



Évaluation de différents sels et mélanges de sels pour lutter contre *Pseudomonas cichorii* dans la laitue

Mémoire

Hicham Affia

Maîtrise en biologie végétale
Maître ès sciences (M. SC.)

Québec, Canada

© Hicham Affia, 2016

Évaluation de différents sels et mélanges de sels pour lutter contre *Pseudomonas cichorii* dans la laitue

Mémoire

Hicham Affia

Sous la direction de :

Russell Tweddell, directeur de recherche
Vicky Toussaint, codirectrice de recherche

Résumé

Ce projet avait pour objectif d'évaluer l'efficacité de certains sels utilisés comme agents de conservation dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique pour lutter contre la maladie des taches et des nervures noires de la laitue (*Lactuca sativa*), causée par la bactérie *Pseudomonas cichorii*. L'étude a permis 1) de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (MICs) des sels et de mélanges de ces sels envers des souches virulentes de *P. cichorii* et 2) d'évaluer l'effet de ces sels et mélanges de sels, appliqués à des concentrations avoisinant les MICs, sur le développement de la maladie. Les résultats obtenus montrent une réduction significative, bien que partielle et variable, de la gravité des symptômes de maladie suite à l'application de NaHCO_3 (160 mM), de AlCl_3 (4 mM) et des mélanges $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{CaCl}_2$ (12 mM), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{AlCl}_3$ (4 mM) et $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{NaHCO}_3$ (125 mM). À la lumière des résultats obtenus, il est clair que les sels testés dans le cadre de cette étude ne permettent pas une réduction suffisamment marquée de la maladie pour envisager la commercialisation des plants. On ne peut toutefois exclure la possibilité que ces sels puissent permettre une réduction suffisante de la maladie des taches et des nervures noires lorsqu'utilisés avec des méthodes complémentaires de lutte dans un programme de lutte intégrée.

Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des annexes.....	viii
Remerciements.....	ix
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	3
Revue de littérature	3
1.1. Portrait de la culture	3
1.2. Problématiques de la culture	3
1.2.1. Maladies biotiques	4
1.2.1.1. Maladie des taches et des nervures noires.....	4
1.2.1.2. <i>Pseudomonas cichorii</i>	6
1.2.1.3. Cycle de la maladie	6
1.3. Méthodes de lutte.....	9
1.3.1. Lutte chimique	9
1.3.2. Pratiques culturales	9
1.4. Propriétés antimicrobiennes des sels	10
1.4.1. Modes d'action des sels.....	11
1.4.2. Efficacité des sels contre des agents phytopathogènes	12
1.4.2.1. Sels à l'étude.....	15
1.5. Adjuvants	17
1.5.1. Tween 20.....	19
1.6. Hypothèses et objectifs de recherche.....	19
CHAPITRE 2	21
Matériel et méthodes	21
2.1. Isolation sur la laitue des souches virulentes de <i>P. cichorii</i> (vérification des postulats de Koch)	21
2.1.1. Isolation des bactéries	21
2.1.2. Identification des bactéries.....	21
2.1.3. Détermination de la virulence et de l'agressivité des bactéries.....	23
2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (MICs)	25
2.3 Détermination d'une synergie des sels en mélange.....	29

2.4. Essais en serre.....	29
2.4.1 Évaluation de la phytotoxicité des sels.....	29
2.4.2. Effet des sels sur le développement de la maladie.....	30
CHAPITRE 3	32
Résultats	32
3.1. Isolation des souches virulentes de <i>P. cichorii</i> (Vérification des postulats de Koch)	32
3.2. Détermination des MICs	34
3.3. Détermination d'une synergie des sels en mélange.....	39
3.4. Essais en serre.....	40
3.4.1 Évaluation de la phytotoxicité des sels.....	40
3.4.2 Effets des sels sur le développement de la maladie.....	42
CHAPITRE 4	45
Discussion	45
CONCLUSION.....	53
RÉFÉRENCES	55
ANNEXE A.....	62

Liste des tableaux

Tableau 1. Effets inhibiteurs connus des sels sur les microorganismes responsables de maladies végétales	13
Tableau 2. Classement par type des adjuvants utilisés en agriculture	18
Tableau 3. Sels dont les MICs ont été déterminées	26
Tableau 4. Mélanges de sels dont les MICs ont été déterminées	26
Tableau 5. Interprétations des indices FIC	29
Tableau 6. Détermination de la virulence et de l'agressivité des isolats de <i>Pseudomonas</i>	33
Tableau 7. Compilation des MICs des sels testés contre <i>P. cichorii</i>	38
Tableau 8. Compilation des MICs des mélanges de sels testés contre <i>P. cichorii</i>	39
Tableau 9. Indices de concentration inhibitrice fractionnée (FIC) des mélanges de sels .	40
Tableau 10. Phytotoxicité des sels	41
Tableau 11. Phytotoxicité des mélanges de sels	42

Liste des figures

Figure 1. Production totale annuelle de 2003 à 2013 (tonnes)	3
Figure 2. Symptômes de taches foliaires (b) et de nervures noires (a et c)	5
Figure 3. Cycle de la maladie	8
Figure 4. Échelle de gravité des symptômes de pourriture	24
Figure 5. Schéma d'une microplaque	27
Figure 6. Schéma de lecture et d'interprétation d'une microplaque	28
Figure 7. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du AlCl_3 , du CaCl_2 et du mélange de ces sels ($\text{AlCl}_3 + \text{CaCl}_2$)	35
Figure 8. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, du AlCl_3 et du mélange de ces sels ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{AlCl}_3$)	35
Figure 9. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, du CaCl_2 et du mélange de ces sels ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{CaCl}_2$)	35
Figure 10. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$, du $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$ et du mélange de ces sels ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2 + \text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$)	35
Figure 11. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du NaHCO_3 , du $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$ et du mélange de ces sels ($\text{NaHCO}_3 + \text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$)	36
Figure 12. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du Na_2CO_3 , du $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$ et du mélange de ces sels ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$)	36
Figure 13. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$, du NaHCO_3 et du mélange de ces sels ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2 + \text{NaHCO}_3$)	36
Figure 14. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$, du Na_2CO_3 et du mélange de ces sels ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2 + \text{Na}_2\text{CO}_3$)	36
Figure 15. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du Na_2CO_3 , du NaHCO_3 et du mélange de ces sels ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3$)	37
Figure 16. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, du Na_2CO_3 et du mélange de ces sels ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{Na}_2\text{CO}_3$)	37
Figure 17. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, du NaHCO_3 et du mélange de ces sels ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{NaHCO}_3$)	37
Figure 18. Effet des sels sur le développement de la maladie en serre (Essai 1)	43
Figure 19. Effet des sels sur le développement de la maladie en serre (Essai 2)	44

Liste des annexes

Annexe A	62
----------------	----

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, M. Russell J. Tweddell, ainsi que ma codirectrice de recherche, Mme Vicky Toussaint, pour leurs conseils, leurs encouragements et leur grande disponibilité pour répondre à mes interrogations tout au long de ma maîtrise.

Merci également à M. Maxime Delisle-Houde, coéquipier sur lequel j'ai toujours pu compter pour m'apporter son aide précieuse lors de la planification et de la réalisation de mes essais. Merci à Mme Angélique Bojanowski, qui m'a guidé à mon arrivée dans l'équipe sur le fonctionnement du laboratoire ainsi que dans la planification et la réalisation des premiers essais et qui est demeurée disponible tout au long de ma maîtrise pour répondre à mes nombreuses questions. Merci aussi à Mme Andréanne Belley qui a joint notre équipe au cours du projet et qui m'a apporté son excellente assistance dans la réalisation de nombreux et fastidieux essais en laboratoire et en serre.

Je remercie également mes collègues de l'Environnement, toujours prêts à m'enrichir de leurs idées et de leurs points de vue.

Enfin, merci à toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible, ainsi qu'à tous les auditeurs qui m'ont accordé leur temps et leur attention lors de mon séminaire de mémoire de maîtrise.

INTRODUCTION

La culture de la laitue (*Lactuca sativa* L.) a une grande importance économique au Canada, particulièrement dans la province du Québec où l'on retrouve la majeure partie des superficies cultivées (Statistique Canada, 2014). La culture connaît cependant des pertes importantes attribuables à la maladie des taches et des nervures noires, causée par la bactérie *Pseudomonas cichorii* (Swingle 1925) Stapp 1928. Cet agent pathogène, largement répandu dans le monde, possède un très grand nombre de plantes hôtes parmi les espèces cultivées et les mauvaises herbes (Blancard et coll., 2003). Lorsque les conditions sont favorables, c'est-à-dire une température comprise entre 5 et 35 °C et une humidité relative élevée, la bactérie occasionne des dommages esthétiques importants au niveau du feuillage des plants de laitue, rendant impossible leur commercialisation. La maladie est particulièrement difficile à dépister, car elle touche les feuilles internes et se déclare généralement tardivement, à l'approche de la récolte (Pauwelyn et coll., 2011).

Aucun produit phytosanitaire n'est actuellement homologué au Canada pour lutter contre *P. cichorii* dans la laitue. Le cuivre est utilisé pour lutter contre la bactérie dans d'autres cultures, notamment la chicorée (Blancard et coll., 2003) et les chrysanthèmes (UMASS Amherst, 2015), mais son utilisation sur la laitue pose problème en raison de la sensibilité de cette dernière à la phytotoxicité du cuivre. Les méthodes de lutte se limitent à la mise en place de mesures prophylactiques reposant sur des pratiques culturales visant à prévenir l'apparition et la propagation de la maladie. Toutefois, ces dernières se révèlent souvent peu efficaces.

L'exploitation des propriétés antimicrobiennes de sels d'acides organiques et inorganiques, utilisés comme agents de conservation dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique, apparaît comme une approche intéressante dans le développement d'une stratégie de lutte contre la maladie des taches et des nervures noires de la laitue. Différentes études révèlent à cet effet que les sels (chlorure d'aluminium, chlorure de calcium, bicarbonate de sodium, carbonate de sodium, métabisulfite de sodium, benzoate de sodium et sorbate de potassium) présentent un potentiel phytoprotecteur envers divers agents pathogènes fongiques et bactériens (Droby et coll., 1997; El-Sheikh-Aly et coll., 1998; Hervieux et coll., 2002; Mecteau et coll., 2002; Olivier et coll.,

1999; Palou et coll., 2001; Punja et Gaye, 1993; Yaganza et coll., 2014). Les sels présentent par ailleurs de nombreux avantages pour une utilisation phytosanitaire (Yaganza, 2005) :

1) Ils sont considérés comme étant généralement sans risque pour la consommation humaine (*generally recognized as safe [GRAS]*); 2) ils possèdent un large spectre antimicrobien; 3) ils sont faciles d'application et relativement peu coûteux. De plus, le fait qu'ils soient déjà homologués pour la consommation humaine suggère que le processus d'homologation pour une utilisation phytosanitaire serait significativement accéléré et facilité.

Cette étude s'inscrit dans ce contexte. Elle avait pour objectif d'évaluer l'efficacité des sels (chlorure d'aluminium, chlorure de calcium, bicarbonate de sodium, carbonate de sodium, métabisulfite de sodium, benzoate de sodium et sorbate de potassium), seuls ou en mélanges, à réprimer la croissance de *P. cichorii* et le développement de la maladie des taches et des nervures noires de la laitue.

Le présent mémoire comprend quatre chapitres. Le premier chapitre présente une revue de littérature traitant notamment de la maladie des taches et des nervures noires et des propriétés antimicrobiennes des sels. Le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude. Les résultats des travaux de recherche et leur analyse sont respectivement présentés aux troisième et quatrième chapitres.

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1.1. Portrait de la culture

En 2011, la laitue était en termes d'importance la 9^e culture maraîchère en plein champ et la 4^e culture en serre au Canada (Statistique Canada, 2012). En 2013, 3840 ha de laitue ont été cultivés en champ pour une production de 82 515 tonnes et 16 ha ont été cultivés en serre. Depuis de nombreuses années, la production est stable et la province du Québec est le leader canadien de la production (figure 1). En 2013, 84,7 % des superficies en champ (3252 ha) et 65 % des superficies en serre (10,4 ha) dédiées à cette culture au Canada étaient sur le territoire de la province du Québec (Statistique Canada, 2014). Au Québec, la culture de la laitue en champ se fait surtout en sol organique, dans les terres noires de la région située au sud-ouest de Montréal.

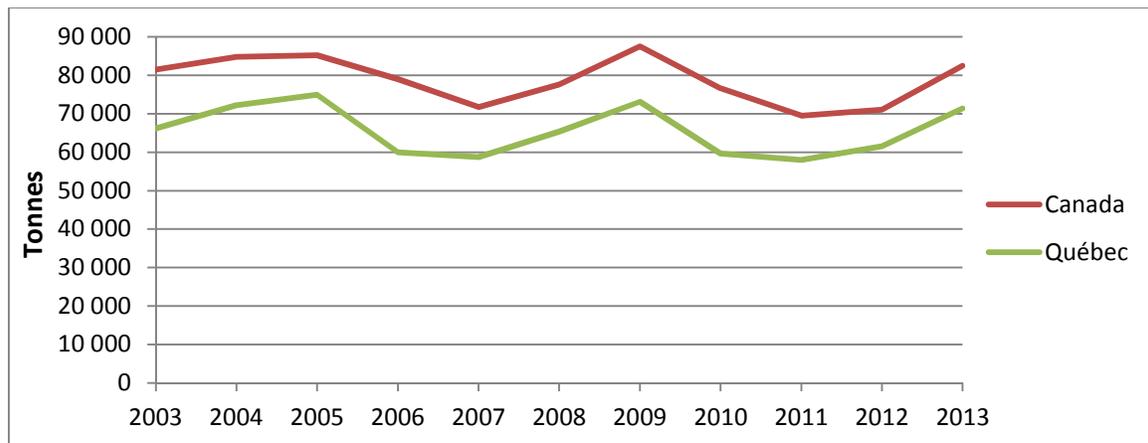


Figure 1. Production totale annuelle de 2003 à 2013 (tonnes)

1.2. Problématiques de la culture

La plus grande partie des pertes dans un champ de laitues est attribuable à des dommages physiques occasionnés par les pratiques culturales ou les conditions climatiques comme le vent, la grêle et les températures extrêmes. Les maladies biotiques et abiotiques, telles que le brunissement nervaire et la nécrose marginale sont également responsables de pertes importantes (Prisme consortium, 2015).

1.2.1. Maladies biotiques

Maladies fongiques

La laitue est sensible à près d'une soixantaine d'agents pathogènes (Blancard et coll., 2003). Les principales maladies affectant la laitue sont causées par des champignons et des protistes fongiformes. Au Québec, les plus redoutés sont *Bremia lactucae* (mildiou de la laitue), *Botrytis cinerea* (moisissure grise de la laitue), *Sclerotinia sclerotiorum* et *Sclerotinia minor* (affaissement sclérotique de la laitue), *Rhizoctonia solani* (fonte de semis et pourriture basale de la laitue), *Pythium tracheiphilum* (affaissement sec de la laitue). On peut également observer des dégâts causés par *Erysiphe cichoracearum* (oïdium ou blanc) et, plus rarement, par *Microdochium panattonianum* (anthracnose de la laitue) (Béliard, 2003; Prisme consortium, 2015).

Maladies bactériennes

Au Québec, *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens* (tache bactérienne de la laitue) est l'agent pathogène bactérien le plus important, suivi par des espèces de *Pseudomonas*, responsables de dégâts foliaires. En 2008, *Pseudomonas syringae* et *P. cichorii* (maladie des taches et des nervures noires) étaient les plus importantes de ce genre, mais on peut également rencontrer les espèces *P. marginalis*, *P. viridiflava* et *P. fluorescens* (davantage considérées comme des agents pathogènes de faiblesse ou opportunistes). *Pectobacterium carotovorum* cause également des dégâts dans la laitue (pourriture humide et noire du pivot et de la pomme) (Toussaint, 2008).

1.2.1.1. Maladie des taches et des nervures noires

Cette maladie des laitues pommées (*Lactuca sativa* var. *capitata*) (Pauwelyn et coll., 2011) est aussi connue sous les noms de *bacterial leaf spot*, *varnish spot* et *tar* (Blancard et coll., 2003). Les symptômes apparaissent le plus souvent sur les feuilles internes, à l'approche de la récolte, ce qui rend le dépistage difficile et tardif, à moins de retirer les feuilles externes (Pauwelyn et coll., 2011). Les symptômes les plus caractéristiques sont les nervures noires, des lésions humides de couleur brun foncé à noire qui touchent les nervures principales et peuvent s'étendre aux nervures secondaires (figure 2, a & c). De petites taches chlorotiques, qui brunissent rapidement

à mesure qu'elles deviennent nécrotiques, peuvent également apparaître sur les feuilles (figure 2, b) (Blancard et coll., 2003).

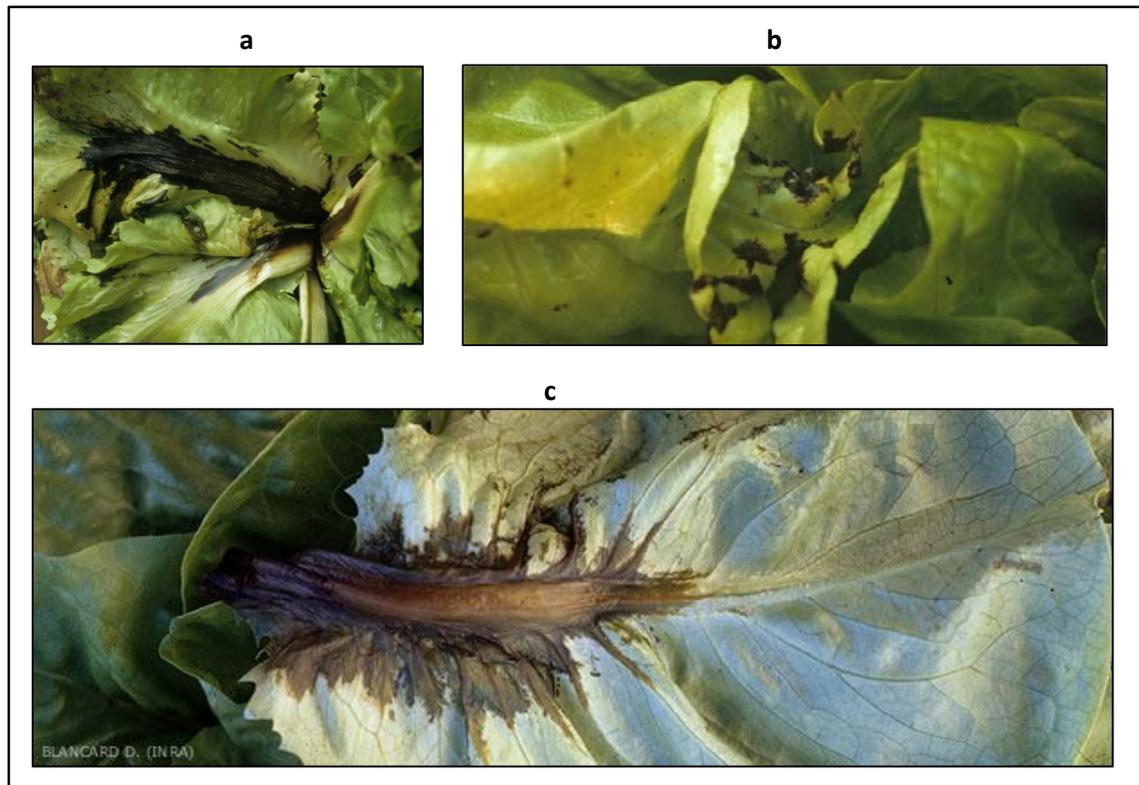


Figure 2. Symptômes de taches foliaires (b) et de nervures noires (a et c).

