

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biotechnologie Microbienne



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Extraction et dosage de la phénylalanine
ammonialyase (PAL) des végétaux infectés
par *Pectobacterium / Dickeya sp***

Présenté par :

KHIMOUM Meriem & MEDDOURI Assia

Soutenu le : 15 Juin 2016

Devant le jury composé de :

M ^r BELHADI D.	MAA	Président
M ^{me} MESSAOUDI K.	MCB	Examinatrice
M ^r LADJOUZI R.	MAA	Promoteur

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail

Nos remerciements vont à notre promoteur Mr LADJOUZI R pour son accueil, ses conseils toujours pertinents, et sa mise à notre disposition

Nos remerciements les plus sincères s'adressent également à Mr BELHADI D d'avoir accepté de présider le jury, ainsi que Mme MESSAOUDI K de nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail

Nous remercions aussi le personnel du laboratoire de Mycologie

Finalement, on est profondément reconnaissantes à toute personne qui nous a idées de près ou de loin, durant ce passage.

Merci 

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes parents

Mes frères

Mes sœurs

Mes amies

Naouel

Lyza, Aya, Chifa, Rahma, Yacín

*Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce travail.*

Assia



Dédicace

**Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que
je dédie ce travail à :**

Mes chers parents qui m'ont soutenue tout au long de ma vie

A mes sœurs : Houria, Nana, Djahida, Lila, Mira

A ma belle maman Tasadit ainsi qu'à mon adorable Ryadou

A mes chers amis et mon promoteur Mr LADJOUZI

Meriem



Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des figures en annexes

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur les <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya sp.</i>.....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Description.....	3
I.3. Taxonomie.....	3
I.4. Maladies associées aux espèces pectinolytiques	4
I.4.1. Pourriture molle.....	5
I.4.2. Jambe noire.....	5
I.5. Facteurs de virulence.....	6
I.5.1. Sidérophores.....	6
I.5.2. Mobilités flagellaires.....	6
I.5.3. Lipopolysaccharides.....	6
I.5.4. Enzymes extracellulaires.....	6
I.5.4.1. Pectate-lyase.....	7
I.5.4.2. Pectine-lyase.....	7
I.5.4.3. Pectate- hydrolase.....	7
I.6. Quorum sensing.....	7
II. Mécanismes de résistance et réponses végétales.....	8
II.1. Défense préformée.....	8
II.2. Défense induite.....	8
II.2.1. Réaction hypersensible (HP).....	9
II.2.2. Renforcements de la paroi cellulaire.....	9
II.2.3. Synthèse des substances antimicrobienne.....	9
II.2.3.1. Production de protéines PR.....	9
II.2.3.2. Production des phytoalexines.....	9
II.2.4. Stimulation des métabolites secondaires.....	10

Partie expérimentale

I. Matériel.....	13
I.1. Matériel bactérien.....	13
I.2. Matériel végétal.....	13
II. Méthodes.....	14
II.1. Préparation des cultures bactériennes.....	14
II.2. Test de pathogénicité.....	14
II.3 Test d'antibiogramme.....	16
II.4 Extraction et dosage des enzymes Pectate-lyases	17
II.5 Extraction/Dosage de la PAL.....	20
III. Résultats et discussion.....	21
III.1 Test d'infection sur pomme de terre et carottes.....	21
III.1.1 Evaluation des facteurs de pathogénicité.....	23
III.2 Test d'Antibiogramme.....	30
III.3 Dosage des enzymes Pectate-lyases.....	32
III.4 Dosage de la PAL.....	34

Conclusion

Liste des références

Annexes

Résumé

Liste des abréviations :

Ak : Amikacine

AMC : Amoxyclav

AMX : Amoxicilline

BN : Bouillon nutritive

CAZ : Ceftazidine

CFBP : Collection française de bactérie pahytopathogènes

CTX : Cafotaxime

CX: Cefoxitine

DSA : Direction des Services Agricoles

DO : Densité optique

EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique

GEN: Gentamycine

HR: Réaction hypersensible

IMP: Imipenème

INRA : Institut national de la recherche agronomique

LP : Levure peptone

LPS : Lipopolysacharides

OX : Oxacilline

Ph: Phényle alanine

PL : Pectine lyase

PR: Pathogenesis related

PAL: Phenylalanine ammonia lyase

PEL : Pectate lyase

PGA: Polygalacturonic acid

Phes : Pectate hydrolase

TE : Tétracycline

TCA : Acide trichloracétique

UMR : Unité mixte de recherche

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Cycle de développement de la pourriture molle.	04
02	Aspect des symptômes sur pommes de terre (<i>Pectobacterium sp.</i>).	05
03	Mécanismes de résistance chez les plantes.	08
04	Illustrations des trois voies de synthèse de quatre classes de Phytoalexines.	10
05	Désamination de la L-Phe par la PAL en Transcinnamate.	11
06	Tubercules de pommes de terre utilisées (variétés Désirée « rouge » et Spunta « blanche »)	13
07	Echantillons de pommes de terre et de carottes inoculées	16
08	Protocole de dosage de l'activité pectate-lyase	19
09	Symptômes de pourriture molle sur pomme de terre et carottes	21
10	Tissus macérés sur cultivar Désirée (à droite) et Spunta (à gauche)	22
11	Symptômes de pourriture molle sur demi-tubercules du cultivar Désirée	22
12	Symptômes de pourriture molle sur demi-tubercules du cultivar Spunta	22
13	Poids des tissus macérés sur demi-tubercules	23
14	Volume d'eau des tissus macérés sur demi-tubercules	24
15	Longueurs des tissus macérés sur demi-tubercules	24
16	Profondeur des tissus macérés sur demi-tubercules	25
17	Aire des zones infectées sur variétés Désirée (gauche) et Spunta (droite)	26
18	Symptômes de pourriture molle sur tubercules de pommes de terre	27
19	Longueurs des tissus macérés sur tubercules	27
20	Largeurs des tissus macérés sur tubercule	27
21	Symptômes de macération sur tranches et rhizomes de carottes	28
22	Longueurs des tissus macérés sur tranches de carottes	28
23	Poids des tissus macérés sur tranches de carottes	29
24	Longueurs des tissus macérés sur carottes	29
25	Poids des tissus macérés sur tranches de carottes	30
26	Zones d'inhibitions obtenues sur boîtes de Pétri	31
27	Résultats du test d'antibiogramme sur l'espèce (5384 et 3937)	32
28	Résultats du dosage de l'enzyme Pectate lyase	33
29	Résultats du dosage de l'enzyme Phénylalanine-ammonialyase	34

Introduction

Introduction

Les plantes (arbres, herbes, fleurs...) constituent la majorité des ressources énergétiques dont dépendent directement ou indirectement l'homme et les animaux. Elles sont également les seuls organismes supérieurs à pouvoir convertir et stocker l'énergie lumineuse sous forme de glucides, lipides et protéine. Tous les êtres vivants dépendent des végétaux pour leur survie.

Malheureusement, lorsqu'une plante est atteinte d'une maladie virale, fongique ou bactérienne, sa croissance, sa fertilité et sa productivité sont affectées. Des symptômes se développent et tout ou une partie de l'organisme peut mourir. Les agents responsables des maladies végétales peuvent être biologiques (microorganismes pathogènes ; compétition avec d'autres plantes ; insectes ravageurs) ou physiques (manque de nutriments, lumière, eau, présence de polluants toxiques dans le sol ou l'air).

La pomme de terre est l'une des denrées alimentaire de base et l'un des légumes les plus consommés dans le monde avec une moyenne de 60Kg/ personne/an. Elle est classée, en termes de production, en quatrième position derrière le maïs, le riz et le blé (**Bessadat, 2014**).

A l'instar des autres végétaux, les cultures de pomme de terre et les tubercules récoltés sont sujets à de nombreuses agressions bactériennes. Parmi ces bactéries, un regain d'intérêt est accordé aux bactéries macergènes appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sp (*Erwinia pectinolytiques*), agents de pourritures molles et de jambe noire (**Hélias, 2008**).

Ces bactéries envahissent les espaces intercellulaires de la plante et produisent des enzymes pectinolytiques. Ces dernières, en particulier les pectates lyases jouent un rôle clef dans le catabolisme des pectines, l'apparition des symptômes de macération et la libération du contenu cellulaire conduisant ainsi à une mort des tissus infectés.

En plus de la pomme de terre, des dégâts importants occasionnés par ces organismes pectinolytiques ont été signalés sur d'autres hôtes tels que le concombre, le chou-fleur, la tomate, le brocoli, le piment et les carottes cité par (**Ladjouzi, 2007**).

Les mécanismes de défense végétale se caractérisent par un bouleversement du métabolisme pouvant entraîner des modifications morphologiques afin de stopper ou empêcher la colonisation. Parmi ces systèmes, on peut citer l'induction des voies de synthèse des métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les anthocyanines, les coumarines...

Différentes voies de biosynthèse sont impliquées dans la mise en place des processus de défense contre les agents pathogènes. Les enzymes qui participent à ces synthèses sont induites lors de l'interaction avec l'agent pathogène ou en réponse à l'application d'éliciteurs.

La phénylalanine ammonialyase (PAL) enzyme clé dans la biosynthèse des phenylpropanoïdes permettant la dégradation de la phénylalanine (Phe) en acide cinnamique, est également induite en réponse à la présence des agresseurs ou des éliciteurs chez les plantes **(Dorey et al., 1999)**.

Notre travail expérimental est axé sur :

- ✚ L'évaluation de la virulence des souches pectinolytiques, ainsi que la sensibilité des tissus végétaux, ceci par la réalisation de tests de pathogénicité et d'agressivité sur des tubercules pommes de terre et carottes, et l'observation des symptômes d'hypersensibilité et de pourriture molle.
- ✚ Mise en évidence des réactions de défense de la plante survenant lors du processus d'infection, en particulier la production de métabolites secondaires.
- ✚ Caractérisation du rôle des substances bioactives et de la phénylalanine ammonialyase dans l'induction d'une résistance végétale.

Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B., Kauffmann, S., 1999. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. Plant Physiology 121, 163-172.

Hélias, V., 2008. Pectobacterium spp. et Dickeya spp. de la pomme de terre: nouvelle nomenclature pour Erwinia spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. Cahiers Agricultures 17, 349-354.

Rachid, L.(2007). Recherche et identification des pectobacterium, agents de la pourriture molle sur différentes plantes hôtes: pomme de terre, tomates et carottes, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa

Synthèse
Bibliographique

I. Généralités sur les genres *Pectobacterium/Dickeya*

1- Définition

Les genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sp, (anciennement appelés *Erwinia* pectinolytiques), regroupent l'ensemble des bactéries, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, phylum des protobactéries. Ces espèces sont responsables de pourritures molles, nécroses et flétrissements sur de nombreuses cultures maraichères (**Winslow et al., 1917 ; Muraschi et al., 1965 ; Lautier, 2007**).

2- Description

Les espèces appartenant aux genres *Pectobacterium/Dickeya* sp sont des bactéries phytopathogènes à activité pectinolytique, Gram négatif, anaérobies facultatives, en forme de bâtonnets. Elles sont mobiles par flagelles péritriches (**Hauben et Swings, 2005 ; Czajkowski, 2012**).

3- Taxonomie

La position taxonomique et la spéciation au sein du genre *Erwinia* ont été longtemps l'objet de controverses et de polémiques dues à l'hétérogénéité des souches d'un même taxon (en annexe) (**Paulin et al., 2001**).

- En 1901, l'espèce *Erwinia carotovora* fut isolée pour la première fois par Jones, à partir d'une pourriture humide de carotte, sous le nom de *Bacillus carotovorus* (**Skerman et al., 1980**).
- Le nom *Erwinia* fut proposé pour la première fois par (**Winslow et al., 1917**) en honneur du phytopathologiste Erwin F. Smith, ce genre permit de regrouper les entérobactéries pathogènes, saprophytes et épiphytes des plantes (**Pérombelon et Kelman, 1980 ; Toth et Birch, 2005**).
- Waldee en 1945 proposa la création du genre *Pectobacterium* pour classer les *Erwinia* pectinolytiques (espèces *carotovora* et *chrysanthemi*) dans un groupe séparé des autres *Erwinia*, agents de nécroses sèches et flétrissements. Cette suggestion a été appuyée par les travaux de (**Brenner et al., 1973**).
- En 1968 et 1969, Dye proposa le maintien du genre *Erwinia* qu'il subdivise en quatre groupes : *Amylovora*, *Carotovora* qui regroupe les espèces pectinolytiques, *Herbicola* et un dernier groupe constitué d'espèces atypiques (**Ladjouzi, 2007**).
- D'autres auteurs (**Kwon et al., 1997 ; Hauben et al., 1998**) s'appuyant sur le séquençage des ARNr 16S ont proposé de déplacer les *Erwinia* pectinolytiques vers le genre *Pectobacterium*, rejoignant ainsi Waldee (1945).

- La nouvelle nomenclature suggérée par ces auteurs et consignée dans la seconde édition du Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology) est : *Pectobacterium carotovora* subsp. *atrosepticum*, *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovorum* et *Pectobacterium chrysanthemi* (Hauben et al., 2005).
- Ces phytopathogènes ont été par la suite subdivisées en deux groupes différents : *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* et *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, puis respectivement *Pectobacterium atrosepticum* et *Pectobacterium carotovorum* (Garden et al., 2003). Tandis qu'*Erwinia chrysanthemi* est devenu un nouveau genre (*Dickeya* spp) (Samson et al., 2005).
- Les espèces *Dickeya* spp associées à la pomme de terre sont *D. dadantii*, *D. zaeae*, *D. dianthicola* (Samson et al., 2009), ainsi qu'une dernière espèce nommée *solani* (Parkinson et al., 2009 ; Cahill et al., 2010 ; Toth et al., 2011). Par ailleurs, une nouvelle sous-espèces (*Pectobacterium carotovora* ssp. *brasiliensis*) associée aux symptômes de jambe noire sur pomme de terre a été découverte au Brésil (Duarte et al., 2004), puis en Afrique du Sud (Van der Merwe et al., 2010)

4- Maladies associées aux espèces *Pectobacterium*

Les bactéries pectinolytiques appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sont parmi les principaux agents pathogènes sur pommes de terre, ainsi que sur d'autres cultures végétales. Ces espèces sont responsables des maladies de jambe noire et pourriture molle qui sévissent au cours de culture et lors du stockage (Khayy, 2015).

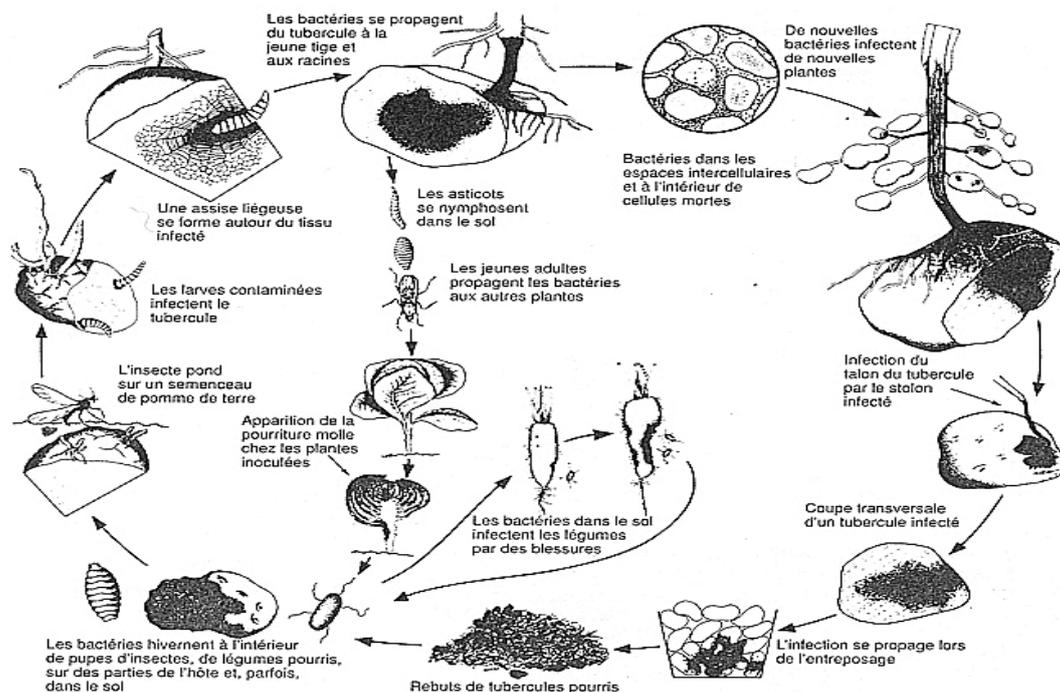


Figure N° 01 : Cycle de développement de la pourriture molle (Howard et al., 1994).

