

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTHECHNOLOGIE VEGETALE
MASTER II

**Caractérisation biochimique, physiologique et détermination du
pouvoir pathogène d'une souche de *Curtobacterium
flaccumfaciens* endophyte d'*Euphorbia helioscopia* L.
(*Euphorbiaceae*)**

Spécialité: Biologie des interactions plantes - microorganismes

ZIOUCHE Chahrazad

Devant le jury composé de :

| | | | |
|---------------|------------|----------|--------------|
| BERRAF A. | M.C.B. | U.S.D.B1 | Présidente |
| KRIMI Z. | Professeur | U.S.D.B1 | Promotrice |
| AIT SAADI N. | M.A.A | U.S.D.B1 | Examinatrice |
| ALIM-MAROK D. | Doctorante | U.S.D.B1 | Examinatrice |

ANNEE UNIVERSITAIRE 2013/2014

Caractérisation biochimique et physiologique et détermination du pouvoir pathogène d'une souche de *Curtobacterium flaccumfaciens* endophyte d'*Euphorbia helioscopia* L. (*Euphorbiaceae*)

Résumé

La caractérisation biochimique et physiologique de la bactérie endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* isolée d'une plante spontanée *Euphorbia helioscopia* et la mise en évidence de sa capacité à produire des métabolites secondaires impliqués dans la promotion de la croissance végétale ainsi que son pouvoir pathogène sur la plante hôte ont été recherchées à travers cette étude.

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques ont révélé que la souche endophyte possède une activité catalase et estérase négatives. Cette souche tolère des concentrations en NaCl très élevées et des pH allant de 5 à 9. Les résultats du test d'évaluation de l'utilisation des hydrates de carbone comme seule source de carbone montrent que cette souche utilise principalement les sucres simples et quelques sucres d'alcool et des diholosides.

Les tests menés *in vitro* pour déterminer une éventuelle efficacité de la bactérie endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* dans la promotion de la croissance végétale et la lutte biologique par la production de plusieurs métabolites secondaires, ont révélé que cette bactérie était incapable de solubiliser le phosphore, de produire l'AIA, l'HCN et les antibiotiques de nature phénazinique. A cet effet, la souche *Curtobacterium flaccumfaciens* que nous avons testé, ne présente pas de capacités de promotion de la croissance pour la plante hôte dont elle est issue, à savoir, *Euphorbia helioscopia*. La souche endophytique possède un arsenal enzymatique important ; elle a montré des résultats très marquants dans la sécrétion d'enzymes de type, protéase, caséinase et amylase.

Enfin, le test d'hypersensibilité sur le tabac et l'étude du pouvoir pathogène de la souche *Curtobacterium flaccumfaciens* sur trois variétés de haricot (Coco rose, Contender, El djadida), ont permis de confirmer sa pathogénicité à l'égard du haricot (*Phaseolus vulgaris*) et de l'identifier comme un pathovar de *Curtobacterium flaccumfaciens* en l'occurrence: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Mots clés: endophyte, *Curtobacterium flaccumfaciens*, caractérisation biochimique et physiologique, pouvoir pathogène, *Euphorbia helioscopia*.

Biochemical and physiological characterization and Pathogenicity determination of a strain of *Curtobacterium flaccumfaciens* endophyte of *Euphorbia helioscopia* L. (*Euphorbiaceae*)

Abstract

Biochemical and physiological characterization of endophytic bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* isolated from a spontaneous plant *Euphorbia helioscopia* and evidence of its capacity to produce secondary metabolites implied in plant growth promotion and its pathogenicity on plant host were required through this study.

Results of physiological and biochemical tests revealed that the endophytic strain has negative catalase and esterase activities. This strain tolerates very high concentrations of NaCl and growth at pH from 5 to 9. Results of the evaluation test of use of carbohydrates as sole carbon source show that this strain primarily uses simple sugars and some sugar alcohols and disaccharides.

Tests carried out *in vitro* to determine a possible efficiency of endophytic bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* in plant growth promotion and biological control by producing several secondary metabolites, revealed that this bacteria was unable to solubilize phosphorus, to produce AIA, HCN and antibiotics of phenazinic nature. For this purpose, the tested strain of *Curtobacterium flaccumfaciens*, shows no growth promotion capacities to the host plant from which it is isolated, *Euphorbia helioscopia*. Endophytic strain has an important enzymatic arsenal; it showed very outstanding results in secretion of type enzymes, protease, caseinase and amylase.

Finally, hypersensitivity test on tobacco and study of pathogenicity of the strain *Curtobacterium flaccumfaciens* on three bean varieties (Coco rose, Contender, El djadida), has confirmed its pathogenicity with regard to bean (*Phaseolus vulgaris*) and identified it as a pathovars of *Curtobacterium flaccumfaciens*: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Key words: Endophytic bacteria, *Curtobacterium flaccumfaciens*, biochemical and physiological characterization, pathogenicity, *Euphorbia helioscopia*.

دراسة الخصائص البيو كيميائية و الفيزيولوجية و القدرة الممرضة لبكتيريا داخلية
Euphorbia helioscopia L. معزولة من *Curtobacterium flaccumfaciens*
(*Euphorbiaceae*).

ملخص

الخصائص البيو كيميائية و الفيزيولوجية لبكتيريا داخلية *Curtobacterium flaccumfaciens* معزولة من نبتة برية *Euphorbia helioscopia* وقدرتها على إنتاج المركبات الثانوية المتدخلية في تحفيز نمو النبات و كذلك قدرتها الممرضة على نبات الفاصولياء تم البحث عنها من خلال هذه الدراسة.

كشفت نتائج الاختبارات الفيزيولوجية و البيو كيميائية أن البكتيريا الداخلية لها نشاط الكاتلاز و استريز سلبي. هذه البكتيريا تقاوم تركيزات عالية جدا من كلوريد الصوديوم ودرجة الحموضة من 5 إلى 9. نتائج اختبار استخدام الكربوهيدرات كمصدر وحيد للكربون أظهرت أن هذه البكتيريا تستخدم أساسا السكريات البسيطة وبعض السكريات الكحولية و الثنائية.

التجارب التي أجريت في المختبر لتحديد فعالية البكتيريا الداخلية فيم في تعزيز نمو النبات و المكافحة البيولوجية من خلال إنتاج المواد الأيضية الثانوية أظهرت أن هذه البكتيريا الداخلية غير قادرة على إذابة الفوسفور، إنتاج AIA، HCN و المضادات الحيوية. لهذه فإن البكتيريا الداخلية التي اختبرناها، لا تظهر أي قدرات تعزيز النمو النبات المضيف الذي عزلت منه. البكتيريا الداخلية تتمتع بترسانة انزيمية هامة حيث أظهرت نتائج باهرة جدا في إفراز الإنزيمات النوعية البروتياز، الأميلاز و الكزينااز.

وأخيرا، فإن اختبار فرط حساسية التبغ ودراسة القدرة الممرضة على ثلاثة أصناف من الفاصولياء (Coco rose ، Contender ، El djadida) أكد القدرة الممرضة في ما يتعلق بالفاصولياء (*Phaseolus vulgaris*) والتي تم تحديدها على أنها نمط ممرض من *Curtobacterium flaccumfaciens* و هو *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الداخلية، *Curtobacterium flaccumfaciens* ، الخصائص البيو كيميائية و الفيزيولوجية، القدرة الممرضة، *Euphorbia helioscopia*.

REMERCIEMENTS

Je dois, en premier lieu, remercier humblement *ALLAH* le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la volonté pour bien mener ce travail.

Mes très vifs remerciements s'adressent à ma promotrice **Professeur KRIMI Z.** qui m'a énormément aidé tout au long de mon travail, ça ne sera pas suffisant pour lui exprimer toute ma grande reconnaissance pour la confiance, la disponibilité, la générosité et le grand soutien qu'elle m'a accordée pour faire avancer ce travail.

Je tiens à remercier Mme BERRAF A. de m'avoir honoré en acceptant d'être présidente de jury.

Je tiens à remercier les membres de jury de mémoire **AIT SAADI N.** et **ALIM-MAROCC D.** de m'avoir accordé leurs temps pour examiner et enrichir ce travail. Pour cela, je leur exprime ma profonde reconnaissance et mes respects.

Un merci très particulier à **Mr. DJAZOULI Z.** d'avoir m'accueilli au sein de son laboratoire de phytopharmacie.

Merci à toute l'équipe de laboratoire de phytobactériologie et plus précisément à **M^{lle} TAFFIFET L.** et à **M^{me} MOHAMED MAHMOUD F.** pour leur aide, leur disponibilité et leur soutien.

Mes profonds remerciements vont à mes chères amies qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire FATIMA, RAZIKA et DELLEL. C'est grâce à vous que j'ai pu finaliser ce travail.

Mes remerciements s'adressent en particulier pour ma grande mère et mes parents.

Enfin que toutes les personnes, qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Dédicaces

A celle qui m'a transmis l'amour, son existence dans ma vie me donne le courage et son regard est le synonyme d'espoir, à toi grande mère toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.

A mes chers parents, jamais je ne saurais m'exprimer quant aux sacrifices et aux dévouements. Les mots expressifs soient-ils restent faibles pour énoncer ma gratitude hautement profonde.

*A mes frères Abderrahmane, Ali et Mohamed et à ma précieuse sœur Meriem
A mon beau-frère Nabil*

A mes oncles sans exception et mon neveu Adem et mes nièce Sirine et Aridj

A mon amie éternelle et unique Fatima

Je dédie ce travail...

CHAHRAZAD

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Les hydrates de carbone utilisés | 26 |
| Tableau 2: Utilisation des différents hydrates de carbone comme seule source de carbone par la bactérie endophyte <i>C. flaccumfaciens</i> | 37 |
| Tableau 3: Principaux symptômes observés après inoculation par <i>C. flaccumfaciens</i> selon les variétés du haricot et la méthode d'inoculation..... | 47 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: Types de micro-organismes endophytes et les voies de pénétration racinaire possibles | 6 |
| Figure 2: Illustration des principaux mécanismes de PGP et BCA impliqués lors de l'interaction bénéfique endophyte-plante | 12 |
| Figure 3: Principaux symptômes du flétrissement bactérien de haricot. | 20 |
| Figure 4: Croissance de la souche bactérienne testée sur milieu NBY | 24 |
| Figure 5: Infiltration sous épidermique d'une feuille de tabac (<i>Nicotiana tabacum</i> var. White Burley) par la suspension bactérienne | 30 |
| Figure 6: Résultats des tests d'activité catalase et de l'activité estérase chez la bactérie endophyte <i>C. flaccumfaciens</i> | 33 |
| Figure 7: Tolérance de la souche bactérienne à différents pH | 34 |
| Figure 8: Croissance de l'isolat bactérien à différentes concentrations de sel | 35 |
| Figure 9: Poids sec de l'isolat bactérien à différentes concentrations de sel | 35 |
| Figure 10: Effet de différentes concentrations de NaCl sur la croissance de la souche bactérienne <i>C. flaccumfaciens</i> | 36 |
| Figure 11: Exemple d'utilisation des hydrates de carbone par la bactérie endophyte <i>C. flaccumfaciens</i> | 37 |
| Figure 12: Résultats de l'estimation de la production de l'acide indole acétique (AIA) | 38 |
| Figure 13: Test de solubilisation du phosphore par la bactérie endophyte sur milieu PVK. | 39 |
| Figure 14: Résultat du test de production d'HCN par la bactérie endophyte | 40 |
| Figure 15: Résultat du test de production des phénazines sur milieu NBY | 40 |
| Figure 16: Production d' NH_3 par la bactérie endophyte..... | 41 |
| Figure 17: Production des enzymes hydrolytiques par la bactérie endophyte <i>C. flaccumfaciens</i> | 42 |
| Figure 18: Réaction d'hyperdensité sur feuille du tabac inoculée par la bactérie endophyte <i>C. flaccumfaciens</i> | 43 |
| Figure 19: Symptômes sur les plantules de haricot var. Coco rose après inoculation de <i>C. flaccumfaciens</i> | 45 |
| Figure 20 : Symptômes sur les plantules de haricot var. El djadida après inoculation de <i>C. flaccumfaciens</i> | 46 |
| Figure 21: Symptômes sur les plantules de haricot var. Cotender après inoculation de <i>C. flaccumfaciens</i> | 46 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------------|--|
| AIA | : Acide Indole-3-Acétique |
| BCA | : Biocontrol Agent |
| <i>Cff</i> | : <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> |
| HCN | : Acide cyanhydrique |
| NH ₃ | : Ammonium |
| P | : Phosphore |
| PGPR | : Plant Growth Promoting Rhizobacteria |

Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction | 1 |
| Chapitre 1: Synthèse bibliographique sur les bactéries endophytes et <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> comme cas d'étude | 3 |
| 1. Les plantes, un réservoir pour les bactéries endophytes | 3 |
| 2. Origine, localisation et caractéristiques des bactéries endophytes | 4 |
| 3. Niche écologique et colonisation de la plante par les bactéries endophytes | 5 |
| 4. Mise au point des bactéries endophytes (méthodes de détection et d'énumération des bactéries endophytes) | 10 |
| 5. Interaction plante–endophyte | 11 |
| 5.1. Interactions bénéfiques | 11 |
| 5.2. Interactions pathogènes | 15 |
| 6. <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , une bactérie endophyte bénéfique ou phytopathogène | 16 |
| 6.1. Description du genre | 16 |
| 6.2. Les <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> bénéfiques..... | 16 |
| 6.3. Les <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> phytopathogènes | 17 |
| Chapitre 2: Matériel et Méthodes | 23 |
| 1. Matériel biologique | 23 |
| 2. Purification de la souche endophyte | 23 |
| 3. Détermination des caractéristiques biochimiques et physiologiques de la bactérie endophyte | 4 |
| 4. Production des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes (PGP) par la souche endophyte | 27 |
| 5. Tests de pathogénicité de la bactérie endophyte | 29 |
| Chapitre 3: Résultats et Interprétations | 41 |
| Chapitre 4: Discussion | 48 |
| Conclusion..... | 55 |
| Références bibliographiques | |
| Annexes | |

Introduction

Introduction

Les bactéries sont ubiquitaires et présentes dans tous les biotopes rencontrés sur terre où elles représentent une grande partie de la biomasse (Fredrickson et *al.*, 2004). Elles peuvent être retrouvées dans le sol, l'air, les eaux douces, salées ou saumâtres, elles sont aussi présentes chez l'homme, les animaux ou les plantes.

Les bactéries en interaction avec la plante jouent un rôle significatif; elles influencent directement ou indirectement la croissance des plantes et leur santé. Certaines sont nuisibles alors que d'autres sont bénéfiques (Elavazhagan et *al.*, 2009).

Les bactéries phytopathogènes causent des maladies bactériennes très graves et sont à l'origine de pertes agronomiques et économiques sévères. Parmi les bactérioses les plus connues et les plus importantes, les bactéries transmises par semence. La plupart des bactéries à l'origine de ces maladies font partie des organismes de quarantaine et dont la lutte ne se pratique que par des moyens cultureux prophylactiques. La lutte chimique étant peu ou pas efficace, ajouté à cela, certaines mesures d'utilisation des antibiotiques en agriculture sont interdites par des lois internationales. Certaines bactéries peuvent être transmises par semences et par conséquent être disséminées d'un continent à un autre par le biais des échanges commerciaux, c'est le cas de *Xanthomonas axonodopidis* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Dickeya dadantii*, *Pectobacterium carotovorum* et de *Ralstonia solanacearum*, engendrant des dégâts sur des cultures économiquement importantes.

Aujourd'hui, une attention particulière est accordée au potentiel des microorganismes phytopathogènes, incluant les bactéries, dont certaines sont considérées aux états unis comme des armes biologiques potentiels ou 'biological weapons/bioterror weapons'. En effet, l'introduction clandestine de certaines bactéries phytopathogènes peut causer des pertes de récoltes très importantes représentant ainsi une menace pour l'économie et la sécurité alimentaire d'un pays (Young et *al.*, 2008).

En contraste, d'autres bactéries ont été prouvées comme inoffensives et considérées comme utiles dans le secteur de l'agriculture et plus spécifiquement concernant la lutte contre les ennemis et parasites des cultures. A l'heure actuelle, l'exploitation des microorganismes bénéfiques a gagné une attention considérable et semble être une alternative prometteuse à l'utilisation des produits chimiques.

Introduction

D'une manière générale, les microorganismes utilisés comme biopesticides ou biofertilisants peuvent avoir trois origines diverses ; la rhizosphère, la surface de la plante ou bien les tissus internes. Les organismes utiles pour la plante colonisant la rhizosphère sont rassemblés dans le groupe des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), ceux localisés dans les tissus internes du végétal sont appelés les endophytes.

Bien que le terme 'endophyte' conçu auparavant pour désigner des microorganismes phytopathogènes colonisant les tissus internes d'un végétal, la nomenclature actuelle limite l'utilisation de ce terme aux microorganismes ayant des effets bénéfiques sur la plante (Schulz et Boyle, 2005). Par ailleurs, les endophytes sont des microorganismes qui colonisent les tissus internes des plantes sans causer des symptômes apparents. Leur rôle a été démontré dans les écosystèmes naturels et agricoles en agissant comme biofertilisants, épurateurs, éléments structurant la matrice du sol et agents de lutte biologique (Wu *et al.*, 2005).

Actuellement, les endophytes sont considérés comme le second génome de la plante du fait de leurs capacités à synthétiser des métabolites secondaires très divers et constituent relativement une source potentielle pour des fins d'exploitation dans la médecine, la pharmacie, l'industrie et l'agriculture (Berendsen *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont été réalisées sur la caractérisation et les propriétés biologiques des bactéries endophytes isolées de plantes spontanées au laboratoire de bactériologie de l'université de Blida.

Djellout (2011) a démontré que les bactéries endophytes isolées des plantes spontanées retardent l'apparition des tumeurs et diminuent ou suppriment totalement les symptômes de la maladie de crown gall causés par *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium vitis* en induisant une résistance systémique à l'égard de ces deux bactéries phytopathogènes. Un autre travail mené par Alim (2011) sur les agents de pourriture molle a montré que la bactérie *Pectobacterium carotovorum* à l'origine de ces symptômes pourraient être réduite ou totalement absente en présence des bactéries endophytes appartenant à deux genres bactériens biologiquement très actifs (*Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp.). Cette inhibition de la croissance des souches de *P. carotovorum* a été attribuée à la production de métabolites secondaires antimicrobiens.

La promotion de la croissance végétale par les bactéries endophytes a été vérifiée par Haddad *et Coll.* (2013), où la bactérisation de la tomate par des endophytes appartenant aux genres *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. isolées des plantes spontanées a permis de stimuler

Introduction

d'une manière significative la germination et la croissance végétale *in vitro* et *in planta*. La tomate traitée avec les filtrats bactériens *in vitro* et les plantes directement bactérisées ont montré une augmentation de tous les paramètres de croissance comparés au témoin ainsi qu'une augmentation de l'indice de vigueur de la tomate.

Parmi les souches endophytiques isolées des plantes spontanées, la plupart d'entre elles appartient aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus*. Une seule souche endophyte a été identifiée appartenant à l'espèce *Curtobacterium flaccumfaciens*, rapportée rarement par la bibliographie comme organisme endophyte.

A cet effet, nous avons jugé judicieux d'étudier cette bactérie endophyte selon plusieurs aspects pour essayer d'expliquer sa présence endophyte. Afin de mener cette étude, nous avons cerné les différents types d'interactions possibles qui peuvent exister et avons réparti nos objectifs comme suit :

- La détermination des caractéristiques biochimiques et physiologiques par la réalisation d'un ensemble de tests.

- La détermination *in vitro* de la production des métabolites secondaires impliqués dans la promotion de la croissance végétale.

- L'évaluation du pouvoir pathogène de la souche bactérienne sur trois variétés de haricot.

Les résultats obtenus par les différents tests et les hypothèses formulées sont par la suite discutés en rapport avec la bibliographie inhérente à ce sujet.

Chapitre 1: Synthèse bibliographique sur les bactéries endophytes et *Curtobacterium flaccumfaciens* comme cas d'étude.

1. Les plantes, un réservoir pour les bactéries endophytes

Les microorganismes endophytes sont présents dans les tissus internes de plusieurs espèces végétales et ils ne produisent pas de symptômes de maladies (Hanada et *al.*, 2010 ; Bae et *al.*, 2011).

Plusieurs études démontrent que les microorganismes endophytes incluent une variété de bactéries et de champignons. Différentes espèces végétales hébergent des endophytes dont les plantes médicinales avec 35%, les plantes cultivées 29% et les plantes adventices 18%. Par ailleurs, les endophytes sont isolés des plantes spontanées appartenant à diverses familles botaniques (Teng et *al.*, 2010 ; Yang et *al.*, 2011).

L'isolement des bactéries endophytiques à partir des plantes spontanées *Urtica dioïca*, *Plantago lanceolata*, *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus* récoltées de la station expérimentale de l'université Blida 1, a montré une grande diversité et abondance des endophytes dont 73 isolats bactériens ont été isolés à la fois des parties aériennes et racinaires (Smaïn et Khodja, 2010).

Les résultats d'évaluation du pouvoir antibactérien de ces isolats à l'égard d'une gamme de bactéries phytopathogènes se sont avérés très intéressants où ils ont montré une action antagoniste très marquante (Smaïn et Khodja, 2010 ; Krimi et *al.*, 2012) .

Une étude menée par Haddad et *ses coll.* (2013), montre que la bactérisation des plants de tomates par des bactéries endophytes (*Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp.) isolées des plantes spontanées cité ultérieurement, stimule d'une façon significative la germination et la croissance végétale *in vitro* et *in planta*. Les plants de tomate traités avec les filtrats bactériens *in vitro* et les plants directement bactérisés ont montré une augmentation de tous les paramètres de croissance comparés au témoin. L'appréciation de l'indice de vigueur a montré une augmentation chez les plantes de tomates cultivées *in vitro* ou *in situ* (en pots).

À partir de cinq plantes spontanées (*Cleome arabica*, *Solanum nigrum*, *Astragalus armatus*, *Aristida pungens* et *Panicum turgidum*) collectées du Sahara algérien, où plusieurs espèces végétales ont s'adaptées aux conditions de stress caractéristiques de la région

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

spécialement le sol sablonneux pauvre et la sécheresse du climat aride. Goudjal et *ses coll.* (2013) ont isolé vingt-sept actinomycètes endophytes appartenant au genre *Streptomyces*. Ces bactéries endophytes ont été capables de produire plusieurs régulateurs de croissance végétale, spécialement l'acide indole acétique (AIA). Les *Streptomyces* producteurs d'AIA ont pu fortement promouvoir la croissance de la tomate (*Solanum lycopersicum* cv. *Marmande*). Cet effet bénéfique est exprimé par un taux de germination élevé, une élongation très importante des racines et une augmentation du poids frais et sec des plantes inoculées (Goudjal et *al.*, 2013).

2. Origine, localisation et caractéristiques des bactéries endophytes

Le terme endophyte a été conçu par de Bary en 1866 pour décrire les souches pathogènes à l'intérieur des tissus des plantes, cette définition a été maintenue par la suite pour tous les microorganismes vivant à l'intérieur des plantes (Wilson, 1995). Ce terme pourrait être employé dans un large spectre pour différents microorganismes comme par exemple des bactéries, des champignons, ainsi que des insectes à l'intérieur des plantes et des algues. Cependant, le terme endophyte a été également défini de plusieurs manières et les définitions ont été modifiées au cours de l'avancement des recherches (Trémouillaux-Guiller et *al.*, 1991 ; Chanway, 1996 ; Zinniel et *al.*, 2002).