L'apparition tardive des symptômes et leur localisation sur les feuilles internes s'expliquent par le fait que ces feuilles, en formant la pomme de la laitue mature, offrent une niche très favorable à la croissance de la bactérie en favorisant une humidité importante et en protégeant l'agent pathogène des rayons ultraviolets (Pauwelyn et coll., 2011).

Pseudomonas cichorii peut également toucher les feuilles des salades de quatrième gamme (préparations crues prêtes à l'emploi) lors de leur conservation. Enfin, la bactérie peut agir en agent pathogène de faiblesse ou opportuniste. On remarque par exemple une plus grande incidence de la maladie chez les laitues atteintes du virus des grosses nervures de la laitue. De plus, l'étude d'échantillons foliaires prélevés à la jonction entre les tissus sains et les tissus malades révèle souvent une action combinée de plusieurs bactéries, y compris, entre autres, *P. cichorii*, *X. campestris* pv. *vitians*, *P. marginalis* pv. *marginalis*, *P. viridiflava* et *P. fluorescens* (Blancard et coll., 2003).

1.2.1.2. *Pseudomonas cichorii*

Pseudomonas cichorii est une bactérie à Gram négatif de la classe des *gammaproteobacteria*, de l'ordre des *pseudomonadales* et de la famille des *pseudomonadaceae*. Il s'agit d'un bacille politrèche motile, aérobie obligatoire, non sporulé et d'une dimension approximative de 0,8 sur 1,3 µm (Richard & Boivin, 1994). Cette bactérie ubiquiste est très polyphage et affecte un grand nombre de plantes hôtes. Parmi les légumes et les fleurs cultivées, on compte l'aubergine (*Solanum melongena*), le céleri (*Apium graveolens*), la chicorée (*Chicorium* spp.), le chou (*Brassica oleracea*), l'endive (*Cichorium intybus* var. *foliosum*), la tomate (*Solanum lycopersicum*), le chrysanthème (*Chrysanthemum* spp.) et le géranium (*Pelargonium* spp.). La bactérie a aussi un grand nombre de plantes hôtes parmi les mauvaises herbes qui peuvent jouer le rôle de réservoirs et favoriser sa persistance au champ. Parmi celles-ci, on compte le laiteron potager (*Sonchus oleracea*), les véroniques (*Veronica* spp.), le pâturin annuel (*Poa annua*), la morelle noire (*Solanum nigrum*), le pourpier potager (*Portulaca oleracea*), les sétaires (*Setaria* spp.), le séneçon vulgaire (*Senecio vulgaris*) et la bourse-à-pasteur (*Capsella bursa-pastoris*) (Blancard et coll., 2003).

Sous-groupes de *Pseudomonas cichorii*

Il existe plusieurs sous-groupes de *P. cichorii* qui peuvent être distingués par une BOX-PCR et dont la virulence varie, notamment en fonction du cultivar de laitue. L'expression même des symptômes causés, pour un même sous-groupe, est fortement influencée par le cultivar de laitue. Ainsi, une même souche peut causer des lésions nécrotiques sur la surface foliaire des laitues Iceberg, mais une pourriture des nervures centrales des laitues Boston ou Oakleaf (Pauwelyn et coll., 2011).

1.2.1.3. Cycle de la maladie

Le cycle de la maladie des taches et des nervures noires est présenté à la figure 3.

Survie

La bactérie se maintient facilement sur la matière organique, dans le sol, sur les débris végétaux ainsi que dans certaines réserves d'eau souillée. Elle survit plusieurs mois sur les semences (Blancard et coll., 2003).

Contamination

La contamination des plants de laitue peut être causée par une eau d'irrigation contaminée ou par des éclaboussures projetant des particules de sol contaminées sur les plants, lors d'une pluie ou d'une irrigation par aspersion (Pauwelyn et coll., 2011; Hikichi et coll., 2013). Une fois contaminées, les feuilles extérieures constituent une source d'inoculum importante pour les feuilles internes. L'utilisation de semences porteuses de la bactérie est également un vecteur substantiel de contamination. La bactérie peut par ailleurs être disséminée par le vent, les animaux, les insectes, les humains et le matériel utilisé lors des opérations agricoles (Blancard et coll., 2003).

Conditions climatiques favorables

La forte aptitude de la bactérie à la survie et le nombre élevé de vecteurs de contamination font que, le plus souvent, *P. cichorii* est présente sur les feuilles de laitue tout au long de leur cycle de production, bien que la maladie ne se déclare pas systématiquement. En effet, l'agent pathogène doit rencontrer des conditions climatiques favorables pour provoquer les symptômes, soit une humidité importante et prolongée et des températures comprises entre 5 et 35 °C, avec un optimum entre 20 et 25 °C. Ces conditions sont remplies, par exemple, lors de périodes estivales pluvieuses ou lors de rosées prolongées. Au-delà de 53 °C, la bactérie meurt (Blancard et coll., 2003; Toussaint, 2008).

Infection

Lorsque les conditions climatiques sont favorables, à l'approche de la récolte, la population bactérienne à la surface des feuilles augmente et la pression d'inoculum s'intensifie (Blancard et coll., 2003). Le seuil de concentration de certaines molécules de communication sécrétées par la bactérie est alors atteint, déclenchant les mécanismes de régulation de son pouvoir pathogène et provoquant l'infection des plants de laitue (Toussaint, 2008). *Pseudomonas cichorii* ne semble pas posséder un important pouvoir parasitaire sur la laitue, la bactérie pénètre la plante principalement par les ouvertures naturelles (stomates et hydathodes) ou les blessures (éclatements occasionnés par une forte croissance, blessures occasionnées par le vent, la grêle, les insectes, les opérations agricoles...) (Blancard et coll., 2003). La présence d'eau sur les feuilles est

particulièrement importante, car, grâce à leurs flagelles, les bactéries peuvent s'y mouvoir vers les orifices présents à la surface foliaire, et les mouvements mêmes de l'eau peuvent les y entraîner (Toussaint, 2008). Les bactéries se multiplient alors activement dans les cellules de garde et les espaces intercellulaires de l'épiderme et migrent vers le mésophylle pour atteindre la nervure principale qu'elles colonisent à la manière d'un agent pathogène vasculaire. Une pénétration à travers la cuticule, bien que rare, peut aussi se produire quand les feuilles sont saturées en eau. Si les sols sont fortement contaminés, on peut également observer une pénétration des bactéries par les racines et le collet des laitues (Blancard et coll., 2003).

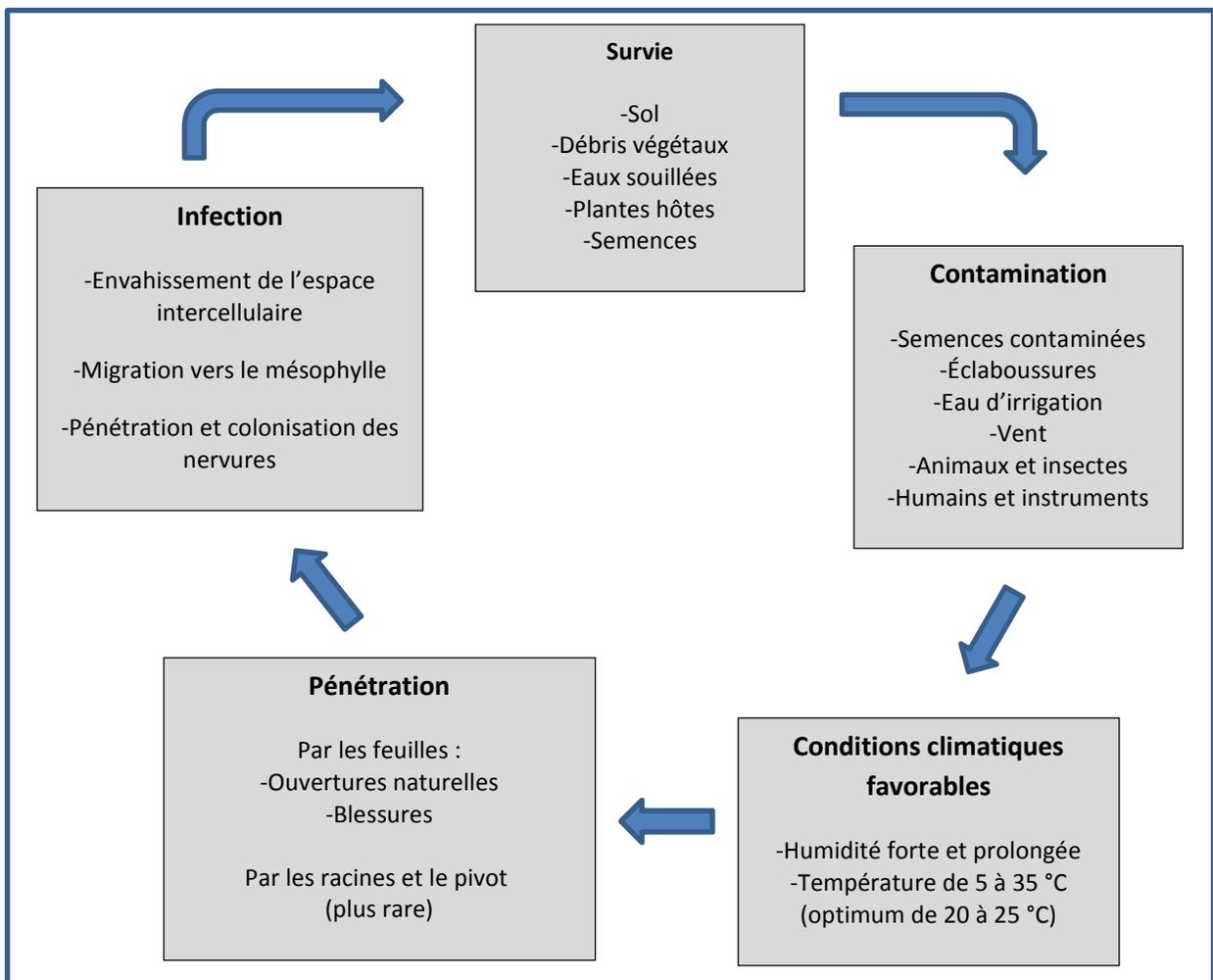


Figure 3. Cycle de la maladie.

Développement des symptômes

Un inoculum de *P. cichorii* d'une concentration de 10^2 ufc/ml suffit à entraîner les symptômes (Pauwelyn et coll., 2011), qui deviennent observables à partir d'une densité microbienne supérieure à 10^5 ufc par gramme de feuille infectée (poids humide) (Hikichi et coll., 2013) et aussi tôt que 30 heures après la contamination (Blancard et coll., 2003). Le stade de croissance durant lequel la contamination des plants a lieu influence également le développement des symptômes. Des plants inoculés avec une suspension bactérienne d'une concentration de 10^6 ufc/ml, au stade de 4 ou 8 feuilles, n'ont montré aucune différence significative avec des témoins non inoculés, tandis que des plants inoculés au stade 12 feuilles ont montré de légers symptômes et des plants inoculés au stade 17 ou 25 feuilles ont développé des symptômes sévères de maladie (Pauwelyn et coll., 2011).

1.3. Méthodes de lutte

1.3.1. Lutte chimique

Au Canada, aucun produit bactéricide n'est homologué à ce jour pour le traitement de la laitue (Toussaint, 2008; MAPAQ, 2014). Des produits à base de cuivre sont utilisés pour lutter contre *P. cichorii* dans d'autres cultures, mais se révèlent d'une efficacité relative dans la laitue. En effet, comme la laitue est sensible à l'effet phytotoxique du cuivre, les différentes formes de ce dernier sont alors utilisées à des doses plus faibles. Enfin, des cas de résistance de *P. cichorii* au cuivre ont été rapportés dans des cultures de céleri en Floride (Blancard et coll., 2003).

1.3.2. Pratiques culturales

Les seuls moyens de lutte actuellement disponibles aux producteurs consistent à adopter des pratiques culturales préventives qui peuvent augmenter les probabilités de contrôler une épidémie bactérienne. Afin de minimiser les sources de contamination, il est essentiel d'utiliser des semences (Toussaint, 2008) et une eau d'irrigation (Toussaint, 2008; Pauwelyn et coll., 2011) qui soient exemptes de la bactérie. Il est également recommandé de se débarrasser des résidus de cultures et des mauvaises herbes sensibles à la bactérie; toutefois leur enfouissement n'est pas recommandé, car

la bactérie survit dans le sol (Blancard et coll., 2003; Toussaint, 2008). Pour éviter une humidité prolongée du feuillage, l'irrigation par aspersion est à proscrire quand c'est possible et, si elle est inévitable, il faudra la réaliser tôt en matinée pour favoriser un assèchement rapide des plants (Blancard et coll., 2003; Toussaint, 2008). L'utilisation de parcelles bien aérées est donc particulièrement indiquée (Blancard et coll., 2003). On veillera spécialement à éviter l'irrigation par aspersion durant les jours précédant la récolte, lorsque les laitues sont plus sensibles à la maladie (Blancard et coll., 2003; Toussaint, 2008). On s'abstiendra également de tout déplacement au champ lorsque le feuillage est mouillé, car le risque de propagation de la bactérie par contact est alors élevé (Blancard et coll., 2003; Toussaint, 2008). Si une parcelle présente des symptômes de maladie, elle devra être travaillée en dernier (Toussaint, 2008) et tout le matériel utilisé devra être désinfecté par la suite (Blancard et coll., 2003; Toussaint, 2008). Il est très important de récolter les laitues à temps et d'éviter de le faire à surmaturité, car la sensibilité des plants à la maladie augmente avec l'âge (Toussaint, 2008). Enfin, pour réduire la population bactérienne au champ, il est recommandé d'effectuer une rotation des cultures avec des espèces non sensibles (Blancard et coll., 2003; Toussaint, 2008) et surtout de ne jamais revenir en culture de laitues sur une parcelle ayant présenté des symptômes de maladie plus tôt en saison (Toussaint, 2008). Il est également de rigueur de réfrigérer rapidement les laitues récoltées (Toussaint, 2008), particulièrement celles qui sont destinées à la quatrième gamme. Ces dernières devront avoir été récoltées dans des parcelles exemptes de la bactériose (Blancard et coll., 2003).

1.4. Propriétés antimicrobiennes des sels

L'effet antimicrobien de certains sels organiques et inorganiques utilisés comme agents de conservation a largement été décrit dans la littérature. Ces sels, utilisés dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, possèdent un large spectre antimicrobien, autant envers les bactéries que les champignons. De plus, la littérature rapporte de nombreux exemples de leur efficacité envers des microorganismes responsables de maladies végétales. Ces sels ont de nombreux avantages pour une utilisation en phytoprotection. Ils sont généralement reconnus comme étant sans risque pour la consommation humaine (*generally recognized as safe* [GRAS]) et sont déjà homologués pour la consommation humaine en plus d'être faciles d'application et peu coûteux (Mecteau et coll., 2002; 2008). Leur homologation pour la consommation humaine est

un avantage important, car le processus d'homologation pour une utilisation phytosanitaire s'en trouverait accéléré.

1.4.1. Modes d'action des sels

Effets généraux

Changement de l'osmolarité du milieu

Le changement d'osmolarité du milieu serait responsable de l'activation des processus d'osmorégulation des microorganismes, causant une augmentation du métabolisme d'entretien. Cependant, certains sels provoquant des changements d'osmolarité comparables dans le milieu ont montré des degrés d'inhibition de croissance microbienne variant d'une inhibition complète à nulle. Le changement d'osmolarité du milieu ne peut donc pas expliquer à lui seul l'inhibition causée par certains sels (Yaganza et coll., 2009).

Changement du pH du milieu

L'acidification ou l'alcalinisation du milieu peut avoir des effets considérables sur la croissance des microorganismes. Des conditions de pH extrêmes entraînent une dénaturation des protéines, comme les enzymes à la surface des cellules qui voient leur interaction avec les lipides membranaires altérée, interférant ainsi avec le transport de solutés essentiels à la survie des microorganismes. De plus, le changement du gradient de pH transmembranaire active le processus de transport actif des protons et, en conditions de pH extrêmes, celui-ci est surchargé. Il se produit alors un transport passif des protons H^+ à travers la membrane cytoplasmique, entraînant une acidification ou une alcalinisation du milieu cytoplasmique qui peut dénaturer les acides nucléiques et altérer leur fonction (Yaganza et coll., 2009).

Effets spécifiques

Certains sels comme le benzoate de sodium et le sorbate de potassium inhibent la croissance bactérienne en affectant peu le pH ou l'osmolarité du milieu de croissance. D'autres sels comme le métabisulfite de sodium inhibent la croissance bactérienne à des pH acide, quasi neutre ou basique. Ce n'est donc ni le changement d'osmolarité, ni

le changement de pH du milieu, qui expliquent l'inhibition observée, mais l'activité toxique des formes ioniques de ces sels envers les microorganismes. Cela se traduit par des formations de complexes, des dénaturations moléculaires, des inactivations enzymatiques, des inhibitions du métabolisme énergétique, ou l'augmentation de la perméabilité membranaire (Yaganza, 2005; Yaganza et coll., 2009). Ces phénomènes seront abordés plus en détail dans la section suivante, pour les sels à l'étude.

1.4.2. Efficacité des sels contre des agents phytopathogènes

Il existe de nombreux exemples de l'efficacité de sels organiques et inorganiques envers des agents phytopathogènes. La plupart des travaux ont porté sur des maladies fongiques (tableau 1), mais il existe aussi des études qui ont démontré leur efficacité envers les bactéries phytopathogènes *Pectobacterium carotovorum* et *P. atrosepticum* (Yaganza et coll., 2009; 2014). Ces deux agents phytopathogènes sont des bacilles à Gram négatif, comme *P. cichorii*.