4.1 Pourriture molle

La pourriture molle est l'une des plus importantes maladies bactériennes de la pomme de terre à l'échelle mondiale (Yanganza, 2005). Les blessures mal cicatrisées, les lenticelles et le stolon des tubercules sont les voies d'accès majeures du pathogène (Fox et al., 1972). Selon (Grouws et Roodeplaat, 2003), la maladie commence en surface pour progresser ensuite vers l'intérieur. Les parties atteintes montrent d'abord une décoloration légèrement brune, qui se creuse, suivie par une transformation de la chair en une pourriture molle typique (Fig2 : A et B) (Howard et al., 1994).

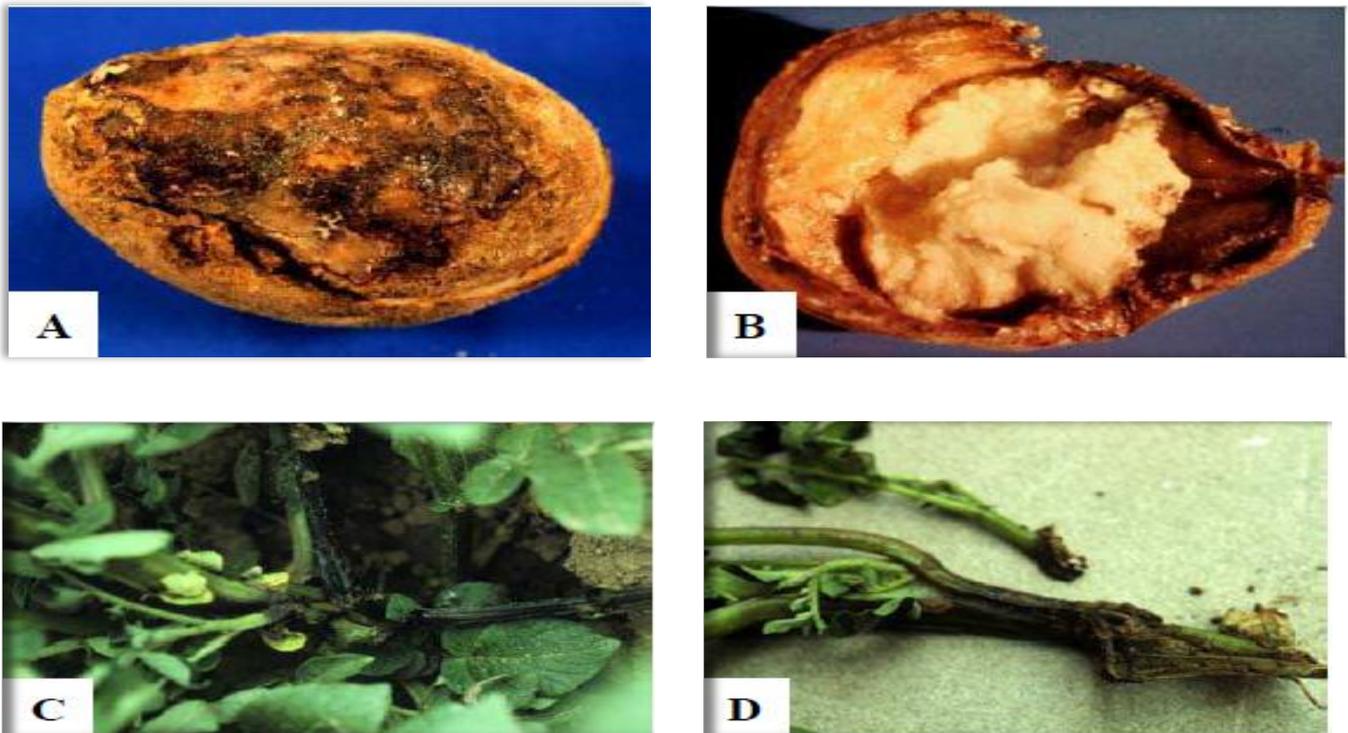


Figure N° 02 : Symptômes des maladies de pourriture molle et jambe noire

A) Macération à l'extérieur du tubercule ; B) Symptômes à l'intérieur du tubercule ; (C et D) Jambe noire à la base des tiges

4.2 Jambe noire

La jambe noire est principalement causée par *P. atrosepticum* (anciennement nommée *Erwinia carotovora ssp atroseptica*) (Helias et al., 2000). Elle se manifeste, en cours de végétation, par un ralentissement de la croissance végétale et une chlorose du feuillage, les tiges présentent à leur base une zone molle, brune et noirâtre, avec un flétrissement progressif (Fig N° 2 : C et D) (Grisson, 1983).

5- Facteurs de virulence

5.1. Sidérophores

Les bactéries produisent de petites molécules de faible poids, appelées sidérophores qui ont une très forte affinité pour l'ion Fe^{3+} , formant ainsi des complexes sidérophores- Fe^{3+} au sein de l'environnement. Ces derniers jouent un rôle clef dans les mécanismes de transport actif. Une fois dans la cellule, le complexe se dissocie et le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}). Ce dernier est utilisé par la cellule pour le fonctionnement des enzymes respiratoires, les sidérophores sont alors recyclés par une pompe à efflux vers le milieu extracellulaire (**Geoffroy et Moser, 2014**).

5.2. Mobilité flagellaire

Les flagelles permettent aux bactéries de chercher des environnements favorables ou d'échapper aux conditions détritantes, ainsi qu'une compétition avec d'autres microorganismes. En outre, le flagelle lui-même constitue certains facteurs de virulence tels que les flagellines qui peuvent induire des réactions de défense chez l'hôte (**Hossain et al., 2006**).

5.3 Lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont des macromolécules de surface majoritaires chez les bactéries Gram négatif (**Erbs et Newman, 2012**). Ils jouent un rôle dans la fixation des cellules bactériennes aux parois végétales, tout en induisant des réponses défensives chez l'hôte (**Newman et Roepenack, 2000 ; Val et al., 2006**).

5.4 Enzymes extracellulaires

Après une étape de multiplication des bactéries, ces dernières secrètent de façon synchrone et en réponse à un mécanisme de régulation, un ensemble d'enzymes lytiques dont l'activité est responsable des symptômes de macération observables sur plantes et tubercules.

Chez *Pectobacterium* sp, cet arsenal enzymatique est particulièrement bien adapté à la dégradation de tous les composants des parois végétales, ce qui explique l'ampleur des dégâts observés et leurs vitesses d'apparition. Il s'agit des protéases, cellulases et de nombreuses enzymes pectinolytiques (pectine et pectate lyases, pectate hydrolases et pectine méthylésterases) (**Latour, 2008**).

5.4.1 Pectate lyase (PEL)

Les PEL sont les enzymes les plus importantes dans le développement de la maladie (**Smadja et al., 2004a**). Ils dégradent les substances pectiques des parois des plantes par β -élimination, provoquant la formation de produits insaturés en C4-C5 (**Augustin, 2012**).

(**Smadja et al., 2004a**) ont montré que la température optimale de la pathogénicité de *Pectobacterium* était plus liée à la température de l'activité des Pels qu'à leur température de croissance.

5.4.2 Pectine lyases (PL)

Les PL ont comme substrat préférentiel la pectine. Elles possèdent le même mode d'action que les PEL, elles agissent par clivage interne dans la chaîne d'acide galacturonique méthylé (**Hatsch, 2004**).

5.4.3 Pectate hydrolases (Pehs)

Nommées aussi polygalacturonases, elles hydrolysent le polygalacturonate au niveau de la liaison α (1-4), à l'intérieur ou aux extrémités de la chaîne. Ces deux formes sont présentes chez *P. carotovora*, elles sont actives à pH 5.5 (**Priou, 1992**).

6- Quorum sensing

L'expression des facteurs de virulence chez les *Pectobacteria* est régulée par un mécanisme originale découvert au début des années 1980 : le quorum sensing (**Fuqua et al., 1994**). Ce dernier permet l'expression des gènes de virulence seulement lorsqu'un quorum bactérien est atteint (**Pérombelon, 2002**).

Les bactéries dans les tissus végétaux se multiplient jusqu'à atteindre un seuil, puis secrètent de façon synchrone, un ensemble de facteurs de virulence qui altèrent les parois végétales. Dans le but d'évaluer leur densité et donc de percevoir ce quorum, les *Pectobacterium* synthétisent des molécules signal, les N-acylhomoserine lactones (HSL) qui diffusent librement à travers les membranes cellulaires (**Latour et al., 2008**). L'infection se déroule en deux phases distinctes : une étape primo-invasive passive (préquorum) au cours de laquelle les bactéries se multiplient aux points d'infections (blessures, lenticelles), sans macérer les tissus de l'hôte. Ensuite une phase lytique active (post-quorum sensing) marquée par la production massive d'enzymes exo cellulaires (**Byers et al., 2002**).

II. Mécanismes de résistance et réponses végétales

Les plantes sont dotées de mécanismes de défense naturelle leur permettant de se protéger contre les attaques microbiennes. Ces systèmes peuvent être répartis en deux principales catégories, à savoir une défense préformée et une défense induite (Agrios, 2005).

1. Défense préformée

Les végétaux possèdent des défenses dites préformées ou passives qui constituent les premières remparts face aux attaques des phytopathogènes ou ravageurs. Elles comprennent des barrières physiques et d'autres chimiques (Gérard, 2014). Les barrières physiques (cuticule des feuilles) permettent aux cellules de résister à des pressions internes et/ou externes, et représentent une défense structurelle (Heredia et al., 1995).

Les barrières chimiques quant à elles, comportent divers composés antimicrobiens faisant également partie des défenses constitutives (phytoanticipines) (Van Etten et al., 1994).

2. Défense induite

Les systèmes de défense induits élaborés par le végétal sont représentés dans la figure suivante.

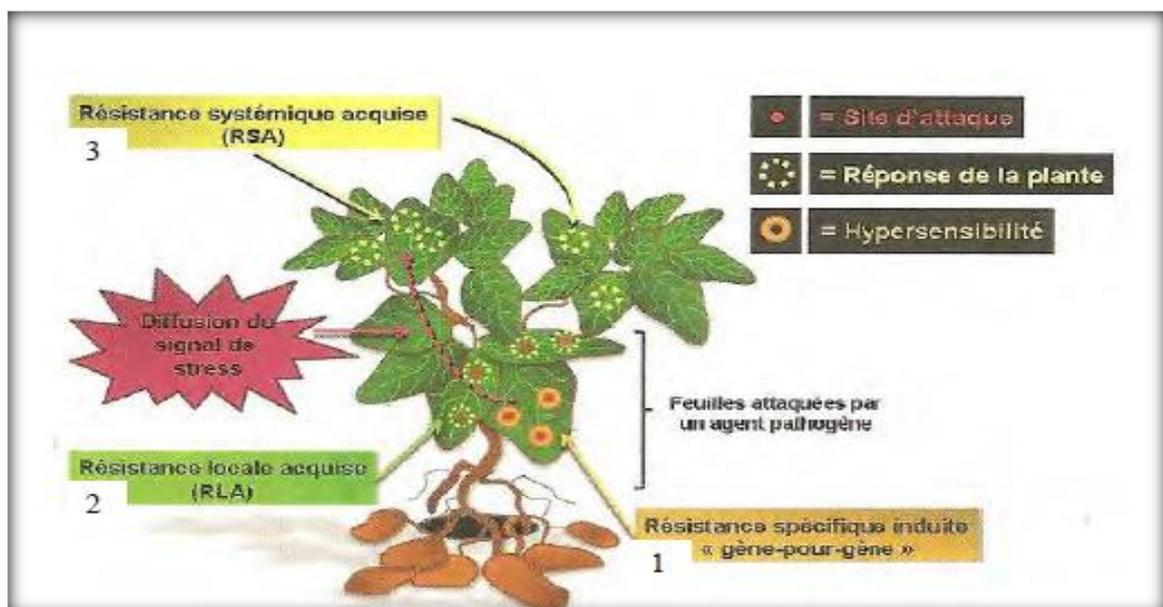


Figure N° 03 : Mécanismes de résistance chez les plantes (Benhamou, 2009).

2.1. Réaction hypersensible (HR)

C'est un mécanisme particulier de résistance mise en place en réponse aux agressions par les agents pathogènes (Bouarab, 2000). La HR présente deux caractéristiques majeures, apparition des lésions nécrotiques au niveau de chaque point d'infection (due à la mort de quelques cellules végétales entourant les cellules infectées) et l'accumulation de molécules antimicrobiennes autour des zones infectées (Greenberg, 1997). Les mécanismes moléculaires de la mort hypersensible ne sont pas connus. Cependant, de nombreux travaux suggèrent que cette réaction est une mort cellulaire génétiquement programmée (Dietriche *et al.*, 1994).

2.2. Renforcement de la paroi cellulaire

La paroi végétale (en annexe) constitue une barrière physique très efficace face aux pathogènes capables d'adhérer aux surfaces cellulaires de l'hôte, en la traversant par pression mécanique ou hydrolyse enzymatique (Benhamou *et al.*, 1996).

Dans la réponse locale liée à la HR, il est évident que la réaction végétale aux pathogène ou à la blessure est corrélée avec les changements biochimiques et physiologiques des cellules (Zhao *et al.*, 2005b ; Zhao *et al.*, 2005c ; Soylyu, 2006), comprenant la synthèse de nouvelles molécules comme les glycoprotéines riches en hydroxy prolines (HRGP), la callose (polymère de β (1-3) glucane) et des composés phénoliques tels que la lignine (Boudart *et al.*, 1995).

2.3. Synthèse des substances antimicrobiennes

a. Production de protéines PR

Les protéines PR (Pathogenesis Related) ont été initialement décrites en 1970 chez le tabac suite à une infection par le virale. Ces protéines sont retrouvées dans les tissus soumis aussi bien au stress biotique qu'abiotique. C'est pourquoi elles ont été longtemps considérées comme des protéines de défense uniquement. Néanmoins, il a été montré que certaines PR (en annexe) sont impliquées dans de nombreuses étapes de développement telles que la germination, la floraison ou encore la maturation des fruits (Van Loon *et al.*, 2006).

b. Production des Phytoalexines

Les phytoalexines sont définies comme étant des composés antimicrobiens de faible poids moléculaires produits par la plante après un stress biotique ou abiotique (Kùc, 1995). Ces composés sont synthétisés par trois principales voies métaboliques, à savoir les voies de l'acide shikimique, de l'acétate-mévalonate et de l'acétate-malonate.

La figure suivante illustre les voies aboutissant à la synthèse de 4 classes de phytoalexines : les terpènes, les composés polyacétylés, les stilbènes et les isoflavonoïdes (Benhamou, 2009).

Ces composants s'accumulent dans les tissus végétaux à l'emplacement d'infection ou de pénétration du pathogène, permettant ainsi de réduire ou de stopper sa progression en désorganisant et en tuant ses cellules. Dans certains cas, la rapidité de l'accumulation des phytoalexines est étroitement associée à la résistance de la plante (Hammerschmidt, 1999).

