

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

UNIVERSITE BLIDA1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

LABORATOIRE DE PROTECTION ET VALORISATION DES PRODUITS  
AGROBIOLOGIQUES  
(PVRAB)

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Spécialité : biotechnologie microbienne

Thème

**Pathosystème *Agrobacterium*- tomate, stimulation  
du métabolisme secondaire : cas des acides  
phénoliques**

Présenté par :

**KEBAILI Ahlem**

**SALHI Ilhem**

Soutenue devant le jury composé de :

<b>M<sup>me</sup>MOHAMED MAHMOUD F.</b>	M.C.B	USD-BLIDA 1	Présidente
<b>M<sup>me</sup>KRIMI Z.</b>	Professeur	USD-BLIDA 1	Promotrice
<b>M<sup>me</sup>MAROC-ALIM N.</b>	M.A.A	UDBKM	Examinatrice
<b>M<sup>me</sup>RAHMANI-DJELLOUT H.</b>	Doctorante	USD-BLIDA 1	Co-Promotrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017/2018

# **Pathosystème *Agrobacterium*- tomate, stimulation du métabolisme secondaire : cas des acides phénoliques**

## **Résumé**

Certaines bactéries antagonistes contribuent à la gestion des maladies des plantes, en stimulant les défenses naturelles chez l'hôte et/ou en assurant le biocontrôle direct des bioagresseurs.

L'objectif de cette étude consiste à mettre en évidence l'induction de la résistance systémique et le biocontrôle chez la tomate vis-à-vis de la galle du collet (causé par *Agrobacterium tumefaciens*), en utilisant quatre souches antagonistes appartenant à deux genres bactériens *Bacillus* spp. et *Pseudomonas brassicacearum*. A cet effet, le test d'antagonisme *in planta* montre une diminution et parfois même une absence totale de symptômes de la galle du collet au niveau des plantes traitées par les bactéries antagonistes, comparées aux témoins positifs qui correspondent aux plantes inoculées directement avec les souches d'*A. tumefaciens* et aux témoins négatifs traités par l'eau distillée stérile.

Le screening phytochimique a révélé la présence de quelques groupes chimiques : les flavonoïdes, les tanins, les composés phénoliques et les salicylates dans les extraits méthanoliques des plantes traitées par les souches antagonistes et inoculées par les souches d'*A. tumefaciens*.

Le dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu par rapport à l'étalon acide gallique, a révélé que les fortes concentrations des composés phénoliques est de l'ordre 12,60 µg/ml pour les plantes traitées par les souches antagonistes et inoculées par les souches pathogènes d'*A. tumefaciens*, tandis que celle des plantes traitées par eau distillée stérile est de 6 µg/ml. Ainsi que le dosage quantitatif des composés phénoliques comparés à l'étalon acide salicylique, a révélé des concentrations importantes aussi chez les plantes bactérisés par les souches antagonistes et inoculées par les souches pathogènes, dont la concentration atteint 4,80 µg/ml. Alors que la concentration des composés phénoliques des plantes saines ne dépasse pas 2,40 µg/ml. La teneur des phénols optimal, est observée 2 semaines après l'inoculation.

Nos résultats ont montré la capacité de *Bacillus* spp. et *Pseudomonas brassicacearum* à induire l'ISR chez la tomate sur la base que les composés phénoliques s'accumulent en même temps que l'on observe une réduction des symptômes de la maladie chez les plantes traitées, suggérant une participation active de ces molécules dans l'inhibition directe du pathogène.

**Mots clés :** Composés phénoliques – ISR - Antagoniste-Folin Ciocalteu -*Agrobacterium tumefaciens*.

# Pathosystem *Agrobacterium*- tomato, stimulation of the secondary metabolism: case phenolic acid.

## Abstract

Some antagonistic bacteria contribute to the management of plant diseases by stimulating the host's natural defenses and/or by providing direct biocontrol of the bioagressors.

The objective of this study is to demonstrate the induction of systemic resistance and biocontrol in tomato against crown gall (caused by *Agrobacterium tumefaciens*), using four antagonist strains belonging to two genera bacterial *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum*. To this effect, the *in planta* antagonism test showed a decrease and sometimes even a total absence of symptoms of crown gall in the plants treated by the antagonist bacteria, compared to positive controls which correspond to plants inoculated directly with *A. tumefaciens* strains and to negative controls treated with sterile distilled water.

Phytochemical screening revealed the presence of a few chemical groups: flavonoids, tannins, phenolic compounds and salicylates in methanolic extracts from plants treated by antagonistic strains and inoculated by strains of *A. tumefaciens*.

The colorimetric determination of Folin-Ciocalteu against the gallic acid standard revealed that the high concentrations of phenolic compounds are in the order of 12,60 µg/ml for plants treated with antagonistic strains and inoculated with pathogenic strains of *A. tumefaciens*, while that of plants treated with sterile distilled water is 6µg/ml. As well as the quantitative determination of phenolic compounds compared to the salicylic acid standard, also revealed significant concentrations in plants bacterized by antagonistic strains and inoculated by pathogenic strains, whose concentration reaches 4,80 µg/ml. While the concentration of phenolic compounds in healthy plants does not exceed 2,40 µg/ml. The optimal phenol content is observed 2 weeks after inoculation.

Our results showed the capacity of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum* to induce ISR in tomato on the basis that phenolic compounds accumulate together with a reduction in disease symptoms in treated plants, suggesting an active participation of these molecules in inhibition direct pathogen.

**Keywords:** Phenolic compounds - ISR - Antagonist – Folin Ciocalteu -*Agrobacterium tumefaciens*.

## التمثل في حمض فنولييك

### الملخص

تساهم بعض البكتيريا الضد بكتيرية في إدارة أمراض النبات ، عن طريق تحفيز الدفاعات الطبيعية في المضيف و / أو عن طريق توفير التحكم البيولوجي للكائنات الحبة التي تهاجم النبات .

الهدف من هذه الدراسة هو إظهار تحفيز المقاومة الشاملة و التحكم

البيولوجي لتدرن التاجي لطماطم (بسبب *Agrobacterium tumefaciens*)

باستخدام أربع سلالات الضد البكتيرية ينتمون إلى نوعين من البكتيريا *Bacillus spp* . و *Pseudomonas brassicacearum* ، لهذا الغرض أظهر اختبار النشاط الضد بكتيري في النبات ان هنالك انخفاضاً ، وأحياناً حتى غياب كلي لأعراض لتدرن التاجي على النباتات التي علجت بالبكتيريا الضد بكتيرية مقارنة مع الشهود الاجابية التي تتمثل في النباتات الملقحة مباشرة بالسلالات *A.tumefaciens* . و الشهود السالبة التي تتمثل في النباتات المعالجة بالماء المقطر المعقم .

كشفت الفحص الكيميائي النباتي عن وجود عدد قليل من المجموعات الكيميائية: الفلافونويدات والعفص والمركبات الفينولية والسالييلات في المستخلصات الميثانولية للنباتات المعالجة بالسلالات الضد بكتيرية و الملقحة بالسلالات *A.tumefaciens*

اظهر اختبار اللوني Folin-Ciocalteu المرتبط بمعيار حمض جاليك

أن التركيزات العالية للمركبات الفينولية هي 12.60 ميكروغرام / مل للنباتات *A.tumefaciens* التي تم علاجها بواسطة السلالات الضد البكتيرية وتم تلقيحها بالسلالات الممرضة في حين أن النباتات المعالجة بالماء المقطر المعقم هي 6 ميكروغرام / مل. وكذلك التقدير الكمي للمركبات الفينولية مقارنة بمعيار حمض الساليسيليك وكشفت تركيزات كبيرة أيضاً في النباتات المصابة من السلالات العدائية وتلقح من قبل السلالات المسببة للأمراض ، التي بلغ تركيزها 4.80 ميكروغرام / مل في حين أن تركيز المركبات الفينولية في النباتات الصحية لا يتجاوز 2.40 ميكروغرام / مل. تمت ملاحظة محتوى الفينول الأمثل بعد أسبوعين من التلقيح.

أظهرت نتائجنا قدرة *Bacillus spp* و *Pseudomonas brassicacearum* أن التحفيز

ISR في الطماطم على أساس أن المركبات الفينولية تتراكم في نفس الوقت هناك انخفاض في أعراض المرض في النباتات المعالجة، مما يشير إلى مشاركة نشطة من هذه الجزيئات في تثبيط مباشر للممرض.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، ISR، الضد البكتيري ،

## *Dédicaces*

*Grace à dieu tout puissant, je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire et plus particulièrement :*

*Ma très cher mère **Fadhila** qui m'a soutenu durant toute ma vie, et m'a appris a aimé le travail et le comportement pour son amour infini et sa bienveillance jour et nuit.*

*Merci maman*

*Mon cher père **Rachid** qui ont toujours souhaité notre réussite et qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs dans mes études et dans ma vie.*

*Merci papa*

*A mes chères frères : **Mouhamed** et **Abed Hakim***

*A mes chère sœurs : **Khira** , **Labiba** et **Sadjeya***

*A mes neveux : **Chayma** , **Harthe** , **Sara** et **Khaled** aussi me nièce : **Rawane** .*

*A mon cher oncle **Mahani** qui m'a beaucoup encouragée tout le long de ce travail.*

*A mes meilleure amies qui m'ont toujours ouvert les portes de l'espoir: **Karima** , **Meriem**, **Amina**.*

*A toute ma famille.*

*Ahlem*

## Remerciements

Avant tout propos, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donnée la capacité et la volonté jusqu'au bout pour réaliser ce travail.

Nous remercions notre promotrice Professeur .Krimi Z pour avoir dirigé ce travail et d'avoir partagé ses connaissances. Merci pour vos critiques constructives qui nous ont permis d'évoluer dans nous vision de recherche et dans la façon de la mener.

Nous remercions notre co-promotrice Dr .Djallout H pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigoureuse scientifique, sa disponibilité, ses précieux conseils, la confiance qu'elle nous a accordé et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce travail.

Nous remercions Dr. Mohamed Mahmoud F , Maître de conférences classe B, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions également Mme Alim N, Maître assistante classe A, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous adressons nos remerciements aux personnes qui nous aidé dans la réalisation de ce mémoire et spécialement au personnel du laboratoire bactériologie en particulier

Mme Ammam .S et Moataze

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail de recherche et que n'a pas cités, trouvent ici l'expression de nos remerciements les plus sincères.

\*Merci\*

## LISTE DES ABREVIATIONS

**Abs** : Absorbance.

**ANOVA** : (Analysis Of Variance).

**AS** : l'acide salicylique.

**Avr** : avirulence.

**°C** : degré Celsius.

**C58, E14, E171**: les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens*.

**CFU** : colony forming unit.

**C4H** : la cinnamate 4-hydroxylase .

**CHI** : chalcone isomérase.

**CHS** : chalcone synthase.

**4CL** : la 4-coumarate CoA ligase .

**cm** : centimètre.

**CNRS** : centre national de la recherche scientifique.

**CR2** : *Pseudomonas brassicacearum* .

**DO** : La densité optique.

**EDS** : eau distille stérile.

**EPR3** : *Pseudomonas brassicacearum* .

**Etc** : et cetera .

**fig** : Figure.

**g** : gramme.

**h** : heure.

**HCAA** : les amides des acides hydroxy-cinnamiques .

**HR** : hypersensible.

**H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>4</sub>** : l'acide phosphomolybdique.

**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : d'acide phosphotungstique .

**ISR**: Induced Systemic Resistance.

**KOH** : hydroxyde de potassium.

**LPGA** : Levure Peptone Glucose Agar.

**MeOH** : méthanol.

**min** : Minute.

**ml** : millimètre.

**MO<sub>8</sub>O<sub>3</sub>** : molybdène.

**n°** : numéro.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : carbonate de sodium.

**nm** : nanomètre.

**OS1**: *Bacillus cereus*.

**OS4**: *Bacillus methylotrophicus* .

**PAL** : La phénylalanine ammonia-lyase .

**PGPR** : plant growth promoting rhizobacteria.

**Phz** : phénazine.

**PR** : Pathogenesis Related Proteins.

**ROS** : reactive oxygen species.

**SAR** : Systemic Acquired Resistance .

**TAL** : la tyrosine ammonia-lyase.

**TMV** : Tobacco Mosaic Virus.

**Tr** : tours rotative .

**U.S.A** : united states of America.

**UV** : rayon Ultraviolet .

**W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>** : tungstene.

**μl** : microlitre.

**μg** : microgramme.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Structure de base de polyphénol.....	<b>10</b>
<b>Figure 2</b> : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des composés phénoliques.....	<b>12</b>
<b>Figure 3</b> : L'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels (salicylate de méthyle, ester glucosylé, glucoside). L'acide acétylsalicylique, principe actif de l'aspirine, est également représenté.....	<b>13</b>
<b>Figure 4</b> : Exemple de composés phénoliques identifiés chez la tomate.....	<b>16</b>
<b>Figure 5</b> : Propriétés des polyphénols.....	<b>21</b>
<b>Figure 6</b> : les graines de tomates pré-germées de 5 jours.....	<b>28</b>
<b>Figure 7</b> : plantules de tomates après repiquage.....	<b>29</b>
<b>Figure 8</b> : une blessure dans le collet d'une plantule de tomate traitée par la souche antagoniste OS4 et inoculé par la suite par une suspension bactérienne de la souche pathogène C58. .....	<b>32</b>
<b>Figure 9</b> : protocole expérimental d'extraction des composés phénoliques. ....	<b>33</b>
<b>Figure 10</b> : étape de filtration des surnageants. ....	<b>35</b>
<b>Figure 11</b> : le Réactif de Trinder. ....	<b>36</b>
<b>Figure 12</b> : Acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque). ....	<b>37</b>
<b>Figure 13</b> : Spectrophotomètre (UV-1601 SHIMADZU) .....	<b>38</b>
<b>Figure 14</b> : Protocole expérimental de dosage des phénols totaux adopté.....	<b>39</b>
<b>Figure 15</b> : Symptômes de l'infection par les souches d' <i>A. tumefaciens</i> sur le limbe foliaire de la plante kalanchoë (40 jours après l'inoculation) .....	<b>40</b>
<b>Figure 16</b> : Symptômes de l'infection par les trois souches d' <i>A. tumefaciens</i> sur les plantes de tomate trois semaines après l'inoculation. ....	<b>41</b>
<b>Figure 17</b> : Réponses des plantules de tomate (var. Saint Pierre) aux différents traitements du test d'antagonisme <i>in vivo</i> . ....	<b>42</b>

<b>Figure 18:</b> Présence les tanins catéchiques dans l'extrait de plante de tomate pour les différents traitements (1 semaine après l'inoculation). .....	<b>43</b>
<b>Figure 19:</b> Présence les flavonoïdes glycosides dans l'extrait de plante de tomate pour les différents traitements (1 semaine h après l'inoculation). .....	<b>43</b>
<b>Figure 20:</b> Présence des salicylates dans l'extrait de plante de tomate préparée à partir des plantules traités par les souches antagonistes et inoculé par <i>A.tumefaciens</i> . (2 semaine après inoculation). .....	<b>44</b>
<b>Figure 21:</b> l'absence des quinones dans l'extrait de tomate dans tous les traitements et à différents temps après l'inoculation. ....	<b>45</b>
<b>Figure 22:</b> Présence des composés phénoliques dans l'extrait de tomate 48 h après l'inoculation. ....	<b>45</b>
<b>Figure 23:</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique. ....	<b>46</b>
<b>Figure 24:</b> La teneur des composés phénoliques par rapport au standard l'acide gallique calculées pour les différents traitements après différents temps d'inoculation (l'interaction : chaque souche antagoniste/ une souche pathogène comparé au témoin négatif). ....	<b>48</b>
<b>Figure 25:</b> La teneur des composés phénoliques par rapport au standard l'acide gallique calculées pour les différents traitements après l'inoculation (l'interaction : souche antagoniste/ les souches pathogènes) comparé au témoin négatif. ....	<b>50</b>
<b>Figure 26:</b> La courbe étalonnage d'acide salicylique. ....	<b>51</b>
<b>Figure 27:</b> La teneur des composés phénoliques par rapport au standard l'acide salicylique calculées pour les différents traitements après l'inoculation (L'interaction : chaque souche antagoniste/ une souche pathogène) comparé au témoin négatif. ....	<b>53</b>
<b>Figure 28:</b> La teneur des composés phénoliques par rapport au standard l'acide salicylique calculées pour les différents traitements après l'inoculation (L'interaction : souche antagoniste/ les souches pathogènes) comparé au témoin négatif. ....	<b>54</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Les différentes classes des métabolites secondaires. ....	<b>09</b>
<b>Tableau 2:</b> Les différentes classes de composés phénoliques. ....	<b>11</b>
<b>Tableau 3:</b> Propriétés biologiques de quelques composés phénoliques. ....	<b>23</b>
<b>Tableau 4:</b> Origines des souches antagonistes utilisées. ....	<b>24</b>
<b>Tableau 5:</b> Origine des souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilisées. ....	<b>26</b>
<b>Tableau 6:</b> les différents traitements de l'essai. ....	<b>30</b>
<b>Tableau 7:</b> La teneur en composés phénoliques dans les extraits méthanoliques des plantules de tomate dans les différents temps après l'inoculation comparés à l'acide gallique (la moyenne est calculée des trois répétitions). ....	<b>47</b>
<b>Tableau 8:</b> La teneur en composés phénoliques dans les extraits méthanoliques des plantules de tomate dans les différents temps après l'inoculation comparés à l'acide salicylique (la moyenne est calculée des trois répétitions). ....	<b>52</b>

## INTRODUCTION

Parmi les nombreuses contraintes environnementales aux quelles les végétaux font face, l'agression par des agents pathogènes bactériens, fongiques ou viraux revêt une importance toute particulière. Les interactions plante-agent pathogène constituent un champ d'étude pertinent au regard des infections qui conduisent à de profonds changements métaboliques pouvant aboutir chez les végétaux à d'importantes pertes, notamment chez les plantes de grandes cultures (blé, tomate et pomme de terre). Depuis longtemps, le métabolisme secondaire des plantes a retenu l'attention des chercheurs qui ont étudié plusieurs voies métaboliques de défense à l'origine de nombreuses molécules aux propriétés antimicrobiennes (phytoalexines, phytohormones comme l'acide salicylique, glucosinolates, etc.) ou insecticides (nicotine, glucosinolates). Récemment, un intérêt certain a été porté au métabolisme secondaire qui apparaît peu à peu comme une des pièces maîtresses sur l'échiquier de la bataille plantes-pathogènes (Berger et *al.*, 2007).

L'utilisation de certains microorganismes non pathogènes en tant que biopesticides est une technologie émergente et écologiquement compatible considérée comme alternative prometteuse aux pesticides de synthèse. Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal.

Les bactéries endophytes peuvent initier l'expression de mécanismes de défense s'établissant dans tous les organes de la plante, lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une agression ultérieure. Ce phénomène, dénommé résistance systémique induite, fait appel séquentiellement à la reconnaissance par l'hôte d'éliciteurs produits par l'agent inducteur, à l'émission d'un signal requis pour propager l'état induit de manière systémique et à l'expression de mécanismes de défense *sensu stricto* qui permettent de limiter la pénétration du pathogène dans les tissus de la plante. De fait qu'elle permet de lutter contre une large gamme d'agents pathogènes (bactéries, champignons, virus, nématodes), parce qu'elle ne fait appel qu'au patrimoine génétique naturel de l'hôte végétal sans l'introduction de gènes de résistance étrangers, parce qu'elle n'est pas propice au développement de résistance chez les pathogènes (multiplicité et variété des mécanismes de défense induits), parce que l'augmentation du niveau de résistance s'établit de manière durable, l'exploitation de l'ISR constitue une des voies les plus prometteuses de traitement biologique des cultures en vue de leur protection.

Le travail de ce mémoire, tous d'abord constitue une continuation d'un ensemble de travaux réalisées au laboratoire de phytobactériologie : de magister réalisée en 2011 par Djellout,

d'ingénieur par Mekhaldi et Belkacem Koumri en 2012, ainsi que deux travaux mémoires de master réalisés par : Kirad, Dahman, Mirad et Bentouil en 2016. L'ensemble de ces travaux rentre dans le cadre de l'exploitation des bactéries endophytes, dans la réduction de la colonisation et de la sévérité de la maladie de la galle du collet *in planta* par induction d'une résistance systémique. Ces bactéries endophytes qui appartiennent à deux genres : *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. se sont révélés lors des tests du pouvoir antagoniste *in vitro* très actives dont les diamètres des zones d'inhibition dépassent les 40 mm. Aussi, elles ont prouvé leur efficacité *in vivo* à réduire voir même une absence du développement des symptômes de la formation des galles provoquée par des souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. y compris des souches d'*A. tumefaciens* sur des plantules de tomate à une concentration cellulaire donnée, comparés aux témoins positifs qui correspond aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium* spp. et aux témoins négatifs trempés dans l'eau distillée stérile.

Ces résultats sont intéressants et suggèrent une utilisation prometteuse de ces souches endophytes dans le biocontrôle. La production d'antibiotiques et la capacité des espèces de *Bacillus* et *Pseudomonas* à induire une résistance systémique chez la plante pourraient jouer un rôle important dans la suppression de la maladie du collet.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont l'objectif principal, est de contribuer à faire progresser les connaissances sur la capacité des espèces de *Bacillus* et *Pseudomonas* à induire une résistance systémique en cherchant à étudier leur effet stimulateur sur le changement du métabolisme secondaire chez les plantules de tomate: cas des acides phénoliques.

L'évaluation du potentiel d'induction de la résistance systémique des souches antagonistes et promotrices de la croissance de tomate et l'exploration des molécules responsables des activités antibactériennes, accumulées dans les tissus des plantes, lors du traitement combiné de l'agent phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* et les souches endophytes sélectionnées.

Notre étude consiste à mettre en évidence les effets de l'inoculation des graines de tomates *Lycopersicon esculentum* avec des souches de *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. De ce fait notre travail a été divisé en quatre parties : la première partie présente une synthèse bibliographique qui englobe des informations générales sur notre thème. La deuxième partie expose le matériel et méthodes utilisés pour réaliser ce travail. La troisième partie traite les résultats obtenus et leurs discussions et enfin une conclusion générale.

# Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

## 1. Pathosystème plante/pathogène

Les plantes dans leur habitat naturel sont exposées aux attaques pathogènes en activant une grande variété de mécanismes de protection (Ojha et Chatterjee, 2012). Les interactions entre la plante et l'agent pathogène impliquent l'échange d'informations. Tout d'abord, l'organisme pathogène est capable de reconnaître la plante grâce à certains facteurs portés par l'hôte (Thordal-Christensen, 2003), et ensuite de modifier son métabolisme pour fournir les conditions favorables à la pathogénicité (Alfano et Collmer, 2004 ; Chang *et al.* 2004). Parallèlement, les plantes ont évolué pour identifier des motifs associées aux pathogènes PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), pour renforcer les défenses existantes et pour développer d'autres mécanismes de défenses puissants. Ces mécanismes de défense peuvent être constitutifs, ou induits après contact avec un agent approprié (Gomez-Gomez et Boller, 2002 ; Parker, 2003).

### 1.1. Différents types d'interaction entre plante et pathogène

Il existe trois types d'interactions plante/pathogène :

- L'interaction non-hôte ou incompatible de base : la plante est protégée contre l'infection de la plupart des souches d'un espèce pathogène.
- L'interaction compatible : la plante est susceptible et peut être infectée par un pathogène virulent.
- L'interaction incompatible spécifique : elle est basée sur une relation de type gène-pour-gène ; ce type d'interaction fut défini génétiquement par Flor en 1971 dans son modèle qui permet de décrire les deux premiers types d'interactions, compatible et incompatible (Flor, 1971). Selon son hypothèse, la réaction de défense est conditionnée par l'expression simultanée d'un gène dominant d'avirulence (Avr) chez l'agent infectieux, codant pour l'éliciteur spécifique, et d'un gène dominant de résistance (R) chez la plante hôte (Staskawicz *et al.* 1995 ; Dangl et Jones, 2001). Il s'agit dès lors d'une interaction incompatible. Si l'un de ces deux allèles dominants est absent, l'interaction qui s'ensuit est de type compatible et conduit à la maladie. L'agent pathogène reconnaît donc la plante comme hôte potentiel et est capable de déclencher l'infection mais la plante peut développer rapidement une réponse prévenant sa propagation. Ainsi, l'identification précoce du pathogène avirulent lance une gamme de mécanismes de défense actifs, contribuant à ralentir ou empêcher l'infection. Cette forme de défense liée à l'interaction incompatible est caractérisée par deux types de réponses défensives inductibles qui se succèdent après l'infection initiale. La première nommée réponse hypersensible ou HR, est une défense locale et rapide. Tandis que la seconde, la résistance systémique acquise ou SAR, est systémique et à long terme (Hammond-Kosack et Jones, 1997).

Les communautés bactériennes peuvent affecter la croissance des plantes par la production de molécules biologiquement actives, comme les substances de croissance chez le pois et le haricot, une amélioration de l'assimilation de fer par la racine suivie d'une augmentation de la synthèse de chlorophylle ont été observées, grâce à la production de l'agrobactine par *Agrobacterium tumefaciens* souche B6 (Monir, 1997).

Certaines interactions induisent une résistance systémique chez les plantes. Ainsi *Pseudomonas putida* et *Serratia marcescens* entraînent une résistance chez le concombre (*Cucumis sativus*) contre le flétrissement causé par *Fusarium oxysporum* Schlechtend (Monir, 1997).

### **1.1.1. Les deux types de résistances systémiques**

Les défenses mises en œuvre par les plantes ne se limitent pas aux seules réponses locales. Les végétaux sont également capables de déployer des défenses systémiques, c'est-à-dire généralisées à l'ensemble de leurs tissus (Adam, 2008).

#### **1.1.1.1. La résistance systémique acquise ou SAR (Systemic Acquired Resistance)**

Cette résistance est stimulée à la suite d'une infection initiale par un pathogène avirulent. Cette résistance a été démontrée pour la première fois par Ross qui a constaté que suite à une première infection de plants de tabac par le TMV (Tobacco Mosaic Virus), une deuxième infection provoquait moins de dégâts au niveau de la plante entière (Ross, 1961).

Les plantes semblent donc être capables de mémoriser l'impact d'une première infection afin de se protéger face à une seconde infection. Généralement, ce type de résistance est accompagné de l'accumulation d'acide salicylique (SA) et de protéines liées à la pathogénicité (PR : Pathogenesis Related Proteins). Il peut être induit après une réponse hypersensible locale (HR), peut être associé à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et parfois à la synthèse de phytoalexines (Desender *et al.*, 2007).

L'acide salicylique, molécule synthétisée par la plante, semble être impliquée dans la signalisation et l'établissement des mécanismes de résistance à plusieurs contraintes environnementales (Korkmaz *et al.*, 2007).

Son application exogène à des plantes sous différents stress a été étudiée par plusieurs chercheurs et son rôle dans l'activation de la germination, de la croissance sous stress salin a été signalé chez le blé (Arfan *et al.*, 2006), l'orge (El tayeb, 2005) et le maïs (Gunes *et al.*, 2005).

Cette molécule joue un rôle important dans la défense des plantes contre les deux conditions de stress, biotiques et abiotiques (Ünlü *et al.*, 2009).

#### **1.1.1.2. La résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)**

Cette résistance est stimulée par certaines rhizobactéries non-pathogènes (PGPR). Ces rhizobactéries sont capables de réduire une maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante (Van Loon et *al.*, 1998). L'induction d'une telle capacité de défense est systémique : le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries induisant l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus (Ramamoorthy et *al.* 2001). La preuve du rôle d'une souche de PGPR en tant qu'inducteur de l'ISR dans la réduction d'une maladie est obtenue en garantissant une séparation spatiale de l'agent pathogène et de l'agent inducteur de la résistance, afin d'exclure toute interaction antagoniste (Bakker et *al.*, 2007).

## **1.2. Interactions entre la flore microbienne**

Différentes interactions antagonistes s'installent entre les communautés de la flore rhizosphérique, elles peuvent être résumées à l'antagonisme et la compétition.

### **1.2.1. Antagonisme**

#### **1.2.1.1. Antibiose**

C'est une forme d'antagonisme qui a lieu quand une espèce bactérienne ou fongique sécrète des substances toxiques pour les espèces situées à sa proximité. Ainsi, les substances antifongiques peuvent induire un effet fongistatique, fongicide ou mycolytique.

*Pseudomonas fluorescens* souche 2-79 est capable de neutraliser le piétin échaudage du blé grâce à la production d'un antibiotique, l'acide phénazine 1-carboxylique (Kim et *al.*, 1999). Ce composé inhibe la croissance de 1 µg/ml les mutants Tn5 non producteurs de phénazine (Phz) ne sont plus capables d'inhiber ce phytopathogène *in vitro*, comme ils protègent mois contre le piétin échaudage du blé, même s'ils sont aptes à coloniser le système racinaire de la plante hôte, avec la même efficacité que la souche-mère (Kim et *al.*, 1999).

Les genres *Bacillus*, *Streptomyces* ou des *Stenotrophomonas* sont aussi capables de produire l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine A ou xanthobacine (Ligon et *al.*, 2000). Ces composés de haut poids moléculaires, sont capables à faibles doses d'interférer avec la sporulation et la croissance mycélienne d'un large spectre de champignons (Flaishman et *al.*, 1990).

L'implication de la production des antibiotiques dans le phénotype d'inhibition de la croissance d'agents pathogènes, a été confirmé en comparant les souches productrices de ces substances à des mutants déficients. Ainsi, la pseudomycine (Kempf et Wolf, 1989), l'herbicoline A (Flaishman et *al.*, 1990) et la wianine (Howell, 1998) ont été reconnues comme substances antagonistes.

Certains champignons antagonistes ont également à l'antibiose. C'est en particulier le cas des espèces appartenant aux genres *Trichoderma spp.* et des *Gliocladium spp.* qui produisent certains composés qualifiés d'antifongiques (Joshi, 2006). D'autres métabolites produits par certains champignons participent à leurs activités antagonistes. Il s'agit des enzymes glucanases et chitanases qui sont capables d'hydrolyser les constituants de la paroi des champignons ciblés. En plus de leur action directe sur les organismes cibles, ces enzymes interviennent dans les modes d'action indirectes car elles sont impliquées dans les mécanismes d'induction de la résistance (Joshi, 2006).

La production des antibiotiques a été observée chez les bactéries *Erwinia herbicola*, qui est un agent de lutte biologique important contre *Erwinia amylovora*. Les peptides antibiotiques ont typiquement un large spectre d'action et sont résistants aux peptidases et protéases d'origine végétale ou animale, contrairement aux bactériocines qui sont des structures antibactériennes ayant un effet inhibiteur spécifique, sur des organismes étroitement apparentés (Rayder et Jones, 1990).

#### **1.2.1.2. Parasitisme**

Certains microorganismes, de la lutte biologique sont capables de produire des enzymes hydrolytiques (Chitinases,  $\beta$ -1,3 –glucanases ou cellulases) pouvant dégrader les constituants pariétaux des cellules fongiques. L'altération de ces parois conduit à la lyse des cellules et inhibe ainsi le développement du champignons (Benjama et al., 2004). Ce mécanisme est fréquemment rencontré chez les champignons, tels que *Gliocladium sp.* et *Trichoderma sp.* (Pleban et al., 1997). Certaines études ont montré une corrélation entre la production d'enzymes chitinolytiques par les bactéries du genre *Bacillus sp.*, *Lysobacter sp.*, *Paenobacillus sp.*, *Pantaeo sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptomyces sp.* et la capacité de ces souches à inhiber la croissance des champignons du sol ; *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* et *Bipolonia sorokiniana* (Palumbo et al., 2005).

Les exemples les plus classiques dans la lutte biologique contre les maladies sont le parasitisme de certaines souches de *Trichoderma spp.* vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* et celui de *Coniothyrium minitans* vis-à-vis des champignons à sclérote et en particulier *Sclerotinia minor* et *Sclerotinia sclerotiorum*. La conséquence de ce parasitisme est une diminution de la densité de l'inoculum primaire de l'agent pathogène *Coniothyrium minitans* (Regnault et al., 2005).

#### **1.2.2. Compétition**

Park (1960), définit la compétition comme la réduction de croissance résultant de la lutte entre organismes pour les nutriments, la niche écologique ou tout autre facteur environnemental. Elle constitue un mécanisme fortement impliqué dans la suppression de nombreux pathogènes (Buysenes et al., 1996).

La compétition pour le fer par certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* est la plus documentée. Elle implique la production de différents sidérophores moléculaires chélatrices du fer et servant de transporteur de l'ion ferrique à l'intérieur de la cellule bactérienne (Maziane et *al.*, 2005). Les souches bactériennes les plus compétitives sont connues par leur capacité à produire des sidérophores ayant une très grande affinité pour le fer, telle que la pyoverdine (sidérophore fluorescent). Il existe aussi d'autres sidérophores non fluorescents comme la pyochéline et la pseudomonique possédant une plus faible affinité pour le fer par rapport à la pyoverdine. La compétition pour le fer est démontrée par la détection de gènes de spécifiques. L'activité protectrice contre *Botrytis cinerea* d'une souche mutante de *Pseudomonas putida* (WCS358), incapable de produire des sidérophores, est fortement diminuée chez la tomate (Haas et Kell, 2003). L'efficacité d'une lutte biologique *via* le phénomène de compétition pour le fer semble être surtout importante dans des conditions limitantes en fer.

## **2. Les métabolites secondaires**

Dans le règne végétal, la diversité des métabolites secondaires est estimée entre 200 000 et un million (Fiehn, 2002 ; Dixon et Strack, 2003 ; Bino et *al.*, 2004). A noter qu'ils sont souvent spécifiques d'une famille, voire d'une seule espèce végétale. Cette diversité est probablement le résultat de mécanismes d'adaptation génétique des plantes à leur environnement, y compris aux réponses aux stress abiotiques et biotiques (Bednarek et Schulze-Lefert, 2009).

Les stress biotiques et abiotiques peuvent induire un dysfonctionnement cellulaire allant jusqu'à la mort des cellules. Face à ces stress, les plantes ont développé des mécanismes cellulaires de réponse aux stress particulièrement flexibles qui leur permettent de s'adapter efficacement. La résistance des plantes aux stress biotiques et abiotiques est un caractère multigénique qui dépend de la combinaison d'un grand ensemble de gènes, de protéines et de voies métaboliques qui agissent de concert (Chaves et *al.*, 2002).

### **2.1. Définition des métabolites secondaires**

Le métabolisme secondaire implique les voies métaboliques primaires spécifiques à certains organismes végétaux. Le métabolisme secondaire sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt intervenaient dans les relations avec les

stress biotiques et abiotiques ou améliorent l'efficacité de la reproduction (Aissous et Bechara, 2016).

Les composés de métabolisme secondaire ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultant de réactions chimiques ultérieures. Ces composés ne se trouvent pas dans toutes les plantes (Aissous et Bechara, 2016). Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées. Elles sont classés selon leur appartenance chimique en : composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes (Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006)

## 2.2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes (Tableau 1). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés (Krief ,2003).

**Tableau 1 : Les différentes classes des métabolites secondaires (Krief ,2003).**

Les Classes des métabolites secondaires		
Les métabolites secondaires	Les composés phénoliques	- <u>tanins</u>  - <u>lignine</u> ,  - <u>flavonoïdes</u>
	les composés azotés	- <u>glucosinolates</u>  - <u>alcaloïdes</u>  - <u>bétalaïne</u>  -hétérosides cyanogènes

	<b>les <u>terpènes</u></b>	<u>-monoterpènes</u> <u>-sesquiterpènes</u> <u>-diterpènes</u> <u>-triterpènes</u> <u>-tétraterpènes</u> <u>-polyterpènes</u>
--	----------------------------	--

## 2.3. Les composés phénoliques

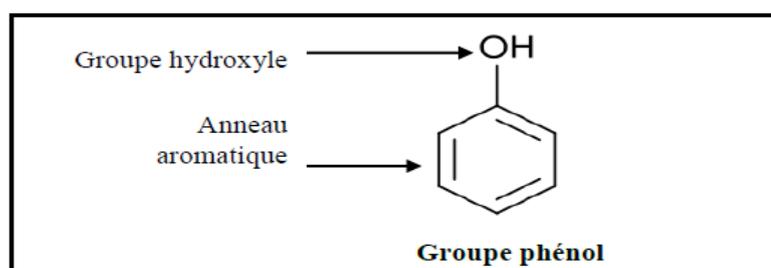
### 2.3.1. Définition

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Yusuf, 2006).

Les composés phénoliques constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10 000 composés ont été caractérisés. La plupart des composés phénoliques sont formés à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout de la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façon variable suivant les végétaux (Guignard, 2000).

### 2.3.2. Structure chimique

La structure chimique des composés phénoliques est caractérisée par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les composés phénoliques sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relient (Fig1) (Boros *et al.*, 2010).



**Figure 1** : Structure de base de polyphénol.

### 2.3.3. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent plusieurs milliers de molécules caractérisées chez les végétaux (Clé et *al.*, 2008). Ils peuvent se regrouper en plusieurs classes selon la complexité du squelette carboné, le degré de modification de ce squelette (méthylation, hydroxylation...) (Royer, 2013) (Tableau2).

**Tableau2 : Les différentes classes de composés phénoliques d'après Macheix et *al.*, (2005).**

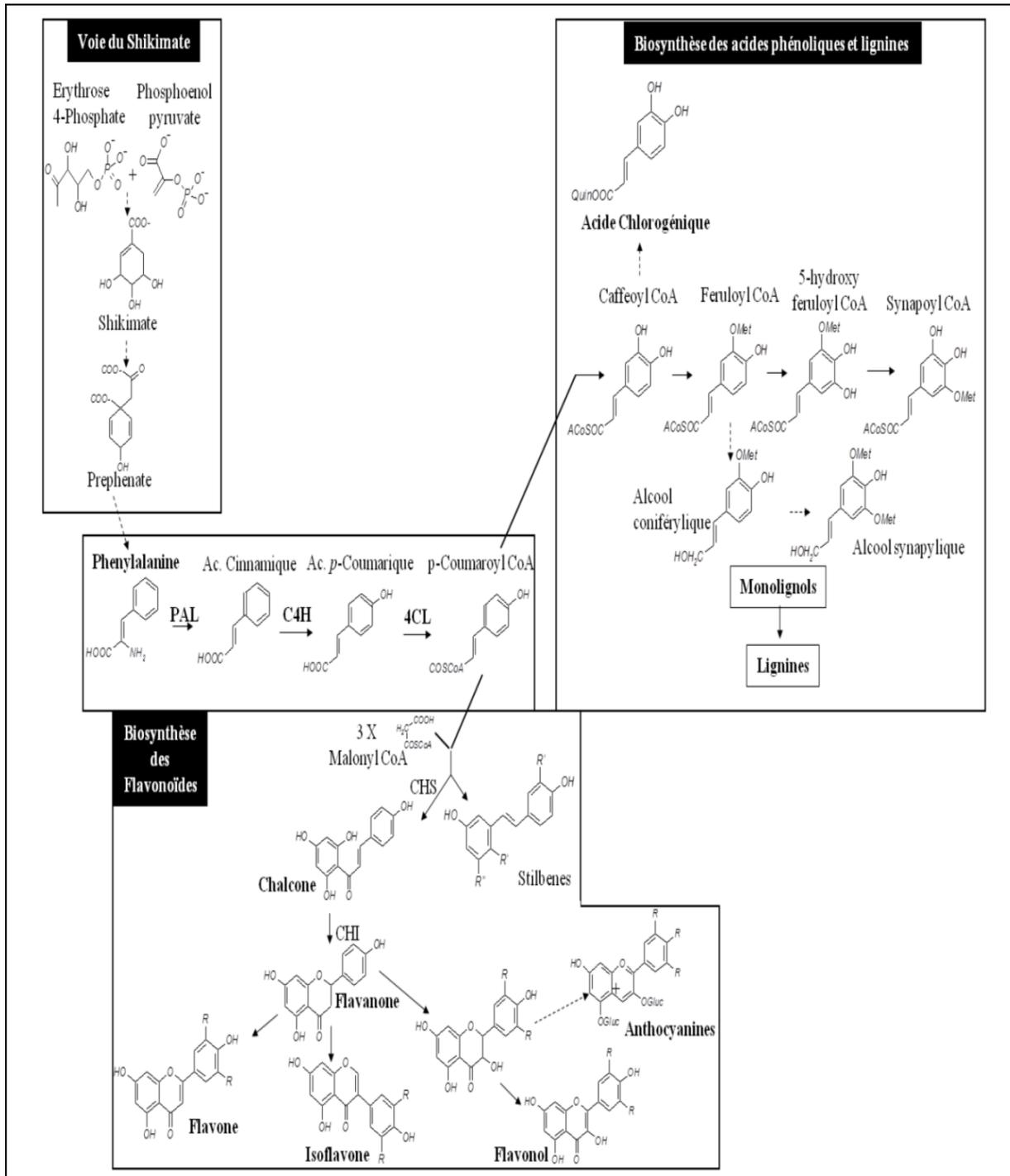
Squelette carboné	Nom de la classe	Exemple	Plante alimentaire
C6	Phénols simples	Acide gallique Catéchol	tomate
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	P- Hydroxybenzolque	Epices, fraise
C6-C3	A.Hydroxycinnamiques	<u>Acide</u> <u>paracoumarique</u>	Tomates, ail
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine	Mangue
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Quercetol, cyanidol	Fruits, légumes
(C6-C3) n	Lignines		fruits à noyaux
(C15) n	Tannins		Raisin rouge, Kaki

#### 2.3.4. Voies de biosynthèse des composés phénoliques

La biosynthèse des composés phénoliques du tomate, largement décrite dans la littérature, il dérive de la voie du shikimate et de la voie des poly- $\beta$ -cétoesters (trois unités malonyl CoA) pour l'élaboration de l'unité phloroglucinol (Fowler et Koffas ,2009).

La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et la tyrosine ammonia-lyase (TAL) catalysent la désamination non-oxydative de la phénylalanine et de la tyrosine pour donner respectivement l'acide cinnamique et l'acide p-coumarique.

L'addition d'un groupement hydroxyle en position 4 du noyau aromatique de l'acide cinnamique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) permet également de former l'acide *p*-coumarique. Sous l'action de la 4-coumarateCoA ligase (4CL), l'acide *p*-coumarique peut former le *p*-coumaroyl-CoA, précurseur des voies de biosynthèse des flavonoïdes, isoflavonoïdes, acides hydroxycinnamiques, dihydrochalcones, lignines et tanins (fig2).



**Figure 2** : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des composés phénoliques (Royer, 2013).

PAL : phénylalanineammonia-lyase. C4H : cinnamate 4 hydroxylase. 4CL : 4-coumarate CoA ligase.

CHS : chalcone synthase. CHI : chalcone isomérase.