Tableau 1. Effets inhibiteurs connus des sels sur les microorganismes responsables de maladies végétales ^a

Microorganisme(s)	Maladie	Sel(s)
<i>Aspergillus cucumerina</i>	Rouille des feuilles du melon musqué (Aharoni et coll., 1997)	Bicarbonate d'ammonium
<i>Aspergillus flavus</i>	Pourriture des grains de maïs (Raeker et coll., 1992)	Acétate de sodium Bicarbonate d'ammonium
<i>Botrytis cinerea</i>	Pourriture grise de la pomme (McLaughlin, 1990; Wisniewski et coll., 1995)	Chlorure de calcium
<i>B. cinerea, Penicillium expansum, Alternaria alternata, Mucor pyriformis</i>	Pourriture de la poire et autres fruits (El-Sheikh-Aly et coll., 1998; Sholberg, 1998)	Métabisulfite de sodium Métabisulfite de potassium
<i>Colletotrichum musae</i>	Anthraxose de la banane (Al Zaemey et coll., 1993)	Sorbate de potassium Sorbate de sodium
<i>Didymella bryoniae</i>	Rouille des tiges du melon musqué (Aharoni et coll., 1997)	Bicarbonate d'ammonium
<i>Fusarium spp.</i>	Pourriture sèche de la pomme de terre (Mecteau et coll., 2002)	Métabisulfite de sodium
<i>Fusarium spp., Penicillium griseofulvum, P. notatum, Aspergillus flavus, A. niger, A. ochraceus, A. parasiticus</i>	Pourriture des grains de maïs (Depasquale et coll., 1990; Montville & Shih, 1991)	Bicarbonate d'ammonium
<i>Helminthosporium solani</i>	Tache argentée de la pomme de terre (Hervieux et coll., 2002; Olivier et coll., 1999)	Sorbate de potassium Sorbate de sodium Métabisulfite de sodium Chlorure d'aluminium Carbonate de sodium

^a adapté de Yaganza (2005)

Tableau 1. Effets inhibiteurs connus des sels sur les microorganismes responsables de maladies végétales ^a (suite)

Microorganisme(s)	Maladie	Sel(s)
<i>Monilinia fructicola</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	Pourriture des cerises et des agrumes (Sholberg, 1998)	Formate de sodium
<i>Penicillium italicum</i>	Pourriture bleue des agrumes (Palou et coll., 2001)	Carbonate de sodium
<i>Penicillium digitatum</i>	Pourriture verte des agrumes (Smilanick et coll., 1999; Droby et coll., 1997)	Chlorure de calcium
<i>Sclerotinium rolfsii</i>	Brûlure du gazon (Punja & Grogan, 1982)	Bicarbonate d'ammonium
<i>Thielaviopsis basicola</i>	Pourriture noire de la carotte (Punja & Gaye, 1993)	Sorbate de potassium Sorbate de sodium
<i>Ulocladium cucurbitae</i>	Brûlure des feuilles de concombre (Ziv & Zitter, 1992)	Bicarbonate d'ammonium
<i>Uncinula necator</i>	Blanc de la vigne (Carroll & Wilcox, 2001)	Phosphate de sodium Phosphate de potassium
<i>Monilinia fructicola</i>	Pourriture verte de la pêche (Biggs et coll., 1997)	Hydroxyde de calcium

^a adapté de Yaganza (2005)

1.4.2.1. Sels à l'étude

Chlorure d'aluminium

L'aluminium et ses sels inhibent la croissance de *Phytophthora capsici* (Mills et coll., 2004) ainsi que la croissance mycélienne et la germination des endoconidies et des chlamydozoospores de *Thielaviopsis basicola* (Mills et coll., 2004, Meyer et coll., 1994). Le chlorure d'aluminium est efficace dans l'inhibition de l'agent fongique *Helminthosporium solani* (tableau 1). Le dihydroxy acétate d'aluminium, le lactate d'aluminium et le chlorure d'aluminium ont démontré une forte inhibition des bactéries *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* à une concentration de 200 mM (Yaganza et coll., 2009).

Le chlorure d'aluminium est utilisé dans les stations de traitement de l'eau potable et des eaux usées pour éliminer les particules en suspension. Comme antibactérien, il entre également dans la composition de cosmétiques tels que les antisudorifiques et les crèmes topiques (Santé Canada, 2010) pour le traitement de certaines affections de la peau (Gennaro, 1990).

Le chlorure d'aluminium possède plusieurs modes d'action. Il entraîne la perméabilisation et la rupture de la paroi cellulaire des bactéries, provoquant une perte du contenu cytoplasmique. De plus, l'aluminium traverse la paroi cellulaire et la membrane plasmique des rhizobactéries et forme des complexes avec les acides nucléiques et les protéines du cytoplasme (Yaganza et coll., 2004).

Carbonate de sodium et bicarbonate de sodium

Les bicarbonates et les carbonates sont efficaces en tant qu'inhibiteurs de croissance de nombreux agents fongiques dont *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium* spp., *H. solani*, *Penicillium digitatum*, *P. griseofulvum*, *P. italicum*, *P. notatum*, *Sclerotium rolfsii* et *Ulocladium cucurbitae* (tableau 1) ainsi qu'envers les agents bactériens *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* (Yaganza et coll., 2009). Le bicarbonate de sodium est utilisé comme agent antifongique pour lutter contre certains organismes nuisibles et maladies dans les serres, mais aussi pour d'autres cultures (ONGC, 2011), et semble efficace pour lutter contre la tache noire du rosier (*Marssonina rosae*), la rouille (*Puccinia graminis*), la brûlure en plaque (*Sclerotinia homeocarpa*) et le *Pythium* du gazon, le mildiou de la pomme de terre

(*Phytophthora infestans*) ainsi que l'oïdium et la rouille du blé (*Puccinia triticina*) (Tremblay, 2001).

Le carbonate et le bicarbonate de sodium sont utilisés comme agents levants, antiagglomérants, épaississants, régulateurs de l'acidité et stabilisants (FAO/OMS, 2014).

Ces sels agissent en inhibant des enzymes du cycle de Krebs ainsi qu'en abaissant la tension interfaciale entre les lipides de la membrane cellulaire et la phase aqueuse, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire (Yaganza, 2005).

Chlorure de calcium

Les sels de calcium inhibent la croissance de *B. cinerea*, *P. digitatum* et *Monilinia fructicola* (tableau 1). Ils ont également inhibé modérément la croissance de *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* (Yaganza et coll., 2009). De plus, l'accumulation de calcium dans les parois cellulaires végétales peut leur conférer une meilleure résistance à l'attaque des agents pathogènes fongiques *Penicillium expansum* et *B. cinerea* et de l'agent pathogène bactérien *P. carotovorum* (Droby et coll., 1997). L'ion calcium se fixe à certaines molécules de la paroi cellulaire des agents pathogènes et la perméabilise, altérant ainsi leur équilibre homéostatique (Yaganza, 2005). Le chlorure de calcium est utilisé comme agent de déshydratation (CSST, 2014) ainsi que comme affermissant, épaississant, stabilisant (FAO/OMS, 2014) et comme additif dans la formulation de vaccins (ASPC, 2013)

Il convient de noter que le chlorure de calcium est utilisé comme amendement dans la culture de laitue pour éviter la carence en calcium, responsable du développement de la brûlure de la pointe (Lacroix, 1999) sur laquelle divers microorganismes opportunistes peuvent s'installer (Blancard et coll., 2003).

Benzoate de sodium et sorbate de potassium

Le sorbate de potassium est un inhibiteur de croissance efficace envers divers agents fongiques, dont *H. solani*, *T. basicola* et *Colletotrichum musae* (tableau 1). Le benzoate de sodium et le sorbate de potassium sont efficaces dans l'inhibition de *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* (Yaganza et coll., 2009). Ces deux sels sont utilisés pour la

conservation de la margarine, des viandes, des confitures de fruits et des conserves de légumes. Ils sont parfois utilisés ensemble (Santé Canada, 2015).

Ces sels d'acides organiques ont une activité aussi bien en tant qu'acides indissociés qu'en tant qu'anions. Leur nature hydrophobe leur permet d'interagir avec les constituants lipidiques de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif et d'en altérer le fonctionnement, inhibant ainsi la croissance bactérienne. De plus, leur nature lipophile leur permet de traverser la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, d'acidifier le milieu cytoplasmique et d'inhiber le métabolisme énergétique de ces bactéries (Yaganza et coll., 2009).

Métabisulfite de sodium

Le métabisulfite de sodium est efficace pour inhiber la croissance des agents fongiques *B. cinerea*, *P. expansum*, *Alternaria alternata*, *H. solani*, *Mucor pyriformis*, et *Fusarium* spp. (tableau 1) et des agents bactériens *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* (Yaganza et coll., 2009).

Au Canada, le métabisulfite de sodium est utilisé comme agent de conservation du vin, de la bière, des viandes, des fruits et légumes séchés, du glucose solide et en sirop, des confitures de fruits et des conserves de légumes et de fruits de mer (Santé Canada, 2015).

Les sulfites et bisulfites réagissent avec des groupements chimiques de nombreux composants cellulaires parmi lesquels des aldéhydes, des cétones, des protéines, des enzymes, des cofacteurs, le NAD⁺, le NADP⁺, l'ADN, l'ARN, des transporteurs d'électrons et des acides gras. Ces réactions se traduisent entre autres par une inhibition du métabolisme, de la production d'énergie, de la synthèse de protéines, de la réplication de l'ADN ainsi que par des altérations des protéines et lipides de la membrane (Russell & Gould, 1991).

1.5. Adjuvants

En agriculture, des adjuvants sont fréquemment utilisés pour rendre un produit phytosanitaire plus sécuritaire, plus efficace ou plus facile à manipuler ou à appliquer. L'ajout d'un adjuvant aura pour effet la modification physique ou chimique d'un pesticide

(GNB, 2006). Ils entrent communément dans la formulation des pesticides commerciaux. On trouve l'information complète relative à chaque adjuvant sur l'étiquette apposée sur le contenant du produit (OMAFRA, 2014). Il existe plusieurs types d'adjuvants, classés en fonction de leur activité (tableau 2).

Tableau 2. Classement par type des adjuvants utilisés en agriculture

Type	Action
Pénétrants	Ils permettent aux pesticides de traverser la couche extérieure d'une surface traitée (GNB, 2006), comme la cuticule cireuse d'une feuille (A2D, 2010).
Dispersants	Ils permettent aux pesticides de former une couche uniforme sur la surface traitée (GNB, 2006).
Adhésifs	Ils permettent aux pesticides d'adhérer à la surface traitée (GNB, 2006) pour éviter le lessivage et la volatilisation (A2D, 2010).
Agents tensioactifs	Ils améliorent la dispersion, l'étalement ou les propriétés mouillantes d'un pesticide (GNB, 2006).
Agents mouillants	Ils facilitent le mélange des poudres mouillables et des pâtes granulées avec l'eau et améliorent leur adhésion aux surfaces traitées (GNB, 2006).
Antimoussants	Ils réduisent la formation de mousse dans les mélanges qui nécessitent une forte agitation pour leur application (GNB, 2006).
Complexants	Ils forment des liens chimiques stables avec les ions présents dans l'eau utilisée pour préparer la bouillie, afin d'empêcher ces ions de se lier avec certaines matières actives des pesticides et de les inactiver (GNB, 2006).
Tampons	Ils augmentent la solubilité des pesticides dans l'eau ou ralentissent leur décomposition en abaissant le pH de l'eau alcaline (GNB, 2006).
Agents antidérive ou épaississants	Ils augmentent le diamètre des gouttelettes pulvérisées et réduisent la dérive des pesticides (GNB, 2006).
Émulsifiants	Ils permettent le mélange d'un pesticide à base d'huile avec de l'eau (GNB, 2006).
Émulsion inverse	Ils permettent le mélange d'un pesticide à base d'eau avec des supports à base d'huile (GNB, 2006).

1.5.1. Tween 20

Le Tween 20 est un des noms commerciaux du polysorbate 20, ou monolaurate de sorbitane polyoxyéthylène, un dérivé de l'oxyde d'éthylène. Il s'agit un tensioactif non ionique (Dikici et coll., 2013) qui a pour effet de réduire la tension superficielle des gouttelettes pulvérisées sur une surface. On parle également d'agent de surface ou encore de surfactant (de l'anglais SURFace ACTive AgeNT) (UAP Canada, 2015).

En agriculture, le Tween 20 est utilisé comme agent mouillant, pénétrant et dispersant (Domoto, 2004). Le polysorbate 20 est aussi utilisé comme additif alimentaire, en tant qu'agent émulsifiant et stabilisant (FAO/OMS, 2014).

La littérature rapporte l'absence d'activité bactéricide du Tween 20 envers les entérobactéries bacilles à Gram négatif *Salmonella enteritidis* et *S. typhimurium* à une concentration de 0,5 % (Dikici et coll., 2013) et *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* à des concentrations entre 10 et 30 % (Anjali et coll., 2010).

1.6. Hypothèses et objectifs de recherche

Devant l'importance des pertes associées aux pourritures bactériennes de la laitue et l'absence de moyen de lutte efficace, il semble important d'explorer de nouvelles voies comme l'utilisation du caractère antimicrobien des sels utilisés dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique. Le fait que plusieurs sels (chlorure d'aluminium, chlorure de calcium, bicarbonate de sodium, carbonate de sodium, métabisulfite de sodium, benzoate de sodium et sorbate de potassium) aient déjà démontré une efficacité envers de nombreux microorganismes phytopathogènes, et particulièrement envers les bactéries à Gram négatif *P. carotovorum* et *P. atrosepticum*, suscite davantage l'intérêt. Dans le cadre de ce projet, les hypothèses suivantes seront vérifiées :

- 1) Les sels, appliqués à faible dose, inhibent la croissance de *P. cichorii*.
- 2) Les sels agissent en synergie dans l'inhibition de la bactérie.
- 3) Les sels, appliqués à faible dose, répriment le développement de la maladie des taches et des nervures noires.

Afin de vérifier ces hypothèses, trois objectifs spécifiques seront poursuivis :

- 1) Isoler sur la laitue des souches virulentes de *P. cichorii*.
- 2) Déterminer les doses minimales inhibitrices (MICs) de certains sels et mélanges de sels.
- 3) Évaluer l'effet des sels et des mélanges de sels, appliqués à des concentrations avoisinant les MICs, sur le développement de la maladie.

CHAPITRE 2

Matériel et méthodes

2.1. Isolation sur la laitue des souches virulentes de *P. cichorii* (vérification des postulats de Koch)

2.1.1. Isolation des bactéries

Les bactéries ont gracieusement été fournies par le laboratoire du Dre. Vicky Toussaint (Agriculture et agroalimentaire Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada). Les bactéries ont été prélevées à partir de plants de laitue présentant des symptômes de pourriture à *Pseudomonas* en culture commerciale en Montérégie, plus précisément dans la région des jardins de Napierville située au sud-ouest de Montréal. Elles ont été cultivées en culture pure sur gélose *Pseudomonas* Agar F (Difco Laboratories, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) et conservées dans une solution de glycérol 15 % à -86 °C. Pour l'usage de routine, les bactéries étaient repiquées sur gélose *Pseudomonas* Agar F, incubées 24 heures à 28 °C et conservées à 4 °C.

2.1.2. Identification des bactéries

Culture

Les bactéries ont été cultivées dans des erlenmeyers de 125 ml contenant 50 ml de milieu de culture liquide King's B (10 g/L de Bacto Proteose Peptone #3 [Difco Laboratories], 1,5 g/L de phosphate de potassium dibasique [Caledon Laboratories, Georgetown, ON, Canada], 15 g/L de glycérol et 5 ml/L de MgSO₄ [1 M, stérile]). Les cultures ont été incubées à 28 °C durant 24 heures, sous agitation à 160 rpm. Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation (3000 x *g*, 5 minutes), puis lyophilisées.

Extraction de l'ADN

Les cellules lyophilisées ont été broyées à l'aide d'un pilon dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Allemagne). L'extraction de l'ADN a

été réalisée à l'aide du E.Z.N.A. Plant DNA Kit d'Omega Bio-tek® (VWR International, Radnor, PA) selon les instructions du fabricant. La quantité d'ADN de chaque extrait a été dosée à l'aide du spectrophotomètre Nanovue (GE Healthcare, Piscataway, NJ) et ajustée à 20 ng/μl. L'ADN extrait a été conservé à -20 °C.

Amplification PCR

Les réactions d'amplification de l'ADN ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur (DNA Engine Opticon 2, MJ Research Inc., Waltham, MA) dans un volume de 20 μl contenant 0,2 μl de Taq DNA Polymerase (5 U/μl, BioLabs® Inc., Ipswich, MA), 2 μl de tampon ThermoPol® Buffer (1 X) fourni avec la Taq, 0,4 μl de dNTPs (10 mM), 0,8 μl de chaque amorce, 1 μl d'ADN (20 ng/μl) et 14,8 μl d'eau bidistillée stérile. Le gène ciblé par cette amplification était le gène codant pour l'ARN 16 s. Les amorces universelles utilisées étaient fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') et rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Les réactions commençaient par 2 minutes de dénaturation à 95 °C, suivies de 30 cycles de 3 secondes de dénaturation à 94 °C et 30 secondes à 92 °C, d'une température d'appariement de 50 °C pour 1 minute puis de 8 minutes d'élongation à 65 °C. Les réactions se terminaient par une période d'élongation à 65 °C de 8 minutes. Les produits PCR étaient par la suite mis à migrer durant 30 minutes, à une tension électrique de 130V, sur gel d'agarose 0,8 % et colorés au bromure d'éthidium (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO).

Séquencage

Les produits PCR issus des réactions ont été purifiés et séquencés avec les amorces fD1 et rP2 par électrophorèse capillaire sur un appareil ABI 3730x1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes, Centre de recherche du CHUL, Québec, QC, Canada). Les séquences ont par la suite été alignées manuellement grâce au logiciel BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA). Les séquences alignées ont été soumises à la banque de données NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Une homologie de 99 % permettait de déterminer l'espèce.

2.1.3. Détermination de la virulence et de l'agressivité des bactéries

Culture des plants de laitue

Des graines de laitue de variété AC Estival (Coop Uniforce, Napierville, QC, Canada) ont été semées dans des plateaux multicellulaires de 200 cellules. Les plants ont été transplantés au stade de plantule dans des pots de 6 pouces (15,2 cm) contenant du terreau PRO-MIX® (Fafard, Saint-Bonaventure, QC, Canada) stérile. Ils ont été fertilisés avec deux solutions d'engrais en alternance, selon les formules 20-8-20 et 14-0-14, à 150 ppm d'azote et soumis à une température diurne de 20 °C (40 % d'humidité relative) et nocturne de 18 °C (50 % d'humidité relative).

Préparation de l'inoculum

Chaque bactérie a été cultivée dans un erlenmeyer de 125 ml contenant 50 ml de milieu de culture liquide Difco Nutrient Broth (Difco Laboratories) pour une période de 24 heures à 28 °C, sous agitation à 160 rpm. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation (3000 x *g*, 5 minutes) et mises en suspension dans un tampon de phosphate de potassium stérile (50 mM, pH 7) à une concentration de 5×10^7 ufc/ml.

Inoculation des plants de laitue

Chaque suspension bactérienne (5×10^7 ufc/ml) a été inoculée sur 10 plants de laitue (au stade de 17 feuilles matures) par aspersion à l'aide d'un pulvérisateur manuel. Chaque plant a reçu 100 ml de la suspension bactérienne. Dix plants témoins ont été traités avec 100 ml de solution tampon phosphate stérile (50 mM, pH 7). Les plants ont été cultivés en serre pendant 18 jours suivant l'inoculation, dans les conditions décrites précédemment, puis récoltés manuellement.

Évaluation de la gravité de la maladie

À la récolte, la gravité des symptômes de maladie a été évaluée visuellement pour chaque plant, sur une échelle de 0 à 4 (Niveau 0 = absence totale de symptômes, niveau 1 = symptômes couvrant moins de 10 % du feuillage, niveau 2 = symptômes couvrant 10 à 30 % du feuillage, niveau 3 = symptômes couvrant entre 30 et 50 % du

feuillage, niveau 4 = symptômes couvrant plus de 50 % du feuillage). Les différents niveaux de gravité des symptômes sont présentés à la figure 4.