En 1995, Wilson a proposé de définir un endophyte en tant que «champignons ou bactéries qui, pour l'ensemble ou une partie de leur cycle de développement, envahissent les tissus des plantes vivantes et causent des infections inapparentes et asymptomatiques dans les tissus végétaux mais ne causent aucun symptôme de la maladie».

Hallmann et *ses coll.* (1997), ont défini les bactéries endophytes en tant que «bactéries détectées à l'intérieur des plantes dont leur surface a été préalablement stérilisée ou extraites de l'intérieur des plantes et de n'avoir aucun effet visiblement nocif sur ces dernières». Cette définition inclut les colonisateurs intérieurs avec un comportement apparemment neutre ainsi que les symbiotiques. Elle est largement utilisée par les chercheurs qui travaillent sur les endophytes.

Dans ce même ordre d'idées, Kobayashi et Palumbo (2000), définissent les endophytes bactériens en tant que «bactéries qui vivent dans les tissus de la plante sans causer un réel dommage ou acquérir un bénéfice autre que leur habitation».

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

Enfin, Bacon et White (2000), définissaient les endophytes comme des microorganismes qui colonisent les tissus vivants internes des végétaux sans causer des effets négatifs immédiatement déclarés.

Nous pouvons retenir que les diverses recherches ont défini ainsi les endophytes de différentes manières qui dépendent habituellement de la perspective selon laquelle les endophytes ont été isolés et plus tard examinés.

Plus de 200 genres bactériens appartenant à 16 phyla ont été rapportés comme endophytes depuis leur isolement, incluant des bactéries cultivables aussi bien que les non cultivables qui appartiennent aux *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, Bacteroidetes, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, Firmicutes, *Fusobacteria*, Gemmatimonadetes, *Nitrospira*, Planctomycetes, *Proteobacteria*, Spirochaetes et *Verrucomicrobiae*. Cependant, les endophytes les plus dominants et les plus étudiés appartiennent à trois phyla majeurs (*Actinobacteria*, *Proteobacteria* et Firmicuta) et incluent les espèces *Azoarcus*, *Acetobacter* (*Gluconobacter*), *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* et *Streptomyces*.

Les espèces de ces genres sont ubiquistes dans le sol et la rhizosphère qui représente la source principale des colonisateurs endophytes. D'autres sources possibles des endophytes incluent la phyllosphère, l'anthosphère et la semence (Pedrosa et al., 2011 ; Sessitsch et al., 2012).

3. Niche écologique et colonisation de la plante par les bactéries endophytes

Les bactéries endophytes colonisent une niche écologique similaire à celle colonisée par les microorganismes phytopathogènes mais sans engendrer des dommages pour leurs plantes hôtes. Cette niche écologique offre à ces bactéries une protection vis-à-vis des conditions de stress biotiques et abiotiques (Haggag, 2010).

Les bactéries endophytiques ont été isolées des différents compartiments de la plante (fleurs, feuilles, fruits, tiges, racines et même de la semence). Ces micro-organismes endophytes établissent ainsi une relation plus étroite avec leur hôte et peuvent de ce fait interagir plus longtemps avec la plante (Posada et Vega, 2005).

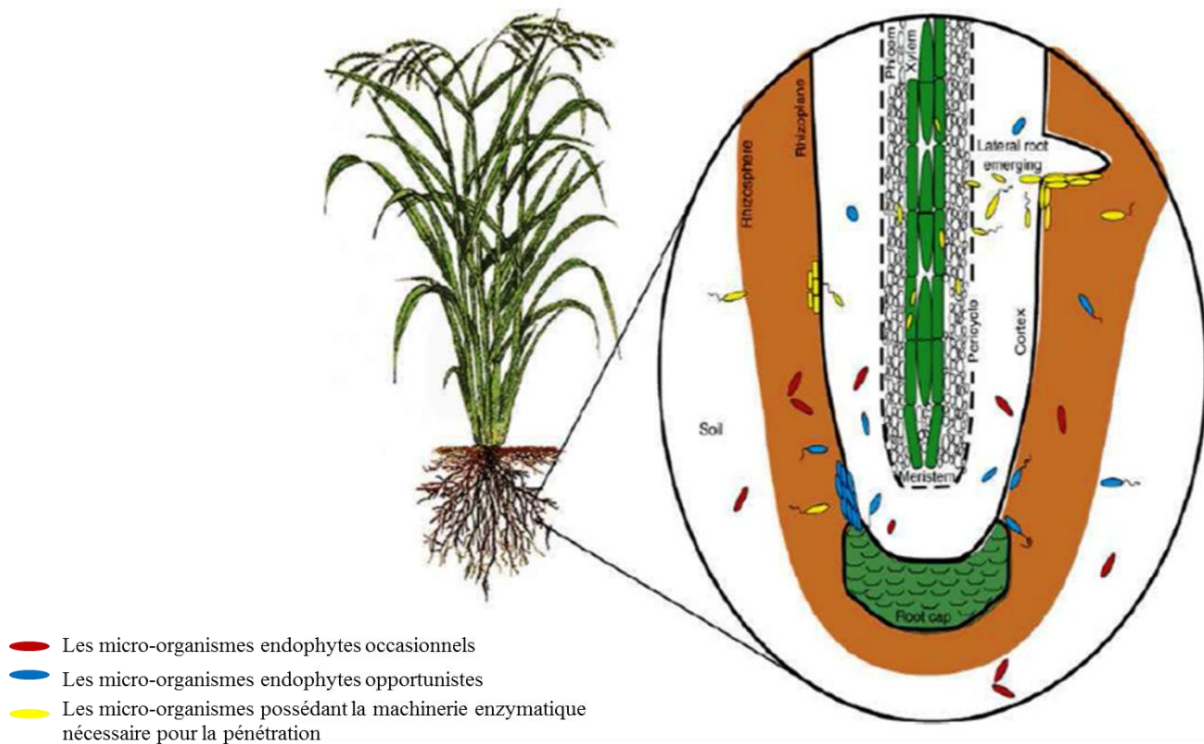


Figure 1: Types de micro-organismes endophytes et les voies de pénétration racinaire possibles (Hardoim *et al.*, 2008).

Au niveau racinaire, la colonisation endophytique peut se réaliser de différentes façons. Tout d'abord, la zone d'émergence des racines secondaires constitue une ouverture naturelle permettant l'entrée des bactéries à l'intérieur de la plante (Figure 1). Ensuite, des blessures peuvent également permettre l'entrée des bactéries. Enfin, une autre possibilité consiste en la sécrétion par le microorganisme d'enzymes dégradant les parois cellulaires de la plante et facilitant sa pénétration (Lodewyckx *et al.*, 2002 ; Hardoim *et al.*, 2008).

3.1. Colonisation du rhizoplan

La colonisation de la plante par les bactéries endophytes commence généralement par leur établissement dans la rhizosphère par des mécanismes de reconnaissance et de chimiotactisme, deux mécanismes précoces à ce processus.

Après la colonisation de la rhizosphère, les bactéries s'attachent au rhizoplan c'est-à-dire la surface des racines. Des études ont montré que l'attachement des cellules bactériennes aux racines est une étape cruciale pour l'établissement de la relation endophytique (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

Plusieurs composants membranaires bactériens peuvent être impliqués dans ce processus. Pour *Azoarcus* sp. BH72, un endophyte diazotrophe du riz, des pili de type IV

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

codés par le gène pilAB sont obligatoires pour l'attachement de la bactérie sur la surface racinaire. Un mutant dont le pilAB est altéré a échoué de coloniser avec succès les racines et les plantules de riz. L'attachement d'un autre endophyte diazotrophique *Herbaspirillum seropedicae* à la surface racinaire du maïs dépend des LPS (liposaccharides). Une souche mutante dont la composition en monosaccharide a été modifiée a montré un niveau d'adhérence aux racines cent fois plus faible que la souche sauvage d'origine. Une étude similaire montre que les EPS (exopolysaccharides) sont également nécessaires à la colonisation du rhizoplan et de l'endosphère du riz par *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Balsanelli et al., 2010 ; Meneses et al., 2011).

Puisqu'aucune de ces souches mutantes n'a complètement perdu sa capacité pour l'adhérence, il peut être recensé que d'autres composants bactériens extracellulaires sont également impliqués dans ce processus (Malfanova et al., 2013).

3.2. Pénétration des bactéries endophytes au sein de la plante

Les sites préférentiels pour l'attachement bactérien et leur point d'entrée sont ; la zone apicale des racines caractérisées par la présence d'une couche extérieure mince telle que les cellules d'élongation racinaire et la zone de chevelu racinaire (zone de pénétration active), et la zone racinaire basale avec de petites fissures causées par l'émergence des racines latérales appelée zone de pénétration passive (Figure 1). Au niveau de ces sites, les bactéries sont souvent arrangées en micro-colonies contenant plusieurs centaines de cellules (Zachow et al., 2010).

Pour la pénétration active, les bactéries endophytiques doivent être bien équipées par des enzymes cellulolytiques qui hydrolysent les membranes des cellules exodermes.

La production de ces mêmes enzymes, *in vitro*, a été rapportée par plusieurs auteurs (Compant et al., 2005 ; Reinhold-Hurek et al., 2006). L'expression de l'endoglucanase, la cellulase principale responsable de l'hydrolyse des ponts β (1→4) de cellulose, a été détectée *in planta* dans les sites primaires d'entrée de *Azoarcus* sp. BH72. D'ailleurs, le rôle d'endoglucanase dans sa colonisation endophytique a été confirmé par l'analyse des souches mutantes, dont un mutant *eglA*, a échoué d'envahir les cellules et coloniser systématiquement l'hôte, contrairement à la souche sauvage contenant le gène *eglA* (Reinhold-Hurek et al., 2006).

Les enzymes de dégradation membranaire des bactéries sont aussi impliquées dans l'élicitation des mécanismes de défense chez les plantes (Norman-Setterblad et al., 2000). L'induction d'une telle réponse diminue habituellement la dissémination du microorganisme à l'intérieur de la plante. Puisque ce n'est pas le cas pour les bactéries endophytes dont la

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

sécrétion enzymatique est de faible intensité et occasionnelle dans la mesure où elle n'aboutit pas à la destruction des tissus et la non activation des mécanismes immunitaires de la plante. L'analyse des séquences génomiques des bactéries endophytes confirme cette notion (Iniguez et al., 2005 ; Malfanova et al., 20013).

En pénétrant à l'intérieur de la plante par le biais des ouvertures naturelles dans la zone des racines latérales, les bactéries demeurent « invisibles » pour le système immunitaire du végétal. Cette voie de pénétration (combinée le plus souvent avec la pénétration active) a été suggérée pour *Azoarcus* sp. BH72 et *Burkholderia vietnamiensis* du riz, *Burkholderia phytofirmans* PsJN de la vigne, *Bacillus subtilis* Lu144 et *Burkholderia cepacia* Lu10-1 du mûrier, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 de la canne à sucre et *Herbaspirillum seropedicae* Z67 du riz (Reinhold-Hurek et Hurek, 1998 ; James et al., 2002 ; Compant et al., 2005 ; Ji et al., 2010).

3.3. Colonisation du cortex de la plante

Une fois que les cellules bactériennes traversent les barrières exodermiques, elles peuvent persister aux sites d'entrée comme il a été démontré pour *Paenibacillus polymyxa* sur l'*Arabidopsis* ou se déplacer plus profondément et coloniser les espaces intercellulaires du cortex (Figure 1). Il est rare que les bactéries endophytes pénètrent à l'intérieur des cellules végétales et causent la formation de structures morphologiques spécifiques (Gasser et al., 2011). Cependant, Huang et ses coll. (2011), ont montré que *Bacillus subtilis* GXJM08 peut coloniser les racines d'une légumineuse *Robinia pseudoacacia* d'une façon similaire à celle des *Rhizobiacées*.

En effet, chez cette dernière famille, des changements spectaculaires incluant: (1) la déformation du chevelu racinaire (gonflement) ; (2) la formation des infections filamenteuses intra-membranaires avec les bactéries dans les cellules corticales des racines et (3) la formation des bactéroïdes à l'intérieur des cellules corticales de la plante surviennent lors de la colonisation mais aucune preuve n'a été émise quant à la fixation de l'azote atmosphérique comme les bactéries symbiotiques des légumineuses (Huang et al., 2011).

3.4. Colonisation du xylème

Très peu de bactéries sont capables de pénétrer les barrières endodermiques et envahir les vaisseaux conducteurs de la sève (le xylème). Cela se produit habituellement dans les cellules endodermales dans la zone apicale et/ou basale des racines où les racines d'émergence latérales interrompent la continuité de la membrane des cellules de l'endoderme (Figure 1) (Gasser et al., 2011).

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

3.5. Source de carbone de la croissance des bactéries endophytes à l'intérieur des tissus de la plante

Bien que la concentration des éléments nutritifs disponibles soit relativement faible et représente 0.006 -0.034 $\mu\text{mol/g}$ de poids frais pour quelques sucres, il a été démontré qu'elle est suffisante pour supporter la croissance des bactéries endophytes (Bacon et Hinton, 2006).

Des études expérimentales par utilisation des marqueurs radioactifs ont confirmé que les bactéries endophytes utilisent les substances végétales dans leur nutrition. Par exemple, après l'inoculation des plants de pomme de terre par du CO_2 radioactif, Rasche et *ses coll.* (2009) ont détecté que l'isotope radioactif se trouve d'abord dans les métabolites photosynthétiques du végétal puis migre vers les différentes bactéries endophytes. Plusieurs expérimentations ont été réalisées dans le but de déterminer les sources de carbone pouvant être importantes ou cruciales pour le développement endophytique (Krause et *al.*, 2011 ; Malfanova et *al.*, 2013).

Dans une étude récente, Malfanova et *ses coll.* (2013) ont montré que contrairement aux *Pseudomonas* spp. rhizosphériques, les souches endophytes de *Pseudomonas* isolées de concombre, étaient capables d'utiliser l'arabinose, un des sucres les plus abondamment disponibles dans le fluide du xylème de nombreuses plantes.

Dans une autre étude, l'induction de l'expression des alcools déshydrogénases bactériens à l'intérieur des racines du riz pendant leur colonisation par *Azoarcus* sp. BH72 a été confirmée et la souche mutante dont les gènes codant pour les alcools déshydrogénases colonise les racines moins efficacement que la souche d'origine (Krause et *al.*, 2011).

Ces études montrent que la capacité des bactéries à utiliser certains métabolites végétaux pourrait être un préalable pour l'établissement de l'endophytisme (Malfanova et *al.*, 2013).

3.6. Colonisation des organes reproducteurs

Il est acceptable que la concentration en nutriments disponibles dans les vaisseaux du xylème décroisse tout en long de la plante. Ceci peut expliquer la diminution de la diversité et de la densité de la population des bactéries endophytiques avec la distance des racines.

En effet, seulement un petit nombre de bactéries atteint les parties supérieures des tiges, l'apoplaste des feuilles et les organes reproducteurs tels que les fleurs, les fruits et la semence (Compant et *al.*, 2010 ; Fürnkranz et *al.*, 2011).

La présence des bactéries endophytes dans les organes reproducteurs a été confirmée par leur isolement et mise en culture dans des milieux synthétiques et par observation

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

microscopique. Dans la plupart des cas, les cellules bactériennes atteignent les organes reproducteurs à travers les tissus vasculaires (Compant et *al.*, 2011).

Il est également possible que si une des cellules reproductrices (gamètes mâles ou femelles) est infectée par un microorganisme, l'embryon résultant et l'endosperme peuvent être colonisés. Ce qui peut expliquer la transmission des endophytes des plantes à la semence (Malfanova et *al.*, 2013).

3.7. Autres voies de colonisation de la plante

Bien que la rhizosphère se considère comme la source principale des endophytes, d'autres sites d'entrée ne peuvent pas être ignorés. Quelques bactéries sont capables de pénétrer à l'intérieur de la plante à travers les stomates comme c'est le cas de *Gluconobacter diazotrophicus* et *Streptomyces galbus* endophytes de la canne à sucre. Pour ce dernier cas, la production des enzymes non spécifiques qui dégradent la cire peut faciliter la colonisation de la surface foliaire et l'établissement de l'endophytisme de ce microorganisme (Suzuki et *al.*, 2005).

Les bactéries peuvent aussi pénétrer *via* les fleurs, les fruits et la semence. Néanmoins, cela est connu pour les microorganismes phytopathogènes et il n'était pas montré pour les bactéries endophytes qui sont non pathogènes (Malfanova et *al.*, 2013).

4. Mise au point des bactéries endophytes (méthodes de détection et d'énumération des bactéries endophytes)

Les méthodes des protéines autofluorescentes (AFP) sont des outils clés pour l'étude de plusieurs processus vitaux tels que les interactions plantes-microorganismes et la formation des biofilms microbiens. Ces techniques ont été utilisées pour détecter et énumérer les microorganismes *in situ* sur la surface des plantes ou *in planta* (Larrainzar et *al.*, 2005).

Une de ces stratégies d'AFP utilise un système de marqueur, qui code pour une protéine fluorescente verte (GFP pour Green Fluorescent Protein). GFP est un biomarqueur très utile parce qu'il n'exige aucun substrat ou cofacteur pour exhiber la fluorescence. Cette technique s'est montrée prometteuse dans l'observation des *Pseudomonas* dans les tissus racinaires (Tombolini et Jansson, 1998).

Germaine et *ses coll.* (2007) ont étudié un certain nombre d'AFP pour des endophytes de peuplier et leur capacité de colonisation. Ils ont aussi exploité différentes méthodes d'inoculation telles que la méthode 'stick dipping' qui s'est avérée très efficace ou la méthode d'imbibition de la semence 'seed imbibing' qui s'est révélée efficace pour l'inoculation des plants de pois.

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

La colonisation endophytique a été également visualisée par utilisation d'un système β -glucuronidase (GUS). Une souche de *Herbaspirillum seropedicae* Z67 marqué d'un GUS a été inoculée dans des plantules de riz. Les marqueurs GUS étaient plus intenses au niveau des coléoptiles des racines latérales et quelques jonctions des racines principales (James et *al.*, 2002).

5. Interaction plante – endophyte

Le but commun pour toutes les interactions endophytiques est la fourniture des éléments nutritifs et la protection contre les stress environnementaux et la compétition microbienne (Schulz et Boyle, 2005).

5.1. Interactions bénéfiques

Lors de l'association bénéfique entre une plante et un endophyte, divers mécanismes sont impliqués dans la protection et la stimulation de la croissance de la plante. Ces interactions peuvent être indirectes par une action directe sur l'agent pathogène qui peut se réaliser par le biais d'une sécrétion de substances allélochimiques inhibitrices et/ou d'un phénomène de compétition avec les microorganismes phytopathogènes pour l'espace et les nutriments ou encore par la production d'H₂CN, des sidérophores et des enzymes de lyse cellulaire. L'action directe de la stimulation de la croissance végétale par le microorganisme endophyte peut se produire de différentes manières, par la fixation de l'azote atmosphérique, la solubilisation des minéraux tels que le phosphore et la production de régulateurs de croissance tels que les auxines, les gibbérellines, les cytokinines et l'éthylène (Sturz et Christie, 2003 ; Ahmad et *al.*, 2008).

Ces microorganismes peuvent également stimuler les défenses des plantes, ce qui provoque une résistance de la plante contre les agents pathogènes. Des barrières structurales avec des appositions pariétales peuvent notamment se mettre en place et des phytoalexines ainsi que des protéines PR peuvent être ou non sécrétées suite à l'inoculation de la plante avec un endophyte (Figure 2) (Harman, 2006).

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

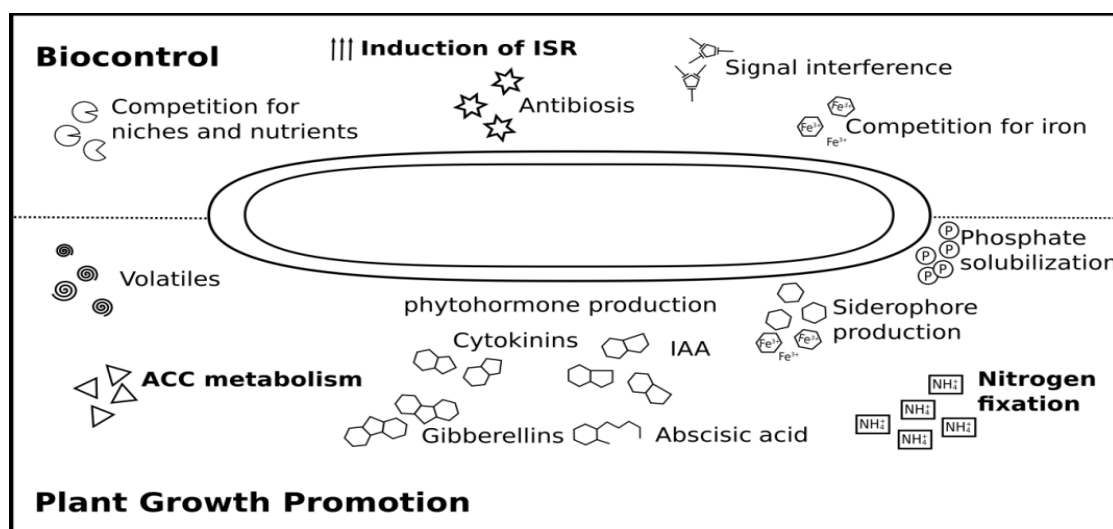


Figure 2: Illustration des principaux mécanismes de PGP et BCA impliqués lors de l'interaction bénéfique endophyte-plante (Malfanova, 2013).

5.1.1. Promotion de la croissance végétale par les bactéries endophytes

La promotion de la croissance a été démontrée dans le cas de plusieurs bactéries endophytiques. Cet effet est généralement basé sur la mise en disponibilité des éléments nutritifs et la production et/ou la régulation des phytohormones au profit de la plante (Malfanova et al., 2011).

- **Fixation d'azote atmosphérique**

Plusieurs études ont confirmé que l'inoculation des plantes par des bactéries fixatrices d'azote peut produire des effets bénéfiques sur la croissance végétale. L'utilisation des biofertilisants et des bio-promoteurs telles que les bactéries fixatrices d'azote est d'importance particulière car ils peuvent diminuer l'application des fertilisants chimiques et par conséquent la réduction des coûts de production. C'est ainsi que les plantes inoculées par certaines bactéries endophytes ont montré une augmentation de la croissance associée à une accumulation plus élevée en azote N et une meilleure croissance racinaire permettant de promouvoir l'absorption de l'eau et des éléments nutritifs (Bashan et Holguin, 1998 ; Mia et al., 2010).

Une incorporation plus élevée d'N peut augmenter la formation des protéines et des enzymes pour maintenir de meilleures activités physiologiques et également contribuer à la formation de la chlorophylle qui par conséquent augmente les activités photosynthétiques (Raja et al., 2006).

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

Des souches de *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* se sont avérées efficaces dans l'augmentation de la nodulation et la fixation d'N chez le soja (Zhang et al., 1996).

