al.*, 2006) et l'hexane pour les extraits de grignon et des feuilles d'olivier (*Olea europaea*) (McDonald *et al.*, 2001).

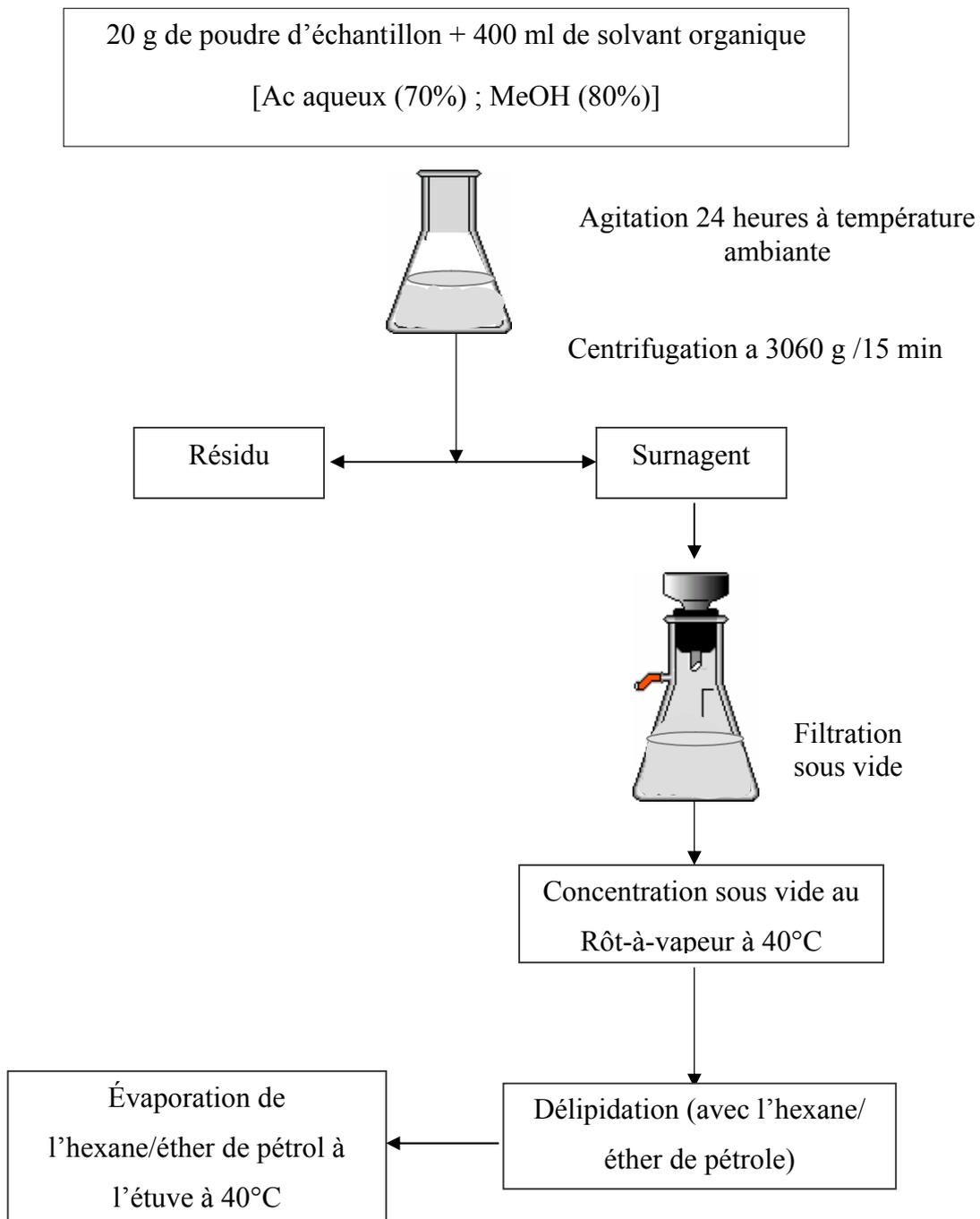


Figure 7 : Protocole d'extraction des polyphénols à partir des échantillons

Dans des ampoules à décanter, les extraits concentrés sous vide sont lavés par demi-volume (200 ml) de solvant approprié à trois reprises. Une phase sombre (extrait délipidé) et une phase organique claire sont clairement séparé comme illustré dans la figure suivante.

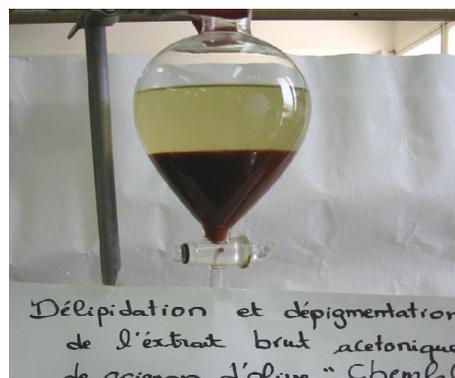


Figure 8 : Extrait de plante délipidé

À l'issue du troisième lavage, la phase contenant l'extrait est récupérée, puis soumise à une évaporation à l'étuve à 40°C jusqu'à évaporation complète des solvants (éther et hexane). Les extraits secs obtenus sont pesés pour estimer le rendement d'extraction, et gardés à l'abri de la lumière dans un dessiccateur maintenu sous vide.

III. Dosages colorimétriques

III.1 Dosage des polyphénols totaux

Les concentrations en polyphénols totaux sont estimées selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) qui est considérée parmi les meilleurs méthodes de quantification des polyphénols totaux des extraits de plantes (Robards, 2003).

L'oxydation des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu résulte de la réaction entre l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$) en milieu alcalin. Cette réduction se traduit par l'apparition d'une coloration bleue formée d'un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (M_8O_{23}) qui sont proportionnels à la concentration en polyphénols dans le mélange (Blouin *et al.*, 1998).

L'extrait sec de chaque plante est dissout dans de l'eau distillée pour obtenir un extrait brut de concentration 1mg/ml. 100 μ l de la solution sont additionnés par 500 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (1N), et le mélange est dilué par ajout de 6 ml d'eau distillée, puis agité

vigoureusement. Après 5 min, 1500 µl de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% sont ajoutés et le volume est ajusté à 10 ml par l'eau distillée. Un témoin, contenant tous les réactifs, excepté l'échantillon, est préparé dans les mêmes conditions. Le mélange réactionnel est laissé à l'obscurité et à température ambiante. Après 2 heures, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 760 nm.

Une courbe standard d'acide gallique allant de 0,1 à 0,9 mg/ml est préparée dans les mêmes conditions de dosage des échantillons, et les résultats sont déterminés à partir de l'équation de la courbe étalon ($y = 1,1259 x$, $R^2 = 0,9971$) (Annexe 4). Les polyphénols totaux sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche d'échantillon (mg EAG/MS), trois répétitions sont réalisées pour chaque échantillon.

III.2 Dosage des tannins

Dans la présente étude, nous avons utilisé le protocole de précipitation des protéines (BSA), proposé par Hagerman et Butler (1978), pour estimer le contenu en tannins totaux. Cette méthode est recommandée pour sa précision et sa reproductibilité par rapport à d'autres méthodes (test à la vanilline, test au nitrite de sodium...etc.) dont la répétitivité et sensibilité sont souvent problématiques (Schofield *et al.*, 2001).

Cette méthode qui utilise la sérum albumine bovine (BSA), est basée sur l'aptitude des tannins à précipiter les protéines formant ainsi un complexe insoluble tannins-BSA. Ce précipité, une fois dissout dans une solution alcaline (SDS/TEA), forme un complexe ions ferriques-polyphénols de couleur bleue-vert-violacée. Cette concentration, proportionnelle à la concentration en tannins, est mesurée au spectrophotomètre à 510 nm (Ribereau-Gayon, 1968).

2 ml de la solution BSA sont ajoutés à 1 ml de solution d'extrait brut, de concentration 1mg/ml. Après 24 heures d'incubation à 4°C, une centrifugation est réalisée à 3060 g pendant 15 min. Le culot récupéré est dissout dans 4 ml de la solution SDS-TEA pendant 15 min, puis additionné à 1 ml de chlorure de fer (FeCl_3).

Le mélange réactionnel est agité vigoureusement avant d'être laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 15 min. Les absorbances des échantillons sont lues à 510 nm contre un blanc contenant le même mélange réactionnel à l'exception de l'extrait. Les résultats sont

rapportés en mg équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS) à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage réalisée à différentes concentrations d'acide tannique allant de 0,01 à 0,12 mg/ml et représentée en moyenne de trois répétitions (moyenne \pm EC) (Annexe 4).

III.3. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode colorimétrique de Lamaison et Carnat (1990) rapportée par Bahorun *et al.* (1996). Cette méthode est basée sur la formation de complexes jaunâtre suite à la chélation de métaux Al^{3+} , utilisés sous forme de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), par les groupements OH. La coloration ainsi formée est proportionnelle au taux de flavonoïdes dans le mélange (Ribereau-Gayon, 1968).

2 ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium hydraté ($AlCl_3, 6 H_2O$) à 2% sont additionnées à 2 ml d'extrait brut (1mg/ml). Le mélange est vigoureusement homogénéisé et laissé reposer pendant 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances des échantillons sont lues au spectrophotomètre à 430 nm contre un blanc contenant 2 ml de solvant et 2 ml de la solution $AlCl_3$. Des concentrations de quercétine allant de 0,001 à 0,015 mg/ml sont utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage, et les résultats sont rapportés en mg équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage et représentés en moyenne de trois répétitions (Annexe 4).

IV. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits de plantes

IV.1. Culture bactérienne

Dans cette étude, une souche de *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum* (*Pca 86/20*), provenant de la Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (CFBP) d'Angers, France, a été utilisée.

La souche conservée en milieu Luria Bertani (LB) (Annexe 3), est revivifiée par ensemencement des colonies dans 5 ml de bouillon de culture Levure Peptone (LP), le milieu est maintenu sous agitation pendant 24 heures dans un bain marie thermostaté à 24°C (Basim *et al.*, 2006). La souche est ensemencée sur milieu gélosé solide King B, puis incubée à 24°C pendant 24 heures.

La souche (*Pca 86/20*) a été standardisée dans les conditions de laboratoire en dressant une courbe étalon de différentes dilutions de la souche dans l'eau distillée stérile et l'absorbance de chaque dilution est lue au spectrophotomètre à 580 nm (Smadja *et al.*, 2004). Parallèlement, 100µl de chaque dilution a été ensemencée sur milieu King B en moyenne de trois boîtes de pétri pour chaque dilution. Celle-ci sont incubées à 24°C et les boîtes présentant un nombre inférieur à 300 colonies ont été dénombrées.

IV.2. Préparation des extraits de plantes

Les extraits bruts sont dissouts dans l'eau distillée à une concentration finale de 400 mg/ml puis stérilisés par filtration sur membrane (0,45 µm). Deux solutions mères de composés phénoliques de synthèse (acide gallique et tannique) sont préparées à une concentration finale de 25 mg/ml pour l'acide tannique et 50 mg/ml pour l'acide gallique.

Une série de dilutions (à 1/2) de solutions mères sont préparées à partir de chaque extrait stérile avec concentration allant de 400 mg /ml à 12,5 mg/ml pour les six extraits de plantes, et une concentration allant de 50 mg/ml à 1,562 mg/ml pour les deux composés de synthèse.

IV.3. Détermination de l'effet antibactérien *in vitro*

IV.3.1. Diffusion sur milieu gélosé

La méthode décrite par Baydar *et al.* (2004) et Natarajan *et al.* (2005) est utilisée pour déterminer l'effet des extraits de plantes étudiés sur la croissance de *Pca in vitro*. La diffusion sur milieu gélosé est très employée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de substances antimicrobiennes naturelles et d'extraits de plantes.

Ce test est basé sur l'utilisation des disques comme réservoir contenant la solution de substances à examiner. Ces composés diffusent à partir des disques dans le milieu gélosé pour interagir avec les bactéries ensemencées (Bartner *et al.*, 1994).

La suspension bactérienne a été préparée à partir d'une culture de 24 heures dans l'eau distillée stérile. Celle-ci est ajustée jusqu'à obtention d'une absorbance de 0,9 à 580 nm correspondant à 10^8 UFC/ml. Cette suspension est diluée à 10^2 pour obtenir un inoculum correspondant à 10^6 UFC/ml. La surface du milieu gélosé stérile de Muller-Hinton (MH) a été ensemencée uniformément par 100 μ l de la suspension, et des disques de papier filtre stériles de 5 mm de diamètre sont déposés sur la gélose, et imprégnés de 10 μ l de l'extrait aqueux de différentes concentration.

Un témoin est réalisé avec de l'eau distillée stérile, et les boîtes de pétri sont incubées à 24°C pendant 24 heures. L'effet des extraits est évalué par la mesure du diamètre des zones d'inhibition présentes autour des disques exprimés en mm. Tous les tests sont effectués en trois répétitions.

IV.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu gélosé

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées par la méthode de Taguri *et al.* (2004).

1 ml de chaque extrait, de concentration allant de 400 mg/ml à 12,5 mg/ml pour les extraits végétaux, et de 25 mg/ml à 0,78125 mg/ml pour les extraits de synthèse, est mélangé avec 9 ml de milieu gélosé de MH en surfusion à 46°C, puis coulé directement sur boîtes de pétri stériles (50 mm de diamètre). La suspension bactérienne est ajustée à une densité

bactérienne de 10^6 UFC/ml à 580 nm. Et des spots de 10 μ l sont déposés sur le milieu solide, puis les boîtes sont incubées à 24°C pendant 48 heures.

Les concentrations minimales requises (CMI) pour inhiber la croissance de *Pca* sont déterminées par observation, à l'œil nu, de l'absence de colonies correspondant à une inhibition de la croissance de *Pca*.

IV.4. Effet des extraits de plantes sur le développement de pourriture molle sur demi-tubercule

Les bactéries sont cultivées sur milieu King B à 24°C pendant 24 heures. Pour l'inoculation des tubercules de pomme de terre. Une suspension bactérienne est préparée dans de l'eau distillée stérile, puis la solution est ajustée à une absorbance de 0,9 à 580 nm correspondant à une concentration bactérienne de 10^8 UFC/ml (Ibrahim *et al.*, 1978)

Les tubercules de pomme de terre apparemment sains, sont lavés à l'eau de robinet puis désinfectés pendant 15 minutes dans 20% d'éthanol (v/v) et sont par la suite rincés avec l'eau distillé stérile et laissés sécher à l'air libre dans une zone aseptique (Priou *et al.*, 1992).