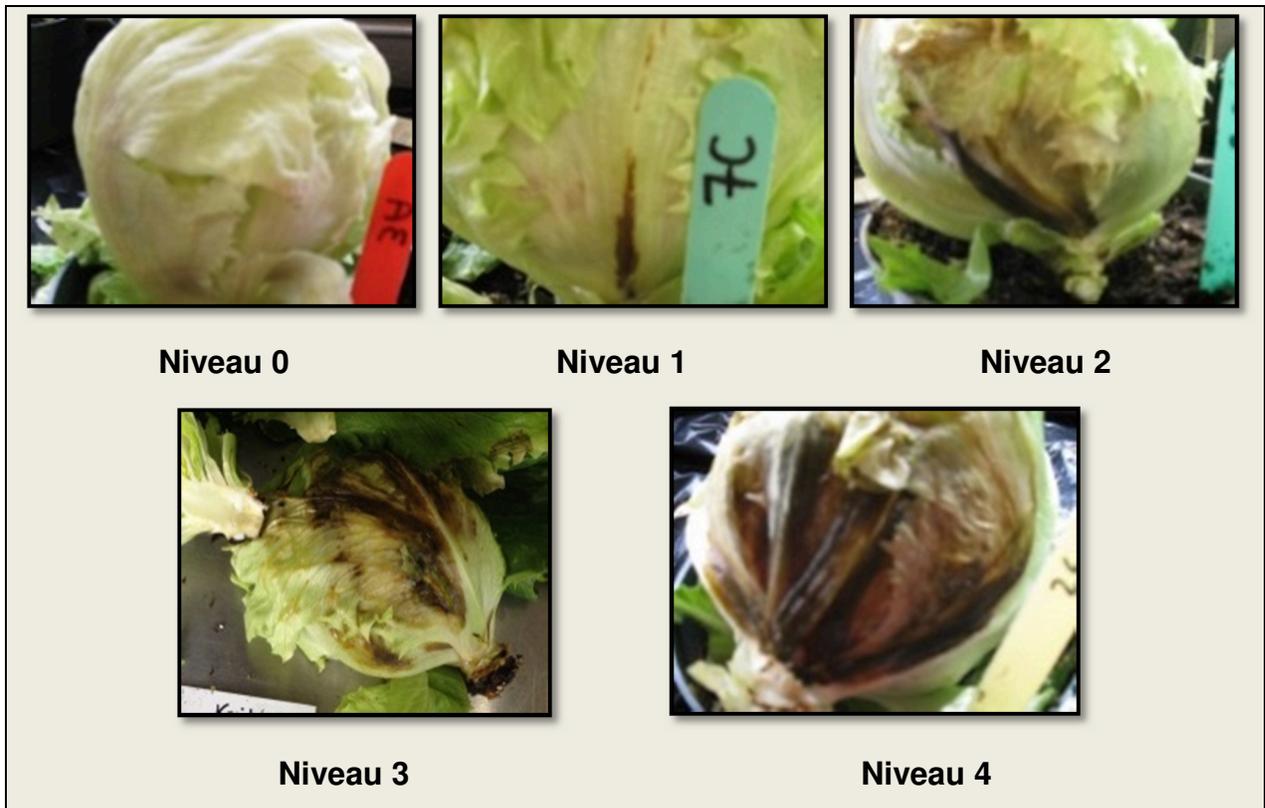


Figure 4. Échelle de gravité des symptômes de pourriture.

Réisolement des bactéries

Pour chaque bactérie, trois échantillons par plant ont été prélevés dans des lésions chez trois plants, stérilisés en surface par une brève immersion dans de l'éthanol à 70 %, rincés à l'eau bidistillée stérile et mis à macérer dans 10 ml de tampon phosphate (50 mM, pH 7). Les suspensions obtenues ont été étalées sur gélose *Pseudomonas* Agar F contenant 0,1 g/L de cycloheximide (Sigma-Aldrich) et incubées 24 heures à 28 °C. Les bactéries obtenues à partir des lésions ont été mises en culture pure et identifiées selon le protocole précédemment décrit (section 2.1.2.).

2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (MICs)

Souches bactériennes

Les souches virulentes de *P. cichorii* ont été sélectionnées pour ces travaux. Les souches étaient conservées à -86 °C dans une solution de glycérol 15 %. Elles ont été repiquées sur gélose Pseudomonas Agar F, incubées 24 heures à 28 °C et conservées à 4 °C.

Préparation de l'inoculum

Chaque souche de *P. cichorii* a été cultivée à 28 °C dans un erlenmeyer de 125 ml contenant 50 ml d'un milieu de culture liquide composé de 10 g/L de Bacto Proteose Peptone #3, 1,5 g/L de phosphate de potassium dibasique et 5 g/L de glycérol, sous agitation à 160 rpm. Après 24 heures d'incubation, les bactéries ont été récupérées par centrifugation (3000 x *g*, 5 minutes) et mises en suspension dans l'eau bidistillée stérile. Les concentrations bactériennes ont été déterminées par lecture de la densité optique à 600 nm (OD₆₀₀) selon le protocole utilisé par Wiegand et coll. (2008), à l'aide d'un spectrophotomètre Biomate 3 (Thermo Scientific, Waltham, MA), et ajustées afin d'obtenir un inoculum composé d'un mélange à parts égales de chacune des souches, pour une concentration totale de 5x10⁶ ufc/ml.

Solutions salines

Les concentrations minimales inhibitrices (MICs) ont été déterminées pour neuf sels (tableau 3). Les MICs des sels de cuivre ont été déterminées à des fins de comparaison. Les MICs de différents mélanges de deux sels compatibles (excluant les sels de cuivre) ont également été déterminées (tableau 4). Deux sels étaient considérés compatibles en mélange lorsqu'il y avait absence d'un précipité ou d'une effervescence. Les tests de compatibilité ont été réalisés en utilisant des solutions salines saturées.

Tableau 3. Sels dont les MICs ont été déterminées

Sel	Formule	Manufacturier
Chlorure d'aluminium	AlCl ₃	Acros organics, Geel, Belgique
Chlorure de calcium	CaCl ₂	Calbiochem, Billerica, MA
Sorbate de potassium	C ₆ H ₇ KO ₂	Bio Basic Canada, Markham, ON
Benzoate de sodium	C ₇ H ₅ NaO ₂	Bio Basic Canada
Bicarbonate de sodium	NaHCO ₃	Caledon Laboratories, Georgetown, ON
Carbonate de sodium	Na ₂ CO ₃	Fisher Science Education, Nazareth, PA
Métabisulfite de sodium	Na ₂ O ₅ S ₂	Bio Basic Canada
Hydroxyde de cuivre (II) ^a	H ₂ CuO ₂	Alfa Aesar, Emmerich am Rhein, Allemagne
Sulfate de cuivre ^a	H ₁₀ CuO ₉ S	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO

^a À des fins de comparaison, les MICs ont également été déterminées pour deux sels à base de cuivre.

Tableau 4. Mélanges de sels dont les MICs ont été déterminées

Mélange	Sel 1	Sel 2
1	Chlorure d'aluminium	+ Chlorure de calcium
2	Métabisulfite de sodium	+ Chlorure d'aluminium
3	Métabisulfite de sodium	+ Chlorure de calcium
4	Benzoate de sodium	+ Sorbate de potassium
5	Bicarbonate de sodium	+ Sorbate de potassium
6	Carbonate de sodium	+ Sorbate de potassium
7	Benzoate de sodium	+ Bicarbonate de sodium
8	Benzoate de sodium	+ Carbonate de sodium
9	Carbonate de sodium	+ Bicarbonate de sodium
10	Métabisulfite de sodium	+ Bicarbonate de sodium
11	Métabisulfite de sodium	+ Carbonate de sodium

Préparation des microplaques

Les MICs des sels ont été déterminées à l'aide de microplaques de 96 puits à fond plat (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) pouvant contenir un volume maximal de 385 µl chacun. La préparation des microplaques a été effectuée en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire. Pour chaque microplaque, la première colonne de puits constituait un témoin de stérilité (TS) et la seconde colonne, un témoin de croissance (TC) (figure 5). Les puits du témoin de stérilité contenaient 100 µl d'eau bidistillée stérile et 80 µl d'un milieu de culture liquide composé de Bacto Proteose Peptone #3 (10 g/L), de phosphate de potassium dibasique (1,5 g/L) et de glycérol (5 g/L). Les puits du témoin de croissance contenaient 100 µl d'eau bidistillée stérile, 80 µl du milieu de culture

liquide précédemment décrit et 20 µl d'inoculum bactérien. Les colonnes 3 à 12 étaient consacrées à la détermination des MICs des sels et des mélanges de sels. Les puits de ces colonnes contenaient des concentrations variées d'un ou de deux sels, selon un gradient horizontal pour le sel 1 et un gradient vertical pour le sel 2. Chaque puits contenait 50 µl d'une solution du sel 1, 50 µl d'une solution du sel 2, 80 µl du milieu de culture liquide et 20 µl d'inoculum bactérien. Ainsi, deux sels étaient testés dans chacune des microplaques. Chaque microplaque a été réalisée en trois répétitions, au même moment, cependant l'ensemble des sels n'a pas été testé au même moment.

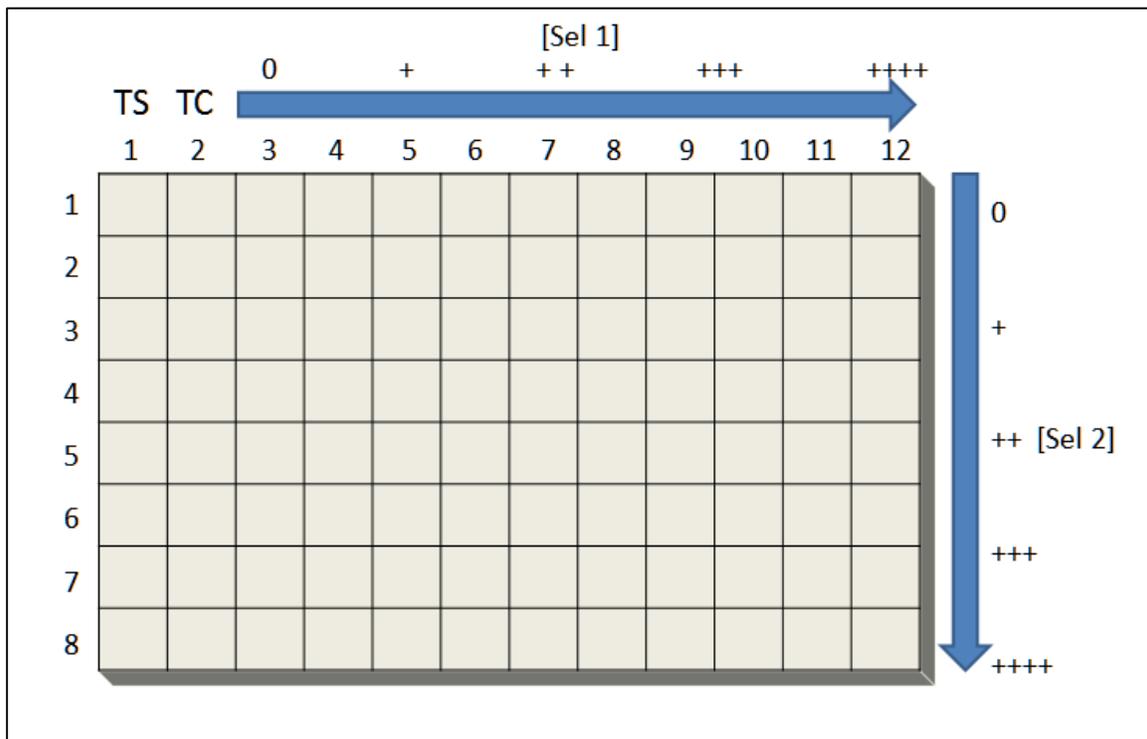


Figure 5. Schéma d'une microplaque. TS : Témoin de stérilité; TC : témoin de croissance; [Sel 1] : concentration du sel 1; [Sel 2] : concentration du sel 2.

Stérilisation et incubation des microplaques

Pour minimiser les risques de contamination, les microplaques ont été exposées à un rayonnement ultraviolet stérilisant durant 30 minutes tout juste avant l'inoculation des puits avec l'inoculum bactérien. Suite à l'inoculation, les microplaques ont été scellées à l'aide d'une double couche d'un film de paraffine (Bemis, Neenah, WI) et incubées 10 jours à 28 °C.

Lecture des microplaques

L'apparition d'une turbidité jaunâtre dans les puits indique une croissance bactérienne. La présence ou l'absence de croissance bactérienne dans les puits permettent ainsi de déterminer les MICs. Un exemple d'interprétation d'une microplaque est présenté à la figure 6. La colonne 3 (figure 6) présente une concentration nulle du sel 1. Ainsi le premier puits sur la colonne 3 où aucune croissance n'est observée correspond à la MIC du sel 2. Pour sa part, la ligne 1 présente une concentration nulle du sel 2. Ainsi le premier puits sur la ligne 1 où aucune croissance n'est observée correspond à la MIC du sel 1. Enfin, la MIC du mélange de sels correspond au puits où aucune croissance n'est observée et dont la concentration totale de sels est la plus faible.

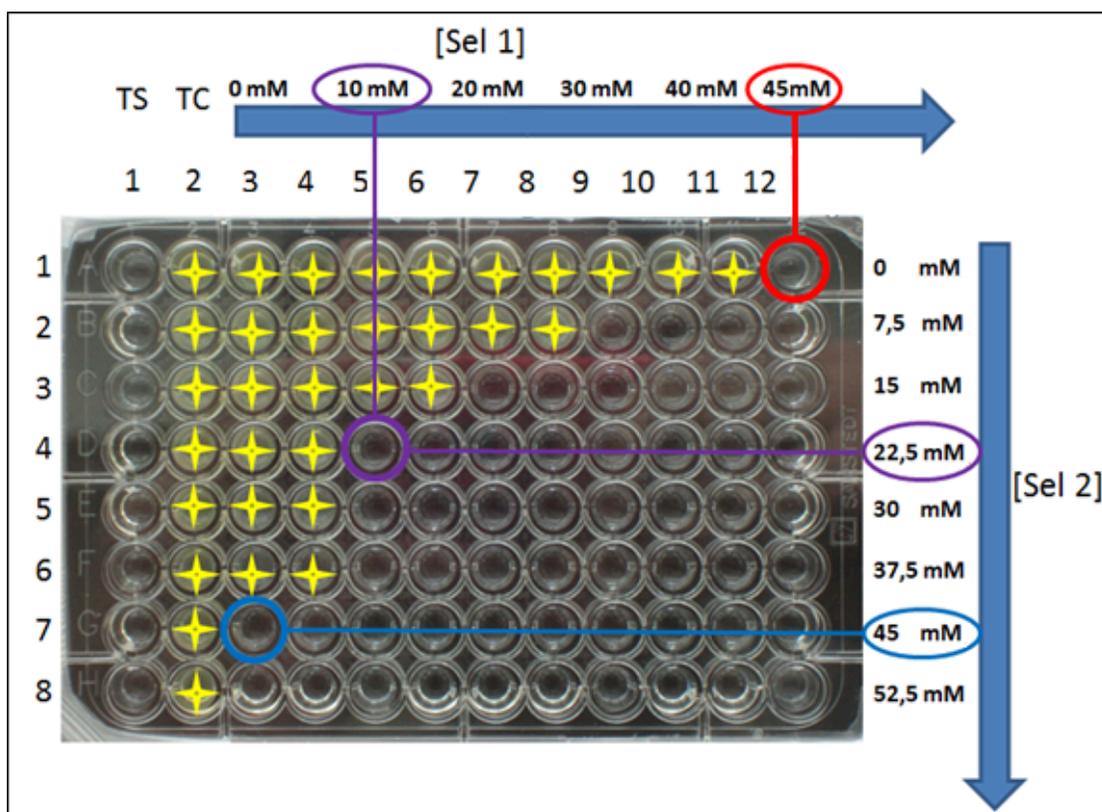


Figure 6. Schéma de lecture et d'interprétation d'une microplaque. TS : Témoin de stérilité; TC : Témoin de croissance. Les étoiles jaunes indiquent la présence d'une turbidité jaunâtre dans les puits et donc d'une croissance bactérienne. La MIC du sel 1 correspond au dernier puits de la ligne 1 (en rouge), avec une valeur de 45 mM. La MIC du sel 2 correspond au 7^e puits de la colonne 3 (en bleu), avec une valeur de 45 mM. La MIC du mélange de sels correspond au 5^e puits de la ligne 4 (en violet) avec une valeur de 32,5 mM, soit 10 mM du sel 1 et 22,5 mM du sel 2.

2.3 Détermination d'une synergie des sels en mélange

L'expression d'une synergie des sels en mélange dans l'inhibition de *P. cichorii* a été évaluée à l'aide des indices de concentrations fractionnées (FIC) de chaque mélange de sels. Les indices FIC ont été calculés selon l'équation suivante :

$$FIC \text{ de la combinaison de sels} = \frac{MIC \text{ du sel 1 testé en mélange}}{MIC \text{ du sel 1 testé seul}} + \frac{MIC \text{ du sel 2 testé en mélange}}{MIC \text{ du sel 2 testé seul}}$$

Les indices FIC ont été interprétés selon l'échelle de Odds (2003), Zuo et coll. (2014) et De Logu et coll. (2002). Les détails de ces différentes échelles sont présentés au tableau 5.

Tableau 5. Interprétations des indices FIC

Odds (2003)	Zuo et coll. (2014)	De Logu et coll. (2002)
Indice FIC ≤ 0,5 (synergie) 0,5 < Indice FIC ≤ 4,0 (aucune interaction) Indice FIC > 4 (antagonisme)	Indice FIC ≤ 0,5 (synergie) 0,5 < Indice FIC ≤ 1 (additivité) 1 < Indice FIC < 2 (aucune interaction) Indice FIC ≥ 2 (antagonisme)	Indice FIC < 1 (synergie) Indice FIC = 1 (aucune interaction) Indice FIC > 1 (antagonisme)

2.4. Essais en serre

2.4.1 Évaluation de la phytotoxicité des sels

Chacun des sels (tableau 3) ou mélanges de sels (tableau 4) a été appliqué à une concentration avoisinant la MIC, sur des laitues cultivées selon les modalités décrites à la section 2.1.3. Les solutions salines additionnées, ou non, de Tween 20 (0,5 ml/L; Amresco, Solon, OH) ont été appliquées sur 4 plants de laitue. Les plants soumis aux traitements témoins ont reçu de l'eau additionnée, ou non, de Tween 20 (0,5 ml/L). L'hydroxyde de cuivre a été solubilisé dans une solution contenant 1 g/L de Bacto Peptone (Difco Laboratories). Trois applications ont été effectuées; la première au stade de croissance de 6-7 feuilles matures, puis 7 et 14 jours plus tard. Les applications ont été réalisées par aspersion jusqu'à égouttement des plants, à l'aide d'un vaporisateur manuel. Tous les traitements ont été réalisés lors d'un même essai.

Sept jours après la dernière application de sels, une évaluation visuelle de la phytotoxicité a été réalisée selon une échelle de 0 à 4 (niveau 0 = aucun symptôme de phytotoxicité, niveau 1 = symptômes de phytotoxicité sur 10 % ou moins de la surface foliaire traitée, niveau 2 = symptômes de phytotoxicité sur 10 à 30 % de la surface foliaire traitée, niveau 3 = symptômes de phytotoxicité sur 30 à 50 % de la surface foliaire traitée, niveau 4 = symptômes de phytotoxicité sur plus de 50 % de la surface foliaire traitée).

2.4.2. Effet des sels sur le développement de la maladie

Solutions salines

Les solutions salines sélectionnées pour ces travaux ont été additionnées de Tween 20 (0,5 ml/L) et appliquées sur des laitues cultivées selon les modalités décrites à la section 2.1.3. Les plants soumis au traitement témoin ont reçu de l'eau additionnée de Tween 20 (0,5 ml/L). L'hydroxyde de cuivre a été solubilisé dans une solution contenant 1 g/L de Bacto Peptone. Trois applications ont été effectuées; la première au stade de croissance de 10-11 feuilles matures, puis 7 et 14 jours plus tard. Les applications ont été réalisées par aspersion jusqu'à égouttement des plants, à l'aide d'un vaporisateur manuel.