- **Solubilisation du phosphore**

Le phosphore (P) joue un rôle indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Il a été démontré que certains endophytes offrent à leur plantes hôtes un système biologique capable de solubiliser le phosphore inorganique du sol et le rendre disponible pour la plante. La capacité de certains endophytes de convertir le phosphore insoluble en formes plus accessibles comme l'orthophosphore, constitue en réalité un facteur très important pour l'augmentation des rendements de la plante (Zaidi et al., 2009).

Des travaux ont confirmé que des souches de *Pseudomonas putida* et *Azospirillum* sp. isolées de la rhizosphère de soja se sont avérées capables de solubiliser le phosphore *in vitro* avec d'autres effets promoteurs de la croissance (Cattelan et al., 1999).

Par ailleurs, d'autres études ont aussi démontré qu'une souche endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* et une autre *Bradyrhizobium japonicum* peuvent augmenter l'absorption du P qui contribue au bon développement des plantules de soja (Son et al., 2006).

Il est à noter aussi que plusieurs bactéries endophytes solubilisant le phosphore jouent un rôle principal dans le cycle biogéochimique de ce dernier et sa disponibilité aux plantes (Coutinho et al., 2011).

- **Production des phytohormones**

Diverses études ont prouvé que les bactéries endophytes peuvent stimuler la croissance de la plante *via* la production des phytohormones d'origine bactérienne telles que les auxines (l'acide indole acétique AIA), les gibbérellines et les cytokinines ou par la régulation des taux élevés d'éthylène endogène dans la plante (Bottini et al., 2004 ; Spaepen et al., 2009).

Il existe de nombreux exemples de corrélation entre la production des phytohormones et la promotion de la croissance des plantes par les bactéries endophytes. Par exemple, l'utilisation de *Bacillus megaterium* promotrice de la croissance chez *Arabidopsis thaliana* et *Phaseolus vulgaris*, s'est avérée dépendante de la signalisation des cytokinines se traduisant par l'augmentation de la biomasse végétale (Ortiz-Castro et al., 2008).

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

5.1.2. Lutte biologique par les bactéries endophytes

Les bactéries endophytes utilisent une série de mécanismes pour permettre à la plante qui les héberge une protection contre les organismes phytopathogènes.

- **La compétition pour l'espace et les nutriments**

La compétition pour les nutriments et la niche écologique est un mécanisme fondamental avec lequel les bactéries endophytes protègent les plantes. La chimiotaxie pour le carbone, les sucres, les vitamines et les acides aminés qui sont exsudés dans la rhizosphère par les plantes hôtes, peut expliquer la compétition au niveau de la rhizosphère (Compant et *al.*, 2005). Plus de 40 % des produits photosynthétiques peuvent être présents au niveau des racines, ce qui implique que les endophytes doivent avoir des facultés chimiotactiques pour atteindre les composants exsudés avant les pathogènes pour protéger les plantes (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

La compétition pour le fer présente un cas particulier de compétition pour les éléments nutritifs. Certaines bactéries endophytes ont la capacité d'adsorber cet élément nécessaire pour la croissance par la production de molécules chélatrices du Fe^{3+} dans des conditions de carence de cet ion: les sidérophores. En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, les endophytes le rendent non disponible pour les organismes phytopathogènes, ce qui provoque une diminution de leur croissance. C'est le cas de plusieurs bactéries du genre *Pseudomonas* ayant un grand pouvoir de chélation du fer (Ongena et *al.*, 2002).

- **L'antibiose**

L'antibiose est l'inhibition directe de la croissance du pathogène par un microorganisme *via* la production de métabolites à propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les antibiotiques constituent un groupe chimique hétérogène comprenant des composants organiques à faible poids moléculaire produits par des microorganismes et qui possèdent un effet nuisible envers d'autres microorganismes à de faibles concentrations (Raaijmakers et *al.*, 2002).

Certaines bactéries sont capables de produire une large gamme d'antibiotiques. Par exemple, la pyrrolnitrine qui est produite par certaines espèces des genres *Burkholderia* et *Pseudomonas*. Cet antibiotique a montré une activité inhibitrice vis-à-vis des champignons *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*, et *Sclerotinia sclerotiorum* (Raaijmakers et *al.*, 2002).

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

- **La sécrétion des enzymes lytiques**

Il a été démontré que les endophytes peuvent sécréter des enzymes lytiques telles que les chitinases, les cellulases, les amylases et les 1,3- β glucanases permettant de réduire le développement de plusieurs phytopathogènes. Par exemple, les enzymes chitinolytiques produites par *Bacillus cereus* souche 65, sont impliquées dans le biocontrôle de *Rhizoctonia solani*. En effet, la chitine constitue le composant principal de la paroi des hyphes fongiques (Pleban et al., 1997).

- **L'induction de la résistance systémique**

Même si les endophytes ne sont pas en contact avec les microorganismes phytopathogènes, ils peuvent protéger systématiquement la plante colonisée. Ces microorganismes peuvent induire une résistance systémique chez les plantes hôtes (van Loon et Bakker, 2005).

La SAR (Systemic Acquired Resistance) et l'ISR (Induced Systemic Resistance) sont les deux types de la résistance qui sont activées dans les plantes lors d'un stress (Durrant et Dong, 2004).

La présence des endophytes induisant une ISR a été signalée sur le haricot, l'œillet, le concombre, le radis, le tabac, la tomate et l'*Arabidopsis thaliana* ainsi que sur plusieurs autres plantes. Cette ISR est effective vis-à-vis de différents types de phytopathogènes. A cet égard, l'ISR est donc phénotypiquement similaire à la SAR en rendant les parties non infectées de la plante plus résistantes envers un large éventail de pathogènes (Sticher et al., 1997). Cependant, différemment à la SAR, l'ISR n'implique pas l'accumulation des protéines PR (*Pathogenesis-Related proteins*). Contrairement à la SAR induite par le pathogène qui est contrôlée par l'acide salicylique, l'ISR induite par les endophytes est contrôlée par une voie de signalisation dont l'éthylène et l'acide jasmonique jouent des rôles clés (Yan et al., 2002).

5.2. Interactions pathogènes

Les bactéries endophytes sont généralement considérées comme des microorganismes inoffensifs pour leurs plantes hôtes (Hallman et al., 1997). Des études visant à isoler et identifier les bactéries endophytes des plantes cultivées et spontanées ont montré qu'en dehors des saprophytes, des mutualistes et des bactéries bénéfiques, des microorganismes phytopathogènes peuvent aussi exister dans certains cas (Scortichini et Loreti, 2007).

Les exemples sont *Pseudomonas viridiflava* isolées des tiges des plantules de pois, *Curtobacterium flaccumfaciens* et *Clavibacter michiganensis* des plantes spontanées, *Curtobacterium flaccumfaciens* et *Xanthomonas campestris* isolées de l'oranger et le

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

mandarinier, *Burkholderia gladioli* et *Curtobacterium flaccumfaciens* pathovars *flaccumfaciens*, *oortii* et *poinsettiae* isolées de la semence de café. Cependant, de telles études n'ont pas évalué la pathogénicité et donc l'identification exacte des souches endophytes des plantes hôtes dont elles ont été isolées (Araujo et al., 2002 ; Vega et al., 2005 ; Scortichini et Loreti, 2007).

6. *Curtobacterium flaccumfaciens*, une bactérie endophyte bénéfique ou phytopathogène

6.1. Description du genre

Le genre *Curtobacterium* a été proposé par Yamada et Komagata en 1972, pour regrouper des bactéries phytopathogènes précédemment appelées Corynobactéries (Yamada et Komagata, 1972).

Ce genre renferme six espèces, mais seulement une espèce phytopathogène *C. flaccumfaciens* incluant des souches phytopathogènes classées en divers pathovars (Collins et Jones, 1983 ; Behrendt et al., 2002).

Tous les pathovars de *C. flaccumfaciens* montrent un niveau de parenté très élevé décrits par des tests biochimiques, par le profil des acides gras, l'électrophorèse des protéines, le séquençage de l'ARN 16S, la composition de la paroi cellulaire et la sérologie, leur distinction est essentiellement basée sur la spécificité de l'hôte (Felske et al., 1999).

Les bactéries du genre *Curtobacterium* ont été isolées comme endophytes de plusieurs plantes, y compris le trèfle, le riz, la pomme de terre, les *Citrus* et les plantes sauvages (Sturz et Matheson, 1996 ; Sturz et al., 1998 ; Elbeltagy et al., 2000 ; Araújo et al., 2001 ; Zinniel et al., 2002).

6.2. Les *Curtobacterium flaccumfaciens* bénéfiques

Plusieurs études ont montré que *Curtobacterium flaccumfaciens* peut être utilisé comme agent de lutte biologique contre de nombreux organismes phytopathogènes.

Lacava et ses coll. (2004), suggèrent en se basant sur des expérimentations *in vitro*, que la croissance de *Xylella fastidiosa* peut être inhibée par la bactérie endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* isolée des feuilles et des branches de *Citrus* asymptomatiques de la maladie du CVC (Citrus variegated chlorosis).

Des études ultérieures ont ensuite confirmé cette hypothèse. C'est ainsi que, les résultats des expériences menées *in planta* indiquent que l'inoculation des plants de *Catharanthus roseus* par *C. flaccumfaciens* réduit la sévérité des symptômes de la maladie de la chlorose des citrus. Ceci peut être expliqué soit par une induction d'une résistance

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

systémique ou par une action antagoniste directe entre *C. flaccumfaciens* et *X. fastidiosa* ou encore par la production des bactériocines spécifiques à *X. fastidiosa* (Lacava et al., 2004 ; Lacava et al., 2007).

Curtobacterium flaccumfaciens a montré une activité antagoniste considérable à l'égard d'*Agrobacterium tumefaciens* dont elle été efficace dans la réduction de l'incidence et la formation des galles sur plusieurs plantes hôtes à savoir les Rosacées et le Kalanchoë. Les résultats des tests du pouvoir antagoniste menés *in vitro* et *in planta* ont montré une activité antimicrobienne très élevée où la croissance de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* responsable de la maladie du crown gall a été inhibée à 100% (Tolba et Soliman, 2013).

Elvira-Recuenco (2000) montre aussi que des bactéries endophytes principalement *Pantoea agglomerans*, *Arthrobacter* sp. et *Curtobacterium* sp. offrent une source potentielle de biocontrol via leurs capacité à supprimer le chancre bactérien causé par *Pseudomonas syringae*.

6.3. Les *Curtobacterium flaccumfaciens* phytopathogènes

Le complexe *Curtobacterium flaccumfaciens* se subdivise en six pathovars: *C. flaccumfaciens* pv. *betae*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*, *C. flaccumfaciens* pv. *beticola* (nouvellement décrite) et *C. flaccumfaciens* pv. *ilicis* (anciennement appelé "*Arthrobacter ilicis*") (Chen et al., 2007 ; La Commission juridique du comité international de la systématique des Procaryotes, 2008).

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *beticola* est un nouveau pathovar de *Curtobacterium flaccumfaciens*. Ce pathogène cause des pertes de récolte très importantes sur la betterave sucrière atteignant 100% de dégâts. Les plantes ainsi infectées présentent au début de petites tâches foliaires jaunes qui deviennent brunes avec un halo jaune. Après 1 mois, les tâches fusionnent pour former des plages nécrotiques brunes. Enfin, la feuille entière se dessèche et meurt (Chen et al., 2007).

La bactérie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Collins et Jones, 1983) est l'agent causal du flétrissement bactérien de haricot, largement distribuée dans le monde et causant des dégâts considérables dans les aires de production de haricot destinés à la consommation. La bactérie est considérée comme un microorganisme de quarantaine (liste A2 de l'OEPP) dans plusieurs pays, son inspection dans la semence commercialisée est très rigoureuse (EPPO, 2011).

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

Ce pathogène est une bactérie transmise par semence, la semence infectée est la source principale pour la propagation et la dissémination de la maladie (Harveson et Schwartz 2007).

La bactérie *C. flaccumfaciens* possède plusieurs variants morphologiques qui peuvent être différenciés par la couleur, on retrouve des colonies de couleur jaune et celles de couleur orange. Quelques souches de la variante jaune ont également capables de produire un pigment extracellulaire hydrosoluble avec une couleur pourpre qui se diffuse dans le milieu de culture après 2 à 3 jours et elle présente la particularité de colorer les semences infectées. Ce pigment extracellulaire peut apparaître pour donner aux colonies de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* leurs couleur pourpre, considéré comme un critère de diagnostic de la maladie sur la semence de haricot. L'expression du pigment n'est pas stable génétiquement ce qui peut expliquer l'occurrence rare de cette variante dans la nature (Schuster et al., 1968 ; Agarkova et al., 2012).

- **Caractéristiques taxonomiques et cellulaires de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***

L'espèce *Curtobacterium flaccumfaciens* est une bactérie qui appartient au genre *Curtobacterium* à la famille des *Microbacteriaceae*, l'ordre des *Actinomycetales*, la sous classe des *Actinobacteridae*, la classe des *Actinobacteria* et le règne des *Eubacteria* (Young et al., 2004).

C'est une bactérie à Gram positif, capable de se mouvoir grâce à des flagelles de type latéraux ou polaires (de 1 à 3), corynéforme de 0.3-0.5 x 0.6-3.0 µm de taille. Elle est non encapsulé et non sporulante. Sur milieu de culture, la croissance de la bactérie est lente, petite (1-4mm). Les colonies sont circulaires, lisses, plates ou légèrement convexes, brillantes et semi-opaques. La pigmentation des colonies varie selon le milieu de culture du crème au jaune, des variantes orange et pourpre ont été aussi décrites (Hayward et Waterston, 1965).

- **Distribution géographique**

Le flétrissement bactérien du haricot a été signalé dans les pays producteurs de haricot à travers le monde. Cette maladie a été rapportée au Canada, aux Etats-Unis, Brésil, Venezuela, Australie, Tunisie, Kenya, Mauritanie, Turquie, Bulgarie, en Roumanie, en Russie et en ex-Yougoslavie. Elle est également présente dans certaines régions qui constituent le centre de production et de commercialisation de haricot tels que le Mexique et la Colombie, mais elle n'a pas été rapportée dans d'autres pays d'Amérique centrale. Ce pathogène a été signalé en Grèce et en Hongrie mais il n'est pas encore établi dans ces pays. En outre, la

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

présence du flétrissement bactérien en Belgique, en France, en Allemagne, et en Suisse n'a pas été confirmée (Hsieh et *al.*, 2006 ; EPPO, 2011). Aucune donnée n'existe sur la présence de la maladie en Algérie.

En raison de la transmission de *Cff* par la semence, le flétrissement bactérien du haricot s'est avéré comme une maladie difficile à gérer. Un certain nombre de pays ont imposé des réglementations de quarantaine pour prévenir l'introduction de la semence de haricot infectée (Guimarães et *al.*, 2001). En effet, la décoloration de la semence infectée n'est pas généralisée, certaines semences mêmes infectées restent incolores. Par conséquent, le potentiel d'introduction de la maladie dans des nouvelles aires géographiques est très élevé par l'intermédiaire des lots de semence pouvant contenir des traces de semences infectées seulement (Huang et *al.*, 2009).

- **Symptômes de la maladie**

Les symptômes de la maladie incluent le flétrissement des plantes, des lésions nécrotiques avec des marges jaunâtres irrégulières sur les feuilles, décoloration de la semence infectée mais pas toutes les gousses infectées présentent des signes visibles d'infection. Les symptômes peuvent être plus profonds sur les jeunes pousses, spécialement celles issues d'une semence infectée. L'infection précoce peut induire la mort des plantules et des pertes très importantes de production (Young et *al.*, 1996).

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

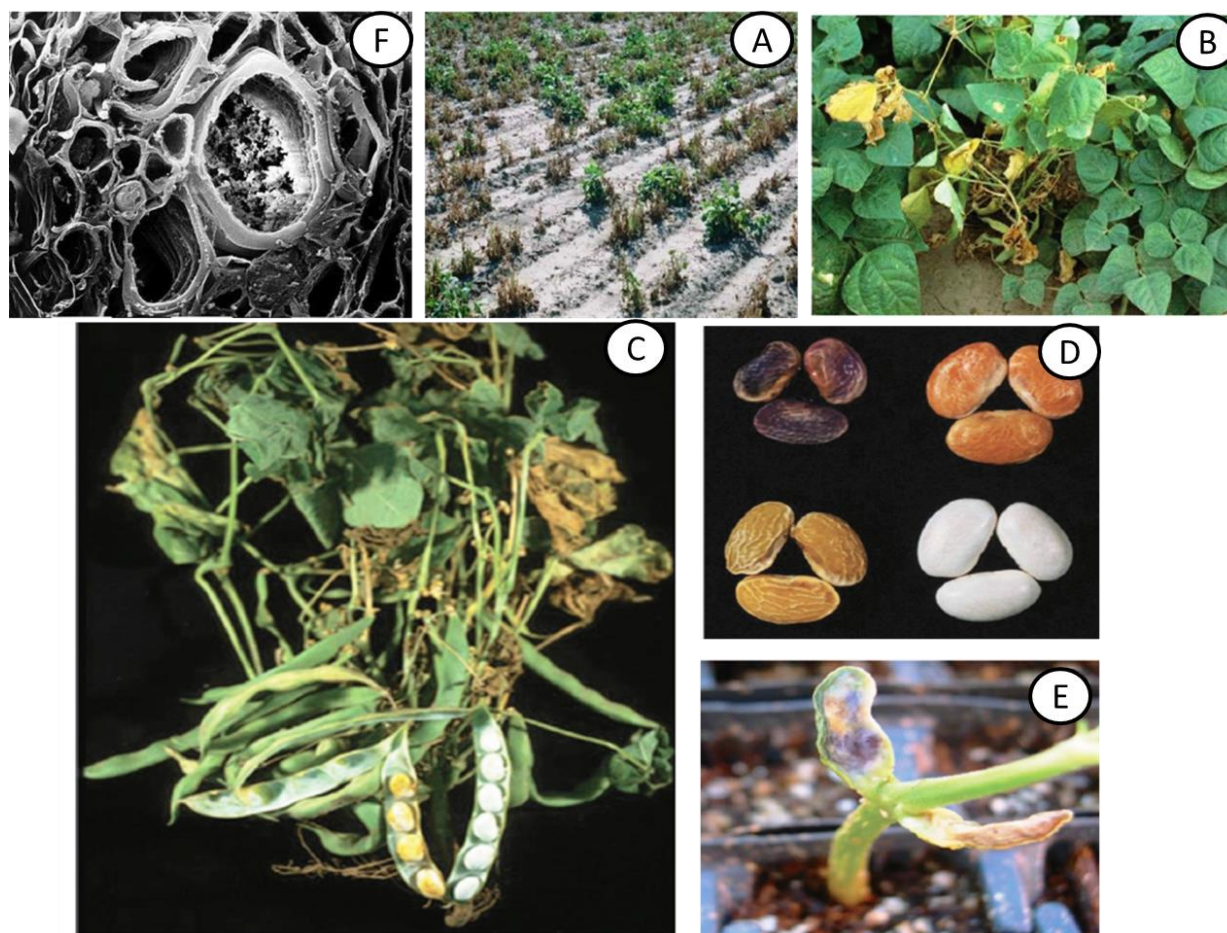


Figure 3: Principaux symptômes du flétrissement bactérien de haricot.

La bactérie *C. flaccumfaciens* est principalement une bactérie systémique envahissante des vaisseaux conducteurs (Figure 3F). La dégradation des cellules du xylème décolore le système vasculaire et limite la circulation de la sève dans la plante conduisant ainsi à un flétrissement de la plante. L'infection systémique des plantules de haricot peut entraver la croissance des plants de haricot et diminuer leur vigueur (Figure 3A, Figure 3B) (Hsieh et al., 2006).

La décoloration de la semence est également un symptôme commun du flétrissement bactérien de haricot. Souvent, les gousses apparaissent saines mais la semence se décolore par une couleur jaune, orange ou pourpre selon la variante de *Cff* responsable de l'infection (Figure 3C). Le pathogène forme une couche bactérienne épaisse sous le tégument de la semence et les pigments produits par les différentes variantes de la bactérie sont responsables de la décoloration des semences (Figure 3D, Figure 3E). En outre, le flétrissement bactérien conduit à une réduction de la taille de la graine (Hall, 1994 ; Schwartz et al., 2005).

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

- **Plantes hôtes**

Les plantes hôtes principales de la bactérie sont les espèces appartenant au genre *Phaseolus* comme *Phaseolus coccineus* (runner bean), *Phaseolus lunatus* (lima bean), *Phaseolus vulgaris* (common bean) mais le pathogène peut aussi infecter beaucoup d'autres espèces de la famille des *Fabaceae* telles que *Glycine max* (le soja), *Lablab purpureus* (hyacinthe bean), *Vigna angularis* (adzuki bean), *Vigna radiata* (mung bean), *Vigna unguiculata* (cowpea), *Zornia* et des plantes spontanées comme *Ipomoea* (morning glory) (Harveson et Schwartz, 2007 ; Huang et al., 2009).

- **Epidémiologie**

La semence de haricot infectée constitue la source principale pour la dissémination de la maladie à de courtes et longues distances (Tegli et al., 2002).

Hsieh et ses coll. (2006), ont prouvé que le degré de décoloration de la semence est étroitement lié aux dégâts du flétrissement bactérien sur l'émergence des plantules, la hauteur des plantes ainsi que la sévérité et l'incidence de la maladie. Le pathogène peut survivre dans la semence sèche et infectée plus de 24 ans. Une fois introduite en plein champ, la bactérie peut survivre dans les débris végétaux au moins 10 mois et jusqu'à deux hivers consécutifs (Burkholder, 1945 In: Huang et al., 2009).

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* est incapable d'infecter les plantes via les stomates, elle ne devient systémique que lorsqu'elle est introduite dans le système vasculaire. Il s'est avéré que les blessures des plantes sont essentielles pour l'infection des plants sains par la bactérie (Dinesen, 1980).

Pour cela, le flétrissement bactérien est plus important et se dissémine plus rapidement dans les champs de haricot endommagés par la grêle. Il est spéculé que le nématode à galle *Meloidogyne incognita* joue également un rôle dans la transmission de la bactérie (Hayward et Waterson 1965).

Cependant, Salgado et ses coll. (2007) n'ont pas pu prouver clairement que *Meloidogyne incognita* agit comme vecteur de la bactérie et n'ont pas détecté le type d'interaction existant entre *Cff* et *M. incognita* sur des cultivars de haricot résistants et susceptibles à ce nématode.

Chapitre 1: Synthèse bibliographique

- **Méthodes de lutte contre la maladie du flétrissement bactérien**

La lutte contre la maladie du flétrissement bactérien est difficile à gérer du fait qu'il s'agit d'une bactérie transmise par semence. Le contrôle de cette maladie est essentiellement basé sur l'utilisation de variétés de haricot résistantes au *Cff*. La rotation culturale et l'utilisation de la semence indemne et saine sont préconisées comme des méthodes préventives culturales afin de réduire les probabilités d'attaque par cet organisme de quarantaine (Maringoni et Camara, 2006 ; Herbes et *al.*, 2008). Comme il n'existe pas des produits commerciaux pour la lutte chimique, le seul moyen pour diminuer les dégâts de la maladie après son apparition en plein champ est l'élimination des plants infectés par incinération (Romero, 2005).