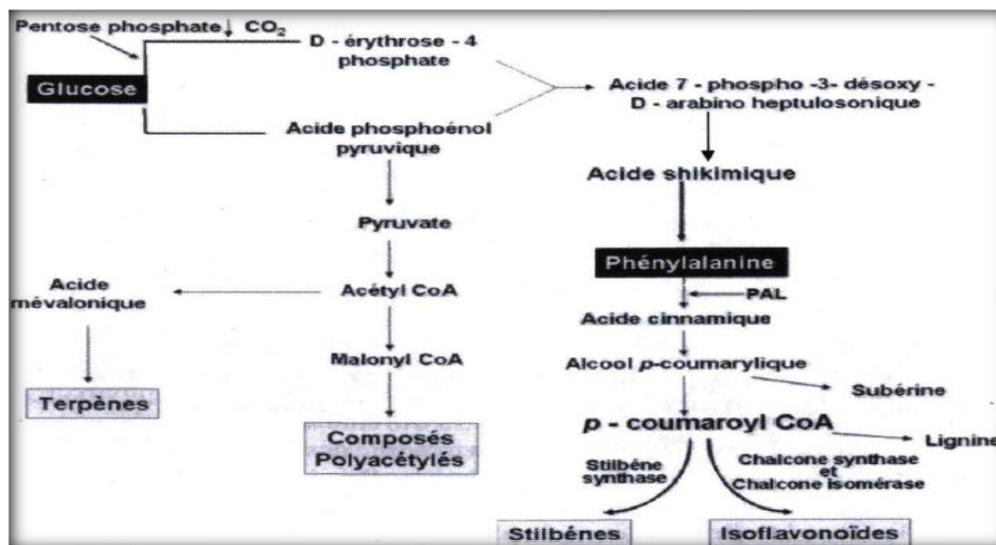


Figure N° 04 : Illustration des trois voies de synthèse de quatre classes de phytoalexines (Benhamou, 2009)

2.4. Stimulation des métabolites secondaires

Les métabolismes secondaires sont des composés synthétisés par la plante afin d'inhiber ou bloquer la propagation des pathogènes. Les enzymes qui participent à cette synthèse sont stimulées en réponse à l'application d'éliciteurs. Parmi ces enzymes, la Phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est à l'origine de plusieurs polyphénols dont les acides transcinnamique, caféique, chlorogéniques et feruliques (en annexe) (Katz *et al.*, 1998).

➤ La Phénylalanine ammonia-lyase

La PAL agit durant les premières étapes de la synthèse de produits phytochimiques (phenylprpanoïdes) (Martinez *et al.*, 1996). La réaction catalysée par la PAL est la

désamination spontanée, non oxydante de l'acide aminé L-Phe pour produire l'acide trans-cinnamique et l'ammoniac selon la formule suivante (Macheix et al., 2005).

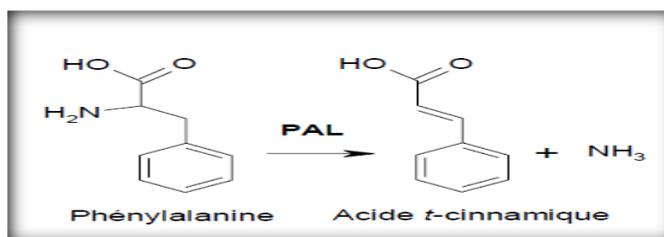


Figure N°05 : Désamination de la L-Phe en acide trans cinnamique par la PAL

La PAL (EC4.3.1.5) est une enzyme de type lyase présente chez les plantes et les champignons. Elle permet la catalyse des réactions de rupture de liaison carbone-azote (Fils-Lycaon, 2007).

L'activité de la PAL augmente après élicitation par un agent pathogène, par un microorganisme avirulent, ainsi que par un éliciteur biotique (endogène ou exogène) ou abiotique (Ebel, 1986). Les niveaux d'activité PAL peuvent différer en fonction du stade de développement de la plante, du génotype et des indices environnementaux (Dixon and Paiva, 1995).

En réponse à la présence d'un pathogène potentiel, la PAL s'accumule rapidement et atteint des niveaux élevés chez l'hôte durant les réponses de résistance (interactions incompatibles) que pour les réponses sensibles (interactions compatibles) (Wajahatullah Khan et al., 2003). Le dosage de la désamination de la L-Phe est réalisé par spectrophotométrie par un suivi de la production de la trans-cinnamate (Ian A Dubery et al., 1987).

La PAL est codée par une famille multigénique s'exprimant de manière différente selon les tissus et les plantes. Elle peut être regroupée dans des complexes enzymatiques fonctionnels avec différentes enzymes du métabolisme phénolique (El Ghaouth et al., 2003).

La PAL est une enzyme responsable de la biosynthèse de nombreux composés végétaux tels que les monomères de lignine et de certaines classes de phytoalexines. Elle peut donc intervenir dans le renforcement des parois cellulaires, dans la destruction du pathogène, mais aussi dans la transmission de signaux puisqu'elle participe à la synthèse d'acide salicylique. Elle peut également ralentir la progression de l'infection de manière indirecte en favorisant la mort cellulaire *via* des dommages sur les membranes cellulaires (Terry et Joyce, 2004).

Les études biochimiques sur les protéines recombinantes montrent que la PAL 1.2 et 4 possèdent une activité PAL avec une la même efficacité, mais que la PAL 3 ne présente qu'une faible activité. De plus, l'expression de PAL3 est très faible dans les tissus, et ne semble pas induite par quelconque stress. Les autres gènes de PAL sont exprimés dans de nombreux tissus (graines, plantules, feuilles, racines, les fleurs, siliques et la hampe florale) (**Raes et al., 2003**).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériel

1. Matériel bactérien

Deux souches bactériennes type sont utilisées pour notre expérimentation :

- ✚ *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* (Pca 53.84), provenant de la collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP/ INRA Anger- UMR pathologie végétale, France) isolée en Algérie en 1997 à partir de la variété de pomme de terre Désirée.
- ✚ *Dickeya dadantii* (Dd 39.37) de l'UMR Microorganismes, Adaptation et Pathologie (MAP)-Université Claude Bernard, Lyon-France.

2. Matériel végétal

Des tubercules de deux variétés de pomme de terre de consommation (cultivars à peau rouge « Désirée », et à peau blanche « Spunta », (fig6) ainsi que des rhizomes de carottes (en annexe) sont collectés au niveau du marché hebdomadaire de Bejaia durant la période comprise entre les mois de mars et avril 2016. Ces échantillons sont d'apparence saine, ne présentant aucune blessure ou symptôme de maladie



Figure N° 06 : Tubercules de pomme de terre utilisés (variétés Désirée « rouge » et Spunta « blanche »)

II. Méthodes

1. Préparation des cultures bactériennes

Les souches de référence utilisées, (*Dickeya dadantii*, *P. atrosepticum*), sont revivifiées à partir de souches conservées dans le glycérol à -80°C. Elles sont d'abord ensemencées sur bouillon LP (levure peptone) pour un enrichissement. Après une période d'incubation à 27°C pendant 24h/48h, elles sont repiquées à plusieurs reprises sur milieu de culture semi-sélectif King B(en annexe) en boîtes de Pétri.

2. Tests de pathogénicité

1) Principe

La méthode d'évaluation de la virulence repose sur l'induction et l'observation des symptômes typiques de pourriture molle sur tissus végétaux, tubercules, demi-tubercules de pommes de terre, ainsi que sur rhizomes de carottes. Elle est utilisée afin de différencier les niveaux de pathogénicité des souches et le degré de sensibilité des tubercules et de carottes selon la méthode décrite par (**Ibrahim et al., 1978**).

2) Mode opératoire

L'effet des souches *Pectobacterium* et *Dickeya* a été testé sur les échantillons végétaux (tubercules et demi-tubercules de deux variétés (Spunta et Désirée), ainsi que sur rhizomes et tranches de carottes). La technique d'inoculation sur pommes de terre et carottes est recommandée pour sa précision et fiabilité (**Ibrahim et al., 1978**).

Les échantillons sont lavés à l'eau, puis désinfectés à la surface avec de l'éthanol 10% pendant 5 minutes. Ils sont ensuite rincés à l'eau et séchés sous hotte à flux laminaire. Une préculture est réalisée sur bouillon LP ou bien sur bouillon nutritif durant 24h à 27°C, puis transférée sur tubes d'eau physiologique. L'inoculum standard est déterminé par spectrophotométrie en mesurant la densité optique (DO= 0.2) pour une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond à une population bactérienne de 10^7 cellules/ml (**Byers et al., 2002**).

2) 1-Sur pommes de terre

2)1-1- demi-tubercules

Chaque tubercule est coupé longitudinalement en deux parties plus au moins identiques, puis disposé dans des bacs en plastique. Des puits uniformes (5mm longueur/5mm de diamètre) sont réalisés. Par la suite, 100 µl de suspension bactérienne sont inoculés. Des répétitions au nombre de 04 sont réalisées pour chaque souche et cultivar. L'incubation se fait à température ambiante et à l'obscurité pour une durée de 3 à 5 jours.

La lecture est réalisée en mesurant quatre différents paramètres :

- Prélèvement et pesée des tissus pourris (gr) ;
- Mesure du volume d'eau nécessaire pour remplir chaque puits à l'aide d'une pipette graduée, il correspond à la quantité de tissus macérés (ml) ;
- Calcul de la longueur de la zone macérée par une règle (mm) ;
- Estimation de la profondeur de la dépression créée par la pourriture (mm).

2)1-2-Sur tubercules

Pour le test de pathogénicité sur tubercules, deux embouts (connes jaunes de micropipette) contenant la suspension sont implantés sur la peau de chaque tubercule à environs 10 mm de profondeur. 02 échantillons de chaque cultivar sont utilisés.

2) 2- Sur Carottes

Les légumes sont coupés transversalement en plusieurs rondelles de dimensions uniformes, puis sont inoculées, et mises dans des boîtes de Pétri stériles, avant d'être incubées à température ambiante. 5 répétitions sont réalisées. En outre, des carottes entières sont aussi inoculées avec 2 répétitions.

Les tissus macérés, ainsi que les couches intermédiaires (entre tissus malades et sains) sont prélevés dans le but de doser les activités enzymatiques des pectates-lyases et de la Phényl-Alanine Ammonialyase.

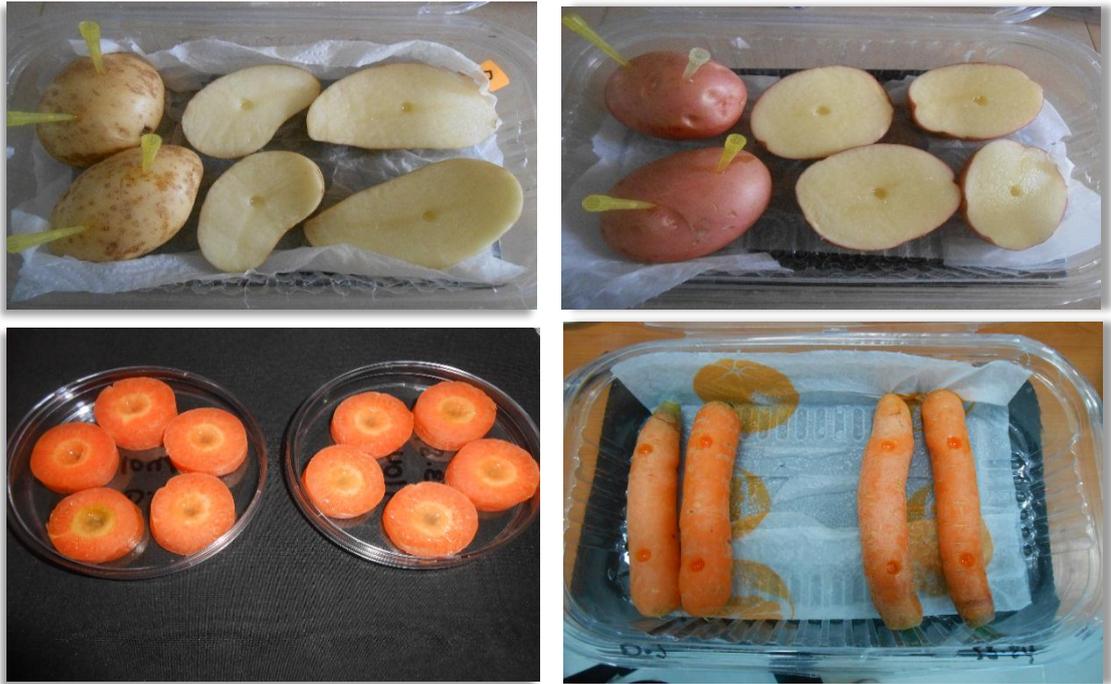


Figure N° 07 : Echantillons de pommes de terre et de carottes inoculés.

3) Test d'Antibiogramme

1-Principe

Le principe d'antibiogramme consiste à placer la culture bactérienne en présence de plusieurs antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

2-Matériel utilisé

- ✚ Milieu standardisé : Mueller-Hinton.
- ✚ Disques d'antibiotiques : Gentamycine (Gen ; 10 mcg), Ceftazidime (Caz ; 30 mcg), Amoxyclav (AMC ; 30 mcg), Amoxicilline (AMX ; 25 mcg), Cefotaxime (CTX, 30 mcg), Oxacilline (OX ; 1 mcg), Tetracycline (TE, 30 mcg), Imipeneme (IMP ; 10 mcg), Amikacine (AK, 30 mcg), Cefoxitine (CX ; 30 mcg).
- ✚ Suspension bactérienne (DO de 0.1 à 600 nm).
- ✚ Ecouvillons stériles.

3-Mode opératoire

Une pré-culture est préparée à partir d'une gélose King B, puis transférée sur des tubes d'eau physiologique afin d'obtenir une suspension bactérienne ajustée à une DO de 0,1 à 600 nm (Andrews, 2008).

A l'aide d'un écouvillon stérile, le milieu Mueller-Hinton estensemencé en surface. Cinq disques d'ATB sont appliqués pour chaque boîte. Les boîtes sont par la suite incubées à 27°C/24h. L'efficacité d'un antibiotique vis-à-vis d'une colonie bactérienne est directement visible en évaluant le diamètre de la zone d'inhibition.

4) Dosage des enzymes Pectates-lyases

1-Principe

Les pectates-lyases sont une classe de pectinases qui clivent les liaisons α (1-4) du polygalacturonate, en libérant des oligogalacturonides insaturés. Ces enzymes présentent un maximum d'absorption au spectre UV à 230nm. Le dosage des pectates-lyases repose sur la détermination par spectrophotométrie des oligogalacturonides libérés au cours du temps selon le protocole de Morran et al., 1968 avec modifications (cité par Kepseu et al., 2010).

2-Matériel et milieu réactionnel utilisé

- + Tris-HCL 0.1M / Ph = 8.5
- + CaCl₂ 0.1Mm
- + PGA (0.5 g/l)
- + Spectrophotomètre UV-visible

Soit pour 100ml :

- + 10ml Tris-HCL 1M à pH= 8.5
- + 50 μ L CaCl₂ 0.2M
- + 2ml PGA à 2.5% (peser 2.5g de PGA dans 100ml de tris-HCL 0.1 M/ pH= 8.5).
- + Ajouter environ 0.8ml de soude à 1N puis ajuster à pH=7 toujours avec NaOH.
- + Diluer le CaCl₂ dans l'eau et le tris : ajouter le PGA à la fin.

3-Protocole

Des cultures fraîches sont préparées sur du milieu King B, puis transférées sur bouillon LP et incubé à 27°C/24h. Les tubes de la seconde pré-culture sont inoculés par 0.5g de tissus

macérés dans 5 ml de LP. Après incubation, 0.1ml sont inoculés dans 0,9 ml de bouillon LP, puis la DO est mesurée à 600 nm.