Inoculation des plants

L'inoculation des plants a été réalisée 72 heures après la première application de sels, par aspersion de 25 ml d'inoculum bactérien à l'aide d'un vaporisateur manuel. L'inoculum bactérien (5×10^6 ufc/ml) a été préparé comme précédemment décrit (section 2.2.).

Évaluation de la gravité de la maladie

Sept jours après la dernière application de sels, la gravité de la maladie a été évaluée visuellement selon une échelle de 0 à 4 précédemment décrite (section 2.1.3.).

Dispositif expérimental et analyses statistiques

L'expérience décrite à la section 2.4.2. a été réalisée à deux reprises selon un dispositif expérimental en blocs aléatoires complets comprenant 6 ou 12 répétitions. Les analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées avec le logiciel SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC) à l'aide du modèle mixte. Des groupes de moyennes ont été déterminés grâce à la méthode des moindres carrés.

CHAPITRE 3

Résultats

3.1. Isolation des souches virulentes de *P. cichorii* (vérification des postulats de Koch)

La vérification des postulats de Koch sur 10 plants de laitue a permis d'identifier les isolats virulents envers la laitue et de déterminer leur agressivité en termes de gravité et d'incidence des symptômes. La virulence d'un agent pathogène est caractérisée par sa capacité à entraîner le développement d'une maladie, tandis que son agressivité est caractérisée par la gravité des symptômes induits (Vincent et coll., 2000). Les résultats obtenus sont présentés au tableau 6. Parmi les 16 isolats, 4 espèces différentes appartenant au genre *Pseudomonas* ont été identifiées. Les isolats les plus agressifs (B08-183, B12-019 et B12-020) appartenaient à l'espèce *P. cichorii*. Ils ont causé des symptômes sévères de maladie des taches et des nervures noires sur 80 à 90 % des plants sur lesquels ils ont été inoculés. La construction d'un arbre phylogénique a montré que les séquences du gène 16S des isolats B08-183 et B12-019 sont très semblables, laissant présager que ces isolats sont de la même souche. L'arbre phylogénique est présenté en annexe (figure A.1., annexe A). Deux isolats appartenant à l'espèce *P. marginalis* ont causé des symptômes de maladie modérés à sévères sur 70 et 90 % des plants sur lesquels ils ont été inoculés. Cinq isolats appartenant à l'espèce *Pseudomonas putida* ont causé des symptômes de maladie modérés à sévères sur 40 à 89 % des plants sur lesquels ils ont été inoculés. Les isolats appartenant à l'espèce *P. fluorescens* ont été moins agressifs, causant des symptômes modérés de maladie sur 10 à 30 % des plants. L'espèce à laquelle appartiennent les souches B11-054 et B12-266 n'a pu être déterminée avec certitude. L'isolat B12-263 n'a pu être identifié au-delà du genre.

Tableau 6. Détermination de la virulence et de l'agressivité des isolats de *Pseudomonas*

Isolat	Identification	Gravité de la maladie évaluée sur 10 plants de laitue (1-4) ^a										Incidence ^b (%)
B08-183	<i>Pseudomonas cichorii</i>	4	4	3	4	3	4	4	4	4	0	90
B11-054	<i>Pseudomonas putida/fluorescens</i>	3	2	2	3	3	0	2	3	3	2	90
B11-055	<i>Pseudomonas marginalis</i>	2	3	4	2	4	0	2	3	4	2	90
B11-056	<i>P. putida</i>	4	2	0	0	3	0	3	2	0	2	60
B11-057	<i>P. putida</i>	0	3	0	2	2	2	4	2	3	0	70
B11-058	<i>P. putida</i>	2	2	2	3	3	2	4	4	0	*	89
B12-017	<i>P. putida</i>	2	2	0	0	0	0	0	2	2	0	40
B12-019	<i>P. cichorii</i>	4	4	3	4	3	3	0	4	4	0	80
B12-020	<i>P. cichorii</i>	4	4	4	3	3	4	0	4	4	2	90
B12-024	<i>P. fluorescens</i>	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0	30
B12-026	<i>P. fluorescens</i>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	10
B12-027	<i>P. marginalis</i>	0	2	3	0	2	3	0	3	3	4	70
B12-028	<i>P. fluorescens</i>	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	20
B12-263	<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	2	2	2	2	3	50
B12-266	<i>P. putida/fluorescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10
B12-268	<i>P. putida</i>	0	0	0	2	2	4	4	4	0	0	50

^a La gravité de la maladie a été évaluée selon une échelle de 0 à 4 (niveau 0 = absence totale de symptômes, niveau 1 = symptômes couvrant moins de 10 % du feuillage, niveau 2 = symptômes couvrant 10 à 30 % du feuillage, niveau 3 = symptômes couvrant entre 30 et 50 % du feuillage, niveau 4 = symptômes couvrant plus de 50 % du feuillage). ^b Pourcentage de plants de laitue présentant des symptômes de maladie.* Donnée manquante.

3.2. Détermination des MICs

Les MICs de chaque sel et mélange de sels, envers un mélange des deux souches virulentes de *P. cichorii* sont présentées aux figures 7 à 17 et résumées aux tableaux 7 et 8. Les MICs les plus élevées étaient celles du bicarbonate de sodium (120 à 250 mM) (figures 11, 13, 15 & 17), du chlorure de calcium (115 mM) (figures 7 & 9), et des mélanges métabisulfite de sodium + bicarbonate de sodium (252 mM) (figure 17), benzoate de sodium + bicarbonate de sodium (170 mM) (figure 13), bicarbonate de sodium + sorbate de potassium (146,7 mM) (figure 11), carbonate de sodium + sorbate de potassium (120 mM) (figure 12) et carbonate de sodium + bicarbonate de sodium (106,7 mM) (figure 15).

Les MICs les plus faibles ont été obtenues avec le chlorure d'aluminium (4 mM) (figures 7 & 8), le métabisulfite de sodium (4 à 5 mM) (figures 8, 9, 16 & 17) et le mélange de ces sels (4 mM) (figure 8). Aucun des sels testés n'a cependant présenté une MIC aussi faible que celles des sels de cuivre, soit l'hydroxyde de cuivre (0,4 à 0,5 mM) et le sulfate de cuivre (0,6 à 0,7 mM) (tableau 7).

Des MICs intermédiaires ont été obtenues avec le carbonate de sodium (20 à 40 mM) (figures 12, 14, 15 & 16), le benzoate de sodium (40 à 53,3 mM) (figures 10, 13 & 14), le sorbate de potassium (80 mM) (figures 10, 11 & 12) et les mélanges benzoate de sodium + carbonate de sodium (30 mM) (figure 14), métabisulfite de sodium + chlorure de calcium (32 mM) (figure 9), métabisulfite de sodium + carbonate de sodium (41 mM) (figure 16), benzoate de sodium + sorbate de potassium (63,4 mM) (figure 10) et chlorure d'aluminium + chlorure de calcium (73 mM) (figure 7).

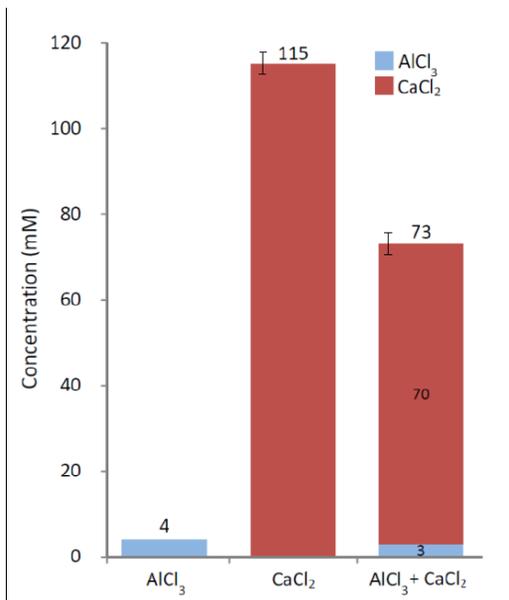


Figure 7. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du AlCl_3 , du CaCl_2 et du mélange de ces sels ($\text{AlCl}_3 + \text{CaCl}_2$). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

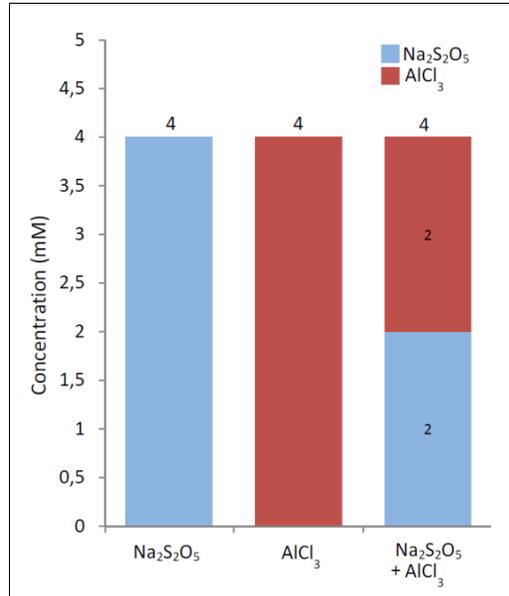


Figure 8. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, du AlCl_3 et du mélange de ces sels ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{AlCl}_3$). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

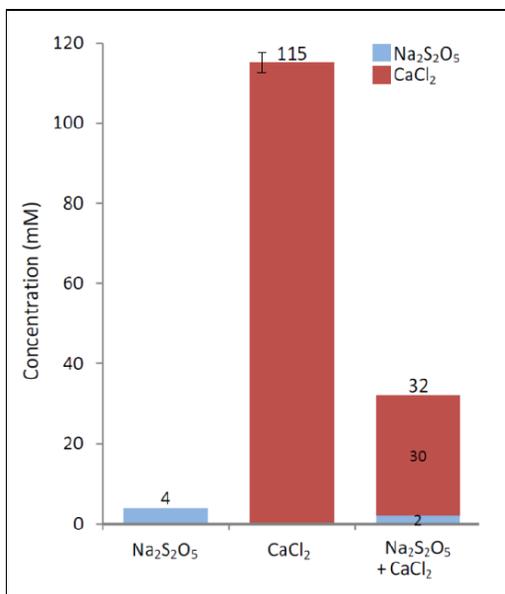


Figure 9. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, du CaCl_2 et du mélange de ces sels ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 + \text{CaCl}_2$). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

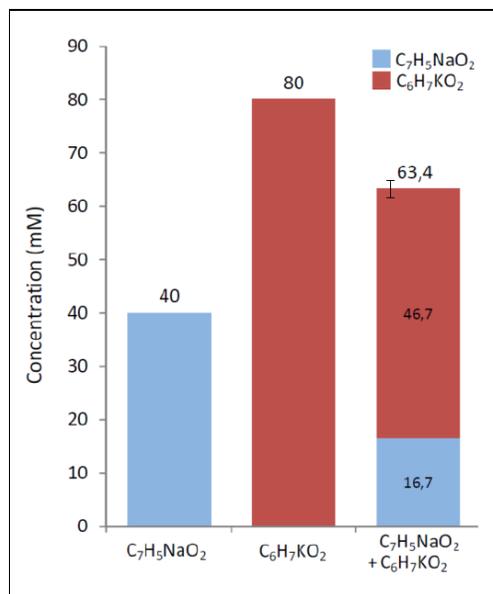


Figure 10. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$, du $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$ et du mélange de ces sels ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2 + \text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

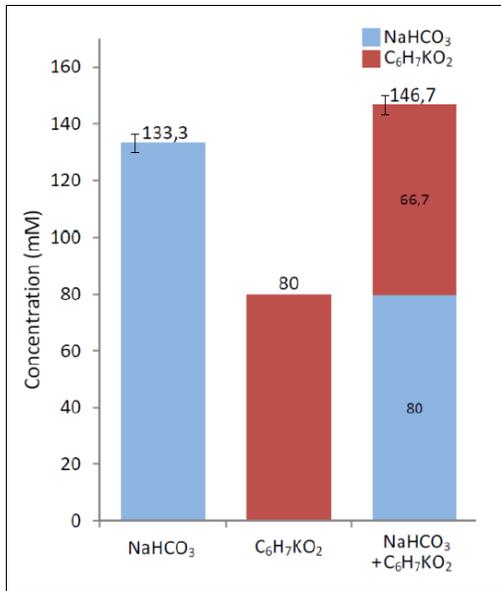


Figure 11. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du NaHCO₃, du C₆H₇KO₂ et du mélange de ces sels (NaHCO₃ + C₆H₇KO₂). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

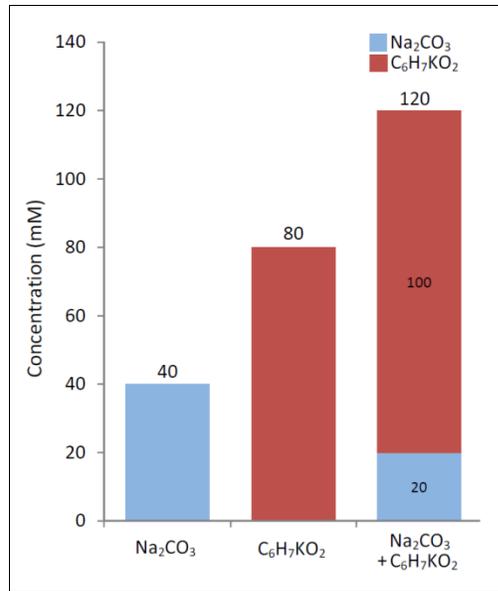


Figure 12. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du Na₂CO₃, du C₆H₇KO₂ et du mélange de ces sels (Na₂CO₃ + C₆H₇KO₂). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

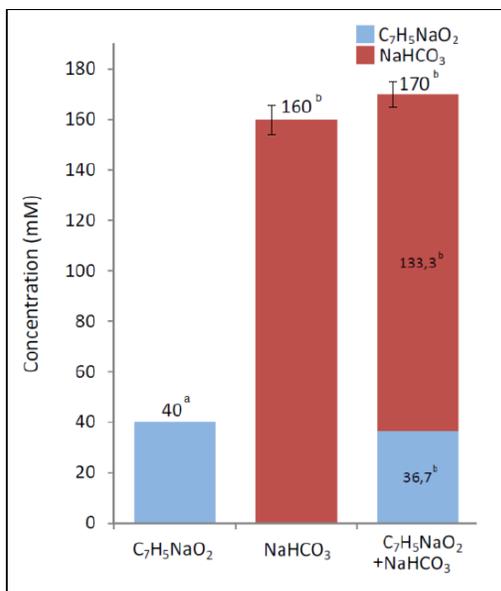


Figure 13. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du C₇H₅NaO₂, du NaHCO₃ et du mélange de ces sels (C₇H₅NaO₂ + NaHCO₃). ^a La valeur représente la moyenne de deux répétitions. ^b Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

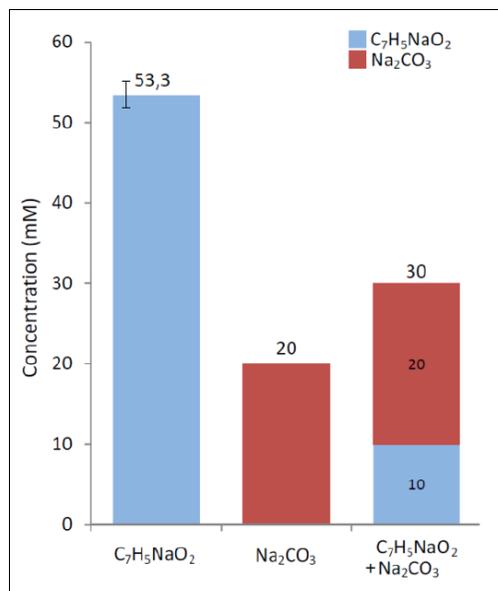


Figure 14. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du C₇H₅NaO₂, du Na₂CO₃ et du mélange de ces sels (C₇H₅NaO₂ + Na₂CO₃). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

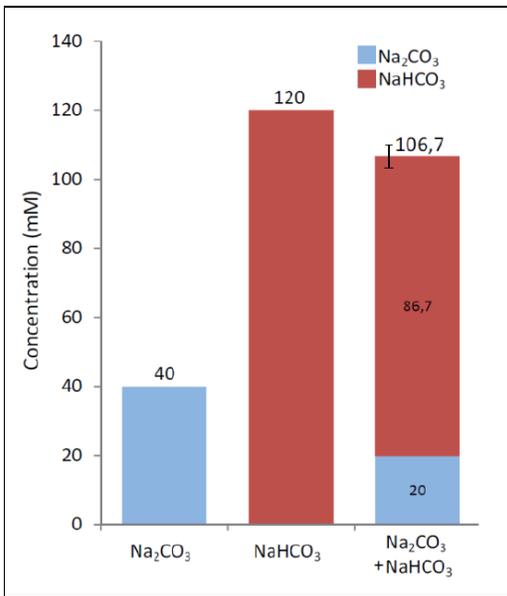


Figure 15. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du Na₂CO₃, du NaHCO₃ et du mélange de ces sels (Na₂CO₃ + NaHCO₃). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

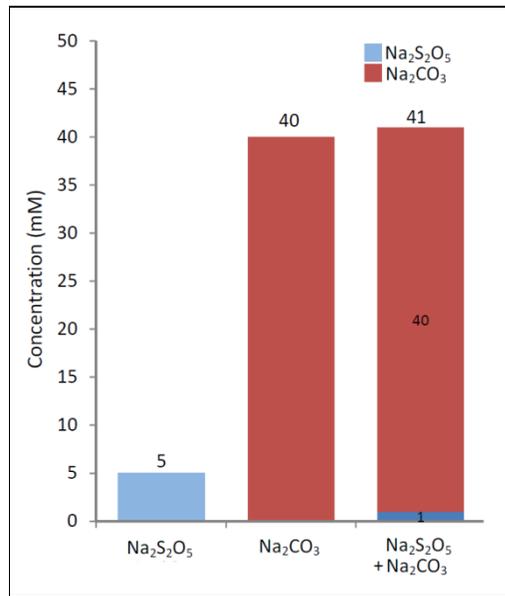


Figure 16. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du Na₂S₂O₅, du Na₂CO₃ et du mélange de ces sels (Na₂S₂O₅ + Na₂CO₃). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

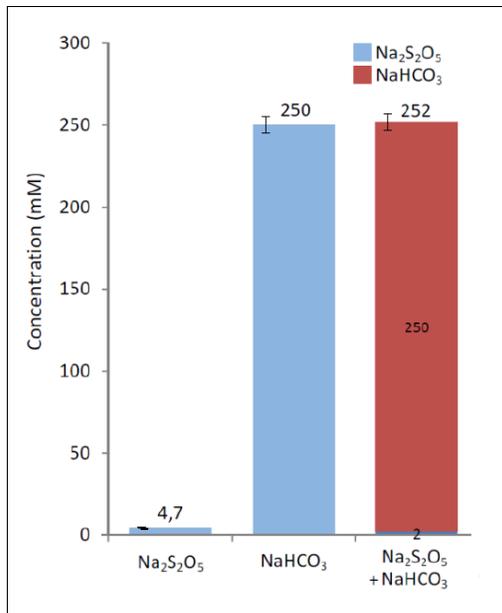


Figure 17. Concentrations minimales inhibitrices (MICs) du Na₂S₂O₅, du NaHCO₃ et du mélange de ces sels (Na₂S₂O₅ + NaHCO₃). Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions.