D'autres méthodes telles que la lutte biologique peuvent avoir un effet potentiel dans la gestion du flétrissement bactérien. Ces stratégies consistent en l'utilisation des rhizobactéries promotrices de la croissance (PGPR). A titre d'exemple, il a été démontré que le traitement de la semence par la bactérie *Pantoea agglomerans* réduit l'incidence et la sévérité de la maladie et permet de promouvoir la croissance des plantules de haricot (Hsieh et *al.*, 2005).

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

La présente étude est constituée de trois parties: la première a pour objectif de déterminer les caractéristiques biochimiques et physiologiques d'une bactérie endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* isolée d'une plante spontanée *Euphorbia helioscopia* (*Euphorbiaceae*), par la réalisation d'un ensemble de tests. La deuxième partie est consacrée à l'analyse de la production de certains métabolites secondaires impliqués dans la promotion de la croissance végétale par la souche endophytique. Alors que la troisième partie s'intéresse à l'évaluation du pouvoir pathogène de la souche bactérienne.

1. Matériel biologique

La souche bactérienne utilisée dans la présente étude appartient à la collection du laboratoire de bactériologie (Département de biotechnologie végétale de l'université de Blida). Cette souche a été isolée à partir des tissus internes d'une plante spontanée *Euphorbia helioscopia* lors d'une étude sur les bactéries endophytes des plantes spontanées (Smain et Khodja, 2010).

Cette bactérie endophyte a été ensuite identifiée par voie moléculaire, par séquençage de l'ADN ribosomal 16S (Krimi et al., 2012). Les résultats de l'analyse moléculaire ont révélé l'appartenance de cette souche bactérienne à l'espèce *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Sachant que cette souche était la seule à être identifiée parmi la collection des bactéries endophytes déjà isolées à savoir *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp., genres qui sont largement décrits parmi les endophytes, nous avons jugé utile d'étudier cette espèce par rapport à des aspects biologiques dans lesquels elle pourrait être impliquée.

2. Purification de la souche endophyte

La souche a été conservée à 4°C au laboratoire sur milieu gélosé incliné. Nous avons procédé à sa purification, cette étape constitue une opération nécessaire afin de s'assurer de la pureté des souches bactériennes. La méthode consiste à faire des étalements par épaissements sectoriels de la culture bactérienne à l'aide d'une anse stérile à raison de 3 secteurs par boîte contenant le milieu NBY (Nutrient Broth Yeast extract) suivis d'une étape d'incubation à 27°C.

Sur le milieu NBY, la croissance de la bactérie testée est lente, petite (1-4mm). Les colonies sont de couleur orange, circulaires, lisses, légèrement convexes, brillantes et semi-opaques (Figure 4).

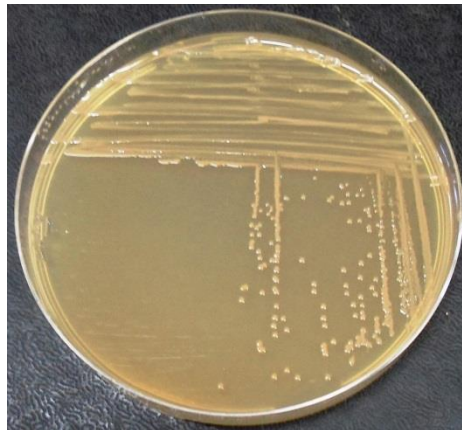


Figure 4: Croissance de la souche bactérienne testée sur milieu NBY.

3. Détermination des caractéristiques biochimiques et physiologiques de la bactérie endophyte

3.1. Recherche de l'activité catalase

Le test catalase sert à déterminer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'oxygène (H_2O_2). Sur une lame, une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. La souche bactérienne âgée de 48 h est déposée dans la solution de peroxyde d'hydrogène. Après 2 minutes, la présence de bulles révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive (Nelson et George, 1995).

3.2. Recherche de l'activité estérase (hydrolyse de tween 80, tween 20)

L'estérase est une activité enzymatique du groupe des hydrolases qui catalyse les liaisons ester entre un alcool ou un phénol et un acide. Le test d'activité d'estérase (hydrolyse de tween 80 et tween 20) est réalisé sur un milieu peptoné additionné après autoclavage du tween 80 ou du tween 20 stérilisé à froid par filtration à raison de 10ml. Des cultures bactériennes âgées de 48 heures sont ensemencées en spot dans des boîtes de Pétri qui sont ensuite incubées à 28°C pendant sept jours. La réaction positive se traduit par l'apparition d'une zone opaque autour des colonies bactériennes ; l'indice enzymatique est ensuite calculé en divisant le diamètre du halo par le diamètre de la colonie bactérienne (Sierra et *al.*, 1957).

3.3. Tolérance à une gamme de pH

La tolérance de la souche bactérienne aux différents pH (5, 6, 7, 8, 9) est testée sur le milieu LB solide. Le pH acide est ajusté au HCl tandis que le pH alcalin est ajusté par le NaOH. Une colonie bactérienne issue d'une culture fraîche estensemencée dans les boites de Pétri contenant le milieu LB, puis incubée à 28°C pendant 48h. Un résultat est considéré comme positif, si une croissance bactérienne est répertoriée au pH du milieu de culture (Pyar et *al.*, 2013).

3.4. Tolérance à la salinité

La tolérance à la salinité de la souche endophyte étudiée a été vérifiée par deux méthodes, à savoir, la mesure du poids sec de la culture bactérienne et par la détermination de la densité optique.

3.4.1. Tolérance à la salinité par mesure du poids sec

Dans des bouteilles de Roux de contenance 500ml, un volume de 100ml de milieu LB solide composé des concentrations progressives de NaCl (g/l): 0, 15, 30, 45, 75, 100, 200, 300 est coulé. Après solidification du milieu, la bactérie estensemencée dans les différentes bouteilles aux différentes concentrations en NaCl afin de déterminer sa croissance et ensuite sa tolérance à la salinité.

Chaque bouteille estensemencée par 50µl de suspension bactérienne suivie par une période d'incubation. Trois répétitions ont été maintenues pour chaque concentration.

Après cette période d'incubation, un volume d'eau distillée stérile est ajouté à l'aide d'une micropipette à embouts stériles puis étalé sur toute la surface du milieu par utilisation de billes stériles afin de répartir d'une manière homogène les bactéries sur toute la surface du milieu de culture. Les flacons sont ensuite incubés pendant 72h à 27°C pour permettre une production en masse de la bactérie dans le milieu clos qu'est la bouteille de Roux.

A la fin, la masse bactérienne produite est filtrée par utilisation du papier whatman n°1 stérile pendant 24h sous une hotte à flux laminaire et le poids sec pour chaque concentration est ensuite mesuré.

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

3.4.2. Tolérance à la salinité par mesure de la densité optique

Une deuxième méthode est utilisée pour déterminer la tolérance de la souche bactérienne à la salinité. Le milieu LB liquide en tubes, ajusté avec des concentrations de NaCl (g/l) de 0, 15, 30, 45, 75, 100, 200, 300 est utilisé. Après ensemencement de la bactérie dans les bouillons liquides à différentes concentrations de NaCl, la croissance de la bactérie dans chaque tube est appréciée par la mesure de son absorbance à 620nm par un spectrophotomètre (Jenway 6405UV/Vis) toutes les 24h pendant 5 jours (Damodaran *et al.*, 2013).

3.5. Utilisation des hydrates de carbone comme seule source de carbone

L'oxydation des sucres conduit en aérobiose à la formation d'acide pyruvique qui entraîne l'acidification du milieu. Le test d'utilisation des hydrates de carbone est réalisé sur le milieu minéral de base additionné après autoclavage du sucre filtré à travers une membrane millipore (Millipore 45µm) (Roussos, 1977). Un total de 17 substrats organiques constituant l'unique source de carbone ont été testés à raison de 2g/l pour les sucres et 1g/l pour les acides aminés et les sucres d'alcool (Tableau 1).

Des cultures bactériennes âgées de 48 heures sont ensemencées par piqûre centrale dans des tubes à essais qui sont incubés à 28°C pendant quatorze jours. La réaction positive se traduit par un virage de la couleur du milieu du vert au jaune traduisant l'utilisation du sucre et la réduction du milieu.

Tableau 1: Les hydrates de carbones utilisés.

| Type du substrat organique | Substrats organiques |
|----------------------------|--|
| Sucres simples | glucose, fructose, mannose, arabinose |
| Diholosides | tréhalose, rhamnose, saccharose, lactose |
| Polyholosides | amidon |
| Sucres alcools | sorbitol, mannitol, inositol, arabitol, glycérol, méthanol |
| Acides aminés | Tryptophane, alanine |

4. Production des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes (PGP) par la souche endophyte

4.1. Estimation de la production de l'acide indole acétique (AIA)

La production d'IAA est déterminée selon la méthode standard (Bric *et al.*, 1991). Une colonie issue d'une culture fraîche est étalée sur gélose Luria-Bertani enrichie de tryptophane. La gélose est recouverte de papier Whatman n°1 préalablement stérilisée à l'autoclave à 110°C pendant 20min. La culture est incubée à 28°C pendant 4 jours. Le papier est récupéré puis traité avec le réactif de Salkowski. Le témoin positif est représenté par une souche de *Pseudomonas* sp. productrice d'AIA.

La préparation du réactif de Salkowski est opérée sous une hotte chimique réservée pour la manipulation des produits chimiques en mélangeant 2% de FeCl₃ à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique.

Les disques de papier filtre sont placés dans une boîte de Pétri contenant le réactif pendant 10 à 30 min. La production d'AIA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose rouge autour des colonies bactériennes.

4.2. Solubilisation de phosphore

La solubilisation de phosphore par la souche bactérienne a été évaluée par sa capacité de solubiliser le phosphate inorganique. Le milieu Pikovskaya PVK bicalcique solide de bleu de bromophénol a été utilisé dans cet essai (Pikovskaya, 1948). Un frottis bactérien issu d'une culture bactérienne fraîche est repiqué dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PVK à raison de trois répétitions par boîte. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 4 à 5 jours. L'apparition d'une zone claire autour de la colonie bactérienne indique la solubilisation de phosphore par la souche bactérienne et l'indice de solubilisation est ensuite calculé par le rapport du diamètre total (halo + colonie) et le diamètre de la colonie (Edi-Premono *et al.*, 1996).

4.3. Production de l'acide cyanhydrique (HCN)

La production d'HCN a été évaluée en utilisant la méthode de Kloepper *et al.* (1991) avec quelques modifications. Sur un milieu LB additionnée de 4.4g/l de glycine, l'isolat bactérien estensemencé par stries, un disque de papier Whatman n°1 saturé en picrate alcalin (2.5g acide picrique + 12.5g Na₂CO₃/l) est déposé dans les couvercles des boîtes, ces dernières sont scellées au parafilm et incubées inversées à 28°C pendant 4 jours. Le virage de

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

la couleur du jaune vers le brun clair au rouge brun indique respectivement une production modérée et élevée d'HCN par la bactérie productrice. Le témoin négatif est représenté par une boîte de Pétri sans inoculum tandis que le témoin positif est représenté par une souche de *Pseudomonas* sp. productrice d'HCN.

4.4. Production d'antibiotiques de nature phénazinique

La production des phénazines *in vitro* a été recherchée sur milieu solide NBY (Nutrient Broth Yeast extract) additionné de glucose à 2% (James et Gutterson, 1986). Des colonies bactériennes issues d'une culture fraîche sont ensemencées en stries puis incubées à 28°C pendant 48h. Le témoin positif est représenté par une souche de *Pseudomonas* sp.

La production d'antibiotiques de nature phénazinique se manifeste par des colonies pigmentées sur milieu NBY qui, lorsqu'elles sont examinées sous UV à 365nm, révèlent des zones sombres autour des colonies produisant des phénazines (Thomashow et Weller, 1988).

4.5. Production d'Ammonium(NH₃)

Pour la production d'Ammonium, nous avons suivi la méthode de Cappuccino et Sherman (1992). La bactérie est ensemencée en milieu liquide dans l'eau peptonée (Peptone-10g, NaCl-5g, eau distillée, 1litre) en tubes de 5 ml. Le témoin est représenté par un milieu en tubes sans inoculum. Les tubes sont ensuite incubés à 28°C pendant 72h, après trois jours, 1ml du réactif de Nessler est ajouté à chaque tube. La présence d'une couleur jaune claire indique une faible production d'Ammonium (+), une couleur jaune foncé (++) à marron (+++++) révèle une production élevée d'Ammonium (Ruchi et *al.*, 2012).

4.6. Sécrétion des enzymes hydrolytiques par la souche endophyte

4.6.1. Enzymes protéolytiques

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode de Smibert et Krieg (1994), par la mise en culture pendant deux jours d'incubation à 28°C de l'isolat bactérien sur gélose au lait écrémé. Le développement d'un halo autour des colonies indique une réaction positive (Naik et Sakthivel, 2006).

4.6.2. Hydrolyse de la gélatine

L'hydrolyse de la gélatine est déterminée selon la méthode décrite par Frazier (1926). Un milieu peptoné supplémenté de 0,2% de gélatine est utilisé pour tester le pouvoir

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

hydrolytique sur la gélatine. L'isolat est ensemencé en spot pendant 36h à 72h à 28°C. Les boîtes sont ensuite saturées par 20ml d'HgCl₂ (6%) dissout dans du HCl 1M pendant 15min. Le développement d'une zone claire autour des colonies indique une réaction positive. Trois répétitions ont été appliquées pour ce test.

4.6.3. L'hydrolyse de la caséine

L'activité caséinolytique est déterminée selon la méthode décrite par Frazier (1926). Un milieu peptoné supplémenté de 0,2% de caséine est utilisé pour tester le pouvoir hydrolytique de la caséine. L'isolat est ensemencé en spots pendant 36h -72h et incubé à 28°C. L'apparition d'une zone claire autour des colonies indique une réaction positive. Trois répétitions ont été réalisées.

4.6.4. Production d'amylase

L'isolat bactérien a été ensemencé en spot sur un milieu amidon et incubée à 28°C pendant 48h. À la fin de la période d'incubation, les boîtes de Pétri sont saturée d'une solution d'iode pendant une minute. L'iode réagit avec l'amidon en formant un composé d'une couleur bleue. Cette couleur bleue disparaît rapidement. Par conséquent, l'apparition d'un halo clair autour des colonies bactériennes indique la production de l'amylase par la bactérie à tester (Malleswari et Bagyanarayana, 2013).

4.6.5. Production de pectinase

La production de pectinase est déterminée selon la méthode décrite par Cattelan et *al.* (1999). La gélose M9 (Miller, 1974) supplémentée de 10g de pectine et 1.2g d'extrait de levure, est utilisée pour tester le pouvoir hydrolytique par production de pectinase. L'isolat est ensemencé en spot pendant 48h à 28°C. Les boîtes sont ensuite saturées par du HCl₂ et le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive.

5. Tests de pathogénicité de la bactérie endophyte

5.1. Test d'hypersensibilité sur tabac (*Nicotiana tabacum*)

Le test d'hypersensibilité sur tabac met en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement des zones inoculées sur les feuilles de tabac.

Dans un tube à essai contenant de l'eau distillée stérile (2 ml), une suspension bactérienne concentrée de 10⁸ CFU/ml correspondant à une densité optique de 0.3 a été préparée à partir d'une culture bactérienne âgée de 48h (Yabuuchi et *al.*, 1999).

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

Les feuilles d'un plant du tabac *Nicotiana tabacum* var. White burley au stade 5 feuilles sont infiltrées par injection sous épidermique d'une suspension bactérienne à l'aide d'une seringue stérile de 1ml. Le témoin négatif consiste à injecter de l'eau distillée stérile au niveau du limbe foliaire (Figure 5).



Figure 5: Infiltration sous épidermique d'une feuille de tabac (*Nicotiana tabacum* var. White Burley) par la suspension bactérienne.

La lecture des résultats est effectuée une semaine après inoculation, un résultat positif se traduit par la présence d'une zone nécrotique mettant en évidence ainsi le pouvoir pathogène de la bactérie testée (Yabuuchi et *al.*, 1999).

5.2. Test du pouvoir pathogène sur plantes hôtes

5.2. 1. Matériel végétal

Dans le but d'évaluer le pouvoir pathogène de la souche endophyte, nous avons choisi trois variétés de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) à savoir ; Coco rose, El djadida et Cotender. Les semences de cette espèce ont été récoltées en 2013 et gracieusement fournies par un agriculteur de la wilaya de Sétif.

5.2. 2. Stérilisation du substrat du sol

Pour le semis, le substrat utilisé est un mélange de 2/3 de terre récupérée au niveau de la station expérimentale et 1/3 de tourbe. La stérilisation du substrat a été réalisée selon la méthode de Rapilly (1986), qui consiste à stériliser le sol à deux reprises pendant une période d'une heure à 250°C à un intervalle de temps de 24h.

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

Le substrat est ensuite distribué dans des alvéoles en plastique à raison de 100 g de sol par alvéole. Les alvéoles sont munies d'un orifice de drainage et de percolation de la solution d'arrosage en cas d'excès.

5.2. 3. Désinfection de la semence et production des plants à inoculer

Les semences de haricot ont été désinfectées dans une solution d'eau distillée stérile et d'environ 2 à 3ml d'hypochlorite de calcium à 2%. La désinfection est suivie par trois rinçages successifs avec de l'eau distillée stérile et les semences sont ensuite séchées sur papier filtre stérile entre deux becs Bunsën.

Le semis des trois variétés de haricot a été mené sous serre avec une photopériode d'environ 16h de lumière et 8h d'obscurité et une température de 27 à 30°C. L'irrigation des plantes de haricot a été réalisée à l'eau de robinet stérile suivant les besoins des plantes et en menant un niveau adéquat d'humidité du sol.

5.2. 4. Préparation des suspensions bactériennes et mesure de la densité optique nécessaire pour la réalisation du test de pouvoir pathogène

De très nombreuses techniques permettent de mesurer la biomasse d'une suspension bactérienne. La mesure de la densité optique est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600 nm (une longueur pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaire est la plus faible). D'une manière générale, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire.

La suspension de la souche bactérienne a été préparée à partir d'une culture préalablement purifiée. La bactérie à tester a été ensemencée sur milieu NBY, suivie d'une étape d'incubation à 27°C (Vidaver, 1967).

Sous une hotte à flux laminaire et dans des conditions aseptiques, nous avons préparé la suspension de la souche bactérienne en raclant à l'aide d'une anse stérile, une culture bactérienne âgée de 48h. Après agitation et à l'aide d'un spectrophotomètre (Prolabo, Paris), nous avons effectué la lecture de la densité optique de la suspension bactérienne à une longueur d'onde de 600 nm.

Selon la bibliographie, afin de déterminer le pouvoir pathogène, la densité optique nécessaire pour des inoculations *in planta* de *Curtobacterium flaccumfaciens* devrait être de 10^8 CFU/ml.

5.2. 5. Inoculation des plantules de haricot par la bactérie endophyte

Pour l'inoculation des plants de haricot, nous avons suivi deux méthodes d'inoculation ; la première consiste en une pulvérisation de la plante entière par la suspension

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

bactérienne alors que la deuxième méthode est une injection de l'inoculum *via* le système vasculaire.

Les plantules à inoculer sont âgées de deux semaines avec deux à trois vraies feuilles et une longueur d'environ 12 cm.

- **Inoculation par voie foliaire**

Avant la mise en place des différents traitements, la mini-serre utilisée est désinfectée par de l'eau de javel à 12° et de l'eau distillée stérile et la température est réglée à 27°C.

Après la mise en place des plants à inoculer, une pulvérisation abondante avec de l'eau distillée stérile est effectuée afin de créer un microclimat humide à l'intérieur de l'enceinte de la mini-serre (atteindre une humidité relative de 80%) et permettre une ouverture intense des stomates des feuilles.

Les plants de haricot sont ensuite pulvérisés avec la suspension bactérienne et maintenus dans la mini-serre pendant deux jours pour assurer une bonne pénétration de l'inoculum à travers les feuilles par le biais des stomates, s'ouvrant à une humidité relative élevée et une atmosphère saturée en eau.

Les plants inoculés avec la bactérie endophyte et le témoin négatif pulvérisé avec de l'eau distillée stérile sont ensuite menés sous serre selon un dispositif expérimental en blocs aléatoires complets avec plusieurs traitements. Neuf répétitions ont été retenues pour chaque traitement.

- **Inoculation par voie systémique**

Concernant cette deuxième méthode d'inoculation, les plants de haricot des trois variétés sont directement injectés par un volume de la suspension bactérienne à l'aide d'une seringue stérile. Le point d'inoculation est pratiqué au niveau de la tige selon 2 à 3 points d'injection espacés d'un centimètre. Les points d'inoculation sont ensuite recouverts avec du papier aluminium pour éviter la déshydratation de l'inoculum.

Le témoin négatif est injecté par de l'eau distillée stérile. Les différents traitements sont ensuite menés sous serre selon un dispositif expérimental en blocs aléatoire complets dont neuf répétitions ont été maintenues pour chaque traitement.

5.2.6. Lecture des résultats

La lecture des résultats et l'observation des symptômes sur les plants inoculés sont faites après trois semaines de l'inoculation pour les deux méthodes (pulvérisation foliaire et vasculaire). Une réaction positive se traduit par l'apparition des symptômes de la maladie par comparaison au témoin négatif. Les symptômes typiques de la maladie est un flétrissement des plantules et des lésions nécrotiques sur feuilles.

Chapitre 3: Résultats et Interprétations

1. Caractéristiques biochimiques et physiologiques de la souche endophyte

1.1. Activité catalase

L'absence des bulles lors du test, indique que la bactérie est catalase négative et elle est incapable de décomposer l' H_2O_2 pour produire de l'oxygène O_2 (Figure 6).

1.2. Activité estérase (hydrolyse de tween 80, tween 20)

L'ensemencement de la bactérie endophyte sur un milieu supplémenté au tween 20 ou tween 80 montre que la bactérie est incapable d'hydrolyser le tween 80 ni le tween 20. Cela est révélé par absence d'halo opaque autour des colonies bactériennes (Figure 6).