IV.4.1. Inoculation des demi-tubercules de pomme de terre par *Pca* seule

Chaque tubercule est coupé longitudinalement en deux parties égales, un puit de 10 mm de diamètre x 10 mm de profondeur est creusé au centre de chaque demi tubercule avec un emporte pièce stérile, puis inoculé par 100 μ l de la suspension bactérienne de 10^8 (Ibrahim *et al.*, 1978).

Pour chaque demi-tubercule inoculé, un témoin est réalisé sur la deuxième moitié du tubercule en remplaçant la suspension bactérienne par l'eau distillée stérile de même volume. Les demi-tubercules inoculés sont déposés sur du papier absorbant humidifié et couverts par un film en plastique dans des bacs en plastique à couvercle pour maintenir une humidité relative élevée (Priou *et al.*, 1992).

Après 5 jours d'incubation à température ambiante (22 à 27°C), nous avons procédé à l'observation des résultats d'incubation pour noter la présence ou l'absence de pourriture molle afin de confirmer la pathogénicité de la souche utilisée. Nous avons réalisé ce test sur 3 tubercules.

IV.4.2. Inoculation des tubercules de pomme de terre par *Pca* en présence d'extraits de plantes

Après confirmation de la pathogénicité de la souche *Pca* 86/20 sur tubercules de pomme de terre « variété Désirée », nous avons évalué l'effet des extraits bruts sur le développement de la pourriture molle sur demi-tubercules de pomme de terre.

La même méthode que celle décrite précédemment est réalisée avec quelques modifications.

Quatre concentrations de solutions aqueuses stériles d'extraits de plantes, allant de 400 mg/ml à 50 mg/ml avec des dilutions à 1/2 à partir de la solution mère, sont testées.

Un volume de 100 µl d'extrait à tester est déposé sur demi-tubercule, le demi-tubercule restant est utilisé comme témoin en remplaçant l'extrait de plante par l'eau distillée stérile. Pour chaque concentration d'extrait testé, cinq tubercules de pomme de terre sont utilisés. Les demi-tubercules présents dans les bacs en plastique humidifiés sont laissés à température ambiante. Après 48 heures, 100µl de la suspension bactérienne (10^8 UFC/ml) sont ajoutés aseptiquement.

Après incubation à température ambiante (22 à 27°C) pendant 5 jours, les tissus pourris sont prélevés par une spatule, puis pesés par une balance analytique (Sartorius BP 1215). Les résultats (poids des tissus pourris) sont exprimés en % du témoin pris comme base de cent. La figure 8 résume les différentes étapes suivies pour ce test.

V. Analyse statistique

Tous les tests sont réalisés en trois répétitions, excepté pour l'étude de l'effet des extraits sur demi-tubercules où chaque essai est testé sur 5 demi-tubercules.

Une analyse de la variance ANOVA à un facteur est réalisée au moyen du logiciel STATISTICA 5.5 Fr pour le test d'humidité. L'analyse statistique des résultats de dosage colorimétriques et des résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des extraits (effet *in vitro* et sur demi tubercules) ont été réalisés par l'analyse de la variance à deux facteurs par le même logiciel (annexe 6).

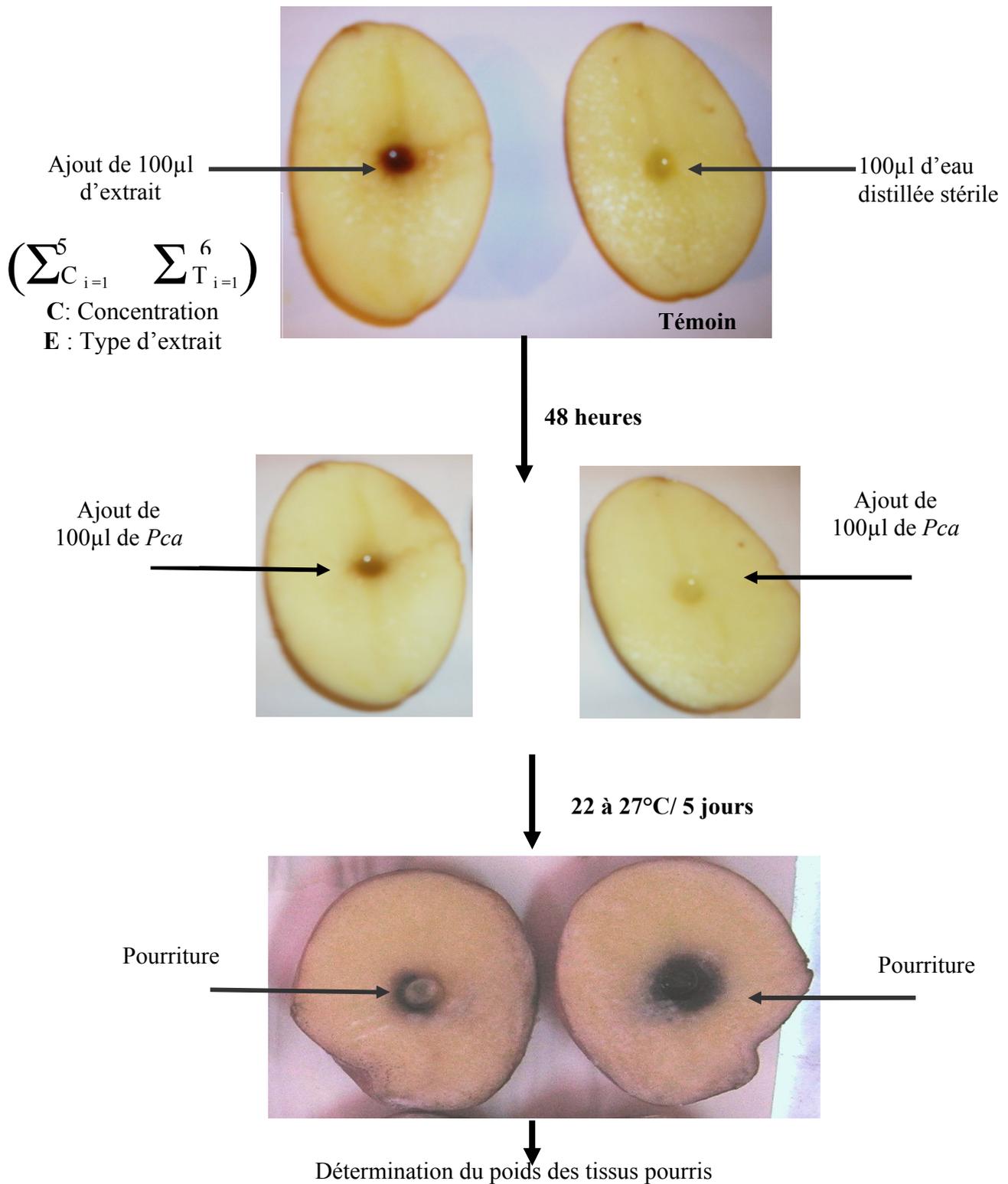


Figure 9 : Schéma de test d'inoculation des demi tubercules

Résultats & discussion

Résultats et discussion

I. Teneurs en humidité

Les résultats de la figure 9 ont montré des taux d'humidité initiale relativement élevés avec des différences hautement significatives ($P < 0,001$) entre les substrats. Les feuilles de *Salvia officinalis* présentent le taux d'humidité le plus élevé ($68,54 \pm 0,33\%$ contre $49,06 \pm 0,24\%$ et $46,94 \pm 0,39\%$ respectivement pour le grignon d'olive et les feuilles d'*O. europaea*).

Selon Slakinove *et al.* (1996), le séchage des plantes surtout ayant un taux d'humidité élevé, est recommandé avant l'étape d'extraction qui généralement ne peut être réalisée aussitôt après la collecte des échantillons.

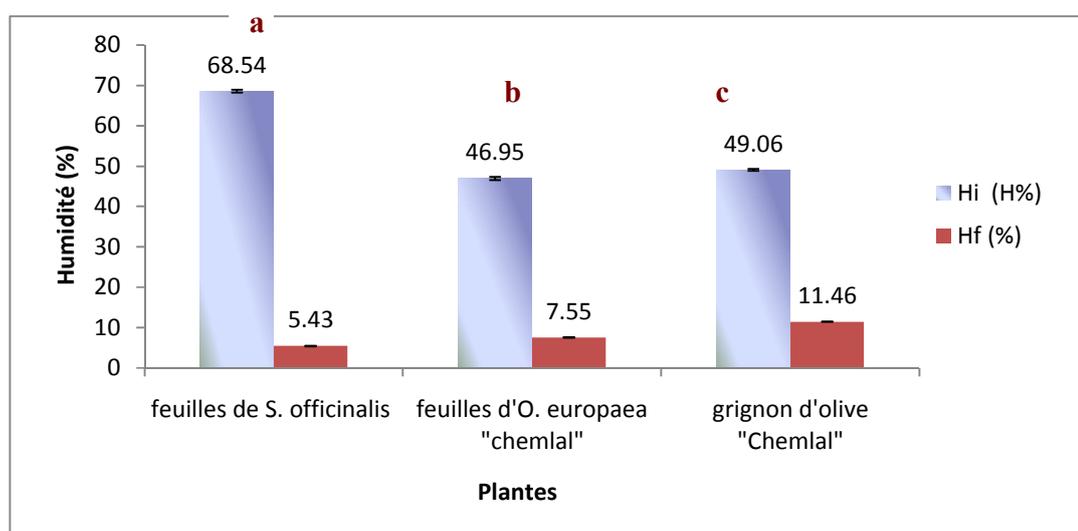


Figure 10 : Taux d'humidité des échantillons

Les taux d'humidité rapportés par Venskutonis (1997) pour les de feuilles de *S. officinalis*, Martin-Garcia *et al.* (2006) pour les feuilles d'*O. europaea* (42,4%), et Akgun et Doymaz (2005) pour le grignon d'olive (44,78%) sont similaires à nos résultats. Après

séchage ces taux d'humidités sont ramenés à 5,43, 7,55 et 11,46% respectivement pour *S. officinalis*, feuilles d'*O. europaea* et grignon d'olive.

II. Rendement en extrait sec

La figure 10 montre que les rendements en extraits secs obtenus avec les extraits acétoniques (EAc 70%) sont légèrement plus élevés que ceux obtenus avec les extraits méthanoliques (E MeOH 80%).

Cette différence, bien qu'elle ne soit pas significative ($P > 0,05$), est, selon certains auteurs, due à la polarité des solvants utilisés qui est proportionnelle aux rendements des extraits secs (Salisova *et al.*, 1997 ; Turkmen *et al.*, 2006). Selon Robards (2003), le grand pouvoir extracteur de l'acétone aqueux est due à sa capacité à lyser les membranes cellulaires et à libérer les composés cellulaires affectant ainsi les propriétés physiques des composés phénoliques telles que la densité et la viscosité. Ces deux paramètres vont à leurs tour augmenter les taux de diffusion et d'extraction de ces composés.

Nous notons également que quelque soit le solvant utilisé, les rendements en extraits secs sont plus élevés pour les feuilles d'*O. europaea* L. suivis des feuilles de *Salvia officinalis* L. et du grignon d'olive respectivement.

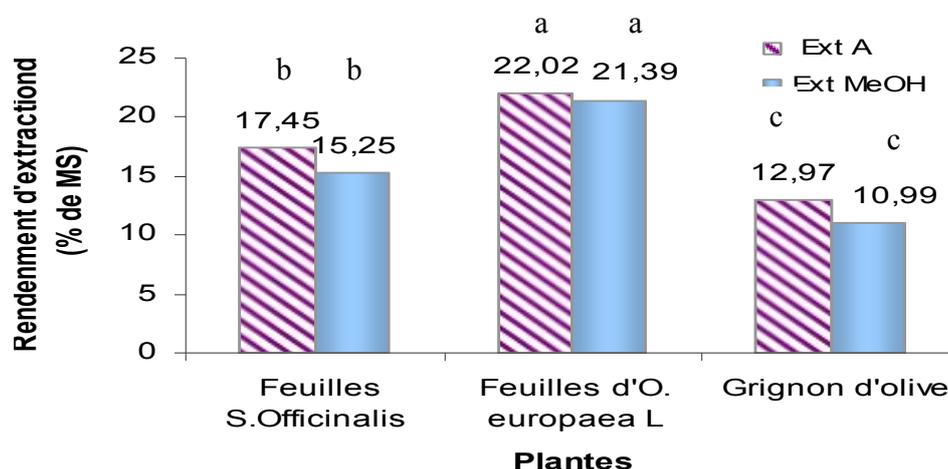


Figure11: Rendement d'extraction avec l'acétone (70%) et le méthanol (80%)

Les valeurs portant des lettre différentes sont différentes significativement ($P < 0,05$) Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c$.

La figure 11, montre clairement que sur les trois échantillons étudiés, l'acétone a donné les concentrations les plus élevées en polyphénols totaux pour les feuilles de *S. officinalis* et le grignon d'olive comparé au méthanol aqueux. Ces résultats corroborent les données bibliographiques rapportées par de nombreux auteurs (Areias *et al.*, 2000 ; Dorman *et al.*, 2003). Par ailleurs, les teneurs les plus élevées en polyphénols ont été obtenues dans les feuilles d'olivier par l'utilisation du méthanol aqueux.

Aussi, la concentration en composés phénoliques dépend de la nature du matériel végétal. En effet, les feuilles d'olivier et de *S. officinalis* ont donné les concentrations les plus élevées en comparaison avec grignon d'olive ($p < 0.05$). Les faibles concentrations en polyphénols dans le grignon d'olive seraient dues à leur élimination dans les margines et l'huile durant la trituration des olives. Les feuilles d'olivier, sont considérées comme une source majeure de production de polyphénols par rapport aux autres parties de l'olivier, et contiennent les teneurs les plus élevées (Ryan *et al.*, 2002).

La concentration en polyphénols totaux de l'extrait acétonique des feuilles de *S. officinalis* ($42,59 \pm 0,2$ mg EAG/g MS) est similaire à celle rapportée par Dorman *et al.* (2003) ($41,5$ mg EAG/g de MS) et légèrement plus élevée que les résultats de Gulçin *et al.* (2004) ($35,24 \pm 4,48$ mg EAG/g de MS). La concentration de l'extrait acétonique des feuilles d'*O. europaea* ($35,07 \pm 0,14$ mg EAG/g MS) s'avère également similaire à celle de Ferreira *et al.* (2007) ($36,05$ mg EAG/g MS).

Pour la concentration en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique des feuilles de *S. officinalis* ($29,84 \pm 0,1$), elle est légèrement supérieure aux données de Miliuskas *et al.* (2004) ($23,6 \pm 0,9$). Aussi, les mêmes observations sont notées avec l'extrait méthanolique des feuilles d'*O. europaea* ($43,30 \pm 0,24$) qui est plus élevée que celles obtenues par Martin Garcia *et al.* (2006) et Ferreira *et al.* (2007) qui ont obtenu des concentrations 41,57% et 70,67% plus faibles respectivement.