Tableau 7. Compilation des MICs des sels testés contre *P. cichorii*

Sel		MIC (mM)
Hydroxyde de cuivre	H_2CuO_2	0,48^a (0,4-0,5)^b
Sulfate de cuivre	$CuSO_4$	0,63^a (0,6-0,7)
Chlorure d'aluminium	$AlCl_3$	4^a (4)
Métabisulfite de sodium	$Na_2S_2O_5$	4,4^c (4-5)
Carbonate de sodium	Na_2CO_3	35^c (20-40)
Benzoate de sodium	$C_7H_5NaO_2$	45^d (40-53,3)
Sorbate de potassium	$C_6H_7KO_2$	80^e (80)
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	115^e (115)
Bicarbonate de sodium	$NaHCO_3$	165,8^c (120-250)

^a Chaque valeur représente la moyenne de six répétitions. ^b Les valeurs minimale et maximale obtenues pour chacune des MICs sont présentées entre parenthèses. ^c Chaque valeur représente la moyenne de 12 répétitions. ^d Chaque valeur représente la moyenne de huit répétitions. ^e Chaque valeur représente la moyenne de neuf répétitions.

Tableau 8. Compilation des MICs des mélanges de sels testés contre *P. cichorii*

Mélange de sels	MIC (mM)
Métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) + chlorure d'aluminium (AlCl_3)	4 ^a (4) ^b
Benzoate de sodium ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$) + carbonate de sodium (Na_2CO_3)	30 (30)
Métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) + chlorure de calcium (CaCl_2)	32 (32)
Métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) + carbonate de sodium (Na_2CO_3)	41 (41)
Benzoate de sodium ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$) + sorbate de potassium ($\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$)	63,4 (60-70)
Chlorure d'aluminium (AlCl_3) + chlorure de calcium (CaCl_2)	73 (63-78)
Carbonate de sodium (Na_2CO_3) + bicarbonate de sodium (NaHCO_3)	106,7 (100-120)
Carbonate de sodium (Na_2CO_3) + sorbate de potassium ($\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$)	120 (120)
Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) + sorbate de potassium ($\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$)	146,7 (140-160)
Benzoate de sodium ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$) + bicarbonate de sodium (NaHCO_3)	170 (150-180)
Métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) + bicarbonate de sodium (NaHCO_3)	252 (241-272)

^a Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions. ^b Les valeurs minimale et maximale obtenues pour chacune des MICs sont présentées entre parenthèses.

3.3. Détermination d'une synergie des sels en mélange

Les indices FIC des mélanges de sels et leur interprétation selon des échelles plus ou moins conservatrices sont présentés au tableau 9. Selon l'échelle de Odds (2003), aucune interaction des sels en mélange n'a été observée. Selon l'échelle de Zuo et coll. (2014), le benzoate de sodium et le sorbate de potassium ont eu un effet

d'additivité, de même que le métabisulfite de sodium et le chlorure de calcium. Selon l'échelle de De Logu et coll. (2002), un effet d'antagonisme a été observé entre les sels en mélange, à l'exception du mélange métabisulfite de sodium + chlorure de calcium (synergie) et du mélange benzoate de sodium + sorbate de potassium (aucune interaction).

Tableau 9. Indices de concentration inhibitrice fractionnée (FIC) des mélanges de sels

Mélange de sels	Indice FIC	Interaction ^a	Interaction ^b	Interaction ^c
AlCl ₃ + CaCl ₂	1,36	Aucune	Aucune	Antagonisme
Na ₂ S ₂ O ₅ + AlCl ₃	1,17	Aucune	Aucune	Antagonisme
Na ₂ S ₂ O ₅ + CaCl ₂	0,76	Aucune	Additivité	Synergie
C ₇ H ₅ NaO ₂ + C ₆ H ₇ KO ₂	1,00	Aucune	Additivité	Aucune
NaHCO ₃ + C ₆ H ₇ KO ₂	1,43	Aucune	Aucune	Antagonisme
Na ₂ CO ₃ + C ₆ H ₇ KO ₂	1,75	Aucune	Aucune	Antagonisme
C ₇ H ₅ NaO ₂ + NaHCO ₃	1,75	Aucune	Aucune	Antagonisme
C ₇ H ₅ NaO ₂ + Na ₂ CO ₃	1,19	Aucune	Aucune	Antagonisme
Na ₂ CO ₃ + NaHCO ₃	1,22	Aucune	Aucune	Antagonisme
Na ₂ S ₂ O ₅ + NaHCO ₃	1,43	Aucune	Aucune	Antagonisme
Na ₂ S ₂ O ₅ + Na ₂ CO ₃	1,20	Aucune	Aucune	Antagonisme

^a Interprétation des indices FIC selon Odds (2003). ^b Interprétation des indices FIC selon Zuo et coll. (2014).

^c Interprétation des indices FIC selon De Logu et coll. (2002).

3.4. Essais en serre

3.4.1 Évaluation de la phytotoxicité des sels

La phytotoxicité des sels et des mélanges de sels déterminée sur des plants de laitue cultivés en serre est présentée aux tableaux 10 et 11. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une grande variabilité de la phytotoxicité en fonction des sels et des mélanges de sels. Les sels les plus phytotoxiques étaient le benzoate de sodium, le chlorure d'aluminium, le chlorure de calcium, le sorbate de potassium et le bicarbonate de sodium. Les moins phytotoxiques étaient le carbonate de sodium, le sulfate de cuivre, l'hydroxyde de cuivre et le métabisulfite de sodium; l'hydroxyde de cuivre et le métabisulfite de sodium n'étant pas du tout phytotoxiques aux concentrations testées (tableau 10). Les mélanges les plus phytotoxiques étaient les mélanges chlorure

d'aluminium + chlorure de calcium, benzoate de sodium + sorbate de potassium, benzoate de sodium + carbonate de sodium, benzoate de sodium + bicarbonate de sodium et carbonate de sodium + sorbate de potassium (tableau 11). À l'exception du benzoate de sodium, du sorbate de potassium et des mélanges bicarbonate de sodium + sorbate de potassium et chlorure d'aluminium + chlorure de calcium, l'addition de Tween 20 a diminué la phytotoxicité des sels.

Tableau 10. Phytotoxicité des sels

Sel	Phytotoxicité (0-4) ^a	
	Sans Tween 20	Avec Tween 20
Benzoate de sodium ^b	2,75 ^c (2-3) ^d	3 (3)
Chlorure d'aluminium	4 (4)	1,25 (1-2)
Chlorure de calcium	3,25 (3-4)	2 (2)
Sorbate de potassium	2,25 (2-3)	2,5 (2-3)
Bicarbonate de sodium	2,75 (2-3)	1 (1)
Carbonate de sodium	1 (1)	0,25 (0-1)
Sulfate de cuivre	1 (1)	0,25 (0-1)
Hydroxyde de cuivre	0	0
Métabisulfite de sodium	0	0
Témoin	0	0

^a La phytotoxicité a été évaluée selon une échelle de 0 à 4. ^b Les sels ont été appliqués à la concentration correspondant à la concentration minimale inhibitrice (MIC). ^c Chaque valeur représente la moyenne de 4 répétitions. ^d Les valeurs minimale et maximale sont présentées entre parenthèses. Les solutions salines ont été testées aux concentrations suivantes : C₇H₅NaO₂ [50 mM]; AlCl₃ [4 mM]; CaCl₂ [120 mM]; C₆H₇KO₂ [80 mM]; NaHCO₃ [160 mM]; Na₂CO₃ [40 mM]; CuSO₄ [0,6 mM]; H₂CuO₂ [0,5 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM].

Tableau 11. Phytotoxicité des mélanges de sels

Mélange de sels	Phytotoxicité (0-4) ^a	
	Sans Tween 20	Avec Tween 20
Chlorure d'aluminium + chlorure de calcium ^b	4 ^c (4) ^d	4 (4)
Benzoate de sodium + sorbate de potassium	3,5 (3-4)	2,5 (2-3)
Carbonate de sodium + sorbate de potassium	2,5 (2-3)	2 (2)
Benzoate de sodium + bicarbonate de sodium	2,75 (2-3)	1,5 (1-2)
Benzoate de sodium + carbonate de sodium	2,25 (1-3)	2 (1-3)
Carbonate de sodium + bicarbonate de sodium	2 (1-3)	1 (1)
Bicarbonate de sodium + sorbate de potassium	1 (1)	1,75 (1-2)
Métabisulfite de sodium + bicarbonate de sodium	1,75 (1-2)	0,5 (0-2)
Métabisulfite de sodium + carbonate de sodium	1 (1)	0
Métabisulfite de sodium + chlorure d'aluminium	0,75 (0-1)	0
Métabisulfite de sodium + chlorure de calcium	0	0
Témoin	0	0

^a La phytotoxicité a été évaluée selon une échelle de 0 à 4. ^b Les mélanges de sels ont été appliqués à la concentration correspondant à la concentration minimale inhibitrice (MIC). ^c Chaque valeur représente la moyenne de 4 répétitions. ^d Les valeurs minimale et maximale sont présentées entre parenthèses. Les solutions salines ont été testées aux concentrations suivantes : AlCl₃ [4 mM] + CaCl₂ [50 mM]; C₇H₅NaO₂ [20 mM] + C₆H₇KO₂ [40 mM]; Na₂CO₃ [20 mM] + C₆H₇KO₂ [100 mM]; C₇H₅NaO₂ [40 mM] + NaHCO₃ [120 mM]; C₇H₅NaO₂ [50 mM] + Na₂CO₃ [20 mM]; Na₂CO₃ [20 mM] + NaHCO₃ [80 mM]; NaHCO₃ [80 mM] + C₆H₇KO₂ [60 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM] + NaHCO₃ [120 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM] + Na₂CO₃ [40 mM]; Na₂S₂O₅ [2 mM] + AlCl₃ [2 mM]; Na₂S₂O₅ [2 mM] + CaCl₂ [10 mM].

3.4.2 Effets des sels sur le développement de la maladie

Les résultats d'un premier essai en serre (figure 18) n'ont montré aucun effet significatif des sels sur le développement de la maladie. Cependant, lors d'un deuxième essai (figure 19), une réduction significative de la maladie a été obtenue suite à l'application du bicarbonate de sodium (160 mM), du chlorure d'aluminium (4 mM), du Kocide (ajusté à 0,5 mM d'hydroxyde de cuivre), du sulfate de cuivre (0,6 mM), de l'hydroxyde de cuivre (0,5 mM) et des mélanges métabisulfite de sodium + chlorure de calcium (12 mM), métabisulfite de sodium + chlorure d'aluminium (4mM) et métabisulfite de sodium + bicarbonate de sodium (125 mM). Bien que la réduction la plus importante de la maladie a été obtenue avec l'hydroxyde de cuivre (0,5 mM), elle n'était pas significativement différente de celles obtenues avec le sulfate de cuivre et les mélanges

métabisulfite de sodium + chlorure de calcium, métabisulfite de sodium + chlorure d'aluminium et métabisulfite de sodium + bicarbonate de sodium.

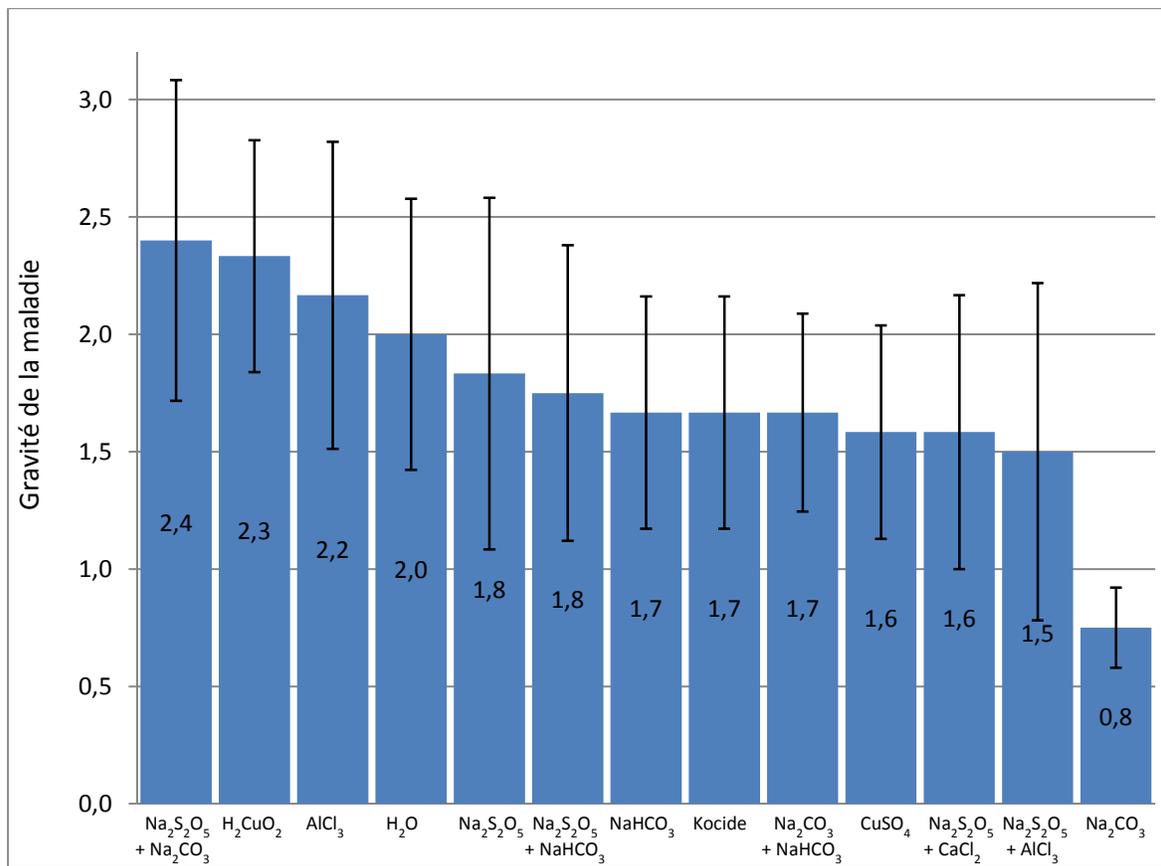


Figure 16. Effet des sels sur le développement de la maladie en serre (Essai 1). La gravité de la maladie a été évaluée selon une échelle de 0 à 4. Le Kocide est un fongicide et bactéricide à base d'hydroxyde de cuivre. Chaque valeur représente la moyenne de six répétitions. Les moyennes ne sont pas significativement différentes ($p < 0,1$). Les solutions salines ont été testées aux concentrations suivantes : H₂CuO₂ [0,5 mM]; CuSO₄ [0,6 mM]; AlCl₃ [4 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM]; NaHCO₃ [160 mM]; Na₂CO₃ [40 mM]; Na₂S₂O₅ [2 mM] + AlCl₃ [2 mM]; Na₂S₂O₅ [2 mM] + CaCl₂ [10 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM] + Na₂CO₃ [40 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM] + NaHCO₃ [120 mM]; Na₂CO₃ [20 mM] + NaHCO₃ [80 mM]; Kocide (Ajusté à 0,5 mM de H₂CuO₂).

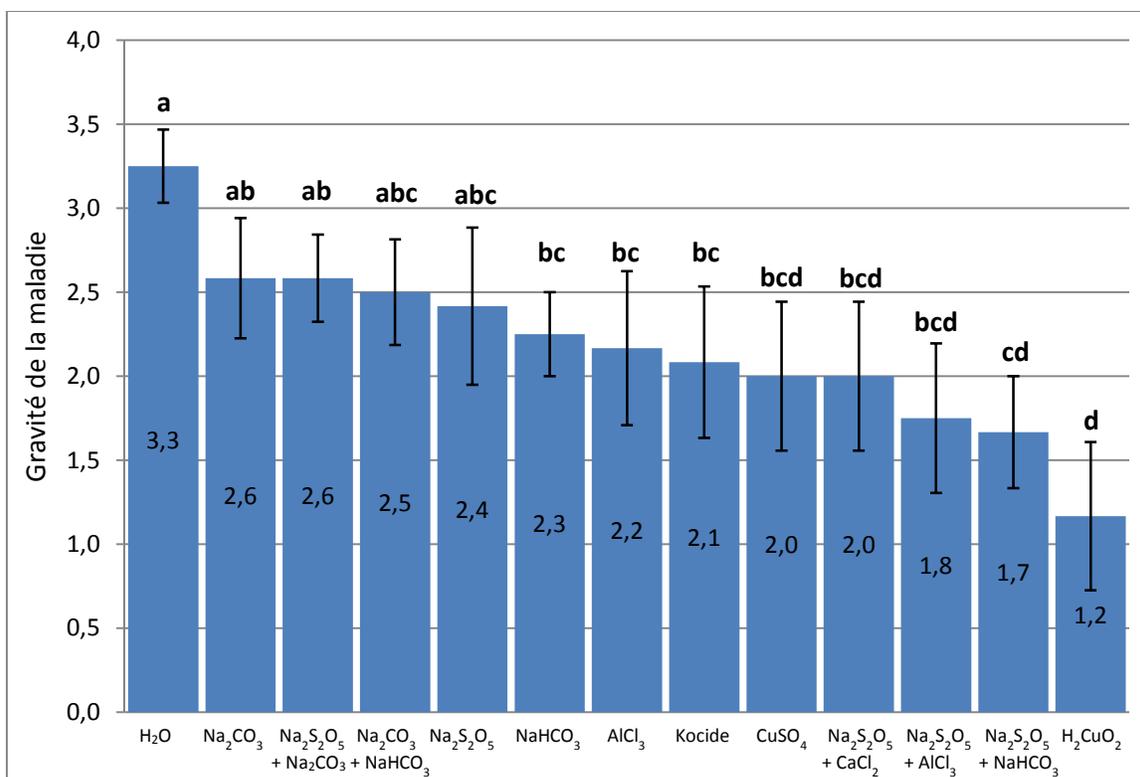


Figure 17. Effet des sels sur le développement de la maladie en serre (Essai 2). La gravité de la maladie a été évaluée selon une échelle de 0 à 4. Le Kocide est un fongicide et bactéricide à base d'hydroxyde de cuivre. Chaque valeur représente la moyenne de 12 répétitions. Les moyennes surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0,1$). Les solutions salines ont été testées aux concentrations suivantes : H₂CuO₂ [0,5 mM]; CuSO₄ [0,6 mM]; AlCl₃ [4 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM]; NaHCO₃ [160 mM]; Na₂CO₃ [40 mM]; Na₂S₂O₅ [2 mM] + AlCl₃ [2 mM]; Na₂S₂O₅ [2 mM] + CaCl₂ [10 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM] + Na₂CO₃ [40 mM]; Na₂S₂O₅ [5 mM] + NaHCO₃ [120 mM]; Na₂CO₃ [20 mM] + NaHCO₃ [80 mM]; Kocide (Ajusté à 0,5 mM de H₂CuO₂).

CHAPITRE 4

Discussion

Les sept sels évalués lors de l'étude ont été sélectionnés en raison de leur efficacité à inhiber la croissance des bactéries *P. carotovorum* et *P. atrosepticum*, responsables de la pourriture molle de la pomme de terre (Yaganza et coll., 2009). Ces bactéries étant à Gram négatif, comme *P. cichorii*, il a été considéré que les mécanismes d'inhibition exercés envers elles pourraient également être efficaces envers *P. cichorii*. Les feuilles de laitue étant plus sensibles à la phytotoxicité des sels que les tubercules de pomme de terre, un des objectifs de l'étude était d'utiliser la plus faible quantité possible de sels pour contrôler la maladie. Dans cette optique, des mélanges de sels ont été évalués dans la perspective d'obtenir une synergie de l'activité antibactérienne, et ainsi de diminuer la quantité totale de sels nécessaire et, conséquemment, les risques de phytotoxicité. On rapporte de nombreux exemples de synergie antimicrobienne entre des agents de conservation (Denyer et coll., 1985) ou des composés phytosanitaires (Gisi, 1996). Cependant, à notre connaissance il s'agit de la première étude évaluant les propriétés phytoprotectrices de combinaisons de sels.