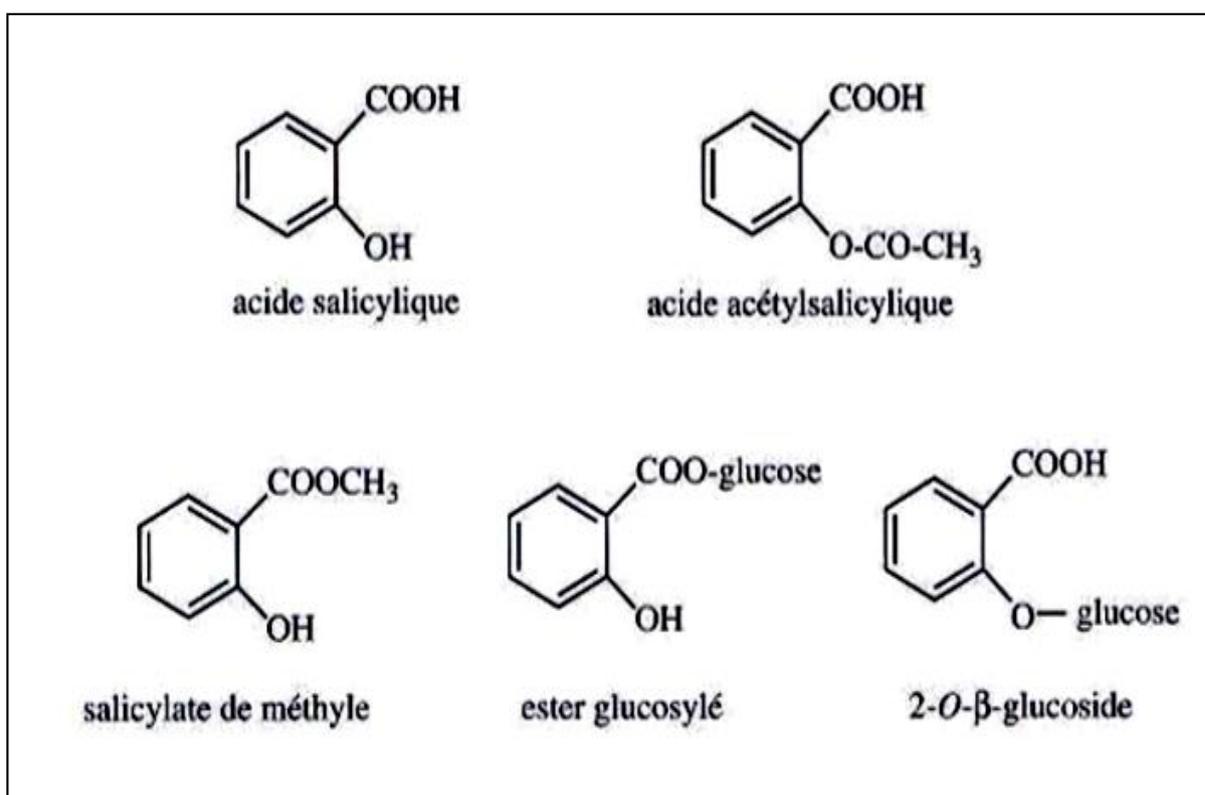
### 2.3.4.1. Les acides phénoliques

L'acide *p*-coumarique est transformé en *p*-coumaroyl CoA, réaction catalysée par l'enzyme 4-coumarate CoA ligase (4CL). De cette molécule, par hydroxylation, méthylation et réduction, se créent de nombreux composés : acides férulique, sinapique et caféique par exemple. Ces composés phénoliques sont très souvent sous forme conjuguée à d'autres molécules organiques impliquant la fonction carboxylique, la conjugaison de ces composés phénoliques avec du glucose

ou différents alcools-acides (acides quinique, malique...) crée des esters. L'ester d'acide caféique avec l'acide quinique est l'acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique), l'ester d'acide caféique le plus fréquemment rencontré (Macheix *et al.*, 2005; Morot-Gaudry, 2012). Leur conjugaison avec des mono ou des di-amines (tyramine, putrescine...) conduit à des phénolamides (ou des amides des acides hydroxy-cinnamiques : HCAA). Ces HCAA sont la conjugaison des acides hydroxy-cinnamiques (tels que l'acide *p*-coumarique ou l'acide férulique) avec des polyamines (tels que la tyramine, la putrescine, l'octopamine...).

L'acide salicylique est un régulateur de croissance endogène de nature phénolique, qui participe à la régulation des différents processus physiologiques chez les plantes (Raskin, 1992).

L'acide salicylique fait partie des acides hydroxy-benzoïques, qui sont dérivés de l'acide benzoïque (fig3) et ont une formule de base de type C6- C1 (Macheix *et al.*, 1990).



**Figure 3 :** L'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels (salicylate de méthyle, ester glucosylé, glucoside). L'acide acétylsalicylique, principe actif de l'aspirine, est également représenté (Sebane, 2014).

#### 2.3.4.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont définis par leur squelette de base constitué de deux cycles aromatiques à 6 atomes de carbone connectés entre eux par un hétérocycle à 3 atomes de carbone (C6-C3-C6) (Bovy *et al.*, 2007). Selon les modifications de l'hétérocycle, ces composés sont regroupés en divers sous-groupes incluant les anthocyanidines, les flavonols, les flavones, les flavanols, les flavanones, les chalcones, les isoflavonoïdes (Treutter, 2006). Leur synthèse débute par la

formation de *p*-coumaroylCoA catalysée par la 4-coumarate-CoA ligase (4CL) à partir de l'acide *p*-coumarique. A cette molécule de *p*-coumaroyl-CoA sont ajoutés 3 molécules de malonyl-CoA aboutissant à la formation d'une chalcone catalysée par l'enzyme chalcone synthase (CHS) (Morot-Gaudry, 2012).

#### **2.3.4.3. Les lignines**

Les lignines résultent d'une polymérisation d'alcools cinnamyliques : les monolignols (alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique). Ces monolignols dérivent du *p*-coumaroyl-CoA par une série de réactions impliquant des hydroxylases, des Co-A ligases, des méthylases, des réductases et des déshydrogénases. Les lignines sont des molécules de fin de chaîne de la voie de biosynthèse des composés phénoliques.

La lignine est indispensable au maintien des plantes et à leur développement. Par ailleurs, cette molécule découle de la voie de biosynthèse des composés phénoliques et est, par sa présence dans les parois cellulaires, le premier rempart aux attaques de bioagresseurs. De ce fait, son caractère primaire ou secondaire est difficile à définir (Macheix et *al.*, 2005). Son rôle actif dans la défense des plantes (Royer, 2013).

#### **2.4. Localisation des composés phénoliques dans les plantes**

À l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Beaucoup des composés phénoliques sont toxiques, ils sont alors stockés dans des vésicules spécifiques ou dans des vacuoles (Machiex et *al.*, 1990).

Dans les vacuoles, les composés phénoliques sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales (Bénard, 2009).

Une des caractéristiques des composés phénoliques, qu'ils partagent généralement avec l'ensemble des métabolites secondaires, est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et, pour une même espèce, selon la variété et le stade d'évolution physiologique (Fleuriet et Macheix, 2003).

La répartition des composés phénoliques montre également des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement (Machiex et *al.*, 2005).

Les variations qualitatives et quantitatives des composés phénoliques peuvent être particulièrement marquées au cours de la vie de la plante (Machiex et *al.*, 1990).

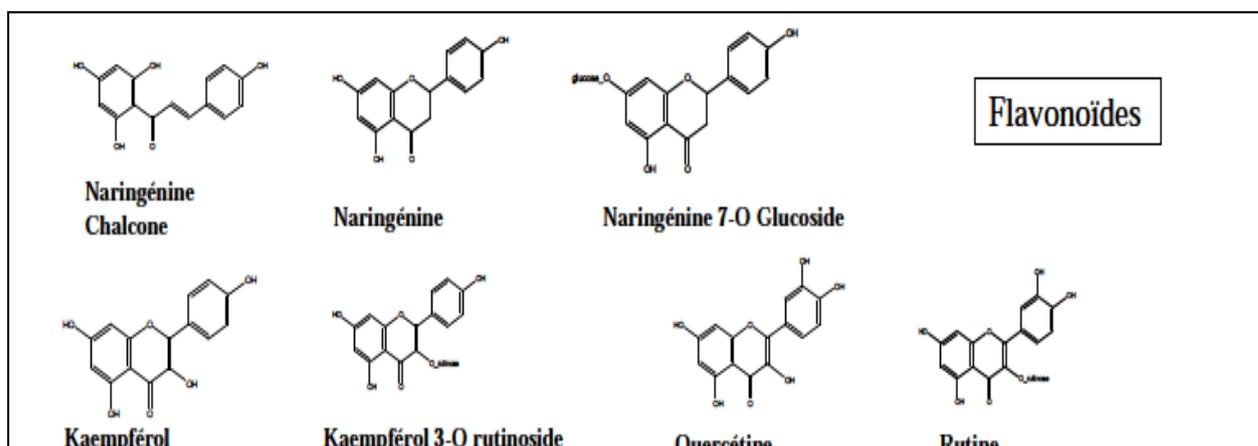
Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique où elles sont organisées en métabolons (Winkel, 2004 ; Macheix et *al.*, 2005).

D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ne présentent pas des lieux d'accumulation (Macheix et *al.*, 2005).

Au sein même des feuilles, la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme (Tomas- Barberan et Espin, 2001; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (Tomas-Barberan et Gil, 2008). A l'échelle tissulaire, des répartitions très inégales des différents composés phénoliques. Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux, en particulier les épidermes des fruits et des feuilles (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

#### 2.4.1. Les composés phénoliques de la tomate

L'acide chlorogénique, la rutine et le kaempferol- rutinoside sont les principales molécules observées dans les extraits de feuille de tomate (Le Bot et *al.*, 2009). L'acide chlorogénique est le composé phénolique majeur dans les feuilles (2% de masse sèche). Dans les racines, l'acide chlorogénique est le composé phénolique majeur détecté (Larbat et *al.*, 2012) (Fig4).



**Figure 4 :** Exemple de composés phénoliques identifiés chez la tomate (Bénard. 2009).

Cependant les feuilles renferment des quantités importantes de composés phénoliques (Stout et *al.*, 1998). L'acide chlorogénique et la rutine semblent être les composés les plus abondants (Wilkens R T et *al.*, 1996). Comparativement (Stewart et *al.*, 2001) ont quantifié environ dix fois plus de flavonols dans les feuilles que dans les fruits de tomate (Stewart et *al.*, 2001).

La composition phénolique des fruits de tomates évolue avec la maturation du fruit (Gautier et *al.*, 2008), et elle varie également quantitativement et qualitativement suivant les cultivars étudiés, les tomates cerises étant généralement les plus riches (Raffo et *al.*, 2002). Fleuriet et Macheix (1981) ont montré que l'acide chlorogénique (ester de l'acide caféique avec l'acide quinine) était un des dérivés d'acide hydroxy-cinnamique prédominant durant la croissance et la maturation du fruit de tomate.

## **2.5. L'accumulation des composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont connus pour jouer un rôle majeur dans le mécanisme de défense des plantes contre divers agents infectieux externes (Anita et Samiyappan, 2012). La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Rees et Harborne, 1985).

Parmi tous les composés phénoliques qui pouvant être impliqués dans la résistance des végétaux aux parasites, l'acide salicylique peut être présent sous plusieurs formes dans la plante : d'abord l'acide lui-même, plus ou moins dissocié selon le pH du milieu, ensuite sous forme d'un  $\beta$ -glucoside qui est probablement une forme de stockage, enfin le salicylate de méthyle qui pourrait

être un signal volatil relâché dans l'air ambiant. Bien qu'il puisse intervenir directement, au même titre que les autres composés phénoliques, dans la résistance des plantes aux micro-organismes, l'acide salicylique joue simultanément un rôle important comme messenger intracellulaire déclenchant l'induction de l'ensemble des mécanismes qui permettent à la plante de se défendre vis-à-vis, des champignons ou des bactéries (Kunkel et Brooks, 2002).

Par ailleurs, il existe généralement une bonne corrélation entre la capacité de résistance de la plante et sa teneur en acide salicylique (Gozzo, 2003). L'acide salicylique joue un rôle primaire pour induire l'expression de nombreux gènes, qu'il s'agisse ou non de gènes du métabolisme phénolique. La conséquence en est l'activation des systèmes de défense de la plante, se traduisant par l'accumulation de composés phénoliques et la mise en place des protéines PR (Ryals et al., 1996).

L'accumulation des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes a été démontrée chez de nombreuses espèces et dans différentes situations de stress biotique (War et al, 2011), spécialement, dans les sites infectés et jouant un rôle toxique pour les pathogènes (Ojha et Chatterjee, 2012). Aussi sous les conditions abiotiques (Korkmaz et al., 2007), leur rôle dans la stimulation de la résistance chez les légumineuses a été démontré (Dakora et Philips, 1996).

Marfek, (2003) et Boukraâ (2016) ont indiqué que certains flavonoïdes jouent le rôle de phytoalexines, qui sont fortement synthétisées par les feuilles des plantes suite à une infection par les pathogènes ou les bactéries.

Arbia et al, (2006) ont signalé l'effet significatif des isoflavones dans la réduction de la croissance des pathogènes en causant des changements dans les mycéliums et la désorganisation des cellules. Harborne (1999) suggère que la capacité d'une plante à résister dépend de son taux de composé phénolique. Alors que, Suprakash et al., (2012) ont signalé que l'activité du polyphénol oxydase atteint son maximum, suite au traitement d'une plante par le *F.oxysporum* et l'SA.

Tandis que les taux des tannins ont diminué en présence de l'SA ; ces composés font parties des composés phénoliques pariétales ; Au cours de la résistance, les cellules ont leurs parois renforcées par des dépôts de callose, de lignines et d'autres composés phénoliques pariétales (Dihazi, 2012). Ces derniers constituent une barrière de défense qui protègent les parois, en inhibant les enzymes nécessaires à la pénétration du pathogène à travers la cuticule des plantes (Bostock et al., 1999).

La SAR, induite par un agent pathogène incompatible, est notamment caractérisée par une accumulation d'acide salicylique (SA) (Van Loon et Van Strien 1999). L'accumulation de SA se produit localement et systématiquement, indiquant que le SA est une molécule essentielle au développement de cette résistance (Van Loon et al., 1998).

Contrairement à la SAR, l'induction de l'ISR dans les plantes par des PGPR est souvent indépendante du SA (Ryu *et al.*, 2003). Cependant, certains exemples de l'ISR liée au SA ont été de temps en temps rapportés (Bargabus *et al.*, 2004). L'acide salicylique est un composé phénylpropanoïde majeur qui influence la résistance des plantes aux pathogènes et probablement à d'autres facteurs de stress (Ojha et Chatterjee, 2012).

La répartition des composés phénoliques montre également des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement (Macheix *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques fournissant une résistance aux maladies était le cas des écailles d'oignon accumulant des quantités suffisantes de catéchol (I) et d'acide proto-catéchuique (II) pour prévenir la maladie des taches d'oignon, *Colletotrichum circinans*. Les écailles colorées des oignons résistants contiennent suffisamment de ces deux phénols pour réduire la germination des spores de *C. circinans* à moins de 2%, tandis que les variétés sensibles manquent de ces composés et le taux de germination est supérieur à 90% (Vincenzo Lattanzio *et al.*, 2006). Des niveaux adéquats d'acide chlorogénique (III) expliquent la résistance des tubercules de pomme de terre contre *Streptomyces scabies*, *Verticillium alboatrum* et *Phytophthora infestans* (Vincenzo Lattanzio *et al.*, 2006), tandis qu'à faibles concentrations, il stimule la croissance de *P. infestans* et de *Fusarium solani var. coeruleum*. De faibles concentrations de benzaldéhyde (IV) inhibent totalement la germination des spores de *Botrytis cinerea* et la germination de *Monilia fructicola* (Vincenzo Lattanzio *et al.*, 2006).

## 2.6. Rôles des composés phénoliques

Les plantes ont besoin de composés phénoliques pour la pigmentation, la croissance, la reproduction, la résistance aux pathogènes et beaucoup d'autres fonctions. Par conséquent, ils représentent des caractères adaptatifs qui ont été soumis à des sélections au cours de l'évolution (Vincenzo *et al.*, 2006). Ils peuvent en effet intervenir dans : la fertilité, la signalisation et la protection contre des agents biotiques et abiotiques et encore la formation de polymères structuraux comme la lignine (Macheix *et al.*, 2005) .

Le SA exerce un rôle dans des phénomènes physiologiques comme la photosynthèse, la floraison, la perméabilité de la membrane, la production de chaleur, la croissance et développement des plantes, et les interactions plantes – pathogènes (Hayat *et al.*, 2007).

La présence des flavonoïdes ainsi d'autres composés phénoliques dans quasiment toutes les parties du végétal, confère une protection considérable à la plante (Madi, 2010). Les flavonoïdes sont parmi les métabolites secondaires les plus actifs chez les plantes, ils sont secrété

par les légumineuses et interviennent dans la fixation de l'azote nodulaire (Sreevidya *et al.*, 2006 ; Samba *et al.*, 2006).

Les composés phénoliques assurent la survie dans les différentes conditions environnementales (climat, sols, sécheresse, rayon UV...). Ces métabolites sont doués de plusieurs rôles au sein de la plante, dont on peut citer (Madi, 2010).

#### ➤ **La lutte contre les agents pathogènes**

Des recherches récentes ont démontré que la teneur en composés phénoliques s'accroît si la plante est agressée par des bactéries, champignons, ou autres comme les rayons UV et l'élévation de la température, cela confirme qu'ils ont un rôle important dans la défense de la plante (Mohammedi 2006 ; Piquemal, 2008).

Le mécanisme de défense des composés phénoliques lors de l'attaque d'un pathogène est élucidé par des expériences déjà faites sur des espèces d'arbre qui est résumé comme suit ;

\_ Une fois le pathogène a pu s'intégrer à l'intérieur de l'hôte, ceci aboutit à la mise en place d'un épiderme interne délimitant une zone périhaustoriale. Dans cette région s'accumulent des composés phénoliques et plus particulier des flavonoïdes.

\_ Dès ce stade s'installe une compétition entre deux phénomènes qui sont d'une part la force de pénétration du pathogène ; cela est lié à la capacité et l'intensité prolifératrices de ses cellules. Et d'autre part les capacités de synthèse des flavonoïdes par les cellules de l'hôte. Si c'est la force de pénétration du pathogène qui l'emporte, celui-ci envahit rapidement les tissus de l'hôte.

Dans le cas contraire, les capacités de synthèse des composés phénoliques qui l'emporte, ils s'accumulent dans la zone périhaustoriale et forment un manchon qui isole totalement ce pathogène. Ce dernier se trouve bloquer dans sa progression. Par la suite, d'autres systèmes de défense qui interagissent pour l'élimination totale du pathogène (Lepoivre, 2003).

#### ➤ **L'astringence et le goût**

L'astringence est la sensation tactile provoquée par l'ingestion de nombreux aliments, du cacao au thé, du vin rouge aux noix, derrière cette perception de râpeux ou de sécheresse, se cachent des composés phénoliques.

Il s'agit plus précisément des pro-anthocyanidines ou tannins condensés, des polymères de flavanols qui contribuent aussi à l'amertume. D'un point de vue chimique, ces composés phénoliques provoquent la précipitation des protéines salivaires, entraînant avec elles leur cortège de molécules d'eau qui lubrifie alors la muqueuse buccale (Guggenbühl, 2003 ; Mohammedi, 2006).

#### ➤ **La couleur de la plante**

La coloration des fleurs, fruits, et des feuilles de la plante est due à la présence des substances organiques colorantes ; qui absorbent seulement certaines longueurs d'onde de la lumière et émettent celle que nous percevons comme la couleur des fleurs. Ainsi, les pétales bleus

possèdent les pigments qui reflètent la lumière bleue et absorbent les autres composantes du spectre (Madi ,2010).

Ces pigments sont essentiellement la chlorophylle, les composés phénoliques flavonoïde, acides phénol,...), les caroténoïdes. Les pigments floraux les plus courants et les plus abondants sont les flavonoïdes, dont les anthocyanes, qui couvrent une grande gamme de couleur du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune, par contre les caroténoïdes donnent l'orange et le jaune. Ces deux types de pigments peuvent d'ailleurs coexister, ce qui donne une large gamme de couleurs (Madi ,2010). Les facteurs qui peuvent influencer la couleur apparente sont :

**-L'acidité** : Le pH varie dans les vacuoles de 2,5 à 7,5. La cyanidine (anthocyane), prendra une coloration rouge en milieu acide, violette en milieu neutre et bleue en milieu basique (Madi ,2010).

**-Le degré d'hydroxylation du cycle B** : L'effet de "bleuissement" s'accroît au fur et à mesure avec l'oxydation (Piquemal, 2008).

#### ➤ **L'attraction et la pollinisation**

Ces métabolites secondaires : composés phénoliques et flavonoïdes interagissent aussi dans le phénomène d'attraction, la couleur de la plante est considérée comme un signal visuel aux insectes pollinisateurs. Dans certains cas, les flavonoïdes servent pour éloigner les prédateurs. Il existe même des flavonoïdes qui sont toxiques pour certains insectes qui sont néfastes pour la plante (Marfak, 2003 ; Mohammedi, 2006).

#### ➤ **Attribution à la croissance de la plante**

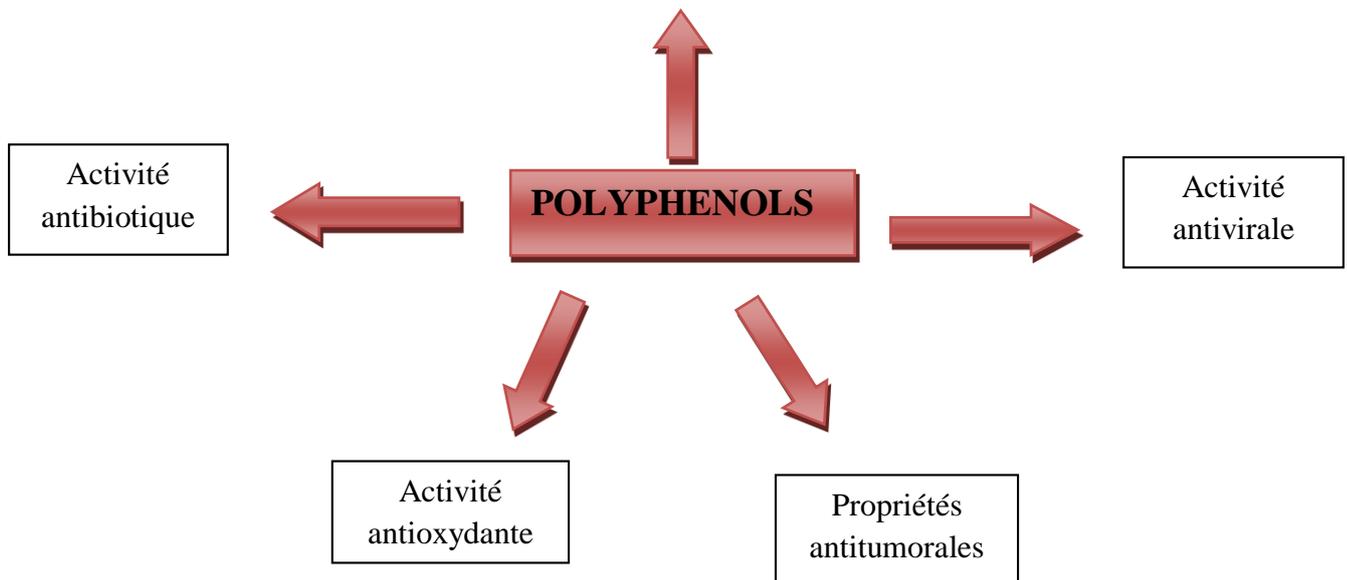
L'intervention des composés phénoliques dans le développement et la croissance de la plante n'est pas confirmée jusqu'à maintenant, car les recherches établies dans ce sujet ont mené à des résultats différents. L'un confirme cette hypothèse et d'autres la refusent (Madi ,2010).