Les valeurs obtenues avec le grignon d'olive MeOH ($11,57 \pm 0,13$ mg EAG/g de MS) sont très proches de celles rapportées par Martin Garcia *et al.* (2003).

Les écarts trouvés entre les résultats obtenus et les données des différents auteurs déjà cités sont tout à fait justifiés. En effet les conditions d'extraction en termes de température et le nombre d'étapes d'extraction (Escribano-Baillon et Santos-Buelga., 2003 ; Scalbert, 1991)

ainsi que l'état et l'origine de l'échantillon en terme de provenance géographique, saison de collecte et cultivar ne peuvent pas être exclus (Ranalli *et al.*, 2006).

III.2. Tannins

Les résultats des dosages ont mis en évidence la présence de tannins totaux dans les trois échantillons (Figure12).

Aucune différence significative ($P > 0.05$) n'a été notée entre les teneurs en tannins des extraits acétoniques et méthanoliques chez les feuilles d'*O. europaea*. Quant aux extraits acétoniques et méthanoliques des feuilles de *S. officinalis* et du grignon d'olive, ils sont statistiquement différents (annexe 6).

L'extraction par l'acétone aqueux a donné les concentrations les plus élevées en tannins pour le grignon d'olive par rapport au méthanol aqueux, alors que pour feuilles *S. officinalis*, les teneurs les plus élevées sont obtenues par l'extrait méthanolique ($3,61 \pm 0,16$ meq AT/g MS contre $2,71 \pm 0,11$ meq AT/g MS pour l'extrait acétonique). Indépendamment du solvant ($P > 0.05$), la teneur en tannins est plus élevée dans les feuilles d'*O. europaea* suivi des feuilles de *S. officinalis* et enfin du grignon d'olive.

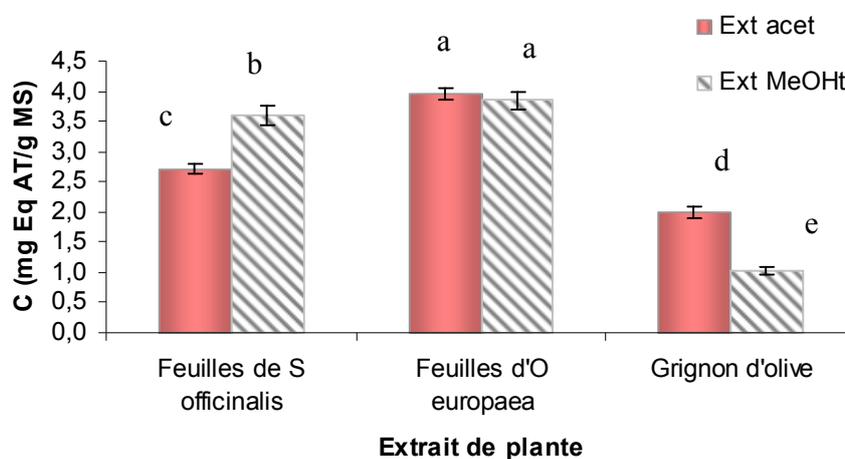


Figure13 : Concentrations en tannins totaux

Les valeurs portant des lettres différentes sont différentes significativement ($P \leq 0,05$).
Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e$

Les concentrations en composés phénoliques du grignon et des feuilles d'olivier (*O. europaea*) de la variété Chemlal s'avèrent différentes de celles de la variété Aimel déterminées par Lagha (2007). Ce résultat n'est pas surprenant car les travaux réalisés par Mehanso *et al.* (1987), ont montré que les concentrations en tannins varient largement au sein de la même espèce végétale selon le cultivar, l'âge de la plante, les caractéristiques du site de croissance.

Selon Makkar *et al.* (1991), les tannins condensés augmentent avec la maturation des feuilles ce qui pourrait expliquer les teneurs relativement faibles de nos échantillons qui ont été récoltés en hiver (jeune feuillage).

III.3. Flavonoïdes

Les résultats des dosages représentés dans la figure 13, ont mis en évidence également la présence des flavonoïdes dans les trois échantillons testés. Néanmoins, il n'existe aucune différence significative ($P > 0.05$) entre les teneurs en flavonoïdes des extraits acétoniques et méthanoliques chez les feuilles de *S. officinalis*.

Contrairement à ces observations, les extraits acétoniques et méthanoliques des feuilles d'*O. europaea* et du grignon d'olive sont significativement différents entre eux.

Les extraits acétoniques des feuilles de *S. officinalis* et d'*O. europaea* présentent des concentrations similaires en flavonoïdes ($1,38 \pm 0,01$ et $1,33 \pm 0,01$ mg EQ/g MS respectivement). Les teneurs en flavonoïdes des extraits méthanoliques des feuilles de *S. officinalis* sont les plus élevées ($1,37 \pm 0,012$ mg EQ/g de MS) par rapport aux feuilles d'*O. europaea* ($1,26 \pm 0,007$).

Enfin, l'extrait méthanolique du grignon d'olive présente des teneurs en flavonoïdes beaucoup plus faibles par rapport aux feuilles. Ces teneurs deviennent négligeables dans l'extrait acétonique.

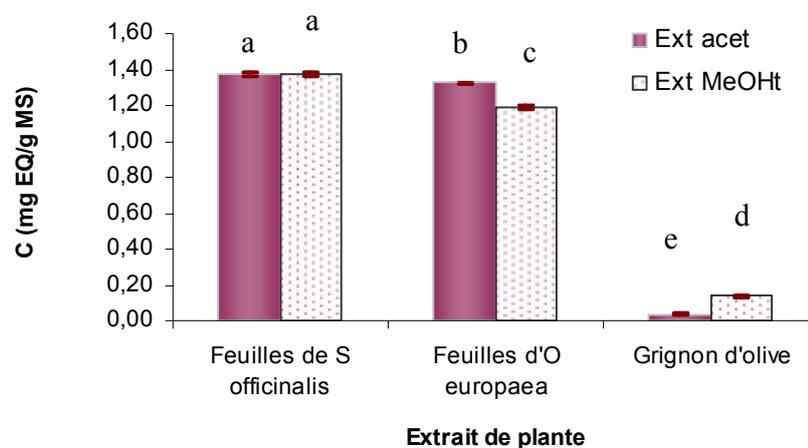


Figure14 : Concentration en flavonoides

Les valeurs portant des lettres différentes sont différentes significativement ($P \leq 0,05$).

Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e$

Les teneurs en flavonoides que nous avons obtenu dans l'extrait acétonique des feuilles de *S. officinalis* sont trois fois plus faibles que celles rapportées par Miliauskas *et al.* (2004) (3,6 mg EQ/g MS).

Nous notons également que les concentrations en flavonoides dans les produits d'*O. europaea* (feuilles et grignon) variété Chemlal sont différentes que celles trouvées avec la variété Aimel (Lagha, 2007). Les valeurs obtenues par Lagha, (2007) sont supérieures à celles que nous avons trouvées avec les deux produits en suivant le même protocole d'extraction et de dosage pour les deux cultivars (Chemlal et Aimel). Une différence de 30,82% et 23,59% est notée pour les extraits acétoniques et méthanoliques respectivement des feuilles d'*O. europaea*, elle est légèrement inférieure dans le grignon d'olive. Par ailleurs, une différence de 17,99% et 12,17% en faveur de la variété Chemlal est notée dans l'extrait acétone et méthanol respectivement.

D'après Rawel *et al.* (2005), les méthodes de conservation et l'exposition à la lumière des plantes peuvent affecter la teneur en flavonoïdes. En effet, ceux-ci sont sensibles à l'oxydation, et ont tendance à former des polymères donnant ainsi des tannins condensés (Manach *et al.*, 2004) ce qui pourrait expliquer ces différences de concentrations.

IV. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits de plantes

IV.1. confirmation de la pathogénicité de *P. c. ssp. atrosepticum*

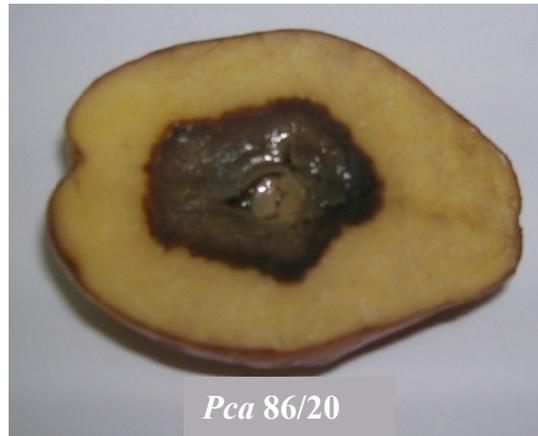


Figure 15 : Demi-tubercule de pomme de terre inoculé par *Pca 86/20*

La figure 14 montre clairement l'extension de la pourriture molle du tubercule de pomme de terre de variété Désirée, inoculé par *Pca 86/20*. Les symptômes observés sont caractéristiques de *P. c. ssp. atrosepticum* et correspondent aux symptômes de pourriture foncée et humide entourée d'un halo noir marquant une frontière avec les tissus sains tels décrits par Perombelon et Kelman (1980).

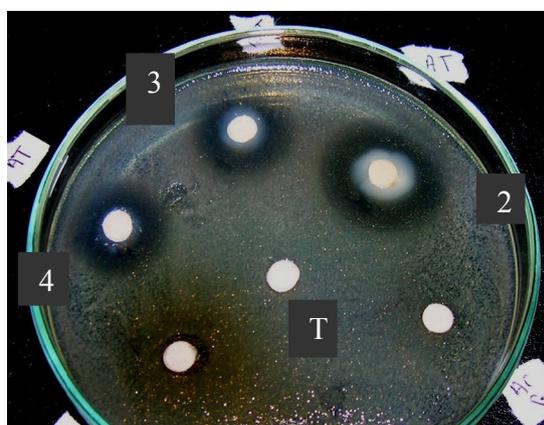
Ces résultats, montrent bien la pathogénicité de la souche testée avec un inoculum de 10^9 UFC/ml révélée par l'estimation de la quantité de pourriture molle obtenue et s'accordent avec ceux obtenus par Priou (1992). La méthode d'inoculation sur demi-tubercule de la variété Désirée s'avère bien adaptée pour l'évaluation de la sévérité de la maladie et du degré de pathogénicité. Elle peut par conséquent être appliquée pour l'étude de l'influence des extraits phénoliques de plantes sur le développement de la maladie sur tubercules de pomme de terre.

IV.2. Détermination de l'activité antibactérienne *in vitro*

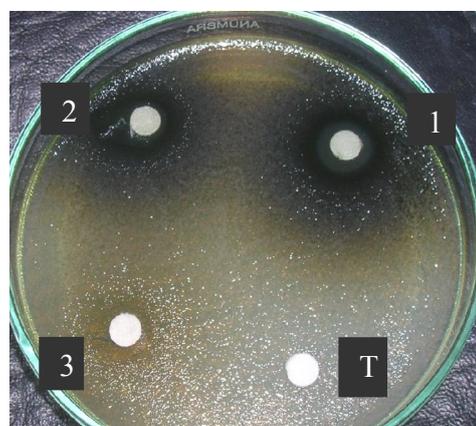
IV.2.A. activité antibactérienne par diffusion sur milieu gélosé

Les résultats de la figure 15 (A et B) montrent une sensibilité de *P. c. atrosepticum* vis-à-vis de deux polyphénols de synthèse (acide tannique et acide gallique), cette sensibilité se traduit par l'apparition de zones d'inhibitions qui entourent les disques.

Ces zones sont d'autant plus importantes que la concentration de ces acides phénoliques est élevée ($P < 0,001$)



A : Effet de l'acide tannique sur *Pca*



B : Effet de l'acide gallique sur *Pca*

1 = 50 mg/ml , 2 = 25 mg/ml, 3 = 12,5 mg/ml, 4 = 6,125 mg/ml, T = Témoin

Figure 16 : Activité antibactérienne de composés phénoliques de synthèse sur la croissance de *Pca*

Les valeurs exprimant les diamètres des zones d'inhibition sont représentées dans les tableaux IV pour les composés de synthèse et tableau V pour les extraits de plantes.

Tableau IV: Inhibition de *P. c. atrosepticum* par des extraits phénoliques de synthèse

Composés C (mg/ml)	Acide tannique	Acide galique
	ZI (mm)	
6,125	18,33 ^c ± 0,58	-
12,5	20,33 ^b ± 0,58	7,33 ^f ± 0,58
25	26,67 ^a ± 0,58	10,17 ^e ± 0,76
50	nd	13,33 ^d ± 0,58

Nd : non définie , (-) : absence de zone d'inhibition

Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significative ($P < 0.001$). Les résultats sont classés par ordre croissant $a > b > c > d > e > f >$ pour montrer les différences liées à la concentration* composé

Une inhibition de la croissance de *Pca* a été notée en présence des deux acides phénoliques (acides tannique et gallique).

En utilisant ces deux substances de synthèse, une différence très hautement significative ($P < 0,001$) est constatée entre l'effet individuel de ces composés phénoliques. La sensibilité de *Pca* vis-à-vis de l'acide tannique est beaucoup plus importante comparé à l'acide gallique. En effet, les zones d'inhibition obtenues avec une concentration de 6,125 mg/ml d'acide tannique sont beaucoup plus importantes que les zones d'inhibition obtenues avec de l'acide gallique à une concentration de 50 mg/ml.