Les sept sels et les onze mélanges de sels à l'étude se sont avérés efficaces pour inhiber la bactérie in vitro. Six sels ont inhibé *P. cichorii* à des MICs comparables à celles obtenues envers *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* (Yaganza et coll., 2009). La MIC du bicarbonate de sodium était cependant beaucoup plus élevée envers *P. cichorii* (165,8 mM en moyenne) qu'envers *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* (20 mM). Il est à noter que, pour une raison indéterminée, lors de la réalisation des microplaques dédiées à l'évaluation du mélange bicarbonate de sodium + métabisulfite de sodium, la MIC obtenue pour le bicarbonate de sodium était systématiquement beaucoup plus élevée (250 mM en moyenne) (figure 17), comparativement à celles obtenues lors de la réalisation des microplaques dédiées aux autres mélanges contenant du bicarbonate de sodium (137,8 mM en moyenne) (figures 11, 13 & 15). Étant donné que la concentration bactérienne reposait uniquement sur la valeur de l'OD600, il est possible qu'elle ait varié entre les différents essais, expliquant la variation importante de la MIC du bicarbonate de sodium et celle, moins importante, du carbonate de sodium. Cependant, il faut noter que, face au résultat très inattendu obtenu avec le bicarbonate de sodium, la réalisation

des microplaques dédiées à l'évaluation du mélange bicarbonate de sodium + métabisulfite de sodium a été reprise de nombreuses fois, avec des résultats toujours similaires. Il ne semble donc pas que cette MIC beaucoup plus élevée soit attribuable à une erreur expérimentale comme une variation importante de la concentration de l'inoculum ou la présence d'une contamination. Une hypothèse qui n'a pas été investiguée est celle de l'influence des échanges gazeux ayant eu lieu à l'intérieur de la microplaque scellée.

L'interaction des sels en mélange a été estimée selon différentes échelles d'interprétation, plus ou moins conservatrices, des indices FIC. L'échelle de Odds (2003) est la plus conservatrice, celle de De Logu et coll. (2002) est la moins conservatrice tandis que le l'échelle de Zuo et coll. (2014) occupe une position intermédiaire. La présence d'une synergie correspond à un indice FIC $\leq 0,5$ pour les échelles de Odds (2003) et de Zuo et coll. (2014), et à un indice FIC < 1 pour l'échelle de De Logu et coll. (2002). Il a été considéré que la détermination d'une synergie ne pouvait s'appuyer sur la seule échelle de De Logu et coll. (2014), bien que cette échelle puisse indiquer une tendance. Les détails des différentes échelles d'interprétation sont présentés au tableau 5.

Lors de la combinaison de deux composés antimicrobiens, on peut s'attendre à l'expression d'une synergie ou d'un antagonisme lorsque ces composés ont des modes d'action différents ou lorsqu'ils ciblent différents sites d'action au niveau de la cellule microbienne. Si ce n'est pas le cas, on s'attend à observer tout au plus une additivité des effets (Denyer et coll., 1985). Les différents sels testés présentaient des modes et des sites d'action différents, bien qu'aucune expression claire d'une synergie ou d'un antagonisme n'a été observée (tableau 9).

Une tendance à la synergie n'a été observée que pour le mélange métabisulfite de sodium + chlorure de calcium, avec un indice FIC de 0,76 (tableau 9). Le métabisulfite de sodium entraîne la perméabilisation de la membrane cytoplasmique des bactéries (Branen et coll., 2001) et dénature de nombreux composés vitaux de la cellule, notamment dans le cytoplasme (Russell & Gould, 1991). Pour leur part, les ions calcium inhibent certaines enzymes digestives (Schober & Vermeulen, 1999), et donc l'utilisation par la bactérie des ressources énergétiques du milieu. On peut alors penser que la privation énergétique provoquée par le chlorure de calcium renforce l'activité toxique du

métabisulfite de sodium en diminuant la capacité de *P. cichorii* à puiser dans son milieu l'énergie nécessaire au rétablissement de son bon fonctionnement.

Des essais préliminaires ont permis de déterminer que l'intervalle de pH toléré par les souches B12-019 et B12-020 de *P. cichorii* est compris entre 4 et 12 (données non présentées). À l'exception du mélange métabisulfite de sodium + chlorure d'aluminium (pH = 3,78), le pH de chaque solution saline se situait dans cet intervalle, indiquant qu'à l'exception de ce mélange, l'inhibition bactérienne ne pouvait être attribuée au seul effet du pH du milieu. Les pH des solutions salines aux concentrations des MICs sont présentés en annexe (tableau A.1., annexe A). On ne peut néanmoins exclure un possible effet du pH, car des conditions de pH proches des limites de l'intervalle toléré par la bactérie pourraient contribuer à l'inhibition de la croissance bactérienne.

Pour la plupart des sels et mélanges de sels, la phytotoxicité et l'effet sur le développement de la maladie ont été évalués pour une application avoisinant la MIC. Pour certains sels et mélanges de sels, les concentrations testées différaient des MICs. Ces ajustements ont été apportés suite à des expériences préliminaires (résultats non présentés). Les concentrations des solutions salines testées pour la phytotoxicité en serre sont présentées aux tableaux 10 et 11. Lors des essais préliminaires aux essais en serre, il a été observé que l'hydroxyde de cuivre ne se solubilisait pas dans l'eau tandis que, lors de la détermination des MICs, il était soluble dans une solution contenant 40 % du milieu de culture décrit à la section 2.1.2. Suite à cette observation, l'hydroxyde de cuivre a systématiquement été solubilisé avec des peptones lors de la réalisation des essais en serre. Une étude de Kober et Sugiura (1912) fait mention de la formation de colloïdes entre le cuivre et les peptones.

Lors de l'essai destiné à évaluer la phytotoxicité, les solutions salines ont été appliquées sur la surface foliaire, mais ont aussi pénétré le substrat de culture en raison de l'égouttement des feuilles. Une phytotoxicité attribuable à une absorption racinaire des sels ne peut donc être exclue. Néanmoins, les symptômes de phytotoxicité observés correspondaient à des taches foliaires bien délimitées et donc fort probablement attribuables au contact direct des solutions salines avec les feuilles.

Les résultats obtenus sont marqués par une grande variabilité de la phytotoxicité selon les sels et les mélanges de sels (tableaux 10 & 11). Les solutions de chlorure

d'aluminium, seul ou en mélange avec le chlorure de calcium, étaient les plus phytotoxiques. Les solutions salines contenant un sel d'acide organique (sorbate de potassium ou benzoate de sodium) figuraient également parmi les plus phytotoxiques.

Toutes les solutions salines contenant du métabisulfite de sodium figuraient parmi les moins phytotoxiques, même lorsqu'il était combiné à des sels particulièrement phytotoxiques lorsqu'appliqués seuls, comme le chlorure d'aluminium et le chlorure de calcium (tableau 10). Ces résultats suggèrent une activité protectrice du métabisulfite de sodium contre la phytotoxicité de ces sels. On peut attribuer l'absence de phytotoxicité du métabisulfite de sodium aux faibles concentrations testées, même si ces concentrations étaient comparables à celles du chlorure d'aluminium, beaucoup plus toxique.

De façon surprenante, les sels de cuivre se sont avérés non phytotoxiques, probablement du fait qu'ils ont été appliqués à de très faibles concentrations. En effet, on rapporte une phytotoxicité du cuivre pour la laitue à partir d'une concentration de 1 g/L de cuivre métallique (Schroth et coll., 1964), soit environ 15 mM d'hydroxyde de cuivre ou 16 mM de sulfate de cuivre, concentrations largement supérieures à celles testées (respectivement 0,5 mM et 0,6 mM) dans la présente étude. De plus, un rapport émis par Horticulture Australia Ltd. (Watson, 2005) mentionne que la sensibilité de la laitue à la phytotoxicité du cuivre n'a pas été systématiquement observée par des producteurs ayant utilisé des produits cuivrés, et suggère que c'est probablement en raison de la forme de cuivre utilisée, ainsi que de la fréquence et du moment de l'application.

L'ajout de Tween 20 a permis de diminuer la phytotoxicité de la plupart des sels et des mélanges de sels. Étonnamment, le Tween 20 a permis de diminuer la phytotoxicité du chlorure de calcium et du chlorure d'aluminium (tableau 10), mais pas celle du mélange de ces deux sels (tableau 11), suggérant une phytotoxicité renforcée de ces sels en mélange. Enfin les seuls sels dont la phytotoxicité n'a pas été réduite par l'ajout de Tween 20 étaient les sels d'acides organiques : le benzoate de sodium et le sorbate de potassium (tableau 10). De la même façon, le Tween 20 n'a que marginalement réduit la phytotoxicité de toutes les solutions salines contenant un sel d'acide organique (tableau 11). En raison de leur forte phytotoxicité, avec ou sans Tween 20, le sorbate de

potassium et le benzoate de sodium ne semblent pas être adaptés à une application foliaire sur la laitue.

Le Tween 20, en lui-même, est considéré comme non phytotoxique (Croda International plc, 2015). Il a permis un étalement uniforme des solutions salines sur les feuilles. En son absence, elles formaient des gouttelettes clairsemées sur la surface foliaire. Le volume de solution saline par unité de surface était ainsi plus important au niveau de ces gouttelettes et les concentrations des résidus de sels, après évaporation de l'eau, y étaient donc supérieures. De plus, le volume de solution saline par unité de surface étant plus élevé à ces emplacements, le temps d'évaporation était plus long et le temps de contact entre le tissu foliaire et les formes ioniques des sels en solution y était donc supérieur. Or, on sait que les formes ioniques des sels peuvent interagir avec le tissu végétal (Yaganza et coll., 2014). Une plus grande durée de contact entre les formes ioniques des sels, ainsi qu'une plus grande concentration de résidus de sels peuvent expliquer le développement des symptômes de phytotoxicité localisés aux emplacements occupés par les gouttelettes de solutions salines.

De plus, la surface foliaire des laitues AC Estival n'est pas plane, mais présente de nombreuses dépressions, et les symptômes de phytotoxicité étaient souvent observés dans ces dépressions. En effet, les solutions salines y ont été retenues lors de l'application, empêchant leur égouttement. Comme dans le cas des gouttelettes, un temps de contact prolongé entre les formes ioniques des sels et le tissu foliaire ainsi que la plus grande concentration des résidus de sels après évaporation de l'eau peuvent expliquer cette apparition localisée de signes de phytotoxicité.

Ainsi, le Tween 20, en favorisant l'étalement des solutions salines, a eu pour effet de diminuer le temps de contact entre les formes ioniques des sels et le tissu végétal, de même que les élévations localisées de concentration de sel associées à la formation de gouttelettes, diminuant en conséquence le développement de symptômes de phytotoxicité.

Au vu de ces résultats, la décision a été prise d'ajouter systématiquement du Tween 20 aux solutions salines lors des essais dédiés à l'évaluation du contrôle de la maladie en serre. De plus, certains sels dont la phytotoxicité a été considérée inacceptable (phytotoxicité $\geq 1,5$ en présence de Tween 20) ont été éliminés. Ainsi, seuls les sels et

mélanges de sels suivants ont été testés pour leur effet sur le développement de la maladie en serre : hydroxyde de cuivre, sulfate de cuivre, chlorure d'aluminium, métabisulfite de sodium, carbonate de sodium, chlorure de calcium, bicarbonate de sodium, métabisulfite de sodium + chlorure d'aluminium, métabisulfite de sodium + chlorure de calcium, métabisulfite de sodium + carbonate de sodium, métabisulfite de sodium + bicarbonate de sodium, carbonate de sodium + bicarbonate de sodium. Un produit phytosanitaire, le Kocide® 2000 (concentration ajustée à 0,5 mM d'hydroxyde de cuivre) a également été testé.

Les résultats obtenus ont été variables. Lors du premier essai (figure 18), malgré certaines différences importantes entre les moyennes de gravité de la maladie, aucune différence significative n'a été observée. Ceci est attribuable au fait qu'il y avait beaucoup de variabilité intra-traitement (résultats non présentés), probablement en raison d'une application non uniforme des solutions salines. Lors du second essai (figure 19), une réduction significative de la gravité de la maladie a été observée pour certains traitements. Les mélanges métabisulfite de sodium + chlorure de calcium, métabisulfite de sodium + chlorure d'aluminium et métabisulfite de sodium + bicarbonate de sodium ont permis les réductions les plus importantes de la maladie. Ces réductions n'étaient pas significativement différentes de celle obtenue avec l'application d'hydroxyde de cuivre qui a permis la réduction la plus importante de la maladie. Le bicarbonate de sodium et le chlorure d'aluminium ont également permis une réduction significative de la maladie, comparable à celles obtenues avec l'application de Kocide 2000 et de sulfate de cuivre. Il est à noter que ces réductions de la maladie n'étaient significatives qu'au seuil critique de $p=0.1$. Enfin, bien que certains traitements aient réduit significativement la gravité de la maladie, il est important de garder à l'esprit que celle-ci demeurait à un niveau trop élevé pour envisager la commercialisation des laitues.

Il est intéressant de noter que les solutions salines les plus efficaces étaient des mélanges de sels contenant du métabisulfite de sodium, alors qu'appliqué seul ce dernier n'a pas significativement réduit la gravité de la maladie. Les autres sels de ces mélanges (chlorure d'aluminium et bicarbonate de sodium) ont significativement réduit la gravité de la maladie lorsqu'ils étaient appliqués seuls. Le mélange métabisulfite de sodium + carbonate de sodium n'a entraîné aucune réduction significative de la maladie,

et le carbonate de sodium était inefficace lorsqu'appliqué seul. Le métabisulfite semble ainsi augmenter l'efficacité des sels présentant déjà une certaine efficacité.

Les résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de la détermination des MICs, où l'ajout de métabisulfite de sodium a permis de réduire la MIC du chlorure de calcium (figure 9) et celle du chlorure d'aluminium (figure 8), mais pas celle du carbonate de sodium (figure 16). Néanmoins, malgré l'observation d'une amélioration par le métabisulfite de sodium de l'efficacité du bicarbonate de sodium à contrôler la gravité de la maladie, ce sel n'a pas permis de diminuer la MIC du bicarbonate de sodium *in vitro* (figure 17). Toutefois, comme discuté précédemment, un phénomène indéterminé a été rencontré lors de la réalisation de la microplaque dédiée au mélange métabisulfite de sodium + bicarbonate de sodium et rend délicate l'interprétation d'une interaction ou d'une absence d'interaction entre ces deux sels dans l'inhibition *in vitro* de *P. cichorii*.

Le carbonate de sodium et le métabisulfite de sodium se sont montrés inefficaces *in vivo* alors qu'ils inhibaient fortement la croissance bactérienne (faible MIC) *in vitro*. La littérature rapporte la diminution de l'activité inhibitrice de nombreux sels *in vivo*, malgré leur efficacité *in vitro* (Olivier et coll., 1999; Mecteau et coll., 2002; Yaganza et coll., 2014). Yaganza et coll. (2014) ont expliqué que l'interaction d'un sel avec le tissu végétal peut influencer sa capacité inhibitrice. En effet, le pH des solutions salines peut être tamponné par le contact avec les tissus végétaux. Or, en solution, les sels forment différentes espèces ioniques en fonction du pH du milieu et ces différentes espèces ioniques sont plus ou moins inhibitrices envers les bactéries. Dans l'étude de Yaganza et coll. (2014), le pouvoir tampon du tissu végétal a abaissé le pH de la solution de carbonate de sodium de 11,1 *in vitro* à 8,4 *in vivo*. À ce pH, l'espèce ionique la plus abondante du carbonate de sodium est l'ion HCO_3^- , beaucoup moins toxique envers les bactéries *P. carotovorum* et *P. atrosepticum* que l'ion CO_3^{2-} , plus abondant au pH de 11,1. Cela peut expliquer l'inefficacité observée du carbonate de sodium *in vivo*. De plus, en raison de leur capacité à créer des liens avec la paroi des cellules végétales, certaines formes ioniques des sels vont renforcer la capacité de la paroi cellulaire à résister à une attaque par un agent pathogène (Yaganza et coll., 2014). C'est le cas de l'ion Ca^{2+} qui se lie aux pectines des parois cellulaires végétales (Conway, 1988), mais également des ions aluminium Al^{3+} et $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, qui forment des complexes avec certaines enzymes présentes à la surface de la paroi végétale (Yaganza et coll., 2014). Par ailleurs, l'activation des systèmes de défense des plantes par certains sels est

documentée. En effet, le chlorure d'aluminium est connu pour induire la production de phytoalexines impliquées dans les mécanismes de résistance systémique de la vigne (Adrian et coll., 1996). Pour de nombreuses espèces végétales, le chlorure d'aluminium est un éliciteur de la callose (Rengel, 1992), dont les dépôts dans les parois cellulaires végétales peuvent renforcer leur résistance à des agents phytopathogènes fongiques (Underwood, 2012) et bactériens (Yun et coll., 2006). Ainsi les sels peuvent réduire le développement de la maladie non seulement via leur action sur les agents pathogènes, mais également via leur effet sur les tissus végétaux. L'absence d'efficacité de certains sels, pourtant fortement inhibiteurs *in vitro*, à réprimer le développement de la maladie montre que les essais *in vitro* ne peuvent prédire l'efficacité des sels à contrôler la maladie des taches et des nervures noires de la laitue.

CONCLUSION

La culture de la laitue connaît d'importantes pertes attribuables à la maladie des taches et des nervures noires. La lutte contre cette maladie causée par la bactérie *P. cichorii* est particulièrement difficile en raison des considérations suivantes : 1) la maladie est difficilement décelable, 2) elle apparaît tardivement, 3) il n'existe aucun produit phytosanitaire homologué au Canada pour lutter contre cette maladie, 4) les pratiques culturales préventives se révèlent souvent peu efficaces et 5) le feuillage de la laitue est sensible à la phytotoxicité des produits potentiellement antibactériens.

Cette étude a permis de démontrer que les sels d'acides organiques et inorganiques (chlorure d'aluminium, chlorure de calcium, bicarbonate de sodium, carbonate de sodium, métabisulfite de sodium, benzoate de sodium et sorbate de potassium) seuls ou en mélanges, ont une forte activité antibactérienne, inhibant la croissance *in vitro* de *P. cichorii*, à des concentrations relativement faibles. Cependant, aucune synergie des sels dans cette inhibition ne s'est exprimée. Appliqués sur le feuillage de plants de laitue, certains sels (bicarbonate de sodium et chlorure d'aluminium) ou mélanges de sels (métabisulfite de sodium + chlorure de calcium, métabisulfite de sodium + chlorure d'aluminium et métabisulfite de sodium + bicarbonate de sodium) ont montré une certaine efficacité en permettant une réduction significative de la gravité de la maladie. Néanmoins, l'efficacité des traitements était variable entre les deux essais réalisés en serre et le degré de réduction de la maladie, même dans les cas des traitements les plus efficaces, s'est avéré insuffisant pour envisager une commercialisation des plants. De plus, en raison de la sensibilité de la laitue à la phytotoxicité des sels testés, augmenter les concentrations des solutions salines dans l'objectif d'améliorer leur efficacité pose le risque de voir se développer des symptômes de phytotoxicité sur le feuillage, rendant impossible la mise en marché des plants.

