

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires

Département des Sciences Agronomiques

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Amélioration des Productions Végétales

RECHERCHE D'UNE RESISTANCE INTRINSEQUE AU CROWN GALL CHEZ QUELQUES ESPECES D'*EUCALYPTUS* SPP.

Par

ZAZA Messaouda

Devant le jury composé de

A. BOUTEKRABT	Professeur USD. Blida	Président
L. KHELIFI	Professeur ENSA. (El Harrach)	Examineur
Z. E. DJAZOULI	Maitre de Conférence USD. Blida	Examineur
Z. KRIMI	Professeur, USD. Blida	Promotrice

Blida, Juin 2010

RESUME

Le crown gall est une maladie bactérienne très inquiétante causée par les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens*. L'eucalyptus est l'une des essences forestières menacées par cette maladie. Dans le cadre de la recherche d'une résistance intrinsèque chez quelques espèces d'*Eucalyptus* spp. vis-à-vis du crown gall, cinq espèces appartenant à ce genre, ont subi des inoculations par trois souches bactériennes pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* : E17, E2X et C58 à trois concentrations d'inoculum différentes: 10^3 , 10^6 et 10^9 CFU/ml.

Dans les conditions expérimentales, les espèces ; *E. melliodora*, *E. albens*, *E. umbellata* et *E. occidentalis* se sont révélées sensibles montrant différents niveaux de sensibilité à la maladie, tandis que l'espèce *E. punctata* s'est montrée résistante. Cette espèce semble intéressante pour les plans de croisement dans l'objectif d'améliorer la résistance des espèces d'*Eucalyptus* au crown gall.

Les quatre espèces révélées sensibles sont analysées par rapport à trois critères (nombre, poids et diamètre des tumeurs induites), les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une importante spécificité hôte/ parasite.

Le dosage des protéines solubles (cytoplasmiques et pariétales) chez les quatre espèces ; *E. melliodora*, *E. albens*, *E. umbellata* et *E. punctata* révèle l'existence d'une corrélation entre les protéines pariétales et l'espèce sensible *E. umbellata* et une corrélation entre les protéines cytoplasmiques et l'espèce résistante *E. punctata*. Ces deux corrélations sont probablement liées aux mécanismes d'infection ou ceux de défense de la plante vis-à-vis du stress biotique apporté par l'inoculation bactérienne.

Mots clés: *Agrobacterium tumefaciens*, *Eucalyptus* spp., résistance, sensibilité, crown gall.

SUMMARY

The crown gall is a very disturbing bacterial disease caused by tumorigenic strains of *Agrobacterium tumefaciens*. The eucalyptus is one of the forest tree species threatened by this disease. In the setting of the research of an intrinsic resistance in some species of *Eucalyptus* spp. to crown gall, five species belonging to this genus, were experimented by inoculation of stems with three pathogenic bacterial strains of *Agrobacterium tumefaciens*: E17, E2X and C58 at three different inoculum concentrations : 10^3 , 10^6 and 10^9 CFU/ml.

In the experimental conditions, the species; *E. melliodora*, *E. albens*, *E. umbellata* and *E. occidentalis* were revealed as sensitive showing different levels of sensitivity to the disease, while the species *E. punctata* appeared resistant. This species seems interesting to be used in breeding programs in the objective of improving the resistance of *Eucalyptus* species towards crown gall.

The four species revealed sensitive are analyzed in relation to three criterias of the induced tumors (number, weight and diameter), the gotten results suggest a high host / pathogen specificity.

The dosage of the soluble proteins (cytoplasmic and cell wall proteins) in the four species; *E. melliodora*, *E. albens*, *E. umbellata* and *E. punctata* reveals the existence of a correlation between cell wall proteins and the sensitive species *E. umbellata* and a correlation between the cytoplasmic proteins and the resistant species *E. punctata*. These two correlations are likely related to mechanisms of infection or those of defense of the plant against the biotic stress which result from the bacterial inoculation.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, *Eucalyptus* spp., resistance, sensitivity, crown gall.

ملخص

التدرّن التاجي مرض بكتيري مقلق جدا تسببه سلالات *Agrobacterium tumefaciens* التي تتسبب في ظهور الأورام السرطانية عند النبات. الأكلبييتوس من الأصناف الغابية التي باتت مهددة بهذا المرض. في إطار البحث عن أصناف من نوع الأكلبييتوس مقاومة لمرض التدرّن التاجي , خمسة أصناف من هذا النوع حققت بثلاث سلالات بكتيرية ممرضة من النوع *Agrobacterium tumefaciens* : E17, E2X, C58 وذلك باستعمال ثلاثة تراكيز بكتيرية مختلفة : 10^3 , 10^6 و 10^9 (وحدة مكونة للمستعمرة) / ملم من كل سلالة.

في الشروط التجريبية أظهرت الأصناف : (*E. melliodora*) , (*E. albens*) , (*E. umbellata*) و (*E. occidentalis*) حساسية كبيرة للمرض مع اختلاف في شدة هذه الحساسية, بينما أظهر الصنف (*E. punctata*) مقاومة كبيرة للمرض. هذا الصنف يبدو ذا أهمية كبيرة إذا ما استغل في برامج التهجين والانتقاء من أجل تحسين مقاومة أصناف الأكلبييتوس لهذا المرض.

الأصناف الأربعة التي أظهرت حساسية لهذا المرض خضعت لدراسة من حيث المعايير التالية: (عدد - قطر - وزن) الأورام السرطانية, تبين من خلالها تواجد مهم للخاصية: عائل /عامل ممرض.

معايرة البروتينات القابلة للانحلال (السيتوبلازمية و الجدارية) عند كل من الأصناف : (*E. melliodora*) , (*E. umbellata*) , (*E. albens*) و (*E. punctata*) كشفت عن تواجد علاقة بين البروتينات الجدارية والصنف (*E. umbellata*) الذي أظهر حساسية لهذا المرض و علاقة ما بين البروتينات السيتوبلازمية و الصنف (*E. punctata*) الذي أظهر مقاومة لهذا المرض. هاتين العلاقتين يرجح أن تكونا على صلة بآليات الإصابة بالمرض أو آليات مقاومته عند النبات اتجاه الحقن بالبكتيريا الممرضة.

الكلمات المفتاحية : *Eucalyptus* spp., *Agrobacterium tumefaciens* , مقاومة, حساسية, التدرّن التاجي.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

- ✓ A mes chers parents, mon seul et unique abri d'enfance, que Dieu me les garde.
- ✓ A mes chers frères : Ahmed, Abdel-Kader et Maamer.
- ✓ A mes chères sœurs : Rehia, Houria, Hadjira et Aicha.
- ✓ A tout ceux et celles qui portent le non ZAZA.
- ✓ A ma copine Djamila "qui mérite un merci particulier" ; " je te souhaite beaucoup de réussite et de succès".
- ✓ A mes chères copines qui n'ont jamais cessé de m'encourager : Rahma, Nadia, Nawal, Soumia, Fatima, Farida, Karima, Razika, Iman, Nabila et Assia...etc.
- ✓ A mes collègues du laboratoire de phytobactériologie: Wassila et Lamia et Karima.

Messaouda.....

REMERCIEMENTS

Avant tout je remercie Dieu le tout puissant pour m'avoir donné courage, assistance et patience de mener à bien l'élaboration de ce mémoire.

L'expression de ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements vont à Melle. *Krimi Z.*, Professeur à l'université Saad Dahlab de Blida pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de phytobactériologie et de m'avoir dirigé et aidé par ses précieux conseils qui m'ont jamais fait défaut, pour sa permanente disponibilité et son sérieux. A qui je dois respect et reconnaissance.

Je remercie Mr. *Boutekrapt A.*, Professeur à l'institut d'agronomie de Blida, d'avoir bien voulu m'honorer de sa présence en qualité de président de jury de ce mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de mes grâces.

Que Mr. *Khilifi L.*, Professeur à l'ENSA (El Harrach) et Mr. *Djazouli Z.-E.* Maître de conférence à l'institut d'agronomie de Blida trouvent ici l'expression de mes profonds remerciements pour m'avoir honoré d'examiner ce modeste travail.

Un merci particulier à Mr. *Djazouli Z.-E.* et Mr. *Amdoun R.*, maître assistant à l'INA de m'avoir énormément aidé dans les analyses statistiques, ainsi que pour leur disponibilité et leur conseils.

Mes sincères remerciements vont également au personnel de L' INRF de Baïnem pour m'avoir fourni la semence des espèces étudiées dans la présente étude, en particulier Mr. *Khemici M.* pour son aide et ses précieux conseils.

Je tiens également à remercier Mr. *El-Hadj*, apiculteur à la station expérimentale, qui m'a beaucoup aidé lors de l'expérimentation.

A tous et à toutes, qui au cours de ce travail m'ont fournis beaucoup d'aide et d'encouragements, je dis merci.

Z. Messaouda....

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	2
DEDICACE.....	5
REMERCIEMENTS	6
TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	10
INTRDUCTION.....	12
1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR <i>AGROBACTERIUM</i> SPP. ET LA MALADIE DU "CROWN GALL"	15
1.1. Le genre <i>Agrobacterium</i> spp.	15
1.1.1. Ancienne et actuelle taxonomie du genre <i>Agrobacterium</i> spp.....	15
1.2. Mécanismes naturels de l'infection des plantes par <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	17
1.2.1. Plasmide Ti d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
1.2.2. Processus d'infection.....	19
1.3. Réponse de la plante vis-à-vis de l'infection par <i>Agrobacterium</i>	25
1.3.1. Réaction d'hypersensibilité dans le cas du "crown gall".....	26
1.4. Gamme d'hôte d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
1.5. Dégâts économiques dus à la galle du collet.....	28
1.6. La lutte contre le crown gall.....	29
1.6.1. La lutte biologique.....	29
1.6.2. Prophylaxie.....	31
1.6.3. La lutte génétique.....	32
1.6.4. La sélection variétale.....	32
2. GENERALITES SUR L'EUCALYPTUS.....	34
2.1. Systématique de l' <i>Eucalyptus</i>	34
2.2. Qualités spéciales des eucalyptus et leurs utilisations.....	34
2.3. Origine et introduction des eucalyptus en Algérie.....	36

2.4. Quelques essences d'eucalyptus cultivées en Algérie.....	37
2.4.1. <i>Eucalyptus umbellata</i> = <i>E. tereticornis</i> (Forest red gum)	37
2.4.2. <i>Eucalyptus occidentalis</i> Endl. (Flat-topped yate).....	38
2.4.3. <i>Eucalyptus albens</i> Benth.	38
2.4.4. <i>Eucalyptus punctata</i> (Grey gum).....	38
2.4.5. <i>Eucalyptus melliodora</i> A. Cunn. (Yellow box).....	39
2.5. Ravageurs et maladies de l'eucalyptus	39
2.5.1. Insectes ravageurs.....	39
2.5.2. Maladies causées par des champignons phytopathogènes.....	40
2.5.3. Maladies virales.....	43
2.5.4. Maladies causées par des phytoplasmes.....	43
2.5.5. Maladies bactériennes.....	44
3. MATERIELS ET METHODES.....	46
3.1. Matériel végétal.....	46
3.1.1. Origine du matériel végétal utilisé.....	46
3.1.2. Désinfection de la semence.....	47
3.1.3. Semis.....	47
3.2. Matériel biologique.....	47
3.2.1. Origine des souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pathogènes utilisées.....	47
3.2.2. Vérification du pouvoir pathogène des souches bactériennes utilisées.....	48
3.2.3. Mesure de la concentration cellulaire des souches bactériennes tumorigènes utilisées pour l'inoculation.....	49
3.3. Essais d'inoculation sous serre.....	49
3.3.1. Dispositif expérimental de l'essai sous serre.....	50
3.3.2. Méthode d'inoculation.....	50
3.3.3. Lecture des résultats.....	53
3.3.4. Analyse statistiques des données.....	53
3.4. Recherche d'une éventuelle modification du métabolisme cellulaire protéique suite à l'inoculation des différentes espèces d'eucalyptus....	54
3.4.1. Extraction et dosage des protéines solubles.....	54
3.4.2. Analyses statistiques des données.....	58

4. RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....	60
4.1. Vérification du pouvoir pathogène des trois souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilisées.....	60
4.2. Réponses des cinq espèces d'eucalyptus à l'inoculation par les trois souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pathogènes.....	60
4.2.1. Analyse du paramètre taux d'infection par le crown gall chez les différentes espèces testées.....	62
4.3. Virulence des souches bactériennes sur les quatre espèces d'eucalyptus sensibles.....	64
4.3.1. Analyse de la variance par rapport au paramètre poids des tumeurs.....	64
4.3.2. Analyse de la virulence des souches par rapport au paramètre diamètre des tumeurs.....	66
4.4. Interprétation partielle des résultats	68
4.5. Analyse des protéines solubles quantifiées chez les quatre espèces d'eucalyptus.....	69
4.5.1. Analyse en composantes principales A.C.P.....	69
4.5.2. Classification hiérarchique (Cluster Analysis).....	71
4.6. Corrélations existantes entre les fractions protéiques quantifiées et les espèces d'eucalyptus étudiées.....	74
4.6.1. Analyse des différences entre les taux protéiques des feuilles et ceux des tiges.....	76
4.7. Interprétation partielle des résultats et analyse du métabolisme protéique suite à l'inoculation des différentes espèces d'eucalyptus.....	77
5. DISCUSSION.....	78
CONCLUSION.....	89
APPENDICES.....	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	108

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Carte du plasmide Ti de la souche pathogène d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58.....	18
Figure 1.2	Schéma récapitulatif du processus d'infection des cellules de la plante hôte par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
Figure 3.1	(a) Dispositif expérimental de l'essai d'inoculation sous serre chez l'espèce <i>E. melliodora</i>	51
	(b) Les trois traitements de la souche C58 chez l'espèce <i>E. melliodora</i>	51
Figure 3.2	Extraction des protéines solubles.....	56
Figure 3.3	Courbe d'étalonnage par l'Ovalbumine.....	58
Figure 4.1	Test de pathogénicité des trois souches bactériennes utilisées.....	61
Figure 4.2	Formation de tumeurs chez l'espèce <i>E. melliodora</i>	65
Figure 4.3	Réponses des plantules d' <i>Eucalyptus punctata</i> à l'inoculation par les deux souches C58 et E2X.....	67
Figure 4.4	Cercle des corrélations des taux de protéines solubles quantifiées chez les quatre espèces d'eucalyptus étudiées (toutes les valeurs sont à l'intérieur du cercle).....	70

Figure 4.5	Classification hiérarchique " cluster analysis " (calculée par le biais des distances euclidiennes) des taux de protéines solubles quantifiées chez les quatre espèces étudiées ; <i>E. melliodora</i> , <i>E. albens</i> , <i>E. umbellata</i> et <i>E. punctata</i>	73
Figure 4.6	Corrélations possibles entre les groupes homogènes déduits par l'ACP et le comportement (réponse) des quatre espèces d'eucalyptus étudiées.....	75
Figure 4.7	Analyse en composantes principales par groupes entre les protéines solubles des feuilles et celles des tiges; Les protéines de la tige (vert) et les protéines des feuilles (rose).....	76
Tableau 3.1	Origine de la semence des espèces d'eucalyptus utilisées.....	46
Tableau 3.2	Origine des souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilisées.....	48
Tableau 3.3	Traitements de l'essai expérimental réalisé sous serre.....	52
Tableau 3.4	Gamme étalon d'ovalbumine.....	57
Tableau 4.1	Taux d'infection des cinq espèces d'eucalyptus étudiées par les trois souches (C58, E2X et E17) d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
Tableau 4.2	Valeurs propres et taux de variance des quatre premiers axes.....	71

INTRODUCTION

Le "crown gall" ou tumeur du collet est une maladie bactérienne néoplasmique très sérieuse causée par la bactérie nommée *Agrobacterium tumefaciens* que l'on trouve habituellement dans le sol [1]. Cette maladie se caractérise par l'apparition de tumeurs au niveau du collet de la plante. Ces tumeurs peuvent être également perçues au niveau des racines ou des tiges.

La transformation génétique de ces cellules végétales est l'œuvre du plasmide Ti (tumor-inducing), présent dans les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens* [2, 3]. La formation de ces tumeurs s'explique par une séquence d'événements moléculaires déclenchés par l'attachement de la bactérie à un site spécifique d'une cellule de l'hôte sensible, suite à l'émission de composés phénoliques par les cellules blessées [4]. *Agrobacterium tumefaciens* se met en contact avec la cellule végétale et lui injecte une partie de son plasmide Ti (T-DNA) qui s'intègre dans le génome nucléaire de la plante hôte. Il s'agit d'un véritable transfert naturel d'ADN. L'expression du fragment T-DNA intégré se traduit par la synthèse des hormones de croissance (auxines et cytokinines) et par la production des opines ; substances spécifiques servant comme une source de carbone, d'azote et d'énergie pour les bactéries inductrices de ces tumeurs [5, 6]. La production en excès de ces phytohormones induit la formation de tumeurs au point de l'infection [5].

Dans les pépinières, cette maladie prend un accent particulier en raison des pratiques culturales qui tendent à favoriser son développement [7]. Des pertes économiques considérables dues au "crown gall" ont été signalées à travers le monde. Aux Etats-Unis d'Amérique, les produits végétaux endommagés étaient estimés à 23 millions de dollars [8]. En Algérie, la maladie sévit dans 95% des pépinières d'arbres fruitiers [9]. Face à cette situation plusieurs tentatives de lutte

ont été préconisées afin de réduire ces infections, telles que la fumigation des sols, les rotations, l'utilisation de la lutte biologique et la sélection variétale.

La maladie du "crown gall" peut toucher plus de 640 espèces végétales réparties dans 93 familles botaniques [10]. Parmi les espèces fruitières les plus sensibles, nous pouvons citer ; la vigne [11], le pêcher [12], le prunier et l'amandier [13], le pacanier [14] et certaines espèces ornementales telles que : le rosier [15], le chrysanthème [16] et le *Ficus benjamina* [17]. Certaines essences forestières n'ont pas également échappé aux infections du "crown gall", c'est le cas du peuplier [18], le pin [19] et l'eucalyptus [20, 21].

La croissance rapide de l'eucalyptus ainsi que la qualité de son bois en font la première espèce ligneuse angiosperme de reboisement industriel dans le monde. Elle est également une espèce forestière modèle pour des approches de génomique fonctionnelle en relation avec la formation du bois et l'adaptation aux stress abiotiques.

Cette essence forestière qui connaît depuis plusieurs années d'importants problèmes entomologiques et phytopathologiques, n'a pas manqué également à être sujette aux infections du "crown gall", causées par *Agrobacterium tumefaciens*. En 1929, Siemaszro a signalé qu'en Transcaucasie (au sud du Caucase) des plantations d'eucalyptus ont été sévèrement touchées par le "crown gall" [22]. De son côté, Imazeki [23] a rapporté que les eucalyptus étaient parmi les essences forestières endommagées par la maladie, et depuis, aucune épidémie n'a été signalée chez cette espèce forestière. En 2001, les symptômes caractéristiques du "crown gall" ont été remarqués sur l'eucalyptus pour la première fois en Algérie par Krimi [20] où, des tumeurs du collet rappelant celles du "crown gall" ont été observées sur 60000 plantules d'*Eucalyptus occidentalis*, au niveau d'une pépinière forestière à Sidi M'djahed (Tlemcen). Les analyses biochimiques et moléculaires des isolats bactériens obtenus à partir de ces tumeurs ont révélé leur affiliation au biovar 1 d'*Agrobacterium tumefaciens* [21]. Au niveau de la même pépinière, l'incidence de la maladie était estimée à 100% chez l'espèce *Eucalyptus occidentalis*. Cependant, aucune infection n'a été signalée chez les deux espèces *Eucalyptus camaldulensis* et *Eucalyptus cladocalyx*. La

non sensibilité observée chez ces deux espèces pourrait s'expliquer par une résistance au crown gall.

Suggérant l'existence d'une éventuelle résistance au crown gall chez les espèces d'eucalyptus produites en pépinières et dans l'objectif de compléter l'étude menée par Belaskri [24], qui a enregistré différents niveaux de sensibilité aux infections naturelles et artificielles par les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens*, nous avons entrepris, le travail suivant :

- ✓ De tester la sensibilité ou la résistance de cinq espèces d'eucalyptus vis à vis de trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* pathogènes.
- ✓ D'évaluer la virulence de ces souches bactériennes sur les espèces d'eucalyptus.
- ✓ Au cours de notre expérimentation, et à la lumière des résultats préliminaires obtenus, nous avons jugé utile de réaliser une analyse complémentaire des protéines totales, dans l'objectif de rechercher leur éventuelle relation avec la résistance ou la sensibilité des espèces d'eucalyptus au cours de leur interaction avec les différentes souches bactériennes testées.

CHAPITRE 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR *AGROBACTERIUM* SPP. ET LA MALADIE DU "CROWN GALL"

1.1. Le genre *Agrobacterium* spp.

1.1.1. Ancienne et actuelle taxonomie du genre *Agrobacterium* spp.

Les espèces bactériennes appartenant au genre *Agrobacterium* sont des microorganismes ubiquistes de la microflore du sol. La plupart survivent en saprophytes sur la matière organique décomposée [6]. Ce genre bactérien appartient à la sub-division des α *Proteobacteria*, à la famille des *Rhizobiaceae* qui comprend également le genre *Rhizobium*, *Bradhyrhizobium* et *Phyllobacterium*. Les membres de cette famille sont à Gram négatif, mésophiles non sporulantes, leur métabolisme respiratoire est aérobie strict [25].

Selon la 8^{ème} édition du " Bergey's manuel " de la systématique bactérienne, ce genre peut être subdivisé en quatre espèces qui se distinguent surtout par leur pouvoir pathogène : *A. tumefaciens* responsable de la tumeur du collet, *A. rhizogenes* qui provoque la maladie du chevelu racinaire, *A. rubi* agent causal du " cane gall " chez les espèces du genre *Rubus*. *A. radiobacter* est une espèce non pathogène [25].

En se basant sur les caractéristiques physiologiques et biochimiques, la plupart des membres de ce genre se distinguent en trois biovars (bv) : *A. tumefaciens* (bv.1), *A. rhizogenes* (bv.2) et *A. vitis* (bv.3) [25]. Les biovars 1 et 2 sont communément associés aux arbres fruitiers alors que le biovar 3 a surtout été observé chez la vigne [26, 27, 28]. De leur côté, Ophel et Kerr [29], ont reclassé les isolats de la vigne, souvent référés au biovar 3, sous une nouvelle

espèce : *Agrobacterium vitis*. Une autre nouvelle espèce a été décrite par Bouzar et Jones [30], elle a été isolée à partir de *Ficus benjamina*, il s'agit d'*Agrobacterium larrymoorei* [17] initialement nommée *A. fici*.

La classification des espèces au sein du genre *Agrobacterium* a été plusieurs fois discutée mais aucune nomenclature proposée n'a reçu une validation universelle. Young *et al.* [31] ont proposé d'amalgamer les deux genres *Allorhizobium* et *Agrobacterium* en un seul genre : *Rhizobium*. Alors que, Farrand *et al.* [32] soutenus par un grand nombre de chercheurs étaient d'accord pour retenir *Agrobacterium* comme étant un genre bien défini par l'absence des (RIMEs ; *Rhizobium*-specific intergenic mosaic elements) et l'échec des agrobactéries dans la fixation d'azote suite à l'acquisition du plasmide Sym, ce qui permet de le différencier des autres membres de la famille des *Rhizobiaceae*. En réponse, Young *et al.* [33] ont rapporté que les épithètes *tumefaciens* et *rhizogènes* ne peuvent pas être retenus dans la distinction entre les espèces et ce, vu l'instabilité des déterminants de ces caractères qui sont des éléments transmissibles entre les agrobactéries.

Etant donné le désaccord entre les auteurs quant à l'appartenance taxonomique des souches et la classification des isolats et dans l'attente d'une taxonomie formelle, nous avons adopté dans notre manuscrit la nomenclature *Agrobacterium* pour les bactéries causant le "crown gall".

Récemment, le comité international de la systématique des Procaryotes a proposé que le mot *Rhizobium* peut être employé comme un nom commun pour les bactéries fixatrices d'azote chez les légumineuses et non pas comme un genre [34].

1.2. Mécanismes naturels de l'infection des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*

1.2.1. Plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*

Le "crown gall" est une maladie bactérienne qui se caractérise par une prolifération cellulaire incontrôlée aboutissant à la formation de tumeurs au point de l'infection [35]. La capacité d'*Agrobacterium tumefaciens* à induire ces tumeurs, est liée à la présence d'un plasmide particulier dénommé : plasmide Ti (Tumor inducing ; ou inducteur de tumeur) [2, 3]. Les fonctions tumorigènes sont essentiellement codées par le plasmide Ti (Figure1.1). Néanmoins, certains gènes chromosomiques peuvent être également impliqués dans la reconnaissance des substances phénoliques émises par les cellules végétales blessées [36].

En effet, cinq régions importantes constituent le plasmide Ti [5] :

- 1- La région T (ADN-T ; ou ADN transféré).
- 2- La région de virulence (*vir*).
- 3- La région nécessaire à la réplication du plasmide Ti (*ori*).
- 4- Les locus *tra* et *trb* qui dirigent le transfert conjugatif du plasmide Ti.
- 5- Les gènes dirigeant le catabolisme des opines (*OPC*).

La région T ou " ADN-T " est une séquence d'ADN flanquée de deux bordures : droite (Rb ; right border) et gauche (Lb ; left border). Il s'agit de la région d'ADN transférable qui s'intègre dans le génome de la cellule végétale. Ce fragment d'ADN-T porte des oncogènes (*onc*) codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des auxines (*iaaM* et *iaaH*) et des cytokinines (*ipt*) [37]. D'autres gènes secondaires tels que: les gènes *5* et *6b*, sont également impliqués d'une façon indirecte dans l'induction des tumeurs [38, 39]. Tandis que d'autres gènes dirigent la synthèse des opines tels que : *Ocs* et *Ogs* [40]. Ces dernières substances particulières constituent des marqueurs d'une transformation par *Agrobacterium* spp.

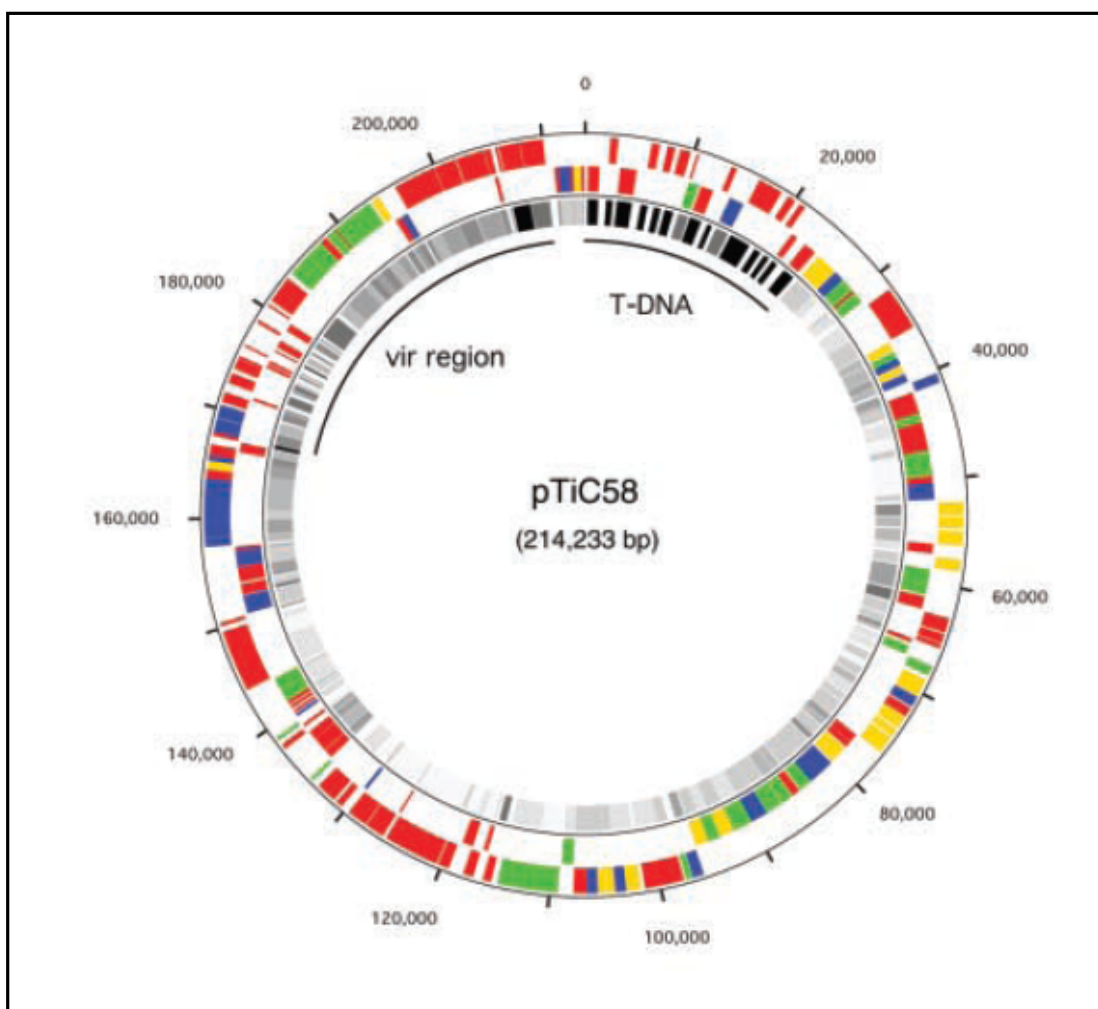


Figure 1.1: Carte du plasmide Ti de la souche pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 [41].

La région de virulence est constituée de vingt gènes qui s'expriment dans six opérons : *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* et *virG*. Ils sont impliqués dans l'incision, le transfert et la protection de l'ADN -T qui va être transféré au sein de la cellule hôte [5]. Dans la région *OPC*, quarante gènes sont nécessaires au catabolisme des opines [5]. Cependant, au niveau de la région *ori*, seule la présence du *repA*, *repB* et *repC* suffit pour assurer une répllication stable au plasmide Ti chez *A. tumefaciens* [42]. Les deux locus *tra* et *trb* dirigent le transfert conjugatif du plasmide Ti d'une bactérie à une autre [5]. D'après Petit *et coll.* [43], les fonctions cataboliques sont inductibles, de même que la fonction de transfert. Selon ces

auteurs, l'octopine induit simultanément la fonction catabolique Occ "octopine catabolism" et la fonction de transfert tra.

1.2.2. Processus d'infection

Le processus d'infection par *Agrobacterium tumefaciens* se résume en quatre étapes :

1. Activation du processus d'infection
2. Attachement bactérien
3. Transfert du T-DNA
4. Expression du fragment intégré

1.2.2.1. Activation du processus d'infection

L'interaction entre *Agrobacterium tumefaciens* et la plante hôte implique une série de signaux chimiques communiquant entre les deux potagonistes. Il s'agit de certains composés phénoliques dérivés du syringol (le plus actif étant l'acétosyringone) et des sucres libérés par les tissus blessés, agissant comme inducteurs des gènes *vir* bactériens [44]. Autrement dit, ces composés phénoliques jouent, le rôle de chimioattracteurs pour les agrobactéries tumorigènes qui s'adhèrent sur les cellules de la plante [4]. L'activation des gènes *vir* nécessite la présence des composés phénoliques et un pH acide au niveau du site blessé de la plante hôte. Tandis que les monosaccharides (L-arabinose et D-xylose) augmentent la sensibilité aux inducteurs phénoliques mais, ne sont pas essentiels pour l'induction des gènes *vir* [45, 46]. Par conséquent, leur action ne peut être observée qu'à des concentrations limitées en acetosyringone (10µM).