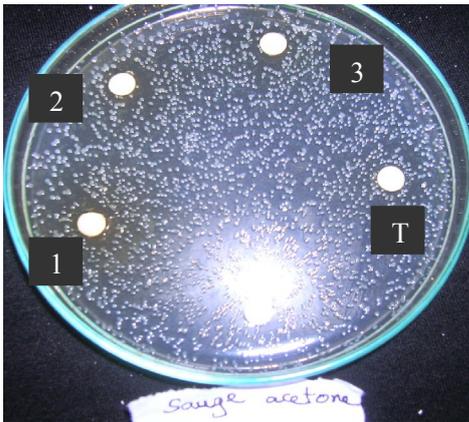
Cette variabilité de sensibilité aux deux composés phénolique est liée à la différence de la taille des deux composés et au nombre de leurs groupement hydroxyle actifs. Taguri *et al.* (2006) rapportent que l'acide tannique est un mélange de pyranosides et de polygalloyls ; et que l'activité antibactérienne d'un composé phénolique est d'autant plus importante avec la présence de groupements galloyls qui comportent plusieurs groupements hydroxyles

Tableau V : Effet antibactérien des extraits de plantes

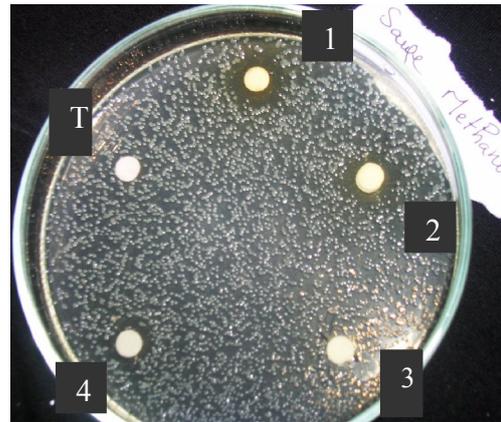
	C (mg/ml) Solvant	ZI (mm)			
		25	50	100	200
Feuilles de <i>S. officinalis</i>	EAc	-	-	7,00 ^h	8,67 ^f ± 0,58
	E MeOH	-	7,33 ^{g h} ± 0,58	10,67 ^d ± 0,58	12,67 ^b ± 0,58
Feuilles d'<i>O. europaea</i>	EAc	7,00 ^h	8,67 ^f ± 0,58	10,33 ^{d e} ± 0,58	15,67 ^a ± 0,58
	E MeOH	-	-	-	10,67 ^d ± 0,58
Grignon d'olive	E Ac	-	-	7,67 ^g ± 0,58	10,17 ^{d e} ± 0,29
	E MeOH	-	7,67 ^f ± 0,58	9,83 ^e ± 0,29	11,33 ^c ± 0,58

(-) : absence de zone d'inhibition

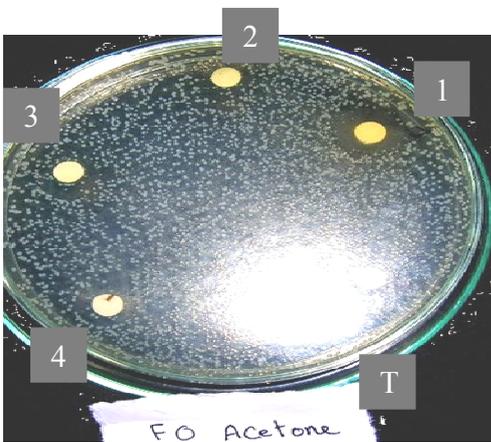
Les valeurs portant les même lettres ne diffèrent pas significativement ($P > 0.05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant $a > b > c > d > e > f > g$ pour montrer les différences liés à la concentration* solvant * plante.



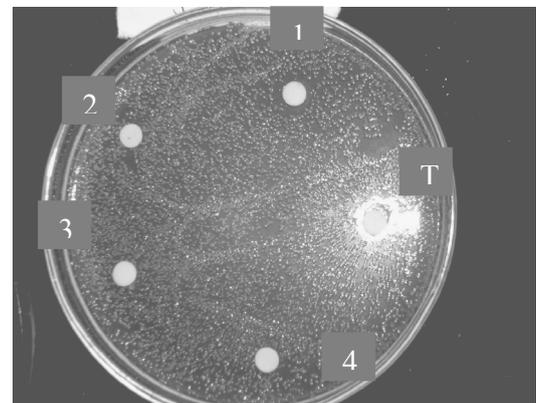
Effet de E Ac des feuilles de *S officinalis*



Effet de E MeOH des feuilles de *S. officinalis*



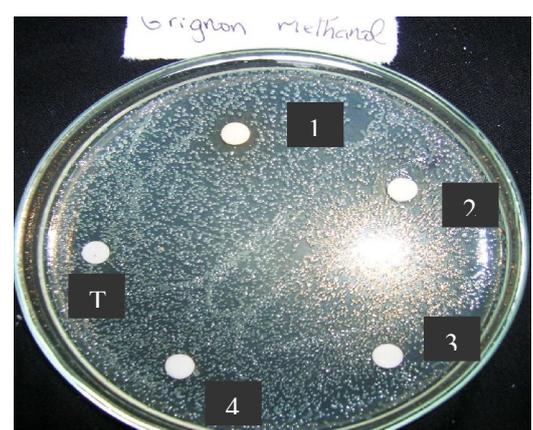
Effet de E Ac des feuilles d'*O europaea*



Effet de E MeOH des feuilles d'*O europaea*



Effet de E Ac du grignon d'olive



Effet de E MeOH du grignon d'olive

1= 200 mg/ml , 2 = 100 mg/ml , 3 = 50 mg/ml, 4 = 25 mg/ml , T = Témoin

Figure 17: Activité antibactérienne d'extraits de plantes

La figure 16 montre que les extraits de feuilles de *S. officinalis* et des produits d'*O. europaea* (grignon et feuilles) présentent tous une activité antibactérienne vis-à-vis de la souche de référence *P. c. atrosepticum*.

Cette activité diffère d'un extrait à un autre, en fonction de la concentration du matériel végétal utilisé et du solvant d'extraction. Selon Rios et Recio (2005), les résultats des tests d'activité antibactérienne varient largement selon la nature du matériel végétal, du solvant et du système d'extraction utilisé ce qui observé dans nos résultats.

Aussi, l'inhibition de la croissance de *Pca* est hautement significative ($P < 0,01$) avec l'augmentation de la concentration en extrait.

L'effet inhibiteur le plus élevé est obtenu avec l'extrait acétonique des feuilles d'*O. europaea* à la concentration de 200 mg/ml, avec une zone d'inhibition d'un diamètre de $15,67 \pm 0,58$ mm, suivi des l'extraits méthanolique de *S. officinalis* et du grignon d'olive. L'effet le plus faible est obtenu avec l'extrait acétonique des feuilles de *S. officinalis*

Plusieurs études sur l'activité antibactérienne de polyphénols purifiés ont été publiées. Cependant, aucun résultat n'a pu être directement comparé à cause des différentes méthodes d'évaluation appliquées et des diverses espèces bactériennes utilisées.

L'influence de la diffusion des extraits uniformément à travers la gélose sur les zones d'inhibition doit être prise en considération (Alzoreky et Nakahara, 2003).

IV.2.B. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le test de diffusion des extraits de plantes sur milieu gélosé est complété par la détermination de la concentration minimale inhibitrice de la croissance de *P. c. atrosepticum* (CMI) Cette activité antimicrobienne est résumée dans le tableau VI.

Tableau VI : concentration minimale inhibitrice de composés phénoliques et extraits de plantes *sur Pca*

Echantillon	Feuilles de <i>S. officinalis L</i> (sauge)		Feuilles d' <i>O. europaea</i> « Chemlal »		Grignon d'olive « Chemlal »		Acide gallique	Acide Tannique
	Extrait Acetone	Extrait MeOH	Extrait Acetone	Extrait MeOH	Extrait Acetone	Extrait MeOH		
CMI mg/ml	40	20	5	40	10	5	1,25	0,3125

Nos résultats avec les extraits de plantes montrent une diminution importante de la croissance de *P. c. atrosepticum* en présence de l'extrait acétonique des feuilles d'*O. europaea* et l'extrait méthanolique du grignon d'olive, ces derniers présentent une CMI 2 à 8 fois plus faible que les autres extraits de plantes.

Les travaux réalisés par Markin *et al.* (2003) sur l'effet des extraits aqueux de feuilles d'olivier sur 46 souches microbiennes montrent un résultat similaire concernant la CMI (6 mg/ml).

Nous remarquons que pour une même plante, les extraits acétoniques présentent des activités antibactériennes différentes de celles des extraits méthanoliques. Ceci est en accord avec l'étude de Cowan (1999) qui rapporte que la nature du solvant joue un rôle important sur le profil qualité/quantité dans l'extraction des composés phénoliques et que le méthanol extrait des composés phénoliques à activité antimicrobienne différents de ceux qui peuvent être extraits à l'acétone.

Nous remarquons également, que malgré la faible concentration en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique du grignon d'olive et l'extrait acétonique des feuilles d'*O. europaea* en comparaison à celle des feuilles de *S. officinalis*, ceux-ci ont été très efficaces sur l'inhibition de la croissance de la bactérie.

Ces observations pourraient être expliquées par la nature et propriétés des composés phénoliques constituant chaque extrait et éventuellement par un effet synergique entre les

composés phénoliques dans un extrait. En effet, la majorité des composés phénoliques identifiés dans les produits d'*O. europaea* sont rapportés pour leurs potentiels antimicrobiens. D'après les travaux de Aziz et al (1998) et Bisignano *et al.* (1999), l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine, deux composés majoritaires d'*O. europaea* (feuilles et grignon), ont montrés des propriétés antibactériennes très intéressantes sur une large gamme de microorganismes dont les entérobactéries.

Dans l'étude de l'effet des composés phénoliques de synthèse (acide tannique et acide gallique), une différence très apparente a été observée sur leurs effets individuels. L'acide tannique a été plus efficace sur l'inhibition de la croissance de *P. c. atrosepticum* à une CMI 4 fois plus faible que celle de l'acide gallique. Cette observation soutien notre hypothèse qui suggère que l'activité antibactérienne des extraits testés est principalement liée à la concentration et nature chimique de leurs composés phénoliques.

De même, en rapportons les CMI des deux extraits les plus actifs sur l'inhibition de *Pca* (EAc de feuilles d'*O. europaea* et EMeOH du grignon d'olive) à leurs équivalent en acide galliques (Annexe 5), Ceux-ci se sont révélés efficaces à des concentrations en EAG plus faibles que les composés phénoliques de synthèse testés. Ainsi, la CMI (EAG/g MS) de l'extrait méthanolique du grignon d'olive est 95,2% plus efficace sur l'inhibition de *P. c. atrosepticum* que l'acide gallique. De même, la CMI (EAG/g MS) de l'extrait acétone des feuilles d'*O. europaea* est 82,4% plus faible que la CMI de l'acide gallique synthétique.

Par ailleurs, nous remarquons que la CMI (EAG/g MS) de l'extrait méthanolique du grignon d'olive est 72,72% plus efficace sur *P.c. atrosepticum* que l'extrait acétone des feuilles d'*O. europaea* à la même CMI (5mg/ml) bien que ce dernier présente les concentrations en composés phénoliques les plus élevés.

D'après la comparaison de Sausa *et al.* (2006) sur les concentrations en composés phénoliques dans les feuilles et grignon d'olive, ce dernier renferme des concentrations plus élevées en tyrosol, composé phénolique dont les propriétés antibactériennes ont été rapportées par plusieurs auteurs (Ryan *et al.*, 2002 ; Markin *et al.*, 2003 ; Perreira *et al.*, 2007). Aussi le grignon contient le verbascoside, un composé phénolique absent, généralement, dans les feuilles d'olivier. L'activité antibactérienne de ce polyphénol a été efficace sur plusieurs espèces bactériennes dans l'étude de Aziz *et al.* (1998)

Les extraits de plantes sont classés en comparant leurs CMI rapportées en EAG/g MS, comme suit : EMeOH grignon > EAc grignon > EAc d'*O. europaea* > EMeOH *S. officinalis* > EMeOH d'*O. europaea* > EMeOH *S. officinalis*.

Les extraits *S. officinalis* n'ont pas révélé de fortes activités antibactériennes, et ce malgré leurs concentrations élevées en polyphénols. Les mêmes observations ont été notées par Nescimento *et al.* (2000) dans leur étude sur l'effet d'extraits aqueux de 10 plantes dont *S. officinalis* sur plusieurs bactéries. Ceci paraît être lié à la nature des composés phénoliques de *S. officinalis*.

Cette plante renferme une quantité considérable d'acides phénoliques (Acide salvianolique, acide rosmarinique, acide sagerinique) (Lu et Foo., 2001) dont l'activité antioxydant a été constatée par plusieurs auteurs. Aussi, elle contient des flavonoïdes (principalement la Luteoline-7-glucoside, luteoline, Apeginine) sous forme glycosylée. Turkmen *et al.*, (2006) et Taguri *et al.*, (2006) ont rapporté que l'activité antioxydante et antibactérienne des flavonoïdes diminue considérablement en étant sous forme glycosylée, ce qui pourrait expliquer la faible activité antibactérienne des extraits de *S. officinalis*. En outre, le faible pouvoir antibactérien de certains extraits pourrait être due, en partie, à la perte d'activité de certains polyphénols pendant l'extraction.

IV.3. Influence des extraits de plantes sur l'évolution de la pourriture molle

L'activité antibactérienne des extraits testés vis-à-vis de *P. c. atrosepticum* a révélé une inhibition variable du développement de la pourriture sur demi-tubercules après traitement des ces derniers par les différentes concentrations d'extraits (Figure 17).

Cette réduction est nettement plus importante en présence des extraits acétoniques des feuilles d'*O. europaea* et des extraits méthanoliques du grignon d'olive comparé aux extraits de *S. officinalis*, ce qui corrobore les observations des tests *in vitro*.

Nous notons également qu'après un traitement des tubercules par une concentration de 400 mg/ml d'extraits, ceux ci diminuent considérablement la quantité des tissus pourris ($P < 0,05$) et que la quantité des tissus pourris et devient presque négligeable avec l'extrait méthanolique du grignon d'olive et extrait acétonique de feuilles d'*O. europaea*.

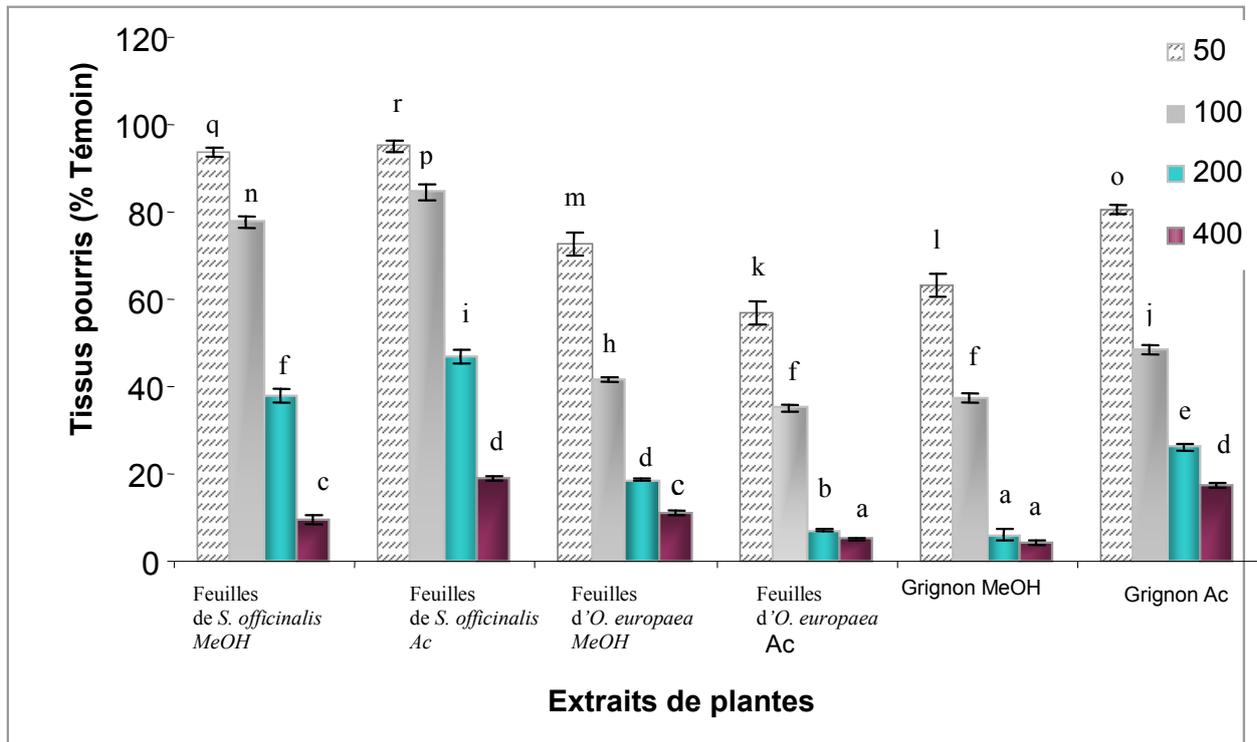


Figure 18: Effet des extraits de plantes sur la croissance de *Pca*

Les valeurs des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0.01$). Les lettres sont classés par ordre croissant $a > b > c > d \dots$ pour montrer les différences liés à la concentration* solvant * plante.