### **2.7. Les propriétés biologiques des composés phénoliques**

Les propriétés antioxydants des composés phénoliques participent à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydant et le vieillissement cellulaire, les composés phénoliques peuvent modifier la disponibilité de l'azote en complexant les protéines (Vincenzo et al., 2006). Des composés phénoliques sont hautement toxiques pour les champignons envahisseurs (Thangeswari et Sankaralingam, 2013).

La capacité antioxydant est le principal rôle physiologique attribué aux composés phénoliques (Diallo, 2005 ; Navarro et al, 2008). L'action antioxydant d'un composé phénolique peut être issue d'une combinaison d'évènements chimiques, dont l'inhibition enzymatique, la chélation de métaux, adsorption et la neutralisation des radicaux libre, attraction d'un O- ou encore la donation d'hydrogène et l'oxydation en un radical stable par sa décomposition du peroxyde d'hydrogène (Ouafa , 2012) (Fig 5).

Activité enzymatique et hormonale
---



**Figure 5** : Propriétés des polyphénols (Uthurry et *al.*, 2011).

### 2.7.1. Propriété antioxydant

C'est la capacité de capter ou de piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant.

#### a) Radicaux libres

Par définition, sont des entités chimiques possédant un électron non apparié « célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron célibataire a naissance suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour entraîner la rupture des liaisons entre les électrons. (Hadi, 2004 ; Boutabet, 2007).

Les radicaux libres sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, protéines cellulaires, les acides nucléiques, et ainsi provoquant la mort cellulaire (Marfak, 2003 ; Boutabet, 2007).

#### b) Stress oxydatif

Dans l'organisme, la production des radicaux libres est contrôlée par les systèmes de défenses. En conditions normales, on assiste à un équilibre de la balance antioxydants antioxydants/prooxydants (Mohammedi, 2006). Une fois cet équilibre est affecté par une augmentation de la production d'oxydants ou par une altération dans la défense antioxydant, on assiste à ce qu'on appelle « stress oxydatif » (Lahoual, 2004 ; Boutabet, 2007).

#### c) Les ROS (reactive oxygen species)

Ces espèces constituent l'ensemble des dérivés des radicaux de l'oxygène. Il existe plusieurs formes de ces espèces dont les plus importantes sont les suivantes :

- L'anion superoxyde

- Le radical hydroxyle : OH•

- Le radical peroxyde : ROO•

### 2.7.2. Propriété antibactérienne, antifongique et antivirale

Les plantes ont une capacité intrinsèque à synthétiser des métabolites secondaires dont certains sont des composés aromatiques de types phénols. Ces composés jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte contre les champignons, bactéries et virus. Ces propriétés antifongiques et antivirales trouvent de nombreuses applications en médecine humaine (Xia et *al.*, 2011).

Il a été reporté que les raisins *Vitis vinifera* possèdent des propriétés pharmacologiques importantes, et en particulier des activités antimicrobiennes grâce à la présence de nombreux polyphénols, notamment d'acide gallique, d'acide hydroxy-cinammique, de flavanols, de flavonols, et de tanins (Nassiri-Asl et Hosseinzadeh, 2009).

Les principales activités biologiques des composés phénoliques sont résumées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 3** : Propriétés biologiques de quelques composés phénoliques (Derradji-Benmeziane, 2015).

<b>Polyphénols</b>	<b>Activité biologique</b>	<b>Auteurs</b>
Acides phénol (cinnamiques et benzoïque)	-Antibactérienne,  -Antiparasitaire, antifongique,  -Antioxydant	-Sannomiya et <i>al.</i> , 2005 ;  -Barros et <i>al.</i> , 2007 ;  -Gurbuz et <i>al.</i> , 2009.
Coumarines	-Anticancérigène, anti- inflammatoire.	-Kostova, 2005
Flavonoïdes	-Antioxydant	-O'Byrne et <i>al.</i> , 2002.
Anthocyanes	-Antioxydant	-Revilla et Ryan. 2000 ; Cisse et <i>al.</i> , 2009 ..
Tanins galliques et catéchiques	-Activité antibactérienne vaste	- Doss et <i>al.</i> , 2009.

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

Dans cette seconde partie, nous décrivons les matériels et les méthodologies adaptées dans nos expérimentations, qu'on a réalisées au niveau du laboratoire de phytobactériologie à l'université SAAD DAHLEB de Blida.

Le présent travail a été réalisé en deux parties principales : la première consiste à étudier l'induction de la résistance par des souches antagonistes chez le pathosystème : Tomate/*Agrobacterium tumefaciens* en réalisant un test d'antagonisme *in planta*. La seconde partie est consacrée à la recherche d'une éventuelle modification du métabolique secondaire : accumulation

des composés phénoliques suite à l'inoculation des plantules de tomate par les souches antagonistes.

## **I. Expérience *in vivo* d'induction d'une résistance par des souches antagonistes chez le pathosystème : tomate/ *Agrobacterium tumefaciens***

### **I.1. Matériels biologiques**

#### **I.1.1. Les bactéries endophytes (source d'agents de lutte biologique)**

Quatre souches de bactéries endophytes isolées initialement de plantes spontanées (Smain et Khofdja, 2010), selon la technique décrite par Long et ses collaborateurs (2003), ont été choisies pour la suite de ce travail (Hildebrand et *al.*, 1998).

Le choix des souches endophytes sélectionnés était porté sur les résultats du test d'antagonistes *in vitro* et *in planta* (Djellout, 2011 ; Mekhaldi et Belkacem Koumri, 2013 ; Kiradet Dahman, 2016). Les quatre (4) souches de bactéries antagonistes choisies pour effectuer l'expérience *in vivo* d'induction d'une résistance sont : CR2, OS1, OS4, EPR3, ces bactéries ont été identifiées par la réalisation du séquençage de l'ADN ribosomal 16S au laboratoire (CNR, Protezione Delle Piante Firenze, Italie) (Krimi et *al.*, 2016) (tableau 4).

**Tableau4** : Origines des souches antagonistes utilisées.

Code la souche	Nom scientifique	Origine végétale	Année d'isolement
OS1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Urtica dioica</i>	2010
OS4	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	<i>Urtica dioica</i>	2010
CR2	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<i>Calendula arvensis</i>	2010
EPR3	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<i>Euphorbia peplus</i>	2010

Ces souches antagonistes ont été cultivées sur milieu LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) (Hildebrand et *al.*, 1988), puis incubées à 28°C.

#### **I.1.1.1. Culture et développement des souches antagonistes**

Tous au long de notre étude, tous les souches antagonistes ont été cultivés sur le milieu de culture LPGA qui s'est révélé plus performant que le milieu LB et milieu King B en termes de croissance bactérienne. Le milieu LPGA contient l'extrait de levure, la peptone bactériologique, le glucose et l'agar (Ryu, 1938) (annexe 1).

Les souches antagonistes ont été préparées à partir de cultures préalablement purifiées. La purification est une opération nécessaire afin de s'assurer de la pureté des souches antagonistes pour leur utilisation. La méthode consiste à faire des étalements sectoriels avec la culture bactérienne de chaque isolat à l'aide d'une anse, à raison de 3 secteurs par boîte de Pétri contenant le milieu LPGA (Ryu, 1938), suivie d'une étape d'incubation à 28-30°C, jusqu'à l'obtention de clones purs.

Pour l'étape de bactérisation, nous avons préparée des suspensions bactériennes à une densité optique variant de 0,22 à 0,26 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond respectivement à une densité cellulaire de concentration  $10^7$  CFU/ml (Djellout, 2011).

### **I.1.2. Origine des Souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées**

Les trois souches bactériennes pathogènes utilisées dans la présente étude appartiennent à la collection du laboratoire de phytobactériologie (département de biotechnologie de l'université SAAD DAHLEB, Blida).

Les souches pathogènes utilisés sont des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* dont la souche C58 qui est une souche de référence, elle fait partie de la collection de souches phytopathogènes du laboratoire phytobactériologie. Elle nous a été soigneusement fournie par le laboratoire d'Ecologie microbienne (CNRS, Lyon I, France), la souche E171 et la souche E14 qui sont des souches isolées d'*Eucalyptus occidentalis* (Krimi *et al.*, 2006) (tableau 5).

Tableau 5 : Origine des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées.

Souche	Origine végétale	Origine géographique	Année d'isolement	Source
C58	<i>Prunus cerasus</i>	New York (U.S.A)	1955	Dickey R.S. Cornell university, Ithaca, N. Y.
E14	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	Tlemcen (Algérie)	2003	Krimi Z. Université SAAD DAHLEB, Blida

E171	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	Tlemcen (Algérie)	2003	Krimi Z. Université SAAD DAHLEB, Blida
------	--------------------------------	-------------------	------	--

Ces souches ont été conservées dans de l'eau distillée stérile à une température de 4°C. Leur pureté a été vérifiée par étalement sectoriel et purification successives sur le milieu MG (Moore et *al.*, 1988) .

Pour l'étape d'inoculation, nous avons préparé des suspensions bactériennes à une densité optique qui varie de 0,12 à 0,16 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond à une densité cellulaire de 10<sup>6</sup>bactéries /ml. En effet, pour notre expérimentation, nous avons utilisé la densité d'inoculum de 10<sup>6</sup> bactéries /ml, indiquée par plusieurs travaux effectuées sur *Agrobacterium tumefaciens* (Portier, 2004 ;Djellout, 2011).

#### **I.1.2.1.Vérification du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées**

Afin de vérifier le pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (C58, E171 et E14), deux plantes tests ont été utilisées à savoir, le kalanchoë(*Kalanchoë daigremontiana*), la tomate (*Lycopersicum esculenum* cv. Saint Pierre). Les limbes foliaires de la plante *Kalanchoe daigremontiana* sont fréquemment utilisés pour vérifier la virulence d'*Agrobacterium* spp. (Moore et *al.*,1988).

##### **I.1.2.1.1.Inoculation des feuilles de kalanchoë et de tomate**

L'inoculation sur les plantes test est réalisée à l'aide d'une culture bactérienne âgée de 48h et cultivée sur le milieu LPGA (Ryu, 1938). La souche à tester est déposée sur des blessures réalisées aseptiquement sur le limbe des jeunes feuilles de kalanchoë d'une couleur vert tendre d'une taille d'environ 7 cm. L'inoculation des plantules de tomate se fait au niveau du 2<sup>ème</sup> entre nœud de la tige. Trois répétitions (plantules) par souches sont réalisées. Pour le test témoin, en plus de la souche de référence, nous avons utilisé des plantules blessées, inoculées d'eau distillée stérile et des plantules blessées non inoculées. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une tumeur au niveau du site de l'inoculation après 2 à 3 semaines (Moore et *al.*,1988).

#### **I.1.3. Matériel végétal**

Nous avons mené notre étude sur la tomate (*Lycopersicum esculutum*L.), qui appartient à la famille des solanacées. Le choix de tester l'activité antagoniste sur la tomate, est dû au fait qu'elle constitue une plante hôte utilisée lors des expérimentations pour les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens*, car en cas de réponse positive, elle développe des tumeurs en un temps très court. La variété testée est la Saint Pierre (var. fixe), les semences de tomate nous ont été fournies par un agriculteur.

### **I.1.3.1 Méthodologie de semis**

#### **I.1.3.1.1 Désinfections de la semence**

Les graines de tomate *Lycopersicum esculentum* ont été désinfectées dans une solution constituée d'eau distillée stérile et d'environ 2 à 3 gouttes d'eau de javel à 12 ° pendant 5 minutes pour la désinfection de semence est suivie de 3 rinçages successifs à l'eau distillé stérile. Les graines sont séchées sur papier filtre stérile (Djellout ,2011).

#### **I.1.3.1.2. Préparation et traitement des graines de tomate**

Les graines qui donneront les plants témoins positifs (sans bactérisation et sans infection par le pathogène) ou négatif (sans bactérisation mais avec infection) sont trempées dans de l'eau distillée stérile (Lee et *al.*, 2010).

Celles qui donneront les plants traités, les graines de tomates sont inoculées par immersion avec des suspensions bactériennes (un des souches antagonistes sélectionnées : OS1, OS4, CR2 et EPR3) pendant 24 h, c'est l'étape de bactérisation des graines de tomate, cette étape qui permet aux bactéries d'établir des interactions moléculaires compatibles avec la plante avant l'application de l'agent pathogène (Adam, 2008).

La suspension bactérienne des souches antagonistes sélectionnées (OS1, OS4, CR2 et EPR3) sontensemencées dans un milieu LPGA, incubées à une température de 28°C pendant 24 heures, ajustées à une densité optique variant de 0.22 à 0, 26 mesurée à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond respectivement à une densité cellulaire de concentration 10<sup>7</sup>CFU /ml (Djellout, 2011).

L'opération de pré germination permet de gagner du temps à la levée et de hâter la végétation, cette opération se réalise en mettant les semences de tomate dans des boîtes de Pétri sur du papier Wattman stérile n°1 et imbibé avec d'eau distillée stérile. Ces boîtes sont déposées dans la mini serre dans des conditions appropriés (25°C) nécessaire à la germination des semences de tomate (fig 6).

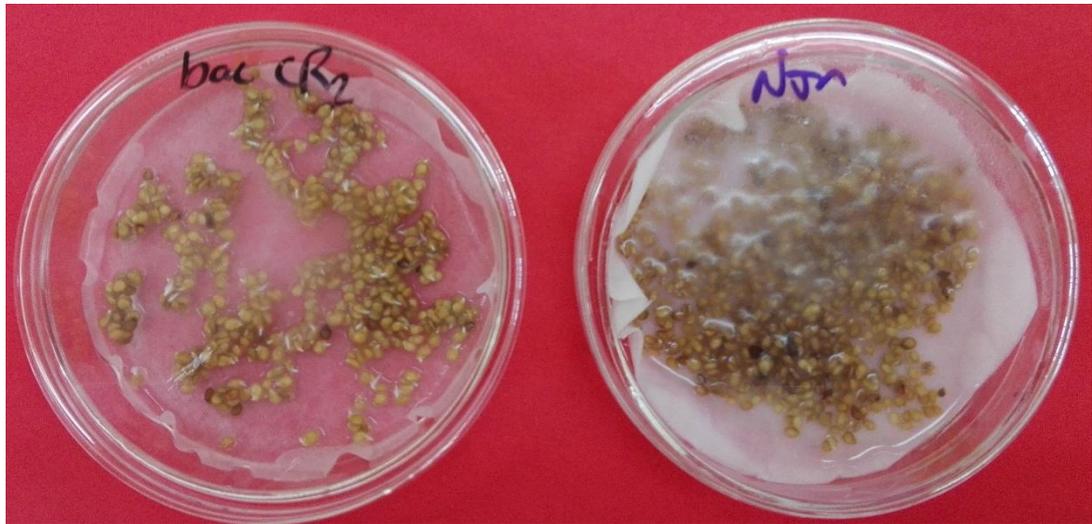


Figure 6: les graines de tomates pré-germées de 5 jours.

À la droite : boîte de pétri de graines de tomate trempé dans l'eau distillée stérile.

À gauche : boîte de Pétri de graines de tomate trempé dans la souche antagoniste CR2.

### I.1.3.1.3. Semis des graines de tomate

Pour le semis, le substrat utilisé est un mélange de 2/3 de terre végétale récupéré au niveau de la station expérimentale et 1/3 de tourbe. La stérilisation du substrat a été réalisée selon la méthode Rapilly (1986), qui consiste à stériliser le sol à 2 reprises pendant une période d'une heure à 200°C, en intervalle de 24h (Rapilly, 1986).

Le substrat est distribué dans des gobelets en plastique (10 cm x 6,5 cm) à raison de 200g de sol par pot. Les pots sont munis d'un orifice de drainage et de percolation de la solution d'arrosage en cas d'excès (fig 7).



Figure 7 : plantules de tomates après repiquage.

Le semis a été mené sous serre avec une photopériode de 16h lumière et 8h d'obscurité et une température de 25 à 30°C.

L'irrigation des plantes de tomate a été réalisée à l'eau du robinet stérile suivant les besoins des plantes (en maintenant un niveau adéquat d'humidité du sol), un apport d'une solution nutritive standard a été préconisé dans le but d'accélérer et d'assurer le bon développement des plantules.

#### I.1.3.1.4. Sélection des plantes pour l'inoculation

La sélection est faite après la germination des semences de tomate et avant leur inoculation par les bactéries antagonistes. Les plantes ont été choisies au stade de quatre vraies feuilles, pour que l'ensemble des plantes soient homogène et de même stade phénologique.

#### I.1.3.1.5. Dispositif expérimental

L'essai *in vivo* d'induction d'une résistance se réalise sous serre selon un dispositif expérimental, qui est bloc randomisé avec plusieurs traitements, un plant avec trois répétitions, pour chaque traitement, soit un total de 60 plantes. Au total, pour tous les traitements de l'essai d'antagonisme, nous avons 240 plantes à analyser dans différents temps : 0h, 48h, 1 semaine et 2 semaines après l'inoculation (tableau 6).

Les traitements sont les suivants :

**T1** : témoin négatif par les plants inoculé avec l'eau distillé stérile.

**T2** : trempage des plants de tomate dans la suspension bactérienne d'antagoniste puis inoculés par les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens* (E14, E171, C58).

**T3** : un second traitement consiste à tremper les plants de tomate dans la suspension d'antagonistes qui sont les souches CR2, OS1, OS4, EPR3.

**T4** : le quatrième traitement représente les plants de tomate inoculés directement avec la suspension de souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens*(E14, E171, C58).

**Tableau 6** : les différents traitements de l'essai

Les traitements de l'essai	Le nombre des plantules (répétition)
<b>T1 : EDS (≠ temps ; 0h, 48h, 1 semaine, 2 semaine)</b>	<b>12</b>
<b>T2 : Antagoniste/pathogène (≠ temps ; 0h, 48h, 1 semaine, 2 semaine)</b>	OS1/C58 12 OS1/E14 12 OS1/E171 12 OS4/C58 12 OS4/E14 12

	OS4/E171	12	<b>144</b>
	EPR3/C58	12	
	EPR3/E14	12	
	EPR3/E171	12	
	CR2/C58	12	
	CR2/E14	12	
	CR2/E171	12	
<b>T3 : Antagoniste (<math>\neq</math> temps ; 0h, 48h, 1 semaine, 2 semaine)</b>	CR2	12	<b>48</b>
	EPR3	12	
	OS4	12	
	OS1	12	
<b>T4 : pathogène (<math>\neq</math> temps ; 0h, 48h, 1 semaine, 2 semaine)</b>	E171	12	<b>36</b>
	E14	12	
	C58	12	

$\neq$  : différent.

EDS : les plants inoculés avec l'eau distillée stérile.

E14, E171, C58 : les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens*

OS1 : *Bacillus cereus*.

OS4 : *Bacillus methylotrophicus*.

CR2 : *Pseudomonas brassicacearum*.

EPR3 : *Pseudomonas brassicacearum*

## **I.2.Méthodologie adaptée pour la réalisation de l'essai *in vivo* d'induction de résistance par des souches antagonistes chez le pathosystème : tomate/*Agrobacterium tumefaciens***

### **I.2.1. Techniques d'inoculation des plantules de tomate *in vivo***

Au stade de quatre feuilles, on procède à un rappel bactérien sur les plants traités, les plantes de tomate sont retirés de leur pots (création de micro blessures) puis rincés pour éliminer l'excès de sol puis trempés pendant 24h dans une suspension des bactéries antagonistes à une densité optique 0.22 à 0, 26 mesurée à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond respectivement à une densité cellulaire de concentration  $10^7$ CFU /ml (Djellout, 2011).

Les plantules de tomate traitées par l'antagoniste seront par suite inoculées par les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* (E14, E171, C58) à la concentration cellulaire de  $10^7$ CFU/ml.

La méthode d'immersion ou de trempage des racines des plantes par les souches antagonistes a été utilisés par plusieurs auteurs à savoir : Guessas et Hadadji, 2009 ; Djellout, 2011 ; Mekhaldi et Belkacem Koumri, 2012 ; Kirad et Dahman, 2016.

Le témoin négatif correspond à des plantes trempées dans de l'eau distillé stérile, après 24h, les plantes sont re- transplantées dans leurs pots.

Avec une aiguille ou scalpel stérile, on réalise une blessure dans le collet des plantules de tomate, à intervalles de 1 cm à partir de l'extrémité en croissance. Un volume de 0.1 ml d'eau distillé stérile ou de la suspension bactérienne de l'agent pathogène *Agrobacterium tumefaciens* sva être introduit au niveau de blessure (fig 8) (Kenneth et *al.*, 2006 ; Djellout,2011 ;Mekhaldi et Belkacem koumri, 2012 ;Kirad et Dahman, 2016).



**Figure 8** : une blessure dans le collet d'une plantule de tomate traitée par la souche antagoniste OS4 et inoculé par la suite par une suspension bactérienne de la souche pathogène C58.

Pour chaque cas, le volume inoculé est de 0.1 ml, la tige inoculée est ensuite enveloppée avec du papier aluminium stérile afin d'éviter la dessiccation de l'inoculum (kenneth et *al.* , 2006). Les plantules sont maintenues en serre à une température de 25-27°C, puis inspectées pour le développement de la tumeur.

## II. La recherche d'une éventuelle modification du métabolisme secondaire : accumulation des composés phénoliques

### II.1. Recherche de métabolites secondaires

#### II.1.1. Préparation de la matière première et extraction

Le matériel végétal, c'est-à-dire les plantules dans les différents traitements effectués, est récolté à différents temps après l'inoculation en vue d'être analysé. Les racines des plantules de tomate sont rincées par de l'eau distillée stérile et elles sont ensuite broyées dans un mortier et pistil stérile (fig 9), jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

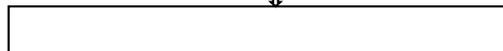
Nous avons broyé 1g de matière végétale fraîche (une plantule entière de 4 vraies feuilles) avec 10 ml de méthanol 80°, le mélange est agité au vortex pendant 3 min, puis centrifugé à 15000 tr pendant 15 min, récupérer le surnageant. Stocker à 4°C dans l'obscurité avant les analyses (Xu et Chang, 2007) (fig 9).