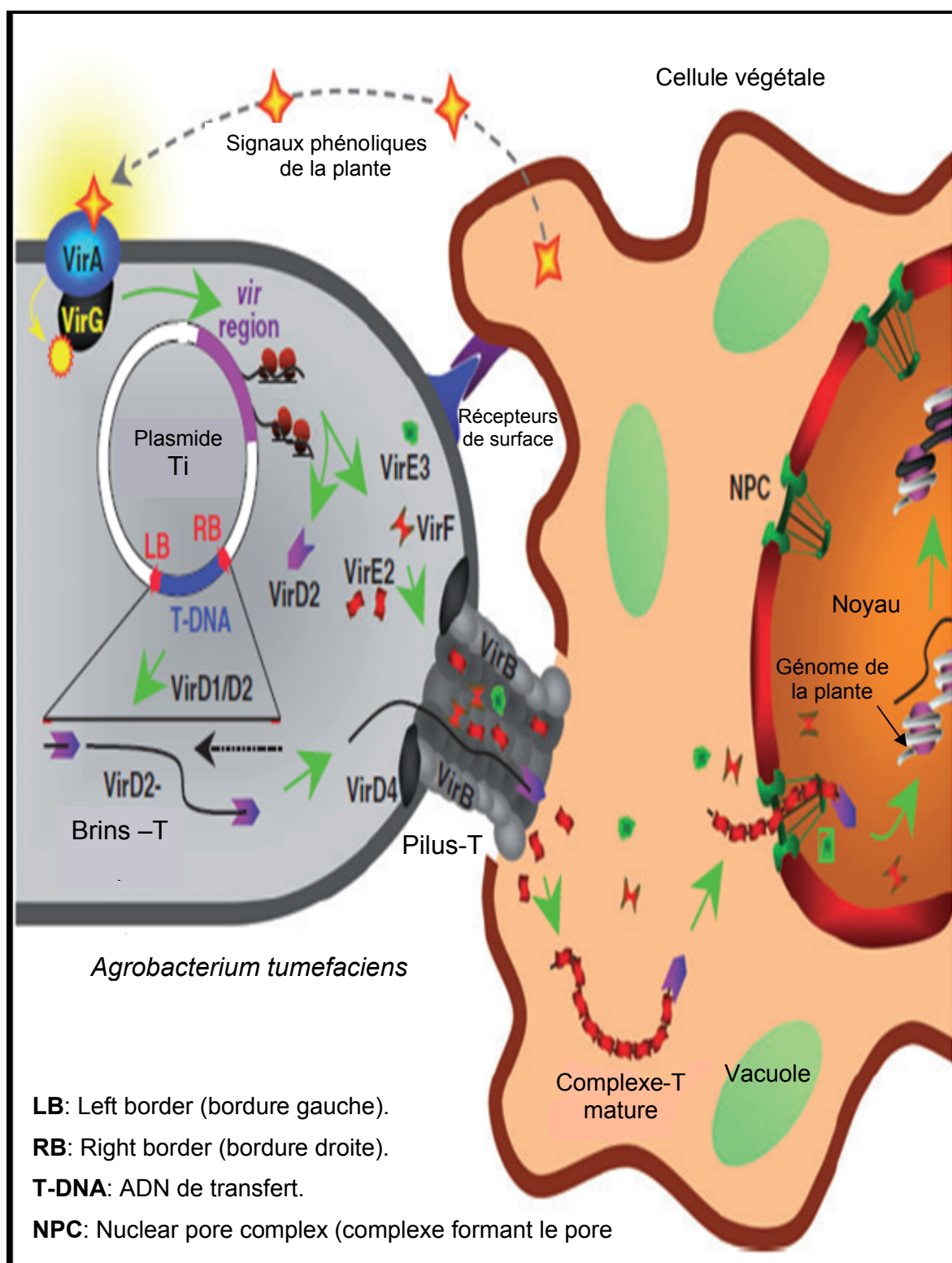


Figure 1.2 : Schéma récapitulatif du processus d'infection des cellules de la plante hôte par *Agrobacterium tumefaciens* [47].

L'activation du processus d'infection est régulée par deux systèmes régulateurs :

a. Complexe VirA/VirG

Vir A est une protéine Kinase constituée d'une partie périplasmique flanquée entre deux régions transmembranaires et une partie cytoplasmique [48]. L'interaction directe entre un inducteur phénolique de type syringol et son domaine périplasmique induit son autophosphorylation [49, 50]. Une fois le VirA phosphorylé, il active la protéine cytoplasmique Vir G par phosphorylation, ce qui déclenche l'expression des autres gènes *vir*, à savoir *virA*, *virB*, *virC*, *virD* et *virE*, qui s'expriment en cascade [49, 51, 52].

b. Complexe VirA/ChvE

Un deuxième mécanisme d'activation des gènes *vir* fait intervenir une protéine chromosomale ChvE, ayant la capacité de se lier avec des sucres. Lorsque ChvE est activée par son ligand, elle augmente la sensibilité de VirA aux composés phénoliques [45, 46], permettant une activation de VirA en présence de faibles concentrations de ces composés. D'après Peng *et al.* [53], lorsque ChvE est hautement exprimée chez *Agrobacterium tumefaciens* sous l'effet de quelques monosaccharides spécifiques, la sélectivité de VirA s'étend à d'autres composés phénoliques n'ayant normalement qu'un faible pouvoir inducteur de gènes *vir*.

Le tandem VirA/ChvE est donc sensible à deux types de signaux chimiques qui sont les hautes concentrations en composés phénoliques spécifiques d'une part et les faibles concentrations en composés phénoliques moins spécifiques en présence de sucres d'autre part.

c. Influence du pH extracellulaire sur l'expression des gènes *vir*

L'acidité du milieu externe est le troisième élément intervenant dans l'activation des gènes *vir*, dont, la perception des sucres via le complexe VirA/ChvE est généralement associée à un pH extracellulaire acide pour assurer

une activation optimale des gènes *vir*. En plus, en absence du ChvE le complexe VirA/VirG sera induit par les composés phénoliques et ni les sucres ni un pH (5-7) peuvent affecter cette induction [54].

1.2.2.2. Attachement bactérien

L'attachement bactérien s'établit d'une manière polaire en deux étapes : un faible attachement consiste en la biosynthèse de polysaccharides acetylés. La synthèse de ces polysaccharides est gérée par le locus *att R* ; car des mutations sur ce locus bloquent la virulence, l'attachement bactérien et la synthèse de polysaccharides de surface [55, 56].

Cette phase d'attachement est suivie par un attachement plus fort assuré par la synthèse de fibres de cellulose [4]. Ces fibres sont fabriquées par les souches oncogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* lors de leur attachement à la cellule de l'hôte [57].

1.2.2.3. Transfert du T-DNA

Les protéines VirD1 et VirD2 sont des endonucléases spécifiques qui reconnaissent les bords du T-DNA ainsi que le brin qui sera exporté et l'excisent [58]. La protéine VirD2 reste liée de manière covalente sur l'extrémité 5' du simple brin du T-DNA qui se recouvre par plusieurs copies de la protéine VirE2 (environ 600 molécules), ce qui lui assure une protection vis-à-vis des nucléases de la cellule végétale cible [59]. L'ensemble VirD2, VirE2 et le T-DNA simple brin constitue le " complexe -T ". Ce dernier, est exporté de la cellule bactérienne vers le cytoplasme de la cellule végétale à travers un appareil de sécrétion bactérien de type IV codé par l'opéron VirB et VirD4 [60]. Le système de sécrétion de type IV est un complexe protéique situé dans la paroi de la bactérie [61]. Ce complexe protéique, VirB, met en jeu onze protéines codées par onze gènes réunis en opéron, formant la région *virB* du plasmide Ti [62]. La protéine VirB2 constitue la composante essentielle de ce pilus qui permet à *Agrobacterium tumefaciens* de s'attacher sur la cellule végétale cible [63].

Les protéines VirE2 et VirD2 possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLS). Ils interagissent avec des protéines endogènes à la plante pour faciliter le cheminement du " complexe-T " vers le pore nucléaire [64, 65].

1.2.2.4. Expression du fragment intégré

L'intégration du T-DNA au sein du génome de la cellule végétale se fait à travers des recombinaisons illégitimes [66, 67]. Le fragment du T-DNA intégré porte deux classes principales de gènes : les oncogènes et les gènes liés à la synthèse des opines.

1.2.2.4.1. Synthèse des hormones de croissance

Les oncogènes perturbent la balance hormonale de la cellule végétale infectée et altèrent la sensibilité de cette dernière aux phytohormones, ce qui induit par conséquent le phénotype tumoral [6]. Le T-DNA des souches d'*A. tumefaciens* contient cinq oncogènes : *iaaM*, *iaaH*, *ipt*, *6b* et *5* [5].

Le tryptophane mono-oxygenase *iaaM* convertit le tryptophane en indole-3-acétamide (IAM). A partir de ce dernier, l'indoleacétamide *iaaH* catalyse la synthèse de l'hormone végétale : l'acide indole acétique (AIA) [5].

Une protéine codée par le gène *ipt* induit la condensation de l'adénosine monophosphate avec l'isopentenyl pyrophosphate (iPePP) et/ou un terpénoïde inconnu, formant l'isopentenyl adénosine 5' monophosphate (ipmp) ou la Zéatine riboside-5'-monophosphate (ZMP) [5]. Les deux composés iPMP/ZMP sont rapidement convertis en trans-Zéatine (cytokinines-Zéatine) par des enzymes codées par des gènes de la plante. L'accumulation massive de l'auxine et de la cytokinine sous l'effet des enzymes *iaaM*, *iaaH* et *ipt* constitue une première étape inductrice de la tumorigénèse [6].

Les oncogènes secondaires *6b* et *5* perturbent l'effet des phytohormones dans la cellule. La protéine (tml) codée par le gène *6b* altère potentiellement la sensibilité de la cellule infectée aux phytohormones ; en augmentant sa sensibilité

aux auxines et en la diminuant envers les cytokinines [68]. Cependant, le gène 5 favorise la synthèse d'un antagoniste de l'auxine: l'indole -3- lactate [38].

1.2.2.4.2. Synthèse des opines

D'autres gènes du fragment T-DNA sont impliqués dans la synthèse des dérivés d'acides aminés, de sucres et de phosphates appelées : opines [6]. Ces opines qui résultent chimiquement de la condensation des acides aminés, des Kétoacides et des sucres, peuvent constituer 7% du poids sec des tumeurs [69].

Plus de 20 différents types d'opines ont été indentifiés dans des cas de tumeurs du collet et de chevelus racinaires [69]. Bien que ces opines ne sont pas impliquées directement dans la tumorigenèse ; elles fournissent des substances de croissance pour les agrobactéries [70]. Autrement dit, ces opines sont des médiateurs trophiques de la relation hôte-parasite; leur synthèse dans les tumeurs de "crown gall" réalise un asservissement de la cellule végétale à la production d'un substrat de croissance spécifique pour l'agent pathogène. Cet asservissement trophique favorable fait donc de la tumeur de "crown gall" une niche écologique pour *A. tumefaciens* [71].

La nature de ces substances spécifiques produites par les tissus de "crown gall" dépend de la souche bactérienne inductrice de ces tumeurs, ce qui est également corrélé à la capacité de cette même souche de dégrader l'un ou l'autre de ces substances [72]. Une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* qui provoque la formation de tumeurs contenant de l'octopine peut utiliser l'octopine pour sa croissance, mais elle n'utilise pas la nopaline. Inversement, une souche qui provoque la synthèse de nopaline, dégrade celle-ci mais n'utilise pas l'octopine [71].

Le catabolisme des opines n'est pas limité aux agrobactéries, car d'autres bactéries telles que les *Pseudomonas* spp. et les Coryneformes peuvent utiliser certains types de ces opines comme source unique d'azote et de carbone [73]. En outre, certains champignons appartenant aux genres : *Fusarium* et

Cylindrocarpon, se sont également révélés aptes à cataboliser les opines pour leur croissance [74].

1.3. Réponse de la plante vis-à-vis de l'infection par *Agrobacterium*

Bien qu'*Agrobacterium* soit largement utilisé dans la transformation génétique des plantes, nous manquons de connaissance en ce qui concerne de nombreux détails sur les événements moléculaires qui se produisent lors de l'interaction *Agrobacterium*-plante hôte. Dans une tentative pour comprendre ces mécanismes, Ditt *et al.* [75] ont étudié l'expression différentielle des gènes de la plante en réponse à l'infection par *Agrobacterium*. Ces auteurs ont pu démontrer que quatre gènes liés à la défense étaient exprimés en réponse à l'infection par des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. de même que par des souches non pathogènes. Cependant un seul gène codant pour "Nodulin-like protein" était spécifiquement exprimé en réponse à l'infection par *Agrobacterium* [75]. Ces résultats ont démontré qu'une réponse rapide vis-à-vis d'*Agrobacterium* chevauche avec une réponse générale vis-à-vis des bactéries non pathogènes mais, qui est spécifique à l'encontre d'*Agrobacterium*.

De leur côté, Veena et ses collaborateurs [76] ont également pu étudier l'expression différentielle des gènes de la plante pendant les étapes initiales de la transformation (de 0-à-36 heures), utilisant des souches d'*Agrobacterium* qui diffèrent les unes des autres dans leur capacité à transférer l'ADN-T et / ou les gènes *Vir* vers la cellule végétale. Ces auteurs ont pu identifier plus de 400 gènes de la plante, qui sont exprimés d'une façon différentielle durant les premières étapes de transformation. Le profil d'expression de ces gènes indique que l'infection par *Agrobacterium* induit une réponse de défense rapide. Cette induction représente une réponse de défense générale à toutes les souches testées (déficientes et non déficientes quant à leur ADN-T et/ou protéines *Vir*). Ces gènes de défense sont toute fois, réprimés au cours des étapes ultérieures de la transformation par *Agrobacterium* suite à l'infection par les souches compétentes quant à leur capacité du transfert d'ADN et non pas par celles déficientes. Ce qui peut s'expliquer par l'utilisation de la machinerie cellulaire de la plante par *Agrobacterium* à des fins de transformation [76].

D'après cette étude, des gènes impliqués dans la croissance et la division cellulaire; tels que ceux codant pour des protéines ribosomales, d'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans les réponses de défense telles que : le glutathionne S- transférase, l'extensines, protéines osmotins-like, protéines riches en proline, protéines PR et également des gènes de la SAR. D'autres gènes ayant un rôle dans la biosynthèse des phenylpropanoïdes ont été également identifiés. Ces protéines ont une activité antimicrobienne et peuvent avoir un rôle important dans la signalisation et la chimiotaxie vis-à-vis des micro-organismes et l'induction du stress biotique [77].

Par ailleurs, Varga et Szegedi [78], ont rapporté que l'induction d'une résistance basale par l'injection d'une solution de la flagelline, éliciteur général de résistance, réduit la formation des tumeurs chez la tabac " *in vitro*"; ces auteurs suggèrent l'exploitation de cette résistance comme un moyen de lutte contre la maladie chez la vigne. De leur côté Zipfel *et al.* [79] ont de même rapporté l'efficacité de certains éliciteurs tel que: le facteur d'élongation EF-TU, dans l'induction de la défense et la réduction de l'efficacité de la transformation par *Agrobacterium*. Les mécanismes de cette résistance basale vis-à-vis du "crown gall" ne sont pas encore connus.

D'après la littérature peu de travaux ont été menés dans l'objectif d'évaluer le comportement de la plante vis-à-vis de l'infection par *Agrobacterium*. En 1987, Vyskot et Kuhrova ont signalé l'apparition de certaines protéines PRs dans des tumeurs de crown gall chez *Nicotiana plumbaginifolia*, ces polypeptides ont été également présents dans des cals de cette espèce. La présence de ces protéines a été attribuée au rôle des phytohormones endogènes et exogènes dans l'induction de ces molécules [80]. Ces protéines PRs ont été de même signalées dans des tumeurs et des cals de *Nicotiana tabacum* [81].

1.3.1. Réaction d'hypersensibilité dans le cas du "crown gall"

Les mécanismes de défense induite telle que la réaction d'hypersensibilité (HR) et le choc oxydatif "burst oxydatif" sont généralement le résultat d'une interaction de type "gène pour gène" entre les protéines de résistance de la

plante et les protéines d'avirulence du pathogène [82, 83]. Dans le cas du "crown gall", peu d'exemples de la résistance induite ont été décrits [84]. C'est le cas des souches d'*Agrobacterium vitis* qui ont la capacité d'induire des nécroses chez la vigne et une réaction d'hypersensibilité chez le tabac [85] bien qu'elles ne possèdent le locus *hrp*. Les mécanismes de cette réaction HR ne pas encore connus. Récemment, Hansen [86] a rapporté que certaines nécroses ont été observées chez le maïs. Selon cet auteur, ces nécroses peuvent être liées à une réaction de défense induite chez la plante vis-à-vis de l'infection par *Agrobacterium*.

Selon quelques données élaborés par Xu et Pan [87], *Agrobacterium* peut détoxifier l'hydrogène peroxyde ; composé primaire du choc oxydatif, responsable de l'activité anti-microbienne et des fonctions de signal dans le cas de la défense induite. C'est ainsi que la catalase KatA d'*A. tumefaciens* qui convertit l'hydrogène peroxyde en oxygène et en eau, est nécessaire pour la virulence sur kalanchoé. Il apparaît, par conséquent, qu'*Agrobacterium* développe plusieurs stratégies afin de surmonter les mécanismes de défense induite chez la plante [6].

1.4. Gamme d'hôte d'*Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens est capable de provoquer des tumeurs sur plus de 640 espèces végétales réparties dans 93 familles botaniques [10]. Parmi les espèces fruitières les plus sensibles : la vigne [11], le pêcher [12], le prunier et l'amandier [13, 88], le pacanier [14] et certaines espèces ornementales telles que : le rosier [89, 15], le chrysanthème [16] et le *Ficus benjamina* [17]. Certaines essences forestières peuvent également être touchées c'est le cas de l'eucalyptus [20, 21], le peuplier [18] et le pin (19).

En effet, beaucoup d'espèces monocotylédones cultivées ne sont pas hôtes pour *Agrobacterium* alors qu'elles peuvent être transformées génétiquement, utilisant cette bactérie, sous des conditions contrôlées tel est le cas du maïs et du riz. Les causes de cette résistance non hôte ne sont pas encore connues [90, 91] bien que beaucoup de mécanismes ont été proposés tels que : le manque des inducteurs des gènes *vir* [92] où l'induction de la mort cellulaire programmée [86].

Certaines souches d'*Agrobacterium tumefaciens* se sont montrées supervirulentes sur certaines plantes hôtes alors qu'elle sont avirulentes sur d'autres, ce qui peut s'expliquer par la spécificité de l'interaction hôte-pathogène [13]. Parfois au sein d'une même espèce, l'incidence de la maladie varie en fonction du porte greffe utilisé, où certains portes greffes peuvent se comporter comme résistants et d'autres comme sensibles [12].

Par ailleurs, certaines souches isolées à partir du pommier ont une gamme d'hôte très réduite ou parfois ne peuvent pas induire ces tumeurs sur leurs hôtes d'origine ; ce qui est dû en partie à ces encogènes déficients dans leurs T-DNA [93].

1.5. Dégâts économiques dus à la galle du collet

Dans de nombreux pays du monde, la tumeur du collet est considérée comme l'un des plus importants problèmes rencontrés en pépinières et en culture fruitière. Rien qu'en Californie, plus de 7 millions de dollars des pertes, en 1963, lui seraient attribuées. En France, c'est surtout en pépinières que les répercussions sont plus importantes, occasionnellement, le nombre des plants malades peut atteindre et même dépasser 80% chez certains cultivars sensibles de pêcher, cerisier,...etc. [94]. La recrudescence du "crown gall" dans les pépinières fruitières françaises a provoqué des restrictions à la commercialisation et des pertes financières allant jusqu'à 6 680 000 francs pour une grande entreprise, de 1987 à 1989 [95].

En Algérie, la maladie sévit dans 99% des pépinières de production de plants fruitiers, les espèces les plus touchées sont le pêcher et l'amandier [9]. Les dommages engendrés par la galle du collet ne se limitent pas aux pépinières et peuvent être sévères dans certains vergers et vignobles. Chez la vigne, les galls apparaissent sur l'ensemble du tronc et les pieds touchés survivent rarement ; ces tumeurs sont habituellement petites et regroupées le long du cep et des rameaux [96]. En algérie, Krimi *et coll.* [21], ont évalué l'incidence de la maladie à 100% chez 60 000 plantules d'*Eucalyptus camaldulensis* au niveau d'une pépinière forestière située à l'ouet algérien (Tlemcen). De son côté, Belaskri [24] a rapporté

que cette incidence dépasse (95%) pour trois espèces différentes ; *E. camaldulensis*, *E. occidentalis* et *E. cornuta* et ce, à travers une étude menée dans six pépinières forestières de la région nord-ouest de l'Algérie.

1.6. La lutte contre le "crown gall"

Le "crown gall" constitue une grave menace pour les pépinières des espèces fruitières, du rosier et de la vigne à travers le monde. Cette maladie est capable d'engendrer des pertes économiques considérables. En Europe, 70% des pépinières ont été touchées avec une incidence qui peut atteindre 90% dans certaines parcelles d'arbres fruitiers [97]. Au Maroc, le taux d'infection varie entre 20 à 80% au niveau des pépinières de production d'arbres fruitiers [98]. De leur côté, Poncet *et al.* [99] ont rapporté qu'en France 20% du stock des portes greffes de rosier était infecté chaque année par le "crown gall".

L'utilisation des produits chimiques dans la lutte contre cette maladie s'est révélée à chaque fois inefficace. Néanmoins, plusieurs tentatives de lutte étaient préconisées afin de réduire ces infections. Parmi ces méthodes préventives, la fumigation des sols, les rotations, la sélection variétale et la lutte biologique, ont été utilisées.

1.6.1. La lutte biologique

Bien que la lutte biologique a connu beaucoup de progrès suite à la sélection de nouveaux agents de biocontrôle très efficaces, sa mise en oeuvre pratique reste difficile et devra relever plusieurs défis. Dans le cas du "crown gall", la découverte de la souche K84 à inciter à la recherche d'autres souches plus efficaces. La plupart de ces antagonistes testés n'ont pas franchi le stade des essais au laboratoire.

1.6.1.1. La souche K84 d'*Agrobacterium radiobacter*

La souche non pathogène d'*Agrobacterium radiobacter* K84, affiliée au biovar 2, a permis de lutter avec succès contre la maladie du "crown gall". Il suffit

pour protéger les plants ou les boutures de les tremper dans une suspension de la souche K84 avant leur plantation [11].

La souche K84 ne possède pas le plasmide Ti responsable de l'oncogénicité, mais elle héberge un autre plasmide pAgK84 codant pour la production d'une bactériocine appelée : agrocine 84, active vis-à-vis des souches à plasmide de type nopaline et de type agrocinopine [100]. Il s'agit d'une bactériocine hautement sélective. En effet, la réussite de la souche K84 ne dépend pas uniquement de la production de cet antibiotique, elle peut être également liée à la survie de cet antagoniste dans le sol et de son aptitude à la colonisation du système racinaire [101].

1.6.1.2. Autres souches antagonistes

Le traitement par la souche K84 n'est malheureusement pas efficace contre toutes les souches d'*Agrobacterium*, comme c'est le cas des souches du biovar 3 et celles du biovar 1 à octopine qui se sont montrées résistantes [102, 11]. D'autre part, cette souche présente l'inconvénient de perdre parfois une partie de son efficacité et ce, suite à l'acquisition du plasmide pAgK84 par les agrobactéries pathogènes, ce qui les rend résistantes.

A la recherche de nouveaux antagonistes, beaucoup d'agents de biocontrôle ont été testés, mais la plupart ne franchissent pas toujours le stade des essais. Néanmoins, certaines souches se sont montrées efficaces vis-à-vis des souches qui n'ont pas pu être contrôlées par la souche K84. Selon Donner *et coll.* [103], la souche K434 dérivée de la souche K84 qui a perdu son plasmide pAgK84 alors qu'elle retient deux autres plasmides pAtK84b et un plasmide pAgK434 cryptique. Ce dernier code pour la production de l'agrocine 434, bactériocine très active vis-à-vis des souches du biovar 2 alors qu'elle ne l'est pas à l'égard des souches du biovar 1 et 3. Quant à la souche K1026, elle dérive aussi de la souche K84 dont elle est issue d'une manipulation génétique de cette dernière et ce, par délétion du fragment responsable du transfert du plasmide pAgK84. Cette souche présente les mêmes caractéristiques que la souche K84 quant à la production de l'agrocine

84 et la colonisation racinaire et elle ne présente pas l'inconvénient de perdre parfois une partie de son efficacité [104, 105].

1.6.2. Prophylaxie

L'utilisation de la souche K84 n'exclut pas les mesures sanitaires, elle ne fait que les compléter. De même, une bonne prophylaxie prépare le terrain pour une action meilleure et plus durable à la souche K84 [106].

Au niveau des pépinières, les mesures préventives reposent sur la désinfection des outils utilisés pour la multiplication végétative, l'incinération de tous les plants malades et la plantation du matériel sain dans des sols exempts de la maladie.

Le sol constitue un véritable réservoir pour les agrobactéries ; qui peuvent y être présentes à des densités relativement élevées ; allant de 10^4 à 10^8 cellules par gramme du sol [107]. Ces bactéries ont la capacité de se maintenir longtemps et à des densités très élevées dans le sol [108, 109]. Mais, vu qu'il n'existe pas de moyens efficaces pour diminuer le taux d'*Agrobacterium* dans le sol, l'utilisation de certaines techniques de détection telles que la réaction de polymérisation en chaîne "PCR" couplée à la technique du nombre le plus probable "MPN-PCR", permet de détecter ces agrobactéries pathogènes dans le sol [93] et par conséquent, les risques de déclenchement d'une épidémie de "crown gall" consécutive à la plantation de plantes sensibles dans un sol contaminé, peuvent être évalués.

Selon Nesme [110], la détection des agrobactéries pathogènes dans les sols des marcottières a permis de confirmer les travaux de Giraud *et coll.* [111], montrant que les portes greffes de pommier sont généralement contaminés au moment de l'arrachage des marcottes. Pour cela, la diffusion du matériel végétal doit se faire à partir des marcottières les moins contaminées. Ainsi, les marcottières les plus infectées devront être peu à peu remplacées et il faudra donc disposer d'un nombre important de plants de base sains qui pourront être obtenus préférentiellement à partir de plantations indemnes. En outre, l'évaluation

rapide de l'état sanitaire des sols grâce à la technique "PCR" permet d'établir les futures pépinières sur des sols non contaminés [110].

La rotation des cultures, en alternance avec des plantes insensibles ou résistantes à *Agrobacterium*, permet aussi de limiter ces épidémies [112, 113, 114].

1.6.3. La lutte génétique

Afin de parvenir à lutter avec succès contre la galle du collet, Escobar *et coll.* [115] ont développé un moyen de contrôle qui vise le processus de la tumorigenèse où ; deux espèces végétales : *Lycopersicon esculentum* et *Arabidopsis thaliana* ; connues pour leur sensibilité au "crown gall", ont été génétiquement modifiées via des souches d'*A. tumefaciens* ; en reprimant d'une manière active " gènes silencing " les deux oncogènes *ipt* et *iaaM*. Ces plants ont par conséquent développé une résistance vis-à-vis des souches pathogènes d'*A. tumefaciens*.

Des techniques ont été exploitées afin de détecter *Agrobacterium tumefaciens* dans la plante et au niveau du sol, tel que le cas de la technique "PCR" utilisée par Dong *et al.* [116] dans l'objectif de détecter *Agrobacterium* sur des boutures de la vigne. Cette méthode assure une meilleure certification du matériel végétal destiné à l'installation de nouvelles pépinières.

1.6.4. La sélection variétale

La nature de la maladie décrite selon Schell [117] par une "colonisation génétique", a rendu inefficace l'utilisation des produits chimiques dans la lutte contre le "crown gall". Ainsi, la désinfection des sols qui semble efficace est très coûteuse ; difficile à appliquer et non fiable car les sols traités sont sensibles aux contaminations. En outre, la sévérité de la maladie est plus élevée au niveau des sols recontaminés vu le manque des antagonistes [26].

De nombreux efforts ont été orientés vers la recherche et la sélection des génotypes résistants aux "crown gall". Différents niveaux de susceptibilité ont été enregistrés chez certaines espèces hôtes telles que : *Prunus* spp. [118, 88, 12, 119], *Juglans* spp. [120], *Vitis* spp. [121], *Populus* spp. [122] et *Rosa* spp. [123, 89]... etc.

Les mécanismes de cette résistance génotypique ne sont pas généralement bien compris, alors que les facteurs contrôlant la tumorigenèse et qui sont liés au pathogène sont plus clairs que ceux liés à la plante [124, 5].

Selon Beneddra *et al.* [122], la susceptibilité des cultivars d'asperge au "crown gall" est liée à leur sensibilité aux cytokinines. Cependant, chez l'*Arabidopsis*, elle peut être attribuée soit au faible attachement de la bactérie ou encore à l'inefficacité de l'intégration du T-DNA [84, 125]. D'autres chercheurs se sont orientés vers la recherche des ressources putatives de la résistance chez un nombre d'espèces de *Prunus* utilisées souvent comme porte-greffes. Les travaux de Bliss *et al.* [88] ont rapporté que le taux des plants résistants peut atteindre 30% comme c'est le cas chez *Prunus mahaleb*.

De leur côté, Pierronnet et Salesses [118] ont étudié le comportement de quelques hybrides et cultivars de l'espèce *Prunus* vis-à-vis d'*A. tumefaciens*. Ils ont remarqué que le taux de sensibilité est faible tant parmi les clones *Prunus domestica* que parmi les hybrides ayant cette espèce comme parent, ce qui la rend intéressante pour des plans de croisements afin d'introduire une moindre sensibilité à *Agrobacterium*. Par ailleurs, quelques clones de rosier se sont montrés plus tolérants à des inoculations par *A. tumefaciens*, tel est le cas du clone *Rosa multiflora* qui pourrait être le plus intéressant [89].

CHAPITRE 2

GENERALITES SUR L'EUCALYPTUS

2.1. Systématique de l'*Eucalyptus*

Selon la nouvelle classification des plantes à fleurs proposée par les botanistes de l'Angiosperm Phylogeny Group (A.P.G.), le genre *Eucalyptus* fait partie de: [126]

Embranchement : Spermaphytes.

Sous -Embranchement : Angiospermes.

Classe : Eudicotylédones.

Sous - Classe : *Rosidées* - *Eurosidées* II.

Ordre : *Myrtales*.

Famille : *Myrtacées*.

L'eucalyptus est l'un des genres les plus importants de la famille des *Myrtaceae*. Chez ce genre qui renferme plus de 500 espèces, les fleurs présentent des étamines qui sont plus remarquables que les pétales, donnant à l'inflorescence un aspect de goupillon [127].

2.2. Qualités spéciales des eucalyptus et leurs utilisations

La croissance rapide des *eucalyptus*, la qualité de leur bois et leur aptitude à assécher les terres humides ont conduit à leur introduction dans toutes les zones au climat propice (allant du 45^{ème} parallèle nord au 45^{ème} parallèle sud). Dans certaines d'entre elles, ils forment maintenant une part significative du couvert végétal [128].

A partir de cette idée, ces espèces sont alors recherchées pour la fabrication de pâte à papier, comme elles rentrent dans l'industrie du sciage et de la fabrication du contreplaqué. Elles donnent aussi d'excellents bois de construction en raison de leur croissance rapide en hauteur [129].