Les quantités des tissus pourris récoltés après cinq jours d'inoculation sont corrélées négativement à la concentration des extraits tels montrés par les figures 18, 19 et 20.

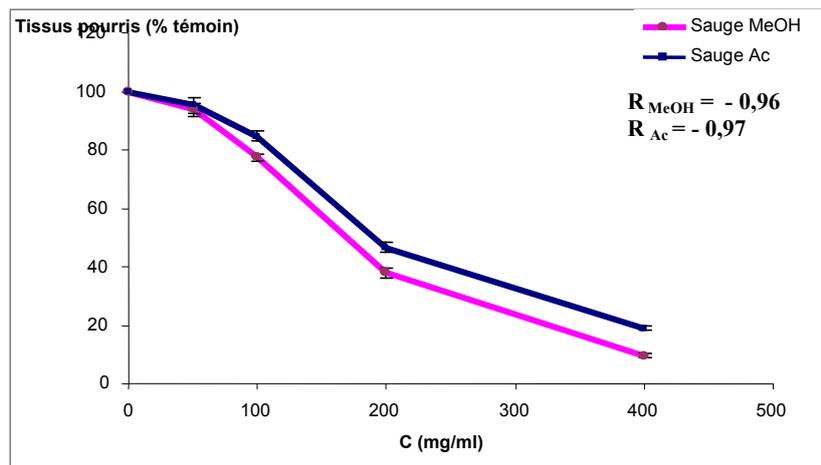


Figure 19 : Effet d'extraits de *S. officinalis* sur l'évolution de la pourriture molle causée par *Pca*.

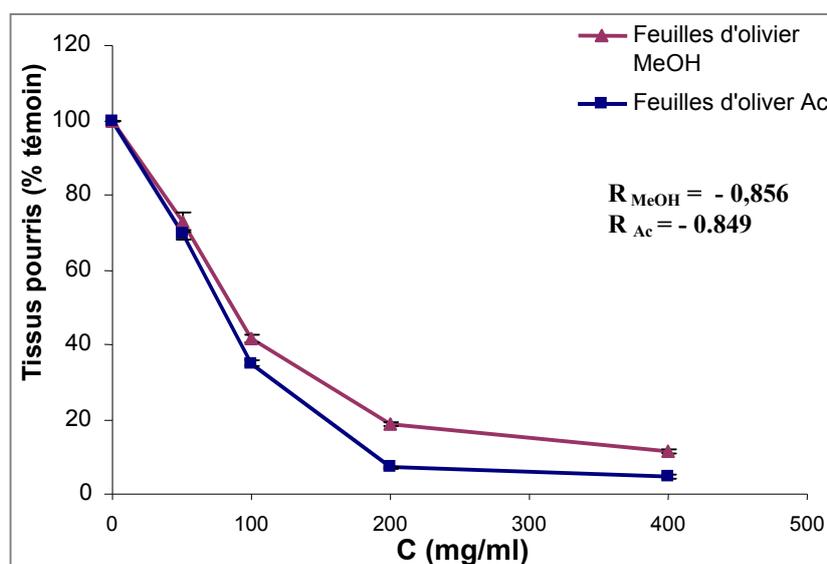


Figure 20: Effet d'extraits de des feuilles d'*O europaea* sur l'évolution de la pourriture molle causée par *Pca*

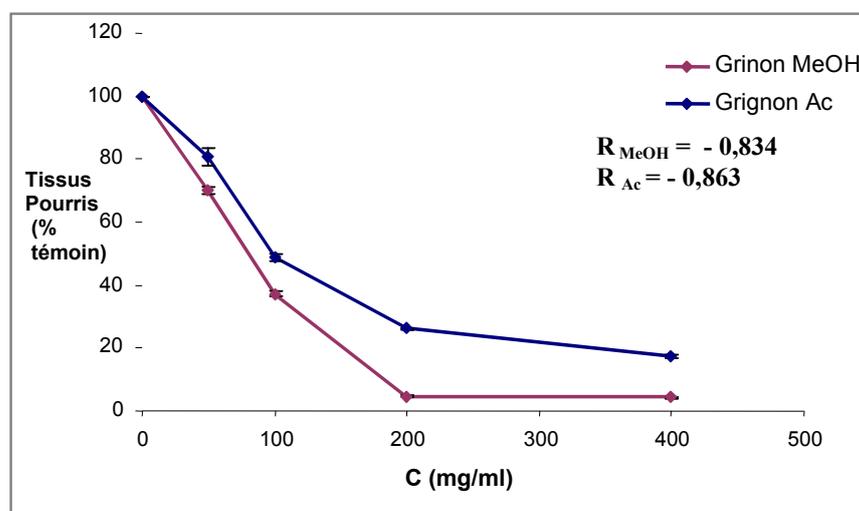


Figure 21: Effet d'extraits de grignon d'olive sur l'évolution de la pourriture molle causée par *Pca*

L'inhibition de la maladie par les extraits testés est due à l'effet antibactérien de leurs composés phénoliques. Ceux-ci ont agité positivement sur l'inhibition du développement de la pourriture molle en agissant principalement sur la croissance de *P. c. atrosepticum* tel

démonstré dans les tests *in vitro*. Selon Okuda *et al.* (2005), les composés phénoliques en général et les tannins en particulier, sont des agents de précipitation des protéines et peuvent par conséquent précipiter les protéines membranaires bactériennes en se fixant sur l'enveloppe externe du microorganisme. Cette fixation entraîne une perturbation de la membrane cytoplasmique et une inactivation de protéines cellulaires.

Cependant, ceci demeure fonction de la nature chimique des composés phénoliques et de l'espèce bactérienne qui est plus difficile dans le cas des bactéries gram négatif dont *Pca* fait partie.

Selon Belemtougri *et al.* (2006), la quercétine a la capacité d'inhiber la libération des ions Ca^{2+} des tissus de plantes. Ceci ci pourrait expliquer, en partie, l'effet des extraits sur la diminution du poids des tissus pourris. En effet, la pectate lyase, enzyme pectinolytique principale responsable de l'apparition de la pourriture, est Ca^{2+} dépendante et la diminution de ces ions inhiberait l'activité de cette enzyme réduisant ainsi les quantités des tissus macérés.

L'étude de Mila *et al.* (1996), a montré également que les polyphénols des plantes inhibent la croissance de plusieurs mutants de *Pectobacterium chrysanthemi*, en alternant leurs sidérophores médiateurs de transport de fer ce qui diminue l'effet pectinolytique de ces bactéries. Aussi, les polyphénols ayant des propriétés de chélateurs de métaux peuvent se lier aux sites actifs des enzymes métaboliques pour réduire le métabolisme de la bactérie et sa croissance (Chandarana *et al.*, 2005).

L'éventualité que les composés phénoliques ajoutés pourraient contribuer à la stimulation des mécanismes de défense de la plante contre *P. c. atrosepticum* n'est pas exclue. Cette suggestion est soutenue par les observations de Del Rio *et al* (2003) où une augmentation de l'inhibition de la croissance *Phytophthora* sp ainsi qu'une augmentation de taux de phytoalexines a été notée après traitement des feuilles d'olivier par les polyphénols.

Aussi, l'étude de Baysal et Zeller (2004), a montré, qu'un traitement préventif des pommes par l'extrait de *Hedera* sp , 48 heures avant son inoculation par *Erwinia amylovora*, était suffisant pour permettre aux récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique de l'hôte pour reconnaître les éliciteurs produits par les extraits. Ce phénomène entraîne une activation des gènes de défense de l'hôte pour inhiber la prolifération du microorganisme en

produisant des polyphénoloxydases et des peroxydases qui jouent un rôle important dans la résistance de la plante vis-à-vis du pathogène.

Conclusion

Conclusion

L'objectif du présent travail est d'étudier l'efficacité potentielle d'un coproduit de l'oléiculture et de deux plantes (*Olea europaea* L. et *Salvia officinalis* L.) pour lutter contre le développement de la pourriture molle de pomme de terre.

Nos résultats, montrent que les teneurs en composés phénoliques varient en fonction du matériel végétal investi et du solvant d'extraction utilisé. Globalement, l'acétone aqueux (70%) s'est avéré meilleur extracteur de polyphénols que le méthanol aqueux (80%). Les feuilles de *S. officinalis* et *O. europaea* sont plus riches en composés phénoliques (polyphénols totaux, tannins et flavonoïdes) que le grignon d'olive.

Le test d'activité antibactérienne *in vitro* de deux composés de synthèse (acide gallique et tannique) a montré une forte sensibilité de *P. c. ssp atrosepticum* vis-à-vis des deux composés, avec un effet plus accentué observé en utilisant de l'acide tannique.

Tous les extraits testés ont montré des effets bactéricides. Aussi, les résultats du test de diffusion sur milieu gélosé ont clairement montré que l'extrait acétonique des feuilles d'*O. europaea* L., suivi de l'extrait méthanolique des feuilles de *S. officinalis* L. et enfin de l'extrait acétonique du grignon d'olive, ont fortement inhibé la croissance de *P. c atrosepticum*. Par ailleurs, les plus faibles concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont obtenues avec l'extrait acétonique d'*Olea europaea* ainsi que l'extrait méthanolique du grignon d'olive qui sont bactéricides à une concentration de 5 mg/ml.

Les tests sur pomme de terre ont confirmé nos résultats *in vitro*. Les extraits testés sur demi-tubercules de pomme de terre, ont remarquablement réduit le développement de la pourriture molle à la concentration de 400 mg/ml. De même, les extraits ayant les plus faibles CMI sont également les plus efficaces sur demi-tubercules ce qui atteste de l'efficacité de l'extrait acétonique d'*O. europaea* et de l'extrait méthanolique du grignon d'olive.

A la lumière de ces résultats, l'utilisation des composés phénoliques extraits à partir des produits d'*Olea europaea*, paraissent prometteurs dans le cadre d'un programme de lutte contre la pourriture molle de la pomme de terre.

Dans cette perspective et dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant de procéder à une caractérisation qualitative plus poussée de ces extraits par la détermination des structures et propriétés chimiques de leurs composés phénoliques. En outre, l'étude des mécanismes d'action biochimique des polyphénols sur *P. c atrosepticum* et l'interaction polyphénols - pommes de terre – bactéries s'avèrent indispensables.

De même, une réflexion et des essais sur le mode d'utilisation de ces métabolites secondaires naturellement présentes dans les plantes mérite d'être menés pour leur utilisation dans la protection phytosanitaire de la pomme de terre et d'autres produits agricoles ; ces substances se substitueraient alors aux produits chimiques habituellement utilisés dans la lutte contre la pourriture molle de la pomme de terre et d'autres phytopathologies.

*Références
bibliographiques*

References Bibliographiques

- Agrios G.N. (1997).** Plant pathology. 4^{ème} edition. Academic Press Inc., San Diego Californie. p635.
- Akgun N. et Doymaz I. (2005).** Modeling of olive cakethin-layer drying process. *Journal of food engenering*, **68 (4): 455-461.**
- Ahn Y.J., Lee C.-O., Kweon J.H., Ahn A. W. et Park J.H. (1998).** Growth-inhibitory effects of Galla Rhois derived tannins on intestinal bacteria. *J. Appl. Microbiol*, **84(3): 439.443.**
- Alzoreky N.S. et Nakahara K. (2003).** Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Jornal of Food Microbiology*, **80: 223-230.**
- Areias F., Valentao P., Andrade P.B., Ferreres F., Seabra R.M. (2000).** Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural Factors. *J. Agric. Food Chem*, **48: 6081-6084.**
- Aziz N.H., Farag S.E., Mousa L.A. et Abo-Zaid M.A. (1998).** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, **93 (374): 43-54.**
- Baba Aissa, F. (1991).** Les plantes médicinales en Algérie. *èd Diwan. Alger ., p.117.*
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. et Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim–Forsch Drug Research*, **46: 1086–1108.**
- Barras F., Van Gijsegem F. et Chatterjee A.K. (1994).** Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol*, **32: 201-234.**
- Bartling S., Derkx O., Wegener C. et Olsen O. (1996).** Synergism between *Erwinia* pectate lyase isoenzymes that depolymerise both pectate and pectin. *Microbiology* , **141: 873-881.**
- Bartner A., K.P. Pfeiffer et H. Bartner, (1994).** Applicability of diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. *Pharmazie*. **49: 512-516.**
- Basile A., Ferrara L., Del Pezzo M., Meled G., Sorbo S., Bassi P. et Montesano D. (2005).** Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, **102: 32–36.**

- Basim E., Basim H. et Ozcan M. (2006).** Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Food Chemistry*, 77 (4): 992-996.
- Baydar N.G., Ozkan G. et Sagdic O. (2004).** Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15 : 335–339.
- Baysal O. et Zeller W. (2004).** Extract of *Hedera* induces resistance on apple roots to M 26 similar to acibenzolar-s-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Physiological and molecular Plant Pathology*, 65: 305-315.
- Bell K.S., Sebahia M., Pritchard L., Holden, M.T.G., Hyman L.J., Holeva M.C., Thomson N.R., Bentley S.D., Churcher L.J.C., Mungall K., Atkin R., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Clark K., Doggett J., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Norbertczak H., Ormond D., Price C., Quail M. A., Sanders M., Walker D., Whitehead S., Salmond G.P.C., Birch P.R., Parkhill J. J. et Toth I.K. (2004).** Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 11105-11110.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio, R.; Crisafi G., Uccella N. et Saija A. (1999).** On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 51 : 971–974.
- Blouin, J., Lorca, L. , Montreau, F.R. et Dufour, J.H. (1972)** étude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin Ciocalteu. In : *connaissance de la vigne et du vin.* 6: 405-413.
- Boucaillou B. (1992).** Protection de la pomme de terre. 1^{ère} journée nationale phytosanitaire de MILA.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosy: Photochemistry, Medicinal plants. 2nd éd Lavoisier. Paris. Pp 240-387.
- Cardoso S.M., Guyot S., Marnet N., Lopes-Da-Silva J.A., Mgc Renard C. et Coimbra M.A. (2004).** Characterisations of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of Science and Food Agriculture*, 84: 1-12.
- Chandarana H., Baluja S. et Chanda S. (2005).** Comparison of antibacterial activities of selected species of Zingiberaceae and some synthetic compounds. *Turk J Biol*, 29:83-97.
- Chatterjee A., Cui Y., Hasegawa H., Leigh N., Dixit V. et Chatterjee A K. (2005).** Comparative analysis of two classes of quorum-sensing signaling systems that control production of extracellular proteins and secondary metabolites in *Erwinia carotovora* subspecies. *American Society for Microbiology*, 187 (23): 8026–8038.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B. et Staskawicz B.J. (2006).** Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803–814.
- Clifford M.N. (1999).** Appendix1. A nomenclature for phenols with special reference to tea. Washington, DC, CRC Press LLC.: Boca Raton, Florida, 41 (5): 393-397.

- Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev*, **12 (4)**: 564-582.
- Das H.C, Wang J.H. et Lien E.J. (1994).** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids : A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. *JUCKER E ed. Progress in Drug Research . Basel : Birkhauser Verlag pp. 133 - 136.*
- Dean B. (1994).** Managing the potato production system. *Ed. Food production press, New York. London. Norwood.(Australia), p183.*
- Del Rio J.A., Baidez A.G., Botia J.M. et Ortuno A (2003).** Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea L.*) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry*, **83** : 75–78.
- Dellagi A., Brisser M.N., Paulin J.P. Expert D. (1998).** Dual role of desferridoxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **11**: 734-742.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97 (4)**: 654-660.
- Doymaz I., Gorel O. et Akgun N.A. (2004).** Drying characteristics of the solid by product of olive oil extraction. *Biosystems Engineering*, **88 (2)**: 213-219.
- Duhoux E., Nicole M. (2004).** Biologie végétale. *Ed DUNOD, Paris.*
- Erlund I. (2004).** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res* **24**: 851-74.
- Escribano-Bailón M.T. et Santos-Buegla C. (2001).** Polyphenol extraction from foods. In : “Method in polyphenol analysis”. *Ed. Royal Society of Chemistry. Pp: 1-16.*
- FAO (2006).** Statistical Yearbook 2005-2006, **2**: 336
- FAO. (2005).** FAO. FAOSTAT. Agriculture. Rome. ([http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/)).
- Fernandez M.A., Garcia M. D. et Saenz M. T. (1996).** Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *rophulariasambucifolia*. *J. Ethnopharmacol.* **53**:11–14.
- Ferreira I.C.F.R., Marcelino F., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R., Estevinho L., Bento A . et Pereira J.A. (2007).** Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea L.* Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecule*, **12** : 1153-1162.
- Fiehn O. (2002).** Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*, **48**:155-171.

- Fox R. T. V., Manners J. G. et Myers A. (1972).** Ultrastructure of tissue disintegration and host reactions in potato tubers infected by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. *Potato Res*, **15**:130-145.
- Gardan L., Gouy C., Christen R. et Samson R. (2003).** Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 381–391.
- Ghedira K. (2005).** Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4** :162-169.
- Ghigo J.M. et Wanderson M. (1992).** A fourth metalloprotease gene in *E. chrysanthemi*. *Res. Microbiol.* **143** : 857-867.
- Hagerman A.E, Rice M.E. et Ritchard N.T. (1998).** Mechanisms of protein precipitation for two tannins, penagalloyl glucose and epicatechin (4-8) catechin (procyanidin). *J. Agric. Food Chem*, **46**: 2590-2595.
- Hagerman A.E. et Butler L.G. (1978).** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J.Agric.Food Chem*, **26**: 809-812.
- Hagerman A.E. et Butler L.G. (1981).** The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, **256 (9)**: 4494-4497.
- Hahlbrock K, Sheel D. (1989).** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev plant Physiol plant Mol biol.* **40**: 374-369.
- Halliwel B.I., Rafter J. et Jenner A.(2005)** Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr*, **81**:268–76.
- Harris P.M. (1992).** Mineral nutrition.Potato crop. éd Harris P.M, Chapman & Hall. *Londres. New York. Melbourne.Madras pp* 162-209.
- Hasegawa H., Chatterjee A., Cui Y., Chatterjee A.K. (2005).** Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, N-Acyl Homoserine Lactone, and extracellular proteins. *Appl.Environ.Microbiol*, **71(8)**: 4655–4663.
- Hélias V., Andrivon D. et Jouan B. (2000).** Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* under field conditions and influence of their effects on the yield of individual potato plants. *Plant pathology*, **49**: 23-32.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. (2004).** Polyphénols: Végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*,**(1)**: 3-6.
- Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollmann P.C.H., Katan M.B. et Romhout D. (1993).** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen lderly study. *Lancet*, **342 (8878)**: 1007-1011.

- Horton D. (1987).** Potatoes. Production, marketing, and programs for deveveloping countries. Westview Press (Boulder)/ IT Publication (London). pp 243.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condémine G., Nasser W. et Reverchon S. (1996).** Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology*, **50**: 213-257.
- Ibrahim M., Jouan B., Samson R., Poutier F. et Saily M. (1978).** Prospect of a pathogenicity test concerning *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on half tubers. In: Proceeding. 4th *International Plant Conference plant pathogenic Bacteria*. Angers, 591-602.
- Iennette, E.H., 1985.** Manual of Clinical Microbiology, *fourth ed.* American Association for Microbiology, Washington, DC, pp. 978–987.
- Ikigai H., Nakae T., Shimamura T. (1993).** Bactericidal catechins damage the lipide bilayer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1147** : 132-136.
- Karola T., Palmaki T.A, Brader G. et Palva E.T. (2003).** *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* and erwinia derived elicitors HrpN and Peh a trigger distinct but interacting defense reponses and cell death in arabidopsis. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **16 (3)** : 197- 187.
- Kelman W.M. et Tanner G.J. (1990).** Foliar condensed tannin levels in Lotus species growing on limed and unlimed soils in South-eastern Australia. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, **52**: 51-54.
- Kim J.F. et Beer S.V. (1998).** Hrpw of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homlogous to pectate lyases of a distinct class. *J.Bacteriol*, **180**:5203-5210.
- King, P. J.; Ma, G.; Miao, W.; Jia, Q.; McDoughall, B. R.; Reinecke, M. G.; Cornell, C.; Kuan, J.; Kim, T. R.; Robinson, Jr. W. E. (1999).** Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type1 integrase and replication. *J. Med. Chem*, **42**, 497-509.
- Lagha S. (2007).** Effet des extraits de plantes (*Pistacia lentiscus* L. et *Olea europaea sativa*) et d'un co-produit (grignon d'olive) sur la croissance de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* sur *Solanum tuberosum* L. *Mémoire de Magistère, Université de Béjaia*.
- Lamaison J.L et Carnat A. (1991).** Teneurs en principaux flavonoides des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. en fonction de la végétation. *Pl. Med. Phytother*, **25** : 12 - 16.
- Lapwood DH., Hering TF., 1968.** Infection of tubers by common scab (*Streptomyces scabies*) during brief periods when the soil is drying. *European Potato Journal*, **11**: 177–187.

- Léger C. (1999).** Co-produits de l'huilerie d'olive: les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques. *OCL. Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **6** : 60-63.
- Le Poivre. (2003).** Phytopathologies. *Ed Tec & Doc. Paris. Pp133.*
- Lu Y., Foo L.Y. (2000).** Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, **55**: 263-267.
- Lu Y. et Foo L.Y.(2001).** Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, **75**: 197–202.
- Machado R.M.D., Toledo M.C.F. et Garcia L.C. (2007).** Effect of light and temperature on the formation of glycoalkaloids in potato tubers. *Food Control*, **1**: 503–508.
- Mäe A., Montesano M., Koiv V. et Palva E.T. (2001).** Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-microbe Interact*, **14**: 1035-1042.
- Maher E.A et Kelman A. (1983).** Oxygen status of potato tuber tissue in relation to maceration by pectic enzymes of *Erwinia carotovora*. *Phytopathology*, **73**: 536- 539.
- Makkar, H.P.S. (2003).** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannin, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, **49**: 241-246.
- Makkar H.P.S. et Becker K. (1998).** Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity? *Agroforestry Systems*, **40**: 59-68.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. et Jimenez L. (2004).** Polyphénols: food sources and bioavailability. *Am.J. Clin. Nutr*, **79**: 727-747.
- Marits R., Tshuikina M., Pirhonen M., Laasik E. et Mäe A. (2002).** Regulation of the expression of *prrW:gusA* fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiology (Reading U.K.)*, **148**: 835-842.
- Markin D., Duek L. et Berdicevsky I. (2003)** In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*, **46**: 132–136.
- Martin-Garcia A.I., Moumen A.,Yanez-Ruiz D.R. et Molina-Alcaide E. (2003).** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, **107**: 61-74.
- Martin Garcia I., Yanez Ruiz D., Moumen A. et Molina Alcaide E. (2006).** Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaf fermentation in continuous fermentors. *Small Ruminant Research*, **61**: 53–61.
- McDonald S., Prenzler P.D., Antolovich M. et Robards K. (2001).** Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, **73**: 73-82.

- Mehanso H., Butler L.G. et Carlson D.M. (1987).** Dietary tannins and salivary proline rich proteins: Interaction, induction and defense mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, **7**: 423-440.
- Mila I.; Scalbert A.; Expert D. (1996).** Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*, **42 (6)** 1551-1555.
- Miliauskas G., Venskutonisa P.R., van Beekb T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, **85**:231–237.
- Mishina T. E. et Zeier J. (2007).** Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **50 (3)**: 500–513.
- Mompon B.,Lemaire B.,Mengal P. et Surbled M. (1998).** Extraction des Polyphénols :du laboratoire à la production industrielle. In : Vercauteren, Joseph. *Polyphénols* 96.éd. INRA. Paris,p. 31-43.
- Montesano M., Brader G., Ponce De leon I. et Polva T. (2005).** Multipl defense signal induced by *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* elicitors in potato. *Molecular Plant Pathology* **6 (5)**: 541-549.
- Morgan B. (2000).** Managing bacterial break down in potato, exposing Erwinia. *Australian potato industry*, 1-2.
- Mulholland V., Hinton J.C.D., Sidebotham J., Toth I.K. Hayman L.J., Perombelon M.C.M., Reeves P.J. et Salmond G.P.C. (1993).** A pleiotropic reduced virulence (Rvi-) mutant of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* is defective in flagella assembly proteins that are conserved in plant and animal bacteria pathogens. *Molecular Microbiology*, **9**:343-356.
- Murata H., Chatterjee A., Lui Y. et Chatterjee A.K. (1994).** Regulation of the production of extracellular pectinase, cellulase, and protease in the soft rot bacterium *Erwinia carotovora* subsp.*carotovora* . *Appl.Environ.Microbiol*, **60 (9)**: 3150-3159.
- Nascimento G.G. F., Locatelli J., Freitas P.C., Giuliana S.L. (2000).** Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal ofMicrobiology*, **31**:247-256.
- Natarajan D., Britto S.J., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C. et Perumal G.(2005).** Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis* - A rare medicinal herb: Short communication. *Journal of Ethnopharmacology* **102**: 123–126.
- Navarre D.A. et Mayo D. (2004).** Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato . *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **180 (64)**: 179–188.
- Nefzaoui A. (1988).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits . *CIHEAM*, 153-173.

- Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M. et Takahara Y. (1993).** Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata* *Phytochem.* **33** : 557 – 561.
- Okuda T. (2005).** Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Photochemistry*, **66**: 2012-2031.
- Pereira A. (2000).** Quantification of tannins in tree foliage a laboratory manual for the FAO/IAEA co-ordinated research project on 'Use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminant son tannin ferous tree foliage'. *FAO/IAEA Working Document IAEA, VIENN.*
- Pereira A.P., Ferreira I.CFR., Marcelino F., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R., Estevinho L., Bento A. et Pereira J.A. (2007).** Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves *Molecules*, **12** : 1153-1162.
- Peres M. T. L. P., Monache F. D., Cruz A. B., Pizzolatti M. G. et Yunes R. A. (1997).** Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **56**: 223–226.
- Pérombelon M.C.M. (2002).** Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, **51**: 1–12.
- Pérombelon MCM. et Salmond GPC. (1995).** Bacterial soft rots. In: Singh US, Singh RP, Kohmoto K, eds. Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. *Oxford, UK: Pergamon Press, 1*: 1–20.
- Perombelon M.C.M., Lumb V.M. et Zutra D. (1987).** Pathogenicity of soft rot erwinias to potato tubers. *Potato Res*, **18**: 64-82.
- Perombelon M.C.M. et Kelman A. (1980).** Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology*, **18**: 361–87.
- Pinelo M., Rubilar M, Jerez M, Sineiro J. et Nunez M. J. (2005).** Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 2111-2117.
- Pizzal L., Bortomeazzi R. Vichi S. Uberegger E. Conte L.S. (2002).** Antioxydant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fructose*) and oregano (*oreganomonites* and *Oindercends*) extracts related to their phenolic compounds content. *Journal Science Food Agriculture.* **82**: 1645-1651.
- Priou S., Bertheau Y. et Jouan B. (1992).** Genetic and pathological diversity within *Erwinia carotovora* species. 2. Pathological characteristics in relation to phenotypic variation. Thèse de doctorat.