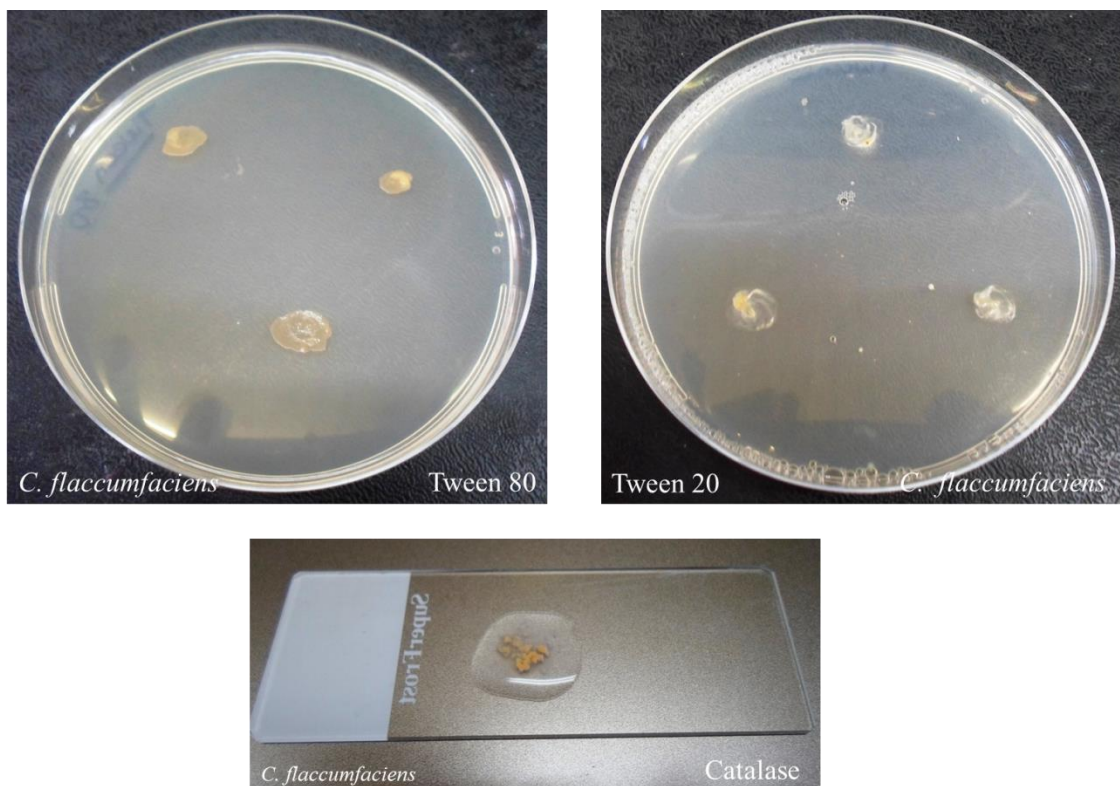


Figure 6: Résultats des tests d'activité catalase et de l'activité estérase chez la bactérie endophyte *C. flaccumfaciens*.

1.3. Tolérance à une gamme de pH

L'effet du pH sur la croissance de la souche bactérienne a révélé que celle-ci se comporte de manière différente vis-à-vis du pH du milieu de culture. En effet, la bactérie endophyte tolère des pH allant de 5 à 9 et la meilleure croissance bactérienne est observée à pH 6 et pH 7. La croissance de la bactérie n'est pas complètement inhibée à pH acide (pH 5) ou à des pH alcalins (pH 8, pH 9) mais elle est moins importante comparée au deux autres pH (pH 7 et pH 6) (Figure 7).

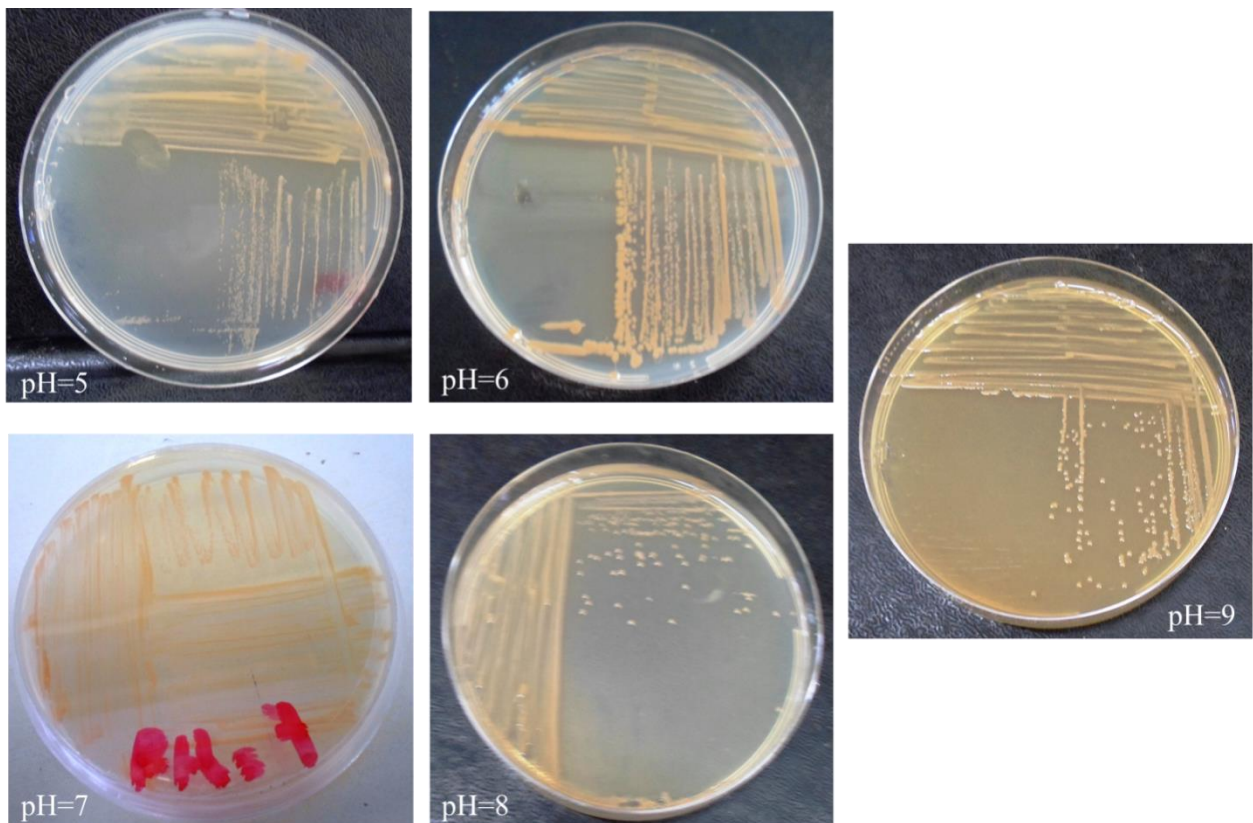


Figure 7: Tolérance de la souche bactérienne à différents pH.

1.4. Tolérance à la salinité

1.4. 1. Tolérance à la salinité par mesure du poids sec

La souche bactérienne tolère des concentrations de sel considérables. Le test de la tolérance à la salinité par l'isolat révèle que la bactérie endophyte croît normalement sur un milieu contenant des concentrations de NaCl de 15 à 100 g/L (Figure 8). Néanmoins, le meilleur développement (7,19g du poids sec) est obtenu sur un milieu contenant 15 g/L de NaCl. La tolérance à la salinité est démontrée quant à elle par le développement de la souche (3,38g du poids sec) sur un milieu composé entre autre de 100 g/L de NaCl. Cependant, la

Chapitre 4: Résultats et Interprétations

bactérie endophytique peut croître sur un milieu qui ne contient pas de NaCl (8,89g du poids sec). Tandis qu'à 200 et 300g/l, l'isolat bactérien est incapable de se développer (0g du poids sec) (Figure 9).

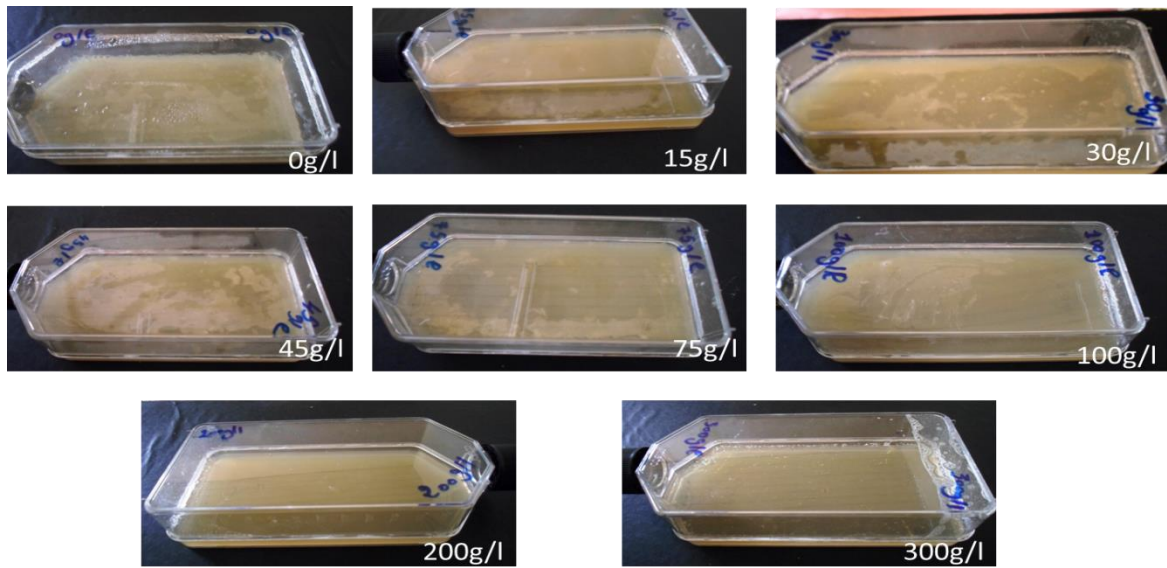


Figure 8: Croissance de l'isolat bactérien à différentes concentration de sel.

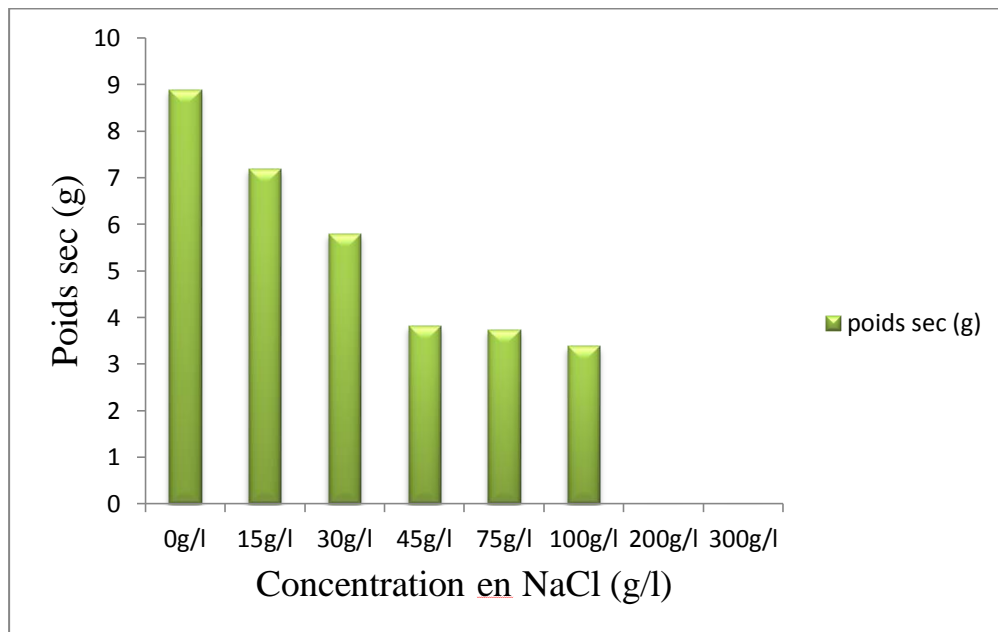


Figure 9: Poids sec de l'isolat bactérien à différentes concentrations de sel.

1.4. 2. Tolérance à la salinité par mesure de la densité optique

La capacité de la bactérie à croître dans un milieu salin est testée sur un milieu LB liquide avec différentes concentrations de NaCl par mesure de la densité optique à 620nm. Les résultats obtenus révèlent que la bactérie endophytique supporte des concentrations de sel

élevées arrivant à 100g/l. La meilleure croissance bactérienne est enregistrée avec une concentration en sel de 15g/l, alors qu'un développement très faible est noté avec 200 g/l et 300 g/l de sel (Figure 10).

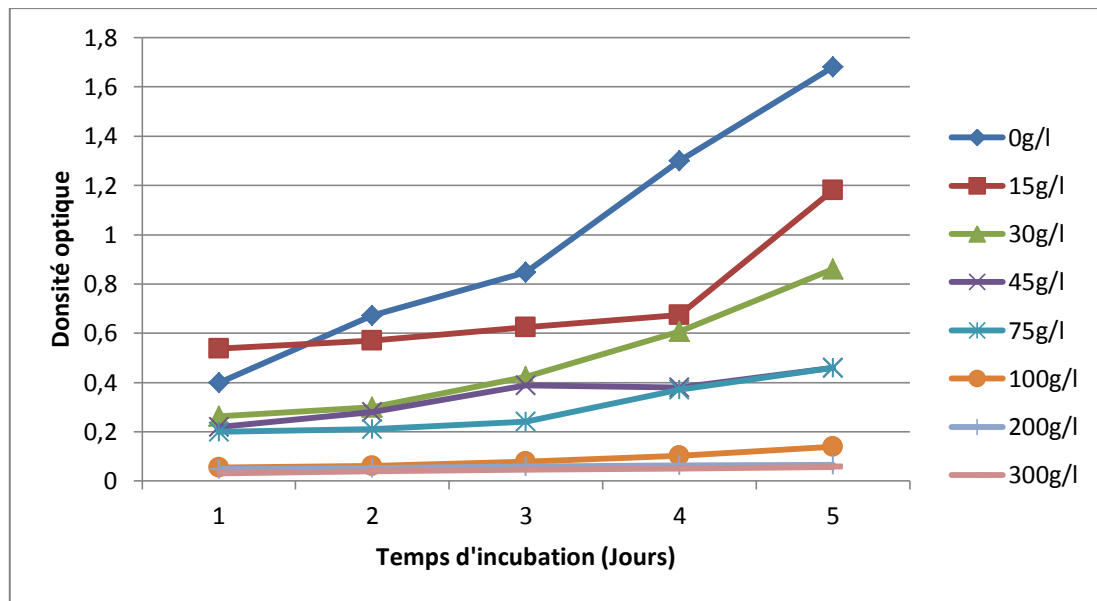


Figure 10: Effet de différentes concentrations de NaCl sur la croissance de la souche bactérienne *C. flaccumfaciens*.

1.5. Utilisation des hydrates de carbone comme seule source de carbone

Le but principal du test d'utilisation des hydrates de carbone est d'étudier la capacité de la bactérie endophyte d'utiliser les différents substrats carbonés comme seule source de carbone. Le milieu de base rouge phénol est employé comme indicateur pour différencier la bactérie selon son profil d'utilisation des hydrates de carbone.

Un résultat positif (utilisation des substrats carboné) est révélé par un changement de couleur du bleu vers le jaune suite à une acidification du milieu tandis que la couleur bleu du milieu indique un résultat négatif (Figure 11).

Chapitre 4: Résultats et Interprétations

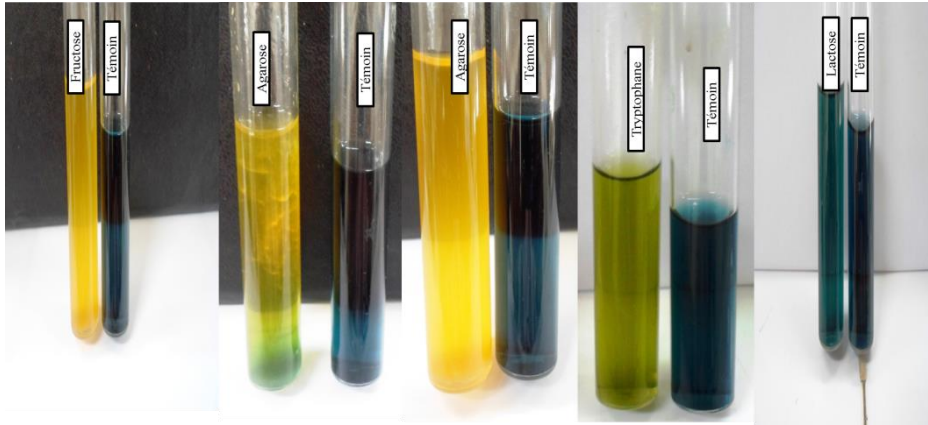


Figure 11: Exemple d'utilisation des hydrates de carbone par la bactérie endophyte *C. flaccumfaciens*.

Le tableau 2 montre que la bactérie est capable d'utiliser trois sucres simples (le fructose, le glucose, le mannose), un sucre diholoside (le saccharose), l'amidon, et deux sucres alcools (inositol, glycérol). Tandis qu'elle a présenté un résultat négatif pour les autres sucres (l'arabinose, le tréhalose, le rhamnose, le lactose, le mannitol, le sorbitol, l'arabitol et le méthanol).

Nous avons constaté que la souche endophyte utilise apparemment tous les sucres simples à l'exception de l'arabinose et elle est incapable d'utiliser les sucres alcools sauf pour l'inositol et le glycérol.

Tableau 2: Utilisation des différents hydrates de carbone comme seul source de carbone par la bactérie endophyte *C. flaccumfaciens*.

| Type du substrat organique | Hydrate de carbone | Réaction |
|----------------------------|------------------------|----------|
| Sucres simples | β -D(-) Fructose | + |
| | Glucose | + |
| | D(-) Arabinose | - |
| | Mannose | + |
| Diholosides | L(-) Tréhalose | - |
| | Rhamnose | - |
| | Saccharose | - |
| | Lactose | - |
| Polyholosides | amidon | + |
| | D(-) Mannitol | - |

Chapitre 4: Résultats et Interprétations

| | | |
|----------------|------------------|---|
| Sucres alcools | L- Sorbitol | - |
| | Inositol | + |
| | L(-) Arabitol | - |
| | Méthanol | - |
| | Glycérol | + |
| Acides aminés | L- Tryptophane | + |
| | β -Alanine | - |

2. Production des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance (PGP) par la souche endophyte

2.1. Estimation de la production de l'acide indole acétique (AIA)

Le test de la production de l'acide indole acétique (AIA) révèle que la bactérie endophyte n'est pas capable de produire ce type de régulateur de croissance. La souche bactérienne n'a développé aucune coloration après le traitement du papier filtre avec le réactif révélateur de Salkowski. Cependant, le témoin positif montre une coloration rouge après une période de 30min après addition du réactif (figure 12).

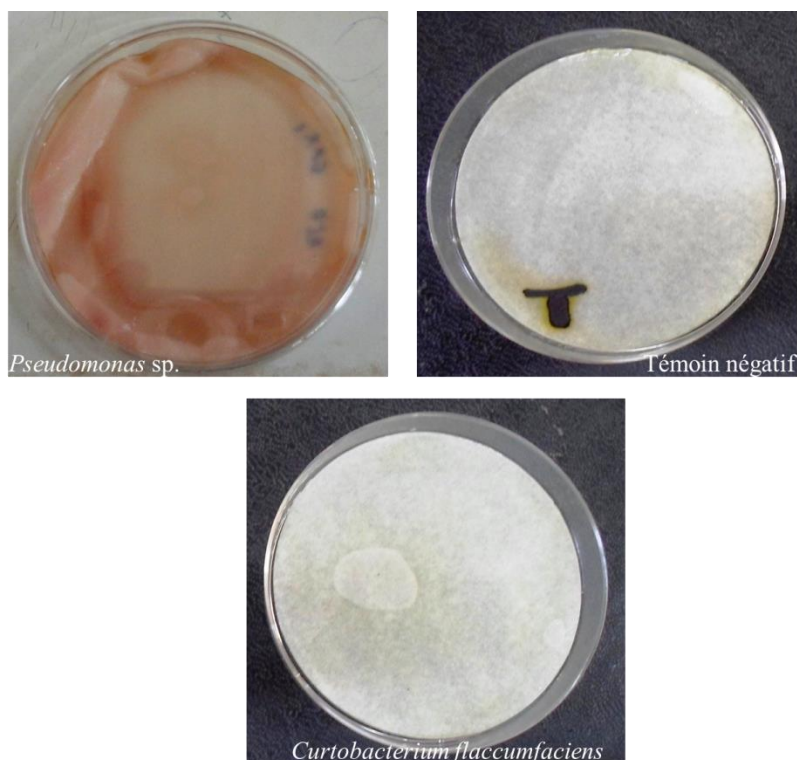


Figure 12: Résultats de l'estimation de la production de l'acide indole acétique (AIA).

2.2.Solubilisation de phosphore

Le test de solubilisation du phosphore montre que la bactérie endophyte testée est incapable de solubiliser le phosphore inorganique sous forme bicalcique. Aucun halo de solubilisation n'est observé autour des spots bactériens sur le milieu de culture de Pikovskaya (PVK) coloré au bleu de bromophénol (Figure 13).

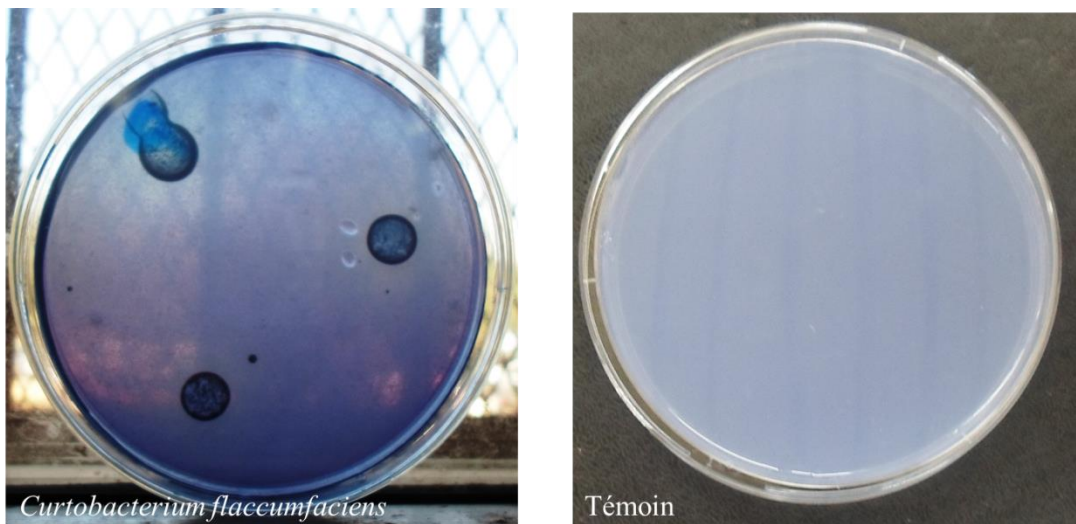


Figure 13: Test de solubilisation du phosphore par la bactérie endophyte sur milieu PVK.

2.3.Production de l'acide cyanhydrique (HCN)

La production d'HCN par la bactérie endophyte est testée sur un milieu additionné de la glycine, ce composé joue un rôle crucial dans la synthèse de l'HCN par les microorganismes. La souche endophytique s'est révélée incapable de produire l'HCN. Aucun changement de couleur n'a été observé sur le papier filtre imprégné de la solution alcaline contrairement au témoin positif où un virage de la couleur du jaune au marron est observé (Figure 14).