L'un des intérêts de ce genre est la diversité de la composition des huiles essentielles que fournissent les feuilles, diversité d'autant plus grande que des chimiotypes sont très fréquents. Ces huiles essentielles notamment le " Biocénol ", sont douées de propriétés antiseptiques sur de nombreux germes des voies respiratoires [128].

Par ailleurs, beaucoup d'espèces d'*Eucalyptus* peuvent fournir du tanin soit par leurs bois soit par leur écorce ou par leurs feuilles tel que : *E. redunca*, *E. albens* [129]. Les tanins des eucalyptus sont des mélanges complexes d'esters, de glucides et d'acides phénoliques [130, 131, 132]. La molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas, d'autres molécules ont été identifiées telles que : l'arabinose et le rhamnose. Pour les acides phénoliques ; l'acide gallique, l'acide ellagique, l'acide shikimique, l'acide hexahydroxydiphénique, le pyrogallol et la catéchine ont été identifiés [133]. Certains tanins telles que ; les elligitanines extraites à partir de l'espèce *E. nitens* agissent comme étant une barrière antimicrobienne [134]. D'autres tanins ont été utilisés aux USA pour abaisser le point de congélation des nappes de boue dans les puits de forage, tel que le cas du " Myrtan" qui peut être extrait à partir des deux essences : *E. redunca* var. *elata* et *E. accendens* [129].

Le bois d'eucalyptus peut être également valorisé en bois d'énergie du fait de son pouvoir calorique élevé. Tandis que, les plantations d'eucalyptus peuvent constituer des haies d'ombrage pour le bétail, comme elles peuvent être utilisées à titre ornemental dans les parcs et les jardins [135].

2.3. Origine et introduction des eucalyptus en Algérie

Les eucalyptus sont originaires d'Australie comme de nombreuses autres *Myrtacées*. Certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de haut, ce sont les *Eudicots* les plus hautes et constituent d'excellents bois de construction [126].

En Algérie, l'eucalyptus a été introduit par les français en 1860. L'espèce pionnière semble être l'*Eucalyptus camaldulensis*, mais d'autres espèces furent introduites à titre d'essai dans la région d'Alger. Cette zone leur a été tellement favorable que des hybrides naturels y sont apparus, tels que : *E. algeriensis* [136].

Dans les années 40 et 50, les eucalyptus furent introduits dans 18 arboretas couvrant les étages bioclimatiques humide et même semi-aride. Dans ce cadre, pas moins de 130 espèces ont été plantées sur le territoire national [136].

Les superficies plantées étaient estimées en 1965 à 28 200 hectares [135]. Dans le but de répondre aux besoins nationaux en produits ligneux et papetiers, des reboisements à base d'eucalyptus, ont commencé durant les années 60 et 70 notamment à l'Est du pays (El-Kala, Annaba, Skikda), au centre (Tizi-Ouzou et Baïnem) et à l'ouest (Mostaganem). En 1982, il a été mis fin à la production des plants d'eucalyptus en pépinières et, par conséquent, à leur plantation. Les dégâts qu'ont subis ces peuplements à cause de l'attaque du *Phoracantha semipunctata* ont été pour beaucoup dans la décision de son interdiction, tandis que nos voisins tunisiens et marocains ne l'ont pas traité de la même façon. Au contraire, ces peuplements ont toujours eu les faveurs des reboiseurs pour leur rôle dans l'alimentation des usines de pâte à papier, de panneaux de particules et même de sciage [136].

Ces dernières années, les seuls arbres exploitables en Algérie se trouvent être les boisements d'eucalyptus plantés il y a une trentaine d'années [136].

2.4. Quelques essences d'eucalyptus cultivées en Algérie

En raison des immenses avantages que les plantations d'eucalyptus sont susceptibles d'apporter au pays, notamment en produits ligneux et papetiers, un grand nombre d'espèces d'eucalyptus a été planté sur le territoire national durant les années 60 et 70 [136]. Ce genre, malgré son interdiction, en 1982 suite aux attaques du *Phoracantha*, semble revenir ces dernières années sur la scène et même être réhabilité par sa disponibilité, sa croissance rapide, son aptitude à rejeter facilement, donc à produire une importante masse ligneuse en peu de temps [136].

Un total de 130 espèces d'eucalyptus introduites en Algérie a été recensé, dont très peu plantées à grande échelle. A côté de l'espèce la plus répandue en Australie et en Algérie *E. camaldulensis*, des espèces telles que : *E. umbellata* (*tereticornis*) et *E. occidentalis* sont très utilisées dans les pépinières d'espèces forestières dans notre pays. D'après Jacobs [135], des essais ont pu sélectionner quelques espèces convenant aux zones d'altitude telle que : *E. melliodora* tandis que d'autres se sont montrées vigoureuses aux environs d'Alger telle que : *E. punctata*.

2.4.1. *Eucalyptus umbellata* = *E. tereticornis* (Forest red gum).

Son aire d'origine, s'étend très largement en latitude du Victoria méridional jusqu'aux savanes de la côte papoue en Papouasie-Nouvelle-Guinée. La hauteur de l'arbre peut aller jusqu'à 45m avec un tronc droit et une cime assez dense [135]. L'écorce contient 3 à 15% de tanins et le bois en contient 6 à 12% [129]. Les jeunes feuilles adultes sont lancéolées étroites souvent courbées. Le bois est de couleur rouge, dur et de texture homogène [135]. Cette espèce s'est montrée relativement indemne de parasites et de maladies.

L'espèce *Eucalyptus tereticornis* pousse sur des sols variés, avec une préférence pour les sols profonds, bien drainés, de texture assez légère y compris des sols alluviaux, des limons et des argiles sableuses. Un pH neutre ou légèrement acide lui convient mais, non un pH fortement acide [135].

2.4.2. *Eucalyptus occidentalis* Endl. (Flat-topped yate)

Originaire de l'Australie occidentale où elle peut atteindre 21m de haut [137], cette espèce se caractérise par un tronc passable, une cime étalée et une écorce fibreuse riche en tanins. Les feuilles juvéniles sont d'abord opposées puis alternes, elliptiques, ovales avec un bord légèrement ondulé. Les feuilles adultes sont pétiolées et lancéolées [135]. C'est une excellente espèce mellifère à bois de couleur pâle, dur et durable [137]. C'est une essence de reboisement intéressante en raison de son aptitude à former des peuplements dans les régions sèches marginales de type méditerranéen [135].

2.4.3. *Eucalyptus albens* Benth.

Cette espèce peut être trouvée dans la Nouvelle Galles du sud, en Victoria et en Australie Méridionale [135]. L'une des espèces à tanins, elle en contient 5% dans l'écorce. Cette dernière est fibreuse, persistante est généralement limitée au tronc et aux grosses branches, s'étendant rarement aux petites branches. L'écorce de ces dernières étant le plus souvent lisse. C'est une espèce à bois de couleur blanche, dur et de texture assez serrée [129].

2.4.4. *Eucalyptus punctata* (Grey gum)

L'aire naturelle de cette espèce s'étend sur la côte et les chaînes côtières du centre de la Nouvelle-Galles du sud jusqu'aux monts Carnarvon dans le centre sud du Queensland. C'est une espèce peu exigeante en ce qui concerne le sol. L'arbre en Australie peut atteindre 35 m de haut avec un fût court ou moyen et une cime assez belle [135]. Les feuilles des jeunes plants sont opposées, puis alternes, pétiolées, de taille et de formes variables (linéaires à lancéolées larges). C'est un arbre à bois lourd, de qualité supérieure "dur" et résistant "durable" ; bon pour la construction, son utilisation pour le reboisement est très limitée. Selon Jacobs [135], C'est une espèce qui pousse aux environs d'Alger.

2.4.5. *Eucalyptus melliodora* A. Cunn. (Yellow box)

Son aire naturelle s'étend en latitude sur le versant continental de la cordillère australienne, dans le Victoria, la Nouvelle-Galles du Sud, jusqu'aux monts Carnarvon dans le centre sud du Queensland. L'arbre peut avoir 20 à 30m de haut avec un fût de belle forme et une belle cime arrondie. L'écorce intérieure est jaune, d'où le nom " Yellow box " [135]. Sa teneur en tanins est de 7% dans l'écorce et de 6% dans le bois [129]. Les jeunes feuilles sont d'abord opposées puis alternes, pétiolées, oblongues ou elliptiques. Les feuilles adultes sont lancéolées à lancéolées étroites. *E. melliodora*, comme son nom l'indique constitue une des meilleures espèces mellifères d'eucalyptus [135].

2.5. Ravageurs et maladies de l'eucalyptus

Les eucalyptus connaissent depuis plusieurs années d'importants problèmes entomologiques et phytopathologiques. Parmi les insectes ravageurs, le *Phoracantha semi-punctata* est le parasite le plus dangereux. De nombreux champignons et bactéries sont également responsables de maladies très sérieuses sur l'eucalyptus.

2.5.1. Insectes ravageurs

Du point de vue entomologique, les plantations d'eucalyptus peuvent être attaquées par un redoutable coléoptère xylophage : *Phoracantha semi-punctata*, son aire d'origine se trouve en Australie et il a été introduit en Algérie il y a une vingtaine d'années [138]. Ce ravageur est strictement inféodé à l'eucalyptus, il peut attaquer toutes les espèces ; en creusant des galeries entre l'écorce et l'aubier [139].

Pour la plupart des espèces d'eucalyptus, les infestations sur la partie inférieure du tronc peuvent provoquer des dommages irréparables et entraîner la mort des sujets attaqués [140].

2.5.2. Maladies causées par des champignons phytopathogènes

De nombreux champignons sont également à l'origine de graves affections sur l'eucalyptus.

2.5.2.1. Le chancre du tronc de l'eucalyptus

Des espèces appartenant au genre *Botryosphaeria* spp. telles que : *B. dothidea*, *B. eucalyptorum* et *B. parvum-N* sont des champignons pathogènes responsables des chancres du tronc de divers eucalyptus [141, 142, 143, 144]. En Afrique du Sud, Smith *et al.* [145] ont signalé que *B. dothidea* est l'agent causal du chancre et du dépérissement de certaines espèces d'eucalyptus. Parmi les espèces sensibles; *E. smithii*, *E. camaldulensis*, *E. grandis* et *E. nitens*.

Un autre champignon *B. ribis* provoque chez *E. camaldulensis* des lésions circulaires (de 1 à 5mm de diamètre) de couleur pourpre rougeâtre, sur les capsules de semences, les pédoncules, les pédicelles, les brindilles et les nervures des feuilles. Les taches nécrotiques qui se développent sur les capsules peuvent induire leur avortement précoce, ce qui les rend invendables [146]. De leur côté, Shearer *et al.* [147] ont rapporté que l'infection par ce pathogène peut induire la mort de l'espèce *E. radiata*.

2.5.2.2. Néoformations

En 1935, Salgue a signalé de remarquables néoformations sur l'eucalyptus dues à *Ustilago vriesiana* Vuill, une des rares Ustilaginales qui attaquent les éléments ligneux [148].

2.5.2.3. Fonte des semis " Damping off "

Selon Batista [149], *Cylindrocladium scoparium* Morgan est l'agent causal du " Damping off ", l'infection la plus grave atteignant les plantules d'eucalyptus. Ces dernières s'étiolent puis dépérissent très rapidement et meurent. Une infection pré-levée peut avoir lieu suite à l'invasion de la graine ou des hypocotyles, comme

il peut y avoir une infection post-levée due à la vulnérabilité des tissus des tiges qui ne sont pas encore bien lignifiés [150]. Des inoculations faites par ce champignon, sur des hypocotyles de jeunes plantules d'eucalyptus, peuvent induire des nécroses accompagnées d'un flétrissement. Ces symptômes sont moins sévères lorsqu'il s'agit de *Cylindrocladium clavatum* [151]. Au sud de Florida, Barnard [152] a signalé que l'utilisation de certains fongicides tel que : le benomyl s'est montrée efficace vis-à-vis de cette maladie.

Cette maladie a été signalée au Brésil [153], en Éthiopie [154], en Afrique du sud [155, 156] et en Inde [157] où des pertes dues à la maladie, ont été estimées à 55.95 % chez des plantations d'*E. tereticornis* âgées de 5 à 11 ans [158].

1.5.2.4. La maladie Rose " Pink disease "

Corticium salmonicolor Berk et Br. est un champignon responsable d'un dépérissement rapide chez l'eucalyptus. Les premiers symptômes de l'infection se manifestent généralement par une exsudation de gomme ou de résine sur les rameaux ayant une écorce jeune et mince, suivi de l'apparition de filaments mycéliens soyeux, brillants, qui deviennent plus denses et prennent avec le temps la couleur rosée. Au fur et à mesure que l'écorce meurt, cette couche de mycélium se dessèche en formant des pustules et des croûtes de couleur rose [135].

Corticium salmonicolor passe par quatre formes de croissance successives sur les tiges et les branches. Ces phases sont respectivement nommées : " Cobweb ", " Pustule ", " Necator " et " Pink incrustation ". Cette dernière forme constitue le symptôme caractéristique du Pink-disease [150].

2.5.2.5. Tumeurs induites par *Alternaria alternaria*

Alternaria alternaria est un champignon, qui provoque des tumeurs et des chancres chez *E. globulus*. Des chloroses peuvent être également observées au niveau des feuilles. Les tumeurs se développent sur les nervures principales des feuilles, les tiges et le long des pétioles. Des examens histologiques réalisés au niveau des tumeurs montrent une destruction des tissus vasculaires avec une

hydrolyse totale des vaisseaux de xylème sous forme d'une grande cavité. Ces cavités diffèrent des poches sécrétrices schizogènes; présentes chez les feuilles d'eucalyptus et qui s'entourent d'une couche de cellules spéciales [159].

En Egypte, Khattab et Khattab [160] ont rapporté que des tumeurs semblables peuvent être induites par des insectes, qui se nourrissent du xylème "gall-forming psyllid". Ces tumeurs se développent également sur les nervures principales des feuilles, sur les pétioles d'*Eucalyptus obliqua*. L'attaque par l'insecte peut provoquer une perturbation au niveau des tissus et parfois même la mort des jeunes branches attaquées. Ainsi, une cavité peut résulter de la destruction des tissus de xylème, cette cavité peut servir comme habitat pour l'insecte inducteur.

2.5.2.6. La défoliation

En (1934) Wallace a observé qu'une espèce de *Stilbum* sp. causait une défoliation des eucalyptus. Cette maladie se développe en saisons froides et humides pendant lesquelles les eucalyptus présentent une grande susceptibilité [161].

2.5.2.7. Les tâches foliaires

De nombreux parasites peuvent être à l'origine des taches foliaires chez l'eucalyptus, parmi eux : *Sphaerulina eucalypti* qui entraîne des taches grises, irrégulières, bordées d'une marge étroite [162]. De leur côté, Wingfield *et al.* [163] ont signalé qu'au Chili, *Aulographina eucalypti* (Cooke & Masee) Arx & E. Müll. provoque des lésions distinctes, circulaires marron sur les feuilles matures d'eucalyptus. Par ailleurs, une autre espèce ; *Fairmaniella leprosa* (Fairm) Petr & Syd. peut également provoquer des taches foliaires rondes, irrégulières, de couleur marron foncé chez l'eucalyptus.

De nouvelles espèces de *Mycosphaerella* inductrices des taches foliaires chez *E. globulus* ont été identifiées en Espagne, parmi ces champignons;

Mycosphaerella ellipsoidea (Crous et M.J. Wingfield), *M. gracilis* (Crous et Alfenas), *M. lateralis* (Crous et M.J. Wingfield)...etc [164].

2.5.2.8. Maladies racinaires

De graves dommages ont été causés à l'eucalyptus officinal en Argentine par *Genoderma sessile* Murill. L'infection est causée soit par des spores tombant sur des blessures ou lésions de racines exposées à l'air soit par le mycélium qui passe d'une racine atteinte à une racine saine. Le développement de la maladie peut être favorisé par l'effet de l'humidité [165]. D'autre part, de jeunes arbres d'eucalyptus peuvent être attaqués au niveau des racines et du collet par *Pythium splendens*. Les symptômes se manifestent par la décoloration du feuillage en rouge, ce dernier se fane par la suite, puis l'arbre flétrit et meurt [166].

2.5.3. Les maladies virales

Certaines maladies dues à des virus ont été également signalées chez l'eucalyptus :

2.5.3.1. Le virus de la mosaïque du tabac (TMV)

Maladie causée par le TMV dont les espèces hôtes sont *E. tereticornis*, *E. citrodora* et *E. macrorhyncha* [167]. Chez *E. citrodora*, l'infection provoque une coloration rouge intense des bourgeons terminaux, un aspect broussailleux dû à l'augmentation du nombre des bourgeons axillaires. Des symptômes de mosaïques sont ainsi observés sur les feuilles plus âgées [168].

2.5.4. Maladies causées par des phytoplasmes

2.5.4.1. Little leaf disease (maladie de petites feuilles)

L'attaque est due à un phytoplasme et se manifeste par un rabougrissement des plants avec des feuilles très réduites à limbe mince et étroit, de couleur pâle ; la croissance des bourgeons axillaires est stimulée donnant une forme

buissonnante aux plantules. Parmi les espèces touchées *E. tereticornis* et *E. globulus* [167]. En Italie, Marcone et al. [169] ont attribué l'origine de cette maladie à un phytoplasme très proche génétiquement des phytoplasmes appartenant au groupe des " Elm yellow ".

2.5.5. Maladies Bactériennes

2.5.5.1. Le flétrissement bactérien " bacterial wilt "

Pegg et al. [170] ont rapporté que *Ralstonia solanacearum* peut causer le flétrissement bactérien chez deux espèces d'eucalyptus; *E. pellita* et *E. urophylla*, en Queensland (État au nord est de l'Australie). Selon les mêmes auteurs, ce flétrissement affecte généralement les jeunes arbres plantés sur des terrains agricoles. Cette maladie se caractérise par un flétrissement brut et la mort des branches ou du collet entier. Ces symptômes sont parfois associés à des nécroses.

2.5.5.2. La tumeur du collet " crown gall "

Le "crown gall" ou la tumeur du collet est une maladie bactérienne très sérieuse causée par *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn ; que l'on trouve habituellement dans le sol [1]. Cette maladie est spécifiquement importante chez les arbres fruitiers, le rosier et la vigne [171]. Certaines essences forestières tel que l'eucalyptus; n'ont pas également échappé aux infections par le "crown gall".

En 1929, Siemaszro a signalé qu'en Transcaucasie (au sud du Caucase) des plantations d'eucalyptus ont été sévèrement touchées par le "crown gall" [22]. De son côté, Imazeki [23] a rapporté que les eucalyptus étaient parmi les essences forestières endommagées par la maladie, et depuis, aucune épidémie n'a été signalée chez cette essence. En Algérie, les symptômes caractéristiques du "crown gall" ont été remarqués sur l'eucalyptus pour la première fois par Krimi [20], où, des tumeurs du collet rappelant celles du "crown gall" ont été observées sur 60 000 plantules d'*Eucalyptus occidentalis*, au niveau d'une pépinière

forestière à Sidi M'djahed (Tlemcen). Selon Krimi *et al.* [21], les analyses biochimiques et moléculaires des isolats bactériens obtenus de ces tumeurs ont révélées leur affiliation au biovar 1 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Au niveau de la même pépinière, l'incidence de la maladie était estimée à 100% chez l'espèce *Eucalyptus occidentalis*. Cependant, aucune infection n'a été signalée chez les deux espèces *Eucalyptus camaldulensis* et *Eucalyptus cladocalyx*.

Dans l'objectif de poursuivre le travail de Krimi [172], Belaskri [24] a évalué l'incidence du "crown gall" dans les pépinières forestières de cinq willayas de l'Ouest algérien et ce, durant les deux campagnes (2003-2004) et (2004-2005). D'après cette étude, une forte incidence de la maladie a été enregistrée dépassant (95%) pour les espèces (*Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus occidentalis* et *Eucalyptus cornuta*) tandis qu'elle ne dépasse pas (1.62%) chez l'espèce *E. gomphocephala* et quant à l'espèce *E. cladocalyx*, elle s'est montrée résistante vis-à-vis de l'infection naturelle par le "crown gall". Un autre travail mené par Baouch [173] afin de tester la sensibilité de six espèces d'eucalyptus vis-à-vis du "crown gall". D'après cette dernière expérimentation, l'espèce *E. cladocalyx* s'est montrée la plus sensible avec un taux d'infection de (48.82%) tandis que chez les deux espèces (*E. saligna* et *E. punctata*), ce taux n'a pas dépassé les 30%.

CHAPITRE 3

MATERIELS ET METHODES

3.1. Matériel végétal

3.1.1. Origine du matériel végétal utilisé

Dans le but de rechercher une résistance intrinsèque chez quelques espèces d'*Eucalyptus* vis-à-vis du "crown gall", nous avons choisi 5 espèces d'*Eucalyptus* cultivées en Algérie. La semence de ces espèces nous a été judicieusement fournie par l'Institut National de la Recherche Forestière (I.N.R.F) de Baïnem, Alger (Tableau 3.1).

Tableau 3.1: Origine de la semence des espèces d'eucalyptus utilisées

Genre	Espèce	Date de récolte	Origine
<i>Eucalyptus</i>	<i>E. umbellata</i>	été 2006	I.N.R.F de Baïnem. Alger
	<i>E. albens</i>	été 2006	I.N.R.F de Baïnem. Alger
	<i>E. punctata</i>	22-10-2007	I.N.R.F de Baïnem. Alger
	<i>E. melliodora</i>	21-10-2007	I.N.R.F de Baïnem. Alger
	<i>E. occidentalis</i>	10-2006	I.N.R.F de Benaïm. Alger

3.1.2. Désinfection de la semence

La désinfection superficielle consiste à immerger les semences durant 30 secondes dans l'alcool à une concentration de 70%. Les semences sont par la suite trempées pendant 10mn dans une solution d'hypochlorite de Sodium à 4%. Ensuite, ces dernières sont rincées abondamment par trois passages successifs de 5, 10 et 15 mn, dans de l'eau du robinet stérilisée [174]. Après une série de désinfections et de rinçages successifs, les semences sont mises sur un papier buvard stérile pour leur séchage.

3.1.3. Semis

Les semences désinfectées sont semées dans des bacs de semis en plastique contenant un mélange de 1/3 de sol stérilisé, 1/3 de sable stérilisé et 1/3 de tourbe stérilisée. Ces bacs sont ensuite maintenus sous serre et sont arrosés régulièrement avec de l'eau stérilisée.

3.2. Matériel biologique

3.2.1. Origine des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* pathogènes utilisées

Les trois souches bactériennes pathogènes utilisées dans la présente étude appartiennent à la collection du laboratoire de phytobactériologie (département d'Agronomie de l'Université Saad Dahleb, Blida). Parmi ces souches, deux souches locales E2X et E17 ont été isolées à partir des tumeurs de "crown gall" issues des espèces d'eucalyptus [172, 21] et une souche de référence *Agrobacterium tumefaciens* C58 [175] (Tableau 3.2). Ces souches ont été conservées dans l'eau distillée stérilisée à une température de 4°C. Leur pureté a été vérifiée par étalement sectoriel et purifications successives sur le milieu MG (Appendice B) [176].

Tableau 3.2 : Origine des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées.

Souche	Origine végétale	Origine géographique	Année d'isolement	Source
E17	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	Tlemcen (Algérie)	(2003)	Krimi Z. Université Saad Dahleb, Blida
E2X	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	Tlemcen (Algérie)	(2003)	Krimi Z. Université Saad Dahleb, Blida
C58	<i>Prunus cerasus</i>	New York (U.S.A.)	(1955)	Dickey R.S. Cornell University, Ithaca, N.Y.

3.2.2. Vérification du pouvoir pathogène des souches bactériennes utilisées.

Afin de vérifier le pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées dans notre étude, nous avons retenu trois plantes test : la tomate (*Lycopersicon esculentum* Var. Marmande), le kalanchoé (*Kalanchoé daigrementiana*) et le datura (*Datura stramonium*), plantes hôtes pour *Agrobacterium tumefaciens*.

Les jeunes plantules tests de chaque espèce ont été élevées sous serre, jusqu'au stade 3 à 4 feuilles dans des alvéoles contenant un mélange de deux volumes du sol stérilisé et un volume de tourbe stérilisée. L'inoculation consiste à déposer à l'aide d'une auge stérile, de la culture bactérienne pure âgée de 24 heures au niveau d'une blessure réalisée sur la tige pour la tomate et datura et sur le limbe de Kalanchoé, à raison de trois répétitions par espèce et par souche bactérienne [176].

Les témoins positifs sont inoculés avec la souche bactérienne tumorigène C58 et les témoins négatifs sont inoculés avec de l'eau distillée stérilisée. Les plantules inoculées sont maintenues sous serre à une température au voisinage de 27°C. La lecture des résultats par notation de la présence ou l'absence des tumeurs est réalisée après 3 à 4 semaines.

3.2.3. Mesure de la concentration cellulaire des souches bactériennes tumorigènes utilisées pour l'inoculation

Afin d'ajuster la suspension bactérienne de chaque souche aux concentrations suivantes: 10^9 , 10^6 et 10^3 , la turbidité (densité optique) de chaque suspension a été mesurée par calcul de la concentration cellulaire exprimée en CFU/ml (ou UFC : unité formant une colonie) et ce, suivant la méthode de dénombrement des bactéries viables par culture en boîte de pétri. La méthode consiste à préparer à partir d'une culture bactérienne pure âgée de 48 à 36 heures une suspension bactérienne homogène. De cette dernière, une série de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-8} est préparée. Après avoir mesuré la densité optique de chacune des dilutions en série : 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} , un volume de 0.1ml de chacune est étalé sur le milieu MG en boîte de pétri ; à raison de trois répétitions par dilution. Les boîtes ainsiensemencées par étalement, sont mises en incubation à une température de 27°C pendant 36 heures.

La lecture est faite par comptage du nombre de colonies par boîte de pétri (CFU/ml). A partir de ces valeurs, la courbe étalon est tracée, elle exprime les variations de la densité optique (DO) en fonction de la densité bactérienne (CFU) par ml d'eau distillée stérilisée. Ensuite, d'après cette courbe, la courbe de tendance est tracée et à partir de cette dernière (Appendice C), la (DO) de chaque concentration voulue est déduite. La densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway : 6405 UV/Vis) étalonné au préalable à ($\lambda = 600\text{nm}$).

3.3. Essais d'inoculation sous serre

Afin de procéder à la recherche des génotypes résistants au "crown gall" chez l'eucalyptus, nous avons choisi cinq espèces. : *E. umbellata*, *E. albens*, *E. punctata*, *E. melliodora* et *E. occidentalis*. Notre choix s'est limité à cinq espèces, vu que nous n'avons pu avoir qu'une quantité limitée de semences.

Ces espèces sont inoculées par trois souches bactériennes tumorigènes, utilisant trois concentrations (10^3 , 10^6 et 10^9 CFU/ml) pour chaque souche bactérienne.

3.3.1. Dispositif expérimental de l'essai sous serre

Les plants sont disposés sur une paillasse métallique distante du sol par 1m pour éviter tout type de contamination issue du sol (Appendice D). Le dispositif expérimental de l'essai d'inoculation sous serre, a été fait selon un plan de randomisation totale [177] dont, l'effectif des individus par espèce était de 160 plants. le choix des individus avait porté sur les plants ayant un diamètre qui oscille entre 0,55 et 1mm avant l'inoculation et ce, dans l'objectif d'avoir une moindre hétérogénéité entre les unités expérimentales testées. Pour chaque espèce, nous avons 10 traitements (Figure 3.1) et chaque traitement est affecté (inoculation par 50 µl de la suspension bactérienne) d'une façon complètement aléatoire sur 16 plantules de chacune des espèces testées (Tableau 3.3). Les témoins négatifs ont été inoculés avec 50 µl d'eau distillée stérilisée.

Durant la période froide, nous avons installé une miniserre sur la paillasse afin d'éviter les températures basses qui peuvent avoir un effet néfaste sur la conduite mais, elle a été désinstallée dès que les températures sont devenues plus modérées (25- 27°C).

3.3.2 . Méthode d'inoculation

L'inoculation artificielle par *Agrobacterium tumefaciens* consiste à réaliser une blessure à travers laquelle la bactérie se met en contact avec les cellules de l'hôte. Pour cela, une incision de 5mm de longueur est effectuée, à l'aide d'une seringue stérile, au niveau de la tige de chaque plant. Cette blessure doit être distante de 1cm du collet. A l'aide d'une micropipette stérile, un volume de 25µl de la suspension bactérienne est injecté au niveau de cette incision. Ce volume est apporté en deux fois; dans le but d'inoculer 50µl pour chaque plant et ce pour assurer une bonne pénétration de l'inoculum et pour permettre une longue durée de contact de la bactérie avec les tissus blessés (le laps de temps entre ces deux inoculations doit être réduit au maximum à fin d'éviter la multiplication rapide des bactéries).

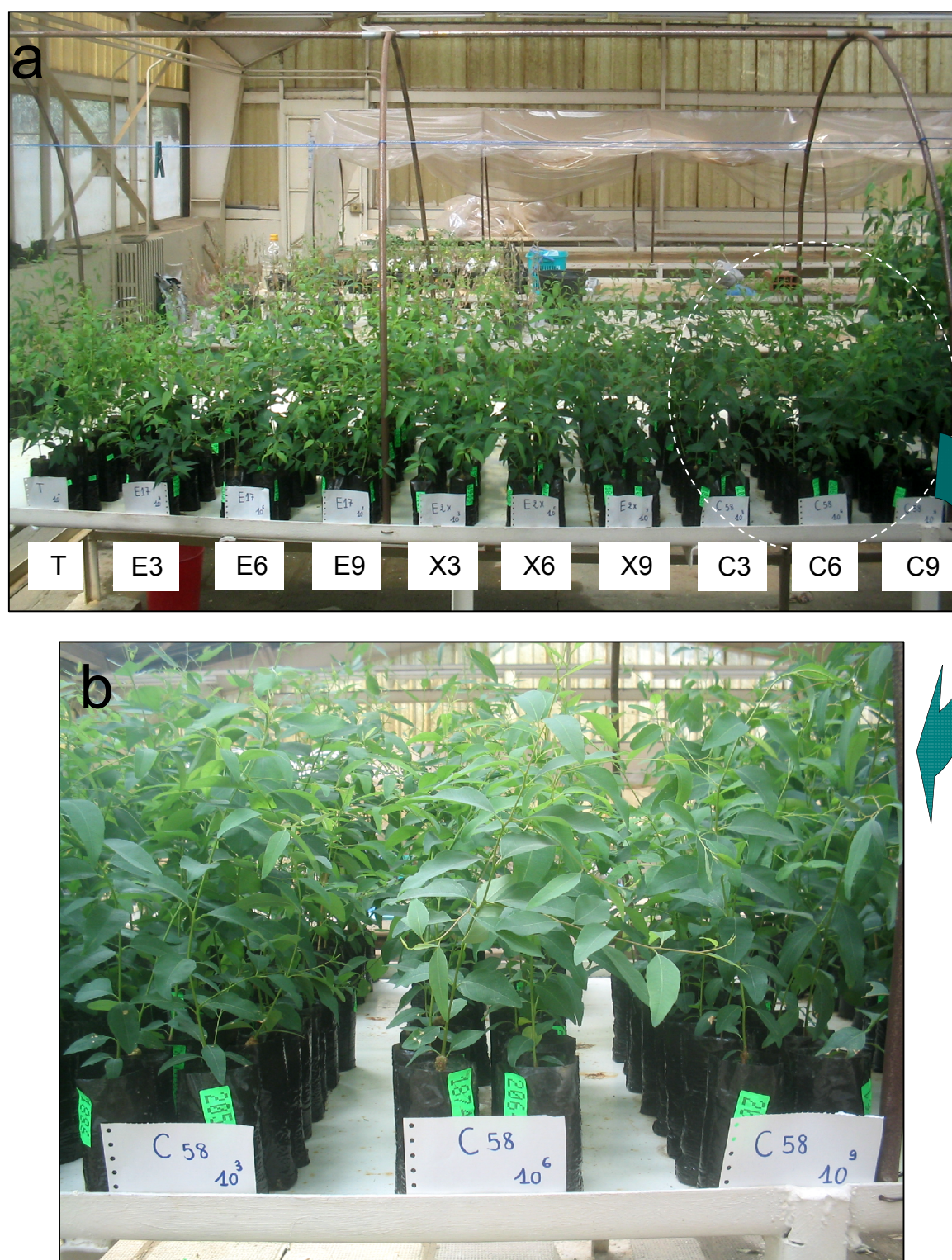


Figure 3.1: (a) Dispositif expérimental de l'essai d'inoculation sous serre chez l'espèce *E. melliodora* ;
 (b) Les trois traitements de la souche C58 chez l'espèce *E. melliodora*.