- Ranalli A., Contento S., Lucera L., Di Febo M., Marchegiani D. et Di Fonzo V. (2006).** Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem*, **54** : 434-440.
- Ranganna B., Kushalappa A. C. et Raghavan G. S. V. (1997).** Ultraviolet irradiance to control dry rot and soft rot of potato in storage. *Can. J. Plant Pathol.* **19**:30-35.
- Rao C. V., Desai D., Simi B., Kulharni N., Amin S. et Reddy B. S. (1993).** Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethaneinduced biochemical changes and aberrant crypt foci, formation in rat colon. *Cancer Res*, **53**: 4182-4188.
- Rauha J.-P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H. et Vuorela P. (2000).** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **56**, 3-12.
- Rawel H.M., Meidtner K. et Kroll J. (2005).** binding of selected phenolic compounds to proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 4228-4235.
- Reiter B., Pfeifer U., Schwab H. et Sessitsch A. (2002).** Response of endophytic bacterial communities in potato plant to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and environmental Microbiology*, **68** (5): 2261-2268.
- Ribereau-Gayon P. (1968).** Notion générale sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. Pp : 1-40.
- Rice-Evans C.A., Miller N., Paganga, G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med*, **20**(7): 933-956.
- Rios J.L. et Recio M.C. (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **100** : 80-84.
- Robards K. (2003).** Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **1000**: 657-691.
- Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R. et Mata R. (1992).** Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **35**:275-283.
- Rossignol L. et Rousselle-Bourgeois F. (1996).** Botanique, morphologie et taxonomie. In : La pomme de terre. Ed. INRA. Rousselle P., Robert Y., et Crosnier J.C. Pp : 62-232.
- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P.D. , Lavee, S., Robards, K. (2002).** Identification of phenolics compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammouth. *J. Agric. Food Chem*, **50**: 6716-6724.
- Salisova M., Toma S. et Mason T.J. (1997).** Comparison of conventional and ultrasonically assisted extraction of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasoncs Sonochemistry*, **4** :131-134.
- Salmond G.P.C. (1992).** Bacterial diseases of potatoes: from classical phytobacteriology to molecular pathogenicity Netherland . *Journal of Plant Pathology*, **98** (2): 115-126.

- Santos-Gomes P.C., Seabra R.M., Andrade P.B., Fernandes-Ferreira M. (2003).** Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis*L.). *J. Plant Physiol*, **160**: 1025–1032.
- Sousa A., Ferreira I.C. F. R., Calhella R., Andrade P.B., Valentano P., Seabra R., Estevinho L., Bento A. et Pereira J.A. (2006).** Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives ‘alcaparra’. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**: 8533–8538.
- Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth-Kesraoui F., Boukef K. et Balansard G. (2001).** Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 618–62.
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**:3875–3883.
- Schober B.M. et Vermeulen T. (1999).** Enzymatic maceration of witloof chicory by the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the effect of nitrogen and calcium treatments of the plant on pectic enzyme production and disease development. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 341-349.
- Schofield P., Mbugua D.M. et Peu A.N. (2001).** Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed and Technology*, **91**:21-40.
- Scott R.I., Chard J.M., Hocart M.J., Lennard J.H. et Graham D.C. (1996).** Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. *Potato Res*, **39**: 333- 344.
- Sepulchre J.A., Reverchon S., Nasser W. (2007).** Modeling the onset virulence in a pectinolytic bacterium. *Journal of theoretical Biology*, **244 (2)**: 239-257.
- Shah J. (2005).** Lipids, Lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu.rev.phyto*, **43**: 229-260.
- Singleton V.L., Orthofer R. et Lamuela-Raventos R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods.Enzymology*, **29**: 152-178.
- Ślesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S. et Miszalski Z. (2007).** The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica.Polonica.* **54 (1)**: 001–012.
- Smadja B., Latour X., Trigui S., Burini J.F., Chevalier S. et Orange N. (2004)_a.** Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Canadian Journal of Microbiology*, **50**: 19–27.
- Smadja B., Latour X., Faure D., Chevalier S., Dessaux Y. et Orange N. (2004)_b.** Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia*

- carotovora* subsp. *Atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *The American Phytopathological Society*, **17 (11)**: 1269-1278.
- Smith A.H., Zoetendal E. et Mackie R.I. (2005).** Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*, **50**:197-205.
- Stevenson W. A., Loria R., Franc G. D., et Weingartner D. P. (2001).** Compendium of potato diseases. American Phytopathological Society. 2^{ème} éd. St-Paul, Minnesota.p106.
- Swain T. (1979).** Tannins and lignins. Herbivores. *Academic Press, New York*. pp.657-682.
- Taguri T., Tanaka T. et Kouno I. (2004).** Antimicrobial Activity of 10 Different Plant Polyphenols against Bacteria Causing Food-Borne Disease. *Biol. Pharm. Bull*, **27(12)**: 1965-1969.
- Taguri T., Tanaka T. et Kouno I. (2006).** Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol. Pharm. Bull*, **29 (11)**: 2226-2235.
- Toda M., Okubo S., Ikigai H., Suzuki T., Suzuki Y., Hara Y. et Shimamura T. (1992).** The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.* **36**: 999–1001.
- Toth I.K., Thorpe C.J., Bentley S.D., Mulholland V., Hyman L.J., Perombelon M.C.M. et Salmond G.P.C. (1999).** Mutation in a gene required for lipopolysaccharide and enterobacterial common antigen biosynthesis effects virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, **12**: 499-507.
- Tourte Y., Donneau B., Henry M. et Tourte C. (2005).** Le monde des végétaux. Ed DUNOD. Paris.
- Tsuchiya H., Sato T.M., Fujiwaras S., Tanigaki S., Ohyama T., Tanaka T. et Linuwa M. (1996).** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavones against methicilline resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol*, **50**: 27-34.
- Turkmen N., Sari F. et Velioglu Y.S. (2006).** Effects of extraction solvents on concentration and antioxydant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, **99 (4)**: 835-841.
- Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F. et Polat G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea *Molecules*, **12**, 484-496.
- Venskutonis P. R. (1997).** Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) *Food Chemisry*, **59 (2)**: 219-227.

- Wegener C. B. (2002).** Induction of defence responses against *Erwinia* soft rot by an endogenous pectate lyase in potatoes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **60**: 91-100.
- Wegener C. B. et Olsen O. (2004).** Heterologous pectate lyase isoenzymes are not different in their effects on soft rot resistance in transgenic potatoes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**: 59–66.
- Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W. et Chen F. (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, **97 (4)**: 705-711.
- Yaganza E.S. (2005).** Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre: base physico-chimique. Université Laval. Thèse de Doctorat.
- Yahiaoui-Zaidi R., Jouan B. et Andrivon D. (2003).** Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*, **52**: 28–40.
- Yamada J. et Tomita Y. (1996).** Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60 (2)**: 328-329.
- Yamasaki H., Sakihama Y. et Ikehara N. (1997).** Flavonoid-peroxydase reaction as detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol*, **115**: 1405-1412.
- Yoshida T., Hatano T., Ito H. (2000).** Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. *Biofactors*, **13**: 121-125.
- Zaidi F., Khima O., Hassissene N., Iguer-Ouada M, Grongnet J.F., Bellal M.M. et Youyou A. (2007).** Les grignons d'olives : composition physico- chimique et digestibilité à la cellulase des fractions granulométriques. (*Soumis à publication*).
- Zhang Y., Bak D.D., Heid H. et Geider K. (1999).** Molecular Characteristic of protease secreted by *Erwinia amylovora*. *J. Mol. Biol.* **289**: 1239-1251.
- Zuo Y., Wang C. et Zhan J. (2002).** Separation, characterisation, and quantitation of benzoic and phenolics antioxidants in American cranberry fruits by GC-MS. *J. Agric. Food Chem*, **50**: 3789 - 3794.

Annexe

Annexe

Annexe 1 : description du matériel végétal utilisé

1. Feuilles d'*Olea europaea* L. variété Chemlal

Olea europaea L. est une dicotylédone de l'ordre des Lamiales, appartenant à au genre *Olea* de la famille des Oléacées. Il s'agit de l'olivier, arbre pouvant atteindre 10 m de hauteur et doué d'une très longue longévité. Cet arbre pousse sur le pourtour méditerranéen. La variété Chemlal nommé aussi Achamlal, Achamli ou bien Achemlal, est une variété typique de la région de Kabylie. Elle occupe environ 30% de la surface oléicole du pays. Les arbres sont très vigoureux de grandes dimensions, à port étalé et feuillage moyen, ses fruits sont d'un poids moyen et de forme ovoïde destiné à la production d'huile (**Baba-Aissa, 1991**).

2. Grignon d'olive

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

3. *Salvia officinalis* L

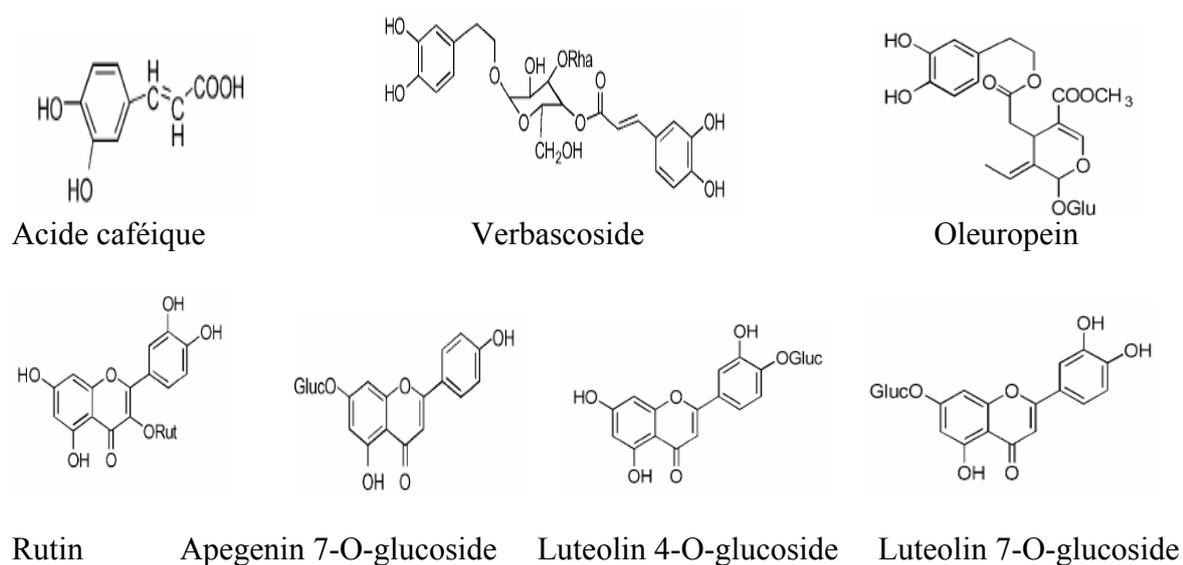
La sauge officinale, est une plante du genre *Salvia* de la famille des Lamiaceae, originaire de la région méditerranéenne, c'est une plante ligneuse ou herbacée très ramifiée, aux tiges de section carrée, à base lignifiée. Les feuilles pétiolées sont vert-pale, veloutées. Les fleurs sont regroupées en petits glomérules. Elle est aujourd'hui cultivée, à des fins commerciales en Europe occidentale, en Russie et aux États-Unis.

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

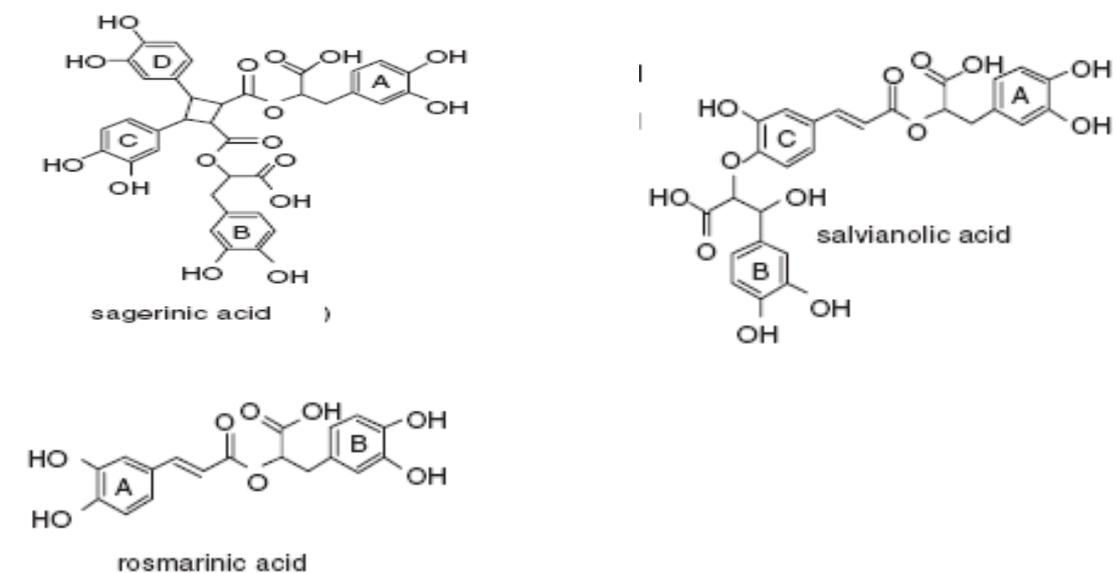
La plante de ce cultivar est à tiges très pigmentées et à ailes assez étroites, le plus souvent rectilignes. Les feuilles, peu divisées sont de couleur verte assez foncée et à pétioles et nervures pigmentés. Les fleurs sont rouges violacées et à pointes blanches. Le tubercule est de forme oblongue, à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

Annexe 2 : Principaux composés phénoliques du matériel végétal utilisé

1. Produits d'*O. europaea* L (feuilles et grignon) (Ryan *et al.*, 2002)



2. *Salvia officinalis* L ((Bruneton, 1999)



Annexe 3 : Préparation des solutions, réactifs et milieu de culture

- **Solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3)**

20g de Na_2CO_3 dans 100ml d'eau distillée.

- **Tampon acétate à pH 4,9:**

- Acide acétique à 0.20M
- chlorure de sodium à 0.17 M
- pH Ajusté à 4,9

- **Solution BSA**

préparée à une concentration de 1 mg/ml de BSA dans le tampon acétate et conservée à 4°C

- **Solution SDS :**

- 50 ml de triethanolamine
- 10 g SDS
- Compléter à 1 litre d'eau distillée.

- **Solution de chlorure de fer (FeCl_3)**

solution de 0,01M de FeCl_3 préparée par dissolution de 1,62 g de FeCl_3 à 0.01 M dans 1 litre d' HCl à 0.01 M

- **Solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3)**

2 g de poudre de AlCl_3 anhydre ($\text{AlCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) dans 100 ml de méthanol.