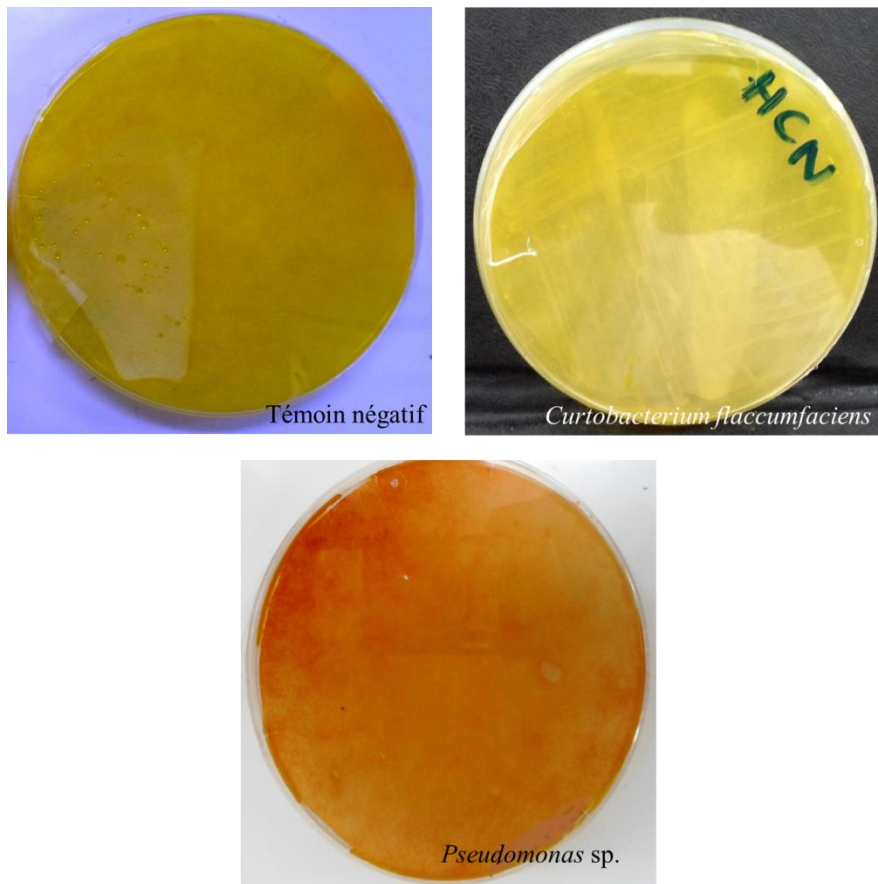


Figure 14: Résultat du test de production d'HCN par la bactérie endophyte.

2.4. Production d'antibiotique de nature phénazinique

L'essai de la production des phénazines *in vitro* a montré que la bactérie endophyte testée est incapable de synthétiser cet antibiotique qui intervient lors des actions antagonistes vis-à-vis des microorganismes phytopathogènes (Figure 15).

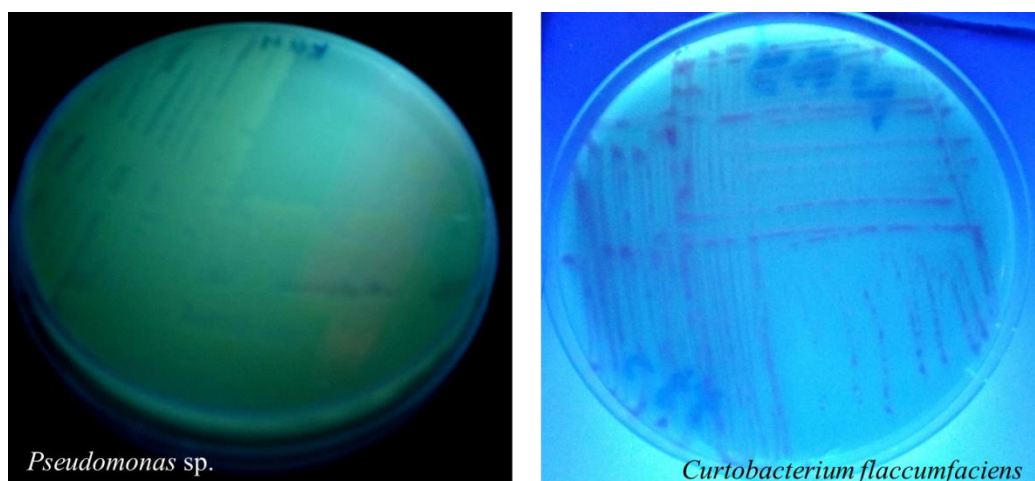


Figure 15: Résultat du test de production des phénazines sur milieu NBY.

2.5. Production d'Ammoniac (NH_3)

La production d'Ammoniac est révélée par l'addition de réactif de Nessler à une culture bactérienneensemencée dans une eau peptoné. La bactérie endophyte montre une production d'Ammoniac très importante, la couleur du milieu a viré vers le marron (+++) après l'ajout du réactif (Figure 16).



Figure 16: Production d' NH_3 par la bactérie endophyte.

2.6. Production des enzymes hydrolytiques

2.6.1. Enzymes protéolytiques

L'activité protéolytique est testée sur un milieu au lait écrémé. La souche endophytique a montré une réaction positive dans la dégradation des protéines par production des enzymes protéases. Un halo de 19mm est observé autour de la colonie bactérienne (Figure 17A).

2.6.2. Hydrolyse de la gélatine

L'hydrolyse de la gélatine est révélée par l'addition du HgCl_2 à une culture bactérienneensemencée et incubée pendant 72h. La bactérie endophyte n'est pas capable d'hydrolyser la gélatine en milieu de culture. Aucun halo transparent n'est observé autour des colonies bactériennes (Figure 17B).

2.6.3. L'hydrolyse de la caséine

Le pouvoir hydrolytique de la caséine est testé sur un milieu gélosé additionné à la caséine. La souche endophytique est capable d'hydrolyser ce type de protéines par production des enzymes caséinases. Un halo clair de 18mm est observé autour des colonies bactériennes (Figure 17C).

2.6.4. Production de pectinase

Sur une gélose M9 supplémentée de pectine, la bactérie endophyte a montré une réaction négative dans la production de l'enzyme pectinase. Aucun halo clair n'est observé autour des colonies bactériennes (Figure 17D).

2.6.5. Production d'amylase (hydrolyse d'amidon)

La solution d'iode est utilisée comme révélateur de la production de l'amylase par la bactérie endophyte. La bactérie endophyte s'est montrée capable d'hydrolyser l'amidon par production de l'enzyme amylase. Un halo de 3,2 mm est observé autour des colonies bactériennes (Figure 26E).

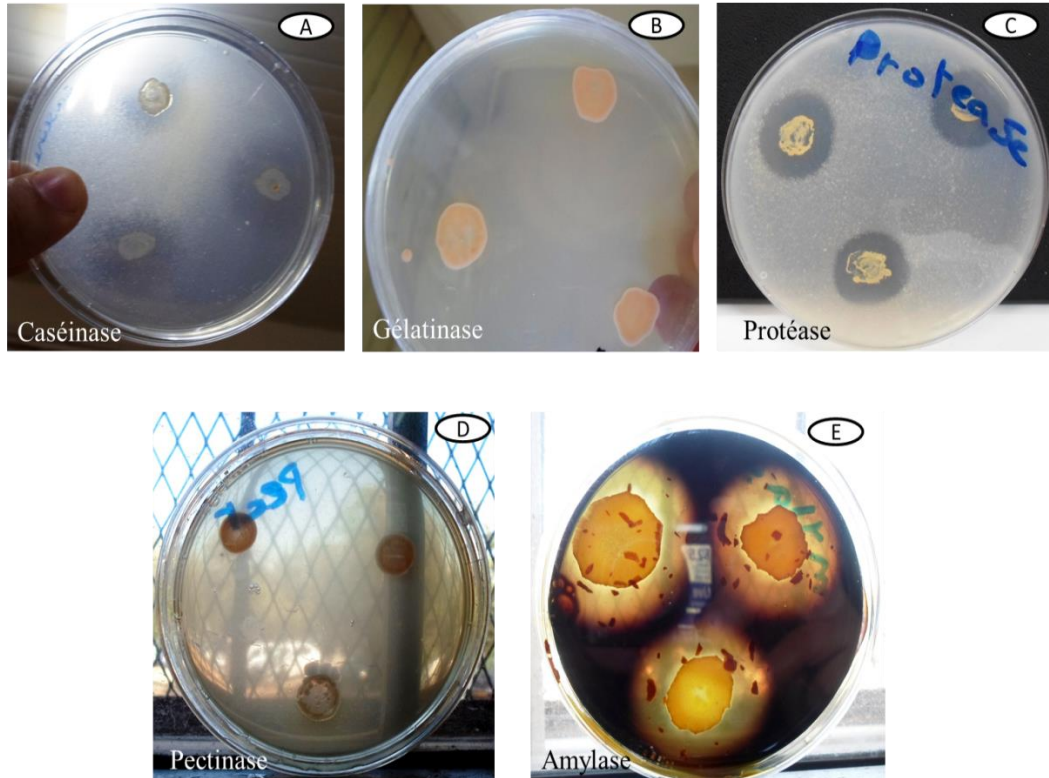


Figure 17: Production des enzymes hydrolytiques par la bactérie endophyte *C. flaccumfaciens*.

3. Pathogénicité de la bactérie endophyte *C. flaccumfaciens*

3.1. Hypersensibilité sur tabac (*Nicotiana tabacum*)

D'après les résultats obtenus, la bactérie endophyte répond positivement au test d'hypersensibilité sur tabac. Une chlorose est apparue après une semaine d'inoculation, ce symptôme se développe en une nécrose localisée après 15 jours d'inoculation de la suspension bactérienne (Figure 18).

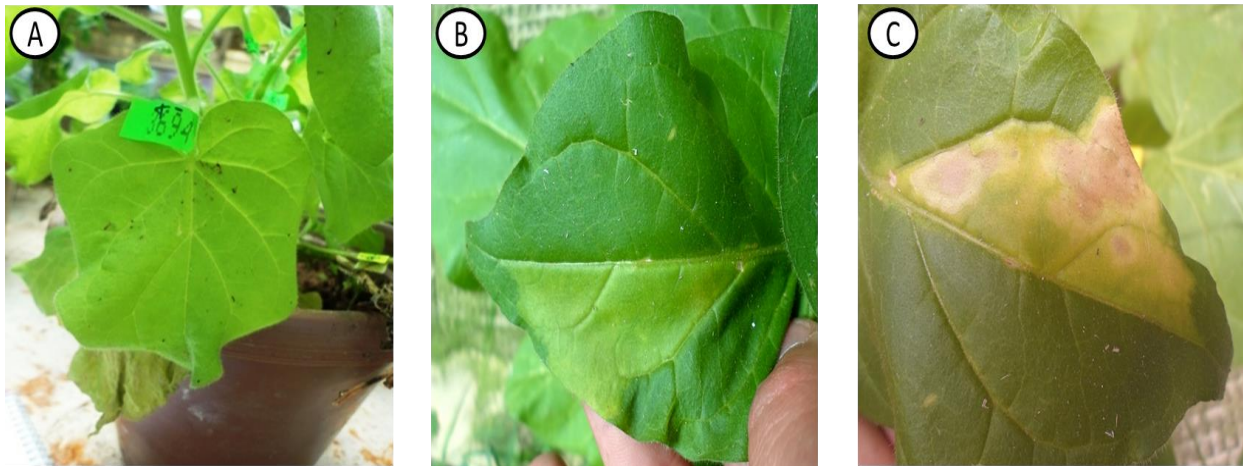


Figure 18: Réaction d'hyperdensité sur feuille de tabac inoculée par la bactérie endophyte *C. flaccumfaciens*.

A : Témoin négatif : feuille de tabac inoculée par de l'eau distillée stérile ; B : Jaunissement de la feuille de tabac après une semaine d'injection de la suspension bactérienne ; C : Développement d'une nécrose localisée dans la partie infiltrée par la souche bactérienne après 15 jours.

3.2. Test du pouvoir pathogène sur plante hôte

Les résultats symptomatologiques obtenus trois semaines après l'inoculation des trois variétés de plantules de haricot montrent un pouvoir pathogène de la souche bactérienne testée à l'égard du haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Figure 19, Figure 20, Figure 21).

Sur les feuilles de haricot inoculées par voie systémique ou par voie foliaire, nous avons observé un flétrissement, des chloroses marginales qui se développent vers toute la surface foliaire. Nous avons également noté un jaunissement des feuilles qui finissent par chuter, un enroulement des bordures et un rétrécissement du limbe foliaire avec diminution du nombre des feuilles par plantules. Nous avons relevé aussi, un dessèchement total de la plante qui se fane et finit par mourir. Sur les plants de haricot inoculés par voie systémique, nous avons observé des brunissements aux points d'inoculation et tout au long de la tige, ce qui mène à suggérer que la

Chapitre 4: Résultats et Interprétations

bactérie à envahit le tissu vasculaire et bloqué la circulation de la sève engendrant ainsi un flétrissement de la plante.

Le tableau 3 montre les principaux symptômes observés selon les variétés de haricot et la méthode d'inoculation.

Les symptômes observés sur les plantules de haricot inoculés par voie foliaire ou par voie systémique sont des symptômes typiques de ceux causés par *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* l'agent causal de la maladie du flétrissement bactérien du haricot.

L'expression des symptômes était plus intenses chez les deux variétés de haricot El djadida, et Cotender. Cela nous mène à déduire que la sévérité et l'incidence de la maladie diffère d'une variété à une autre et apparemment la variété Coco rose s'est avérée plus résistante.



Figure 19: Symptômes sur les plantules de haricot var. Coco rose après inoculation de *C. flaccumfaciens*.



Figure 20 : Symptômes sur les plantules de haricot var. El djadida après inoculation de *C. flaccumfaciens*.



Figure 21: Symptômes sur les plantules de haricot var. Cotender après inoculation de *C. flaccumfaciens*.

Chapitre 4: Résultats et Interprétations

Tableau 3: Principaux symptômes observés après inoculation par *C. flaccumfaciens* selon les variétés du haricot et la méthode d'inoculation.

| variété | Méthode d'inoculation | Description symptomatologique |
|------------|------------------------|--|
| Coco rose | Inoculation systémique | - Jaunissement et enroulement des feuilles ; - Brunissement des tiges ; - Réduction du nombre des feuilles par plants. |
| | Inoculation foliaire | - flétrissement des feuilles ; |
| El djadida | Inoculation systémique | - Chlorose marginale qui se développe vers toute la surface foliaire ; - enroulement des bordures des feuilles vers la face inférieure ; - Dessèchement total de la plante ; - Brunissement intense de la tige. |
| | Inoculation foliaire | - flétrissement des feuilles ; - Dessèchement et enroulement des feuilles. |
| Cotender | Inoculation systémique | - flétrissement et dessèchement des feuilles ; - rétrécissement du limbe foliaire ; - Apparition des poils sur la surface foliaire ; - brunissement de la tige. |
| | Inoculation foliaire | - flétrissement et nécrose marginal des feuilles ; - Dessèchement des feuilles basales ; - rétrécissement du limbe foliaire. |

Discussion

Les plantes sont constamment en interaction avec un grand nombre de microorganismes. La plupart de ces micro-organismes dérivent de la rhizosphère, entourant le système racinaire où des populations microbiennes sont en relation avec la plante (Hinsinger et Marschner, 2006). Certains de ces micro-organismes sont épiphytiques tandis que d'autres sont endophytes. Les bactéries endophytes peuvent être définies comme des bactéries qui colonisent les tissus internes de la plante ne montrant aucun signe visible d'une infection ou d'un effet négatif immédiat sur leur hôte (Schulz et Boyle, 2006).

Les bactéries endophytes colonisent une niche écologique similaire à celle colonisée par les microorganismes phytopathogènes mais sans engendrer des dommages pour leurs plantes hôtes. Cette niche écologique offre à ces bactéries une protection vis-à-vis des conditions de stress biotiques et abiotiques (Haggag, 2010).

Ces dernières années une attention considérable a été accordée à l'étude des microorganismes endophytes et leur interactions avec la plante hôte. L'intérêt de l'exploitation des bactéries endophytes est important vu leurs implications dans différents secteurs à savoir la production d'antibiotiques, la promotion de la croissance, les substances antimicrobiennes pour la protection végétale un autre intérêt est leur utilisation pour la phytoremédiation et la décontamination des sols.

Plusieurs genres bactériens ont été rapportés comme des bactéries endophytes des plantes cultivées et des plantes spontanées. Parmi ces genres bactériens, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Curtobacterium* ont été sujets à de nombreuses études visant à déterminer leurs capacités métaboliques et leurs diverses interactions avec les espèces végétales qui les hébergent.

Le but de notre travail est la caractérisation biochimique et physiologique d'une bactérie endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* isolée d'une plante spontanée *Euphorbia helioscopia* tout en tentant de mettre en évidence sa capacité à produire des métabolites secondaires impliqués dans la promotion de la croissance végétale ainsi que son pouvoir pathogène sur la plante hôte.

Une variété de méthodes est utilisée pour la différenciation des bactéries membre du genre *Curtobacterium* mais qui reste toujours limitée. La classification des pathovars de *Curtobacterium flaccumfaciens* repose essentiellement sur les propriétés physiologiques. Néanmoins, ces propriétés diffèrent d'une souche de *Curtobacterium flaccumfaciens* à une

Chapitre 4: Discussion

autre. Il existe des souches capables d'hydrolyser l'amidon, la gélatine, la caséine et le tween tandis que d'autres révèlent des réactions négatives (Behrendt et *al.*, 2002).

Les résultats de notre travail ont montré que la souche bactérienne testée est catalase négative, elle hydrolyse l'amidon, la caséine et présente une activité estérase (hydrolyse du tween 20 et tween 80) négative.

En raison des difficultés reconnues dans la caractérisation taxonomique, la plupart des souches isolées sont affiliées aux *Curtobacterium flaccumfaciens* sans pouvoir identifier la sous espèce ou le pathovar. L'évaluation de système d'identification Biolog par utilisation des 95 sources de carbone confirme la difficulté accordée lors de la distinction entre les pathovars en se basant sur les caractéristiques physiologiques (Harris-Baldwin et Gudmestad, 1996 ; Behrendt et *al.*, 2002).

Les sols salins et acides constituent un environnement défavorable pour la croissance des plantes et leurs bactéries endophytes. Contrairement à leurs hôtes, les bactéries endophytes peuvent tolérer et survivre dans des conditions de stress. En effet, la densité et la diversité des bactéries diminuent avec l'augmentation du pH et la salinité de sol qui jouent un rôle primordial dans la sélection et l'adaptation microbienne.

L'évaluation de la tolérance de la bactérie endophyte *C. flaccumfaciens* à une gamme de pH et à des concentrations en NaCl arrivant à 300g/l a montré que cette souche tolère des pH allant de 5 à 9. D'autre part, la souche *Curtobacterium flaccumfaciens* n'est pas une bactérie halotolérante. La meilleure croissance a été révélée dans un milieu sans sel mais selon Galinski, (1993) on peut la classer comme une bactérie halophile modérée capable de se développer d'une façon optimale à 15-100g/l de NaCl.

L'adaptation des bactéries aux fortes concentrations en sels est due à leur faculté de synthèse et d'accumulation intracellulaire des solutés compatibles. Ces solutés ont un rôle d'osmo-régulation et de protection des bactéries contre les effets de stress salin. Les principaux solutés rencontrés chez les bactéries sont: les ions K⁺, la glycine, la betaïne, la proline, le glutamate, divers glucides et le N-acetylglutaminyl-glutamine amide (Boncompagni et *al.*, 1999). Cependant, la tolérance à l'acidité est due à la capacité de la bactérie à maintenir le pH cytoplasmique inchangeable (Chen et *al.*, 1993).

Plusieurs études ont révélé une grande variabilité dans la tolérance à la salinité chez les bactéries endophytes. Damodaran et ses *coll.* (2013) ont démontré que des souches *Bacillus* sp. isolées des sols alcalins (pH 9,65) tolèrent à des concentrations très élevées en sel tout en possédant des potentialités dans la promotion de la croissance végétale.

Chapitre 4: Discussion

Les résultats d'une autre étude, indiquent que les bactéries endophytes des plantes spontanées halophytes tolèrent elles aussi la salinité. Ces bactéries endophytes ont exhibé des résultats positifs dans la production des enzymes amylase, catalase, ammonium et d'autres métabolites impliqués dans la promotion de la croissance (Arora et *al.*, 2014). Ces derniers résultats concordent avec les résultats de nos tests de recherche des enzymes de dégradation chez la souche endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* qui fait l'objet de cette étude. De plus, la survie des microorganismes dans des conditions de stress n'est possible que lorsque ils possèdent la capacité d'utiliser les sources disponibles sous des conditions appropriés (Madigan et *al.*, 1998).

Les résultats du test d'évaluation de l'utilisation des hydrates de carbone comme seule source de carbone par la bactérie endophyte montrent que cette souche utilise principalement les sucres simples et quelques sucres d'alcools et diholosides.

Les bactéries endophytes colonisent les espaces intracellulaires et les cellules des vaisseaux conducteurs de xylème qui forment ensemble l'apoplaste de la plante (Compant et *al.*, 2010). Les études biochimiques sur les nutriments existant dans l'apoplaste indiquent que cette niche contient des sucres, des alcools, des acides aminés, des acides organiques, des facteurs de croissance et des éléments nutritifs (Bacon et Hinton, 2006).

Plusieurs expérimentations ont été réalisées dans le but de déterminer les sources de carbone pouvant être importantes ou cruciales pour le développement endophytique (Krause et *al.*, 2011 ; Malfanova et *al.*, 2013).

Dans une étude récente, Malfanova et *ses coll.* (2013) ont montré que contrairement aux *Pseudomonas* spp. rhizosphériques, les souches endophytes de *Pseudomonas* isolées des plantules de concombre, étaient capables d'utiliser l'arabinose un des sucres les plus abondamment disponible dans le fluide du xylème de nombreuses plantes. Cette étude suggère que ce sucre peut être un facteur contribuant à l'établissement de la relation endophytique entre les *Pseudomonas* endophytes et leurs plantes hôtes.

Shishido et *ses coll.* (1999), ont comparé le profil d'oxydation du carbone de deux bactéries endophytes *Paenibacillus polymyxa* souche Pw-2R et *Pseudomonas fluorescens* souche Sm3-RN avec d'autres souches rhizosphériques, incapables de coloniser le sapin d'une façon endophyte, les résultats obtenus ont montré que les deux souches Pw-2R et Sm3-RN étaient capables de métaboliser le D-sorbitol et l'acide galacturonique alors que les autres souches rhizosphériques étaient incapables de le faire.

Chapitre 4: Discussion

Ces études montrent que la capacité des bactéries à utiliser certains métabolites végétaux tels que les sucres et les acides aminés pourrait être un préalable pour l'établissement de l'endophytisme (Malfanova et *al.*, 2013).

Les tests menés *in vitro* pour déterminer une éventuelle efficacité de la bactérie endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* dans la promotion de la croissance végétale et la lutte biologique par la production de plusieurs métabolites secondaires ont révélé que la souche endophyte était incapable de solubiliser le phosphore, de produire l'AIA, l'HCN et les antibiotiques de nature phénazinique. Cependant, cette souche a montré un résultat positif dans la production d'Ammoniac.

Les micro-organismes endophytes peuvent stimuler la croissance végétale et protéger la plante hôte par différents mécanismes y compris la sécrétion des hormones de croissance végétale tels que l'acide indole acétique (AIA) et les gibbérellines, la solubilisation du phosphore, la production des sidérophores, par la fixation d'azote, l'induction d'une résistance systémique ou par la production des antibiotiques. Ceci nous amène à conclure que la bactérie *Curtobacterium flaccumfaciens* que nous avons testé ne présente pas des capacités de promotion de croissance pour la plante hôte dont elle est issue en l'occurrence *Euphorbia helioscopia*.

Des résultats ont confirmé que la souche *Curtobacterium* possède la capacité de solubiliser le phosphore sous sa forme tricalcique aussi bien qu'elle tolère des taux très élevés de métaux lourds tels que l'uranium. Un tel résultat lui confère d'être un candidat intéressant pour son utilisation dans la phytoremédiation (Sowmya et *al.*, 2013).