Tableau 3.3 : Traitements de l'essai expérimental réalisé sous serre.

Code	nombre des unités expérimentales	Traitement
C ₉	16*	Plants inoculés avec la souche C58 à une concentration de 10 ⁹ CFU/ml
C ₆	16	Plants inoculés avec la souche C58 à une concentration de 10 ⁶ CFU/ml
C ₃	16	Plants inoculés avec la souche C58 à une concentration de 10 ³ CFU/ml
X ₉	16	Plants inoculés avec la souche E2X à une concentration de 10 ⁹ CFU/ml
X ₆	16	Plants inoculés avec la souche E2X à une concentration de 10 ⁶ CFU/ml
X ₃	16	Plants inoculés avec la souche E2X à une concentration de 10 ³ CFU/ml
E ₉	16	Plants inoculés avec la souche E17 à une concentration de 10 ⁹ CFU/ml
E ₆	16	Plants inoculés avec la souche E17 à une concentration de 10 ⁶ CFU/ml
E ₃	16	Plants inoculés avec la souche E17 à une concentration de 10 ³ CFU/ml
T	16	Plants inoculés avec de l'eau distillée stérilisée (10 ⁰ CFU/ml)

N.B: Les mêmes codes ont été utilisés pour les cinq espèces d'*Eucalyptus* testées:

C3 : Souche C58 à la concentration 10³ CFU/ml .

C6 : Souche C58 à la concentration 10⁶ CFU/ml.

C9 : Souche C58 à la concentration 10⁹ CFU/ml.

X3 : Souche C58 à la concentration 10³ CFU/ml.

X6 : Souche C58 à la concentration 10⁶ CFU/ml.

X9 : Souche C58 à la concentration 10⁹ CFU/ml.

E3 : Souche C58 à la concentration 10³ CFU/ml.

E6 : Souche C58 à la concentration 10⁶ CFU/ml.

E9 : Souche C58 à la concentration 10⁹ CFU/ml.

T : Témoin inoculé avec l'eau distillée stérilisée.

* : indique nombre de répétition.

Le site inoculé est recouvert par du papier aluminium stérile pour éviter la dessiccation de l'inoculum. Les témoins négatifs sont des plants inoculés avec 50µl d'eau distillée stérilisée.

Les plants inoculés sont arrosés régulièrement, une fois tous les deux jours pendant l'hiver. Cette fréquence d'arrosage est augmentée pendant la période estivale.

3.3.3. Lecture des résultats

Les résultats sont notés:

- Huit semaines après l'inoculation ; le nombre, le diamètre et le poids, sont notés.
- Prise des photos.

3.3.4. Analyse statistiques des données

Afin de vérifier une éventuelle différence dans les espèces d'eucalyptus vis-à-vis des souches testées, les données quantitatives de chaque paramètre ont subi une analyse de variance (ANOVA). En considérant l'essai factoriel ($\alpha = 5\%$), l'analyse de la variance décompose la variabilité de chaque paramètre étudié en contributions dues aux facteurs principaux (F1 = Espèce, F2 = Souche et F3 = Concentration d'inoculum) et à leurs interactions. Dans le cas de différence significative ($P < 0.05$), le test des étendues multiples (LSD) de Fisher au seuil ($\alpha = 5\%$) classe les traitements en groupes homogènes [178] (Appendice G).

L'application de ces analyses a été réalisée par le logiciel: STATGRAPHICS Centurien XV Version 12.2.05 copyright © 1982-2007 StatPoint, Inc.

Pour le calcul du taux d'infection (incidence de la maladie) sur les espèces d'eucalyptus étudiées, nous avons utilisé la formule suivante :

$$\text{Taux d'infection (\%)} = \frac{\text{Nombre des plants atteints (présence de tumeur)}}{\text{Nombre total des plants}} \times 100$$

3.4. Recherche d'une éventuelle modification du métabolisme cellulaire protéique suite à l'inoculation des différentes espèces d'*Eucalyptus*

3.4.1. Extraction et dosage des protéines solubles

Le dosage des protéines solubles se fait par spectrophotométrie. Le but est de quantifier les protéines cytoplasmiques et les protéines pariétales chez les quatre espèces d'*Eucalyptus*: *E. umbellata*, *E. albens*, *E. punctata* et *E. melliodora*, suite à leur inoculation par l'agrobactérie phytopathogène.

Dans le cadre de notre étude, nous avons retenu la méthode proposée par Bradford [179], qui consiste en premier lieu à la préparation des solutions tampons et l'extraction des protéines solubles.

Les deux tampons phosphate (0,1M) préparés pour l'extraction des protéines cytoplasmiques sont désignés par la solution A et B.

La solution A est obtenue après avoir dissout 13,6g de KH_2PO_4 dans 1000ml d'eau distillée. Alors que la solution B est obtenue après avoir dissout 17,4g de KH_2PO_4 dans 1000ml d'eau distillée.

Le but fixé ci-dessus n'est abordable qu'après avoir mélangé les deux solutions A et B de façon à obtenir une solution à pH = 7.

En ce qui concerne l'extraction des protéines pariétales la méthode préconise un tampon plus salé comparé au tampon phosphate ; pour y remédier nous avons ajouté (0,1M) KCl soit 119,3g de KCl dans 1000ml d'eau distillée.

3.4.1.1. Extraction des protéines solubles

L'extraction des protéines solubles consiste à peser 3g de matière végétale fraîche tout en respectant la partie ciblée par le dosage: feuilles ou tiges. Dans un mortier mis sur une plaque froide, la matière fraîche ainsi pesée, est broyée après avoir ajouté 1g de poly vinyl pyrrolidone (pvp) et 5ml de la solution tampon phosphaté (0.1M, pH=7). Ce dernier provoque une bonne dissolution de la matière végétale.

La matière fraîche broyée, subit une centrifugation réfrigérée effectuant 4500 trs/ mn à - 4C° pendant 15 mn.

Le surnageant est séparé du culot dans un tube à essai, pour une éventuelle extraction des protéines cytoplasmiques, il est appelé communément surnageant (1). Le culot récupéré dans son tube subi par la suite un lavage avec 5ml d'eau distillée par centrifugation réfrigérée d'environ 4500 tr/mn à - 4C° pendant 15 mn.

Après l'élimination du surnageant 2, un volume de 5ml du tampon phosphaté (0.1M, pH=7) additionné de (0.1M) KCL, est ajouté au culot 2. Le substrat obtenu est alors centrifugé à - 4C° pendant 15 mn à raison de 4500 tr/mn. Le culot 3 est alors éliminé tout en gardant le surnageant 3 qui doit faire l'objet de l'extraction des protéines pariétales (Figure 3.1).

3.4.1.2. Dosage des protéines solubles

Les surnageants 1 et 3 sont dilués au 10^{-2} (soit 2 fois 1ml par 9ml d'eau distillée). Puis à partir de cette dilution, un volume de 0.1ml est mis dans un tube à essai auquel, 0.1ml d'eau distillée et 3ml de réactif de Bradford sont ajoutés. Après agitation pendant une heure, la densité optique de chaque tube est lue à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway : 6405 UV/Vis) réglé à l'émission (λ =595 nm).

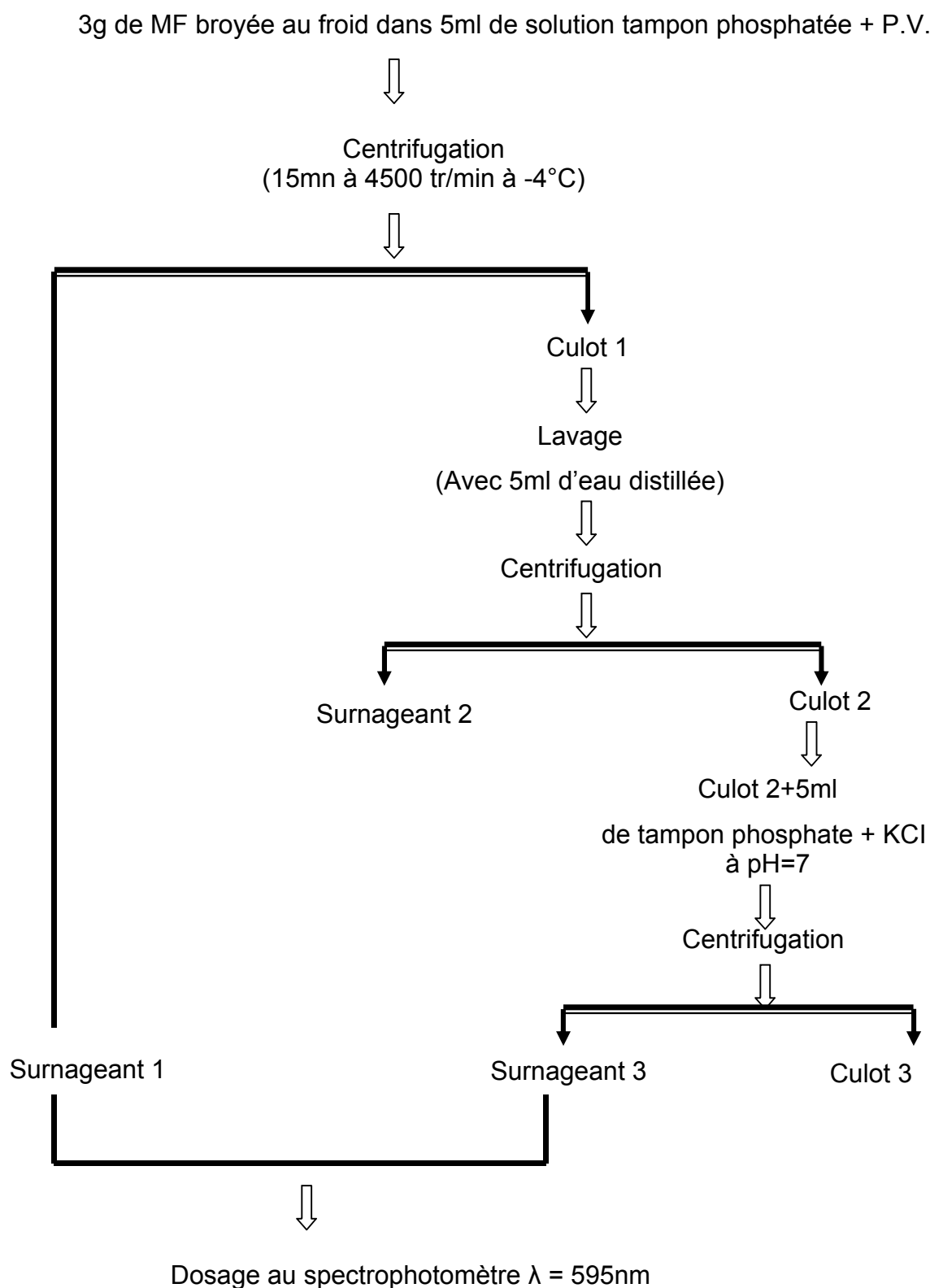


Figure 3.2 : Extraction des protéines solubles [179]

3.4.1.3. Préparation de la courbe étalon des protéines

Les lectures des densités optiques (D.O.) du spectrophotomètre ne seront significatives qu'après la réalisation de la courbe d'étalonnage établie grâce à l'utilisation d'une protéine de référence qui est l'ovalbumine à différentes concentrations. La solution mère est préparée par dilution de 15 mg d'ovalbumine dans 10ml d'eau distillée. De cette concentration (1,5 mg/ml) plusieurs dilutions sont faites afin d'établir une courbe selon le tableau 3.4.

Tableau 3.4: Gamme étalon d'ovalbumine

	1	2	3	4	5	6
Concentration d'ovalbumine	0	0,02	0,04	0,08	0,12	0,16
Eau distillée	0,2	0,18	0,16	0,12	0,08	0,04
Réactif de Bradford	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml

Après avoir ajouté dans chaque tube, 3ml du réactif de Bradford (Appendice H), le contenu de chaque tube est agité pendant une heure afin de lire l'absorbance. La lecture est faite successivement pour les solutions étalons, les solutions d'analyse et à nouveau les solutions étalons.

La concentration en protéines de chaque échantillon est calculée à partir de la courbe d'étalonnage. Le calcul de la teneur en protéines en (mg) est fait selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en protéines (mg/g MF)} = \frac{\text{Quantité de la protéine (mg)} \times 200}{\text{Poids d'échantillon}}$$

200: étant le coefficient de dilution [179].

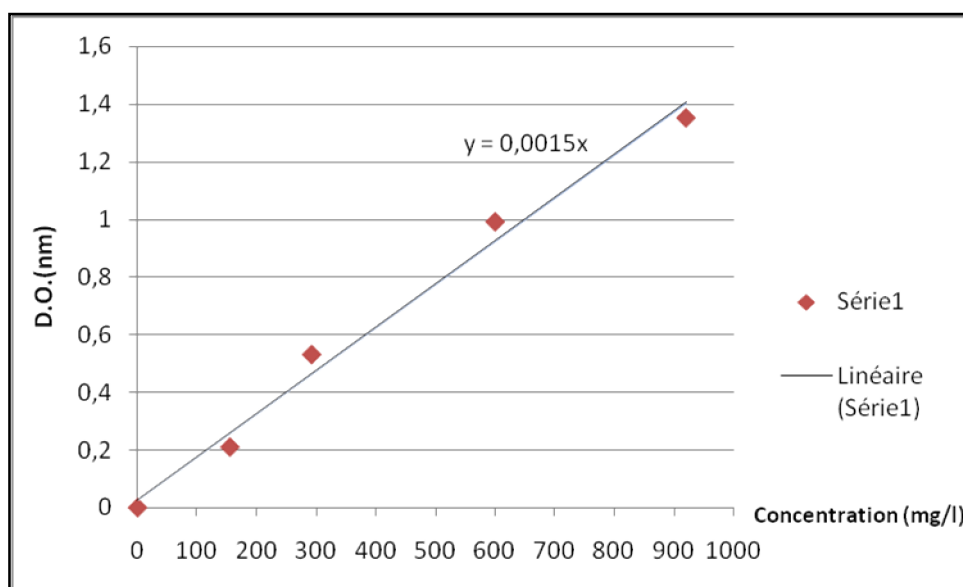


Figure 3.3 : Courbe d'étalonnage par l'Ovalbumine.

3.4.2. Analyses statistiques des données

Les données recueillies du dosage des protéines solubles (pariétales et cytoplasmiques) chez les quatre espèces d'eucalyptus : *E. umbellata*, *E. albens*, *E. punctata* et *E. melliodora*, doivent faire l'objet d'une analyse statistique (Appendice I).

Afin de vérifier une éventuelle relation entre les teneurs protéiques chez ces espèces et leur comportement vis-à-vis de l'inoculation par la souche bactérienne pathogène E17, nous nous sommes servis de l'analyse en composantes principales (ACP) suivie par une classification hiérarchique. L'ACP est un test permet de résumer la plus grande variabilité des teneurs protéiques (cytoplasmiques et pariétales), quantifiées chez les espèces d'eucalyptus testées, pour un nombre plus réduit de variables synthétiques appelée axes factoriels. Ces axes définissent le premier plan factoriel de l'ACP dans lequel sont projetés les différents statuts des espèces étudiées [180]. L'hypothèse de l'effet de l'inoculation sur la composition des protéines est testée par le modèle de la distance euclidienne à un facteur contrôlé par le logiciel PAST - PAleontological STatistics, ver. 1.81.

L'analyse en composantes principales (ACP) par groupes a été également utilisée dans le but de mettre en valeur les éventuelles différences entre:

✓ les taux des protéines solubles au niveau des feuilles (ceux des plants inoculés par le pathogène et ceux des plants témoins) et ceux quantifiés au niveau des tiges (ceux des plants inoculés par le pathogène et ceux des plants témoins) (Appendice J).

CHAPITRE 4

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

4.1. Vérification du pouvoir pathogène des trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées

En moins de quatre semaines, les trois souches bactériennes d'*Agrobacterium tumefaciens* E17, E2X et C58 ont donné naissance à des tumeurs caractéristiques au niveau des blessures effectuées sur les limbes du kalanchoë et sur les tiges des deux plantes tests : tomate et datura (Figure 4.1).

4.2. Réponses des cinq espèces d'eucalyptus à l'inoculation par les trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* pathogènes

Trois semaines après l'inoculation, les plants d'eucalyptus inoculés par les trois souches bactériennes pathogènes ; E17, E2X et C58 ont commencé à développer des tumeurs. La lecture des résultats est faite huit semaines après l'inoculation par inspection visuelle des plants afin de noter le nombre, le poids et le diamètre d'excroissances formées. Il est à signaler également, qu'aucune tumeur ne s'est développée sur les plants témoins.

D'après les résultats obtenus, mis à part l'espèce *E. punctata*, toutes les espèces ont répondu positivement à l'inoculation artificielle par ces trois souches bactériennes pathogènes. Parmi les quatre espèces qui se sont révélées sensibles, *E. melliodora* s'est montrée la plus sensible (Figure 4.2). Chez cette espèce, nous avons enregistré le taux d'infection le plus élevé soit 93.75% et ce avec la souche E2X à une concentration de 10^6 CFU/ml, suivie par l'espèce *E. albens* qui a pu enregistrer un taux de 50 % avec les deux souches pathogènes

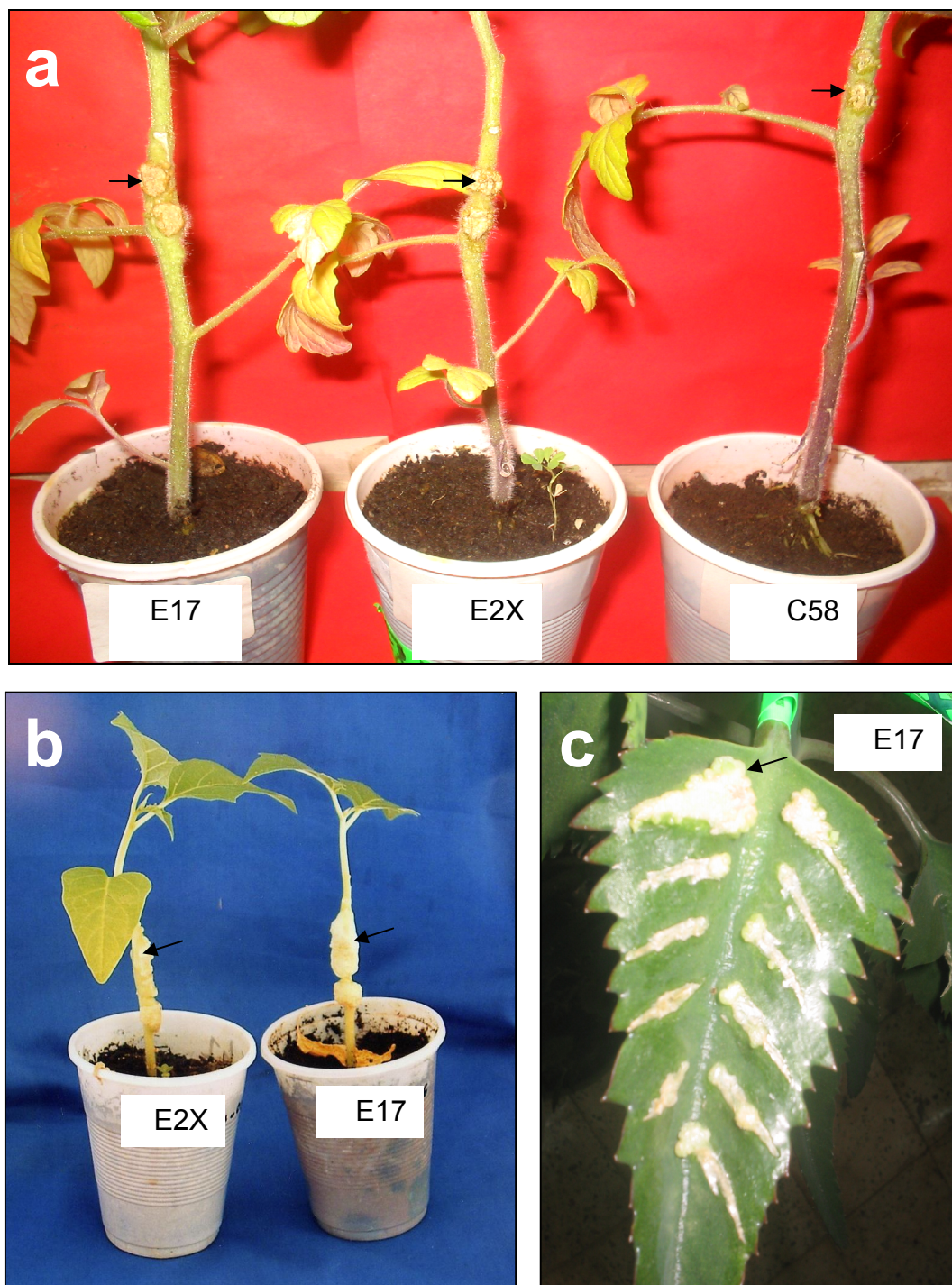


Figure 4.1: Test de pathogénicité des trois souches bactériennes utilisées ;

- (a) Pouvoir pathogène des deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* locales (E17 et E2X) et de la souche de référence C58 sur des plantules de tomate ;
- (b) Pouvoir pathogène des deux souches bactériennes locales (E17 et E2X) sur des plantules de *Datura stramonium*;
- (c) Pouvoir pathogène de la souche (E17) sur le limbe de kalanchoë.

E17 et E2X à une concentration de 10^6 CFU/ml (Tableau 4.1). Cependant, l'espèce *E. umbellata* a pu également atteindre un taux de 50% et ce, avec la souche pathogène E17 à une concentration de 10^9 CFU/ml. Tandis que pour l'espèce *E. occidentalis*, le taux le plus élevé était de 18.75%. Ce taux a été obtenu avec la souche pathogène E17 et ce, avec les trois concentrations utilisées. Chez l'espèce *E. punctata*, nous n'avons enregistré que quatre tumeurs de petite taille sur un total de 144 plants inoculés (Figure 4.3).

4.2.1. Analyse du paramètre taux d'infection par le crown gall chez les différentes espèces testées

En ce qui concerne l'incidence de la maladie. L'analyse de la variance révèle une action très hautement significative du facteur espèce sur l'incidence de la maladie. Une action hautement significative du facteur souche et une action non significative du facteur concentration sur le degré de sensibilité de ces espèces d'eucalyptus vis-à-vis des trois souches bactériennes pathogènes testées ont également été révélées. Aucune interaction de ces facteurs n'a été enregistrée (Appendice F).

Le test des différences significatives minimales de Fisher (L.S.D.) au seuil 5% indique qu'il y a trois groupes homogènes pour la variable espèce. L'infection a atteint le plus haut niveau chez l'espèce *Eucalyptus melliodora* avec un pourcentage de 67.36 ± 3.18 qui est confiné individuellement dans le groupe (A) suivi par l'espèce *E. albens* qui s'individualise dans le groupe (B) avec un taux d'infection de 35.41 ± 3.18 . Tandis que les deux espèces *E. umbellata* et *E. occidentalis* sont groupées dans le même groupe (C) avec les pourcentages: 20.83 ± 3.18 et 13.88 ± 3.18 respectivement (Appendice G).

Tableau 4.1: Taux d'infection des cinq espèces d'eucalyptus étudiées par les trois souches (C58, E2X et E17) d'*Agrobacterium tumefaciens*

Espèce	Souche	Concentration	Taux d'infection
<i>E. umbellata</i>	C58	10^3	12,5
<i>E. umbellata</i>	E 2X	10^3	25
<i>E. umbellata</i>	E17	10^3	37,5
<i>E. umbellata</i>	C58	10^6	6,25
<i>E. umbellata</i>	E 2X	10^6	12,5
<i>E. umbellata</i>	E17	10^6	18,75
<i>E. umbellata</i>	C58	10^9	12,5
<i>E. umbellata</i>	E 2X	10^9	12,5
<i>E. umbellata</i>	E17	10^9	50
<i>E. albens</i>	C58	10^3	31,25
<i>E. albens</i>	E 2X	10^3	31,25
<i>E. albens</i>	E17	10^3	50
<i>E. albens</i>	C58	10^6	31,25
<i>E. albens</i>	E 2X	10^6	50
<i>E. albens</i>	E17	10^6	50
<i>E. albens</i>	C58	10^9	37,5
<i>E. albens</i>	E 2X	10^9	25
<i>E. albens</i>	E17	10^9	12,5
<i>E. melliodora</i>	C58	10^3	43,75
<i>E. melliodora</i>	E 2X	10^3	68,75
<i>E. melliodora</i>	E17	10^3	81,25
<i>E. melliodora</i>	C58	10^6	56,25
<i>E. melliodora</i>	E 2X	10^6	93,75
<i>E. melliodora</i>	E17	10^6	8,75
<i>E. melliodora</i>	C58	10^9	43,75
<i>E. melliodora</i>	E 2X	10^9	50
<i>E. melliodora</i>	E17	10^9	81,25
<i>E. occidentalis</i>	C58	10^3	12,5
<i>E. occidentalis</i>	E 2X	10^3	6,25
<i>E. occidentalis</i>	E17	10^3	18,75
<i>E. occidentalis</i>	C58	10^6	0
<i>E. occidentalis</i>	E 2X	10^6	25
<i>E. occidentalis</i>	E17	10^6	18,75
<i>E. occidentalis</i>	C58	10^9	12,5
<i>E. occidentalis</i>	E 2X	10^9	12,5
<i>E. occidentalis</i>	E17	10^9	18,75

Concernant l'effet souche sur le taux d'infection, le test (L.S.D.) de Fisher au seuil 5% montre qu'il y a trois groupes statistiquement homogènes. Le taux d'infection le plus élevé a été obtenu par la souche E17 avec un pourcentage de 43.75 ± 2.75 ; qui est représenté par le groupe (A), suivi par la souche E2X qui se classe dans le groupe (B) avec un pourcentage de 34.37 ± 2.75 . Tandis que la souche C58 avec un taux d'infection de 25 ± 2.75 , se classe dans le groupe (C) (Appendice G).

4.3. Virulence des souches bactériennes sur les quatre espèces d'eucalyptus sensibles

Afin d'évaluer la virulence des trois souches bactériennes pathogènes utilisées E17, E2X et C58 sur les quatre espèces d'eucalyptus sensibles, nous avons mesuré le poids et le diamètre des tumeurs induites après leur inoculation sur les différentes espèces testées.

4.3.1. Analyse de la variance par rapport au paramètre poids des tumeurs

Pour le paramètre poids, l'analyse de la variance révèle une action hautement significative du facteur espèce sur le poids des tumeurs, une action significative du facteur souche et une action hautement significative du facteur concentration d'inoculum. Une action significative de l'interaction (espèce - concentration d'inoculum) a été également enregistrée. Par ailleurs, aucune des interactions n'a été significative sur le paramètre poids des tumeurs (Appendice F).

Concernant l'effet espèce sur le poids des tumeurs produites, Le test des différences significatives minimales de Fisher (L.S.D.) au seuil 5% indique qu'il y a deux groupes homogènes. Le groupe (A) qui regroupe les deux espèces *E. umbellata* et *E. melliodora* avec les moyennes 0.62 ± 0.057 g et 0.60 ± 0.057 g respectivement. Le deuxième groupe (B) qui regroupe les deux espèces *E. albens* et *E. occidentalis* avec les moyennes : 0.28 ± 0.057 g et 0.24 ± 0.065 g respectivement (Appendice G).

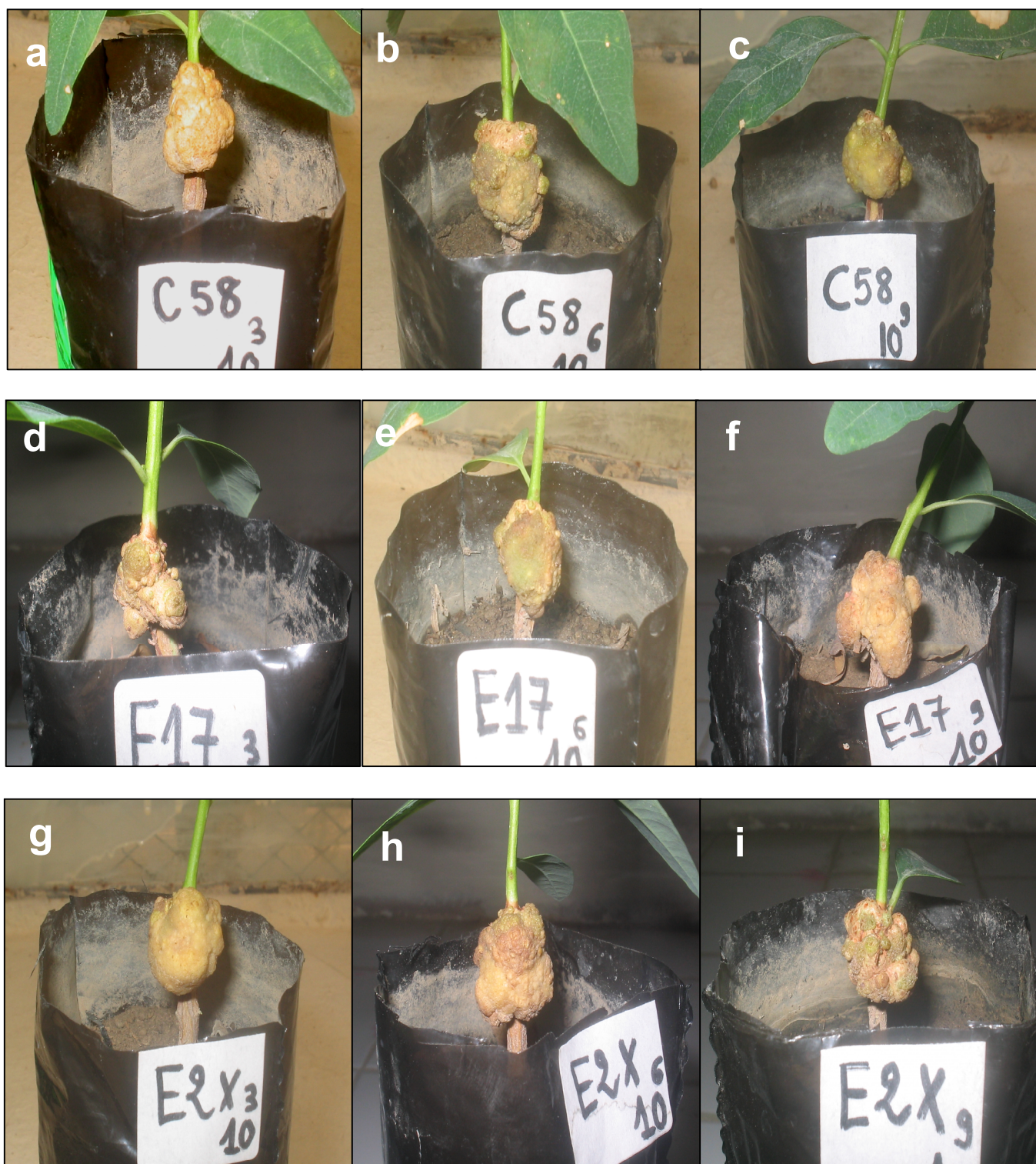


Figure 4.2 : Formation de tumeurs chez l'espèce *E. melliodora* ;

- (a) C58 à la concentration 10³CFU/ml ; (b) C58 à la concentration 10⁶CFU/ml ; (c) C58 à la concentration 10⁹CFU/ml ;
- (d) E17 à la concentration 10³CFU/ml ; (e) E17 à la concentration 10⁶CFU/ml ; (f) E17 à la concentration 10⁹CFU/ml ;
- (g) E2X à la concentration 10³CFU/ml ; (h) E2X à la concentration 10⁶CFU/ml ; (i) E2X à la concentration 10⁹CFU/ml.