Pour le dosage enzymatique, 1ml de la seconde culture est centrifugé à deux reprises à 12000 rpm/3mn. Le surnagent riche en enzymes extracellulaires est récupéré, 50µl de ce dernier est additionné à 950µl de tampon PL. La lecture est réalisée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 230nm.

Le schéma suivant résume les étapes de dosage des Pels.

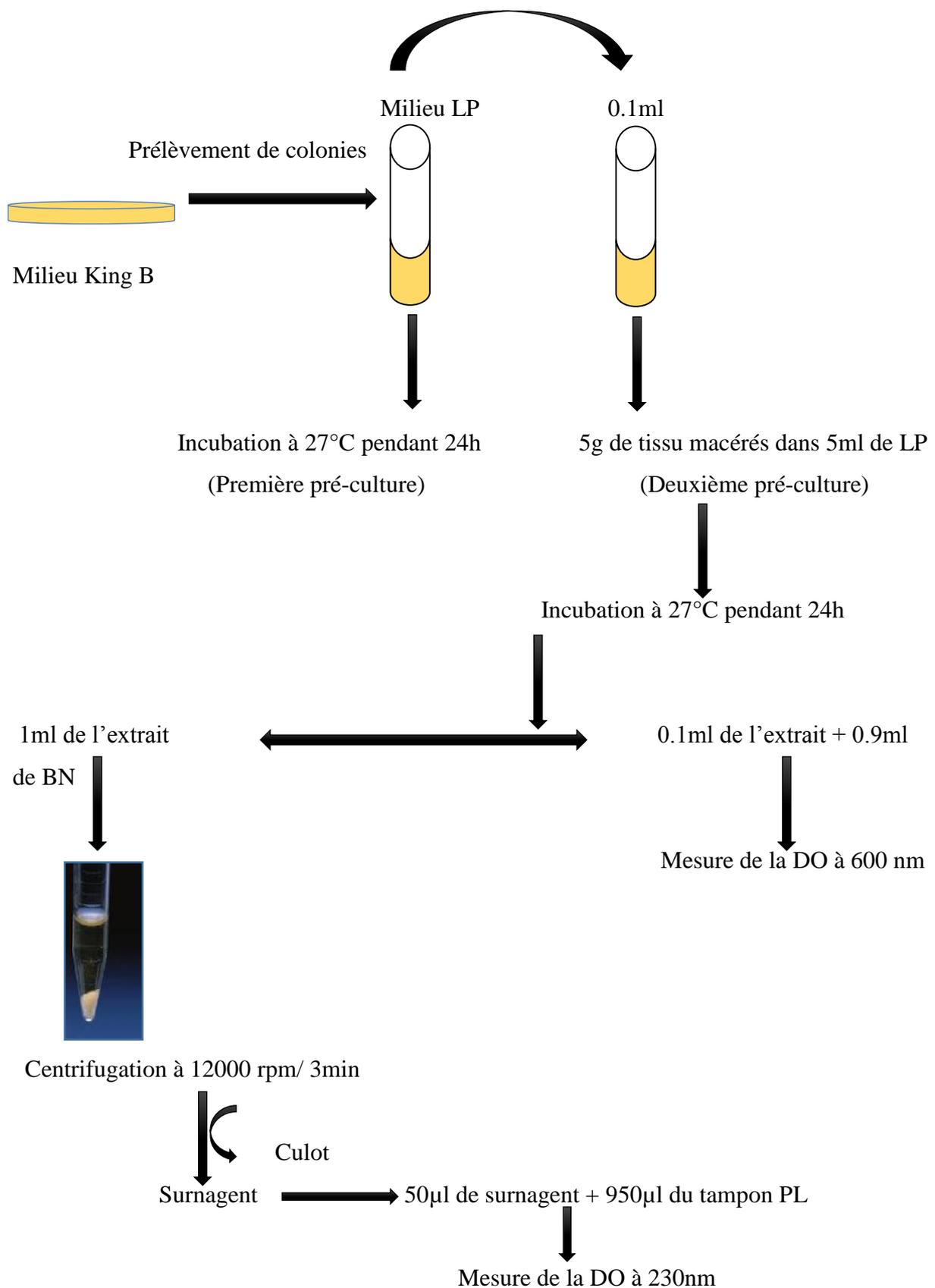


Figure N° 08 : Protocole de dosage de l'activité pectate-lyase (Kepseu *et al.*, 2010).

5) Extraction/dosage de la PAL

1-Principe

L'enzyme PAL convertit avec désamination la L-Phe en acide- transcinnamique, ce dernier est le précurseur de la synthèse de la plupart des composés phénoliques, qui présentent un maximum d'absorption à 290nm. Le dosage de la PAL repose sur la détermination spectrophotométrique des transcinnamates libérés au cours du temps.

2-Matériel et milieu réactionnel

- ✚ Spectrophotomètre UV-visible
- ✚ Tampon borate de sodium 0.1M/ pH= 8.8 (contenant 10mM de 2-mercaptoéthanol 5%, de polyvinyplopyrrolidone et 1mM d'EDTA).
- ✚ L-Phénylalanine (1ml).
- ✚ Acide trichloracétique (TCA), pH= 8.8.
- ✚ Papier Wathman N°1.

3-Protocole d'extraction et dosage de la PAL

La quantification de l'enzyme PAL est réalisée selon le protocole modifié de **Ngadze et al., (2012)** :

- ✓ Prélèvement de 1.5g de tissus pourris, suivi d'une macération pendant 5 min dans 10 ml de Tampon borate de Sodium 0.1M.
- ✓ Clarification par filtration sur papier Wathman N°1.
- ✓ Deux Centrifugations du filtrat obtenu à 14000 pendant 30 min.
- ✓ 1ml du surnagent récupéré est additionné à 1.5ml de tampon borate (0.1M, pH= 8.8) et 1ml de L-Phe.
- ✓ Incubation du mélange réactionnel à 37°C pendant 1h.
- ✓ Après incubation, la réaction est stoppée par ajout d'1ml d'acide trichloracétique (TCA), 6M.
- ✓ L'absorbance est mesurée à 290 nm.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III-1. Tests d'infection sur pommes de terre et carottes

Des essais d'inoculation sont effectués sur deux variétés de pommes de terre, ainsi que sur carottes, ceci afin d'induire les symptômes de macération et d'estimer le potentiel infectieux des souches de références de notre collection. La lecture est réalisée par la mesure de cinq paramètres-clefs, à savoir les poids des tissus pourris, volumes d'eau et longueur et profondeur des zones macérées.

A la lumière des données obtenues, on constate tout d'abord que la totalité des tissus inoculés (que ce soit les tubercules de pommes de terre ou les carottes) ont présentés des symptômes de macération et de pourriture après la période d'incubation, et cela dès le 2^{ème} jour après infection (Fig 09).

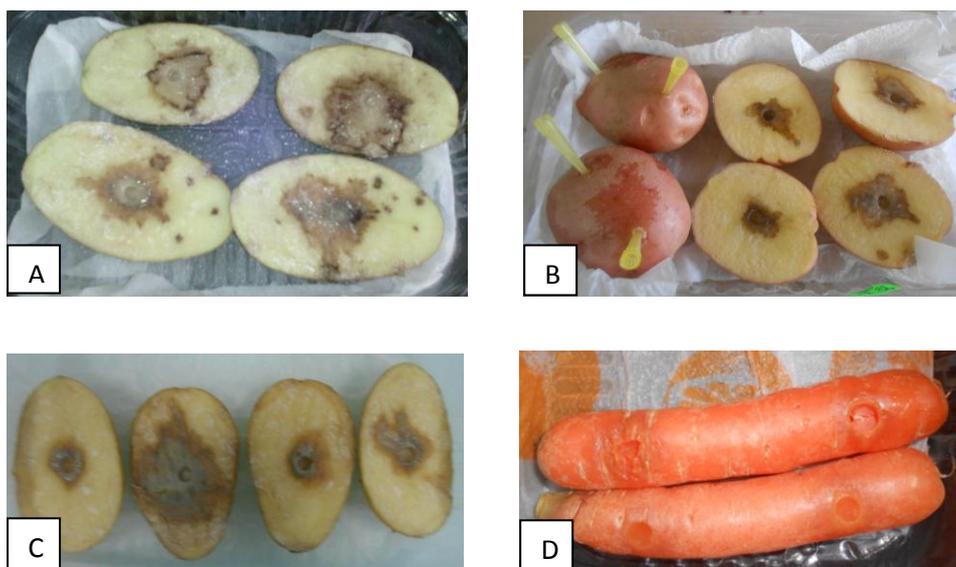


Figure N° 09 : Symptômes de pourriture molle sur pomme de terre et carottes

A) Spunta/ 5384 ; B) Désirée/ 3937 ; C) Spunta/ 3937 ; D) Carotte/ 3937

A noter que le type de symptômes observés, leur intensité, ainsi que leurs différentes mesures sont fonction de la nature des souches utilisées, des cultivars inoculés, ainsi que des conditions d'incubation. A signaler aussi que les symptômes observés sur tubercules et demi-tubercules sont typiques des souches utilisées et sont en accord avec les données

bibliographiques. Ainsi, les tissus végétaux inoculés par les souches de *Pectobacterium* et *Dickeya* sont distinguables par l'apparence de la pourriture occasionnée sur demi-tubercules. Les symptômes induits par *Pca* 5384 sont caractérisés par une pourriture foncée et humide avec un halo noir marquant une frontière entre tissus sains et infectés, par contre ceux dus à *Dickeya dadantii* sont plutôt secs, de couleur marron clair, avec une étendue de la surface nécrosée plus réduite (Fig 10, 11 et 12).



Figure N° 10 : Tissus macérés sur cultivar Désirée (à gauche) et Spunta (à droite)



Figure N° 11: Symptômes de pourriture molle sur demi-tubercules du cultivar Désirée

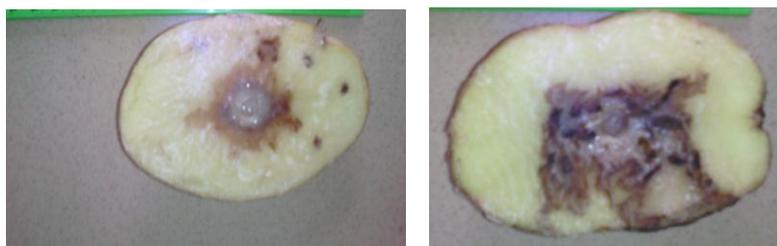


Figure N° 12: Symptômes de pourriture molle sur demi-tubercules du cultivar Spunta

III-1-1) Evaluation des facteurs de pathogénicité

1. Sur demi-tubercules

1. 1 Poids des tissus macérés

La mesure de la masse des tissus infectés, nous renseigne sur la différence de sensibilité des variétés utilisées.

Ainsi, la souche 5384 (*Pectobacterium atrosepticum*) est celle qui a induit le plus de macération (avec des poids supérieurs à 4g sur cultivar Désirée), alors que la souche Dickeya a présenté les plus faibles poids, notamment sur Désirée (0,6g).

Par ailleurs, on constate que c'est la variété Désirée qui présente les valeurs les plus faibles pour la souche *Dickeya*, alors que Spunta semble avoir une moindre sensibilité pour 5384, du moins pour le paramètre poids des tissus macérés (Fig 13). La différence peut aller jusqu'à 8 fois pour les valeurs de poids, ce qui indique la grande variabilité pathogénique de nos souches.

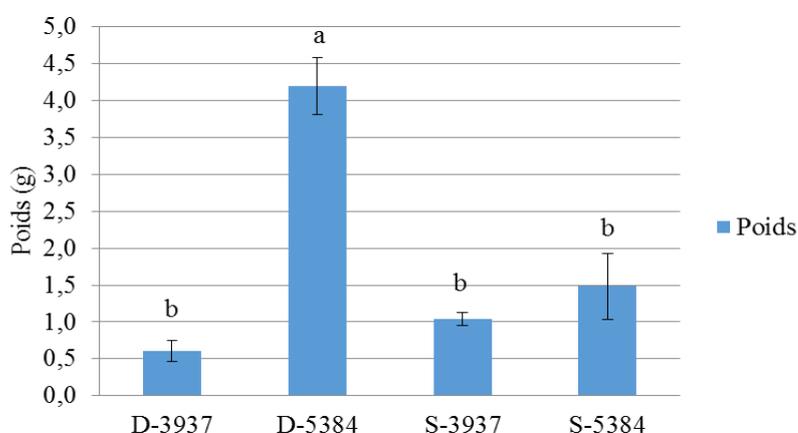


Figure N° 13 : Poids des tissus macérés sur demi-tubercules

Pour la masse des tissus macérés, on remarque que la différence peut aller jusqu'à 2 fois entre les souches les plus pathogènes de *Dickeya* sp et les souches les moins virulentes de *Pectobacterium*, notamment l'espèce *Pca*.

1. 2 Volumes d'eau des tissus macérés

Les calculs du volume d'eau nécessaire pour combler les espaces macérés sont illustrés dans la (Fig 14), les demi-tubercules inoculés par la souche 5384 ont présenté les

volumes les plus élevés, et ceci pour les deux cultivars. De même, la souche 3937 montre des volumes plus faibles. Concernant les variétés, c'est le cultivar Désirée à peau rouge qui est plus sensible par rapport à la variété blanche Spunta pour la souche 5384. Les différences de volumes entre les essais peuvent atteindre un maximum de 3,5 fois sur la variété Désirée. Il est à signaler que généralement les paramètres poids et volume d'eau sont proportionnellement corrélés.

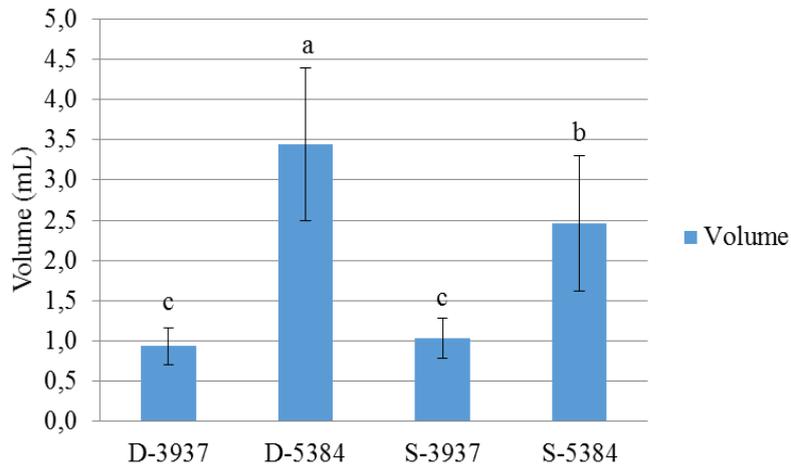


Figure N° 14 : Volumes d'eau des tissus macérés sur demi-tubercules

1. 3 Longueurs et profondeurs des tissus macérés

Les mesures des longueurs/profondeurs des zones nécrosées, (Fig 15et 16), ont montré une prédominance de la souche 5384 avec les valeurs les plus élevées, à l'exception du paramètre profondeur sur Désirée. Notons, que de ce dernier présente des taux presque similaires pour les deux cultivars.