Les endophytes ont été attribués à la production des métabolites diffusibles et volatils et leur présence dans les tissus de la plante peut influencer la production de ces métabolites volatils par la plante (Baysal et *al.*, 2008). Des études ont clairement démontré l'efficacité relative des endophytes dans la production des métabolites comme l'HCN qui sont impliqués dans la promotion de la croissance des plantes et la résistance systémique induite (Nandhini et *al.*, 2012).

Plusieurs autres études ont montré que *Curtobacterium flaccumfaciens* peut être utilisé comme agent de lutte biologique contre de nombreux organismes phytopathogènes, cette propriété antagoniste est accomplie soit par induction d'une résistance systémique induite ou par antibiose (Lacava et *al.*, 2004; Lacava et *al.*, 2007).

Un travail réalisé par Bulgari et *ses coll.* (2014) visant à la caractérisation du génome d'une souche de *Curtobacterium* isolée de la vigne a révélé la présence de multiples gènes

Chapitre 4: Discussion

codant pour des effets bénéfiques sur la plante tels que la nutrition minérale (solubilisation de phosphore et production des sidérophores), le développement végétal (synthèse de l'acide indole acétique AIA), la production des substances anti-stress (1-amino-cyclopropane-1-carboxylate désaminase [ACC] et l'activité catalase) ainsi que des substances intervenant dans la protection végétale (production des enzymes chitinase et des sidérophores). Les études sur cette bactérie visant à rechercher ces dernières activités et menées *in vitro* ont confirmé ces résultats ; cette souche a été capable de solubiliser le phosphore et produire l'AIA et a montré une activité catalase et ACC désaminase.

Les effets bénéfiques des bactéries endophytes peuvent être aussi exprimés par leur capacité à sécréter des enzymes lytiques. Les microorganismes ayant la capacité de produire ces enzymes jouent un rôle important en tant qu'agents de lutte biologique contre de nombreux bactéries et champignons phytopathogènes. C'est ainsi que nos résultats révèlent que la souche endophytique était incapable de synthétiser les enzymes pectinase et gélatinase et parallèlement, elle a montré des résultats très marquants dans la sécrétion des enzymes protéase, caséinase et amylase.

A cet effet, nous pouvons avancer que les enzymes protéase, caséinase et amylase sécrétées par la bactérie endophyte testée *Curtobacterium flaccumfaciens* interviennent probablement dans l'établissement de la relation endophytique avec la plante spontanée dont elle a été isolée.

Nous avons réalisé le test d'hypersensibilité sur le tabac afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir pathogène de la bactérie endophyte testée. Les feuilles de tabac infiltrées par la souche bactérienne ont exprimé des symptômes de nécrose au point d'inoculation indiquant ainsi son pouvoir pathogène.

Dans le cas des bactéries phytopathogènes, l'apparition de la maladie résulte de l'infection par le pathogène d'une plante dite hôte au cours d'une réaction dite compatible. Par contre, si une bactérie pathogène attaque une plante non hôte au cours d'une réaction incompatible, celle-ci met en place un système de résistance très efficace dite réaction hypersensible (HR). Il a été démontré qu'une souche de *Curtobacterium* isolée des tissus de la betterave sucrière induit une réaction hypersensible sur les feuilles de *Mirabilis jalapa* en présentant des nécroses au point d'infiltration (Chen et *al.*, 2007).

L'étude du pouvoir pathogène de la souche *Curtobacterium flaccumfaciens* sur trois variétés de haricot (Coco rose, Contender, El djadida) a révélé un résultat intéressant. Une observation des symptômes a permis d'estimer le pouvoir pathogène de la souche

Chapitre 4: Discussion

Curtobacterium flaccumfaciens. Les résultats symptomatologiques obtenus après trois semaines de l'inoculation de la suspension bactérienne sur les plants de haricot des trois variétés utilisées, montrent un pouvoir pathogène de la souche bactérienne testée à l'égard du haricot (*Phaseolus vulgaris*).

Les symptômes de la maladie observés incluent le flétrissement des plantes, des lésions nécrotiques avec des marges jaunâtres irrégulières sur les feuilles, des chloroses marginales qui se développent sur toute la surface foliaire, un jaunissement des feuilles, un enroulement des bordures des feuilles et rétrécissement du limbe foliaire avec diminution du nombre de feuilles par plant et des brunissements au point d'inoculation tout au long de la tige.

La classification et la nomenclature pathovar sont basées sur la capacité des bactéries phytopathogènes à causer des symptômes distinctifs ou par référence à leur gamme d'hôtes prouvée (Young et al., 1992). Étant donné que les symptômes observés sur les plants de haricot inoculés sont des symptômes typiques de ceux causés par *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* l'agent causal de la maladie du flétrissement bactérien de haricot, on peut identifier la bactérie utilisée dans la présente étude comme une *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

En se basant sur l'observation au microscope électronique, Dinesen (1980) a prouvé que la bactérie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* est largement confinée dans les tissus conducteurs du xylème des plantes de haricot infectées. Cette même étude a démontré que les symptômes de flétrissement et le rétrécissement du limbe foliaire causé par cette bactérie sont principalement dus à la dégradation des cellules lignifiées du xylème plutôt qu'à la formation des tyloses. Il est aussi spéculé que la haute densité de la bactérie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* dans les cellules de xylème peut empêcher la circulation de la sève au sein des plantes de haricot.

L'extériorisation des symptômes nous mène à déduire que les trois variétés de haricot ont répondu de façon hétérogène à l'inoculation de la souche *Curtobacterium flaccumfaciens*. Cependant, les variétés El djadida et Cotender étaient les plus sensibles tandis que la variété Coco rose s'est avéré plus résistante où les symptômes observés sont moins importants que ceux des deux autres variétés (El djadida, Cotender).

Halluka et ses coll. (1978), ont démontré que la densité des populations *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* est plus élevée chez les cultivars de haricot susceptibles que chez les cultivars résistants. D'autre part, Wood et Easdown, (1990) ont

Chapitre 4: Discussion

démontré que les filtrats bactériens exempts de cellules de *Cff* peuvent causer des flétrissements des plantes de *Vigna radiata* (mung bean) et *Vigna unguiculata* (cowpea) indiquant ainsi que le pathogène est capable de synthétiser des phytotoxines partiellement responsables des symptômes de flétrissements observés sur les plantes infectées. Le flétrissement et la mort des plantules sont des symptômes indicateurs d'une infection précoce de la bactérie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

À travers notre étude, nous avons confirmé le pouvoir pathogène *in vitro* de cette bactérie par le fait qu'elle possède un arsenal enzymatique qui peut être considéré comme « déterminants de la virulence ». Cette sécrétion d'enzymes extracellulaires dépend principalement du système de sécrétion de type II mais aussi pour certaines protéases du système de sécrétion de type I. D'autres enzymes sécrétées par le système de sécrétion de type II et non impliquées dans la dégradation de la paroi de la cellule végétale semblent donc importantes pour la virulence des bactéries phytopathogènes (Omori et Idei, 2003 ; Büttner et Bonas, 2010).

Une fois dans les tissus de la plante, les bactéries phytopathogènes dégradent la paroi des cellules végétales. Cette dégradation entraînera une libération de nutriments qui seront utilisés comme source de carbone et d'énergie par les bactéries, mais permettra aussi, une dissémination des agents pathogènes dans les tissus. Les enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de la paroi des cellules de la plante hôte (PCWDE pour Plant Cell Wall Degrading Enzymes) sont très répandues parmi les agents phytopathogènes. Elles ont pour rôle essentiel la dégradation des polysaccharides (cellulose, hémicellulose et pectine) et de la lignine qui composent les parois cellulaires des végétaux.

Le haricot *Phaseolus vulgaris* est une source de protéines diététiques dans beaucoup de pays en développement et les exsudats racinaires de cette plante sont très riches en sucres et acides aminées (Odunfa, 1979) ce qui les rendent une niche favorable à la croissance des microorganismes et source de carbone et d'azote (Youssef et Mankarios, 1968). La plante n'a pas d'exigences particulières concernant le type de sol mais elle est sensible aux pH bas (optimum entre 6.1 et 7.4) et à la salinité (Renard *et al.*, 2007). Au regard de ces données et vu les résultats physiologiques et biochimiques obtenus lors cette étude, nous pouvons conclure que le haricot représente une plante hôte parfaite pour la croissance et l'expression des facteurs de virulence de notre bactérie *Cff*.

Les bactéries du genre *Curtobacterium* ont été isolées comme endophytes de plusieurs plantes, y compris le trèfle, le riz, la pomme de terre, les *Citrus* et les plantes sauvages (Sturz

Chapitre 4: Discussion

et Matheson, 1996 ; Sturz et *al.*, 1998 ; Elbeltagy et *al.*, 2000 ; Araújo et *al.*, 2001 ; Zinniel et *al.*, 2002).

Plusieurs études ont montré qu'*Euphorbia* sp., une plante spontanée répartie dans toutes les aires géographiques (Europe, Asie, Afrique, introduit en Amérique) peut héberger plusieurs microorganismes fongiques et bactériens comme endophytes dans les tissus internes (Zinniel et *al.*, 2002 ; Irum et *al.*, 2010).

Les travaux menés par Zinniel et ses *coll.* (2002) indiquent que des *Curtobacterium* isolés des plantes spontanées, y compris *Euphorbia* sp., exhibent des taux de colonisation et des capacités à persister dans les tissus internes de plusieurs plantes très prometteuses. Ces bactéries ont aussi présenté une grande résistance vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques.

A cet effet, *Euphorbia helioscopia* à partir de laquelle la bactérie utilisée dans notre travail a été isolée, représente une source potentielle d'inoculum et un réservoir important pour *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ; microorganismes de quarantaine causant d'importants pertes économiques.

Conclusion

Conclusion

La croissance et le développement de la plante sont influencés d'une manière significative de la présence et l'activité des microorganismes. Les interactions plante-endophytes les plus étudiées et les plus avancées sont celles des bactéries à Gram négatif en raison de leur isolement aisé des tissus internes de différentes espèces végétales, facilement manipulables et favorables pour des approches génétiques. Par ailleurs, plusieurs bactéries à Gram positif ont montré une diversité d'actions sur les plantes ; ce sont des excellents agents de biocontrôle, de promotion de la croissance végétale et de la bioremédiation. En revanche, plusieurs d'entre elles sont des bactéries phytopathogènes causant des pertes agricoles et économiques très considérables. L'impact des bactéries à Gram positif sur les plantes est moins documenté et ne doit pas être sous-estimé (Isolde et al. , 2010).

Cependant, les bactéries endophytes colonisant les tissus internes des végétaux représentent un atout très intéressant pour le domaine agricole et une alternative très prometteuse à l'utilisation perpétuée des pesticides d'origine chimique qui représentent une dépense supplémentaire pour les agriculteurs et constitue un dommage pour les écosystèmes naturels.

Au terme de notre étude, plusieurs constatations ont été mise en place :

La souche *Curtobacterium flaccumfaciens* est une bactérie avec une activité catalase et estérase négative ; incapable de produire les métabolites secondaires impliquées dans la promotion de la croissance et la lutte biologique (AIA, HCN, solubilisation de phosphore, phénazines) à l'exception de la production d'ammoniac (NH₃) dont le résultat était positif.

Une tolérance très élevée de la bactérie *Curtobacterium flaccumfaciens* a été observée à des concentrations élevées de NaCl arrivant jusqu'à 100g/l et à une gamme de pH allant de 5 à 9. La bactérie utilise le plus souvent des sucres simples et quelques sucres alcools comme seule source de carbone.

La bactérie *Curtobacterium flaccumfaciens* possède un arsenal enzymatique important ; elle est capable de sécréter les enzymes telles que la protéase, caséinase et amylase, mais incapable d'hydrolyser la gélatine et la pectine. Un tel résultat indique que la sécrétion de ces enzymes est probablement impliquée dans les mécanismes de l'établissement de la relation endophytique avec la plante d'où elle est isolée.

Le test de la détermination du pouvoir pathogène sur tabac (*Nicotiana tabacum* var. White burley) et sur plantes hôtes (*Phaseolus vulgaris*) montre qu'il s'agit d'une bactérie phytopathogène. Les symptômes observés sur les plantules de haricot sont des symptômes

Conclusion

typiques de ceux causés par *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* l'agent causal de la maladie du flétrissement bactérien de haricot. L'expression des symptômes et l'incidence de la maladie diffèrent en fonction de la variété de haricot.

Les résultats obtenus sont intéressants et méritent d'être approfondis et comme continuation à ce travail, il serait évident de tester le pouvoir pathogène de la souche *Curtobacterium flaccumfaciens* sur d'autres espèces végétales appartenant à diverses familles botaniques afin de confirmer la spécificité du pathover *flaccumfaciens* à sa plante hôte qu'est le haricot.

Il serait souhaitable également de vérifier l'implication des enzymes hydrolytiques et les autres métabolites synthétisées par la souche bactérienne comme déterminants de pathogénicité pour une meilleure compréhension du mécanisme exact de pathogénicité et aussi d'étudier et d'identifier, de façon plus approfondie les gènes responsables du pouvoir pathogène.

On ne connaît par ailleurs aucun composé chimique efficace contre la maladie du flétrissement bactérien de haricot, ni de cultivar commercial résistant à cette maladie et face à la grande diversité des bactéries endophytes et de leurs pouvoir antagoniste vis-à-vis les agents phytopathogènes, il serait intéressant de réaliser des essais d'antagonisme entre la microflore endophyte de la plante spontanée *Euphorbia helioscopia* et la bactérie *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Agarkova I.V., Lambrecht P.A., Vidaver A.K. and Harveson R.M., 2012.** Genetic diversity among *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* populations in the American High Plains. *J. Microbiol.* 58, 788-801.
- Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163:173–181.
- Alim D., 2011.** Antagonisme bactérien sur des souches d'*Erwinia* spp. Pectinolytiques agents de la pourriture molle de la pomme de terre. Mémoire de magister phytopathologie. Université de Blida. 137 p.
- Araújo W.L., Maccheroni W., Aguilar-Vildoso C.I., Barroso P.A.V., Saridakis H.O. and Azevedo J.L., 2001.** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47:229-236.
- Arora S., Purvi N.P., Vanza M. J., Rao G.G., 2014.** Isolation and characterization of endophytic bacteria colonizing halophyte and other salt tolerant plant species from coastal Gujarat. *African Journal of Microbiology Research.* 8(17): 1779-1788.
- Bacon C.W. and White Jr.J.F., 2000.** *Microbial Endophyte.* Marcel Dekker Incorporated, New York, United States of America. pp. 487.
- Bacon C.W., Hinton D.M., 2006.** Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-associated bacteria.* Springer, the Netherlands, pp. 155–194.
- Bacon CW., Hinton DM., 2006.** Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-associated bacteria.* Springer, the Netherlands, pp. 155–194.
- Bae H., Roberts D.P., Lim H.S., Strem M.D., Park S.C., Ryu C.M., Melnick R.L., Bailey B.A., 2011.** Endophytic Isolates from Tropical Environments Delay Disease Onset and Induce Resistance against *Phytophthora capsici* in Hot Pepper Using Multiple Mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 24:336–351.
- Balsanelli E., Serrato R.V., de Baura V., Sasaki G., Yates M.G., Rigo L.U., Pedrosa F.O., de Bashan Y. et Holguin G., 1998.** Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry.* 30:1225-1228.

Références bibliographiques

- Baysal O., Caliskan M. et Yesilova O., 2008.** An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 73:25-32.
- Berendsen R. L., Pieterse C.M.J. et Bakker A.H.M., 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 8: 478-486.
- Boncompagni E., Ostrerás M., Poggi M. and Le Rudulier D., 1999.** Occurrence of choline and glycine betaine uptake metabolism in rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2072- 2077.
- Bottini R., Cassán F. and Piccoli P., 2004.** Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65: 497-503.
- Bric J. M., Bostock R. M. and Siiverstone S.E., 1991.** Rapid *in situ* assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2636-2642.
- Bulgari D., Minio A., Casati P., Quagliano F., Delledonne M., Bianco P. A., 2014.** *Curtobacterium* sp. Genome Sequencing Underlines Plant Growth Promotion-Related Traits. genomea.asm.org.
- Burkholder W.H., 1945.** The longevity of the pathogen causing the wilt of common bean. *Phytopathology*. 35:743-744. *In* Huang H.C., Erickson R.S., Balasubramanian P.M., Hsieh T.F. and Conner R.L., 2009. Resurgence of bacterial wilt of common bean in North America. *Can. J. Plant Pathol.* 31(3): 290–300.
- Buttner D. and Bonas U., 2010.** Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence.
- Cappuccino J. G. and Sherman. N., 1992.** Biochemical activities of microorganisms. In: *Microbiology, a Laboratory Manual*. The Benjamin / Cummings Publishing Co. California, USA.
- Cattelan A.J., Hartel P.G. and Fuhrmann J.J., 1999.** Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670–1680.
- Chanway C.P., 1996.** Endophytes: they’re not just fungi!. *Canadian Journal of Botany*. 74:321-322.

Références bibliographiques

- Chen H., Richardson A.E., Rolfe B.G., 1993.** Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Applied and Environmental Microbiology. 59: 1798-1804.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka EA., 2005.** Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4951–4959.
- Compant S., Mitter B., Colli-Mull JG., Gangl H., Sessitsch A., 2011.** Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. Microb. Ecol. 62: 188-97.
- Compant S., van der Heijden M. and Sessitsch A., 2010.** Climate change effects on beneficial plant-microbes interactions. FEMS Microbiology Ecology. 73: 197-214.
- Coutinho F.P., Cavalcanti M. A. et Yano-Melo A. M., 2011.** Phosphate-solubilizing fungi isolated from a semiarid area cultivated with melon (*Cucumis melo* L. cv. gold mine). Acta bot. Bras. 25(4): 929-931.
- Damodaran T., Sah V., Rai R. B., Sharma D. K., Mishra V.K., Jha S. K. and Kannan R., 2013.** Isolation of salt tolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomato under sodic environment. Afri. J. of Microbiol. Research. 7(44): 5082-5089.
- De Bary A.H., 1866.** Morphologie und physiologie der pilze. Flechten und Myxomyceten”. In: Hofmeister’s Handbook of Physiological Botany. Vol II, Leipzig, Germany, pp.1-316. Dekker Incorporated, New York, United States of America. pp. 199-233.
- Dinesen I.G., 1980.** Bacterial wilt of bean (*Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dowson). Dan. J. Plant. Soil. Sci.84:361-370.
- Djellout H., 2011.** Identification et sélection d'antagonistes bactériens induisant une résistance systémique vis-à-vis *Agrobacterium* spp. l'agent du crown gall des arbres fruitiers et de la vigne. Mémoire de magister phytopathologie. Université de Blida. 147 p.
- Durrant W.E. and Dong X., 2004.** Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 42: 185-209.
- Edi-Premono M.A. M. et Vleck P.L., 1996.** Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indonesian J. Crop Sci. 11:13–23.
- Elavazhagan T., Jayakumar S., Balakrishnan V. and Chitravadivu C., 2009.** Isolation of Endophytic Bacteria from the Invasive Alien Weed, *Mikania micrantha* and Their Molecular Characterization. American-Eurasian Journal of Scientific Research. 4 (3): 154-158.

Références bibliographiques

- Elbeltagy A., Nishioka K., Suzuki H., Sato Y.I., Morisaki H., Mitsui H. and Minamisawa K., 2000.** Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 617-629.
- Elvira-Recuenco M., 2000.** Sustainable control of pea bacterial blight: Approaches for durable genetic resistance and biocontrol by endophytic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 46(11):1036-41.
- Frazier W.C., 1926.** A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. Infect. Dis.* 39: 302-306.
- Fredrickson J.K., Zachara J.M., Balkwill D.L., Kennedy D., Li S.M., Kostandarithes H.M., Daly M.J., Romine M.F. and Brockman F.J., 2004.** Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4230-4241.
- Fürnkranz M., Lukesch B., Müller H., Huss H., Grube M., Berg G., 2011.** Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonist potential against phytopathogens. *Microb. Ecol.* DOI: 10.1007/s00248-011-9942-4.
- Galinski E.A., 1993.** Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water solute interactions, stress protection. *Experientia.* 49: 487-496.
- Gasser I., Cardinale M., Müller H., Heller S., Eberl L., Lindenkamp N., Kaddor C., Germaine K., Keogh E., Borremans B., 2004.** Colonization of poplar trees by GFP-expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol Ecol.* 48: 109-118.
- Goudjal Y., Toumatia O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F., Zitouni A., 2013.** Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29:1821-1829.
- Guimarães P.M., Palmano S., Smith J.J., de Sa M.F. and Saddler G.S., 2001.** Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 80:1-10.
- Haddad N., Krimi Z., Raio A., 2013.** Endophytic bacteria from weeds promote growth of tomato plants *in vitro* and in greenhouse. In: Schneider C, Leifert C, Feldmann F (Eds), *Endophytes for plant protection: the state of the art*, pp. 27-32.
- Haggag W. M., 2010.** The Role of Endophytic Microorganisms in Biocontrol of Plant Diseases. *Life Science Journal.* 7(2): 102-107.

Références bibliographiques

- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahafee W.F. et Kloepper J.W., 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 895-914.
- Halluka M., Schuster M.L., Weihing J.C., Coyne D.P., 1978.** Population trends of *Corynebacterium flaccumfaciens* strain in leaves of *Phaseolus* species. *Fitopatologia Brasileira* 3: 13- 26.
- Hanada R.E., Pomella A.W., Costa H.S., Bezerra J.L., Loguercio L.L., Pereira J.O., 2010.** Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*. 114:90–1910.
- Hardoim P.R., Overbeek L.S. et Ellass J.D., 2008.** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. 16: 463-471.
- Harman G.E., 2006.** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190- 194.
- Harris-Baldwin A. and Gudmestad N.C., 1996.** Identification of phytopathogenic coryneform bacteria using the Biolog automated microbial identification system. *Plant. Dis.* 80:874-878.
- Harveson, R.M., and Schwartz, H.F. 2007.** Bacterial diseases of dry edible beans in the Central High Plains. *Plant Health Prog.*
- Hayward A.C. and Waterson J.M., 1965.** *Corynebacterium flaccumfaciens*. CAB International. Wallingford.UK. CMI Desc. Pathogenic Fungi Bact. 43.
- Herbes D.H., Theodoro G.F., Maringoni A.C., dal Piva C.A., de Abreu L., 2008.** Detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in seeds of common bean produced in Santa Catarina. *Trop. Plant Pathol.* 33: 53–156.
- Hinsinger P. and Marschner P., 2006.** Rhizosphere—perspectives and challenges—a tribute to Lorenz Hiltner 12–17 September 2004- Munich, Germany. *Plant and Soil*. 283: vii–viii.
- Hsieh T.F., Huang H.C. and Erickson R.S., 2006.** Bacterial wilt of common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of seedborne inoculum on disease incidence and seedling vigor. *Seed Sci. Technol.* 34:57-67.
- Hsieh T.F., Huang H.C., Mundel H.H., Conner R.L., Erickson R. S. and Balasubramanian P.M., 2005.** Resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *J. Phytopathol.* 153(4): 245– 249.
- Huang B., Lv C., Zhuang P., Zhang H., Fan L., 2011.** Endophytic colonization of *Bacillus subtilis* in the roots of *Robinia pseudoacacia* L. *Plant Biol.* 13: 925-931.