Pour l'effet souche sur le poids des tumeurs, le test (L.S.D.) de Fisher au seuil 5% montre qu'il y a trois groupes statistiquement homogènes. La souche C58 se classe dans le groupe (A) avec une moyenne de 0.55 ± 0.055 g, suivi par la souche E17 dans un groupe intermédiaire (AB) avec une moyenne de 0.43 ± 0.049 g. Tandis que la souche E2X se classe à part, dans le groupe (B) avec une moyenne de 0.33 ± 0.049 g (Appendice G).

Pour l'effet concentration d'inoculum sur le poids des tumeurs, le test (L.S.D.) de Fisher au seuil 5% montre qu'il y a deux groupes statistiquement homogènes. Le groupe (A) représenté par la concentration 10^6 CFU/ml qui donne le poids le plus élevé avec une valeur de 0.60 ± 0.055 g, suivi par le groupe (B) qui regroupe les deux concentrations 10^9 et 10^3 CFU/ml donnant un poids plus faible avec une valeur de 0.36 ± 0.049 g et 0.34 ± 0.049 g respectivement (Appendice G).

4.3.2. Analyse de la virulence des souches par rapport au paramètre diamètre des tumeurs

Pour le paramètre diamètre, l'analyse de la variance révèle une action significative du facteur espèce sur le diamètre des tumeurs. Une action non significative de chacun des deux facteurs; souche et concentration d'inoculum sur le diamètre des tumeurs a été notée. De même, aucune des interactions (espèce - souche; espèce-concentration d'inoculum; souche - concentration d'inoculum ou espèce - souche - concentration d'inoculum) n'a été significative sur le paramètre diamètre des tumeurs (Appendice F).

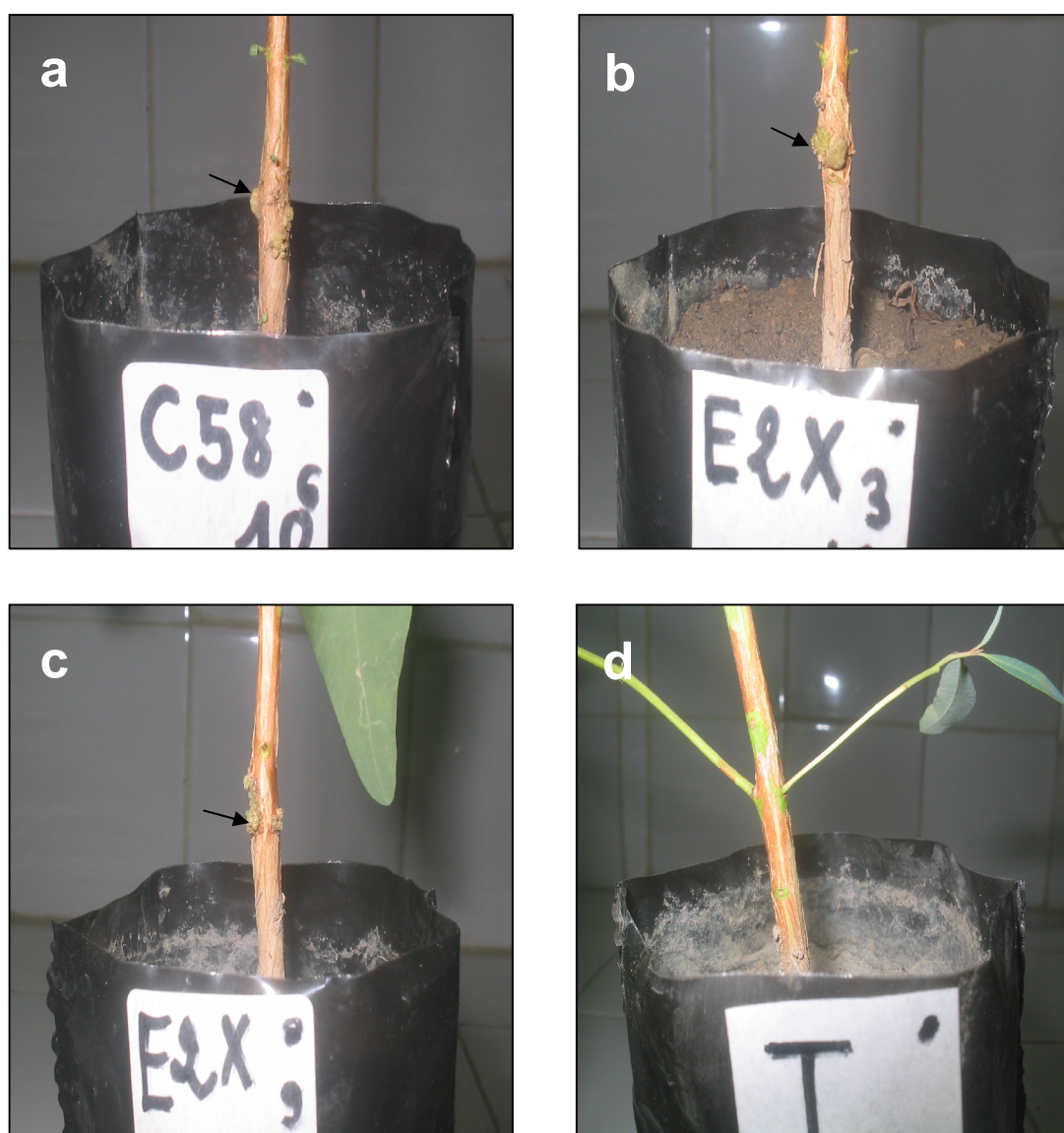


Figure 4.3 : Réponses des plantules d'*Eucalyptus punctata* à l'inoculation par les deux souches C58 et E2X.

(a), (b), (c): Formation de tumeurs de petite taille.

(d): Absence de tumeur sur la tige du témoin.

4.4. Interprétation partielle des résultats

Nos résultats révèlent une variabilité dans la sensibilité des espèces d'eucalyptus testées vis-à-vis des trois souches bactériennes utilisées. Cette variabilité liée à l'espèce peut s'expliquer par une variabilité entre ces espèces quant à leurs taux de croissance.

Les trois souches bactériennes pathogènes E17, E2X et C58 ont été capables de provoquer la formation de tumeurs chez les quatre espèces d'eucalyptus; *E. melliodora*, *E. albens*, *E. umbellata* et *E. occidentalis*. Cependant, les deux souches locales E17 et E2X isolées de l'eucalyptus ont causé plus de tumeurs par rapport à la souche C58 isolée de prunier, ce qui pourrait être expliqué par une spécificité hôte/ parasite. Cette spécificité parasitaire a déjà été signalée dans le cas du crown gall chez l'eucalyptus [24, 173] et chez d'autres espèces végétales également [13, 181].

Du point de vue poids des tumeurs, les deux espèces *E. umbellata* et *E. melliodora* ont induit des tumeurs plus volumineuses par rapport à celles induites par les deux espèces *E. albens* et *E. occidentalis*, qui ont provoqué la formation de tumeurs moins volumineuses. Cela pourrait être dû à leur vitesse de croissance qui diffère d'une espèce à une autre ou à la masse tissulaire de chaque espèce.

Quant à l'effet souche sur le poids des tumeurs, nous retrouvons un rapprochement des poids obtenus qui s'exprime par l'apparition d'un groupe intermédiaire entre les deux souches C58 et E2X. L'apparition de ce groupe intermédiaire représenté par la souche E17, peut s'expliquer par le fait que ces trois souches hébergent des plasmides du même groupe opinique (nopaline). Sachant que les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* à nopaline ; sont toujours celles induisant les tumeurs les plus volumineuses [182, 13].

Pour l'effet concentration d'inoculum, c'est la concentration 10^6 bactérie/ml qui donne naissance aux tumeurs les plus volumineuses par rapport, aux deux concentrations utilisées 10^9 et 10^3 bactéries/ml, qui provoquent la formation de tumeurs ayant des poids très proches. Cela pourrait être dû au phénomène d'antagonisme bactérien au niveau du point d'infection dans le cas de la concentration 10^9 bactérie/ml et à l'absence de ce phénomène dans le cas d'une concentration faible de 10^3 bactérie/ml.

4.5. Analyse des protéines solubles quantifiées chez les quatre espèces d'eucalyptus

Afin de vérifier une éventuelle différence entre les taux de protéines solubles (pariétales et cytoplasmiques) quantifiées chez les quatre espèces d'eucalyptus ; deux mois après leur inoculation par la souche tumorigène E17 d'*Agrobacterium tumefaciens*, nous avons fait appel à l'analyse en composantes principales A.C.P.

Le cercle des corrélations montre que tous les points se trouvent à l'intérieure du cercle ; ce qui explique qu'ils sont corrélés positivement entre eux (Figure 4.4).

4.5.1. Analyse en composantes principales A.C.P.

Avant l'établissement du plan de l'A.C.P. ; nous devons procéder à l'analyse des axes. Seuls les axes présentant des taux de variance supérieurs à 25% sont retenus. Cette raison nous a permis de retenir les deux axes F1 et F2 qui expliquent 81% de la variabilité (Tableau 4.2). Ces deux axes nous rendent compte d'un maximum d'informations sur les corrélations existantes entre les fractions protéiques quantifiées et le comportement de ces espèces vis à vis de la souche pathogène E17.

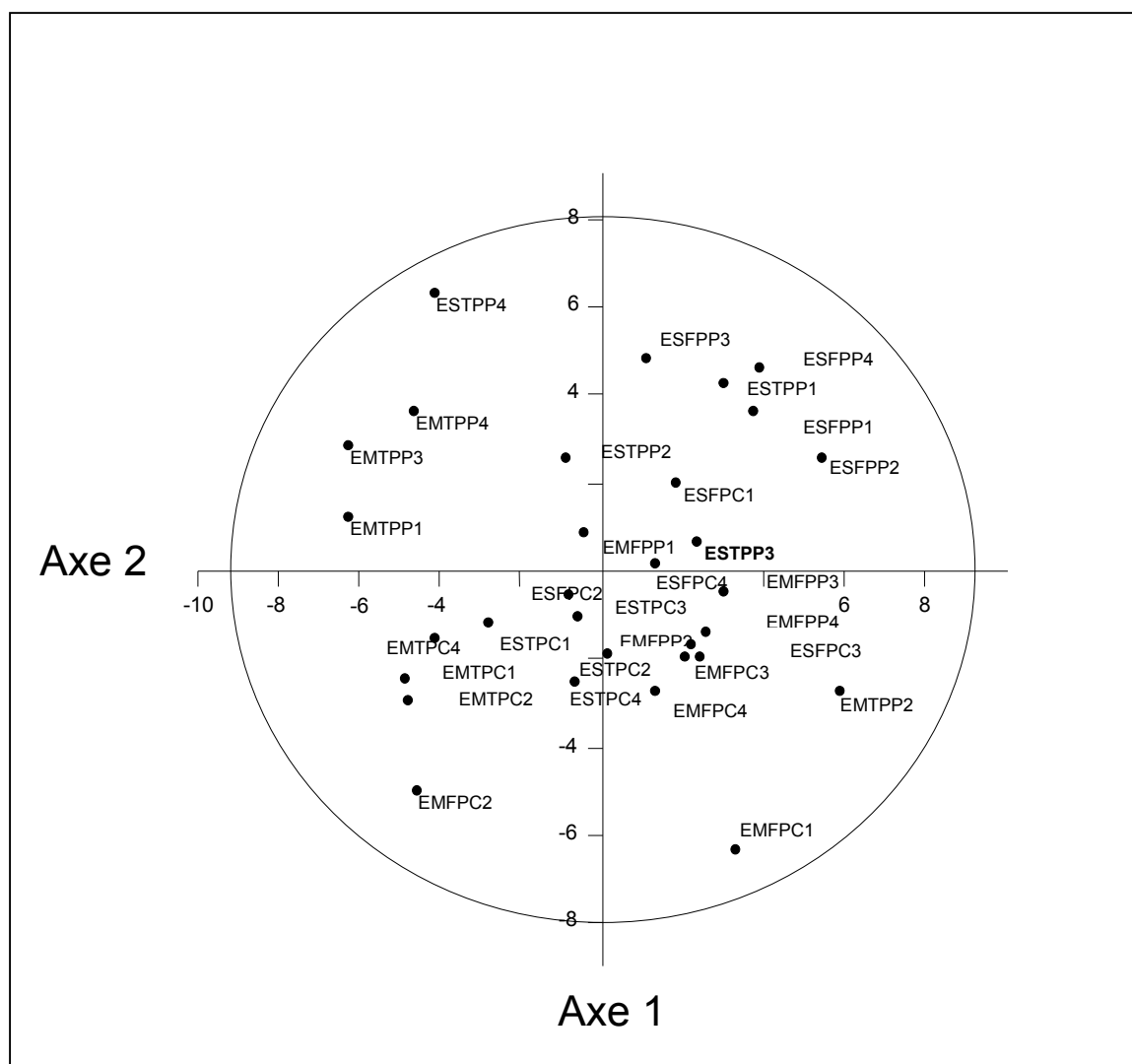


Figure 4.4 : Cercle des corrélations des taux de protéines solubles quantifiées chez les quatre espèces d'eucalyptus étudiées (toutes les valeurs sont à l'intérieur du cercle).

EMTPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inoculées par la bactérie.

EMTPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inoculées par la bactérie.

EMTPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inoculées par la bactérie.

EMFPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants inoculées par la bactérie.

EMFPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants inoculées par la bactérie.

ESTPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants témoins.

ESTPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants témoins.

ESFPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants témoins.

ESFPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants témoins.

Tableau 4.2 : Valeurs propres et taux de variance des quatre premiers axes.

L'axe Variance	F1	F2	F3	F4
Valeur propre	12.669	9.380	3.265	1.93
% de la variance	46.494	34.423	11.984	7.099

4.5.1.1. Analyse des axes

L'axe 1 : Il est représenté par des protéines pariétales des tiges et des feuilles des plants témoins et des protéines pariétales des tiges des plants inoculés par le pathogène. A l'opposé de cet axe, ce sont les protéines pariétales et les protéines cytoplasmiques des feuilles des plants inoculés par le pathogène et les protéines cytoplasmiques des tiges des plants inoculés par le pathogène et ceux des plants témoins qui sont représentées.

L'axe 2 : Il n'est représenté que sur le côté négatif par les quatre espèces d'eucalyptus *E. umbellata*, *E. punctata*, *E. albens* et *E. melliodora*. Les plus grandes contributions sont celles des espèces: *E. umbellata* et *E. punctata*.

4.5.2. Classification hiérarchique (Cluster Analysis)

L'analyse en composantes principales A.C.P. est complétée par une classification hiérarchique des différents paramètres étudiés (taux de protéines solubles pariétales et cytoplasmiques). Le classement est réalisé sous forme d'un dendrogramme fait selon une échelle des distances euclidiennes.

A une distance euclidienne égale à - 4.8, la classification hiérarchique nous a permis de dégager cinq groupes distincts présentant différentes corrélations avec les quatre espèces d'eucalyptus étudiées (Figure 4.5).

Parmi ces cinq groupes, trois sont relativement homogènes (GI, GII, GIV).

- **Le groupe I** : Constitué par : MTPP1, MTPP3, MTPP4, STPP4. ce groupe est représenté par les protéines pariétales extraites à partir des tiges des plants inoculés par la bactérie pathogène et un seul échantillon de protéines des tiges des plants témoins.
- **Le groupe II** : qui englobe : MTPC1, MTPC2, MTPC4, MFPC2, STPC1. ce groupe est représenté par des protéines cytoplasmiques dont la plupart sont extraites à partir des tiges des plants inoculés par le pathogène.
- **Le groupe III** : MFPC3, MFPC4, MFPP1, MFPP2, MFPP3, MFPP4, SFPC1, SFPC2, SFPC3, SFPC4, STPC2, STPC3, STPC4, STPP2, STPP3. Ce groupe se constitue de deux sous groupes homogènes dont l'un comporte des protéines pariétales des feuilles des plants inoculés par la bactérie alors que l'autre est beaucoup plus représenté par les protéines cytoplasmiques des feuilles des plants témoins.
- **Le groupe IV**: il inclut SFPP1, SFPP2, SFPP3, SFPP4 et STPP1, ce groupe est représenté par les protéines pariétales dont la quasi-totalité est extraite à partir des feuilles des plants témoins. Un seul échantillon de protéines pariétales des tiges des plants témoins y est représenté.
- **Le groupe V**: C'est un groupe faiblement représenté et hétérogène. Il regroupe : MTPP2 et MFPC1, qui sont respectivement; des protéines pariétales des tiges inoculées par le pathogène et des protéines cytoplasmiques des feuilles des plants inoculées également par le pathogène.

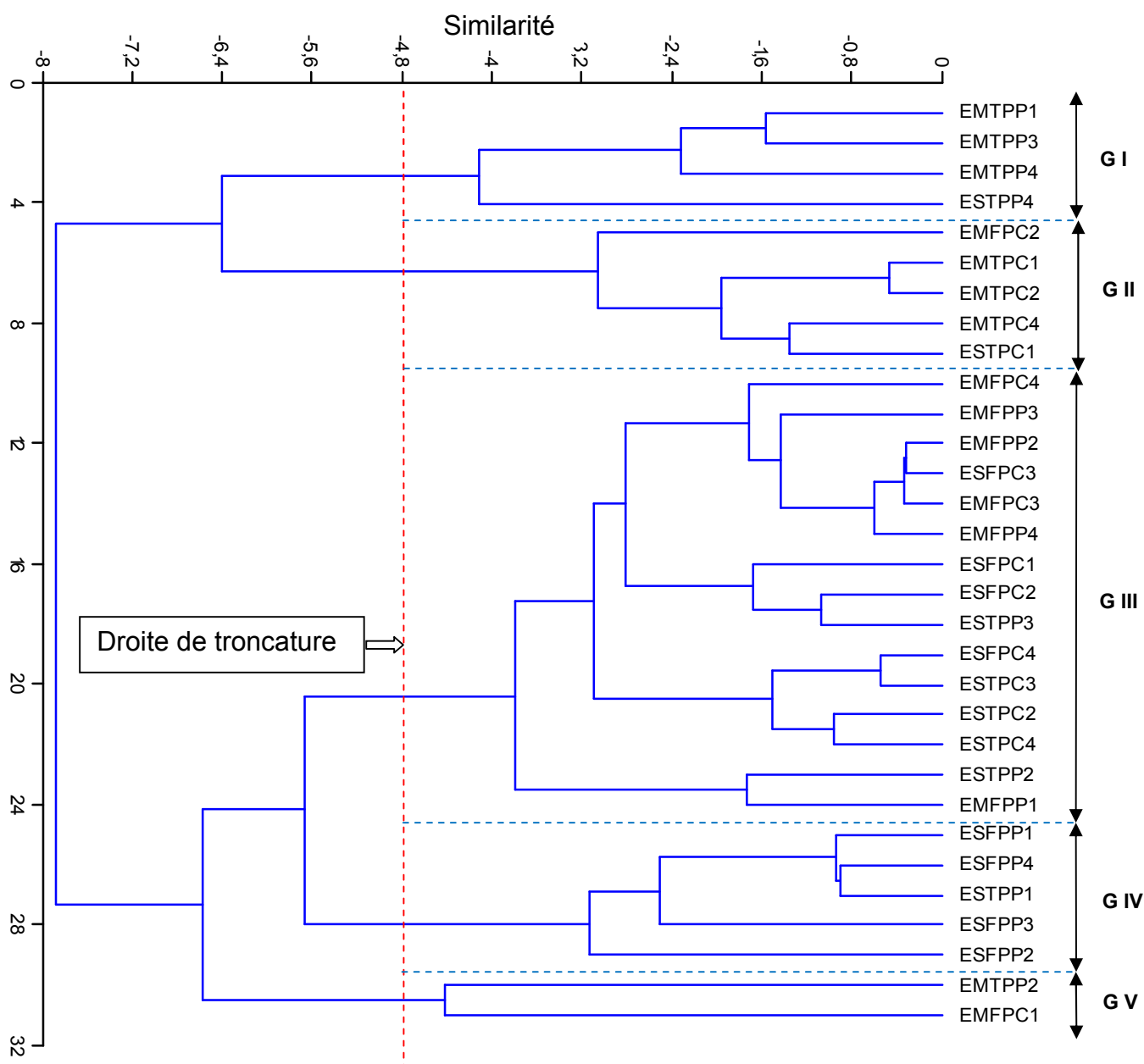


Figure 4.5 : Classification hiérarchique " cluster analysis " (calculée par le biais des distances euclidiennes) des taux de protéines solubles quantifiées chez les quatre espèces étudiées ; *E. melliodora*, *E. albens*, *E. umbellata* et *E. punctata*.

EMTTP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inocuées par la bactérie.

EMTPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inocuées par la bactérie.

EMFPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants inocuées par la bactérie.

EMFPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants inocuées par la bactérie.

ESTPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants témoins.

ESTPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants témoins.

ESFPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants témoins.

ESFPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants témoins.

4.6. Corrélations existantes entre les fractions protéiques quantifiées et les espèces d'eucalyptus étudiées

Les corrélations existantes entre les taux protéiques (cytoplasmiques et pariétales) quantifiées et les espèces d'eucalyptus sont mises en évidence par l'A.C.P. La projection de ces quatre paramètres étudiées (espèces d'eucalyptus) dans le plan factoriel retenu (Figure 4.6), nous a permis de constater que :

- **Le groupe I** est corrélé positivement à l'espèce sensible *E. umbellata*.
- **Le groupe II** est corrélé positivement à l'espèce résistante *E. punctata*.
- **Le groupe III** ne présente aucune corrélation avec les quatre espèces eucalyptus étudiées.
- **Le groupe IV** ne présente également aucune corrélation avec les quatre espèces d'eucalyptus étudiées.
- **Le groupe V** ne présente aucune corrélation avec les quatre espèces d'eucalyptus étudiées.

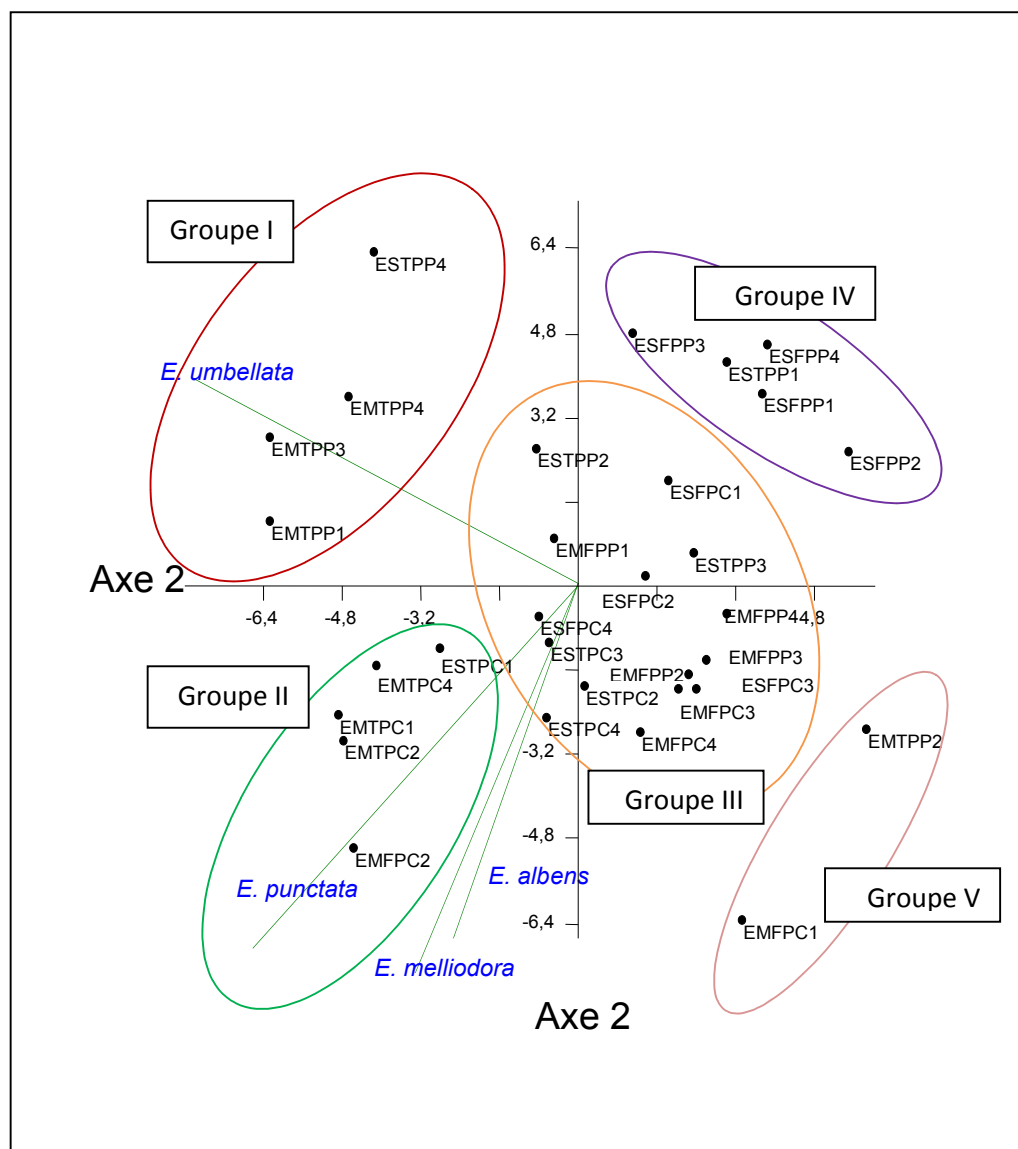


Figure 4.6: Corrélations possibles entre les groupes homogènes déduits par l'ACP et le comportement (réponse) des quatre espèces d'eucalyptus étudiées.

EMTPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inoculées par la bactérie.

EMTPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inoculées par la bactérie.

EMFPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants inoculées par la bactérie.

EMFPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants inoculées par la bactérie.

ESTPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants témoins.

ESTPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants témoins.

ESFPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants témoins.

ESFPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants témoins.

4.6.1. Analyse des différences entre les taux protéiques des feuilles et ceux des tiges

L'analyse en composantes principales par groupes réalisé grâce au logiciel Past a été utilisée dans le but de mettre en valeur les éventuelles différences entre les taux protéiques (pariétaux et cytoplasmiques) des tiges et ceux des feuilles et ce, chez les quatre espèces d'eucalyptus étudiées (Appendice J).

D'après la présentation graphique obtenue par l'ACP par groupes, les deux losanges; dont l'un est représenté par les protéines (pariétales et cytoplasmiques) des tiges et l'autre est représenté par les protéines (pariétales et cytoplasmiques) des feuilles sont nettement séparés (pas d'intersection) (Figure 4.7). Cela signifie qu'il existe une différence significative entre les taux protéiques (pariétaux et cytoplasmiques) des tiges et ceux des feuilles (que ce soit pour ceux des échantillons inoculés avec le pathogène ou ceux inoculés avec de l'eau stérilisée). Ainsi les protéines des tiges sont corrélées positivement avec les deux espèces *E. punctata* et *E. umbellata* et cela concorde partiellement avec les résultats obtenus par l'ACP globale.

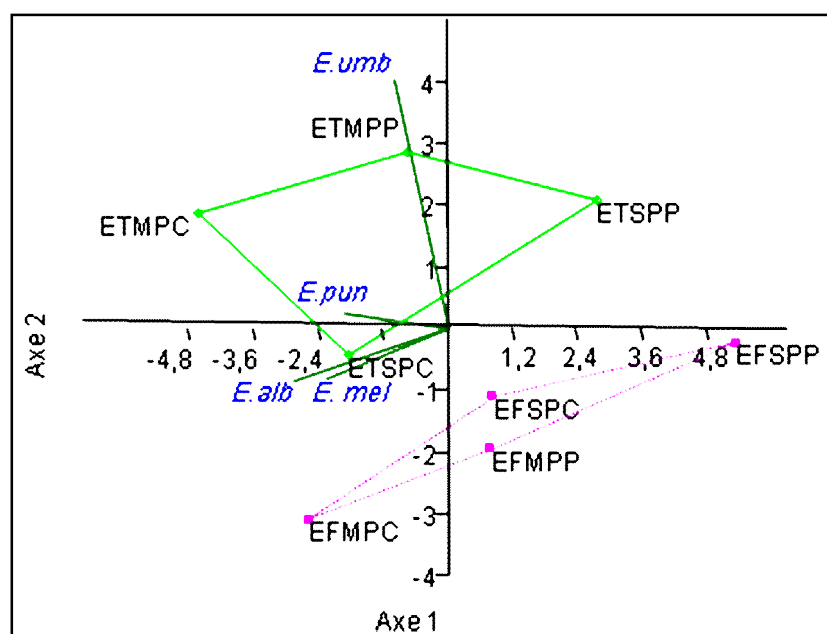


Figure 4.7 : Analyse en composantes principales par groupes entre les protéines solubles des feuilles et celles des tiges; Les protéines de la tige (vert) et les protéines des feuilles (rose).

4.7. Interprétation partielle des résultats de l'analyse du métabolisme protéique suite à l'inoculation des quatre espèces d'eucalyptus

L'analyse en composantes principales (A.C.P.) complétée par la classification hiérarchique des différents paramètres étudiés (protéines solubles pariétales et cytoplasmiques) nous a permis de dégager cinq groupes distincts. Parmi ces groupes, " le groupe I " représenté surtout par des protéines pariétales des tiges des plants inoculés par la bactérie, est corrélé positivement avec l'espèce sensible *E. umbellata*. Cette corrélation peut s'expliquer par le rôle de ces protéines pariétales dans le mécanisme d'infection.

Quant au " groupe II " qui est représenté par des protéines cytoplasmiques des tiges des plants inoculés par la bactérie pathogène, est corrélé positivement avec l'espèce résistante *E. punctata*. Cela peut s'expliquer par l'intérêt de ces protéines dans l'activation des mécanismes de défense.

L'éventuelle différence existante entre les taux protéiques des échantillons de tiges et ceux des échantillons de feuilles a été confirmée par une comparaison entre les protéines totales quantifiées au niveau des tiges et ceux des feuilles. Cette différence significative révélée n'est pas surprenante vu que les tiges étaient le siège d'inoculation et sont beaucoup plus soumises à l'effet du stress biotique par rapport aux feuilles. Autrement dit, cette différence quantitative exprime la manifestation des gènes de défense suite au stress apporté par l'inoculation du pathogène au niveau de la tige.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GENERALE

5.1. La résistance intrinsèque chez les espèces d'eucalyptus étudiées

Les résultats de la recherche d'espèces résistantes au crown gall ont permis de révéler différents niveaux de susceptibilité chez un certain nombre d'espèces végétales telles que celles appartenant aux genres : *Prunus* spp. [118, 88, 12], *Populus* spp. [122], *Juglans* spp. [120], *Pisum* spp. [183] et quelques écotypes d'*Arabidopsis* spp. [84] et même, au sein des clones de la même espèce tel le cas de l'espèce *Pinus radiata* [184].