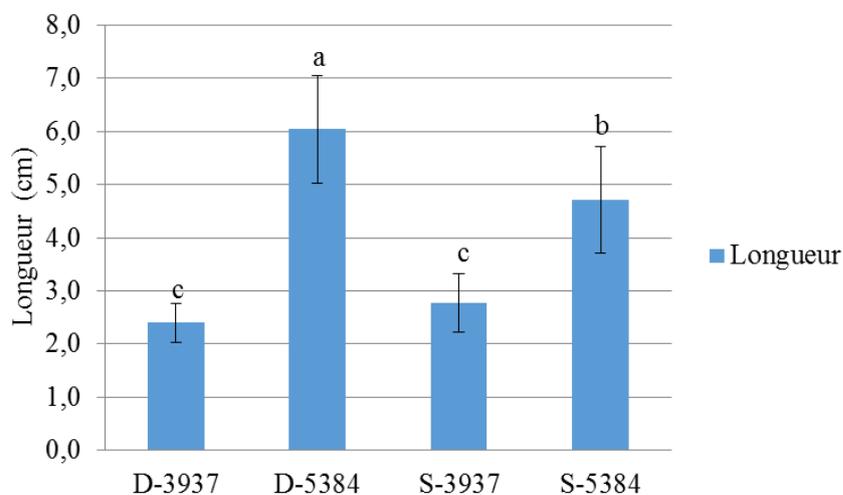


Figure N° 15 : Longueurs des tissus macérés sur demi-tubercules

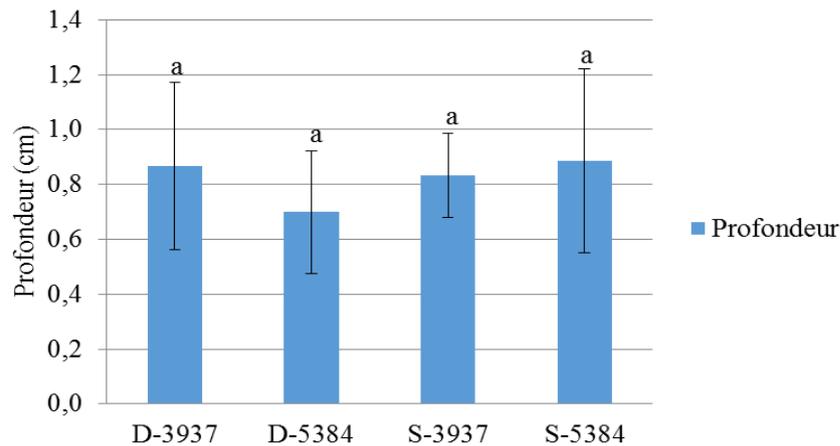


Figure N° 16 : Profondeurs des tissus macérés sur demi-tubercules

Les résultats du test LSD, (voir annexe), avec le paramètre cultivar comme effet principal ont montré que seul la variable poids des tissus pourris présente des différences significatives avec deux groupes homogènes, prouvant ainsi la pertinence et l'impact de ce facteur. Les autres paramètres (volume, longueur et profondeur) n'ont montré aucun effet.

En outre, en considérant le caractère souche comme effet principale, on a constaté que les variables poids, volume et longueurs des nécroses ont montré une différence significative. Par contre, la variable profondeur ne semble avoir aucun effet.

La forte prédominance du caractère virulent de l'espèce 5384 par rapport à 3937 est expliquée par son optimum de température. En effet, d'après (**Pérombelon, 1992**) et **Smadja et al., (2004)**, 5384, à des températures de 15 à 22°C jusqu'à 25°C, produit des quantités élevées de pectinases, notamment la transéliminase endopolygalacturonique, induisant ainsi plus de symptômes de pourriture molle.

Tandis qu'à des températures supérieures, cette production diminue pour devenir presque indétectable à 30°C, et ce sont les espèces du genre *Dickeya* qui vont prédominer. Vu que la température d'incubation des demi-tubercules n'a pas dépassé le seuil de 25°C, il est tout à fait naturel que les souches d'*atrosepticum* soient les plus actives.

En outre, selon **Lapwood et al., (1984)**, la mesure des facteurs de macération (longueur, profondeur et de volumes d'eau) est un bon indicateur pour l'évaluation du degré de pénétration des tissus par les souches de *Pectobacterium* et *Dickeya*.

1. 4 Calcul des surfaces des zones infectées

La superficie des zones d'infection des demi-tubercules inoculés sont mesurées par l'intermédiaire d'un logiciel de calcul et de traitement des images (ImageJ), qui mesure le pourtour de la zone infectée en mm² (Fig 17).

Pour la souche *dadantii*, les surfaces estimées varient entre 4,025 et 20,274 mm² pour la variété Spunta, tandis qu'elles sont situées de 2,557 jusqu'à 7,064 mm² pour la variété Désirée. Alors que pour les demi-tubercules inoculés par la souche 5384, les surfaces mesurées varient entre un intervalle de 06,643 à 13,867 mm² sur cultivar rouge Désirée, et de 11,893 à 30,176 mm² sur Spunta.

On constate que pour la souche 5384, il y'a une non correspondance entre les mesures des longueurs de pourriture et les surfaces des zones nécrosées, ceci est probablement dû à l'inégalité de la répartition des suspensions bactériennes.



Figure N° 17 : Aire des zones infectées sur variétés Désirée (gauche) et Spunta (droite)

2. Sur tubercules

L'inoculation des tubercules de pommes de terre via les cônes de micropipettes, a permis après incubation d'observer des zones d'infection sous forme d'un trait ou ligne dû à la diffusion de l'inoculum bactérien à travers l'embout, et encore une fois, les symptômes sont typiques selon les souches inoculées (Fig 18).

Les résultats obtenus ont montré, contrairement aux essais sur demi-tubercules, une légère prédominance de la souche 3937 par rapport à 5384, en ce qui concerne la longueur des tissus infectés. Néanmoins, les différentes observations présentent des valeurs rapprochées.

Tandis que pour la largeur des zones macérées, c'est la souche 5384 qui prédomine sur cultivar Désirée, tandis que la sensibilité Spunta est presque similaire pour les deux souches (Fig 19 et 20).



Figure N° 18 : Symptômes de pourriture molle sur tubercules de pommes de terre

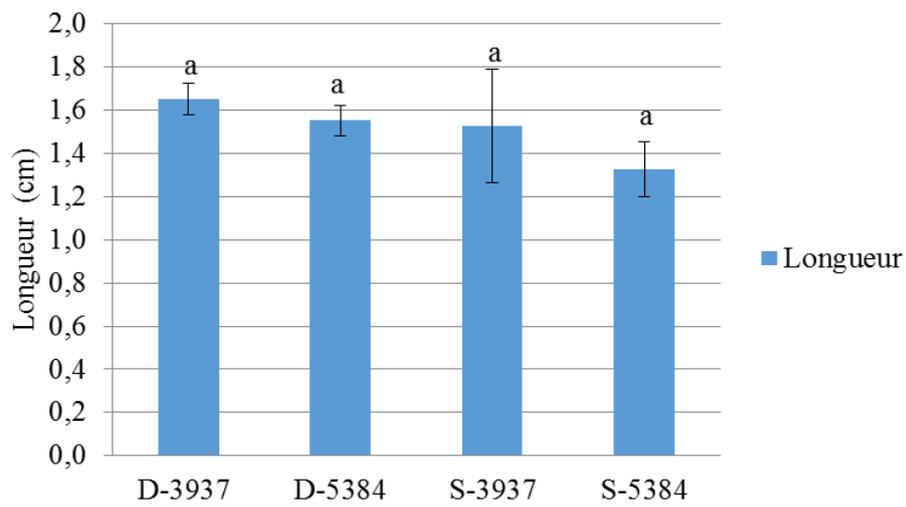


Figure N° 19 : Longueurs des tissus macérés sur tubercules

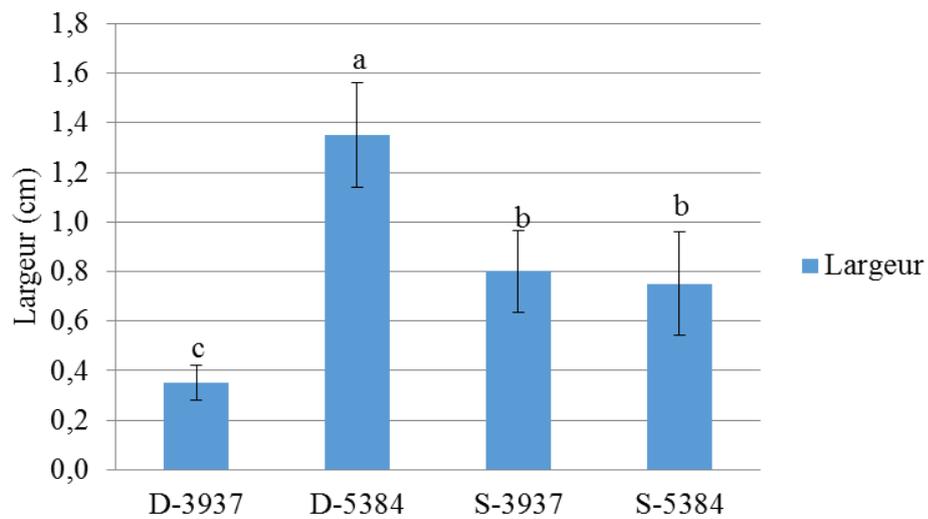


Figure N° 20 : Largeurs des tissus macérés sur tubercules

3. Sur carottes :

Les essais d'inoculation réalisés sur carottes ont confirmé l'effet virulent des souches à la fois sur carottes entières, ainsi que sur tranches (Fig 21).

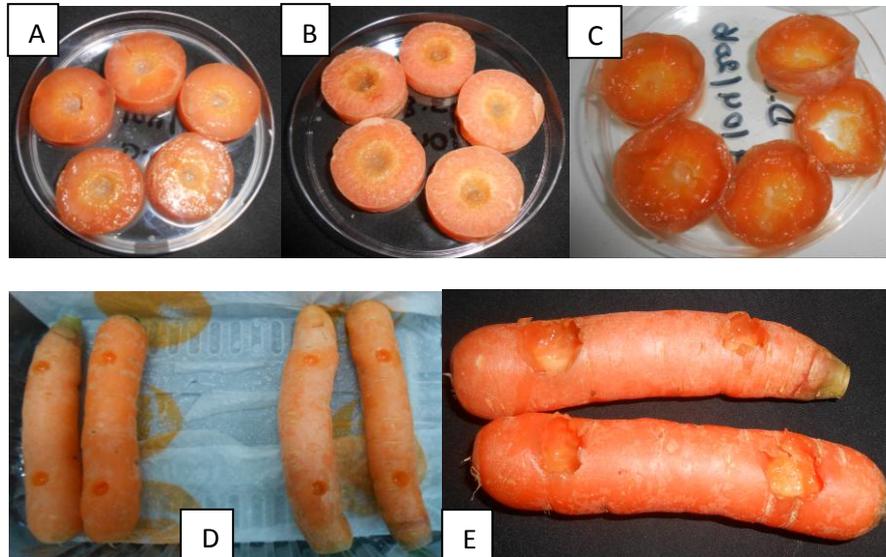


Figure N° 21 : Symptômes de macération sur tranches et rhizomes de carottes

A) Macération sur 3937 ; B) 5384 ; C) 3937 ; D) 5384 ; E) 3937

Les calculs des poids et longueurs de pourriture sur rondelles de carottes ont montré des valeurs supérieures chez les tissus inoculés par la souche 3937 par rapport à 5384. En outre, les rondelles de carottes ont été complètement macérées au point où on n'a pas pu estimer la masse des zones nécrosées par rapport aux tissus sains (Fig 22 et 23).

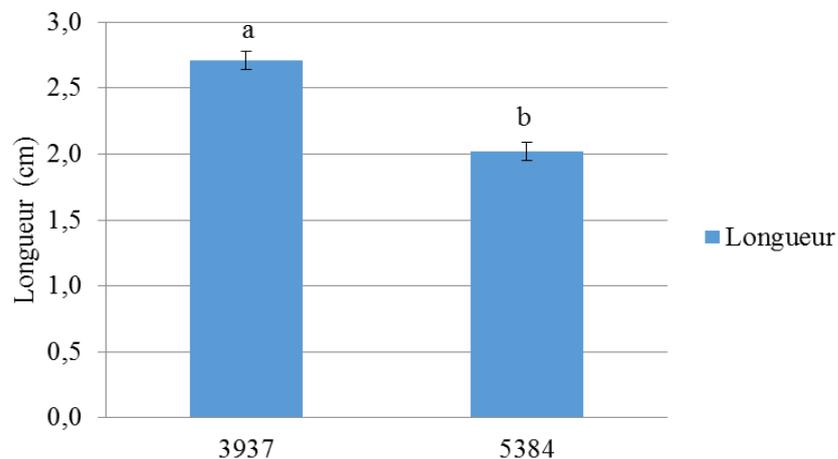


Figure N° 22 : Longueurs des tissus macérés sur tranches de carottes

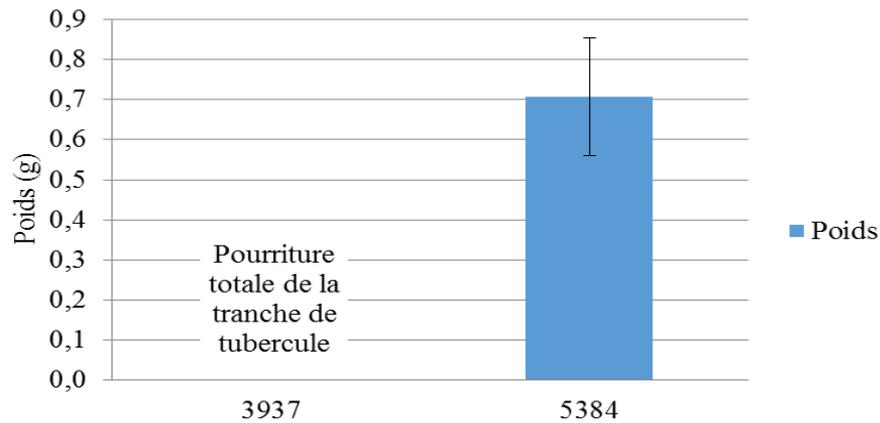


Figure N° 23 : Poids des tissus macérés sur tranches de carottes

Sur rhizomes de carottes, c’est la souche 3937 qui présente aussi les valeurs les plus élevées que ce soit en termes de poids ou de longueurs des zones macérées (Fig 24 et 25). La prédominance du genre *Dickeya* par rapport à *Pectobacterium* est due au fait que durant la période d’incubation, la température ambiante a dépassé les 30°C, ce qui favorise bien sur le développement et la croissance des souches 3937.

Corbaz (1990) a montré que les recombinants des clones de *Dickeya* capables de produire la polygalacturonique-acide transéliminase provoqueraient une macération importante des racines de carotte, tandis que des clones mutants dépourvus de l’enzyme n’engendraient aucun symptôme.

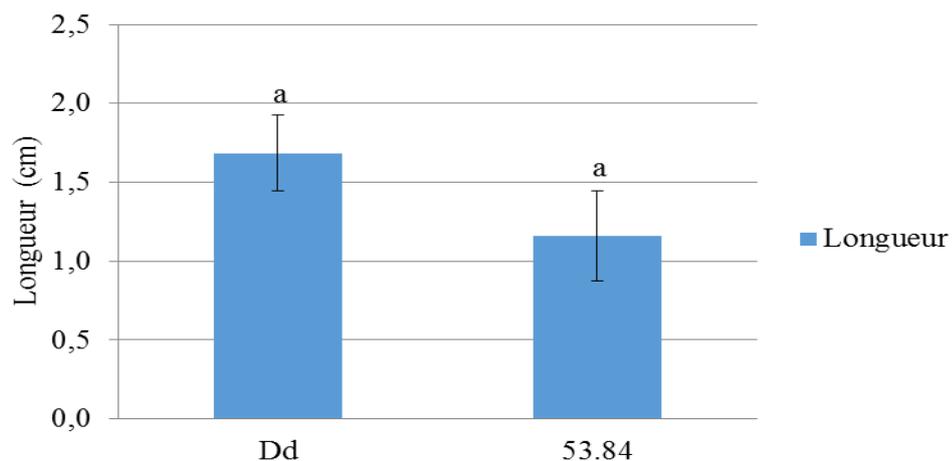


Figure N° 24 : Longueurs des tissus macérés sur carottes

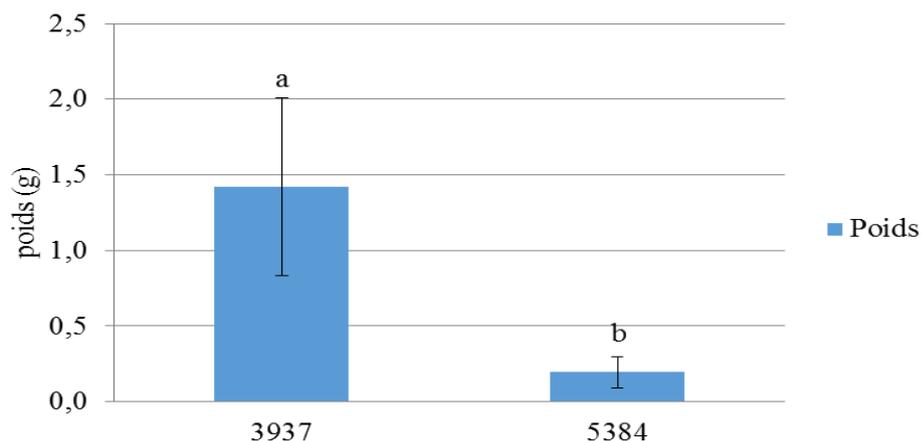


Figure N° 25 : Poids des tissus macérés sur tranches de carottes

Les essais d'inoculation sur tissus végétaux ont permis de mettre en évidence une différence de sensibilité au sein des variétés de pommes de terre. Ainsi, il s'avère que c'est le cultivar à peau rouge (Désirée) qui présente une plus grande vulnérabilité à la macération par rapport à Spunta.