Broyage de matière végétale fraîche



1g de matière végétale + 10 ml de méthanol 80°



Agitation au vortex pendant 3 min



Centrifuger à 15000 tr pendant 15 min



Filtration et récupération du surnageant

**Figure 9** : protocole expérimental d'extraction des composés phénoliques.

### **II.1.2. Méthodes d'analyse : Screening phytochimique**

Le screening phytochimique représente l'ensemble des techniques qualitatives permettant la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais les principaux sont les polyphénols totaux y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les stéroïdes, les stérols, les terpènes...etc (Lendvai *et al.*, 2002).

Le screening phytochimique a été réalisé tant sur les phases aqueuses qu'organiques par des réactions usuelles à l'aide des réactifs de caractérisation classiques (Bruneton, 2009 ; Kolling *et al.*, 2010).

#### **II.1.2.1. Tests phytochimiques**

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des constituants chimiques, essentiellement les composés phénoliques. Ces tests sont réalisés généralement sur des extraits déjà préparés (par épuisement à chaud ou par macération à froid et dans les différents extraits méthanoliques) ou directement sur la poudre d'échantillon. Ils sont basés sur des essais de solubilité des réactions de coloration et de précipitation (Aissous et Bechara, 2016). Ces essais permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique, ces caractérisations ont été faites en utilisant principalement les réactions en tube à essai, les résultats sont classés en :

(+) : test faiblement positif.

(-) : test négatif.

(++) : Test positif.

(+++): Test fortement positif (Aissous et Bechara, 2016).

#### **II.1.2.1.1. Test des tanins**

1 g de matériel végétal sont placés dans 10 ml de MeOH 80 °. Après 15 minutes d'agitation en vortex, les extraits sont filtrés par papier Wattman n°1 stérile et mis dans des tubes à essai. L'ajout de FeCl<sub>3</sub> 1% permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (Dahou et *al*, 2003) (fig 10).



**Figure 10** : étape de filtration des surnageants.

#### **II.1.2.1.2. Test des flavonoïdes glycosides**

1ml d'hydroxyde de potassium KOH à 1% est ajouté à 2ml de l'extrait dilué dans le méthanol. L'apparition d'une coloration jaune indique la présence des flavonoïdes glycosides (Iqbal Hussain et *al*, 2011).

#### **II.1.2.1.3. Teste des quinones**

A l'extrait organique, on ajoute 2ml d'hydroxyde de sodium 10M, puis agité énergiquement l'apparition rapide ou lente d'une coloration rouge orange indique la présence des quinones (Kongo, 2009).

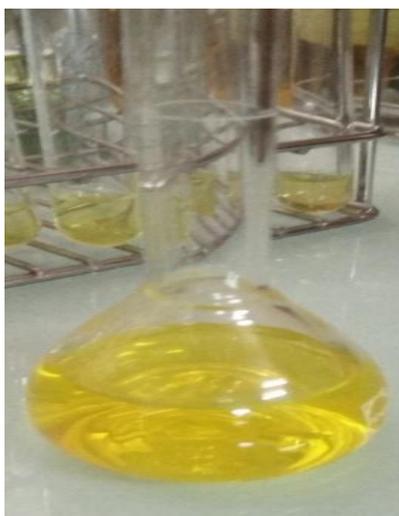
#### II.1.2.1.4. Test des salicylates

Le test de Trinder est un test de diagnostic utilisé en médecine pour déterminer l'exposition aux salicylates, en particulier à l'acide salicylique et à l'acide acétylsalicylique. Le test utilise le réactif de Trinder. Le changement de couleur, résultant de la réaction de Trinder, est immédiat, permettant une évaluation rapide de l'échantillon. Nous avons utilisé ce réactif dont le but de chercher la présence de salicylates dans nos extraits méthanoliques. L'intensité de la coloration développée est proportionnelle à la quantité de salicylates présents (Barham et Trinder, 1972).

La solution / réactif de Trinder est une solution pré mélangée de chlorure ferrique à 10% (Leslie et *al.*, 2001). Il peut être préparé en combinant 40 g de chlorure mercurique et 40 g de nitrate ferrique dans 850 ml d'eau déionisée, puis en ajoutant 10 ml d'acide chlorhydrique concentré à la solution et en diluant jusqu'à un volume de 1 litre avec eau déionisée (Neal, 2006 ; Richard, 2004) (Annexe 2) (fig 11)

Le test est positif en cas de changement de couleur (Richard, 2004). Les changements de couleur spécifiques sont : bleu ou violet test positif (Leslie et *al.*, 2001 ; Neal, 2006), pas de changement test négatif (Leslie et *al.*, 2001), marron test faussement positif causé par la présence de phénouthiazines (Leslie et *al.*, 2001).

1000µl de chaque extrait méthanolique additionnée de quelques gouttes du réactif de Trinder. Si l'addition de ce réactif se traduit par une coloration violette, on en conclut à la présence des salicylates (Barham, et Trinder, 1972).



**Figure 11** : le Réactif de Trinder.

#### **II.1.2.1.5. Test des composés phénoliques**

1ml de extrait méthanolique (dissous dans le méthanol 80°), ont été ajoutés à 250µl de réactif de Folin-Ciocalteu et 5 ml d'eau distillée. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 3 minutes. Après l'incubation, 1ml de la solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 120 minutes. Cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée. La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux (Thangeswari et Sankaralingam, 2013).

### **II.2. Dosage quantitatif par des réactions colorimétriques**

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée.

#### **II.2.1. Dosage quantitatif des polyphénols (les composés phénoliques)**

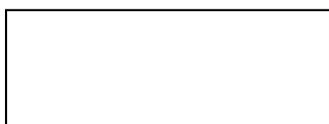
Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode décrite par Singleton en 1965.

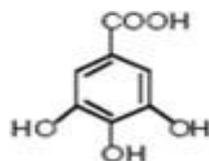
La méthode que nous avons pu adapter à notre matériel végétale, décrite par Thangeswari et Sankaralingam (2013), que nous avons modifiés un peu au laboratoire.

##### **II.2.1.1. Principe**

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les propriétés colorimétriques de réactif de Folin-Ciocalteu sont modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules. Il réagit avec la fonction -OH des phénols (Catalano *et al.*, 1999). Ce réactif est formé d'acide phosphomolybdique H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>4</sub> et d'acide phosphotungstique H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub> qui est réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène W<sub>8</sub>O<sub>23</sub> et de molybdène MO<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée (wong *et al.*, 2006).

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique dont la formule chimique est la suivante :





**Figure 12 :** Acide gallique (Acide 3, 4,5-trihydroxybenzoïque).

Brièvement 1000 µl de chaque extrai tméthanolique(dissous dans le méthanol 80°)agités pendant 15 minutes à 10000 tour /min, ont été ajoutés à 250µl de réactif de Folin-Ciocalteu et 5 ml d'eau distillée. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 3 minutes. Après l'incubation, 1000 µl de la solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 120 minutes dans l'obscurité à température ambiante (Thangeswari et Sankaralingam, 2013). La densité optique (DO) de chaque échantillon est lue à deux longueurs d'onde, 731 nm et 765 nm grâce à un spectrophotomètre (UV-1601 SHIMADZU).L'expérience est répétée trois fois pour chaque l'extrait.

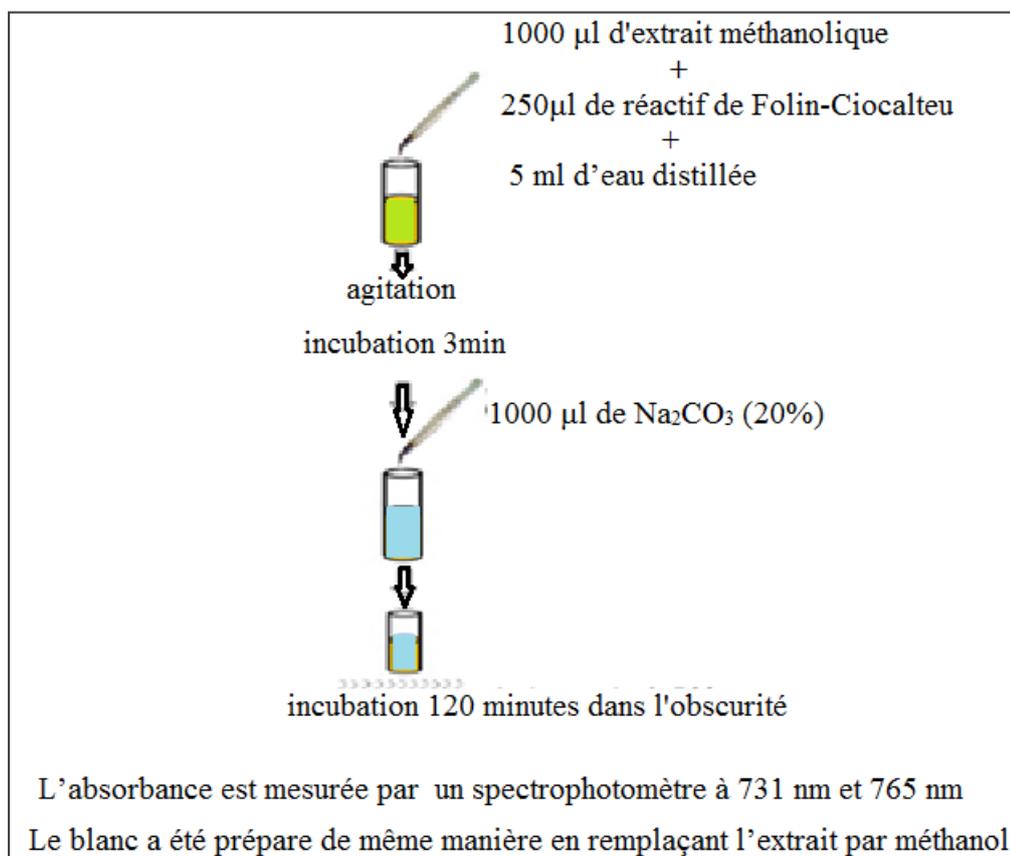


**Figure13 :** Spectrophotomètre (UV-1601 SHIMADZU).

### II.2.1.2. Expression des résultats

L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode au Folin-Ciocalteu (Maisuthisakul et *al.*, 2008). La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage  $Abs = f(\text{concentration})$ , cette dernière est établie avec le standard étalon d'acide gallique et l'acide salicylique.

Deux courbes d'étalonnage ont été réalisées par l'acide gallique et l'acide salicylique à différentes concentrations et pratiquées dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (50 µg/ml) et d'acide salicylique (50 µg/ml), exprimée en microgrammes d'acide gallique et d'acide salicylique par gramme de partie fraîche (Wong *et al.*, 2006) (fig14).



**Figure14** : Protocole expérimental de dosage des phénols totaux adopté.

### III. Analyse statistique des résultats obtenus

Les résultats de la recherche d'une éventuelle accumulation des composés phénoliques obtenus pour les différents tests effectués ont été analysés par le programme Excel (2013). La moyenne des trois répétitions a été calculée.

## Chapitre 3 : Résultats et interprétations

### I. Résultats de l'expérience d'induction *in vivo* d'une résistance par des souches antagonistes chez le pathosystème : tomate/ *Agrobacterium tumefaciens*

#### I.1. Confirmation du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées

Au moins de trois semaines, les trois souches bactériennes d'*Agrobacterium tumefaciens* C58, E171 et E14 ont donné naissance à des tumeurs caractéristiques au niveau des blessures effectuées sur les limbes du kalanchoë et sur les tiges des plantes de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Saint Pierre) (Figure 15 et 16).

##### I.1.1. Réponses des limbes foliaires de *kalanchoë daïgremantiana* à l'inoculation par les trois souches d'*A. tumefaciens* pathogènes

Trois semaines après l'inoculation, les limbes foliaires de *k. daïgremantiana* inoculés par les trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* C58, E171 et E14 ont commencé à développer des tumeurs, par rapport au témoin qui ne montre qu'une légère cicatrisation de la blessure et qui correspondait aux limbes des feuilles de kalanchoë blessées et inoculées avec de l'eau distillée stérile (Figure 15).



**Figure 15** : Symptômes de l'infection par les souches d'*A. tumefaciens* sur le limbe foliaire de la plante kalanchoë (40 jours après l'inoculation).

(EDS : les plants inoculé avec l'eau distillé stérile, E14, E171, C58 : les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens*)

### I.1.2. Réponses de plants de tomate à l'inoculation par les trois souches d'*A. tumefaciens* pathogènes

Sur les plants de tomate *Lycopersicon esculentum* var. Saint Pierre, les trois souches C58, E171 et E14 se sont révélées tumorigènes, avec formation des galles par rapport au témoin inoculé avec de l'eau distillée stérile qui n'a montré aucune formation des tumeurs au site d'inoculation (Figure 16). Les galles ont été formées trois semaines après l'inoculation par les souches pathogènes.



Figure 16 : Symptômes de l'infection par les trois souches d'*A. tumefaciens* sur les plantes de tomate trois semaines après l'inoculation.

### I.2. Evaluation de l'induction de la résistance chez la tomate

Les premières manipulations de ce travail consistaient à vérifier l'effet protecteur *in vivo* des souches antagonistes sélectionnées qui sont *Pseudomonas brassicacearum* (CR2 et EPR3), *Bacillus cereus* (souche OS1) et *Bacillus methylotrophicus* (souche OS4) avec le pathosystème : tomate/ *Agrobacterium tumefaciens*.

Les résultats obtenus nous ont permis de constater une diminution de la sévérité des symptômes, voir même une absence totale de symptômes du crown gall sur les plantules de tomate (Figure 17) préalablement trempées dans des suspensions bactériennes des souches antagonistes comparées aux témoins qui correspondent aux plantules inoculées directement avec les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* (figure 17).

Cet effet antagoniste confirmé *in planta* est très important, il s'est traduit soit par l'absence de tumeurs aux points d'inoculation ou par la formation des tumeurs de faible taille.

La bactérisation avec chacune des souches antagonistes *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus methylotrophicus* (OS4) et *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3 et CR2) a limité l'installation et l'expression des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* tumorigènes.

La protection conféré au plantules de tomate inoculé (souche pathogène) au niveau des blessures induite au niveau du tige alors que l'inoculation bactérisation (souche antagoniste) a été faite au niveau racinaire : la suppression de la maladie dans ces expériences était assurément due à l'induction de la résistance systémique chez la plante hôte.

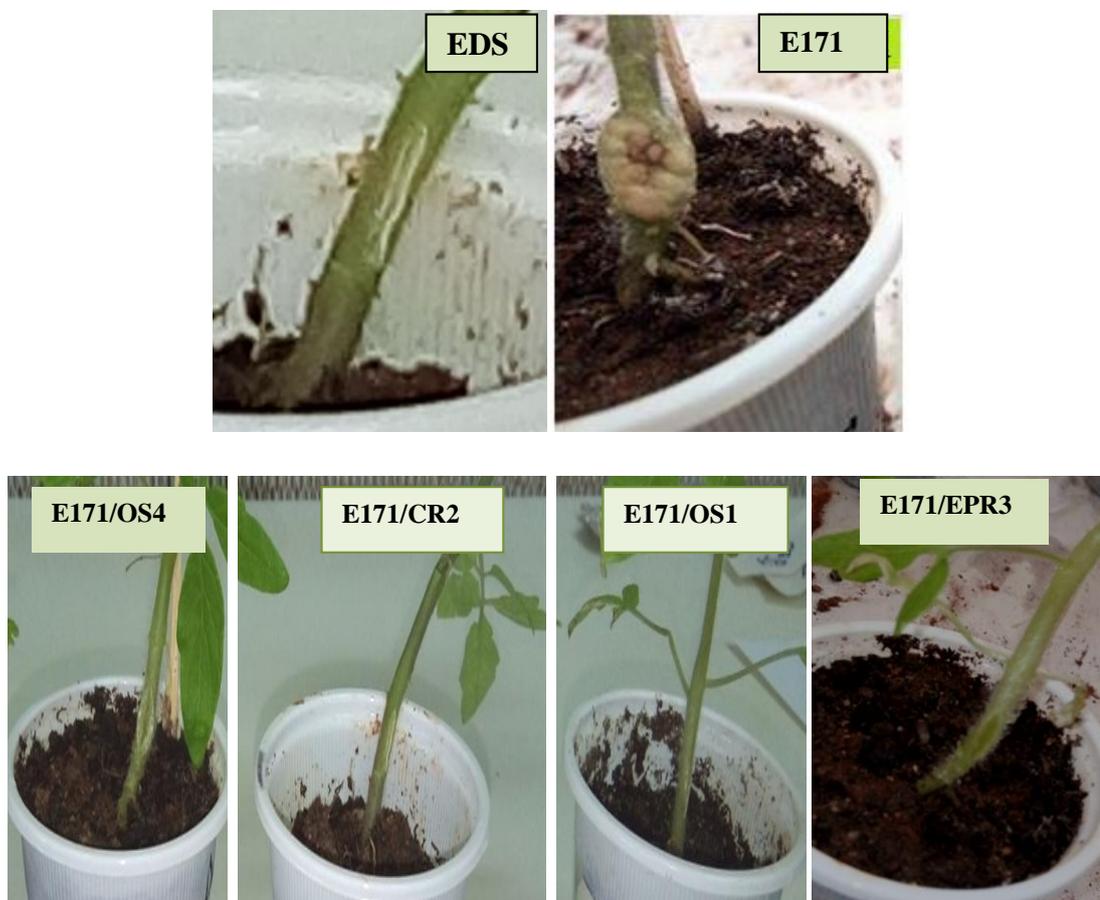


Figure 17 : Réponses des plantules de tomate (var. Saint Pierre) aux différents traitements du test d'antagonisme *in vivo*.

## II. Modification du métabolique secondaire : accumulation des composés phénoliques

### II.1. Résultats de screening phytochimique

Ce teste consiste à détecter la présence des différents composés chimiques existants dans la plante de tomate par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Ces dernières permettent de définir la présence ou non de quelques métabolites secondaires.

#### II.1.1. Les Tanins :

Le test des tanins a montré la présence d'une coloration brune verdâtre, ce qui signifie que la plante entière de tomate (l'extrait méthanolique) contient les tanins catéchiques, dans les différents temps après l'inoculation. Cette couleur brune verdâtre est remarquée d'une façon

importante chez les extraits méthanoliques préparée à partir des plantules de tomates bactérisés par les souches antagonistes et inoculés par les souches pathogènes comparés aux extraits des plantes saines et les plantules inoculés seulement par les souches pathogènes ou ceux qui sont traitées par les souches antagonistes (figure 18).



Figure18 : présence les tanins catéchiques dans l'extrait de plante de tomate pour les différents traitements (1semaineaprès l'inoculation).

(C : OS1+C58 ; E : OS1+E14 ; E17 : OS1+E171)

### II.1.2. Les flavonoïdes glycosides

Le test des flavonoïdes glycosides a montré la présence d'une coloration jaune, ce qui signifie que la plante entière de tomate contient les flavonoïdes glycosides dans les différents temps après l'inoculation. Cette couleur jaune est remarquée d'une façon importante chez les extraits méthanoliques préparée à partir des plantules de tomates bactérisés par les souches antagonistes et inoculées par les souches pathogènes comparés aux extraits des plantes saines et les plantules inoculés seulement par les souches pathogènes ou ceux qui sont traitées par les souches antagonistes (figure 19).



Figure 19 : présence des flavonoïdes glycosides dans l'extrait de plante de tomate pour les différents traitements (1 semaine h après l'inoculation).

(C : OS1+C58, E : OS1+E14, E17 : OS1+E171, B : OS4+C58).

### II.1.3. Les salicylates

Le test des salicylates a montré la présence d'une coloration violette qui se disparaît rapidement, ce qui signifie que les extraits méthanoliques préparés de la plante entière de tomate contiennent des salicylates dans les différents temps après l'inoculation (figure 20). Cette couleur violette est remarquée chez les extraits méthanoliques préparés à partir des plantules de tomates bactérisés par les souches antagonistes comparés aux extraits des plantes saines et les plantules inoculés seulement par les souches pathogènes ou ceux qui sont traités par les souches antagonistes.

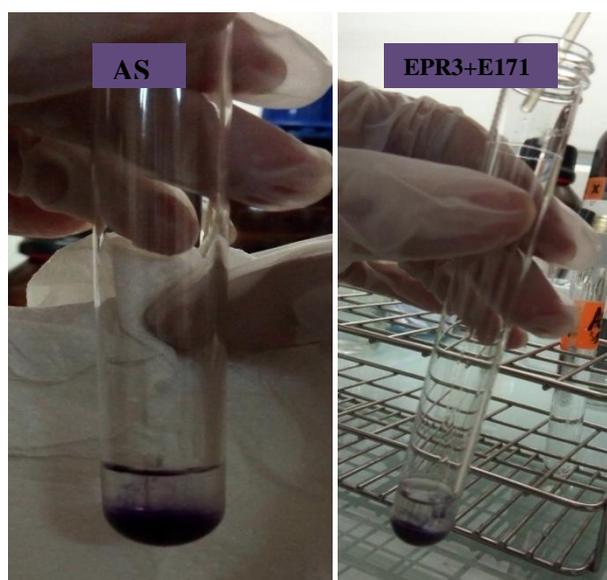


Figure 20 : présence des salicylates dans l'extrait de plante de tomate préparée à partir des plantules traitées par les souches antagonistes et inoculée par *A.tumefaciens* (2 semaines après l'inoculation).

(Photo à droite : EPR3+E171 : souche antagoniste+ souche pathogène après 2 semaines d'inoculation,

Photo à gauche solution d'A.S : l'acide salicylique a une concentration de 1 mg/ml).

### II.1.4. Les quinones

Le test des quinones a montré l'absence de la coloration rouge orange, ce qui signifie que l'extrait de plantule de tomate ne contient pas des quinones dans les différents temps après l'inoculation. Cette absence de la couleur rouge orange est observée pour tous les traitements et à différents temps après l'inoculation (figure 21).