À la lumière des résultats obtenus, il est clair que les sels testés dans le cadre de cette étude ne permettent pas à eux seuls une réduction suffisamment marquée de la maladie. On ne peut toutefois exclure la possibilité que ces sels puissent permettre une réduction suffisante de la maladie des taches et des nervures noires lorsqu'utilisés avec des méthodes complémentaires de lutte, telles que des pratiques culturales adaptées, dans un programme de lutte intégrée.

Dans les travaux futurs, il serait intéressant d'explorer l'efficacité contre *P. cichorii* d'autres composés *GRAS* potentiellement moins phytotoxiques que les sels testés dans cette étude, notamment d'autres sels organiques ou inorganiques et des extraits végétaux.

RÉFÉRENCES

- A2D, Action distribution directe. (2010). Rôle des adjuvants. [En ligne]. <<http://www.a2d.fr/page-role-adjuvants.html>> (Page consultée le 4 mai 2015).
- Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R., & Joubert, J. M. (1996). Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**(8), 1979-1981.
- Aharoni, Y., Fallik, E., Copel, A., Gil, M., Grinberg, S., & Klein, J. D. (1997). Sodium bicarbonate reduces postharvest decay development on melons. *Postharvest Biology and Technology*, **10**(3), 201-206.
- Al Zaemey, A. B., Magan, N., & Thompson, A. K. (1993). Studies on the effect of fruit-coating polymers and organic acids on growth of *Colletotrichum musae* *in vitro* and on post-harvest control of anthracnose of bananas. *Mycological Research*, **97**, 1463-1468.
- Anjali, C. H., Dash, M., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2010). Antibacterial activity of sunflower oil microemulsion. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2**, 123-128.
- ASPC, Agence de la santé publique du Canada. (2013). Guide canadien d'immunisation. [En ligne]. <<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/cig-gci/p01-14-fra.php>> (Page consultée le 3 avril 2015).
- Béliard, E. (2003). Maladies et ravageurs de la laitue et de la chicorée à salade en agriculture biologique (Fiche technique). Institut technique de l'agriculture biologique. [En ligne]. <http://www.itab.asso.fr/downloads/Fiches-techniques_maraichage/fiche-salademini.pdf> (Page consultée le 1 mai 2015).
- Biggs, A. R., El-Kholi, M. M., El-Neshawy, S., & Nickerson, R. (1997). Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, **81**(4), 399-403.
- Blancard, D., Lot, H., & Maisonneuve, B. (2003). Maladies des Salades : Identifier, Connaître et Maîtriser. INRA éditions, Paris, France. 375 pages.
- Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Thorngate, J. (2001). Food Additives. CRC Press, Boca Raton, FL. 952 pages.
- Carroll, J.E., & Wilcox, W.F. (2001). Physical mode of action of monopotassium phosphate against *Uncinula necator* infections on grape leaves. *Phytopathology*, **91**, S193.
- Conway, W. S. (1988). Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. *Phytopathology*, **78**(8), 1052.

Croda International plc. (2015). Product summary : Tween™ 20. [En ligne]. <<http://viticulture.hort.iastate.edu/info/pdf/sprayadjuvants.pdf>> (Page consultée le 4 mai 2015).

CSST, Commission de la santé et de la sécurité du travail. (2014). Répertoire toxicologique. [En ligne]. <<http://www.crodacropcare.com/home.aspx?d=content&view=dtl&s=143&r=256&p=1932&prodID=248#Terms>> (Page consultée le 25 août 2015).

De Logu, A., Onnis, V., Saddi, B., Congiu, C., Schivo, M. L., & Cocco, M. T. (2002). Activity of a new class of isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49(2)**, 275-282.

Denyer, S., Barryhugo, W., & Harding, V. (1985). Synergy in preservative combinations. *International Journal of Pharmaceutics*, **25(3)**, 245-253.

Depasquale, D. A., El-Nabarawy, A., Rosen, J. D., & Montville, T. J. (1990). Ammonium bicarbonate inhibition of mycotoxigenic fungi and spoilage yeasts. *Journal of Food Protection*, **53(4)**, 324-328.

Dikici, A., Arslan, A., Yalcin, H., Ozdemir, P., Aydin, I., & Calicioglu, M. (2013). Effect of Tween 20 on antibacterial effects of acidic, neutral and alkaline decontaminants on viability of *Salmonella* on chicken carcasses and survival in waste decontamination fluids. *Food Control*, **30(2)**, 365-9.

Domoto, P. (2004). Characteristics of spray adjuvants. Iowa State University. [En ligne]. <<http://viticulture.hort.iastate.edu/info/pdf/sprayadjuvants.pdf>> (Page consultée le 4 mai 2015).

Droby, S., Wisniewski, M. E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y., & Chalutz, E. (1997). Influence of CaCl₂ on *penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology*, **87(3)**, 310-315.

El-Sheikh-Aly, M. M., Felaiifel, M. S. A., Fouad, N. A. & Badawy, H. M. A. (1998). Comparative effectiveness of some fungicides and salts applied preharvest or postharvest for controlling pear fruit rots. *Annals of Agricultural Science Cairo*, **Special Issue 1**, 135-149.

FAO/OMS, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation Mondiale de la Santé. (2014). Codex Alimentarius, base de données en ligne sur la norme générale codex pour les additifs alimentaires (NGAA), Tableau 3. [En ligne]. <<http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/reference/table3.html?ad=201#ad201>> (Page consultée le 29 avril 2015).

Gennaro, A. R. (1990). Remington's Pharmaceutical Sciences. 18e éd. Mack Publishing Company, Easton, PA. 2000 pages.

Gisi, U. (1996). Synergistic interaction of fungicides in mixtures. *Phytopathology*, **86(11)**, 1273-1279.

GNB, Gouvernement du Nouveau-Brunswick. Groupe de travail des provinces de l'Atlantique sur la lutte antiparasitaire, l'éducation et les normes de formation. (2006). Série de manuels de formation sur l'utilisation des pesticides au Canada atlantique. Base d'applicateur : manuel de formation. [En ligne]. <<http://www2.gnb.ca/content/dam/gnb/Departments/env/pdf/LandWaste-TerreDechets/BaseApplicateur.pdf>> (Page consultée le 4 mai 2015).

Hervieux, V., Yaganza, E. S., Arul, J., & Tweddell, R. J. (2002). Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Plant Disease*, **86(9)**, 1014-1018.

Hikichi, Y., Wali, U. M., Ohnishi, K., & Kiba, A. (2013). Mechanism of disease development caused by a multihost plant bacterium, *Pseudomonas cichorii*, and its virulence diversity. *Journal of General Plant Pathology*, **79(6)**, 379-389.

Kober, P. A., & Sugiura, K. (1912). The copper complexes of amino-acids, peptides and peptones. *Journal of Biological Chemistry*, **13(1)**, 1-13.

Lacroix, M. (1999). Nutrition en calcium : problèmes et prévention. MAPAQ, ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, publication VT 046. [En ligne]. <<http://www.agrireseau.qc.ca/lab/documents/Nutrition%20en%20calcium.pdf>> (Page consultée le 1 mai 2015).

MAPAQ, ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec. (2014). Réseau d'avertissements phytosanitaires : Carotte, céleri, laitue, oignon, poireau, ail. Avertissement No 5 - 5 juin 2014. [En ligne]. <<http://www.agrireseau.qc.ca/Rap/documents/a05tn14.pdf>> (page consultée le 30 mars 2015).

McLaughlin, R. J. (1990). Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology*, **80(5)**, 456.

Mecteau, M. R., Arul, J., & Tweddell, R. J. (2002). Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of *Fusarium sambucinum*, a causal agent of potato dry rot. *Mycological Research*, **106(6)**, 688-696.

Mecteau, M. R., Arul, J., & Tweddell, R. J. (2008). Effect of different salts on the development of *Fusarium solani* var. *coeruleum*, a causal agent of potato dry rot. *Phytoprotection*, **89(1)**, 1-6.

Meyer, J. R., Shew, H. D., & Harrison, U. J. (1994). Inhibition of germination and growth of *Thielaviopsis basicola* by aluminum. *Phytopathology*, **84(6)**, 598-602.

Mills, A. A. S., Platt, H. W., & Hurta, R. A. (2004). Effect of salt compounds on mycelial growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, **34(3)**, 341-350.

- Montville, T. J., & Shih, P.-L. (1991). Inhibition of mycotoxigenic fungi in corn by ammonium and sodium bicarbonate. *Journal of Food Protection*, **54(4)**, 295-297.
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52(1)**, 1.
- Olivier, C., MacNeil, C. R., & Loria, R. (1999). Application of organic and inorganic salts to field-grown potato tubers can suppress silver scurf during potato storage. *Plant Disease*, **83(9)**, 814-818.
- OMAFRA, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. (2014). Guide de lutte contre les mauvaises herbes 2014-2015. [En ligne]. <<http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/pub75/pub75ch5.pdf>> (Page consultée le 4 mai 2015).
- ONGC, Office des normes générales du Canada. (2011). Systèmes de production biologique. Listes des substances permises. [En ligne]. <<http://www.tpsgc-pwgsc.gc.ca/ongc-cgsb/programme-program/normes-standards/internet/bio-org/permises-permitted-fra.html>> (Page consultée le 28 avril 2015).
- Palou, L., Smilanick, J. L., Usall, J., & Viñas, I. (2001). Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Disease*, **85(4)**, 371-376.
- Pauwelyn, E., Vanhouteghem, K., Cottyn, B., De Vos, P., Maes, M., Bleyaert, P., & Höfte, M. (2011). Epidemiology of *Pseudomonas cichorii*, the cause of lettuce midrib rot. *Journal of Phytopathology*, **159(4)**, 298-305.
- Prisme consortium. 2015. Culture de la laitue. [En ligne]. <<http://www.prisme.ca/laitue.asp>> (Page consultée le 28 avril 2015).
- Punja, Z. K., & Gaye, M. M. (1993). Influence of postharvest handling practices and dip treatments on development of black root rot on fresh market carrots. *Plant Disease*, **77(10)**, 989-995.
- Punja, Z. K., & Grogan, R. G. (1982). Effects of inorganic salts, carbonate-bicarbonate anions, ammonia, and the modifying influence of pH on sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **72(6)**, 635-639.
- Raeker, M. O., Bern, C. J., Johnson, L. A., & Glatz, B. A. (1992). Preservation of high-moisture maize by various propionate treatments. *Cereal Chemistry*, **69(1)**, 66-69.
- Rengel, Z. (1992). Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytologist*, **121(4)**, 499-513.
- Richard, C., & Boivin, G. (1994). *Maladies et Ravageurs des Cultures Légumières au Canada*. La Société Canadienne de Phytopathologie, Société d'Entomologie du Canada, Ottawa, Canada. 590 pages.

Russell, N. J., & Gould, G. W. (1991). *Food Preservatives*. Glasgow: Blackie, New York, NY. 290 pages.

Santé Canada. (2015). Liste des agents de conservation autorisés. [En ligne]. <<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/addit/list/11-preserv-conserv-fra.php>> (Page consultée le 27 avril 2015).

Santé Canada. Site web Substances chimiques. (2010). Sels d'aluminium : Chlorure d'aluminium (Numéro de CAS 7446-70-0), Nitrate d'aluminium (Numéro de CAS 13473-90-0), Sulfate d'aluminium (Numéro de CAS 10043-01-3). [En ligne]. <<http://www.chemicalsubstanceschimiques.gc.ca/fact-fait/alum-salts-sels-fra.php>> (Page consultée le 27 avril 2015).

Schober, B. M., & 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(4)**, 341-349.

Schroth, M., Thompson, J., Bardin, R., & Greathead, A. (1964). A new disease in California : bacterial spot of lettuce. *California Agriculture*, **18(11)**, 2-3.

Sholberg, P. L. (1998). Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay. *Plant Disease*, **82(6)**, 689-693.

Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Mlikota, F., Usall, J., & Michael, I. F. (1999). Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease*, **83(2)**, 139-145.

Statistique Canada. (2014). Tableau 001-0013 : Superficie, production et valeur à la ferme des légumes. [En ligne]. <<http://www5.statcan.gc.ca/cansim/a47>> (Page consultée le 16 janvier 2015).

Statistique Canada. (2012). Aperçu statistique de l'horticulture canadienne 2010-2011. [En ligne]. <http://publications.gc.ca/collections/collection_2012/agr/A71-23-2011-fra.pdf> (Page consultée le 27 avril 2015).

Toussaint, V. (2008). Ma salade est malade, à qui la faute? Le point sur les maladies bactériennes dans la laitue. [En ligne]. <<http://www.agrireseau.qc.ca/legumeschamp/documents/Toussaint%20JH2008.pdf>> (Page consultée le 1 juin 2013).

Tremblay, L. (2001). Le bicarbonate, fongicide de l'avenir? *Québec vert*, août 2001. [En ligne]. <<http://www.agrireseau.qc.ca/horticulture-pepinierie/documents/bicarbonate.PDF>> (Page consultée le 30 avril 2015).

UAP Canada, United Agri Products Canada. (2015). Improving pesticide performance with surfactant technology: The LI 700® Way. Brochure. [En ligne]. <http://www.uap.ca/products/documents/UAP_LI700_WhitePaper_Final_LoRez.pdf> (Page consultée le 4 mai 2015).

UMASS Amherst, University of Massachusetts Amherst. (2015). Chrysanthemum - Bacterial Blight (*Pseudomonas cichorii*). [En ligne]. <<http://negreenhouseupdate.info/photos/chrysanthemum-%E2%80%93-bacterial-blight-pseudomonas-cichorii-1>> (Page consultée le 26 août 2015).

Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in plant science*, **3**, 85.

Vincent, C., Panneton, B., & Fleurat-Lessard, F. (2000). La lutte physique en phytoprotection. Editions Quae, Versailles, France. 347 pages.

Watson, A. (2005). Scoping study on the management of varnish spot in field and hydroponic lettuce. NSW Department of Primary Industries, Orange, Australie. 58 pages.

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, **3(2)**, 163-175.

Wisniewski, M., Droby, S., Chalutz, E., & Eilam, Y. (1995). Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* *in vitro* and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathology*, **44(6)**, 1016-1024.

Yaganza, E. S., Tweddell, R. J., & Arul, J. (2014). Postharvest application of organic and inorganic salts to control potato (*Solanum tuberosum* L.) storage soft rot: plant tissue-salt physicochemical interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62(38)**, 9223-9231.

Yaganza, E. S., Tweddell, R. J., & Arul, J. (2009). Physicochemical basis for the inhibitory effects of organic and inorganic salts on the growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **75(5)**, 1465-1469.

Yaganza, E-S. (2005). Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre : base physico-chimique. Thèse de doctorat. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval. 175 pages.

Yaganza, E. S., Rioux, D., Simard, M., Arul, J., & Tweddell, R. J. (2004). Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Applied and Environmental Microbiology*, **70(11)**, 6800-6808.

Yun, M. H., Torres, P. S., El Oirdi, M., Rigano, L. A., Gonzalez-Lamothe, R., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Dankert, M. A., Bouarab, K. & Vojnov, A. A. (2006). Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiology*, **141(1)**, 178-187.

Ziv, O., & Zitter, T. A. (1992). Effects of bicarbonates and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. *Plant Disease*, **76(5)**, 513-517.

Zuo, G. Y., Han, Z. Q., Hao, X. Y., Han, J., Li, Z. S., & Wang, G. C. (2014). Synergy of aminoglycoside antibiotics by 3-benzylchroman derivatives from the Chinese drug *Caesalpinia sappan* against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, **21**(7), 936-941.

ANNEXE A

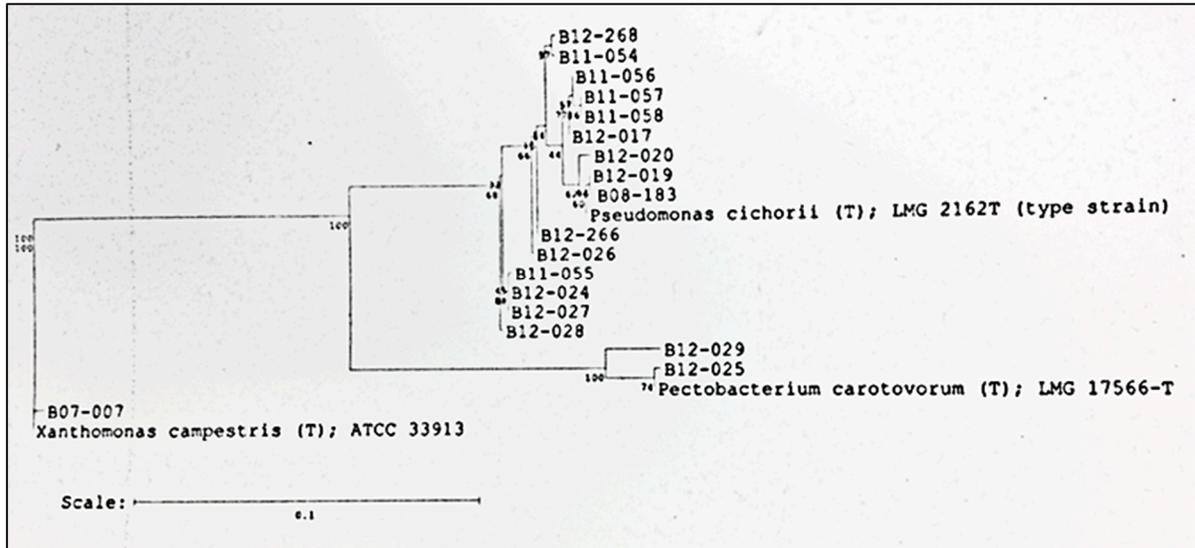


Figure A.1. Arbre phylogénique 16S

Tableau A.1. pH des différentes solutions salines ajustées aux concentrations minimales inhibitrices (MICs).

Solutions salines		pH
AlCl ₃ (4 mM) ^a	-	4,00
Na ₂ S ₂ O ₅ (4 mM)	-	4,33
CaCl ₂ (120 mM)	-	11,58
C ₇ H ₅ NaO ₂ (45 mM)	-	7,54
C ₆ H ₇ KO ₂ (75 mM)	-	8,15
Na ₂ CO ₃ (35 mM)	-	11,34
NaHCO ₃ (140 mM)	-	8,56
AlCl ₃ (3 mM)	+ CaCl ₂ (70 mM)	4,04
Na ₂ S ₂ O ₅ (2 mM)	+ AlCl ₃ (2 mM)	3,78
Na ₂ S ₂ O ₅ (2 mM)	+ CaCl ₂ (30 mM)	4,58
C ₇ H ₅ NaO ₂ (16,7 mM)	+ C ₆ H ₇ KO ₂ (46,7 mM)	8,19
NaHCO ₃ (80 mM)	+ C ₆ H ₇ KO ₂ (66,7 mM)	8,31
Na ₂ CO ₃ (20 mM)	+ C ₆ H ₇ KO ₂ (100 mM)	11,32
C ₇ H ₅ NaO ₂ (36,7 mM)	+ NaHCO ₃ (133,3 mM)	8,22
C ₇ H ₅ NaO ₂ (10 mM)	+ Na ₂ CO ₃ (20 mM)	11,35
Na ₂ CO ₃ (20 mM)	+ NaHCO ₃ (86,7 mM)	11,38
Na ₂ S ₂ O ₅ (2 mM)	+ NaHCO ₃ (250 mM)	8,09
Na ₂ S ₂ O ₅ (1 mM)	+ Na ₂ CO ₃ (40 mM)	11,23

^a Les concentrations des sels sont présentées entre parenthèses.