Ce constat est confirmé par les travaux de **Rabot et al., (1994)** réalisés sur 8 cultivars qui ont décrit la variété Désirée comme modérément sensible à la pourriture molle causée par les souches de *P. atrosepticum*. Ces résultats ont aussi montré que cette variété présente aussi une faible sensibilité à la maladie de la jambe noire.

Allefs et al., (1996) ont montré que chez 12 variétés de pomme de terre, la variété Désirée est sensible. Par ailleurs, **Acuña et al., (2004)** en évaluant la réaction de 14 cultivars vis-à-vis de quatre maladies ont conclu que Désirée est sensible à la pourriture sèche.

III-1-2) Test d'Antibiogramme

Les résultats du test d'antibiogramme nous ont permis de tester la sensibilité des souches de notre collection vis-à-vis de 10 antibiotiques actifs vis-à-vis des bactéries Gram négatif. Les données obtenues ont révélé que les deux souches testées (*Dickeya dadantii* 3937 et *Pectobacterium atrosepticum* 5384) sont sensibles à la plupart des antibiotiques utilisés. Ainsi, à l'exception de l'oxacycline, tous les antibiotiques testés ont produits des zones d'inhibition plus au moins importantes. L'inefficacité de l'oxacycline serait probablement due à sa faible concentration (1 µg/disque) (Fig 26).

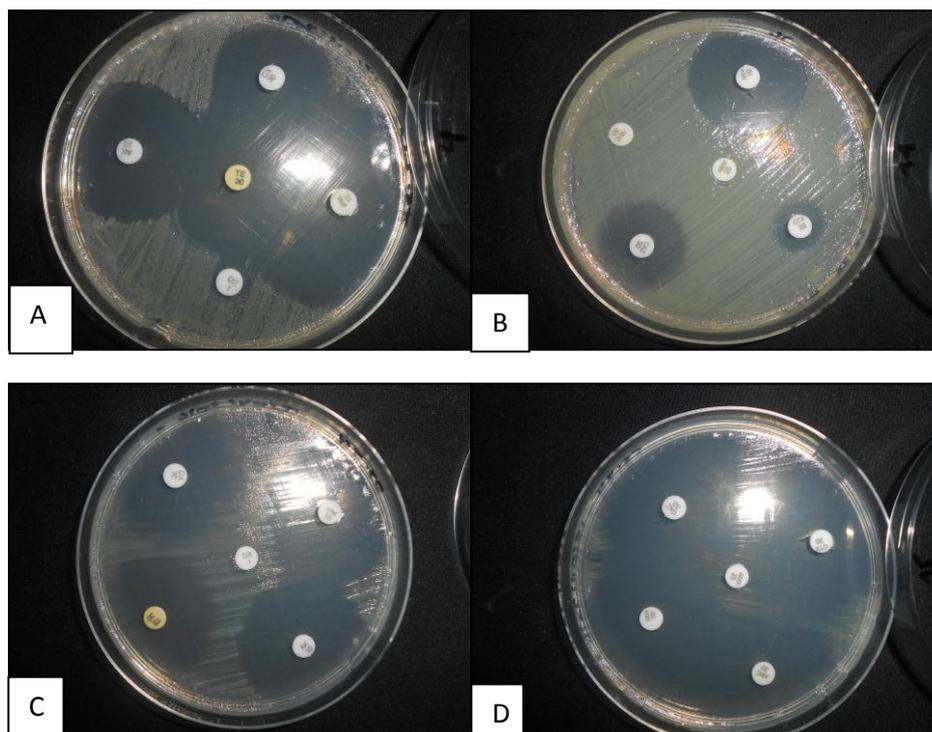


Figure N° 26 : Zones d’inhibitions obtenues sur boîtes de Pétri
 A : AK, CX, TE, IMP, OX / B : AMC, GEN, AMX, CTX, CAZ. Pour 5384
 C : CX, TE, OX, IMP, AK/ D : CAZ, CTX, AMX, AMC, GEN. Pour 3937

Les antibiotiques les plus performants sur les trois souches étant l’Imipeneme, l’Amoxyclav et la Gentamycine. Tandis que la Tetracycline, l’Amoxycilline et la Cefoxitine ont produits les zones d’inhibitions les plus réduites. Les zones les plus importantes ont atteint les 4 cm de diamètre.

- La souche 3937 est résistante à l’OX, sensible moyennement à l’AMX et AMC. Elle est sensible aux IMP, CTX, AK, GENT, CX, TE et CAZ (Fig 27).
- La souche 5384 est résistante à l’OX et l’AMX, Sensible à l’IMP, CAZ, CTX, AK, GENT et CX. Elle présente une sensibilité intermédiaire au TE et l’AMC (Fig 27).

Ainsi, au regard des résultats du test d’antibiogramme, on peut affirmer que les trois souches présentent des niveaux de sensibilité similaires, avec le même profil vis-à-vis des antibiotiques testés.

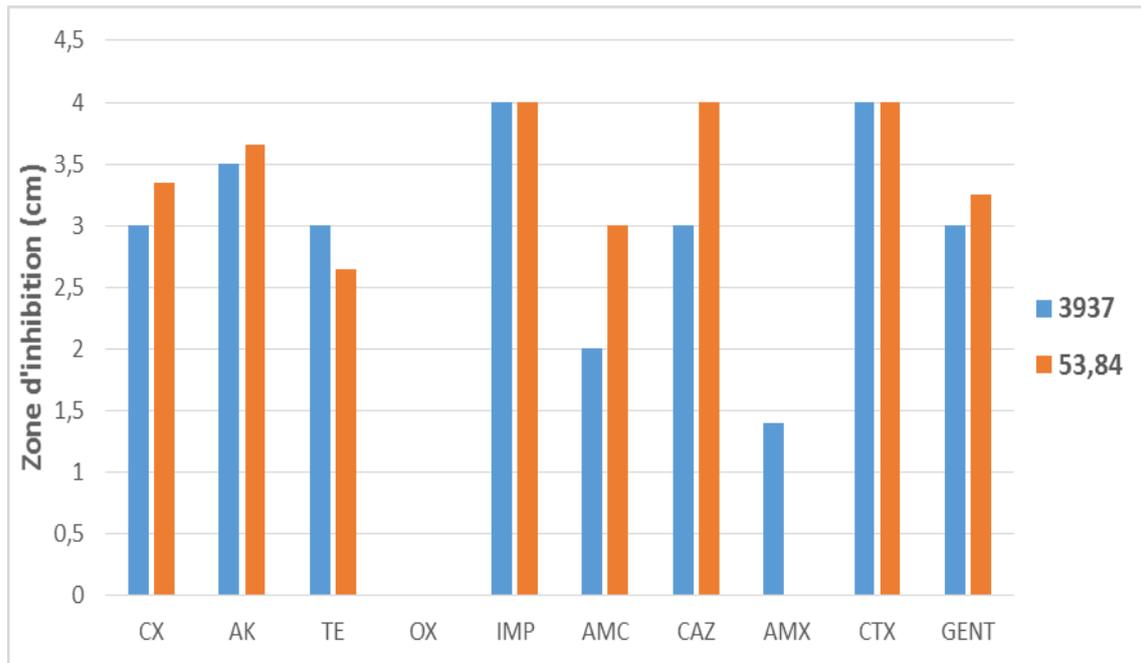


Figure N° 27 : Résultats du test d'antibiogramme sur les souches (5384 et 3937)

III-1-3) Dosage des enzymes Pectate lyases

La quantification de l'activité pectinolytique nous a permis d'estimer la sensibilité des tissus végétaux, ainsi que leurs réactions vis-à-vis des souches bactériennes inoculées de *Pectobacterium* et *Dickeya* sp. Les Pels jouent un rôle primordial dans la pathogénicité.

La méthode de dosage est basée sur la quantification des oligouronides insaturés produits lors de la réaction de β -élimination, catalysée par la pectate lyase. La concentration des produits de dégradation est proportionnelle à la quantité de pectate lyase active libérée.

Les résultats obtenus dans les figures montrent que le calcul des activités spécifiques sur pommes de terre et carottes inoculées ont montré des taux élevés sur carottes infectées par les souches 5384 avec des valeurs dépassant 12 UI. Tandis que les deux variétés de pommes de terre présentent des taux de pels assez rapprochés, il faut noter cependant que les variétés blanches Spunta ont présenté légèrement moins d'activité pectate-lyase comparé à Désirée qui est plus sensible (Fig 28).

A signaler aussi que l'activité Pel s'est exprimée de la même manière autant sur les tissus infectés que sur les parties intermédiaires entre tissus sains et infectés. De ce fait, ce paramètre (type de tissus) ne semble pas avoir d'impact déterminant.

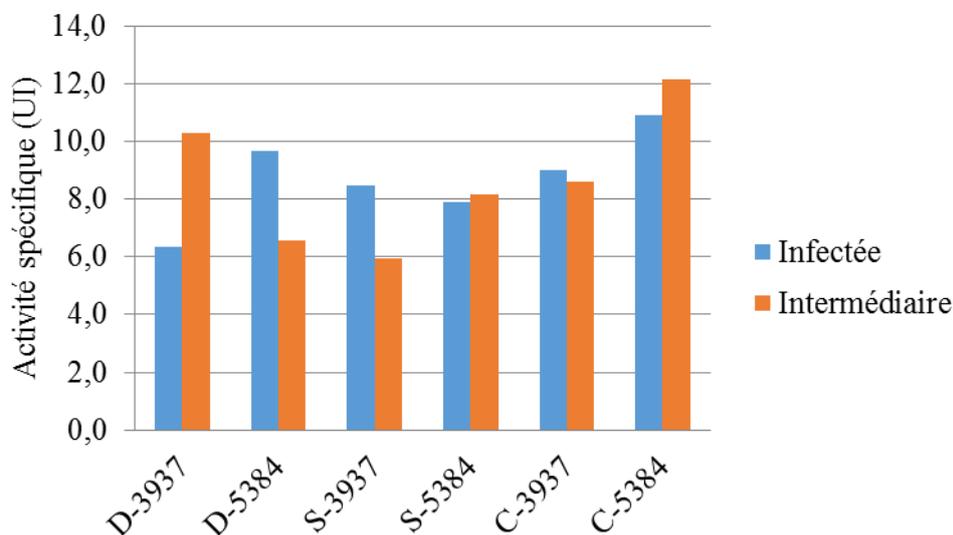


Figure N° 28 : Résultats du dosage de l'enzyme Pectate lyase

Ces résultats suggèrent que la pathogénicité des bactéries pectinolytiques ne dépend pas de la concentration bactérienne, mais de la quantité d'enzymes produites, ainsi que la nature de l'hôte infecté, Ces observations sont confirmées par **Ishi (1976)** et aussi par **Corbaz (1991)**, qui ont démontré que l'activité enzymatique est plus question de l'environnement et de l'interaction plant-pathogène que du pathogène lui-même. En outre, les travaux de **Lautier (2007)** ont montré que l'agressivité des genres *Pectobacterium/Dickeya* est essentiellement liée à leur capacité à produire massivement différents facteurs de virulence dont les Pels.

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par **Dorel et al., (1992)** qui ont établi une relation directe entre gravité de la maladie et activité des Pels sur deux cultivars de pomme de terre dont l'un est sensible et l'autre résistant, il a été noté que l'intensité de la maladie est plus réduite dans les tissus des tubercules résistants, ceci est dû au fait que les tissus végétaux résistants possèdent divers facteurs qui pourraient inhiber l'activité PeL en inactivant les enzymes produites par les *Pectobacterium* tels que la polyphénol oxydase et peroxydase L'autre possibilité est que la pectine de plantes résistantes est fortement méthylée et en tant que tel, ne pourrait pas être dégradée par les pectate lyases.

De même que pour le dosage de l'activité spécifique des PeLs sur carotte, on a constaté que sur ce légume, la sécrétion de Pels est plus importante que sur pommes de terre. Nos résultats sont aussi en conformité avec ceux de **Parthiban en 2012**, qui a testé l'effet de quatre enzymes pectinolytiques dont les pectate lyases de trois souches de *Pectobacterium* sur des tissus de carottes, ils ont ainsi confirmé une intense corrélation entre activité enzymatique et symptômes de macération au cours de 5 jours d'infection.

III-1-4) Dosage de la Phénylalanine Ammonialyase (PAL)

A l'issue du dosage de la PAL à partir de tissus infectés et intermédiaires de pommes de terre (Spunta et Désirée) et de carottes. Les absorbances calculées ont révélé ont montré des quantités élevées sur les demi-tubercules de Désirée inoculés par 5384, la variété Spunta présentant de plus faible taux. Des taux élevés ont aussi été observés sur tissus de carottes. D'une manière générale, ce sont les tissus infectés qui présentent les valeurs de Pal les plus élevées par rapport aux tissus intermédiaires, ceci est logique, vu que ce sont ces parties qui sont les premiers au contact de l'inducteur, aussi plus les cellules et les tissus végétaux sont durement touchés, et plus il réagissent en produisant des quantités importantes de métabolites secondaires. La souche 5384 induit les taux les plus élevés à la fois sur Spunta, Désirée et aussi sur carottes (Fig 29).

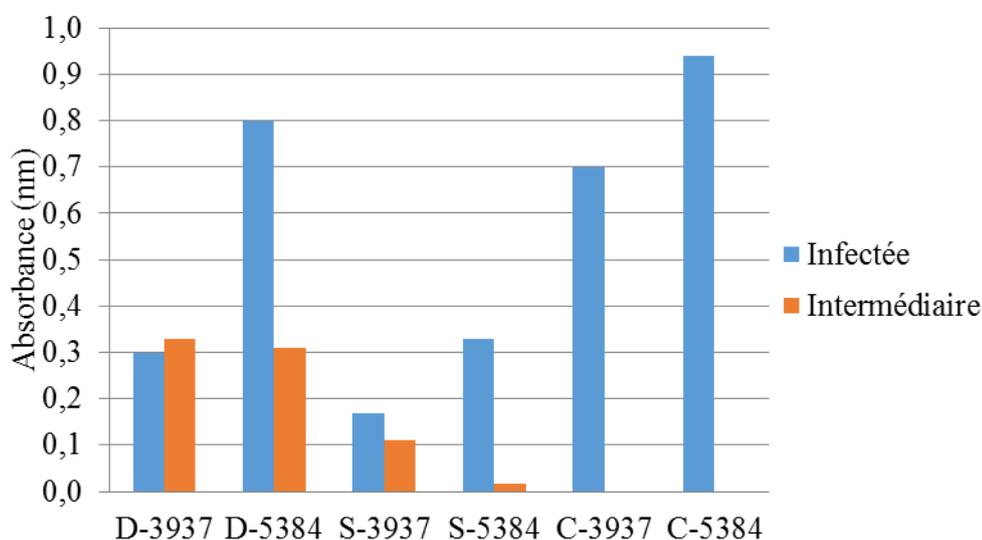


Figure N° 29 : Résultats du dosage de l'enzyme Phénylalanine-ammonialyase

Plusieurs travaux antérieurs ont confirmé les résultats obtenus dans ce travail. Ainsi **Zimnoch-Guzawska et al., (1999)** en testant la résistance de 44 hybrides diploïdes de pomme de terre vis-à-vis des maladies de pourriture molle et jambe noire sont arrivés à la conclusion

que les souches 5384 sont les plus virulentes et produisent des taux de macération généralement plus importants que les souches de 3937.