Références bibliographiques

- Huang H.C., Erickson R.S., Balasubramanian P.M., Hsieh T.F. and Conner R.L., 2009.** Resurgence of bacterial wilt of common bean in North America. *Can. J. Plant Pathol.* 31(3): 290–300.
- Iniguez AL., Dong Y., Carter HD., Ahmer BMM., Stone JM., Triplett EW., 2005.** Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 169-178.
- Irum M., Ibatsam K., Sobia M. and Amna A., 2010.** Diversity of epiphytic and endophytic microorganisms in some dominant weeds. *Pak. J. Weed Sci. Res.* 16(3): 287-297.
- Isolde F., Holsters M. and Vereecke D., 2010.** The Gram-positive side of plant–microbe interactions. *Environmental Microbiology.* 12(1): 1–12.
- James D.W. and Gutterson N.I., 1986.** Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1183–1198.
- James EK., Gyaneshwar P., Mathan N., Barraquio WL., Reddy PM., Iannetta PPM., Ji X., Lu G., Gai Y., Gao H., Lu B., Kong L., Mu Z., 2010.** Colonization of *Morus alba* L. by the plant growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. *BMC Microbiol.* 10: 243.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. 2008.** *Corynebacterium ilicis* is typified by ICMP 2608 = ICPB CI144, *Arthrobacter ilicis* is typified by DSM 20138 = ATCC 14264 = NCPPB 1228 and the two are not homotypic synonyms, and clarification of the authorship of these two species. Opinion-87. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(8): 1976–1978.
- Kloepper J.W., Rodrigo R.K., McLroy J.A. et Collins D.J., 1991.** Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plant with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. *Plant and Soil.* 136: 95-102.
- Kobayashi D.Y. et Palumbo J.D., 2000.** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: *Microbial Endophytes* (Bacon C.W. and White J.F., eds), Marcel.
- Krause A., Bischoff B., Miché L., Battistoni F., Reinhold-Hurek B., 2011.** Exploring the function of alcohol dehydrogenases during the endophytic life of *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 1325-1332.
- Krimi Z., Raio A., Djellout H., Alim D., Haddad N., Smain K. and Dessaux X., 2012.** Bacterial endophytes from diverse spontaneous plant species with biological activities. *Proceedings of COST Action FA1103: Endophytes in biotechnology and agriculture.* November 14-16th, Trento (Italy). Pp. 33.

Références bibliographiques

- Lacava P.T., Araújo W.L. and Azevedo J.L., 2007.** Evaluation of endophytic colonization of *Citrus sinensis* and *Catharanthus roseus* seedlings by endophytic bacteria. *J. Microbiol.* 45, 11-14.
- Lacava P.T., Araújo W.L., Marcon J., Maccheroni W. and Azevedo J.L., 2004.** Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 55-59.
- Larrainzar E., O’Gara F. and Morrissey J.P., 2005.** Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 59: 257–277.
- Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M. and van der Lelie D., 2002.** Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 21: 583-606.
- Lugtenberg B., 2011.** Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microb. Biotech.* 4: 523-532.
- Lugtenberg B., Kamilova F., 2009.** Plant-growth-promoting-rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541–556.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., 1998.** Brock’s biology of microorganisms. 8th ed (international edition), XVIII. Hemel Hempstead (UK): Prentice Hall; p. 342.
- Malfanova N., Lugtenberg B., Berg G., 2013.** Bacterial endophytes: who, where and what are they doing there?. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere.* F.J. de Bruijn.
- Malfanova N., 2013.** Is L-arabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp.? *Arch. Microbiol.* 195: 9-17.
- Malfanova N., Kamilova F., Validov S., Shcherbakov A., Chebotar V., Tikhonovich I., Lugtenberg B., 2011.** Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microb. Biotech.* 4: 523-532.
- Malleswari. D and Bagyanarayana. G, 2013.** *In vitro* screening of rhizobacteria isolated from the rhizosphere of medicinal and aromatic plants for multiple plant growth promoting activities. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 3(1):84-91.
- Maringoni A.C. and Camera R.C., 2006.** *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semiselective culture medium. *Braz. J. Microbiol.* 37:451-455.
- Mia M., Shamsuddin Z.H., Wahab Z. and Marziah M., 2010.** Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue

Références bibliographiques

cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Aus. J. Crop. Sci.* 4: 85-90.

Miller J.H., 1974. Experiments in Molecular Genetics, second ed. Cold Spring Harbor, New York. 31- 36.

Naik P. R. and Sakthivel N., 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp.strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* 157: 538–546.

Nandhini S., Sendhilvel V. et Babu S., 2012. Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, the wilt pathogen. *J. Biopest.* 5(2):178-185.

Nelson G. and George S., 1995. Comparison of media for selection and enumeration of mouse fecal flora populations. *J. Microbiol. Methods.* 22: 293-300.

Norman-Setterblad C., Vidal S. and Palva ET., 2000. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 430-438.

Odunfa V. S. A., 1979. Free amino acids in the seed and root exudates in relation to the nitrogen requirements of rhizosphere soil Fusaria. *Plant and Soil.* 52: 491-499.

OEPP, 2011. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 41, 320–328.

Olivares FL., Ladha JK., 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 894-906.

Omori K. and Idei A., 2003. Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 1-12.

Ongena M. and Thonart P., 2006. Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses. In: Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. 1st ed. Japan: Global Science Books, 447-463.

Ortiz-Castro R., Valencia-Cantero E. and López-Bucio J., 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling and Behavior.* 3: 263-265.

Pedrosa FO., Monteiro RA., Wassem R., Cruz LM., Ayub RA., Colauto NB. And Fernandez MA., 2011. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS genetics* 7.

Références bibliographiques

- Pikovskaya R.I., 1948.** Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*. 17:362–370.
- Pleban S., Chernin L. and Chet I., 1997.** Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* 25: 284-288.
- Posada F. et Vega F.E., 2005.** Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*. 97: 1195–1200.
- Pyar H. and Peh K.K., 2013.** Characterization and identification of *Lactobacillus acidophilus* using biolog rapid identification system. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* (6):189-193.
- Raaijmakers J.M., Vlami M. and de Souza J.T., 2002.** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
- Raja P., Una S., Gopal H. and Govindarajan K., 2006.** Impact of BioInoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. *J. Biolog. Sci.*6: 815-823.
- Rapilly F., 1986.** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des épiphytes* 19 (No. H.S). p 1-102.
- Rasche F., Lueders T., Schloter M., Schaefer S., Buegger F., Gattinger A., Hood-Nowotny R.C., Sessitsch A., 2009.** DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes. *New Phytologist* 181: 802-807.
- Reinhold-Hurek B., Maes T., Gemmer S., Van Montagu M., Hurek T., 2006.** An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 181-188.
- Renard S., Goffork J.P., Frankinet., 2007.** Optimisation de l'efficience de l'azote dans les rotations intégrant les cultures de légumes industriels en Hesbaye. *Les dossiers de la recherche agricoles*.
- Romero R.S., 2005.** Bactérias fitopatogênicas. Editora UFV, Viçosa. 417p.
- Roussos S., 1977.** Taxonomie et écologie des bactéries sphériques hétérotrophes isolées du milieu marin. Thèse 3^e cycle. Université de Provence. Marseille.
- Ruchi, Kapoor R., Kumar A., Kumar A., Patil S., Thapa S. and Kaur M., 2012.** Evaluation of plant growth promoting attributes and lytic enzyme production by fluorescent *Pseudomonas* diversity associated with Apple and Pear. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2:1-8.
- Salgado R.G.D., Maringoni A.C. and Wilcken S.R.S., 2007.** Non- pathogenic interaction between *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* and *Meloidogyne incognita* race 2 on common bean plants. *Nematol. Bras.* 31: 229-232.

Références bibliographiques

- Saridakis H.O. and Azevedo J.L., 2001.** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47: 229-236.
- Schulz B. et Boyle C., 2006.** What are endophytes? *Microbial Root Endophytes* (Schulz BJE, Boyle CJC & Sieber TN, eds), pp. 1–13. Springer-Verlag, Berlin.
- Schulz B., Boyle C., 2005.** The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109:661–687.
- Sessitsch A., Hardoim P., Döring J., Weilharter A., Krause A., Woyke T. et Mitter B., 2012.** Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25: 28-36.
- Shishido M., Breuil C., Chanway C.P., 1999.** Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 191-196.
- Sierra G. A., 1957.** A simple method for the detection of lyolytic activity of microorganisms and some observations on the influence on the contact between cells and fatty substracts. *Antonine van Leeuwenhoeck.* 28:15-22.
- Smain K., Khoudja R., 2011.** Pouvoir antagoniste d'isolats bactériens endophytes de diverses plantes adventices à l'égard d'une gamme de bactéries phytopathogènes. Thèse Ing. USDB. 49-55.
- Smibert R.M. and Krieg N.R., 1994.** Phenotypic characterization. In: *Methods for general and molecular bacteriology.* P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg(ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp.607–654.
- Son T.T.N., Diep C.N. and Giang T.T.M., 2006.** Effect of *Bradyrhizobia* and phosphate solubilizing bacteria application on Soybean in rotational system in the Mekong delta. *Omonrice.* 14: 48-57.
- Souza E.M., Monteiro R.A., 2010.** *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environ. Microbiol.* 12: 2233-2244.
- Sowmya S., Rekha P.D. and Arun A.B., 2013.** Isolation, Identification and Characterization of *Curtobacterium* sp. YU-SSC-67 for phosphate Solubilization and Uranium Tolerance. *Int. Res. J. Biological Sci.* 2(12):102-106.
- Spaepen S., Das F., Luyten E., Michiels J. and Vanderleyden J., 2009.** Indole-3-acetic acid- regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. *FEMS Microbiology Letters.* 291: 195-200.
- Steinbüchel A., Berg G., 2011.** Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant and Soil.* 347: 125-136.

Références bibliographiques

- Stitcher L., Mauch-Mani B. and Metraux J.P., 1997.** Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology. 35: 235-70.
- Sturz A.V. and Christie B.R., 2003.** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. Soil and tillage research. 72:107-123.
- Sturz A.V. and Matheson B.G., 1996.** Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in tubers. Plant Soil. 184:265-271.
- Sturz A.V., Christie B.R. and Matheson B.G., 1998.** Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. Can. J. Microbiol. 4: 162-167.
- Suzuki T., Shimizu M., Meguro A., Hasegawa S., Nishimura T., Kunoh H., 2005.** Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. Actinomycetologica. 19: 7–12.
- Tegli S., Sereni A. and Surico G., 2002.** PCR- based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. Lett. Appl. Microbiol. 35:331-337.
- Teng S.S., Liu Y.P., Zhao L., 2010.** Isolation, identification and characterization of ACC deaminase-containing endophytic bacteria from halophyte *Suaeda salsa*. Acta Microbiologica Sinica. 50:1503–1509.
- Thomashow L.S. and Weller D.M., 1988.** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. Bacteriol. 170: 3499-3508.
- Tolba I.H. and Soliman M.A., 2013.** Efficacy of native antagonistic bacterial isolates in biological control of crown gall disease in Egypt. Annals of Agricultural Sciences. 48: 43-49.
- Tombolini R. and Jansson JK., 1998.** Monitoring of GFP-tagged bacterial cells. Methods in Molecular Biology: bioluminescence Methods and Protocols (LaRossa RA, ed.), pp. 285–298.
- Trémouillaux-Guiller J. and chénieux J.C., 1991.** Somatic embryogenesis from leaf protoplasts of *Rauvolfia vomitoria* shoot cultures. Plant Cell Reports. 10: 102-105.
- Usha R.M., Arundhathi, Reddy G., 2011.** *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of pigeon pea. A. J. Microbial. R. 5(15): 2090-2094.

Références bibliographiques

- Van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M., 2005.** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. *In: Siddiqui Z.A., ed. PGPR: Biocontrol and biofertilization.* Dordrecht, The Netherlands: Springer, 39-66.
- Vidaver AK., 1967.** Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence of phytopathogenic *Pseudomonas*: effect of carbon source. *Applied Microbiology.* 15: 1523-1524.
- Wilson D., 1995.** Endophyte- the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos.* 73: 274-276.
- Wood B. A., and Easdown W.J., 1990.** A new bacterial disease of mung bean and cowpea for Australia. *Aust. Plant. Pathol.* 19:16-21.
- Wu S. C., Cao H. Z., Li G. Z., Cheung C. K. et Wong H. M. 2005.** Effect of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma.*125:155-156.
- Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T., Arakawa M., 1992:** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology.* 36:1251-1275.
- Yan Z., Reddy M.S., Yyu C.M., McInroy J.A., Wilson M. and Kloepper J.W., 2002.** Induced systemic protection against tomato late blight by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology.* 92: 1329-1333.
- Yang N., Yang B., 2011.** Diversity and Seasonal Fluctuations of Endophytic Bacteria Isolated from the Root Tissues of *Cymbidium faberi*. *Plant Science Journal.* 29:156–163.
- Young J. M., Allen C., Coutinho T., Denny T., Elphinstone J., Fegan M., Gillings M., Gottwald T. R., Graham J. H., Iacobellis N. S., Janse J. D., Jacques M.A., Lopez M.M., Morris C.E., Parkinson N., Prior P., Pruvost O., Rodrigues Neto J., Scortichini M., Takikawa Y., and Upper C. D., 2008.** Plant-pathogenic bacteria as biological weapons Real threats?. *Phytopathology.* 98:1060-1065.
- Young J. M., Takikawa Y., Gardan, L. and Stead D. E., 1992.** Changing concept in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:67-105
- Young J. M., Watson D. R. W. and Dye, D.W., 2004.** Reconsideration of *Arthrobacter ilicis* (Mandel et al. 1961) Collins *et al.* 1982 as a plant-pathogenic species. Proposal to emend the

Références bibliographiques

authority and description of the species. Request for an Opinion. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:303-305.

Youssef Y. A., Mankarios A. T., 1968. Studies on the rhizosphere mycoflora of broad bean and cotton: seed and root exudates and their effects on spore germination and growth of the prevalent fungi isolated from the rhizosphere. Mycopathologia. 38: 257-269.

Zachow C., Fatehi J., Cardinale M., Tilcher R. et Berg G., 2010. Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. FEMS Microbiol. Ecol. 74: 124-35.

Zaidi A., Khan M.S., Ahemad M. and Oves M., 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 56: 263-284.

Zhang F., Dashti N., Hynes R.K. and Smith D.L., 1996. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. Annals of Botany. 77: 453-459.

Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z., Kiczmarski D., Higley P., Ishimaru C.A., Arunakumari A., Barletta R.G. et Vidaver A.K., 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Applied and Environmental Microbiology. 68: 2198-2208.

Annexes

Milieux de culture (composition en g/ l)

Milieu LB (Luria Bertani)

| | |
|-------------------|-----|
| Tryptone | 10g |
| Extrait de levure | 5g |
| NaCl | 5g |
| Agar | 17g |
| pH=7 | |

Milieu LBT (Luria Bertani enrichi du tryptophane)

| | |
|-------------------|-------|
| Tryptone | 10g |
| Extrait de levure | 5g |
| NaCl | 5g |
| L-tryptophane | 1,02g |
| Gélose | 20g |
| Agar | 17g |
| pH= 7,5 | |

Milieu PVK

| | |
|---|-------|
| (NH ₂) ₂ SO ₄ | 0.5g |
| extrait de levure | 0.5g |
| phosphate bicalcique | 5g |
| KCl | 0.2g |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 0.1g |
| glucose | 10g |
| Agar | 17g |
| MnSO ₄ | trace |
| FeSO ₄ | trace |
| Bleu bromophénol | 4ml/l |
| pH= 6.7 | |

Milieu de production d'HCN

milieu LB + 4,4g de glycine

NBY à 2% de glucose

| | |
|---------------------------------|------|
| Bouillon nutritif | 8g |
| Extrait de levure | 2g |
| K ₂ HPO ₄ | 2g |
| KHPO ₄ | 0,5g |
| Glucose | 2g |

| | |
|--|-------|
| Mg SO ₄ , 7H ₂ O | 0,25g |
| Agar | 17g |

Milieu pour les enzymes protéolytiques

| | |
|-------------------------------|------------|
| Caséine digestif pancréatique | 5g |
| Extrait de levure | 2,5g |
| glucose | 1g |
| Solution de lait écrémé | 100ml (7%) |
| Agar | 17g |

Milieu Amylase

| | |
|--------------|-----|
| Beef extract | 3g |
| Peptone | 5g |
| Amidon | 2g |
| Agar | 17g |

Milieu M9 pour production des enzymes pectinase

| | |
|----------------------------------|------|
| Na ₂ HPO ₄ | 6g |
| KH ₂ PO ₄ | 3g |
| NH ₄ Cl | 1g |
| NaCl | 0,5g |
| Agar | 17g |

Autoclavage à 120°C puis additionner par infiltration de:

20 ml d'une solution D-Glucose 20%

2 ml d'une solution MgSO₄ 1.0 M

0.1 ml d'une solution CaCl₂ 1.0 M

Milieu minéral de base pour utilisation des hydrates de carbone

| | |
|--|-------|
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 1g |
| KCl | 0,2g |
| Mg So ₄ , 7H ₂ O | 0,2g |
| Bleu de bromotymol | 0,03g |
| Gélose | 3g |

Le sucre à tester à raison de 2g ou l'acide aminé à raison de 1g

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction 1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique sur les bactéries endophytes et *Curtobacterium flaccumfaciens* comme cas d'étude

| | |
|--|----|
| 1. Les plantes, un réservoir pour les bactéries endophytes | 3 |
| 2. Origine, localisation et caractéristiques des bactéries endophytes | 4 |
| 3. Niche écologique et colonisation de la plante par les bactéries endophytes | 5 |
| 3.1. Colonisation du rhizoplan | 6 |
| 3.2. Pénétration des bactéries endophytes au sein de la plante | 7 |
| 3.3. Colonisation du cortex de la plante..... | 8 |
| 3.4. Colonisation du xylème..... | 8 |
| 3.5. Source de carbone de la croissance des bactéries endophytes à l'intérieur des tissus de la plante..... | 9 |
| 3.6. Colonisation des organes reproducteurs | 9 |
| 3.7. Autres voies de colonisation de la plante..... | 10 |
| 4. Mise au point des bactéries endophytes (méthodes de détection et d'énumération des bactéries endophytes) | 10 |
| 5. Interaction plante – endophyte | 11 |
| 5.1. Interactions bénéfiques | 11 |
| 5.1.1. Promotion de la croissance végétale par les bactéries endophytes | 12 |
| • Fixation d'azote atmosphérique | 12 |
| • Solubilisation du phosphore | 13 |
| • Production des phytohormones..... | 13 |

| | |
|--|----|
| 5.1.2. Lutte biologique par les bactéries endophytes..... | 14 |
| • La compétition pour l'espace et les nutriments | 14 |
| • L'antibiose | 14 |
| • La sécrétion des enzymes lytiques | 15 |
| • L'induction de la résistance systémique | 15 |
| 5.2. Interactions pathogènes | 15 |
| 6. <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , une bactérie endophyte bénéfique ou phytopathogène | 16 |
| 6.1. Description du genre | 16 |
| 6.2. Les <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> bénéfiques..... | 16 |
| 6.3. Les <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> phytopathogènes | 17 |
| • Caractéristiques taxonomiques et cellulaires de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> | 18 |
| • Distribution géographique | 18 |
| • Symptômes de la maladie | 19 |
| • Plantes hôtes | 21 |
| • Epidémiologie | 21 |
| • Méthodes de lutte contre la maladie du flétrissement bactérien | 22 |

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Matériel biologique | 23 |
| 2. Purification de la souche endophyte | 23 |
| 3. Détermination des caractéristiques biochimiques et physiologiques de la bactérie endophyte | 4 |
| 3.1. Recherche de l'activité catalase | 24 |
| 3.2. Recherche de l'activité estérase (hydrolyse de tween 80, tween 20) | 24 |
| 3.3. Tolérance à une gamme de pH | 25 |
| 3.4. Tolérance à la salinité..... | 25 |
| 3.4.1. Tolérance à la salinité par mesure du poids sec | 25 |
| 3.4.2. Tolérance à la salinité par mesure de la densité optique | 26 |
| 3.5. Utilisation des hydrates de carbone comme seule source de carbone..... | 26 |
| 4. Production des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes (PGP) par la souche endophyte | 27 |
| 4.1. Estimation de la production de l'acide indole acétique (AIA) | 27 |
| 4.2. Solubilisation de phosphore | 27 |
| 4.3. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) | 27 |
| 4.4. Production d'antibiotiques de nature phénazinique | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.5. Production d'Ammonium(NH ₃) | 28 |
| 4.6. Sécration des enzymes hydrolytiques par la souche endophyte..... | 28 |
| 4.6.1. Enzymes protéolytiques | 28 |
| 4.6.2. Hydrolyse de la gélatine | 28 |
| 4.6.3. L'hydrolyse de la caséine | 29 |
| 4.6.4. Production d'amylase | 29 |
| 4.6.5. Production de pectinase | 29 |
| 5. Tests de pathogénicité de la bactérie endophyte | 29 |
| 5.1. Test d'hypersensibilité sur tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>)..... | 29 |
| 5.2. Test du pouvoir pathogène sur plantes hôtes | 30 |
| 5.2.1. Matériel végétal..... | 30 |
| 5.2.2. Stérilisation du substrat du sol | 30 |
| 5.2.3. Désinfection de la semence et production des plants à inoculer | 31 |
| 5.2.4. Préparation des suspensions bactériennes et mesure de la densité optique nécessaire pour la réalisation du test de pouvoir pathogène | 31 |
| 5.2.5. Inoculation des plantules de haricot par la bactérie endophyte | 31 |
| • Inoculation par voie foliaire | 32 |
| • Inoculation par voie systémique | 32 |
| 5.2.6. Lecture des résultats | 32 |

Chapitre 3 : Résultats et Interprétations

| | |
|--|----|
| 1. Caractéristiques biochimiques et physiologiques de la souche endophyte | 33 |
| 1.1. Activité catalase | 33 |
| 1.2. Activité estérase (hydrolyse de tween 80, tween 20) | 33 |
| 1.3. Tolérance à une gamme de pH | 34 |
| 1.4. Tolérance à la salinité | 34 |
| 1.4.1. Tolérance à la salinité par mesure du poids sec | 34 |
| 1.4.2. Tolérance à la salinité par mesure de la densité optique | 35 |
| 1.5. Utilisation des hydrates de carbone comme seule source de carbone | 36 |
| 2. Production des métabolites impliqués dans la promotion de la croissance (PGP) par la souche endophyte | 38 |
| 2.1. Estimation de la production de l'acide indole acétique (AIA) | 38 |
| 2.2. Solubilisation de phosphore | 39 |
| 2.3. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4. Production d'antibiotique de nature phénazinique | 40 |
| 2.5. Production d'Ammoniac (NH ₃) | 41 |
| 2.6. Production des enzymes hydrolytiques | 41 |
| 3. Pathogénicité de la bactérie endophyte <i>C. flaccumfaciens</i> | 43 |
| 3.1. Hypersensibilité sur tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>) | 43 |
| 3.2. Test du pouvoir pathogène sur plante hôte | 43 |
| Chapitre 4: Discussion | 48 |
| Conclusion..... | 55 |

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Synthèse bibliographiques

Matériel et Méthodes

Résultats et interprétations

Discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