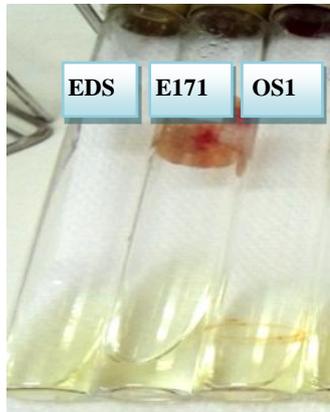


Figure 21 : l'absence des quinones dans l'extrait de tomate dans tous les traitements et à différents temps après l'inoculation.

### II.1.5. Les composés phénoliques

Le test qualitatif de la présence des composés phénoliques a montré l'apparition d'une coloration bleue foncée, ce qui signifie que la plante entière de la tomate contient des composés phénoliques dans les différents temps après l'inoculation. Cette couleur bleu foncée est remarquée d'une façon importante chez les extraits méthanoliques préparée à partir des plantules de tomates bactérisés par les souches antagonistes et inoculées par les souches pathogènes d'*A. tumefaciens* comparés aux extraits des plantules inoculés seulement par les souches pathogènes ou ceux qui sont traitées par les souches antagonistes et les plantes saines (fig 22).



Figure 22 : présence des composés phénoliques dans l'extrait de tomate 48 h après l'inoculation.

(R1 : CR2 +C58 ; C1 :OS1+C58, B1 :OS4+C58, EP1 :EPR3+C58, Bla : le Blanc, DN : les plants inoculé avec l'eau distillé stérile).

## II.2. Dosage et caractérisation spectrophotométrique des composés phénoliques

### II.2.1.1. Dosage quantitatif des composés phénoliques comparés au standard l'acide gallique

Afin de caractériser les extraits méthanoliques préparés à partir des plantules de tomate, la quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire  $Abs = f(\text{concentration})$  réalisé par un étalon standard, qui est l'acide gallique préparé à différentes concentrations (figure 23).

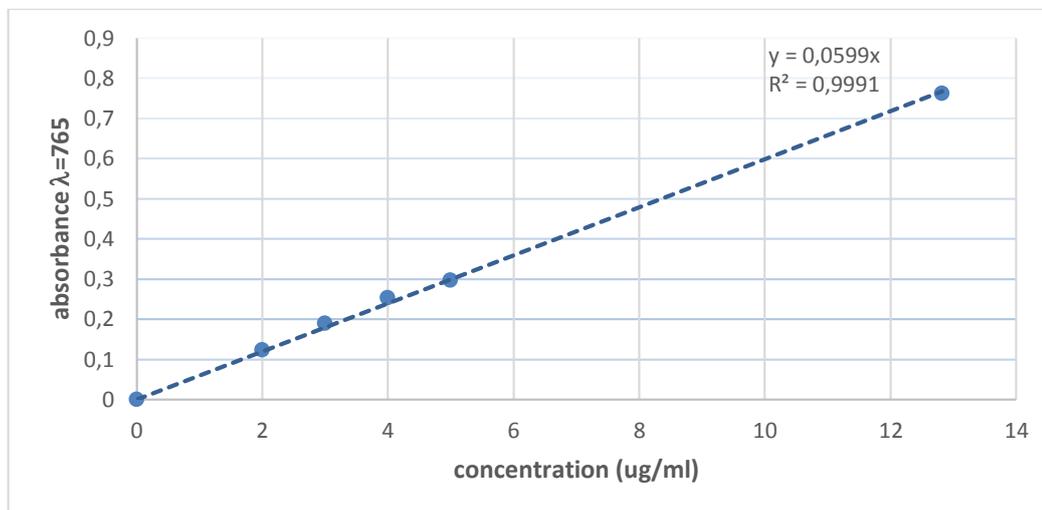


Figure 23 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique et d'acide salicylique, exprimée en microgrammes d'acide gallique et d'acide salicylique par gramme de partie fraîche (Wong *et al.*, 2006) (tableau 7).

**Tableau 7** : La teneur en composés phénoliques dans les extraits méthanoliques des plantules de tomate dans les différents temps après l'inoculation (la moyenne est calculée des trois répétitions).

Traitements	Teneurs en phénols totaux ( $\mu\text{g}$ d'acide gallique/ml extrait)			
	Différents temps après inoculation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
	0 h	48 h	1 semaine	2 semaines
OS1+C58	10,67	9,05	6,01	6,59
OS1+E14	7,73	9,30	11,92	8,55
OS1+E171	7,60	8,63	8,01	7,38
OS4+C58	9,30	8,66	7,13	5,16
OS4+E14	9,88	12,55	7,50	5,24
OS4+E171	8,80	5,63	6,69	11,75
EPR3+C58	10,07	9,23	7,11	9,45
EPR3+E14	7,61	10,85	6,33	5,98
EPR3+E171	7,68	12,60	10,53	9,03
CR2+C58	9,40	10,47	7,51	6,58
CR2+E14	10,27	8,08	6,06	6,83
CR2+E171	8,26	7,03	6,24	9,52
DN	4,19	4,19	5,08	6,74
C58	7,11	7,31	5,34	8,35
E171	5,83	9,70	10,55	9,67
E14	7,90	4,94	9,58	10,42
OS1	7,70	6,84	8,63	7,38
EPR3	9,85	11,95	9,17	5,83
OS4	7,26	6,61	11,14	9,13
CR2	6,04	7,95	8,98	10,55

Les résultats de tableau 7 indiquent que la quantité des composés phénoliques est beaucoup plus élevées quand les plantules sont bactérisés par les souches antagonistes et inoculées par les souches pathogènes, dont la concentration varié de 5,16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  jusqu'au 12,60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  comparés à la quantité des composés phénoliques des plantes saines qui est de 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Par contre, les teneurs en phénols est de 5,83  $\mu\text{g}/\text{ml}$  à 11,95  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les plantules traitées seulement avec les souches antagonistes, alors que chez les plantules inoculées seulement avec les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens*, la quantité des composés phénolique ne dépasse pas les 10,55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Les résultats obtenus ont été analysés par le programme Excel (2013). La moyenne des trois répétitions a été calculée (figure 24).

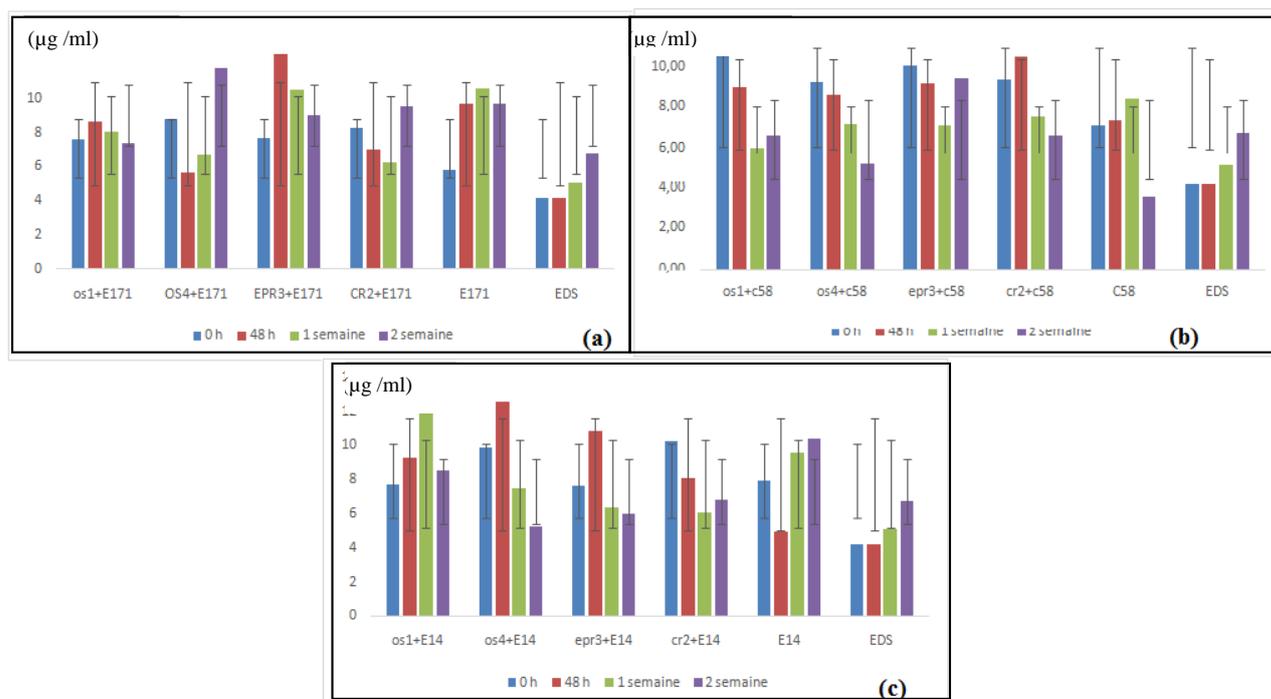


Figure 24 : La teneur des composés phénoliques par rapport au standard l'acide gallique calculées pour les différents traitements après différents temps d'inoculation (l'interaction : chaque souche antagoniste/ une souche pathogène comparé au témoin négatif).

- (a) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste (OS1 / OS4/EPR3/ CR2) puis inoculés par la souche tumorigène d'*A. tumefaciens*E171.  
 (b) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste (OS1 / OS4 / EPR3 / CR2) puis inoculés par la souche tumorigène d'*A. tumefaciens*C58.  
 (c) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste (OS1 / OS4 / EPR3 / CR2) puis inoculés par la souche tumorigène d'*A. tumefaciens*E14.

D'après les résultats de la figure 24, la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par les souches antagoniste *Bacillus cereus* (OS1) et *Bacillus methylotrophicus* (OS4) et *Pseudomonas brassicacearum* (CR2 et EPR3) ensuite inoculées par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* C58, E171 et E14, est beaucoup plus élevée par rapport à la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par l'eau distillé stérile seulement.

Ainsi les plantes qui ont reçu seulement les bactéries antagonistes comme traitement ont également montré des niveaux plus élevés par rapport au contrôle sain (plantules trempé seulement dans eau distillée stérile).

La teneur des composés phénoliques obtenue pour les plantules traitées par les souches de *Pseudomonas brassicacearum* (CR2 et EPR3) et inoculée par la souche E171 d'*A. tumefaciens* (48 h et 2 semaines après l'inoculation) ou par la souche C58 d'*A. tumefaciens* (0 h et 48 h après

l'inoculation) est plus élevée par rapport à la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par les souches de *Bacillus* spp (OS1 et OS4) et inoculée par les souches pathogènes E171 ou C58 (fig24.a et b).

Par contre la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par les souches de *Bacillus* spp (OS1 et OS4) et inoculée par la souche pathogène E14 (1 semaine et 48h après l'inoculation) est plus élevée par rapport à la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par ces mêmes souches antagonistes et inoculée par la souche E171 et C58 d'*A. tumefaciens*.

Par ailleurs, la concentration des composés phénoliques des plantules inoculées par les souches C58, E171 et E14 d'*A. tumefaciens* est différente de la teneur des composés phénoliques de 0 h après l'inoculation, 48h après l'inoculation, 1 semaine après l'inoculation et 2 semaine après l'inoculation, donc, les teneurs en phénols ont très peu varié entre les différents temps d'inoculation. Le jour maximum d'accumulation des composées phénoliques pour les différentes souches pathogènes a lieu après 7 jours d'inoculation.

La concentration des composés phénoliques des plantules inoculées par la souche E14 d'*A. tumefaciens* est plus élevée par rapport à la concentration des composés phénoliques des plantules inoculées par les souches C58 et E171 d'*A. tumefaciens* (0 h et 2 semaine après l'inoculation). Les teneurs en phénols des plantules inoculées par la souche E171 d'*A. tumefaciens* sont plus élevées par rapport à la teneur des phénols des plantules inoculées par les souches C58 et E14 d'*A. tumefaciens* (48h et 1 semaine après l'inoculation).

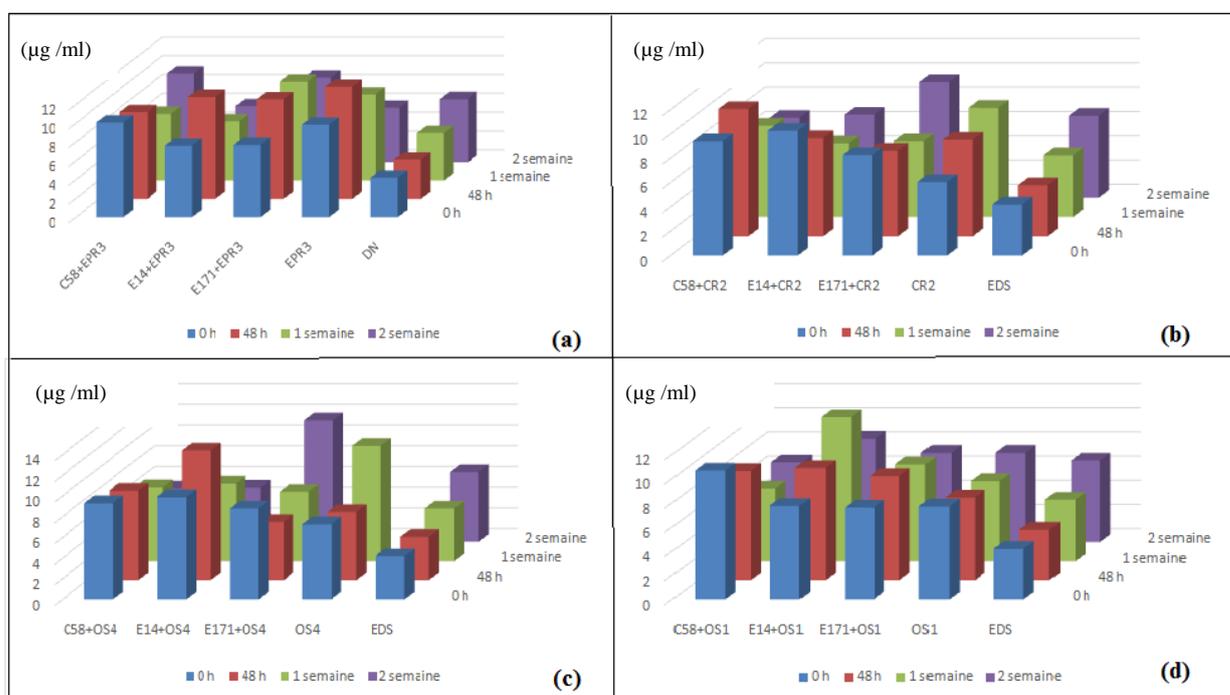


Figure 25 : La teneur des composés phénoliques par rapport au standard l'acide gallique calculées pour les différents traitements après l'inoculation (l'interaction : souche antagoniste/ les souches pathogènes) comparé au témoin négatif.

(a) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3) puis inoculés par les souches tumorigène d'*A. tumefaciens* (E171, C58, E14).

(b) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* (CR2) puis inoculés par les souches tumorigène d'*A. tumefaciens* (E171, C58, E14).

(c) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Bacillus methylotrophicus* (OS4) puis inoculés par les souches tumorigène d'*A. tumefaciens* (E171, C58, E14).

(d) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Bacillus cereus* (OS1) puis inoculés par les souches tumorigène d'*A. tumefaciens* (E171, C58, E14).

Les résultats obtenus de la figure 25 indiquent, que la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3) et inoculé par la souche C58 d'*A. tumefaciens* est plus élevée par rapport aux plantules traitées par cette même souche antagoniste et inoculés par les souches tumorigènes E14 ou ceux qui sont inoculée par la souche E171 d'*A. tumefaciens* (2 semaine après l'inoculation) (Fig 25 .a).

Alors que la teneur en phénols des plantules traitées par *Pseudomonas brassicacearum* (CR2) et inoculées par la souche E171 d'*A. tumefaciens* est plus élevée par rapport aux plantules traitées par cette même souche antagoniste CR2 et inoculés par les souches E14 ou C58 d'*A. tumefaciens* (2 semaines après l'inoculation) (Fig 25 .b)

La concentration des composés phénoliques des plantules traitées par *Bacillus methylotrophicus* (OS4) et inoculés par la souche E171 d'*A. tumefaciens* est plus élevée comparer aux plantules traitées par cette même souche antagoniste et inoculés par les souches tumorigènes E14 et C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* (2 semaine après l'inoculation) (Fig 25 .c).

La concentration des composés phénoliques des plantules traitées par *Bacillus cereus* (OS1) puis inoculées par la souche E14 est plus élevée par rapport aux plantules traitées par cette même souche antagoniste puis inoculés par les souches tumorigènes E14 et C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* (1 semaine après l'inoculation) (Fig 25 .d).

#### **II.2.1.2. Dosage quantitatif des composés phénoliques comparés au standard l'acide salicylique**

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des plantules de tomate, la quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire  $y=ax$  réalisé par une solution d'étalon qui est l'acide salicylique à différentes concentrations (figure 26).

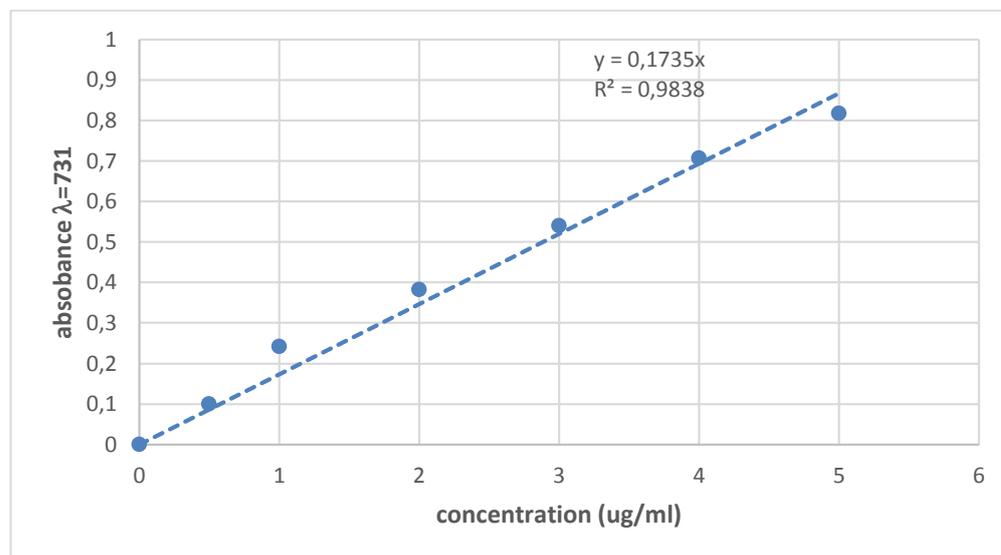


Figure 26 : Droite d'étalonnage d'acide salicylique.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec l'étalon d'acide salicylique, exprimée en microgrammes d'acide salicylique par gramme de partie fraiche (Wong *et al.*, 2006) (tableau 8).

**Tableau 8** : La teneur en composés phénoliques dans les extraits méthanoliques des plantules de tomate dans les différents temps après l'inoculation comparés à l'acide salicylique (la moyenne est calculée des trois répétitions).

Traitements	Teneurs en phénols totaux ( $\mu\text{g}$ d'acide salicylique/ml extrait)			
	Différents temps après inoculation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
	0 h	48 h	1 semaine	2 semaines
OS1+C58	2,45	2,31	2,17	3,13
OS1+E14	1,87	2,51	2,65	4,80
OS1+E171	2,08	2,66	2,40	3,24
OS4+C58	2,34	2,29	2,59	3,03
OS4+E14	2,39	3,61	2,53	3,24
OS4+E171	2,27	2,15	2,62	3,36
EPR3+C58	2,30	2,88	2,11	3,66
EPR3+E14	2,03	2,34	2,38	3,16
EPR3+E171	1,97	2,94	2,08	3,32
CR2+C58	2,65	3,23	2,05	2,51

CR2+E14	2,72	2,07	2,47	2,89
CR2+E171	2,48	2,76	2,46	3,12
DN	1,91	1,91	2,31	2,44
C58	2,50	2,54	1,83	3,56
E171	1,96	3,34	3,69	4,25
E14	2,73	1,73	3,39	3,76
OS1	2,68	2,36	2,97	2,31
EPR3	3,47	3,00	3,15	2,21
OS4	2,52	2,28	3,86	3,21
CR2	1,93	2,79	3,10	3,63

Les résultats obtenus de tableau 8 montrent que, la teneur des composés phénoliques comparés au standard l'acide salicylique, est beaucoup plus élevée chez les plantules bactériésés par les souches antagonistes et inoculées par les souches pathogènes, dont la concentration atteint 4,80 µg/ml. Cette concentration est comparée aux plantules traitées seulement avec les souches antagonistes, dont cette concentration est de 1,93 µg/ml à 3,86 µg/ml, alors que chez les plantules inoculées seulement avec les souches pathogènes d'*A. tumefaciens*, la quantité des composés phénolique atteint les 4µg/ml. Alors que la concentration des composés phénoliques des plantes saines ne dépasse pas 2.40 ug / ml.

Les résultats obtenus ont été analysé par le programme Excel (2013). La moyenne des trois répétitions a été calculée (figure 27).