Comme précédemment cité, la prédominance des espèces du genre *Pectobacterium* par rapport à *Dickeya sp* est expliquée par les températures de croissance optimales. Le test de pathogénicité étant réalisé au mois de Mars 2016.

Ces résultats mettent en évidence la relation proportionnelle existante entre l'activité enzymatique et l'intensité des symptômes de pourriture sur les tissus infectés de pomme de terre et de carotte. En comparant le degré de pathogénicité des souches entre la pomme de terre et carotte on constate que la pomme de terre qui est l'hôte spécifique de ces souches est plus sensible par rapport à la carotte qui présente une certaine résistance, et une moindre sensibilité.

D'une manière générale, et en vue des résultats obtenus, à la fois sur tubercules, demi-tubercules et carottes, ainsi que via les dosages enzymatiques, on constate que c'est l'espèce *P. atrosepticum* qui présente les taux d'infection les plus élevés, ceci à la fois pour tous les paramètres de mesures, (poids, volume, longueur et profondeur des pourritures), avec une capacité de macération plus importante sur pomme de terre. Cependant, *D. dadantii* demeure toujours aussi virulente.

Conclusion générale

Conclusion

L'objectif principal de notre étude est de mettre en évidence des méthodes quantitatives et qualitatives permettant de déterminer et d'évaluer le potentiel de virulence de souches appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya sp* inoculées sur tissus végétaux hôtes (pommes de terre et carottes), soit par l'observation et l'analyse des symptômes induits ou bien par la quantification et le dosage de métabolites secondaires qui jouent un rôle clef durant le processus infectieux (enzymes Pels et Pal).

De ce fait, en se basant sur les données récoltées, on est en mesure d'affirmer la prédominance et le caractère virulent de l'espèce *P. atrosepticum* (souche 5384) sur l'ensemble des échantillons testés (tubercules et demi-tubercules de pommes de terre des variétés Désirée et Spunta, ainsi que sur carottes). Cette activité de macération est principalement due à un large éventail d'enzymes de dégradation. Le genre *Dickeya sp* bien que potentiellement moins virulent que *Pectobacterium sp* a néanmoins induit des niveaux de macération assez importants. Une différence de réaction variétale vis-à-vis de ces phytopathogènes est également à signaler, ainsi pour la plupart des essais réalisés, c'est le cultivar de couleur rouge Désirée qui présente la plus grande sensibilité comparé à la variété blanche Spunta.

Les calculs des paramètres physiques des symptômes de macération se sont avérés être un outil assez fiable d'évaluation, notamment l'estimation des poids et des volumes d'eau des tissus infectés.

De même, l'extraction des tissus macérés et la quantification spectrophotométrique des enzymes pectate-lyases et de la Phénylalanine-Ammonialyase (Pal) nous a renseigné sur les réactions métaboliques survenant durant l'interaction plante-pathogène, ainsi les tissus infectés par les souches *Pectobacterium* ont enregistré les taux les plus élevés en Pels et en Pal, alors que l'espèce *Dickeya dadantii* fait office d'inducteur moyen. De même, c'est la variété Désirée qui a réagi le plus avec les populations bactériennes.

Ces résultats mettent en évidence la proportionnalité existant entre activités métaboliques et intensité des symptômes de pourriture molle sur tissus de pomme de terre et carotte. Ainsi, on a établi qu'il existe une étroite corrélation entre degré de macération et activité enzymatique.

Ceci ouvre également de nouvelles voies vers une meilleure exploitation des réponses végétales, en vue de les utiliser comme moyens de prévention et de lutte prophylactique.

Différents travaux à venir seront nécessaires pour finaliser et confirmer nos conclusions, ceci par des approches systémiques en explorant les différentes réactions biochimiques liées à cette interaction pathogène. De même, il serait intéressant d'extrapoler notre méthodologie sur d'autres plante cibles et sur d'autres pathologies végétales.

*Références
bibliographiques*

A

- Acuña, I., Mancilla, S., Sagredo, B., Gutiérrez, M., Vargas, M., Delgado, J., 2004.** Identificación taxonómica de las especies *Fusarium* causantes de pudrición seca en tubérculos de papa en el sur de Chile, 55 Congreso Agronómico de Chile, Valdivia, Chile.
- Agrios, G., 2005.** Plant Pathology 5th Edition Academic Press. San Diego. California, Elsevier Inc., 922p.
- Allefs, J., Van Dooijeweert, W., Prummel, W., Keizer, L., Hoogendoorn, J., 1996.** Components of partial resistance to potato blackleg caused by pectolytic *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. chrysanthemi*. Plant Pathology 45, 486-496.
- Andrews, J., 2008.** BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62, 256-278.

B

- Benhamou, N., 2009.** La résistance chez les plantes: principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. 1^{ère} édition, Paris, Lavoisier, 376p.
- Benhamou, N., Klopper, J.W., Quadt-Hallman, A., Tuzun, S., 1996.** Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiology 112, 919-929.
- Bessadat, N., 2014.** Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria* sp. responsable de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires. Université d'Oran ES-SENIA, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 213p.
- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Miklos, G.V., Fanning, G.R., 1973.** Deoxyribonucleic acid Relatedness among *Erwiniae* and other Enterobacteriaceae: the soft-rot organisms (genus *Pectobacterium* Waldee). International Journal of Systematic Bacteriology 23, 205–216.
- Byers, J.T., Lucas, C., Salmond, G.P., Welch, M., 2002.** Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. Journal of bacteriology 184, 1163-1171
- Bouarab, K., 2000.** Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système *Chondrus crispus*–*Acrochaete operculata*. Université de Paris VI. France, 163p.
- Boudart, G., Dechamp-Guillaume, G., Lafitte, C., Ricart, G., Barthe, J.P., Mazau, D., Esquerré-tugayé, M.T., 1995.** Elicitors and Suppressors of Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Accumulation are Solubilized from Plant Cell Walls by Endopolygalacturonase. European journal of biochemistry 232, 449-457.

C

- Cahill, G., Fraser, K., Kowalewska, M., Kenyon, D., Saddler, G., 2010.** Recent findings from the *Dickeya* survey and monitoring programme, The Dundee Conference. Crop Protection in Northern Britain 2010, Dundee, UK, 23-24 February 2010. The Association for Crop Protection in Northern Britain, pp. 171-176.

Corbaz, R., 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques.

Charkowski, A.O. 2006. The Soft Rot *Erwinias*. In: Samuel S. Gnanamanickam (Ed.). Plant-Associated Bacteria, pp. 423-505.

Czajkowski, R., De Boer, W., Van Veen, J., Van der Wolf, J., 2012. Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya sp.* biovar 3 in vitro and in planta. Plant Pathology 61, 169-182.

D

Dietriche, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., Dangl, J.L., 1994. Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. Cell 77, 565-577.

Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell 7, 1085.

Dorel, C., Lojkowska, E., Robert Baudouy, J., 1994. Reduced activity of *Erwinia chrysanthemi* pectinase after inoculation of potato plants resistant to soft rot. Colloques de l'INRA (France).

Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B., Kauffmann, S., 1999. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. Plant Physiology 121, 163-172.

Dow, M., Newman, M.-A., von Roepenack, E., 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. Annual review of phytopathology 38, 241-261

Duarte, V., De Boer, S., Ward, L., Oliveira, A., 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. Journal of Applied Microbiology 96, 535-545

Dubery, I.A., Schabert, J.C., 1988. Kinetic and regulatory properties of phenylalanine ammonia-lyase from *Citrus sinensis*. International Journal of Biochemistry 20, 217-222.

E

Ebel, J., 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. Annual review of phytopathology 24, 235-264.

El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Callahan, A.M., 2003. Induction of chitinase, β -1, 3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. Phytopathology 93, 349-355.

Erbs, G., NEWMAN, M.A., 2012. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. Molecular plant pathology 13, 95-104.

F

- Fils-Lyacaon., 2007.** Extraction, Dosage et calculs de l'activité PAL de banane. Rapport experimentation, UMR qualitrop physiology Guadeloupe.
- Fox, R., Manners, J., Myers, A., 1972.** Ultrastructure of tissue disintegration and host reactions in potato tubers infected by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. Potato Research 15, 130-145.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994.** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. Journal of bacteriology 176, 269.

G

- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., 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.
- Gerard, C.m., 2014.** Caractérisation d'inhibiteurs de protéases lors de l'interaction entre la vigne et *Botrytis cinerea*. Thèse de Doctorat en Biologie et pathologie végétale. Université de Reims Champagne- Andrenne, France.
- Greenberg, J.T., 1997.** Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annual review of plant biology 48, 525-545.
- Geoffroy, V., Moser, M. A., 2014.** Fiche irebs, Institut de recherche de l'école de Biotechnologie et signalisation cellulaire, UMR 7242, Equipe (transports membranaires bactériens).
- Grison, C., 1983.** La pomme de terre: caractéristiques et qualités alimentaires. Association pour la promotion industrie agriculture.

H

- Hammerschmidt, R., 1999.** Phytoalexins: what have we learned after 60 years? Annual review of phytopathology 37, 285-306.
- Hatsch, D., 2004.** Interaction hôte/pathogène: étude du modèle *Humulus lupulus/Fusarium graminearum*: Identification, génomique et transcriptomique du pathogène. Strasbourg 1.
- Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J., 1998.** Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Systematic and Applied Microbiology 21, 384-397.
- Hauben, L., Swings, J., 2005.** Genus XIII. *Erwinia*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2, 670-679.
- Hélias, V., 2008.** *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre: nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. Cahiers Agricultures 17, 349-354.
- Hélias, V., Andrivon, D., Jouan B. 2000.** Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp. *Atroseptica*. Plant Pathology. 49, 33-42.

Heredia, A., Jiménez, A., Guillén, R., 1995. Composition of plant cell walls. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 200, 24-31.

Hossain, M.M., Shibata, S., Aizawa, S.-I., Tsuyumu, S., 2005. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *Physiological and molecular plant pathology* 66, 134-143.

Howard, R.J., Garland, J.A., Seaman, W.L., 1994. Diseases and pests of vegetable crops in Canada: an illustrated compendium. Entomological Society of Canada & Canadian Phytopathological Society.

I

IAN, A. DUBERY., JOHANNES, C., SCHBORT., 1988. Kinetic and regulatory properties of phenylalanine ammonia-lyase from *Citrus Sinensis*. *INT. J. Biochem* 20(2): 217-228.

Ibrahim, M., JOUAN, R., Samson, R., Poutier, F., Saily, M., 1978. Prospects of pathogenicity test concerning *Erwinia carotovora var. carotovora* and *Erwinia carotovora var. atroseptica*, on half potato tubers, variation according to variety of bacterial species and strains, inoculum dose, temperature, variety of potatoes, physiological age of tubers and delay between injury and inoculation, Proceedings, 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Angers-França: INRA, pp. 591-602.

Ishii, S., 1976. Enzymatic maceration of plant tissues by endo-pectin lyase and endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Phytopathology*.

K

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

Khan, W., Prithiviraj, B., Smith, D.L., 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* 160, 859-863.

Khay, S., 2015. Génomique comparative des bactéries *Dickeya solani* et *Pectobacterium wasabiae*, pathogènes émergents chez *Solanum tuberosum*. Thèse de Doctorat en Sciences de végétal. Université Paris-Saclay. p144

Kepseu, W.D., Sepulchre, J.-A., Reverchon, S., Nasser, W., 2010. Toward a quantitative modeling of the synthesis of the pectate lyases, essential virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 28565-28576.

Kuc, J., 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual review of phytopathology* 33, 275-297.

Kwon, S.-W., Go, S.-J., Kang, H.-W., Ryu, J.-C., Jo, J.-K., 1997. Phylogenetic Analysis of *Erwinia* Species Based on 16S rRNA Gene Sequences†. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47, 1061-1067.

L

Ladjouzi, R.,(2007). Recherche et identification des *Pectobacterium*, agents de la pourriture molle sur différentes plantes hotes: pomme de terre, tomates et carottes. Mémoire de Magister Université Abderrahmane Mira de Béjaia. p1

Latour, X., Faure, D., Diallo, S., Cirou, A., Smadja, B., Dessaux, Y., Orange, N., 2008. Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium spp.(Erwinia carotovora)*. Cahiers Agricultures 17, 355-360.

Lautier, T., 2007. Rôle de la protéine associée au nucléoïde Fis dans le contrôle de la virulence chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*. INSA de Lyon.

M

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques et université Romandes. 192p.

Martinez, G., Chaves, A., Anon, M., 1996. Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.). Journal of Plant Growth Regulation 15, 139-146.

Moh, A.A., 2012. Etude des facteurs écologiques influençant la croissance et le développement des *Pectobacterium spp.* infectant les tubercules de pomme de terre. Université de Liège, Gembloux, Belgique. p109

Muraschi, T.F., Friend, M., Bolles, D., 1965. *Erwinia*-like microorganisms isolated from animal and human hosts. Applied microbiology 13, 128-131.

N

Newman, M. A., Roenpenak, E. V. (2000): The induction of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharide. Annual Review of Pathology, 1: 25-31.

Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T.A., Van der Waals, J.E., 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. Plant Disease 96, 186-192.

P

Parkinson, N., Stead, D., Bew, J., Heeney, J., Tsrer, L., Elphinstone, J., 2009. *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of recA sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59, 2388-2393.

Parthiban, V., Prakasam, V., Prabakar, K., 2012. Enzymatic changes in carrot roots induced by *Erwinia carotovora var. carotovora*. Int. J. Pharma Biosci 3, 246-252.

Paulin, J.-P., Sampson, R., 1973. Fireblight in France. II. Characters of the strains of *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al., 1920, isolated from a Franco-Belgian focus, Annales de phytopathologie, pp. 389-397.

Paulin, J.P., Ridé M., Prunier, J-P., 2001. Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans : controverses et polémiques transatlantiques. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences 324, 905–914.

Perombelon, M.C., Kelman, A., 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. Annual review of phytopathology 18, 361-387.

Pérombelon, M., 1994. Diversity in *Erwinias* as plant pathogens. Colloques de l'INRA (France). p. 113-28.

Pérombelon, M., 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. Plant Pathology 51, 1-12.

Priou, S., 1992. Variabilité phénotypique et génétique et caractérisation des sous-espèces d'*Erwinia carotovora* en relation avec leur pouvoir pathogène sur pomme de terre. Ph. D. thesis. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Rennes, France.

R

Rabot, B., Pasco, C., Schmidt, J., 1994. Assessing six Austrian potato cultivars for resistance to *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. Potato Research 37, 197-203.

Raes, J., Rohde, A., Christensen, J.H., Van de Peer, Y., Boerjan, W., 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. Plant Physiology 133, 1051-1071.

S

Soylu, S., 2006. Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in Arabidopsis thaliana leaves following inoculation with pathovars of Pseudomonas syringae. Plant Science 170, 942-952.