D'après ces travaux, peu d'espèces ont été considérées comme résistantes. Les mécanismes de cette résistance génotypique ne sont pas généralement bien compris, cependant, les facteurs contrôlant la tumorigénèse et qui sont liés au pathogène sont plus expliqués que ceux liés à la plante. C'est la raison qui nous a amené à rechercher les génotypes résistants au crown gall chez quelques espèces d'eucalyptus cultivées dans les pépinières algériennes.

Avant d'entamer cette étude, nous avons vérifié le pouvoir pathogène des trois souches bactériennes d'*Agrobacterium tumefaciens* E17, E2X et C58 sur trois plantes tests (tomate, datura et kalanchoë). La vérification du pouvoir pathogène est une étape indispensable et ce, en raison de l'instabilité du pouvoir pathogène porté par l'élément extra chromosomique le plasmide Ti, qui peut être perdu comme, il peut être acquis ; suite au phénomène de la conjugaison bactérienne [2]. Les travaux de Krimi [185] ont montré une instabilité génétique au niveau d'une population d'*Agrobacterium tumefaciens* isolée d'eucalyptus. Certaines souches, identifiées sur la base de la perte de virulence, présentent une

instabilité génétique du plasmide Ti se traduisant soit par une perte totale du pTi ou par des pertes partielles des fonctions déterminées par ce plasmide. Le mécanisme moléculaire qui sous-tend ce phénomène n'a pas été caractérisé, néanmoins d'autres auteurs ont suggéré que des insertions de transposons ou d'autres séquences mobiles pouvaient jouer un rôle important pour expliquer cette instabilité et la perte du pTi [186].

Dans la présente étude, nous avons évalué la susceptibilité de cinq espèces d'eucalyptus cultivées dans les pépinières de production des arbres fruitiers et forestiers vis-à-vis du crown gall. Parmi ces cinq espèces, quatre, dont ; *E. melliodora*, *E. albens*, *E. umbellata* et *E. occidentalis* se sont révélées sensibles aux inoculations des trois souches bactériennes pathogènes. Tandis que l'espèce *E. punctata* n'a pu développer que quatre tumeurs de très faible taille (allant de 2.2 à 7.9 mm de diamètre). En effet, les espèces d'eucalyptus sont connues pour leur croissance très rapide [135], ce qui peut expliquer la susceptibilité élevée de ces espèces à l'égard du crown gall.

L'espèce *E. occidentalis* s'est montrée très faiblement sensible vis-à-vis des différentes souches bactériennes utilisées, ce qui est peut être dû d'une part ; à son faible taux de croissance ou à l'âge convenable à la sensibilité de cette espèce au crown gall d'autre part. D'après une étude épidémiologique de la maladie menée par Belaskri [24] dans six pépinières forestières à l'ouest algérien, cette espèce n'est sensible qu'à partir de l'âge de 3 à 4 mois à l'infection naturelle par le crown gall, en outre ; cette espèce ne présente pas une forte sensibilité vis-à-vis d'une inoculation artificielle au niveau de la tige. Par ailleurs, rappelons que c'est à partir de tumeurs de cette espèce que les premiers isolats d'*Agrobacterium* pathogènes ont été identifiés par voie biochimique et moléculaire [21].

Quand à l'espèce *E. punctata* qui s'est montrée dans la présente étude résistante vis-à-vis des inoculations des trois souches bactériennes pathogènes, elle s'est montrée également faiblement sensible à l'égard de ces mêmes souches bactériennes ; avec un taux qui ne dépasse pas les 30%.

D'après les résultats de cette étude, il apparaît par conséquent intéressant d'utiliser l'espèce *E. punctata* dans les plans de croisements, pour introduire une moindre sensibilité à *Agrobacterium tumefaciens*. Ajoutons à cela quelques caractéristiques agronomiques spécifiques à cette espèce telle que le fait que c'est une espèce vigoureuse qui est très commune dans l'algérois, peu exigeante en ce qui concerne le sol, connue également par sa résistance à la chlorose virale qui cause le rabougrissement des jeunes plants [135]. Des essais au Maroc ont de même démontré sa résistance aux attaques du *Phoracantha semipunctata* [187].

Chez le genre *Prunus*, certaines espèces ont été déjà signalées comme moins sensibles voire résistantes vis-à-vis du crown gall telle que; *Prunus domestica* ou tous les hybrides ayant *P. domestica* comme parent se sont montrés moins sensibles [118]. Ainsi, le porte greffe Mr.s2/5 s'est révélé résistant vis à vis d'une large gamme de souches pathogènes d'*A. tumefaciens* [12]. Suggérant l'existence d'une base génétique de résistance au crown gall exploitable en sélection, ces espèces ont été proposées pour des programmes de croisements.

Selon Nam *et al.* [125], la récalcitrance de certaines espèces à la tumorigénèse résulte d'une déficience de l'intégration du T-DNA et son expression de façon stable dans le génome de la plante. Dans d'autres cas, selon les mêmes auteurs, la récalcitrance peut résulter d'un déficit dans l'attachement bactérien et non pas à une déficience dans l'intégration et l'expression du T-DNA et ce, vu l'attachement atténué chez deux écotypes d'*Arabidopsis* récalcitrants (Aa-0 et WS) comparés à deux écotypes susceptibles (BI-1 et Petergof). Ce déficit d'attachement peut provoquer un blocage précoce dans le processus d'infection et par conséquent, il pourrait être une des causes principales de la récalcitrance.

D'après Beneddra *et coll.* [122], la résistance de certaines variétés de peuplier est en relation avec la synthèse des cytokinines, signalant que chez les variétés résistantes, la synthèse de cette phytohormone est insuffisante pour initier la tumorigénèse.

En effet, beaucoup de monocotylédones cultivées et légumineuses ne sont pas hôtes pour *Agrobacterium* bien que quelques espèces parmi ces plantes récalcitrantes telles que ; le maïs et le riz ont été transformés "in vitro" par *Agrobacterium* [188]. Les causes de cette résistance non hôte sont dues à la présence de certains facteurs naturels limitant leur transformation. Selon Zhang *et coll.* [189], la présence du 2-hydroxy-4.7-dimethoxybenzoxazin (MDIBOA), qui constitue plus de 98% des exsudats racinaires du maïs, ce composé inhibe la protéine VirA inducteur de l'expression des gènes *vir* chez *Agrobacterium tumefaciens*.

Il est à signaler également que les résultats de l'expérimentation menée, ont montré que quelques grosses tumeurs ont été souvent accompagnées d'une diminution dans la croissance de la partie aérienne. Cette diminution est certainement due à une perturbation du système vasculaire au niveau du point d'infection ; ce qui limite les échanges entre la partie inférieure et la partie supérieure à la tumeur et par conséquent, entrave les fonctions physiologiques de translocation de l'eau et des sels minéraux et par la même la croissance en hauteur. Faivre-Amiot [94] a de son côté rapporté que, lorsque la tumeur se développe précocement sur de jeunes semis ou sur de jeunes boutures, détournant à son profit les éléments nutritifs, la croissance et la rhizogénèse se trouvent fortement perturbées.

Nos résultats révèlent une très grande variabilité dans l'incidence de la maladie chez les quatre espèces d'eucalyptus sensibles. Cette variabilité est liée à l'espèce végétale. Un certain nombre de facteurs relatifs à la plante peuvent être à l'origine de cette variabilité comme par exemple le taux de croissance cellulaire. Dans le même ordre d'idée, Bergmann et Stomp [184] ont rapporté que l'intensité de la division cellulaire chez les végétaux à croissance rapide les rend plus sensibles au crown gall par rapport aux espèces à croissance plus lente, puisque la multiplication des cellules transformées est de même incitée. Ce résultat peut expliquer la différence de susceptibilité entre ces espèces qui diffèrent entre elles par rapport à ce taux de croissance. Par ailleurs, Mullins *et coll.* [190] ont également rapporté que chez l'*Eucalyptus camaldulensis*, les meilleurs clones

transformés via *Agrobacterium tumefaciens* sont ceux qui se régénèrent le mieux *in vitro*, confirmant l'existence d'une relation entre la croissance et la transformation par cette bactérie.

5.2. Virulence des souches : Notion de spécificité d'hôte

En se basant sur le paramètre taux de réactivité, les deux souches bactériennes pathogènes locales E2X et E17 se révèlent plus virulentes sur ces espèces d'eucalyptus testées et ce par rapport à la souche pathogène de référence C58. Rappelons à juste titre que nous avons utilisé deux souches locales (E2X et E17) isolées de tumeurs de crown gall sur *Eucalyptus occidentalis* et une souche de référence C58. La souche C58 diffère des deux autres souches par son origine d'isolement. En effet, cette souche a été isolée à partir des tumeurs d'un porte greffe de cerisier sauvage *Prunus cerasus* [175]. Il est important de rappeler que, les souches d'*Agrobacterium* se sont souvent révélées préférentielles à l'égard des espèces d'où elles ont été isolées. Cette spécificité parasitaire a été plusieurs fois signalée. Selon Cervera *et al.* [13], la souche C58 est plus virulente sur le prunier; l'espèce d'où elle était isolée, que sur d'autres rosacées telles que ; le pommier, poirier...etc. D'autres travaux ont également rapports cette relation spécifique hôte-parasite [181].

Les tumeurs les plus volumineuses ont été obtenues avec les deux espèces *E. melliodora* et *E. umbellata*. Ce qui concorde partiellement avec les groupes déterminés pour la variable taux d'infection en ce qui concerne *E. melliodora*; l'espèce la plus sensible. Tandis que l'espèce *E. occidentalis* s'est classée la dernière. Ce fait peut être dû à la vitesse de croissance des espèces qui peut influencer sur le poids des tumeurs, quant à l'effet souche, la souche E17 se trouve dans un groupe intermédiaire entre les deux souches E2X et C58. Ces trois souches partagent une caractéristique commune, elles hébergent des plasmides Ti de type nopaline [40, 21] ; ce qui peut expliquer la classe intermédiaire de la souche E17 vis-à-vis des deux souches E2X et C58 ; bien que les deux souches locales diffèrent de la souche C58 quand à leurs origine d'isolement.

Chez les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens*, une diversité des types plasmidiques a été également décrite [40]. Nous distinguons des plasmides Ti de type octopine, cucumopine, agropine, vitopine, etc. Ces souches diffèrent les unes des autres par la spécificité de synthèse et de catabolisme des opines ; molécules intervenant comme source de carbone, d'azote et d'énergie pour la bactérie pathogène à l'origine de la tumeur et dans le transfert par conjugaison du plasmide Ti [40].

Selon Machado *et coll.* [191], chez l'hybride *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus europaylla*, des inoculations " *in vitro* " par des souches à nopaline provoquent des tumeurs plus importantes et plus vigoureuses que celles induites par les souches à agropine et à octopine. Ce qui peut également expliquer la forte sensibilité des espèces d'eucalyptus que nous avons étudié. Les résultats obtenus par cette expérimentation, peuvent nous amener à suggérer que les espèces d'eucalyptus peuvent être intéressantes du fait qu'elles soient facilement transformables et par la même être exploitées pour augmenter la résistance aux maladies entre autres. L'insertion chez cette espèce de gènes intéressants par leurs qualités pharmaceutiques et industrielles a de tout temps été recherchée du fait de son pouvoir de croissance élevé en un temps limité.

5.3. Concentration d'inoculum bactérien et tumorigénèse chez l'eucalyptus

Nos résultats ont annoncé une forte variabilité dans la sensibilité de ces espèces d'eucalyptus et dans le poids des tumeurs produites par rapport à la concentration d'inoculum bactérien. En effet, la dose prescrite souvent pour les inoculations bactériennes utilisées dans des expérimentations pour la plupart des bactéries pathogènes varie entre 10^8 et 10^9 CFU/ml; cette dose suffirait pour provoquer l'expression de la maladie. Mais, dans notre cas, nous avons pu induire l'apparition des tumeurs avec une dose plus faible que celle utilisée dans les essais de susceptibilité. En effet, avec la concentration cellulaire de 10^3 CFU/ml nous avons pu parfois atteindre des valeurs qui se rapprochent de celles des fortes doses d'inoculum. Ceci peut être expliqué par l'absence de la compétition des bactéries au niveau du site blessé pour pouvoir réaliser l'étape d'attachement

indispensable avec les cellules de l'hôte. D'après Krimi *et al.* [109] au niveau du sol, la densité des agrobactéries pathogènes oscille entre 10^4 et 10^6 CFU/g et au niveau de la rhizosphère elle varie entre 10^5 et 10^7 CFU/g et ce, durant les saisons de l'année (printemps et été). D'autre part, Picard [93] a estimée la densité cellulaire entre 10^5 et 10^7 CFU/g dans le sol des marcotières de pommier. Ces concentrations se rapprochent de la notre 10^6 CFU/ml et expliquent notre choix.

D'une manière générale, il est connu que la compétition bactérienne diminue les chances d'une bonne colonisation bactérienne et c'est ce qui est justement exploité dans le domaine du biocontrôle par l'utilisation des antagonistes dans le cas du crown gall [1, 104]. De leur côté, Hawes *et coll.* [192] ont rapporté dans un essai de susceptibilité du petit pois au crown gall, que le taux d'apparition de tumeurs et le poids des tumeurs sont proportionnels à la concentration d'inoculum bactérien utilisé. De même, la profondeur des blessures peut influencer sur le poids des tumeurs qui se développent. Selon toujours ces mêmes auteurs, aucune tumeur ne se développe à une concentration d'inoculum inférieure à 10^2 CFU/ml. Tandis qu'un pourcentage de 100% de tumeurs a été obtenu à une concentration supérieure ou égale à 10^8 CFU/ml [192].

Nous avons utilisé par conséquent, une inoculation à une dose de 10^9 CFU/ml pour atteindre un maximum d'efficacité dans la sélection d'espèces résistantes au sein de cette gamme des espèces d'*Eucalyptus*.

Par ailleurs, l'utilisation de la concentration 10^3 CFU/ml a révélé des taux considérables de susceptibilité chez l'eucalyptus, ce qui confirme encore une fois, leur susceptibilité au crown gall ; même à des concentrations plus faibles que celles qui sont souvent utilisées. Les valeurs de 10^3 CFU/ml se rapprochent des valeurs de concentrations des agrobactéries pathogènes dans les sols qui induisent des transformations naturelles de crown gall [107, 109].

De même, une variabilité a été également constatée dans les deux caractères phénotypiques et morphométriques des tumeurs (poids et diamètre) et ce en fonction de l'espèce végétale. Ce qui a été également annoncé par Khawar

et Ozcan [193], qui ont rapporté que le poids et le diamètre des tumeurs induites par la souche pathogène A281 (pTiBo542) d'*Agrobacterium tumefaciens* chez quelques espèces de lentille varie en fonction du génotype et de l'explant utilisé. Un certain nombre de travaux ont également signalé l'effet de la variabilité génotypique des espèces sur ces critères phénotypiques chez l'hybride *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus europhylla* [191] ; chez l'espèce *Pisum sativum* [192] et chez le pois chiche [194].

Dans la présente étude, nous avons également constaté que le poids des tumeurs varie par rapport à la souche utilisée. En effet, les souches utilisées qui diffèrent quand à leur origine d'isolement appartiennent au même groupe d'opines. Différentes réponses ont été également observées entre des souches qui font partie du même groupe opinique [191, 195].

5.4. Corrélation entre types protéiques et résistance intrinsèque spécifique chez l'eucalyptus

La méthodologie utilisée (méthode de Bradford) s'est révélée simple et particulièrement adoptée pour effectuer une extraction et une quantification des protéines solubles (pariétales et cytoplasmiques) chez les quatre espèces d'eucalyptus étudiées. Outre sa rapidité et sa sensibilité, cette méthode présente la particularité d'assurer une combinaison assez stable entre le colorant (bleu de coomassie G250) et les protéines qui existent dans les échantillons végétaux [179].

L'analyse en composantes principales (ACP) effectuée sur les protéines solubles quantifiées chez les quatre espèces d'eucalyptus étudiées met en évidence l'existence de cinq groupes distincts : GI, GII, GIII, GIV et GV. Parmi ces groupes, deux groupes relativement homogènes paraissent les plus importants : le groupe GI corrélé positivement avec l'espèce sensible *E. umbellata* et le groupe GII corrélé positivement avec l'espèce résistante *E. punctata*.

La corrélation existante entre l'espèce sensible *E. umbellata* et le groupe GI qui est représenté surtout par des protéines pariétales quantifiées à partir des tiges inoculées par la souche pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* E17, peut s'expliquer par le rôle de ces protéines dans l'attachement bactérien à la surface de l'hôte. D'après Wagner et Matthysse [196], certaines protéines spécifiques pariétales telles que : les " vitro-nectin like proteins " peuvent être impliquées dans l'attachement bactérien qui constitue une phase essentielle dans le processus d'infection et qui peut constituer un facteur limitant dans la gamme d'hôtes. Cependant, l'échec de cette phase n'est pas responsable de toute limitation de la gamme d'hôtes [197, 196]. En plus des " vitro-nectin like proteins ", une autre glycoprotéine pariétale isolée à partir des racines de petit pois, agit comme un récepteur de la " rhicadhesin ", qui est une protéine bactérienne codée par *Agrobacterium* spp. et autres *Rhizobiaceae* très proches génétiquement [198].

Selon Zhu *et al.* [199], une protéine " cellulose synthase-like protein " CSLA9 potentiellement impliquée dans l'attachement bactérien, a été identifiée chez des plants d'*Arapidobsis*. D'autres gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation de la paroi cellulaire telles que ceux codant pour : les extensines, les osmotines, les protéines riches en proline et les glucanases jouent un rôle dans la reconstitution de la matrice extracellulaire, la transduction du signal et la reconnaissance cellulaire [200, 201].

En revanche, le groupe II représenté par des protéines cytoplasmiques des tiges inoculées par le pathogène est corrélé positivement avec l'espèce résistante *E. punctata*. La corrélation existante peut s'expliquer par la réponse de la plante vis-à-vis de l'attaque bactérienne, cette réponse s'est traduite par une augmentation de la capacité de la plante à se défendre vis-à-vis du pathogène.

Selon Ditt *et coll.* [202], l'induction des gènes de défense chez l'espèce *Ageratum conzoydes* est inversement corrélée avec l'efficacité de la transformation de cette espèce par *Agrobacterium tumefaciens*. Ces auteurs suggèrent que les gènes de défense ont un rôle important dans le contrôle de l'infection et de la transformation.

Veena *et coll.* [76] ont rapporté que l'expression des gènes de défense a été sensiblement réduite pendant les dernières étapes de l'infection par une souche mutante possédant la capacité du transfert des gènes *vir* et du T-DNA, a montré une réinduction significative de ces gènes de défense pendant les derniers stades de l'infection. Ces observations suggèrent que la répression des réponses de défense de l'hôte est nécessaire à la transformation. Il ressort de cette dernière étude que le transfert du T-DNA et des gènes *vir* joue un rôle dans l'expression différentielle des gènes de l'hôte pendant le processus d'infection [76].

Rappelons qu'une panoplie de protéines cytoplasmiques sont impliquées telles que les MAPKs (mitogen activates protein kinases) qui sont activées par perception des PAMPs; qui sont à leur tour associés au pathogène. Ces MAPKs, une fois activées, elles induisent les mécanismes de défense de l'hôte qui ne sont pas encore connus. Ces protéines sont parfois détournées au profit du pathogène pour induire la maladie [203]. Cependant, certains facteurs de virulence du pathogène peuvent inhiber la défense basale élicitée par ces PAMPs. Dans certains cas spécifiques, la plante implique des protéines de résistance spécialisées pour détecter ces facteurs de virulence ou leurs effets sur l'hôte. Par conséquent, une réaction d'hypersensibilité (HR) peut avoir lieu afin d'arrêter la progression du pathogène [204]. D'après Djamei *et coll.* [203], les plantes reconnaissent *Agrobacterium tumefaciens* comme pathogène et activent une cascade de signalisation de défense par activation des MAPKs, y compris le MAPK₃ qui, une fois activé ; phosphoryle VIP1; protéine végétale localisée dans le cytoplasme. Ce dernier sera donc modifié et transporté vers le noyau de la cellule végétale. Il s'agit d'un facteur de transcription qui provoque l'expression de la protéine de défense PR1 (pathogenesis-related). Selon ces auteurs, la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* augmente largement suite à la co-expression du VIP1. Ce qui explique qu'*Agrobacterium* utilise VIP1 comme un adaptateur dans le noyau. Cette découverte montre que la bactérie a développé une stratégie d'exploitation de la cascade de signalisation des mécanismes de défenses de la plante pour intégrer son ADN-T dans le génome de la cellule végétale, stratégie digne de celle du cheval de Troie [203].

Tandis que le groupe III et IV qui semblent de moindre importance, ne sont pas corrélés à aucune des espèces étudiées. Ces deux groupes sont représentés par des protéines pariétales et cytoplasmiques des feuilles des échantillons inoculés par le pathogène et par celles des feuilles des témoins. La non-corrélation dans ce cas n'est pas surprenante du fait que les échantillons témoins n'ont pas subi de stress biotique et ont dépassé le stade de stress abiotique dû à la blessure. Pour le cas des feuilles des échantillons inoculés par le pathogène, qui sont éloignés du lieu d'inoculation. Le groupe V n'est corrélé à aucune espèce, il est très hétérogène et faiblement représenté ce qui ne donnera aucune explication significative.

Une éventuelle différence existante entre les taux protéiques des tiges et les taux protéiques des feuilles a été détectée. Ce résultat démontre que les tiges sont beaucoup plus soumises au stress biotique apporté par l'infection par *Agrobacterium* (stress biotique) que les feuilles qui non pas été soumises à ce dernier. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'elles sont loin des tiges (siège d'inoculation). Ainsi, la différence existante exprime par conséquent la manifestation des gènes de défense suite au stress apporté par l'inoculation et qui peut s'expliquer par le comportement de l'espèce vis-à-vis de cette infection. En d'autres termes nous pouvons dire que ces gènes sont gouvernés selon l'itinéraire de la cascade de signalisation de ces mécanismes de défense qui peuvent être soit exprimés soit réprimés selon l'interaction hôte-parasite qui se fait par voie de communication génique.

Nous aurons souhaité faire des analyses plus fines que le dosage des protéines totales pour comprendre les mécanismes de défense de cet hôte vis à vis d'*Agrobacterium tumefaciens*. Ceci, vu leur double intérêt scientifique ; d'une part dans le cadre de la recherche appliquée et la conception des stratégies de protection de la plante contre l'attaque par ce pathogène. D'autre part, ces mécanismes peuvent être exploités pour améliorer les méthodes de transformation des espèces utilisées dans le domaine de la recherche fondamentale.

CONCLUSION

Les plantes sont en contact permanent avec des micro-organismes dont les rôles sont bien distincts. Certains sont bénéfiques : champignons mycorhiziens ou antagonistes de la flore pathogène du sol, bactéries fixatrices de l'azote ou auxiliaires de la mycorhization. D'autres éliminent les débris végétaux et en recyclent les éléments minéraux. Enfin, certains sont des parasites des plantes, parmi ceux-ci les champignons et les bactéries phytopathogènes. Ces dernières sont à l'origine de graves affections sur beaucoup d'espèces végétales contre lesquelles les méthodes de lutte utilisées sont souvent inefficaces.

L'eucalyptus est une essence forestière sur laquelle le crown gall constitue une véritable menace surtout en pépinières en raison des pratiques culturales qui favorisent son déclenchement et son développement. La lutte contre cette maladie repose essentiellement sur une bonne prophylaxie et ce, par le contrôle des épidémies. Ce moyen vise principalement à limiter les risques de la transmission du pathogène entre ces principaux réservoirs : le sol et la plante. Une détection spécifique des *Agrobacterium* pathogènes dans les sols permet d'évaluer les risques du déclenchement d'éventuelles épidémies de crown gall [93].

Pour la sélection des variétés résistantes au crown gall, l'absence de réelles possibilités de lutte chimique et la difficulté de la mise en œuvre de mesures prophylactiques renforcent l'intérêt de cette approche dans le cas du crown gall.

La présente étude entreprend une contribution dans le développement des méthodes de lutte contre cette maladie par la recherche d'une résistance intrinsèque chez quelques espèces d'eucalyptus, vis-à-vis du crown gall.

D'après les résultats de cette étude, l'essai d'inoculation sous serre révèle une grande variabilité dans les réponses des ces espèces d'eucalyptus testées vis-à-vis des inoculations par les souches bactériennes pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens*, Mis à part l'espèce *E. punctata*, les quatre espèces testées ; *E. melliodora*, *E. albens*, *E. umbelleta* et *E. occidentalis* se sont révélées sensibles où l'espèce *E. melliodora* était la plus sensible avec un taux de 93,75% , suivie par l'espèce *E. albens* avec 50%, puis l'espèce *E. umbelleta* avec un taux de 50% et ce avec la souche E17 , tandis que l'espèce *E. occidentalis* était moins sensible avec un pourcentage de 18,75%. Ces espèces devront être évitées lors de l'installation de nouvelles pépinières sur des sols conductibles et plus particulièrement les deux espèces qui se sont montrées très sensibles.

D'après nos résultats, l'espèce *E. punctata*, semble une espèce très intéressante vu son comportement à l'égard des trois souches pathogènes testées ; E17, E2X et C58. Même à des concentrations très élevées cette espèce n'a pas donné naissance à des tumeurs. Cette espèce mérite d'être plus étudiée surtout en ce qui concerne l'âge convenable à sa sensibilité car, nos résultats suggèrent que la résistance est liée au stade d'inoculation. Rappelons aussi que, Belaskri [24] a de son côté rapporté que cette espèce n'est sensible qu'à l'âge de 3 à 4 mois vis-à-vis de l'infection naturelle du crown gall et ce, au niveau de six pépinières forestières prospectées au nord ouest algérien, ce qui est peut être lié aux pratiques culturales favorisant son infection à cet âge. La confirmation de cette résistance et sa compréhension contribue sans aucun doute au contrôle des épidémies de crown gall rencontrées avec cette plante [24, 21].

D'un point de vue paramètre poids des tumeurs, les deux souches E17 et E2X isolées de l'eucalyptus se révèlent plus virulentes sur les espèces d'eucalyptus testées par rapport à la souche de référence C58 isolée de prunier. Cette spécificité d'hôte rencontrée dans notre cas à déjà était signalée dans d'autres travaux dans le cas du crown gall sur l'eucalyptus [24, 173] et sur d'autres espèces végétales sensibles [181, 13].

Il est également très important de rappeler que la plupart des espèces forestières sont élevées dans des pépinières destinées également à la production des espèces fruitières d'où ; le risque de la transmission de la maladie de ces espèces d'eucalyptus sensibles vers d'autres espèces fruitières et ornementales connues pour leur sensibilité au crown gall telles que : la vigne, les rosacées à noyaux et le rosier...etc.

En ce qui concerne le dosage des protéines solubles chez ces espèces d'eucalyptus qui teste l'éventuelle implication de ces protéines dans les mécanismes de la sensibilité ou de la résistance à la maladie. Ces analyses révèlent alors une corrélation positive entre les protéines cytoplasmiques et l'espèce sensible *E. umbellata*. Cependant, une corrélation positive existe entre les protéines pariétales et l'espèce résistante *E. punctata*. Ces deux corrélations suggèrent l'expression des gènes codant pour ces protéines en réponse au stress biotique apporté par l'inoculation bactérienne que ce soit dans le cas de la maladie ou de la résistance. Par ailleurs, il est certain que la caractérisation des effecteurs de la pathogénie et de leurs cibles moléculaires aura des conséquences importantes dans la conception de nouvelles stratégies de lutte contre la maladie de la tumeur du collet.

La facilité de la reproduction des tumeurs sur cette essence forestière et sa croissance rapide font du crown gall de l'eucalyptus un modèle extrêmement intéressant dans la recherche d'une résistance chez d'autres espèces de ce genre. Cette étude mérite d'être poursuivie pour mieux comprendre les mécanismes qui gèrent la défense ou la vulnérabilité des espèces végétales au crown gall.

A l'échelle pratique, la sensibilisation des agriculteurs pour le choix judicieux des cultivars résistants ou moins sensibles, en se référant aux travaux de sélection contribue certainement à la diminution du taux d'inoculum dans les sols et par conséquent au contrôle des épidémies.

APPENDICE A

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

° C	: Degré Celsius
%	: pourcentage
<i>A. fici</i>	: <i>Agrobacterium fici</i>
<i>A. larrymoorei</i>	: <i>Agrobacterium larrymoorei</i>
<i>A. radiobacter</i>	: <i>Agrobacterium radiobacter</i>
<i>A. rhizogenes</i>	: <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A. rubi</i>	: <i>Agrobacterium rubi</i>
<i>A. tumefaciens</i>	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. vitis</i>	: <i>Agrobacterium vitis</i>
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ACP	: Analyse en composantes principales
ANOVA	: Analysis of variance
ARN	: Acide ribonucléique
APG	: Angiosperm Phylogeny Group
bv	: biovar
cm	: centimètre
DO	: Densité optique
<i>E</i>	: <i>Eucalyptus</i>
EF-TU	: Elongation factor TU
g	: gramme
h	: Heure
HR	: Réaction d'hypersensibilité
IAA	: Indole acetic acid (auxin)
INRF	: Institut national de la recherche forestière
iPMP	: Isopentenyl adenosine 5' monophosphate
kb	: Kilo base
Lb	: Left border
Log	: Logarithme
LPS	: Lipopolysaccharide
LSD	: Least significant difference
m	: mètre
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MG	: Mannitol-Glutamate (milieu de culture)
mg	: milligramme

MDIBOA	: 2-hydroxy-4,7-dimethoxybenzo- xazin
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mn	: minute
MNP	: Most probable number
M	: mole
nm	: nanomètre
µl	: microlitre
µM	: micromole par litre
MF	: matière fraîche
NLS	: Nuclear localization signal
NPC	: Nuclear pore complex
Occ	: Octopine catabolism
Ocs	: Octopine synthase
<i>onc</i>	: oncogènes
<i>OPC</i>	: Opine catabolism
<i>ori</i>	: origin of replication
PAMPs	: Microbe-Associated Molecular Patterns
PAST	: PAlaeontological STatistics
pb	: Paire de bases
PCR	: Polymerase chain reaction
pH	: potentiel hydrogène
PR	: Pathogenesis- related protein
pTi	: Plasmide "tumor inducing"
Rb	: Right border
RIMEs	: <i>Rhizobium</i> -specific intergenic mosaic elements
SAR	: Systemic acquired resistance
Sym	: Symbiosis plasmid
T4SS	: Type IV Secretion System
T-DNA	: Transferred -DNA
Ti	: tumor inducing
TMV	: Tobacco mosaic virus
tr	: tour
UFC / ml	: Colony-forming unit per milliliter
UV	: Rayons ultraviolets
<i>vir</i>	: virulence
ZMP	: Zéatine riboside-5'-monophosphate

APPENDICE B

1.1. Composition des milieux de culture utilisés

1.1.1. Milieu MG (Mannitol-Glutamate) non sélectif (Moore *et al.*, 1988)

Mannitol.....	10.0 g
L(-) acide glutamique.....	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Nacl.....	0.2 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2 g
Extrait de levure	0.5 g
Agar.....	15 g

pH =7.20

- * MgSO₄ doit être solubilisé séparément dans 20 à50 ml d'eau distillée.
- * Pour la préparation du milieu en boites ; le milieu est stérilisé en autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes, puis coulé en boites de pétries.
- * Pour la préparation du milieu en tubes ; le milieu est dissout à chaud, puis réparti en tubes à essais, à raison de 3 à 5ml par tube. Les tubes sont ensuite stérilisés par autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes.