- **King B**

Protéose peptone..... 1,145 g
 Phosphate de K dibasique (K_2HPO_4)..... 1,5 g
 Sulfate de Mg ($\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) 1,5 g
 Agar..... 15 ml
 Glycerol..... 20 ml
 Eau distillée..... 1000 ml

- **Milieu Levure Peptone (LP)**

Extrait de levure3g
 Peptone5g
 Eau distillée..... 1000 ml

- **Milieu Luria Bertali (LB)**

Tryptone..... 10 g
 Extrait de levure5 g
 NaCl15 g
 Agar10 g
 Eau Distillée1000 ml

Annexe 4 : Courbes d'étalonnage

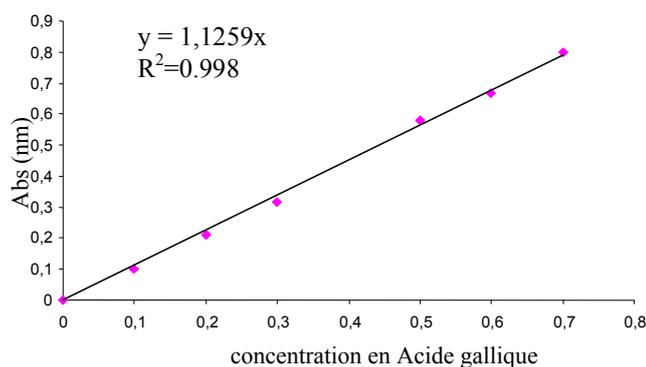


Figure 1 Courbe étalon pour le dosage des polyphénols

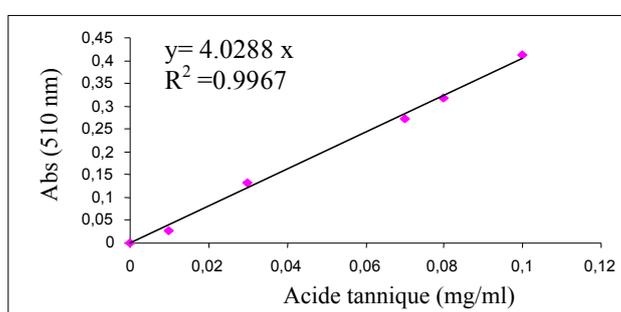


Figure 2 : Courbe étalon pour le dosage des tannins

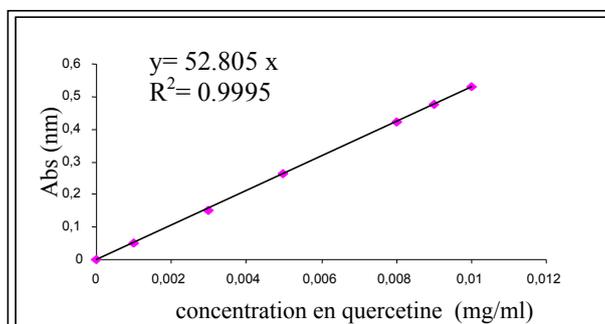
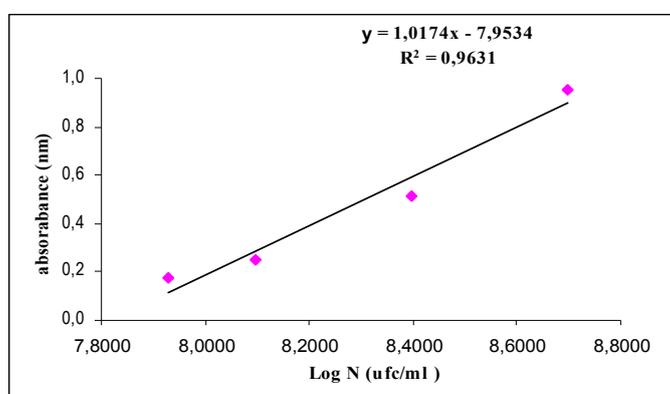


Figure 3 : Courbe étalon pour le dosage des flavonoides

Figure 4 : Courbe étalon de *Pectobacterium carotovorum* ssp *atrosepticum*

Annexe 5 : Concentration d'extraits de plantes rapportées en mg EAG/g Ms, mg mg EAT/g Ms , mg EQ/g Ms

	mg/ml	EAG	EAT	EQ
E Ac de Salvia officinalis	40	1,70	0,108	0,0550
	20	0,85	0,054	0,0275
	10	0,43	0,027	0,0138
	5	0,21	0,014	0,0069
E MeOH de Salvia officinalis	40	1,19	0,144	0,0548
	20	0,60	0,072	0,0274
	10	0,30	0,036	0,0137
	5	0,15	0,018	0,0068
E Ac de feuilles d'olivier	40	1,73	0,154	0,0531
	20	0,87	0,077	0,0266
	10	0,43	0,038	0,0133
	5	0,22	0,019	0,0066
E MeOH de feuilles d'olivier	40	1,40	0,158	0,0475
	20	0,70	0,079	0,0238
	10	0,35	0,040	0,0119
	5	0,18	0,020	0,0059
E Ac de grignon d'olive	40	0,58	0,080	0,0014
	20	0,29	0,040	0,0007
	10	0,15	0,020	0,0004
	5	0,07	0,010	0,0002
E MeOH de grignon d'olive	40	0,46	0,041	0,0054
	20	0,23	0,020	0,0027
	10	0,12	0,010	0,0014
	5	0,06	0,005	0,0007

Annexe 6 : Résultats des tests statistiques

1. Humidité

Test LSD; variable HUMIDITE (new.sta) Groupes homogènes, alpha = 0,001
EFFET PRINC.:PLANTE

	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4
Feuilles d' <i>O. europaea</i> {2}	46.94500	xxxx		
Grignon {3}	49.05900		xxxx	
<i>S. officinalis</i> {1}	68.54040			xxxx

2. Rendement d'extraction

Test LSD; variable RD (polyphénols.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05
EFFET PRINC.:PLANTE

	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4
Grignon {3}	12.02500	xxxx		
<i>S. officinalis</i> {2}	17.13550		xxxx	
Feuilles d' <i>O. europaea</i> {1}	21.90575			xxxx

3. Dosage des polyphénols

Test LSD; variable POLYPHEN (new.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05
EFFET PRINC.:solvant

	MOY_	VAR2	VAR3
MeOH {2}	28.23818	Xxxx b	
Acétone {1}	30.76497		Xxxx a

Test LSD; variable POLYPHEN (new.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05
EFFET PRINC.:plante

	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4
Grignon {3}	13.09638	Xxxx c		
<i>S. officinalis</i> {1}	36.21753		Xxxx b	
Feuilles d' <i>O. europaea</i> {2}	39.19080			Xxxx a

Test LSD; variable POLYPHEN (new.sta)

	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5	VAR6	VAR7
MeOH * Grignon {6}	11.56977	Xxxx f					
Acétone * Grignon {3}	14.62300		Xxxx e				
MeOH * sauge {4}	29.84293			Xxxx d			
Acétone * Feuilles d'olivier{2}	35.07977				Xxxx c		
Acétone * sauge {1}	42.59213					Xxxx b	
MeOH * Feuilles d'olivier {5}	43.30183						Xxxx a

Dosage des Tannins

Test LSD; variable TANNIN (new.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05
EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:solvant

	MOY_	VAR2
MeOH {2}	2.820245	xxxx
Acétone {1}	2.884500	xxxx

Test LSD; variable TANNIN (new.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05
EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:plante

	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4
.... Grignon {3}	1.503817	xxxx		
.... Sauge {1}	3.153617		xxxx	
.... Feuilles d'olivier {2}	3.899683			xxxx

Test LSD; variable TANNIN (tanni.sta) Groupes homogènes
alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:solvant-plante

	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5	VAR6
Grignon * MeOH {5}	1.015567	Xxxx e				
Grignon * Acétone {6}	1.992067		Xxxx d			
Sauge * Acétone {2}	2.705933			Xxxx c		
Sauge * MeOH {1}	3.601300				Xxxx b	
Feuilles d'olivier * MeOH {3}	3.843867					Xxxx a
Feuilles d'olivier * Acétone {4}	3.955500					Xxxx a

Dosage des flavonoides

Test LSD; variable PHÉNOLS (flavonoides.sta)

	MOY_	VAR2
Acétone {2}	0.913716	xxxx
MeOH {1}	0.917057	xxxx

Test LSD; variable PHÉNOLS (flavonoides.sta) Groupes homogènes
alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:plante

	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4
grignon {3}	0.086002	xxxx		
Feuilles d'olivier {2}	1.287400		xxxx	
sauge {1}	1.372757			xxxx

Test LSD; variable PHÉNOLS (flavonoïdes.sta) Groupes homogènes alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:plante et solvant						
	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5	VAR6
Grignon * Acétone {6}	0.036007	xxxx				
Grignon * MeOH {5}	0.135998		xxxx			
Feuilles d'olivier * MeOH {3}	1.245273			xxxx		
Feuilles d'olivier * Acétone {4}	1.329527				xxxx	
Sauge * MeOH {1}	1.369901					xxxx
Sauge* Acétone {2}	1.375613					xxxx

Tests *in vitro*

acide gallique et tannique (AT et AG)

Test LSD; variable ZI (in vitro.sta) Groupes homogènes, alpha =0,001
EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:composé

	MOY_	VAR2	VAR3
Acide Gallique {2}	7.95833	xxxx	
Acide Tannique {1}	21.77778		xxxx

Test LSD; variable ZI (in vitro at et ag.sta) , alpha =0,001 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:composé								
	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5	VAR6	VAR7	VAR8
Acide Gallique * 6,25 {4}	0.00000	xxxx						
Acide Gallique * 12,5 {3}	7.33333		xxxx					
Acide Gallique * 25 {2}	11.16667			xxxx				
Acide Gallique * 50 {1}	13.33333				xxxx			
Acide tannique* 6,25 {7}	18.33333					xxxx		
Acide tannique * 12,5 {6}	20.33333						xxxx	
Acide tannique * 25 {5}	26.66667							xxxx

Effet d'extrait de plantes

Test LSD; variable ZI (in vitro.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:solvant			
	MOY_	VAR2	VAR3
MeOH {1}	4.930555	xxxx	
Acétone {2}	7.291667		xxxx

Test LSD; variable ZI (in vitro.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:plante		
	MOY_	VAR2
Feuilles d'O. europaea{2}	5.666667	xxxx
Sauge {1}	5.791667	xxxx
Grignon {3}	6.875000	xxxx

Test LSD; variable ZI (in vitro.sta) Groupes homogènes alpha = ,01 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:concentration					
	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5
25 {1}	1.16667	Xxxx a			
50 {2}	4.16667		Xxxx b		
100 {3}	7.58333			Xxxx c	
200 {4}	11.52778				Xxxx d

Test LSD; variable ZI (in vitro.sta) Groupes homogènes alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:plante et solvant				
	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4
Feuilles d'olivier * MeOH {3}	2.666667	Xxxx C		
Sauge * Acétone {2}	3.916667	Xxxx C		
Grignon * MeOH {5}	4.458333	Xxxx C	Xxxx B	
Sauge* MeOH {1}	7.666667		Xxxx B	Xxxx A
Feuilles d'olivier * Acétone {4}	8.666667			Xxxx A
Grignon * Acétone {6}	9.291667			Xxxx A

Testes *in vivo*

Test LSD; variable POURITURE (new.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:plante			
	MOY_	VAR2	VAR3
Feuilles d'O. europaea {2}	30.87862	xxxx	
Grignon {3}	35.20641	xxxx	
Sauge {1}	57.94231		xxxx

Test LSD; variable POURITUR (new.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:solvant		
	MOY_	VAR2
MeOH {1}	39.43482	xxxx
Acétone {2}	43.25008	xxxx

Test LSD; variable POURITUR (in vivo.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05 EFFET PRINC.: EFFET PRINC.:concentration					
	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5
400 {4}	11.17944	xxxx			
200 {3}	23.54804		xxxx		
100 {2}	54.02042			xxxx	
50 {1}	76.62190				xxxx

Test LSD; variable POURITUR (new.sta) Groupes homogènes, alpha = ,05
EFFET PRINC.: EFFET PRINC.: plante et solvant

	MOY_	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5
Feuilles d'olivier * Acétone {4}	25.50550	Xxxx a			
Grignon* MeOH {5}	27.18445	Xxxx a	Xxxx b		
Feuilles d'olivier * MeOH {3}	36.25175	Xxxx a	Xxxx b		
Grignon*Acétone {6}	43.22837		Xxxx b	Xxxx c	
Sauge * MeOH {1}	54.86825			Xxxx c	Xxxx d
Sauge * Acétone {2}	61.01637				Xxxx d

Résumé

L'activité antibactérienne des extraits acétoniques et méthanoliques des feuilles de *Salvia officinalis* L. et des produits d'*Olea europaea* L. (feuilles et grignon d'olive) a été testée vis-à-vis de *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum*, *in vitro* et sur demi tubercules de *Solanum tuberosum* L., dans le but de contribuer à la protection des tubercules de pomme de terre contre la pourriture molle.

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent que l'extraction à l'acétone (70%) donne globalement un meilleur rendement que l'extraction au méthanol (80%), avec un taux relativement élevé pour les feuilles d'*O. europaea* L. Le dosage colorimétrique des extraits obtenus montre des teneurs variables en polyphénols totaux, tannins et flavonoïdes en fonction du solvant, matériel végétal avec des concentrations plus faibles dans les trois dosages pour le grignon d'olive.

L'activité antibactérienne de deux extraits de synthèse (acide gallique et tannique) sur *P. c. atrosepticum in vitro* a été très efficace avec un effet inhibiteur plus prononcé marqué par l'acide tannique (ZI : 26,67±0.58 mm ; CMI de 0.3125 mg/ml). Les six extraits de plantes testés montrent tous une activité antimicrobienne à la concentration de 200 mg/ml avec des zones d'inhibition variables plus élevées dans l'extrait acétonique des feuilles d'*Olea europaea*. Cet extrait présente également la plus faible CMI avec le grignon méthanol estimée à 5 mg/ml.

Les six extraits de plantes testés sur demi tubercules de pomme de terre ont montré une baisse importante du développement de la pourriture molle avec une inhibition plus prononcée (inhibition près de 96% de la maladie) obtenue par l'extraits acétonique d'*Olea europaea* L et l'extraits méthanolique du grignon d'olive à la concentration 400 g/ml.

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

Summary

Acetonic and methanolic extracts of *Salvia officinalis* L leaves and the products of *Olea europaea* L (leaves and olive cake) were assessed against *P. carotovorum* ssp. *atrosepticum*, *in vitro* and on *Solanum tuberosum* L. half tubers.

The obtained results from this investigation showed that extraction with aqueous acetone gave generally the best yield of phenolic compounds than aqueous methanol with a higher yield obtained by *Olea europaea* L leaves. Total phenolics, tannins and flavonoids concentrations showed variable concentrations with lower proportions in olive cake.

All the plant extracts have an antibacterial activity in a concentration of 200 mg/ml. The obtained results from the *in vivo* study reveal that all extracts show a decrease in soft rot development; with a clear inhibition at 400 mg/ml. Acetonic extract of *Olea europaea* leaves and methanolic extract of olive cake were the most effective (inhibition of 96% of disease).

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