Samson, R., Legendre, J., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., Gardan, L., 2005. NEW TAXA-Proteobacteria-Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 1415-1428.

Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A., 1980. Approved lists of bacterial names. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 30, 225-420.

Smadja, B., Latour, X., Trigui, S., Burini, J.F., Chevalier, S., Orange, N., 2004. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora subspecies (Pectobacterium spp.)*. Canadian Journal of Microbiology 50, 19-27.

T

Terry, L.A., Joyce, D.C., 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. Postharvest Biology and Technology 32, 1-13.

Toth, I., Van Der Wolf, J., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Elphinstone, J., 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathology 60, 385-399.

Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C., Birch, P.R., 2003. Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes. Molecular plant pathology 4, 17-30.

V

- VAL, F., Barzic, M.-R., Desender, S., Hamelin, G., Andrivon, D., 2006.** Stockage des pommes de terre: Un lipopolysaccharide bactérien... anti-bactérien? *Phytoma-La Défense des végétaux*, 33-36.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E., 1994.** Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell* 6, 1191.
- Van der Merwe, J.J., 2009.** Etiology of Soft Rot and Blackleg on Potatoes in South Africa. University of Pretoria.
- Van der Merwe, J.J., Coutinho, T.A., Korsten, L., van der Waals, J.E., 2010.** *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 126, 175-185.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C., 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135-162.

W

- Walder, P.S., 1964.** Mineralogy of the Eocene sediment in the Isle of Wight. *Proceedings of the Geologists' Association* 75, 291-IN294.
- Winslow, C.-E., Broadhurst, J., Buchanan, R., Krumwiede Jr, C., Rogers, L., Smith, G.H., 1917.** The families and genera of the bacteria: preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of bacteriology* 2, 505.

Y

- Yaganza, E.-S., 2005.** Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter Contre la pourriture molle de la pomme de terre : base physico-chimique. *Philosophiae doctor: Université Laval (Québec, Canada)*. 175p.

Z

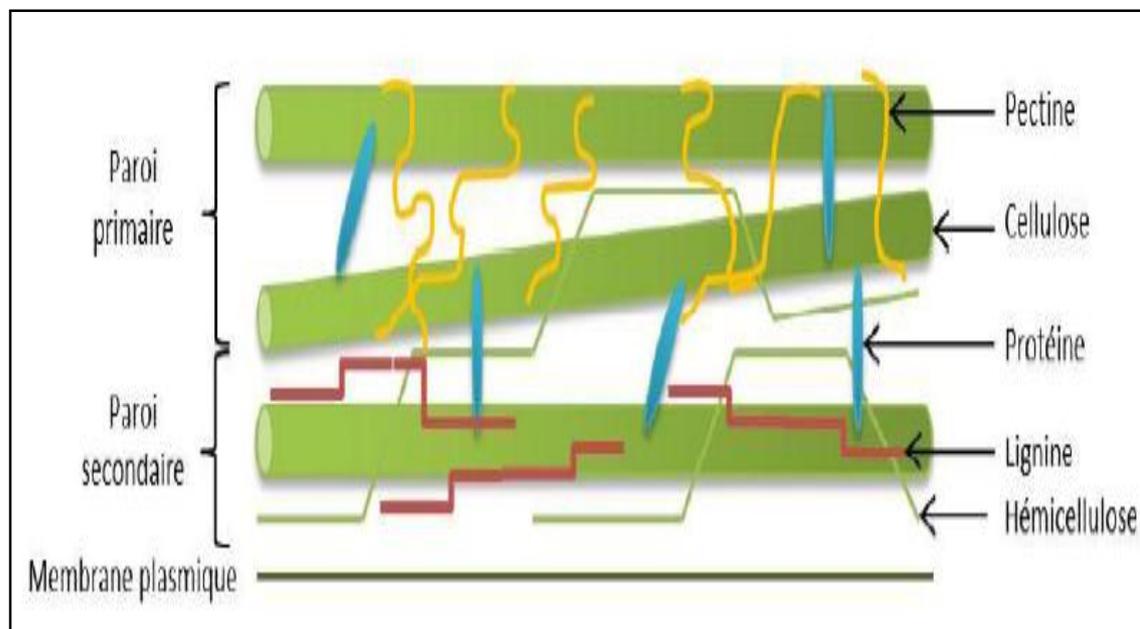
- Zhao, H.-C., Li, G.-j., Wang, J.-B., 2005a.** The accumulation of phytoalexin in cucumber plant after stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 43, 187-193.
- Zhao, H., Zhao, H., Wang, J., Wang, B., Wang, Y., 2005b.** Stress stimulation induced resistance of plant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 43, 174-178.
- Zimnoch-Guzowska, E., Marczewski, W., Lebecka, R., Flis, B., Salamini, F., Gebhardt, C., 2000.** QTL Analysis of New Sources of Resistance to ssp. in Potato Done by AFLP, RFLP, and Resistance-Gene-Like Markers.

Annexes

I. Récapitulatif de la nomenclature des bactéries pectinolytiques. Modifié d'après (Charkowski, 2006) :

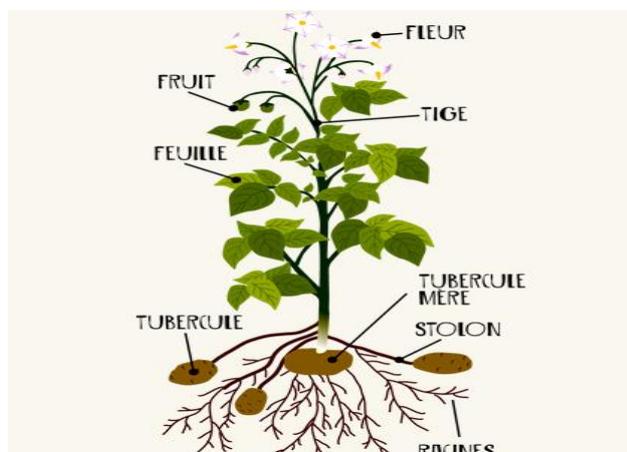
Ancienne nomenclature	Nomenclature proposée	Hôte	Référence
<i>Erwinia carotovora</i>			
subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Pomme de terre, tomate	Gardan <i>et al.</i> (2003)
subsp. <i>betavasculorum</i>	<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	Betterave, tournesol, pomme de terre, artichaut	Gardan <i>et al.</i> (2003)
subsp. <i>brasiliensis</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	Pomme de terre	Duarte <i>et al.</i> (2004), Nabhan <i>et al.</i> (2012)
subsp. <i>carotovora</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Plusieurs hôtes	Hauben <i>et al.</i> (1998)
subsp. <i>odorifera</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	Chicorée, poireau, céleri	Hauben <i>et al.</i> (1998)
subsp. <i>wasabiae</i>	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	Raifort	Gardan <i>et al.</i> (2003)
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Pectobacterium chrysanthemum</i>		Hauben <i>et al.</i> (1998)
pv. <i>dieffenbachia</i> (2, 3)	<i>Dickeya Dieffenbachiae</i> , <i>Dickeya dadantii</i>	Plusieur hotes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>dianthicola</i> (1, 7, 9)	<i>Dickeya dianthicola</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>paradisiaca</i> (3)	<i>Dickeya paradisiaca</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>zeae</i> (3, 8)	<i>Dickeya zeae</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>chrysanthemi</i> (5, 6)	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
pv. <i>parthenii</i> (5, 6)	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Plusieurs hôtes	Samson <i>et al.</i> (2005)
	<i>Dickeya solani</i> sp. nov.	Pomme de terre	Van der Wolf <i>et al.</i> (2014)

II. Représentation schématique de la paroi d'une cellule végétale d'après (Gérard, C. 2014) :



V. Classification botanique et appareil végétatif de la pomme de terre et de la carotte :

Règne : Végétal
Embranchement : Angiospermes
Classe : Dicotylédones
Sous classe : Asteridae
Ordre : Solanales
Genre : solanum
Espèce : *Solanum tuberosum*



Règne : Végétal
Embranchement : Angiospermes
Classe : Dicotylédones
Sous-classe : Astéridae
Ordre : Apiales
Famille : Apiaceae
Genre : Daucus
Espèce : *Daucus carota*



VI. Variétés de pommes de terre cultivées en Algérie d'après la DSA, EL-oued, (2008) :

Variétés rouge	Variétés blanche
Brentina	Safran
Amorosa	Spunta
Cardinal	Diamant
Kondor	Sahel
Désirée	Lola
Cléopatra	Appolo
Resolie	Ajax
Thalassa	Yesmina

VII. Fiche technique des deux variétés de pomme de terre (Désirée et Spunta) :

<ul style="list-style-type: none"> • <i>Solanum tuberosum</i> (Désirée) • Origine : Amérique du Sud, Andes • Désirée est une des variétés de pomme de terre à une saveur type, légèrement sucrée. • Tubercule : oblong, assez régulier, yeux superficiel. • Peau : rouge à chair jaune. • Désirée est une variété facile à cultiver. • La plantation s'effectue en extérieur de mars à avril • Période de floraison : printemps-été. • La récolte : demi-tardive, de bon rendement. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Solanum tuberosum</i> (Spunta) • Origine : Amérique du Sud, Andes • La pomme de terre de Spunta est une des variétés qui se garde le plus longtemps. • Facile à réussir, elle s'adapte à tous les terroirs et les climats. • Très productive, la plus cultivée au monde. • Tubercule : sont réguliers, de gros calibre, yeux superficiel. • Peau : jaune à chair jaune. • La plantation en extérieur de mars à avril. • Période de floraison : printemps-été. • La récolte : demi-précoce au rendement élevé.
--	---

La plupart des milieux de cultures sont stérilisés, à une température de 120° pendant 20mn.

VIII. Milieux utilisés pour la culture et la conservation des *Pectobacterium* et *Dickeya sp.*

Milieu King B (pH= 7,2)



Peptone	20 g
Phosphate de K dibasique	1,145 g
Sulfate de Mg (MgSO₄, 7H₂O)	1,5 g
Glycerol	10 g
Agar	15 g
Eau distillé	1000 ml

Milieu LP (Levure Peptone)



Peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillé	1000ml

Milieu LB (Luria Bertali) (pH= 7.2)



Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillé	1000ml

Test LSD; variable LONGUEUR (pt tuber.sta)			
Groupes homogènes, alpha = ,05			
EFFET PRINC.:VARIETE			
	Moy.	1	
B {2}	1,42499995	xxxx	
R {1}	1,60000002	xxxx	
Test LSD; variable POIDS (pt tuber.sta)			
Groupes homogènes, alpha = ,05			
EFFET PRINC.:VARIETE			
	Moy.	1	
B {2}	0,77499998	xxxx	
R {1}	0,85000002	xxxx	

Test LSD; variable LONGUEUR (pt tuber.sta)			
Groupes homogènes, alpha = ,05			
EFFET PRINC.:SOUCHE			
	Moy.	1	
.... 53.84 {1}	1,4375	xxxx	
.... Dd {2}	1,58749998	xxxx	
Test LSD; variable POIDS (pt tuber.sta)			
Groupes homogènes, alpha = ,05			
EFFET PRINC.:SOUCHE			
	Moy.	1	2
.... Dd {2}	0,57499999	xxxx	
.... 53.84 {1}	1,04999995		xxxx

Test LSD; variable LONGUEUR (pt demi.sta)			
Groupes homogènes, alpha = ,05			
EFFET PRINC.:VARIETE			
	Moy.	1	
VB {2}	3,74047613	xxxx	
VR {1}	4,21999979	xxxx	

Test LSD; variable **VOLUME** (pt demi.sta)

Groupes homogènes, alpha = ,05

EFFET PRINC.:VARIETE

	Moy.	1
VB {2}	1,74523807	xxxx
VR {1}	2,18666673	xxxx

Test LSD; variable **PROFOND** (pt demi.sta)

Groupes homogènes, alpha = ,05

EFFET PRINC.:VARIETE

	Moy.	1
VR {1}	0,78333336	xxxx
VB {2}	0,85952383	xxxx

Test LSD; variable **POIDS** (pt demi.sta)

Groupes homogènes, alpha = ,05

EFFET PRINC.:VARIETE

	Moy.	1	2
VB {2}	1,2617619	xxxx	
VR {1}	2,40050006		xxxx

Test LSD; variable **LONGUEUR** (pt demi.sta)

Groupes homogènes, alpha = ,05

EFFET PRINC.:SOUCHE

	Moy.	1	2
.... Dd {2}	2,58333325	xxxx	
.... 53.84 {1}	5,37714291		xxxx

Test LSD; variable **VOLUME** (pt demi.sta)

Groupes homogènes, alpha = ,05

EFFET PRINC.:SOUCHE

	Moy.	1	2
--	------	---	---

.... Dd {2}	0,98333335	xxxx	
.... 53.84 {1}	2,94857144		xxxx

Test LSD; variable PROFOND (pt demi.sta)

Groupes homogènes, alpha = ,05

EFFET PRINC.:SOUCHE

	Moy.	1	
.... 53.84 {1}	0,79285717	xxxx	
.... Dd {2}	0,85000002	xxxx	

Test LSD; variable POIDS (pt demi.sta)

Groupes homogènes, alpha = ,05

EFFET PRINC.:SOUCHE

	Moy.	1	2
.... Dd {2}	0,82483333	xxxx	
.... 53.84 {1}	2,83742857		xxxx

Résumé

Les espèces *Pectobacterium atrosepticum* et *Dickeya dadantii* agents responsables des maladies de jambe noire et pourriture molle, induisent des dégâts considérables sur pommes de terre. Dans le but de caractériser ces pathogènes, des échantillons de deux variétés de pommes de terre (Désirée et Spunta), ainsi que des carottes ont été inoculées par deux espèces pectinolytiques (*P. atrosepticum* et *D. dadantii*). Après incubation, les paramètres physiques des tissus macérés (poids, volume, longueur, profondeur et surface) sont calculés. Par ailleurs, des dosages enzymatiques (pectate-lyases et phénylalanine-ammonialyase) sont effectués à partir de ces tissus infectés. Un test d'antibiogramme est réalisé dans le but d'estimer la résistance/sensibilité des souches vis-à-vis de certains antibiotiques. D'après les résultats obtenus, une prédominance du caractère virulent est observée pour l'espèce *atrosepticum* sur l'ensemble des échantillons utilisés par rapport à *Dickeya sp* qui a présenté des niveaux de macération assez importants. Une différence de réaction variétale est également signalée vis-à-vis de ces pathogènes, c'est la variété Désirée qui présente la plus grande sensibilité par rapport au cultivar Spunta. De même, l'extraction des tissus macérés et le dosage des enzymes Pels et PAL, nous ont renseigné sur les réactions métaboliques survenant durant l'interaction plante-pathogène.

Mots-clés : Dosage, *Pectobacterium*, Pathogénicité, Pomme de terre, Phénylalanine-ammonialyase.

Abstract

Pectobacterium atrosepticum and *Dickeya dadantii* species are blackleg and soft rot diseases agents who induce considerable damage to potatoes crops. In order to characterize these pathogens, two potatoes varieties (Desiree and Spunta) and carrots were inoculated by two pectinolytic species (*P. atrosepticum* and *D. dadantii*). After incubation, physical parameters of macerated tissues (weight, volume, length, depth and area) are measured. Furthermore, enzymatic assays (pectate lyases and phenylalanine ammonialyase) are made from these infected tissues. An antibiogram test is also performed in order to estimate resistance/sensitivity of strains against antibiotics. According to the results, a predominance of virulent character is observed for *atrosepticum* specie on all samples used, *Dickeya sp* shows sizeable maceration levels. A difference of reaction is also reported, Desiree variety has the greatest sensitivity compared to Spunta cultivar. In addition, macerated tissues extraction and enzyme assay on Pels and PAL indicate metabolic reactions that occurred during plant-pathogen interaction.

Keywords: Dosage, *Pectobacterium*, Pathogenicity, Potato, Phenylalanin-ammonialyase