APPENDICE C

Courbes de tendance des souches bactériennes utilisées

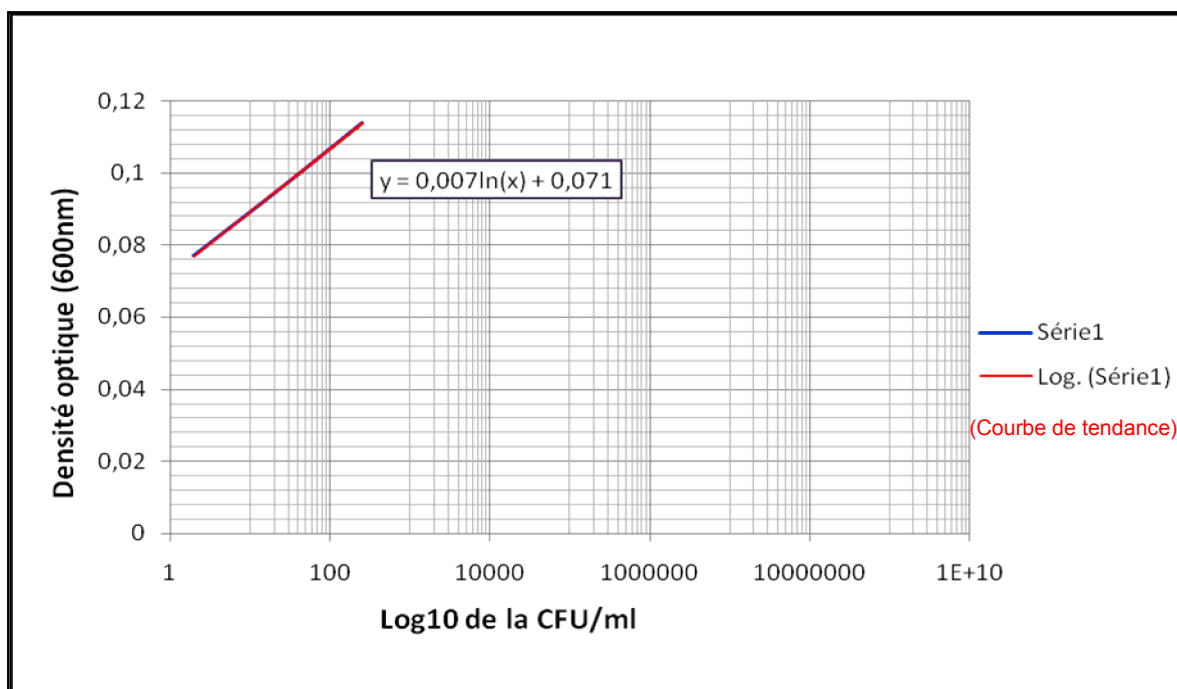


Figure C.1 : Courbe de tendance de la souche C58

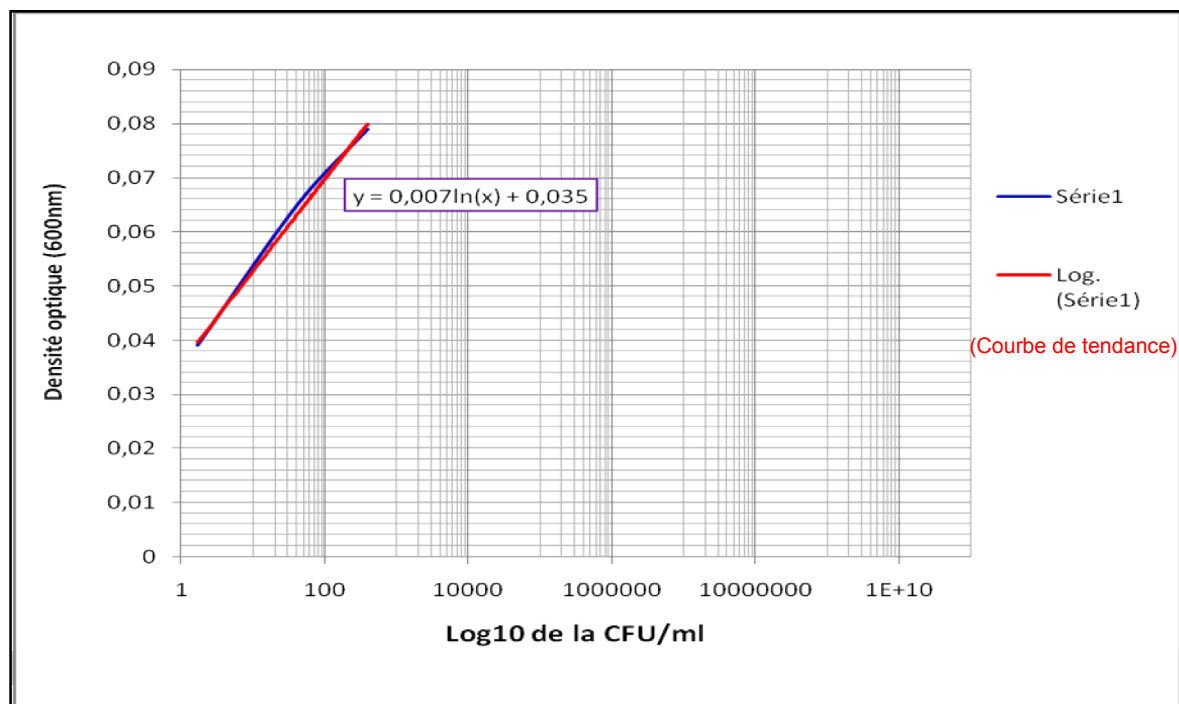


Figure C.2 : Courbe de tendance de la souche E17

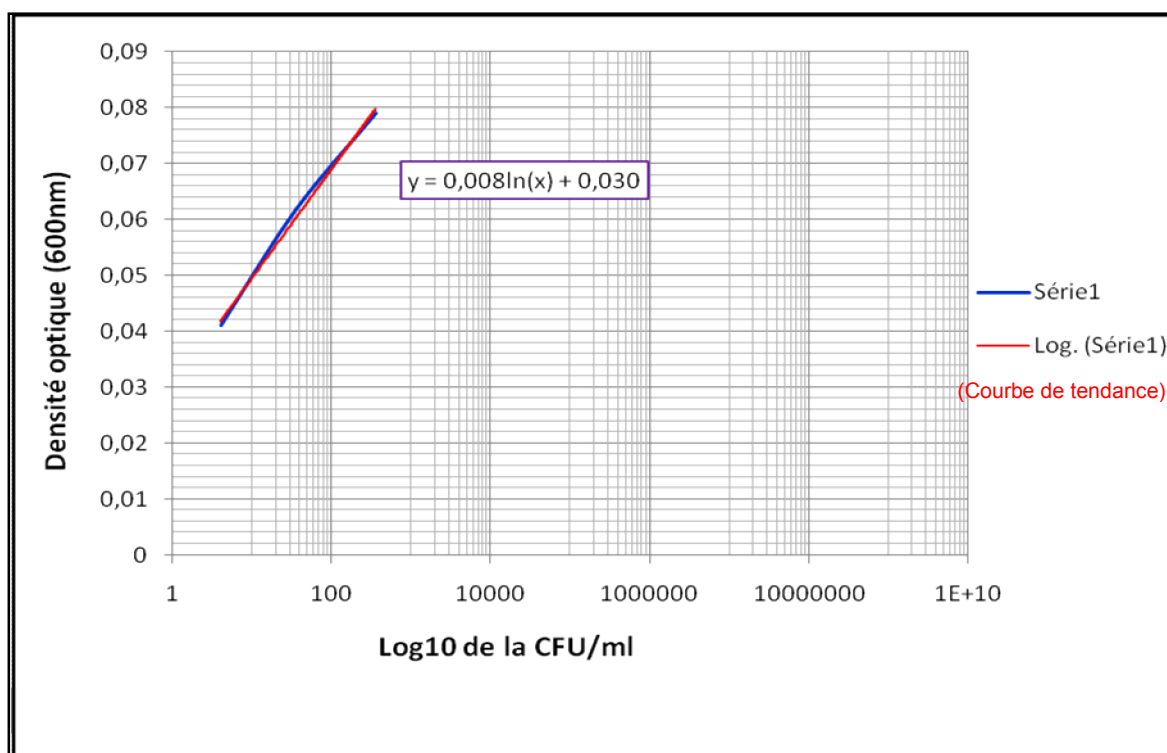


Figure C.3 : Courbe de tendance de la souche E2X

APPENDICE D



Figure D.1: Dispositif expérimental de l'essai d'inoculation sous serre ;

a : espèce *E. melliodora*

b : espèce *E. punctata*

c : espèce *E. umbellata*

d : espèce *E. albens*

e : espèce *E. occidentalis* (n'est pas sur la photo)

APPENDICE E

TABLEAUX DES RESULTATS BRUTS

Tableau E.1: Taux de réactivité et moyennes des poids et des diamètres des tumeurs.

espèce	souche	dose	poids	diamètre	% de réactivité
<i>E. umbellata</i>	C58	10 ³	0,2875	7,125	12,5
<i>E. umbellata</i>	E 2X	10 ³	0,34325	8,2125	25
<i>E. umbellata</i>	E17	10 ³	0,3365	7,54666667	37,5
<i>E. umbellata</i>	C58	10 ⁶	1,2904	15,2	6,25
<i>E. umbellata</i>	E 2X	10 ⁶	0,6223	7,775	12,5
<i>E. umbellata</i>	E17	10 ⁶	1,4773	14,3	18,75
<i>E. umbellata</i>	C58	10 ⁹	0,7335	10,7	12,5
<i>E. umbellata</i>	E 2X	10 ⁹	0,01175	2,25	12,5
<i>E. umbellata</i>	E17	10 ⁹	0,5414875	10,54375	50
<i>E. albens</i>	C58	10 ³	0,1908	6,69	31,25
<i>E. albens</i>	E 2X	10 ³	0,47966	10,09	31,25
<i>E. albens</i>	E17	10 ³	0,1917875	6,8625	50
<i>E. albens</i>	C58	10 ⁶	0,33908	8,48	31,25
<i>E. albens</i>	E 2X	10 ⁶	0,1819875	7,0875	50
<i>E. albens</i>	E17	10 ⁶	0,14835	5,625	50
<i>E. albens</i>	C58	10 ⁹	0,55725	10,6	37,5
<i>E. albens</i>	E 2X	10 ⁹	0,329925	6,35	25
<i>E. albens</i>	E17	10 ⁹	0,11795	5,825	12,5
<i>E. melliodora</i>	C58	10 ³	0,79091429	11,4857143	43,75
<i>E. melliodora</i>	E 2X	10 ³	0,65232727	10,1045455	68,75
<i>E. melliodora</i>	E17	10 ³	0,50707692	9,41923077	81,25
<i>E. melliodora</i>	C58	10 ⁶	0,9833	11,8833333	56,25
<i>E. melliodora</i>	E 2X	10 ⁶	0,37905333	7,97	93,75
<i>E. melliodora</i>	E17	10 ⁶	0,49152143	9,61428571	8,75
<i>E. melliodora</i>	C58	10 ⁹	0,49481429	9,11428571	43,75
<i>E. melliodora</i>	E 2X	10 ⁹	0,6197875	10,6	50
<i>E. melliodora</i>	E17	10 ⁹	0,51188462	9,71153846	81,25
<i>E. occidentalis</i>	C58	10 ³	0,256	8,275	12,5
<i>E. occidentalis</i>	E 2X	10 ³	0,045	2,65	6,25
<i>E. occidentalis</i>	E17	10 ³	0,08136667	4,55	18,75
<i>E. occidentalis</i>	C58	10 ⁶	0	0	0
<i>E. occidentalis</i>	E 2X	10 ⁶	0,182925	6,6575	25
<i>E. occidentalis</i>	E17	10 ⁶	0,5414	8	18,75
<i>E. occidentalis</i>	C58	10 ⁹	0,11825	4,325	12,5
<i>E. occidentalis</i>	E 2X	10 ⁹	0,13985	5,6	12,5
<i>E. occidentalis</i>	E17	10 ⁹	0,23826667	6,73333333	18,75

APPENDICE F

TABLEAUX D'ANALYSES DE LA VARIANCE

Tableau F.1 : Analyse de la variance pour le paramètre incidence de la maladie.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeur F	Probabilités	
A- Espèce	15230	3	5076,68	55,59	0,0000	T.H. Significative
B- Souche	2109,37	2	1054,69	11,55	0,0016	H. Significative
C- Concentration	279,948	2	139,974	1,53	0,2554	non Significative
Interactions						
AB	1032,99	6	172,164	1,89	0,1648	non Significative
AC	1273,87	6	212,312	2,32	0,1007	non Significative
BC	657,552	4	164,388	1,8	0,1937	non Significative
Résiduelle	1095,92	12	91,3267			
Totale corrigée	21679,7	35				

APPENDICE F (suite)

Tableau F.2 : Analyse de la variance pour le paramètre poids des tumeurs.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeur F	Probabilités	
A- Espèce	1,02587	3	0,341958	11,67	0,0010	H. Significative
B- Souche	0,265189	2	0,132594	4,53	0,0368	Significative
C- Concentration	0,422982	2	0,211491	7,22	0,0099	H. Significative
Interactions						
AB	0,365723	6	0,0609538	2,08	0,1385	non significative
AC	0,881605	6	0,146934	5,02	0,0104	Significative
BC	0,250155	4	0,0625387	2,13	0,1444	non significative
Résiduelle	0,322245	11	0,029295			
Totale corrigée	3,71521	34				

APPENDICE F (suite)

Tableau F.3 : Analyse de la variance pour le paramètre diamètre des tumeurs

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeur F	Probabilités	
A- Espèce	64,3038	3	21,4346	2.4	0,0328	Significative
B- Souche	31,6804	2	15,8402	3.11	0,0852	non Significative
C- Concentration	20,2694	2	10,1347	1.99	0,1832	non Significative
Interactions						
AB	35,5517	6	5,92528	1.16	0,3912	non Significative
AC	39,847	6	6,64117	1.3	0,3325	non Significative
BC	15,0726	4	3,76816	0.74	0,5846	non Significative
Résiduelle	56,0758	11	5,0978			
Totale corrigée	276,391	34				

APPENDICE G

TABLEAUX DES TESTS (LSD)

Tableau G.1.1 : Tests des étendues multiples pour le paramètre taux de réactivité par espèce d'eucalyptus.

Méthode : 95,0 % LSD.

Espèce	Effectif	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
<i>E. occidentalis</i>	9	13,8889	3,1855	X (C)
<i>E. umbellata</i>	9	20,8333	3,1855	X (C)
<i>E. albens</i>	9	35,4167	3,1855	X (B)
<i>E. melliodora</i>	9	67,3611	3,1855	X (A)

Tableau G.1.2 : Tests des étendues multiples pour le paramètre taux de réactivité par souche.

Méthode : 95,0 % LSD.

Souche	Effectif	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
C58	12	25	2,75872	X (C)
E2X	12	34,375	2,75872	X (B)
E17	12	43,75	2,75872	X (A)

APPENDICE G (suite)

Tableau G.2.1: Tests des étendues multiples pour le paramètre poids par espèce.

Méthode : 95,0 % LSD.

Espèce	Effectif	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
<i>E. occidentalis</i>	8	0,247209	0,0658787	X (B)
<i>E. albens</i>	9	0,281866	0,0570526	X (B)
<i>E. melliodora</i>	9	0,603409	0,0570526	X (A)
<i>E. umbellata</i>	9	0,62711	0,0570526	X (A)

Tableau G.2.2 : Tests des étendues multiples pour le paramètre poids par souche.

Méthode : 95,0 % LSD.

Souche	Effectif	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
E2X	12	0,332318	0,049409	X (B)
E17	12	0,432074	0,049409	XX (AB)
C58	11	0,555303	0,0552409	X (A)

Tableau G.2.3 : Tests des étendues multiples pour le paramètre poids par concentration.

Méthode : 95,0 % LSD.

Concentration d'inoculum	Effectif	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
10 ³	12	0,346849	0,049409	X (B)
10 ⁹	12	0,367893	0,049409	X (B)
10 ⁶	11	0,604954	0,0552409	X (A)

APPENDICE G (suite)

Tableau G.3.1: Tests des étendues multiples pour le paramètre diamètre par espèce.

Méthode : 95,0 % LSD.

Espèce	Effectif	Moyenne MC	Ecart-type MC	Groupe homogène
<i>E. occidentalis</i>	8	6,38917	0,869039	X (C)
<i>E. albens</i>	9	7,51222	0,75261	XX (BC)
<i>E. umbellata</i>	9	9,29477	0,75261	XX (AB)
<i>E. melliodora</i>	9	9,98921	0,75261	X (A)

APPENDICE H
REACTIFS UTILISE POUR LE DOSAGE DES PROTEINES

*** Réactif de Bradford :**

Bleu de coomassie G250 (sevra).....	100	mg
Ethanol (95%).....	50	ml
Acide phosphorique (85%)	100	ml
Eau distillée.....	1000	ml

APPENDICE I

RESULTATS DU DOSAGE DES PROTEINES

Tableau I.1 : taux des protéines solubles totales quantifiées chez les quatre espèces d'eucalyptus étudiées exprimés en (mg/ g de MF)

<i>Espèce</i> Echantillon	<i>E. umbellata</i>	<i>E. albens</i>	<i>E. punctata</i>	<i>E. melliodora</i>
EMFPP1	100,20	98,40	93,07	94,60
EMFPP2	96,73	99,33	92,67	95,60
EMFPP3	96,53	100,20	92,53	93,07
EMFPP4	96,53	100,80	93,00	93,73
EMFPC1	94,13	105,27	91,53	96,73
EMFPC2	101,53	104,47	94,13	99,07
EMFPC3	96,80	100,53	92,80	95,07
EMFPC4	96,80	100,33	95,27	95,33
EMTPP1	105,40	99,07	95,07	96,13
EMTPP2	93,27	100,40	90,67	94,93
EMTPP3	106,40	99,47	92,67	95,20
EMTPP4	105,40	99,40	91,73	93,80
EMTPC1	102,67	104,13	95,53	95,67
EMTPC2	102,27	100,80	95,60	98,73
EMTPC4	102,27	101,93	95,80	95,60
ESFPP1	97,73	99,87	91,80	88,20
ESFPP2	95,87	97,47	89,73	91,47
ESFPP3	100,80	97,87	89,93	90,93
ESFPP4	97,93	96,00	91,33	90,20
ESFPC1	98,73	97,33	91,67	93,40
ESFPC2	97,87	97,93	95,47	93,40
ESFPC3	96,27	98,80	93,87	95,60
ESFPC4	99,93	98,67	92,80	96,53
ESTPP1	98,67	97,00	90,87	90,60
ESTPP2	100,87	97,00	95,47	92,53
ESTPP3	97,87	100,80	91,13	92,40
ESTPP4	106,13	100,53	91,60	89,33
ESTPC1	101,47	103,20	94,27	94,20
ESTPC2	98,53	103,33	93,93	93,40
ESTPC3	99,40	101,13	94,27	94,33
ESTPC4	98,40	100,07	97,20	95,33

EMTPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inoculées par la bactérie.

EMTPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants inoculées par la bactérie.

EMFPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants inoculées par la bactérie.

EMFPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants inoculées par la bactérie.

ESTPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants témoins.

ESTPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons de tiges des plants témoins.

ESFPP : protéines pariétales quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants témoins.

ESFPC : protéines cytoplasmiques quantifiées à partir des échantillons des feuilles des plants témoins.

APPENDICE J

PROTEINES DES FEUILLES ET DES TIGES

Tableaux J.1 : Moyennes des taux protéiques quantifiés (feuilles et tiges) chez les quatre espèces d'Eucalyptus (mg/ g de MF).

Espèce Echantillon	<i>E. umbellata</i>	<i>E. albens</i>	<i>E. punctata</i>	<i>E. melliodora</i>
ETSPP	100,88	98,83	92,27	91,22
ETSPC	99,45	101,93	94,92	94,32
ETMPP	102,62	99,58	92,53	95,02
ETMPC	102,40	102,29	95,64	96,67
EFMPP	97,50	99,68	92,82	94,25
EFMPC	97,32	102,65	93,43	96,55
EFSPP	98,08	97,80	90,70	90,20
EFSPC	98,20	98,18	93,45	94,73

Tableau J.2 : Valeurs propres et taux de variance des deux premiers axes (suite tableau)

L'axe Variance	F1	F2
Valeur propre	9,98344	4,3843
% de la variance	62,218	27,324

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Ryder, M.H. and Jones, D.A.** « Biological control of crown gall using *Agrobacterium* strains K84 and K1026 ». Australian Journal of Plant Physiology, vol.18, 1991, pp: 571-579.
2. **Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van Den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J.** « Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability ». Nature, vol. 252, 1974, pp: 169-170.
3. **Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester, E.W.** « Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens* ». Journal of Bacteriology, vol. 123, N°1, 1975, pp: 255-264.
4. **Gelvin, S.B.** « *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration ». Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, vol.51, 2000, pp: 223-256.
5. **Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S.K. and Winans, S.C.** « The bases of crown gall tumorigenesis ». Journal of Bacteriology, vol. 182, N°14, 2000, pp: 3885-3895.
6. **Escobar, M.A. and Dandekar, A.M.** « *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease ». Trends in Plant Science, vol. 8, N°8, 2003, pp: 380-386.

7. **Faivre-Amiot, A.** « Maladies hyperplasmiques d'origine bactérienne en culture fruitière: Les bactérioses et les viroses des arbres fruitiers », (Collection de Viennot-Bourgin, G.), Ed. Ponsot, M., Paris, France, **1968**, pp: 102-125.
8. **Davet, P.** « Vie microbienne du sol et production végétale ». Ed. INPV, Paris, **1996**, 465p.
9. **Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A. and Khemici, E.** « Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84 ». Agronomie, vol. **11**, **1991**, pp: 901-908.
10. **De Cleene, M. and De Ley, J.** « The host range of crown gall ». Botanical Review, vol. **42**, N°4, **1976**, pp: 389-466.
11. **Burr, T.J., Bazzi, C., Süle, S. and Otten, L.** « Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and development of disease control strategies ». Plant Disease, vol. **82**, N°12, **1998**, pp: 1288-1297.
12. **Zoina, A. and Raio, A.** « Susceptibility of some peach rootstocks to crown gall ». Journal of Plant Pathology, vol. **81**, N°3, **1999**, pp: 181-187.
13. **Cervera, M., López, M.M., Navarro, L. and Peña, L.** « Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants ». Physiological and Molecular Plant Pathology, vol. **52**, **1998**, pp: 67-78.
14. **Cole, J.R.** « Control of crown gall, *Agrobacterium tumefaciens*, on pecans ». Plant Disease Reporter, vol. **53**, N°9, **1969**, pp: 712-713.
15. **Tan, B.S., Yabuki, J., Matsumoto, S., Kageyama, K. and Fukui, H.** « PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan ». Journal of General Plant Pathology, vol. **69**, **2003**, pp: 258-266.

16. **Vaudequin-Dransart, V., Petit, A., Poncet, C., Ponsonnet, C., Nesme, X., Jones, J.B., Bouzar, H., Chilton, W.S. and Dessaux, Y.** « Novel Ti plasmids in *Agrobacterium* strains isolated from fig tree and chrysanthemum tumors and their opinelike molecules ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. **8**, N°2, **1995**, pp: 311-321.

17. **Zoina, A., Raio, A., Peluso, R. and Spasiano, A.** « Characterization of agrobacteria from weeping fig (*Ficus benjamina*) ». *Plant Pathology*, vol. **50**, N°5, **2001**, pp: 620-627.

18. **Nesme, X., Michel M,-F. and Digat B.** « Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus L.* from a single nursery ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **53**, N°4, **1987**, pp: 655-659.

19. **Huang, Y. and Tauer, C.G.** « Integrative transformation of *Pinus taeda* L. and *P. echinata* MILL. by *Agrobacterium tumefaciens* ». *Forest Genetics*, vol. **1**, N°1, **1994**, pp: 23-31.

20. **Krimi, Z.** « Crown gall on *Eucalyptus occidentalis* seedlings ». New and Unusual records. *Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin*, vol. **31**, N°1, **2001**, pp: 111-117.

21. **Krimi, Z., Raio, A., Petit, A., Nesme, X. and Dessaux, Y.** « *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* ». *European Journal of Plant Pathology*, vol. **116**, **2006**, pp: 237-246.

22. **Siemaszro, W.** « Phytopathologische Beobachtungen in Polen ». *Centralbl. für Bakt, t. LXXVIII, fasc.1-7*, **1929**, pp: 113-116.

23. **Imazeki, R.** « Introduced diseases with particular attention to the threat they pose forest protection in Asia ». Proceedings of the Fifth world forestry Congress, Seattle, USA, **1960**, pp: 2.
24. **Belaskri, A.** « Incidence de la maladie du crown gall de l'eucalyptus dans les pépinières forestières de l'Ouest algérien ». Mémoire de Magister, Université Abou bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, **2006**, 101p.
25. **Kerstens, K. and De ley, J.** « Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942, 359^{AL} ». **1984**, pp: 244-254. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Ed. Krieg, N. R. & Holt, J. G., The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
26. **Psallidas, P.G.** « Large-scale application of biological control of crown gall in Greece ». Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin, vol. **18**, N°1, **1988**, pp: 61-66.
27. **Pulawska, J., Malinowski, T. and Sobiczewski, P.** « Diversity of plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* isolated from fruit trees in Poland ». Journal of Phytopathology, vol. **146**, **1998**, pp: 465-468.
28. **Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y. and Gardan, L.** « Characterization of plasmid-borne and chromosome-encoded traits of *Agrobacterium* biovar1, 2, and 3 strains from France ». Applied and Environmental Microbiology, vol. **66**, N°5, **2000**, pp: 1818-1825.
29. **Ophel, K. and Kerr, A.** « *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines ». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. **40**, N°3, **1990**, pp: 236-241.
30. **Bouzar, H. and Jones, J.B.** « *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumors of *Ficus benjamina* ». International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, vol. **51**, N°3, **2001**, pp: 1023-1026.

31. **Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H.** « A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola*, and *R. vitis* ». International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. **51**, N°1, **2001**, pp: 89-103.

32. **Farrand, S.K., Van Berkum, P.B. and Oger, P.** « *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae* ». International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. **53**, N° 5, **2003**, pp: 1681-1687.

33. **Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H.** « Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - a reply to Farrand *et al.* (2003) ». International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. **53**, N°5, **2003**, pp: 1689-1695.

34. **Martínez-Romero, M.E., Lindström, K., Laguerre, G., de Lajudie, P., Willems, A. and Young, J.P.W.** « International Committee on Systematics of Prokaryotes: Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium* ». International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. **55**, N°3, **2005**, pp: 1383.

35. **Braun, A.C.** « Tumor inception and development in the crown gall disease ». Annual Review of Plant Physiology, vol. **13**, **1962**, pp: 533-558.

36. **Hess, K.M. Dudley, M.W., Lynn, D.G., Joerger, R.D. and Binns, A.N.** « Mechanism of phenolic activation of *Agrobacterium* virulence genes: development of a specific inhibitor of bacterial sensor / response systems ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. **88**, N°17, **1991**, pp: 7854-7858.

37. **Binns, A.N. and Castantino, P.** « The *Agrobacterium* oncogenes ». **1998**, pp: 251-266. In: The *Rhizobiaceae*: molecular biology of model plant - associated bacteria, Ed. Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

38. **Körber, H., Strizhov, N., Staiger, D., Feldwisch, J., Olsson, O., Sandberg, G., Palme, K., Schell, J. and Koncz, C.** « T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants ». The EMBO Journal, vol. **10**, N°**13**, **1991**, pp: 3983-3991.

39. **Tinland, B., Fournier, P., Heckel, T. and Otten, L.** « Expression of a chimaeric heat-shock-inducible *Agrobacterium 6b* oncogene in *Nicotiana rustica* ». Plant Molecular Biology, vol. **18**, N°**5**, **1992**, pp: 921-930.

40. **Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S.K. and Murphy, P.J.** « Opines and opine-like molecules involved in plant-*Rhizobiaceae* interactions ». **1998**, pp: 173-197. In: The *Rhizobiaceae*: molecular biology of model plant-associated bacteria, Ed. Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

41. **Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G.E., Almeida Jr, N.F., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Karp, P.D., Bovee Sr, D., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M.-J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z.-Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S.V., Tomb, J.-F., Gordon, M.P., Olson, M.V. and Nester, E.W.** « The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58 ». Science, vol. **294**, **2001**, pp: 2317-2323.

42. **Tabata, S., Hooykaas, P.J.J. and Oka, A.** « Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3 ». *Journal of Bacteriology*, vol. **171**, N°3, **1989**, pp: 1665-1672.
43. **Petit, A., Tempé, J., Kerr, A., Holsters, M., Van Montagu, M. and Schell, J.** « Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids ». *Nature*, vol. **271**, N°5645, **1978**, pp: 570-572.
44. **Bolton, G.W., Nester, E.W. and Gordon, M.P.** « Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence ». *Science*, vol. **232**, N°4753, **1986**, pp: 983-985.
45. **Ankenbauer, R.G. and Nester, E.W.** « Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides ». *Journal of Bacteriology*, vol. **172**, N°11, **1990**, pp: 6442-6446.
46. **Shimoda, N., Toyoda-yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y. and Machida, Y.** « Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, vol. **87**, **1990**, pp: 6684-6688.
47. **Citovsky, V., Kozlovsky, S.V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A. and Tzfira, T.** « Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection ». *Cellular Microbiology*, vol. **9**, N°1, **2007**, pp: 9-20.
48. **Wise, A.A., Voinov, L. and Binns, A.N.** « Intersubunit complementation of sugar signal Transduction in VirA heterodimers and posttranslational regulation of VirA activity in *Agrobacterium tumefaciens* ». *Journal of Bacteriology*, vol. **187**, N°1, **2005**, pp: 213-223.

49. **Jin, S., Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G. and Nester, E.W.** « Phosphorylation of VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: Essential role in biological activity of VirG ». *Journal of Bacteriology*, vol. **172**, N°9, **1990a**, pp: 4945-4950.
50. **Mukhopadhyay, A., Gao, R. and Lynn, D.G.** « Integrating input from multiple signals: The VirA/VirG two-component system of *Agrobacterium tumefaciens* ». *ChemBioChem*, vol. **5**, N°11, **2004**, pp: 1535-1542.
51. **Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G., Gordon, M.P. and Nester, E.W.** « The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for *vir* gene regulation ». *Journal of Bacteriology*, vol. **172**, N°2, **1990b**, pp: 525-530.
52. **Roitsch, T., Wang, H., Jin, S. and Nester, E.W.** « Mutational analysis of the VirG protein, a transcriptional activator of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes ». *Journal of Bacteriology*, vol. **172**, N°10, **1990**, pp: 6054-6060.
53. **Peng, W.-T., Lee, Y.-W. and Nester, E.W.** « The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein ChvE ». *Journal of Bacteriology*, vol. **180**, N°21, **1998**, pp: 5632-5638.
54. **Gao, R. and Lynn, D.G.** « Environmental pH sensing: resolving the VirA/VirG two-component system inputs of *Agrobacterium* pathogenesis ». *Journal of Bacteriology*, vol. **187**, N°6, **2005**, pp: 2182-2189.
55. **Reuhs, B.L., Kim, J.S. and Matthysse, A.G.** « Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of cell-associated, acidic polysaccharide ». *Journal of Bacteriology*, vol. **179**, N°17, **1997**, pp: 5372-5379.