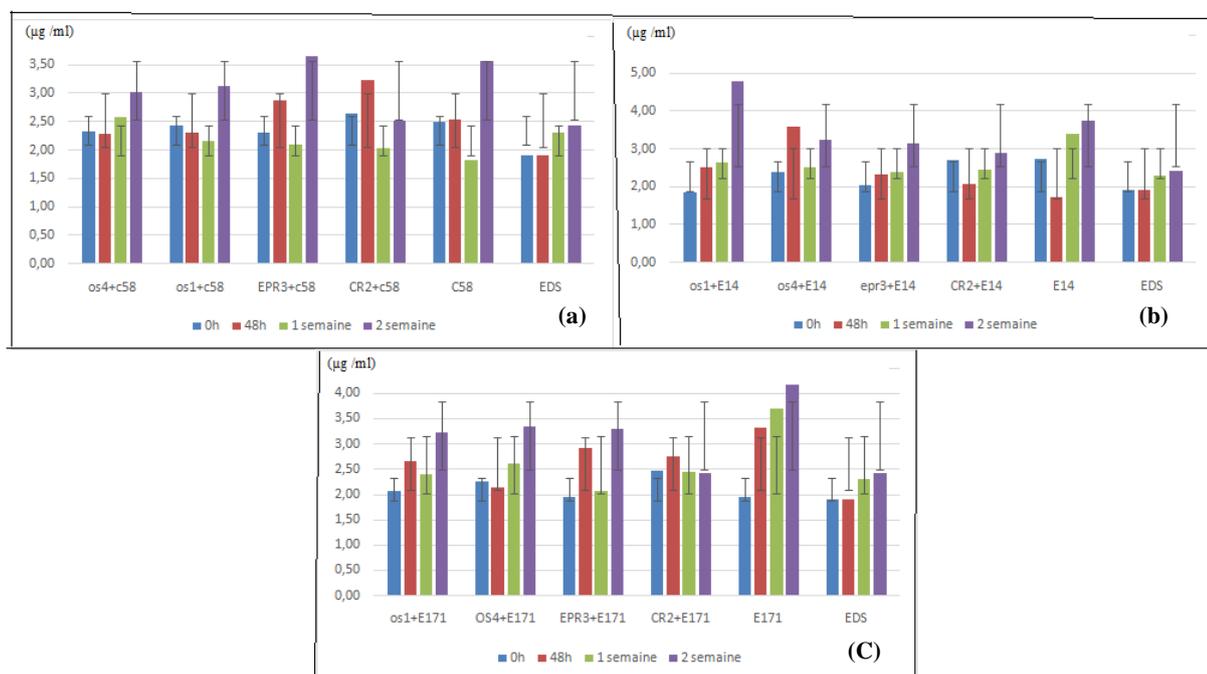


Figure 27 : La teneur des composés phénoliques par rapport au standard l'acide salicylique calculées pour les différents traitements après l'inoculation (l'interaction : chaque souche antagoniste/ une souche pathogène) comparé au témoin négatif.

- (a) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste (OS1 / OS4/EPR3/ CR2) puis inoculés par la souche tumorigène d'*A. tumefaciens*C58.
- (b) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste (OS1 / OS4 / EPR3 / CR2) puis inoculés par la souche tumorigène d'*A. tumefaciens*E14.
- (c) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste (OS1 / OS4 / EPR3 / CR2) puis inoculés par la souche tumorigène d'*A. tumefaciens*E171.

Les résultats obtenus de la figure 27 signalent, que la teneur des composés phénoliques optimal, est observée 2 semaine après l'inoculation par rapport au d'autres temps (0h ; 48 h ; 1 semaine après l'inoculation).

La concentration des composés phénoliques pour les plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste (OS1 / OS4 / EPR3 / CR2) puis inoculés par les souches tumorigène C58 et E14 et E171 d'*A. tumefaciens* est beaucoup élevée par rapport à la concentration des composés phénoliques des plantules inoculé seulement par l'eau distillé stérile.

La concentration des composés phénoliques pour les plantules de tomate traitées par les souches (OS1 / OS4) de *Bacillus* spp puis inoculés par la souche tumorigène E14 d'*A. tumefaciens* est plus élevée par rapport à la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par ces mêmes souches (OS1 / OS4) et inoculés par la souche C58 d'*A. tumefaciens* (48h et 2 semaines après inoculation).

La concentration des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate traitées par les souches de *Pseudomonas brassicacearum* (CR2 / EPR3) puis inoculés par la souche C58d'*A. tumefaciens* est plus élevée comparer à la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par ces mêmes souches (CR2 / EPR3) puis inoculés par la souche E14 tumorigène d'*A. tumefaciens* (48h et 2 semaine après inoculation) (Fig 27 a,b).

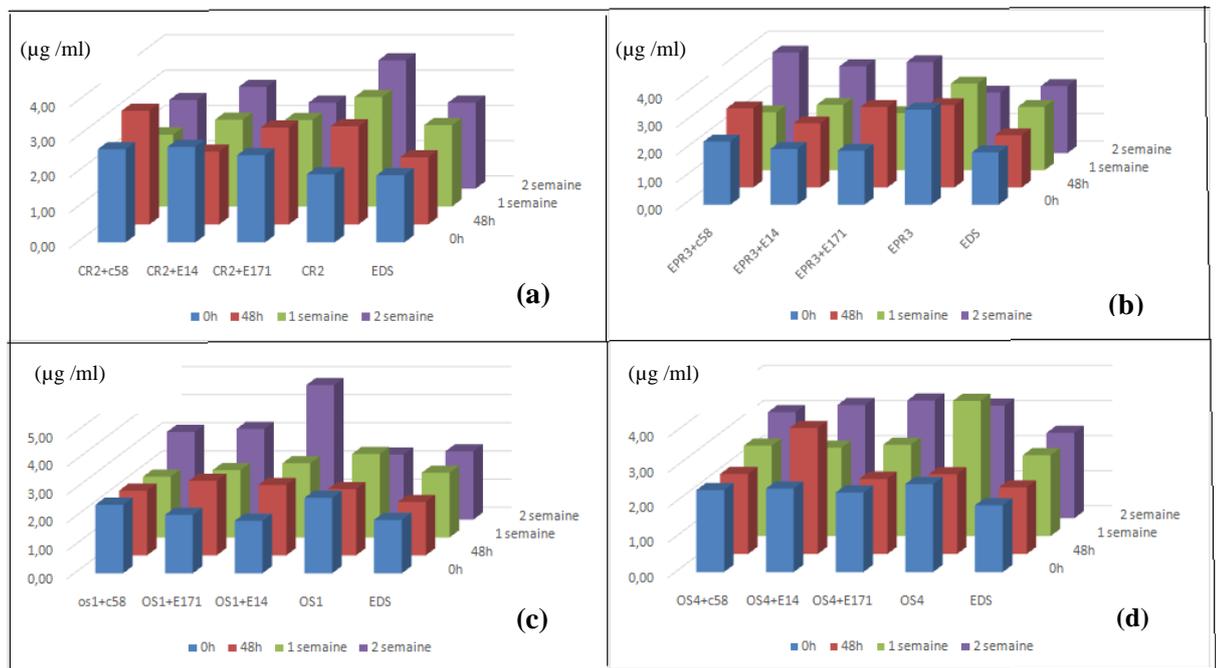


Figure 28 : La teneur des composés phénoliques par rapport au standard l'acide salicylique calculées pour les différents traitements après l'inoculation (L'interaction : souche antagoniste/ les souches pathogènes) comparé au témoin négatif.

(a) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* (CR2) puis inoculés par les souches tumorigène d'*A. tumefaciens* (E171, C58, E14).

(b) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3) puis inoculés par les souches tumorigène d'*A. tumefaciens* (E171, C58, E14).

(c) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Bacillus cereus* (OS1) puis inoculés par les souches tumorigène d'*A. tumefaciens* (E171, C58, E14).

(d) La teneur des composés phénoliques pour les extraits des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Bacillus methylotrophicus* (OS4) puis inoculés par les souches tumorigène d'*A. tumefaciens* (E171, C58, E14).

La concentration des composés phénoliques des plantules traitées par *Pseudomonas brassicacearum* (CR2) puis inoculé par la souche E14 d'*A. tumefaciens* est plus élevée par rapport aux plantules traitées par cette même souche antagoniste puis inoculées par la souche E171 d'*A. tumefaciens* ou ceux qui sont inoculée par la souche C58 (2 semaine après l'inoculation) (Fig 28 .a).

La concentration des composés phénoliques des plantules traitées par *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3) puis inoculé par la souche C58 est plus élevée comparer aux plantules traitées par cette même souche antagoniste puis inoculées par les souches E14 d'*Agrobacterium tumefaciens* ou ceux qui sont inoculée par la souche C58 (2 semaine après l'inoculation) (Fig 28 .b).

La concentration des composés phénoliques des plantules traitées par *Bacillus cereus* (OS1) puis inoculés par la souche E14 est plus élevée comparer aux plantules traitées par cette même

souche (OS1) puis inoculé par les souches E171 d'*Agrobacterium tumefaciens* ou ceux qui sont inoculés par la souche C58 (2 semaine après l'inoculation) (Fig 28 .c).

Ainsi que la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par *Bacillus methylotrophicus* (OS4) puis inoculé par d'*Agrobacterium tumefaciens* E171 est plus élevé par rapport des plantules traitées par cette souche OS4 puis inoculés par les souches E14 et C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* (2 semaine après l'inoculation) (Fig 28 .d).

La concentration des composés phénoliques des plantules traitées par *Bacillus methylotrophicus* (OS4) est plus importante comparer à la concentration des composés phénoliques des plantules traitées par les espèces : *Bacillus cereus* (OS1) et *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3, CR2) (1 semaine après l'inoculation) (fig 28, d).

L'accumulation des composés phénoliques des plantules traitées par des antagonistes, *Bacillus* spp (OS1, OS4) et *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3, CR2) est différente de la teneur des composés phénoliques de 0 h, 48h, 1 semaine et 2 semaine après l'inoculation. Le jour maximum d'accumulation des composés phénoliques pour les différentes souches pathogènes a lieu deux semaines après l'inoculation.

Par ailleurs les teneurs en phénols des plantules traitées par *Pseudomonas brassicacearum* (CR2) sont plus élevées par rapport à la teneur des phénols des plantules traitées par les antagonistes suivant : *Bacillus cereus* (OS1) et *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3) 2 semaine après l'inoculation (fig28, a).

## Chapitre 4 : Discussion

Au cours de ce travail de mémoire, nous avons abordé une contribution à l'étude de l'induction de la résistance par des souches antagonistes chez le pathosystème : Tomate/*Agrobacterium tumefaciens* en réalisant un test d'antagonisme *in planta*. La seconde partie est consacrée à la recherche d'une éventuelle modification du métabolisme secondaire : accumulation des composés phénoliques suite à l'inoculation des plantules de tomate par les souches antagonistes.

### 1. L'antagonisme de *Bacillus spp.* Et *Pseudomonas brassicacearum* et potentiel d'induction d'une résistance systémique

Les résultats obtenus à travers l'étude d'antagonisme *in vivo*, nous ont permis de constater une diminution et parfois même une absence totale de symptômes de la galle du collet au niveau des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne des antagonistes (*Pseudomonas brassicacearum* et *Bacillus spp.*), comparées aux témoins positifs qui correspondent aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium spp.* et aux témoins négatifs trempés dans l'eau distillée stérile.

La bibliographie rapporte que les espèces de *Bacillus ssp.* colonisent rapidement les racines des plantes et ont la capacité de se multiplier sur les racines (Van Sluys et al., 2002). D'une manière générale, il est connu que la compétition bactérienne diminue les chances d'une bonne colonisation bactérienne et c'est ce qui est justement exploité dans le domaine du biocontrôle par l'utilisation des antagonistes dans le cas du crown gall (Ryder et al., 1991 ; Penyalver et Lopez, 1999 ).

Les espèces de *Bacillus spp.* induisent une résistance systémique par la production de composés organiques volatils (Backert et Meyer, 2006) et favorisent la croissance des plantes et des racines à travers la production de phytohormones et d'enzymes extracellulaires (Fronzes et al., 2009). Ce qui rend les espèces de ce genre efficaces dans la lutte contre une gamme de maladies fongiques et bactériennes (Backert et Meyer, 2006).

La bactérisation des plants de tomate avec *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus methylotrophicus* (OS4), et *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3 et CR2) a limité l'installation et l'expression des *Agrobacterium tumorigènes*. Cela est expliqué par la présence d'une situation d'incompatibilité entre la souche bactérienne et l'espèce végétale inoculée (Zhang et al., 2002). Le trempage des plants de tomate avec ces souches antagonistes a permis leur protection contre l'action agressive d'*Agrobacterium tumefaciens* C58, E171 et E14. Le succès de cette protection dépend du moment de l'application de l'antagoniste. Ainsi, l'inoculation des plants de tomate avec les quatre agents protecteurs bien avant les agrobactéries virulentes leur confère une protection

intéressante. Ce délai, dans nos conditions expérimentales, est de 24 heures. Les plantes sont ainsi mises en alerte suite à la reconnaissance de la bactérie pour réagir de manière systémique et plus rapidement vis-à-vis de l'expression des gènes de défense et de l'accumulation de produits inhibiteurs pour le pathogène après la perception d'un agent pathogène (Chai *et al.*, 2007). Cela avait déjà été rapporté chez plusieurs espèces végétales suite à la perception d'éliciteurs biotiques ou abiotiques (Carlier *et al.*, 2004). Nos résultats renforcent ce concept dans le contexte spécifique de l'ISR.

Les travaux de Reddy *et al.* En 1994, ont montré que l'inoculation des semences avec *Pseudomonas* spp. ont conduit à une réduction significative de la maladie des semis de conifères infectées par *Fusarium oxysporum*. Certaines souches de *Pseudomonas* peuvent également réduire l'apparition de la maladie causée par *F. oxysporum* ou *Pythiummultimum* dans une pépinière de conifères (Reddy *et al.*, 1994).

La protection conférée aux plantules de tomate inoculés par les souches pathogènes d'*A.tumefaciens* C58, E171 et E14 au niveau des blessures induites sur la tige alors que l'inoculation par les souches antagonistes a été faite au niveau racinaire, ce qui suggère un effet d'induction systémique de la résistance (ISR), tant que ces dernières (les bactéries antagonistes) ne sont pas en contact avec l'agent phytopathogène (Van Loon et Bakker, 2005). La colonisation rhizosphérique et endophytique ainsi que la capacité des espèces de *Bacillus* et *Pseudomonas* à induire une résistance systémique chez la plante auraient joué un rôle important dans la bioprotection de la tomate (Jourdan *et al.*, 2008). Des études ont montré que les voies métaboliques activées dans le cadre de l'ISR varient en fonction de l'espèce végétale même si le microorganisme inducteur est identique (Adam, 2008).

En effet, Compant *et al.* (2005) ont rapporté dans un article de synthèse que la résistance systémique induite des plantes est l'un des plus importants mécanismes de biocontrôle par les bactéries protectrices. Ce phénomène consiste en l'activation d'un certain nombre de gènes qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance de la plante entière contre le pathogène (Bergmann et Stomp, 1992).

Dans plusieurs études, ce mécanisme de défense résulte d'une multitude de changements physiologiques et biochimiques des plantes hôtes incluant l'induction de l'accumulation des métabolites de défense tels que les protéines PR (pathogenesis-related protéines), les peroxidases, les phenylalanine ammonialyases, les polyphenoloxidasés et les phytoalexines (Moor et Tingey, 1976). En effet, il a été démontré que la tomate synthétise des phytoalexines de type tomatine suite à sa pré-inoculation par la bactérie *Pseudomonas fluorescens* et induit une résistance contre le champignon *Fusarium oxysporium* f.sp. *radicis-lycopersici* (Poncet *et al.* , 1996).

Ce changement dans le métabolisme de la plante hôte exige un délai entre l'application de l'agent protecteur et celle du pathogène. Ce délai dépend du trio : plante hôte, agent protecteur et agent pathogène (Bergmann et Stomp, 1992). Il est de 0 minute lors de la bioprotection contre la verticilliose de la luzerne par *Gliocladium roseum* (Aliosi et al., 1994) et de 48h lorsque la bioprotection est faite par *Sinorhizobium meliloti* (Sule et al., 1994). Dans notre étude, la pré-inoculation avec la bactérie antagoniste 24h avant l'infection par le pathogène semble induire la production par la tomate d'une teneur seuil des métabolites impliqués dans sa résistance envers *Agrobacterium tumefaciens* testées lors de cette étude (Scharoth et al., 1988).

Pour plus de 20 ans, la galle du collet causée par *A. tumefaciens* a été contrôlée biologiquement par trempage du matériel de plantation dans une suspension cellulaire de la souche K84 d'*A. radiobacter*. Cet effet est dû à un antibiotique 'agrocine84' (Hildebrand, 1940). Ce traitement conduit à un niveau assez élevé de contrôle de la maladie, mais l'utilisation de cette souche avait beaucoup de difficultés. Plus tard, Jones et Kerr (1989) construisent une souche bactérienne semblable à K84, qui est K1026 et qui était plus efficace. Les efforts de lutte biologique à l'aide d'*Erwinia herbicola* et récemment par *Pseudomonas fluorescens* et des souches non virulentes de *Pseudomonas syringae* a gagné la plus grande attention à la fois scientifique et d'un point de vue pratique, comme agent de lutte biologique efficace (Garrett, 1973).

## **2. Modification du métabolisme secondaire : accumulation des composés phénoliques suite à l'inoculation des plantules de tomate par les souches antagonistes.**

Les interactions hôte-pathogène chez les plantes ont été très largement étudiées ces dernières années du point de vue physiologique, enzymatique, métabolique et même moléculaire (Nurenberger et al., 2004; Eulgem, 2005).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des microorganismes et des insectes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Rees et Ilarbone, 1985).

Les composés phénoliques représentent l'un des moyens mis en œuvre par la plante pour lui permettre d'adapter sa physiologie et son métabolisme à la défense vis-à-vis de différentes agressions, qu'elles soient d'origine biotique ou environnementale (Macheix et al., 2005). Ainsi que les variations qualitatives et quantitatives des composés phénoliques peuvent être particulièrement marquées au cours de la vie de la plante (Macheix et al., 1990).

Les résultats des tests phytochimiques réalisés dans notre expérimentation, montrent la présence des métabolites secondaires qui sont : les flavonoïdes, les tanins et les composés

phénoliques en grandes quantités surtout pour les plantes traitées par les bactéries antagonistes et inoculées par les souches pathogènes *d'A. tumefaciens*, ce qui peut expliquer la réduction de la sévérité et l'expression des symptômes de la galle du collet sur les plantes traitées par les bactéries antagonistes. Cela est dû aux faits que :

Selon Balatsouras (1975), les flavonoïdes ont un rôle antimicrobien. De même Valette et *al.*, 1998 signalent que les flavonoïdes ont un rôle de défense dans l'infection des bananiers par les nématodes, ces flavonoïdes interviennent en premier position pour la défense, puis les tanins arrivent en second (Kofujita et *al.*, 2004).

La synthèse et l'accumulation des niveaux élevés en flavonoïdes et en tannins est considérablement stimulées sous stress (Sailaja et Sujatha, 2013). Ils sont bioactifs et influencent le transport des hormones de la plante surtout l'auxine ainsi que leur activité antioxydant (Posmyk et *al.*, 2009).

Selon Makkar et Becker (1998), les flavonoïdes sont des substances constitutives alors que les tanins sont inductibles, résultant des réactions chimiques ultérieures plus tardives chez les plantes.

D'après les résultats de la présente étude, il apparaît que le dosage quantitatif des composés phénoliques, est plus élevée chez les tomates infestées que celle de tomates saines. Cela est expliqué par l'intervention de ces composés dans la défense contre les attaques pathogéniques. Selon Bourab (2000) et Rahioui et *al.*, (2002), les composés phénoliques sont synthétisés suite à une inoculation de pathogène.

Pour observer une modification des teneurs en métabolites au niveau des tissus végétaux, davantage de temps est nécessaire. Lors d'attaque de pathogènes, une augmentation des composés phénoliques totaux peut être observée quelques jours après l'infection (Andreu et *al.*, 2001 ; Yamunarani et *al.*, 2004), ainsi pour observer des modifications au niveau des métabolites secondaires, notre expérimentation est inscrite sur plusieurs jours. Dont nous avons suivi cette modification de composés phénoliques en quatre différents temps après l'inoculation (juste après l'inoculation, 48h après inoculation, une semaine et enfin deux semaines après inoculation).

Après 48 h d'inoculation, la teneur des composés phénoliques est plus élevée, 12,60 µg/ml est obtenue pour les plantules traitées par la souche EPR3 de *Pseudomonas brassicacearum* et inoculée par la souche E171 d'*A. tumefaciens*.

Dans une étude faite par Beimen et *al.*, en 1992, ils ont constaté une accumulation accrue des composés phénoliques 2 semaines après l'infection chez les plants de tomate traités avec trois souches de *Clavibacter*, une augmentation prononcée des composés phénoliques a été observée. L'infection par la souche hautement virulente NCPPB 382 a donné les valeurs les plus (Beimen et *al.*, 1992).

Il a été aussi démontré que les feuilles jeunes contenaient davantage de composés phénoliques (Wilkins R. T., 1997 ; Stout et al., 1998), cependant nos extraits méthanoliques ont été préparés à partir des plantules de 4 vraies feuilles dont les teneurs en phénols étaient très importante pour les différents traitements réalisés.

Les souches antagonistes EPR3 et CR2 utilisés pendant les études d'antagonisme *in vivo* sont des espèces du genre *Pseudomonas*. Les espèces de ce genre sont connues pour leur capacité à réduire le pouvoir virulent des pathogènes, en activant les mécanismes de défense et/ou en l'inhibant directement (production d'antibiotiques) (Haas et Défago, 2005).

Plusieurs études confirment que l'application préalable de *Pseudomonas fluorescens* renforce les structures d'accueil de la paroi cellulaire, ce qui limite l'invasion des agents pathogènes dans les tissus végétaux (Benhamou et al., 2000 ; Chen et al., 2000).

La diversité métabolique des *Pseudomonas* spp, fluorescents confère à ces bactéries une plasticité importante pour s'adapter à de différents environnements (Latour et Lemanceau, 1997 ; Misko et Germida, 2002), ce qui implique leur utilisation comme biofertilisants, phyto-stimulateurs et agents de lutte biologique (Misko et Germida, 2002). On note également, pour certaines souches de ce groupe de bactéries, une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (Jourdan et al., 2008). Les substances antimicrobiennes produites par *Pseudomonas* spp. fluorescents sont à large spectre et sont actives vis-à-vis des fusariums (Upadhyay et Srivastava, 2010).

Les *Pseudomonas* spp. peuvent renforcer la résistance des plantes, en induisant leurs capacités défensives naturelles, ce qui confère à l'hôte une meilleure tolérance vis-à-vis des attaques ultérieures par les agents pathogènes (Bakker et al., 2007).

Les souches de *Pseudomonas fluorescens* sont capables de synthétiser différents métabolites secondaires, qui peuvent influencer positivement la croissance des plantes et sont impliqués également dans les relations de reconnaissance entre ces bactéries et les plantes (Sturz et Christie, 2003 ; Zahir et al., 2004). L'accumulation des composés phénoliques par application préalable de *P. fluorescens* a été rapportée chez le riz (Meena et al., 2000).