56. **Matthysse, A.G. and McMahan, S.** « Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD* and *attR* mutants ». Applied and Environmental Microbiology, vol. **64**, N°7, **1998**, pp: 2341-2345.
57. **Matthysse, A.G., Holmes, K.V. and Gurlitz, R.H.G.** « Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells ». Journal of Bacteriology, vol. **145**, N°1, **1981**, pp: 583-595.
58. **Veluthambi, K., Ream, W. and Gelvin, S.B.** « Virulence genes, borders, and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* ». Journal of Bacteriology, vol. **170**, N°4, **1988**, pp: 1523-1532.
59. **Howard, E.A. and Citovsky, V.** « The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex ». BioEssays, vol. **12**, N°3, **1990**, pp: 103-108.
60. **Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M.T., Regensburg-Tuïnk, T.J.G. and Hooykaas, P.J.J.** « VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells ». Science, vol. **290**, N°5493, **2000**, pp: 979-982.
61. **Christie, P.J.** « *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: A paradigm for a new family of multifunctional transporters in Eubacteria ». Journal of Bacteriology, vol. **179**, N°10, **1997**, pp: 3085-3094.
62. **Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., O'Callaghan, D. and Ramuz, M.** « Systèmes de sécrétion des protéines de type IV et virulence bactérienne ». Médecine/ Sciences, vol. **18**, N°4, **2002**, pp: 439-447.

63. **Lai, E.-M. and Kado, C.I.** « Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens* ». *Journal of Bacteriology*, vol. **180**, N°10, **1998**, pp: 2711-2717.
64. **Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D. and Zambryski, P.** « Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells ». *Science*, vol. **256**, **1992**, pp: 1802-1805.
65. **Howard, E.A., Zupan, J.R., Citovsky, V. and Zambryski, P.C.** « The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C- terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells », *Cell*, vol. **68**, N°1, **1992**, pp: 109-118.
66. **Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G.P., Schell, J., Hohn, B. and Koncz, C.** « T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants ». *The EMBO Journal*, vol. **10**, N°3, **1991**, pp: 697-704.
67. **Van Attikum, H., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J.** « Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration ». *The EMBO Journal*, vol. **20**, **2001**, pp: 6550-6558.
68. **Gaudin, V., Vrain, T. and Jouanin, L.** « Bacterial genes modifying hormonal balances in plants ». *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. **32**, N°1, **1994**, pp: 11-29.
69. **Dessaux, Y., Petit, A. and Tempé, J.** « Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism ». *The International Journal of Plant Biochemistry*, vol. **34**, N°1, **1993**, pp: 31-38.
70. **Guyon, P., Chilton, M.-D., Petit, A. and Tempé, J.** « Agropine in "nulltype" crown gall tumors: Evidence for generality of the opine concept ».

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, vol. **77**, **1980**, pp: 2693-2697.

71. **Tempé, J. and Schell, J.** « Les plasmides pathogènes d'*Agrobacterium*: Vecteurs naturels de gènes ». **1983**, pp: 135-162. In: Perspectives d'applications industrielles du génie génétique (Séminaire organisé par l'ADEPRINA), Ed. Heslot, H., (Tec & Doc) Lavoisier, France, 211p.

72. **Petit, A., Delhay, S., Tempé, J. and Morel, G.** « Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu'elles induisent ». *Physiologie Végétale*, N° **8**, **1970**, pp: 205-213.

73. **Tremblay, G., Gagliardo, R., Chilton, W.S. and Dion, P.** « Diversity among opine-utilizing bacteria: Identification of coryneform isolates ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **53**, N°**7**, **1987**, pp: 1519-1524.

74. **Beauchamp, C.J., Chilton, W.S., Dion, P. and Antoun, H.** « Fungal catabolism of crown gall opines ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **56**, N°**1**, **1990**, pp: 150-155.

75. **Ditt, R.F., Nester, E.W. and Comai, L.** « Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. **89**, N°**19**, **2001**, pp: 10954-10959.

76. **Veena, Jiang, H., Deorge, R.W. and Gelvin, S.B.** « Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression ». *The Plant Journal*, vol. **35**, N°**2**, **2003**, pp: 219-236.

77. **Paiva, N.L.** « An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication ». *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. **19**, N°2, **2000**, pp: 131-143.
78. **Varga, G.J. and Szegedi, E.** « Basal resistance: an alternative defence strategy against crown gall disease ». 30th World Congress of vine and wine, Budapest 10-16, Hongrie, **2007**. 5p.
79. **Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T. and Felix, G.** « Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation ». *Cell*, vol. **125**, **2006**, pp: 749–760.
80. **Vyskot, B. and Kuhrova, V.** « Soluble proteins in *Nicotiana plumbaginifolia* crown-gall tumors ». *Biologia Plantarum (Praha)*, vol. **29**, N°2, **1987**, pp: 143-149.
81. **Antoniw, J.F., Ooms, G., White, R.F., Wullems, G.J. and Vloten-Doting, L.V.** « Pathogenesis-related proteins in plants and tissues of *Nicotiana tabacum* transformed by *Agrobacterium tumefaciens* ». *Plant Molecular Biology*, vol. **2**, **1983**, pp: 317-320.
82. **Flor, H.H.** « Current status of the gene-for-gene concept ». *Annual Review of Phytopathology*, vol. **9**, **1971**, pp: 275-296.
83. **Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J.D.G.** « Resistance gene-dependent plant defense responses ». *The Plant Cell*, vol. **8**, **1996**, pp: 1773-1791.
84. **Nam, J., Matthysse, A.G., and Gelvin, S.B.** « Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration ». *The plant cell*, vol. **9**, **1997**, pp: 317-333.

85. **Zheng, D., Zhang, H., Carle, S., Hao, G., Holden, M.R. and Burr, T.J.** « A luxR homolog, aviR, in *Agrobacterium vitis* is associated with induction of necrosis on grape and a hypersensitive response on tobacco ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. **16**, N°7, **2003**, pp: 650-658.

86. **Hansen, G.** « Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells». *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. **13**, N°6, **2000**, pp: 649-657.

87. **Xu, X.Q. and Pan, S.Q.** « An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis ». *Molecular Microbiology*, vol. **35**, N°2, **2000**, pp: 407- 414.

88. **Bliss, F.A., Almehti, A.A., Dandekar, A.M., Schuerman, P.L. and Bellaloui, N.** « Crown gall résistance in accessions of 20 *Prunus* species ». *HortScience*, vol. **34**, N°2, **1999**, pp: 326-330.

89. **Reynders-Aloisi, S., Pelloli, G., Bettachini, A. and Poncet, C.** « Tolerance to crown gall differs among genotypes of rose rootstocks ». *HortScience*, vol. **33**, N°2, **1998**, pp: 296-297.

90. **Nadolska-Orczyk, A., Orczyk, W. and Przetakiewicz, A.** « *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals - from technique development to its application ». *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. **22**, N°1, **2000a**, pp: 77-88.

91. **Nadolska-Orczyk, A., Przetakiewicz, A. and Orczyk, W.** « *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of cereal crops », *Biotechnologia*, N°4, **2000b**, pp: 93-98.

92. **Usami, S., Okamoto, S., Takebe, I. and Machida, Y.** « Factor inducing *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression is present in monocotyledonous plants ». *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. **85**, **1988**, pp: 3748-3752.

93. **Picard, C.** « Caractérisation et détection dans le sol des *Agrobacterium* du pommier ». Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Claude Bernard-Lyon I, Lyon, France, **1993**, 123p.
94. **Faivre-Amiot, A.** « La galle du collet ou tumeur à *Agrobacterium* ». Phytoma-Défense des cultures, N°**341**, sept.-oct. **1982a**, pp: 33-36.
95. **Paulin, J.-P., Ridé, M. and Prunier, J.-P.** « Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans : controverses et polémiques transatlantiques ». Compte Rendus de l'Académie des Sciences, Sciences de la vie, Paris, vol. **324**, N°**10**, **2001**, pp: 905-914.
96. **Dhanvantari, B.N.** « Etiology of grape crown gall in Ontario ». Canadian Journal of Botany, vol. **61**, N°**10**, **1983**, pp: 2641-2646.
97. **López, M.M., Miró, M., Salcedo, C.I., Orive, R.J. and Temprano, F.J.** « Características de aislados españoles de *Agrobacterium radiobacter* pathovar *tumefaciens* ». Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agrícola, N°**24**, **1983**, pp: 239-249.
98. **Benjama, A., Alami, N. and Saadaoui, E.M.** « Étude sérologique des souches marocaines d'*Agrobacterium tumefaciens*, agent de la galle du collet des rosacées fruitières ». Agronomie, vol. **16**, **1996**, pp: 517-522.
99. **Poncet, C., Antonini, C., Bettachini, A., Hericher, D., Pionnat, S., Simonini, L. Dessaux, Y. and Nesme, X.** « Impact of the crown gall disease on vigour and yield of rose trees ». Second International Symposium on Roses, Ed. Morisot, A., Ricci. P., Acta Hort., vol. **424**, **1995**, pp: 221-225.
100. **Ryder, M.H. and Jones, D.A.** « Biological control of crown gall», **1990**, pp: 45-63. In: Biological control of soil-borne plant pathogens. Ed. Hornby, D., CAB. International, Wallingford, United Kingdom.

101. **Shim, J.-S., Farrand, S.K. and Kerr, A.** « Biological control of crown gall: Construction and testing of new biocontrol agents ». *Phytopathology*, vol. **77**, N°3, **1987**, pp: 463-466.
102. **Kerr, A. and Tate, M.E.** « Agrocins and the biological control of crown gall ». *Microbiological Sciences*, vol. **1**, **1984**, pp: 1-4.
103. **Donner, S.C., Jones, D.A., McClure, N.C., Rosewarne, G.M., Tate, M.E., Kerr, A., Fajardo, N.N. and Clare, B.G.** « Agrocin 434, a new plasmid encoded agrocine from the biocontrol *Agrobacterium* strains K84 and K1026, which inhibits biovar 2 agrobacteria ». *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. **42**, **1993**, pp: 185-194.
104. **Penyalver, R. and López, M.M.** « Cocolonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and nonpathogenic strains K84 and K1026, used for crown gall biocontrol ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **65**, N°5, **1999**, pp: 1936-1940.
105. **Penyalver, R., Vicedo, B. and López, M.M.** « Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall ». *European Journal of Plant Pathology*, vol. **106**, **2000**, pp: 801-810.
106. **Faivre-Amiot, A.** « La galle du collet ». *Phytoma-Défense des cultures*, N°341, nov. **1982b**, pp: 45 -48.
107. **Bouzar, H. and Moore, L.W.** « Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass Prairie ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **53**, N°4, **1987**, pp: 717-721.
108. **Moore, L.W. and Cooksey, D.A.** « Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: Plant interactions ». **1981**, pp: 15-46. In: *Biology of the Rhizobiaceae*. Ed. Giles, K.L. and Atherly, A.C., Academic Press, New York.

109. **Krimi, Z., Petit, A., Mougél, C., Dessaux, Y. and Nesme, X.** « Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **68**, N°7, **2002**, pp: 3358-3365.

110. **Nesme, X.** « Tumeur du collet: Mise au point d'une méthode de diagnostic ». *L'arboriculture fruitière*, N°483, **1995**, pp: 17-20.

111. **Giraud, M., Labergère, M., Fauré, J. and Nesme, X.** « Le crown gall du pommier ». *Info Ctifl*, N°5, **1993**, pp: 33-36.

112. **New, P.B. and Kerr, A.** « Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments ». *Journal of Applied Bacteriology*, vol. **35**, N°2, **1972**, pp: 279-287.

113. **Moore, L.W. and Allen, J.** « Controlled heating of root-pruned dormant *Prunus* spp. seedlings before transplanting to prevent crown gall ». *Plant Disease*, vol. **70**, N°6, **1986**, pp: 532-536.

114. **Raio, A., Zoina, A. and Moore, L.W.** « The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria ». *Plant Pathology*, vol. **46**, N°3, **1997**, pp: 320-328.

115. **Escobar, M.A., Civerolo, E.L., Summerfelt, K.R. and Dandekar, A.M.** « RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. **98**, N°23, **2001**, pp: 13437-13442.

116. **Dong, L.-C., Sun, C.-W., Thies, K.L., Luthe, D.S. and Graves, C.H., Jr.** « Use of the polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium* ». *Phytopathology*, vol. **82**, N°4, **1992**, pp: 434-439.

117. **Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.P., Holsters,**

- M., Seurinck, J., Silva, B., Van Vliet, F. and Villarroel, R.** « Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host ». Proceedings of Royal Society of London, series B, vol. **204**, N°**1155**, **1979**, pp: 251-266.
118. **Pierronnet, A. and Salesses, G.** « Behaviour of *Prunus* cultivars and hybrids towards *Agrobacterium tumefaciens* estimated from hardwood cuttings ». Agronomie, vol. **16**, N°**4**, **1996**, pp: 247-256.
119. **Thomidis, T., Exadaktylou, E. and Tsipouridis, C.** « Susceptibility of five *Prunus* rootstocks to *Agrobacterium tumefaciens* ». New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, vol. **33**, **2005**, pp: 343-345.
120. **McKenna, J.R. and Epstein, L.** « Susceptibility of *Juglans* species and interspecific hybrids to *Agrobacterium tumefaciens* », HortScience, vol. **38**, N°**3**, **2003**, pp: 435-439.
121. **Süle, S., Mozsar, J. and Burr, T.J.** « Crown gall resistance of *Vitis* spp. and grapevine rootstocks ». Phytopathology, vol. **84**, N°**6**, **1994**, pp: 607-611.
122. **Beneddra, T., Picard, C., Petit, A. and Nesme, X.** « Correlation between susceptibility to crown gall and sensitivity to cytokinin in aspen cultivars ». Phytopathology, vol. **86**, N°**2**, **1996**, pp: 225-231.
123. **Boelema, B.H.** « Resistance of rose rootstocks to crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*) ». European Journal of Plant Pathology, vol. **75**, N°**1-2**, **1969**, pp: 147-150.
124. **Ream, W.** « *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange ». Annual Review of Phytopathology, vol. **27**, **1989**, pp: 583-618.
125. **Nam, J., Mysore, K.S., Zheng, C., Knue, M.K., Matthysse, A.G. and Gelvin, S.B.** « Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are

- resistant to transformation by *Agrobacterium* ». Molecular and General Genetics, vol. **261**, N°**3**, **1999**, pp: 429-438.
126. **Guignard, J.-L.** « Botanique: Systématique moléculaire ». 12^{ème} Ed., Masson S.A., Paris, Cedex, **2001**, 290p.
 127. **Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. and Stevens, P.** « Botanique systématique: Une perspective phylogénétique ». Ed. De Boeck Université, **2002**, 467p.
 128. **Bruneton, J.** « Les huiles essentielles ». **1999**, pp: 483-578. In: Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} Ed., Tec&Doc/ médicales Internationales éditions. Cedex, Paris, 1120p.
 129. **Renier, H.J.** « Les eucalyptus en Australie et en Tasmanie ». Ed. Direction de l'agriculture, des forêts et de l'élevage. Bruxelles, Belgique, **1953**, 126p.
 130. **Hillis, W.E. and Yazaki, Y.** « Kinins of *Eucalyptus* species and their acid degradation products ». Phytochemistry, vol. **13**, N°**2**, **1974**, pp: 495-498.
 131. **Yazaki, Y. and Hillis, W.E.** « Polyphenols of *Eucalyptus globulus*, *E. regnans* and *E. deglupta* ». Phytochemistry, vol. **15**, N°**7**, **1976**, pp: 1180-1182.
 132. **Nichols, D. and Yazaki, Y.** « Phytotoxicity of *Eucalyptus camaldulensis* and *E. regnans* sawdusts ». Australian Forest Research, vol. **9**, **1979**, pp: 35-39.
 133. **Fechtal, M. and Riedl, B.** « Analyse des extraits tannants des écorces des eucalyptus après hydrolyse acide par la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée avec la Spectrophotométrie de Masse (GC-MS) ». Holzforschung, vol. **45**, N°**4**, **1991**, pp: 269-273.

134. **Barry, K.M., Davies, N.W. and Mohammed, C.L.** « Identification of hydrolysable tannins in the reaction zone of *Eucalyptus nitens* wood by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry ». *Phytochemical Analysis*, vol. **12**, **2001**, pp: 120-127.

135. **Jacobs, M.R.** « Les eucalyptus dans les reboisements ». 2^{ème} Ed., Collection FAO: Forêts N° **11**, FAO, Rome, Italie, **1982**, 753p.

136. **Meziane, H.** « L'eucalyptus en Algérie: Un arbre controversé ». *La Forêt algérienne*, N°**1**, **1996**, pp: 5-10.

137. **Chippendale, G.M.** « Eucalypts of the Western Australian goldfields (and the adjacent wheatbelt) ». Ed. Australian Government Publishing Service for the Minister of Primary Industries, Canberra, Australia, **1973**, 218p.

138. **Khemici, M.** « Contribution à l'étude éco-éthologique de *Phoracantha semipunctata* F. (Coleoptera., Cerambycidae) ravageur xylophage de l'eucalyptus en forêt de Baïnem ». Thèse de Magister en biologie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie, **1993**, 85p.

139. **Fraval, A. and Haddan, M.** « *Phoracantha* ». Actes Éditions. (Rabat), Documents Scientifiques et Techniques (collection), Maroc, **1989**, 38p.

140. **Drinkwater, T.W.** « The present pest status of eucalyptus borers *Phoracantha* sp. in South Africa ». The International Congress of the Entomological Society of South Africa, **1975**, pp: 119-129.

141. **Gezahgne, A., Roux, J., Slippers, B. and Wingfield, M.J.** « Identification of the causal agent of *Botryosphaeria* stem canker in Ethiopian *Eucalyptus* plantations ». *South African Journal of Botany*, vol. **70**, N°**2**, **2004**, pp: 241-248.

142. **Palvic, D.** « *Botryosphaeria* species on native South African *Syzygium cordatum* and their potential threat to *Eucalyptus* ». Thesis of Magister Scientiae, University of Pretoria, Pretoria, South Africa, **2004**, 130p.

143. **Mohali, S.R., Slippers, B. and Wingfield, M.J.** « Identification of *Botryosphaeriaceae* from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela ». Fungal Diversity, vol. **25**, **2004**, pp: 103-125.

144. **Pérez, C.A., Altier, N., Simeto, S., Wingfield, M.J., Slippers, B. and Blanchette, R.A.** « Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus* and native Myrtaceae in Uruguay ». Agrociencia, vol. **XII**, N°2, **2008**, pp: 19-30.

145. **Smith, H., Wingfield, M.J., Crous, P.W. and Cautinho, T.A.** « *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. And *Eucalyptus* spp. in South Africa ». South African Journal of Botany, vol. **62**, N°2, **1996**, pp: 86-88.

146. **Webb, R.S.** « Seed capsule abortion and twig dieback of *Eucalyptus camaldulensis* in South Florida induced by *Botryosphaeria ribis* ». Plant Disease, vol. **67**, N°1, **1983**, pp: 108-109.

147. **Shearer, B.L., Tippet, J.T. and Bartle, J.R.** « *Botryosphaeria ribis* infection associated with death of *Eucalyptus radiata* in species selection trials ». Plant Disease, vol. **71**, N°2, **1987**, pp: 140-145.

148. **Salgues, R.** « Les tumeurs en Pathologie comparée ». Rev. Gén. Sci. Pur. Appl., vol. **45**, N°13, **1935**, pp: 395-405.

149. **Batista, A.C.** « *Cylindrosporium scoparium* Morgan, var. *Brasiliensis* Batista ex Ciferri, um novo fungo do Eucalipto ». Boletim da Secretaria de Agricultura de Pernambuco, t. XVIII, fasc. **3-4**, **1951**, pp: 188-191.

150. **Old, K.M., Wingfield, M.J. and Yuan, Z.Q.** « A manual of diseases of *Eucalyptus* in South-East Asia ». Ed. Center for International Forestry Research, Bogor, Indonesia, **2003**, 98p.

151. **Rehn, V.N.C., Menezes, M., Rehn, K.G. and Coêlho, R.S.B.** « Isolation, morphological identification and pathogenicity of *Cylindrocladium scoparium* and *C. clavatum* isolates obtained from plants rhizosphere cultivated in Pernambuco State ». Brazilian Journal of Microbiology, vol. **35**, **2004**, pp: 292-294.

152. **Barnard, E.L.** « Occurrence, impact, and fungicidal control of girdling stem cankers caused by *Cylindrocladium scoparium* on eucalyptus seedlings in a South Florida nursery ». Plant Disease, vol. **68**, N°**6**, **1984**, pp: 471-473.

153. **Ferreira, F.A. and Alfenas, A.C.** « Pink disease of *Eucalyptus* caused by *Corticium salmonicolor* Berk and Br. in Brazil ». Fitopatologia Brasileira, vol. **2**, **1977**, pp: 109-115.

154. **Gezahgne, A., Roux, J. and Wingfield, M.J.** « First report of pink disease on *Eucalyptus camaldulensis* in Ethiopia ». Plant Pathology, vol. **52**, **2002**, pp: 402.

155. **Roux, J., Meke, G., Kanyi, B., Mwangi, L., Mbaga, A., Hunter, G.C., Nakabonge, G., Heath, R.N. and Wingfield, M.J.** « Diseases of plantation forestry trees in eastern and southern Africa ». South African Journal of Science, vol. **101**, N° **9-10**, **2005**, pp: 409-413.

156. **Gezahgne, A., Roux, J. and Wingfield, M.J.** « Diseases of exotic *Eucalyptus* and *Pinus* species in Ethiopian plantations ». South African Journal of Science, vol. **99**, **2003**, pp: 29-33.

157. **Subramaniam, S.V. and Ramaswamy, V.** « Histopathological observations on Pink disease of eucalyptus ». *Current Science*, vol. **56**, N°20, **1987**, pp: 1042-1043.

158. **Seth, S.K., Bakshi, B.K., Reddy, M.A.R. and Singh, S.** « Pink disease of *Eucalyptus* in India ». *European Journal of Forest Pathology*, vol. **8**, N°4, **1978**, pp: 200-216.

159. **Abd-Allah, S. and Salih, O.** « First report for *Alternaria* sp. infection of *Eucalyptus globulus* in Al-Taif province at Kingdom of Saudi Arabia ». *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. **15**, N°2, **2008**, pp: 231-236.

160. **Khattab, H. and Khattab, I.** « Responses of Eucalypt trees to the insect feeding (gall-forming psyllid) ». *International Journal of Agriculture & Biology*, vol. **7**, N°6, **2005**, pp: 979-984.

161. **Wallace, G.B.** « Report on a survey of plant diseases in the Iringa province in June, 1934 ». Tanganyika Department of Agriculture. Mycological Leaflets, **1934**, pp: 15-16.

162. **Baudin, P.** « Mises au point phytopathologiques : Les maladies des plantes à parfum tropicales ». *Revue de Mycologie (Supplément colonial)*, Tome XX, N°2, Laboratoire de cryptogamie du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, **1955**, 112p.

163. **Wingfield, M.J., Crous, P.W. and Peredo, H.L.** « A preliminary, annotated list of foliar pathogens of *Eucalyptus* spp. in Chile ». *South African Forestry Journal*, N° **173**, **1995**, pp: 53-57.

164. **de Blas, B., Iturrutxa, E. and Diez, J.J.** « New species of *Mycosphaerella* causing leaf spot on *Eucalyptus globulus* in Spain ». *Australasian Plant Disease Notes*, vol. **4**, **2009**, pp: 59.

165. **Girola, D.C.** « *Ganoderma sessile* Murill ». Bol. Minis. Agric. Nación (Buenos Aires), **1922**, pp: 236-239.
166. **Linde, C., Wingfield, M.J. and Kemp, G.H.J.** « Root and root collar disease of *Eucalyptus grandis* caused by *Pythium splendens* ». Plant Disease, vol. **78**, N°**10**, **1994**, pp: 1006-1009.
167. **Ciesla, W.M., Diekmann, M. and Putter, C.A.J.** « *Eucalyptus* spp. ». Ed. FAO/ IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm, Rome, N°**17**, **1996**, 66p.
168. **Sastry, K.S.M., Thakur, R.N., Gupta, J.H. and Pandotra, V.R.** « Three virus diseases of *Eucalyptus citrodora* ». Indian Phytopathology, vol. **24**, **1971**, pp: 123-126.
169. **Marcone, C., Ragozzino, A. and Seemüller, E.** « Detection of an Elm Yellow-Related phytoplasma in eucalyptus trees affected by little-leaf disease in Italy ». Plant Disease, vol. **80**, N°**6**, **1996**, pp: 669-673.
170. **Pegg, G., Brown, B. and Ivory, M.** « Eucalypt disease in hardwood plantations in Queensland ». Hardwoods Queensland Report, N°**16**. Forestry Research, Agency for Food and Fibre Sciences, Department of primary industries, **2003**, pp: 1-15.
171. **Moore, L.W. and Warren, G.** « *Agrobacterium radiobacter* strain K84 and biological control of crown gall ». Annual Review of Phytopathology, vol. **17**, **1979**, pp: 163-179.
172. **Krimi, Z.** « Persistance du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* dans le sol et sa stabilité in situ et in vitro ». Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences. Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie, **2003**.

173. **Baouch, H.** « Sensibilité de quelques espèces d'eucalyptus vis-à-vis du crown gall et variabilité du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ». Mémoire d'Ingénieur Agronome, Université Saad Dahlab de Blida, Algérie, **2007**, 44p.

174. **Haïcour, R.** « Biotechnologies végétales: Techniques de laboratoire », Collections des Universités Francophones, Ed. Tec & Doc, Paris, France, **2002**, 305p.

175. **Dickey, R.S.** « Relation of some edaphic factors to *Agrobacterium tumefaciens* ». Phytopathology, vol. **51**, **1961**, pp: 607-614.

176. **Moore, L.W., Kado, C.I. and Bouzar, H.** « *Agrobacterium* ». **1988**, pp: 16-36. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd Ed., Ed. Schaad N.W., The American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota.

177. **Dagnelie, P.** « Principes d'expérimentation ». 1^{ère} Ed., Presses Agronomiques de Gembloux, Belgique, **1981**, 182p.

178. **Dagnelie, P.** « Théorie et méthodes statistiques: applications agronomiques ». 2^{ème} Ed., Presses Agronomiques de Gembloux, Belgique, **1975**, 463p.

179. **Bradford, M.M.** « A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding ». Analytical Biochemistry, vol. **72**, **1976**, pp: 248-254.

180. **Philippeau, G.** « Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales ? ». Ed. Institut Technique des Céréales et des Fourrages (ITCF), Paris, France, **1986**, 63p.

181. **Ohta, K.** « Studies on the crown gall disease of flower crops: II. Pathogenicity and the inoculum potential of the causal bacterium ». *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, vol. **50**, N°2, **1984**, pp: 205-210.

182. **Byrne, M.C., McDonnell, R.E., Wright, M.S., and Carnes, M.G.** « Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction ». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. **8**, **1987**, pp: 3-15.

183. **Robbs, S.L., Hawes, M.C., Lin, H.-J., Pueppke, S.G. and Smith, L.Y.** «Inheritance of resistance to crown gall in *Pisum sativum* ». *Plant Physiology*, vol. **95**, **1991**, pp: 52-57.

184. **Bergmann, B.A. and Stomp, A.-M.** « Effect of host plant genotype and growth rate on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gall formation in *Pinus radiata*». *Phytopathology*, vol. **82**, N°12, **1992**, pp: 1457-1462.

185. **Krimi, Z., Raio, A. and Dessaux, Y.** « In vitro genetic instability of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from eucalyptus tumors ». *Biotechnologies Végétales*, **2007**, pp: 5-10.

186. **Fournier, p., de Ruffray, P. and Otten, L.** « Natural instability of *Agrobacterium vitis* Ti plasmid due to unusual duplication of a 2.3-kb DNA fragment ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. **7**, N°2, **1994**, pp: 164-172.

187. **El Yousfi, M.** « Possibilités de lutte préventive contre *Phoracantha semipunctata* (F.) par la sélection d'espèces d'*Eucalyptus* ». *Boletim de Sanidad Vegetal, Plagas*, vol. **18**, N°4, **1992**, pp: 735-743.

188. **Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., komari, T. and Kumashiro, T.** « High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* ». *Nature Biotechnology*, vol. **14**, **1996**, pp: 745-750.

189. **Zhang, J., Boone, L., Kocz, R., Zhang, C., Binns, A.N. and Lynn, D.G.**
« At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation ». *Chemistry and Biology*, vol. **7**, N°8, **2000**, pp: 611-621.

190. **Mullins, K.V., Llewellyn, D.J., Hartney, V.J., Strauss, S. and Dennis, E.S.**
« Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis* ». *Plant cell Reports*, vol. **16**, N°11, **1997**, pp: 787-791.

191. **Machado, L. de O.R., de Andrade, G.M., Barreto Cid, L.P., Penchel, R.M. and Brasileiro, A.C.M.** « *Agrobacterium* strains specificity and shooty tumor formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*) ». *Plant Cell Reports*, vol. **16**, N° 5, **1997**, pp: 299-303.

192. **Hawes, M.C., Robbs, S.L. and Pueppke, S.G.** « Use of a root tumorigenesis assay to detect genotypic variation in susceptibility of thirty-four cultivars of *Pisum sativum* to crown gall ». *Plant Physiology*, vol. **90**, **1989**, pp: 180-184.

193. **Khawar, K.M. and Özcan, S.** « *In vitro* induction of crown gall by *Agrobacterium tumefaciens* super virulent strain A281 (pTiBo 542) in lentil (*Lens culinaris* Medik.) ». *Turkish Journal of Botany*, vol. **26**, N°3, **2002**, pp: 165-170.

194. **Islam, R., Malik, T., Husnain, T. and Riazuddin, S.** « Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-chickpea interaction ». *Plant cell Reports*, vol. **13**, N°10, **1994**, pp: 561-563.

195. **Otten, L., Canaday, J., Gérard, J.-C., Fournier, P., Crouzet, P. and Paulus, F.** « Evolution of *Agrobacteria* and their Ti plasmids – a review ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. **5**, N°4, **1992**, pp: 279–287.

196. **Wagner, V.T. and Matthysse, A.G.** « Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells ». *Journal of Bacteriology*, vol. **174**, N°**18**, **1992**, pp: 5999-6003.

197. **Matthysse, A.G., and Gurlitz, R.H.G.** « Plant cell range for attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to tissue culture cells », *Physiological and Plant Pathology*, vol. **21**, N° **3**, **1982**, pp: 381-387.

198. **Swart, S., Lugtenberg, B.J., Smit, G. and Kijne, J.W.** « Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an *Agrobacterium tumefaciens* chvB mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium ». *Journal of Bacteriology*, vol. **176**, N°**12**, **1994**, pp: 3816-3819.

199. **Zhu, Y., Nam, J., Carpita, N.C., Matthysse, A.G. and Gelvin, S.B.C.** « *Agrobacterium*-mediated root transformation is inhibited by mutation of an *Arabidopsis* cellulose synthase-like gene ». *Plant Physiology*, vol. **133**, **2003**, pp: 1000-1010.

200. **Robertson, D., Mitchell, G.P., Gilroy, J.S., Gerrish, C., Bolwell, G.P. and Slabas, A.R.** « Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants ». *The Journal of Biological Chemistry*, vol. **272**, N°**25**, **1997**, pp: 15841-15848.

201. **Showalter, A.M.** « Structure and function of plant cell wall proteins ». *Plant Cell*, vol. **5**, N°**1**, **1993**, pp: 9-23.

202. **Ditt, R.F., Nester, E.W. and Comai, L.** « The plant cell defense and *Agrobacterium tumefaciens* ». *FEMS Microbiology Letters*, vol. **247**, N°**2**, **2005**, pp: 207-213.

203. **Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I. and Hirt, H.** « Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: Abusing MAPK defense signaling ». *Science*, vol. **318**, **2007**, pp: 453-456.

204. **Kuta, D.D. and Tripathi, L.** « *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer ». African Journal of Biotechnology, vol. **4**, N°**8**, **2005**, pp: 752-757.