La bioprotection des plants de tomate, peut être due à l'ISR et/ou aux actions antagonistes des *Pseudomonas*. La réduction de la maladie par ces bactéries antagonistes peut être due à l'inhibition de la germination et à la sporulation. Le ralentissement de ces deux processus diminue la diffusion des champignons et les bactéries (Kamilova et al., 2008).

L'application des PGPR induit des modifications biochimique, physiologique et structurale de la paroi cellulaire, conduisant à la synthèse des protéines et des produits chimiques impliqués dans les mécanismes de défense des plantes (Ramamoorthy et al., 2001), les souches antagonistes utilisées *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus methylotrophicus* (OS4), et *Pseudomonas*

*brassicacearum* (EPR3 et CR2) dans la présente étude vont partie des PGPR (Krimi *et al.*, 2016).

Dans certains paramètres, au niveau des interactions des plants de tomate avec les antagonistes et/ou le pathogène, les performances les plus élevées sont enregistrées sur tout avec l'application des souches bactériennes seules sans infection. Globalement, les témoins malades ont enregistré les valeurs les plus faibles par rapport aux plants bactérisés et sains (Swarnalee et Appa, 2010), ces résultants concordent avec les résultats qu'on a obtenus.

Par ailleurs, les composés phénoliques sont des molécules essentielles dans la stratégie de défense des plantes. En effet de nombreux acides phénoliques comme l'acide caféique, ou l'acide gallique ont des activités antivirales, antibactériennes ou antifongiques importantes (Murphy et Cowan, 1999). Certains composés phénoliques peuvent agir comme des molécules signal (acide salicylique) ou des antioxydants et ainsi induire une résistance (Malamy *et al.*, 1990).

Dans les interactions plante-pathogène, le SA peut être un activateur de défenses et ces concentrations endogènes peuvent augmenter considérablement (Yalpani *et al.*, 1991). Il agirait comme un signal chimique permettant à la plante de résister aux bactéries, virus ou champignons microscopiques qui l'attaquent ; cette fonction a été mise en évidence chez la plante Voodoo (*Arum lilies*) (Raskin *et al.*, 1987). Ce composé peut aussi être toxique pour la cellule à forte dose, son accumulation a des effets phytotoxiques pour l'agent pathogène (Raskin *et al.*, 1992), cela concorde avec nos résultats obtenus lors de dosage des composés phénolique par rapport à l'étalon acide salicylique où les teneurs en phénols étaient moyennement faible comparés aux teneurs en phénols étudiées par rapport à l'acide gallique.

Le SA interviendrait aussi comme molécule de signalisation susceptible de migrer dans les vaisseaux de la plante, et conférer une immunité à distance aux tissus de la plante dans la SAR , son niveau endogène augmente en réponse à une infection pathogène (50 à 70% près du site d'infection, et 10 à 20% à distance du site d'infection (Métraux ,2002).

Il existe divers signaux systémiques qui vont donc déclencher la S.A.R, ces messagers sont l'acide salicylique, les protéines PR, l'acide jasmonique, Les phytoalexines et enfin l'éthylène. En effet, ces molécules semblent jouer un rôle très important dans les processus de mise en place de la SAR. L'implication du SA dans l'immunité des plantes contre la pathogénicité est liée à les fonctions (Vasyukova et Ozeretskoykaya, 2007) : Le SA est une molécule mobile capable d'intervenir dans la chaîne de perception, amplification et transmission de l'information quand une cellule de la plante est attaquée par un agent pathogène ; ceci mène à l'expression de gènes de défense responsables de la protection structurale et fonctionnelle (Vasyukova et Ozeretskoykaya, 2007). Le SA migre dans les vaisseaux de la plante, et confère une immunité à distance aux tissus de la plante dans la SAR (Vernooij *et al.*, 1994). L'accumulation locale de ce composé est souvent

associé à une réaction hyper sensible, alors que l'augmentation de sa concentration dans des zones éloignées du site d'attaque, réaction hypersensible qui permet à la plante d'acquérir une résistance et se traduit par l'induction systémique acquise (SAR) (Yalpani et al, 1994).

La présente étude a porté sur l'évaluation de l'activité antagoniste *in vivo* de quatre souches antagonistes envers les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les résultats ont révélés un fort pouvoir antagoniste de ces souches. Ce pouvoir est traduite par une absence des symptômes du crown gall et une accumulation importante des composés phénoliques caractérisés par une analyse spectroscopique. Ces résultats sont très prometteurs et suggère des études plus approfondie afin de mettre en place une formulation permettant leur homologation et par la suite leur utilisation. Sur le long terme, la perspective de ces agents de lutte biologique peut fournir une protection de la nature de l'utilisation excessive de produits chimiques toxiques qui menacent la vie humaine .

### **Conclusion et perspectives**

La galle du collet est une maladie causée par les Agrobactéries tumorigènes. Cette maladie est responsable d'épidémies dans plusieurs régions du monde (Peluso et al., 2003). Elle présentait et présent, jusqu'à nos jours, une grande importance économique pour les pépinières et les vergers.

Les pertes financières ont été estimées à des millions de dollars par année (Kennedy et Alcorn ,1980). Les produits de pépinière atteints sont invendables et la présence de cette maladie dans un verger entraîne une réduction de la durée de vie des arbres qui survivent rarement une fois touchés.

Parmi les Agrobactéries, il y a aussi des pathogènes majeurs d'importance économique considérable. Certaines espèces d'*Agrobacterium tumefaciens* qui sont des parasites sur un spectre d'hôtes considérablement diversifié comprenant plusieurs arbres fruitiers (Sturz et Christie,2003) plantes ornementales (Viel et Richarson , 1993) et arbres forestiers (Buesanteal et *al.*,2007). Elles peuvent causer des dommages considérables pouvant atteindre 80 à 100% de la culture (Krimi et *al.*, 2002).

Dans l'objectif d'établir une stratégie de lutte contre la galle du collet causée par les souches virulentes d'*Agrobacterium tumefaciens* par un moyen non polluant et sans inconvénients pour l'environnement, nous avons étudié lors de cette présente étude, l'induction de la résistance par des souches antagonistes chez le pathosystème : Tomate/ *Agrobacterium tumefaciens* en réalisant un test d'antagonisme *in planta*. En complément à cette étude, nous avons procédé à la recherche d'une éventuelle modification du métabolisme secondaire : accumulation des composés phénoliques suite à l'inoculation des plantules de tomate par quatre souches antagonistes appartenant à deux genres bactériens *Bacillus* spp. et *Pseudomonas brassicacearum*. L'analyse de l'accumulation des composés phénoliques a été réalisée en 4 différents temps après l'inoculation à savoir : juste après l'inoculation 0h, après 48h d'inoculation, une 1 semaine après l'inoculation et enfin deux semaines après l'inoculation.

Les résultats du test d'antagonisme *in planta* a montré une diminution et parfois même une absence totale de symptômes de la galle du collet au niveau des plantes traitées par les bactéries antagonistes et inoculés par la suite par les souches d'*A. tumefaciens*, comparées aux témoins positifs qui correspondent aux plantes inoculées directement avec les souches d'*A.tumefaciens* et aux témoins négatifs traités par l'eau distillée stérile.

Les quatre souches antagonistes : deux souches de *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3 et CR2) et *Bacillus cereus* (OS1) et *Bacillus methylotrophicus* (OS4) ont montré leur potentiel en biocontrôle des plants de tomate et en induction de la résistance systémique vis-à-vis de l'*Agrobacterium tumefaciens*.

Dans le but de rechercher les différentes classes des substances secondaires dans les extraits méthanoliques préparés des plantes de tomates pour les différents traitements réalisés, nous avons effectué un screening phytochimique par la mise en place d'un ensemble de réactions de

caractérisation de différents composés chimiques à savoir : les flavonoïdes, les tanins, les salicylates, les quinones et les composés phénoliques.

Les résultats des tests phytochimiques montre que les extraits méthanoliques des plantes traités par les souches antagonistes et inoculées par les souches d'*A. tumefaciens* sont très riche en flavonoïdes glycosides et les composés phénoliques et moyennement riche en tanins et les salicylates et pauvre en quinones.

L'estimation quantitative des phénols est faite à l'aide du réactif de Folin - Ciocalteu, la lecture de la densité optique à 765 nm permet de déterminer la concentration des phénols se référant à la courbe d'étalon dressée à partir de concentrations connues de l'acide gallique, a révélé que les fortes concentrations des composés phénoliques est de l'ordre 12,60 µg/ml pour les plantes traitées par les souches antagonistes et inoculées par les souches pathogènes d'*A. tumefaciens*, tandis que celle des plantes traités par eau distillé stérile est de 6 µg/ml.

Alors que la lecture de la densité optique à 731 nm permet de déterminer la concentration des phénols en se référant à la courbe d'étalon dressée à partir de concentrations connues de l'acide salicylique, a montré des concentrations importantes aussi chez les plantes bactériés par les souches antagonistes et inoculées par les souches pathogènes, dont la concentration est estimé de 4,80 µg/ml, tandis que la concentration des composés phénoliques des plantes saines ne dépasse pas 2,40 µg/ml.

La teneur des composés phénoliques optimal, est observée 2 semaines après l'inoculation.

L'ensemble de ces résultats de screening phytochimique et le dosage quantitatif des composés phénoliques prouve l'existence d'une défense biochimique des plantes de tomate contre les souches tumorigènes d'*A.tumefaciens*. Cependant, ces composés phénoliques s'accumulent en même temps que l'on observe une réduction des symptômes de la maladie chez les plantes traitées, suggérant une participation active de ces molécules dans l'inhibition directe du pathogène. Généralement, la relation entre une accumulation de composés phénoliques et la résistance induite chez certaines plantes a déjà été bien établie dans d'autres pathosystèmes et est évoquée pour être une composante nécessaire à la réponse défensive de l'hôte (Ongena *et al.* 1999 ; Ongena *et al.* 2000).

Les métabolites secondaires, qu'ils soient constitutifs ou qu'ils s'accumulent à la suite de différents stress, jouent un rôle essentiel dans la défense contre les agressions et l'équilibre de la plante au sein de son milieu naturel et dans ses capacités d'adaptation (Meziane, 2010).

Les résultats de nos travaux nous encouragent à poursuivre nos recherches sur les différents composés phénoliques sécrétés par les plantules de tomate en réponse à l'inoculation d'*Agrobacterium tumefaciens*. Ainsi, on se propose de : poursuivre l'étude phytochimique et continuer la recherche des composés phénoliques : flavonoïdes, alcaloïdes, tanins... afin d'isoler, de purifier et d'identifier d'autres métabolites secondaires contenus dans ces différents extraits

méthanoliques préparées à partir des différents plantules de tomates subissant différents traitements.

Les méthodes de chromatographie liquide sont plus adaptées à des analyses plus spécifiques des composés phénoliques puisqu'elles permettent de les doser individuellement, donc pour identifier ces composés, il sera intéressant d'approfondir l'étude en effectuant une HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) (Verdu, 2013).

Cependant des études plus approfondies semblent être nécessaire pour valoriser ce travail notamment une caractérisation qualitative plus fine par des techniques plus performantes telles que la CPG/SM ou l'HPLC/SM à fin d'établir une relation structure activité, pour mieux évaluer le pouvoir antibactérien et antioxydant de ces composés phénoliques.

D'autre part, notre étude de bioprotection de la tomate pourra se poursuivre par l'étude des mécanismes de défense physiques et biochimiques impliqués dans l'induction de la résistance de cette plante aux *Agrobacterium tumefaciens* par *Pseudomonas* spp. et les espèces de *Bacillus* spp.

Et enfin, bien que cette recherche a contribué à éclaircir quelques aspects phytopathologiques et biopesticides des endophytes vis-à-vis les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp., elle n'a fait qu'entamer une série de recherches qui serait nécessaire de mener afin d'explorer ce terrain encore vierge.

## Références bibliographiques

### A

**-ADAM A., 2008.** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non pathogènes, Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique, 165p.

- AISSOUS ASSIA BECHARA RIMA., 2016.** Caractérisation chimique et activités biologiques d'extrait brut hydroalcoolique des graines de *Lepidium sativum*, Mémoire Mast Université de Constantine.
- ALFANO, J.R. AND COLLMER, A., 2004.** Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:358-414.
- ALOISI S., PIONNAT S., JACOB Y., PELLOLI G., BOTTON E., BETTACHINI A., 1994.** Crown gall du rosier : strategies de lutte. Troisième conférence Internationale sur les maladie des Plantes., Bordeaux, 6-8 Déc. 1994. *Annales ANPP*: 791: 795.
- ANDREWS, J.H., ET HARRIS, R.F., 2000.** The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology.* 38:145-180.
- ANDREU A, OLIVA C, DISTEL S, DALEO G, 2001.** "Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*." *Potato Research* 44: 1-9.
- ANITA1 B AND R. SAMIYAPPAN2., 2012.** Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *J Biopest*, 5 (Supplementary): 53-59.
- ARBIA A, BOUAZIZ S, ABDELATIF B. ISMAIL EH. MOHAMED C 2006.** Effect of rhizobium isolates on isoflavonoid levels in chickpea plant infect with *Fusarium oxysporum* F. sp. *Ciceris* , phytopathol, Mediterr ; 45 :24-34.
- ARFAN M., ATHAR H.R., ASHRAF M., 2006.** Exogenously application of salicylic acid on the modulation of photosynthetic in heat in salt stress.

## B

- BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. AND VAN LOON, L.C., 2007.** Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* 97(2):239-243.
- BALATSOURAS G. D., 1975.** Processing black olives. Sem.Oléic. Int. Cordoue (Espagne), 6-17 Octobre 1975.
- BARHAM, D., TRINDER, P., 1972.** An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97 (1972) 142.
- BARGABUS, R.L., ZIDACK, N.K., SHERWOOD, J.W. AND JACOBSEN, B.J., 2004.** Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biol. Control.* 30(2):342-350.
- BEDNAREK P, SCHULZE-LEFERT P., 2009.** Role of plant secondary metabolites at the host pathogen interface. in: parker, ed, molecular aspect of plant disease resistance, vol 34. annual plant reviews, hoboken, usa, pp 220-260
- BEIMEN A ANDREAS BERMPOHL, ANDREAS , MELETZUS DIETMAR , EICHENLAUB RUDOLF , BARZ WOLFGANG 1992** Accumulation of Phenolic Compounds in Leaves of Tomato Plants after Infection with *Clavibacter michiganense michiganense* sp. Strains Differing in Virulence . 47c, 8 9 8 -9 0 9 ; Westfälische Wilhelms-Universität
- BELKACEM KOUMRI KH., 2013.** Etude du pouvoir antagoniste (*in vitro* et *in planta*) des souches de *Bacillus* spp. Et de *Pseudomonas* spp. Et de la bioprotection par induction d'une résistance systémique vis-à-vis d'*Agrobacterium tumefaciens* agent causal de la galle du collet de la vigne. Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en sciences agronomiques. Université de SAAD DAHLEB. Blida
- BELLEBCIR .L., 2008.** Etude des composés phénoliques en tant

Que marqueurs de biodiversité chez les céréales , Mem Magister- UNIV MENTOURI DE CONSTANTINE

**-BENHAMOU, N., GAGNE, S., LE QUERE., D, AND DEHBI, L., 2000.** Bacterial mediated induced resistance in cucumber : Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 90 : 45-56.

**-BENHAMOU, N., 2009.** La résistance chez les plantes : Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Lavoisier, Paris. 376 p.

**-BENJAMA P.A. ET GADDA M. EL BOUSTANI F. EL MODAFAR C NESME X ET CUBERO J., 2004.** Détection moléculaire spécifique de la région vir du plasmide pTi d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les sols et plants au Maroc; *Bull. OEPP*. 34: 403-406.

**-BERGER, S., SINHA, A. K., & ROITSCH, T. 2007.** Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58, 4019-4026.

**-BERGMANN B., STOMP A.M., 1992.** Effect of host plant genotype and growth rate on *Agrobacterium tumefaciens* mediated gall formation in *Pinus radiata* *Phytopathology* 82 : 1457-1462.

**-BINO RJ, HALL RD, FIEHN O, KOPKA J, SAITO K, DRAPER J, NIKOLAU BJ, MENDES P, ROESSNER-TUNALI U, BEALE MH, TRETHERWEY RN, LANGE BM, WURTELE ES, SUMNER LW., 2004.** Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in Plant Science* 9:418-425

**-BLOEMBERG, G.V. AND LUGTENBERG, B.J.J., 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4(4):343-350.

**- BOLLER, T., 2002.** Ethylene and the régulation of antifungal hydrolases in plants. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 5: 145-174.

**-BOUKRAA DJAMILA., 2016.** Effet de l'acide salicylique sur les composantes du rendement et la résistance biotique et abiotique chez *Cicer arietinum*. Thes doctorat en science UNIV de MASCARA MUSTAPHA STAMBOULI.

**-BOURAB K., 2000.** Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogène dans le système chondruscristes *Acrochaete operculata*. *Doc. Univ. Paris* 6. France.

**-BORROS, B ; JAKABOVA.S ; DORNYEIA ; HORVATH.G ; PLUHAR.Z ; KILAR.F ; FELINGER.A., 2007.** Détermination de polyphénoliques composés par chromatographie-massspectrométrie in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217 : 7972-7980.

**-BOROS, B ; JAKABOVA.S ; DORNYEIA ; HORVATH.G ; PLUHAR.Z ; KILAR.F ; FELINGER.A., 2010.** Détermination de polyphénoliques composés par chromatographie-mass spectrométrie in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217(51):7972-80.

**-BOSTOCK, R.M., KARBAN, R., THALER, J.S., WEYMAN, P.D. AND GILCHRIST, D., 1999.** Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107: 103-111.

**-BOUTABET K., 2007.** Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. Thèse de Magistère de l'université de Jijel.

**-BOVY, A., SCHIJLEN, E., HALL, R. D., 2007.** Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics". *Metabolomics*. 3(3): 399-412.

**-BRAVO L., 1998.** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.*;56(11):317-33.

**-BRUNETON, J., 1993.** Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier, Tec & Doc; Édition : 2e édition 915 p.

- **BRUNETON.J., 2009.** Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales, (4<sup>éd</sup>), revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, p 1288 .
- **BUESANTEAI , N., D. ATHINUWAT, AND S. PRATHUANGWONG. 2007.** *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines* caused agent soybean bacterial pustule with
- **BUYSENS. S. HEUNGENS. K POPPE. J. ET HOFTE. M., 1996.** Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of pythium-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Applied and Environmental microbiology* 62: 865-871.

## C

- **CAI, Y. TSAI. C. S. CHO. H. ET WINANS. S. C. 2007.** Reconstitution of the biochemical activities of the attJ repressor and attK, attL, and catabolic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 189 : 3674-3679
- **CAMILLE BENARD., 2009.** Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de cultures sur le contenu en polyphénols chez la tomate, Sciences Agronomiques, Université – INRA Agronomie et Environnement Ecole doctorale RP2E .
- **CARLIER, A., CHEVROT, R., DESSAUX, Y. ET FAURE, D. 2004.** In *Agrobacterium tumefaciens* strain C58, the assimilation of butyrolactone interferes with the accumulation of the acylhomoserine lactone signal. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17 : 951-957.
- **CATALANO, L., FRANCO, I., DE NOBILI, M., AND EITA, L., 1999.** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica*, 43, Pp. 193-205. IN: Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales Nassif, D.2004. Mémoire (DEA). INRA. FRANCE.
- **CAVAGLIERI, L., ORLANDO, J., RODRIGUEZ, M.I., CHULZE, S. AND ETCHEVERRY, M., 2005.** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* 156(5-6):748-754.
- **CHEN C., BELANGER R.R., BENHAMOU N. AND PAULITZ T., 2000.** Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56, pp 13-23.
- **CHANG, J.H., GOEL, A.K., GRANT, S.R. AND DANGL, J.L., 2004.** Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 7(1):11-18.
- **CHAVES M.M., J.S. PEREIRA, J. MAROCO, M.L. RODRIQUES, C.P.P. RICARDO, M.L. OSORIO, I. CARVATHO, T. FARIA AND C. PINHEIRO. 2002.** How plants cope with water stress in the field photosynthesis and growth, *Ann. Bot.*, 89: 907–916.
- **CHEYNIER, V.; DUENAS-PATON, M.; SALAS, E.; MAURY, C.; SOUQUET, J.-M.; SARNI-MANCHADO, P.; FULCRAND, H., 2006 .** Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture.*, 57, 298-305.
- **CHOUDHARY D.K. AND JOHRI B.N., 2009.** Interactions of *Bacillus* spp. and plants- With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164, (5), pp 493-513.
- **CISSE, M., VAILLANT, F., ACOSTA, O., DHUIQUE-MAYER, C., & DORNIER, M. 2009.** Thermal degradation kinetics of anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6285–6291

**-CLÉ, C., HILL, L. M., NIGGEWEG, R., MARTIN, C. R., GUISEZ, Y., PRINSEN, E., JANSEN, M. A., 2008.** Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance". *Phytochemistry*. 69(11): 2149-2156.

**-COMPANT S., DUFFY B., NOWAK J., CLEMENT C. AND BARKA E.A. 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases : principle, mechanisms of actions, and future prospects, *Applied and Environmental Microbiology* 71 : 4951-4959.

**-CUENDET M., 1999.** Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.

## D

**-DAKORA F. D & PHILLIPS D. A., 1996.** Diverse functions of isoflavonoides in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49, 1-20.

**-DANGL, J.L. AND JONES, J.D.G., 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411(6839):826-833.

**-DE MEYER, G., AUDENAERT, K. AND HÖFTE, M., 1999.** *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 105(5):513-517.

**-DE MEYER, G., CAPIEAU, K., AUDENAERT, K., BUCHALA, A., METRAUX, J. P. AND HÖFTE, M., 1999.** Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12(5):450-458.

**-DE MEYER, G. AND HÖFTE, M., 1997.** Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*. 87(6):588-593.

**-DERRADJI-BENMEZIANE F 2015 .** Effet de la nature du sol sur la teneur en antioxydants de quelques variétés de raisin de la région d'el-tarf, univ badji mokhtar-annaba.

**-DESENDER, S., ANDRIVON, D. AND VAL, F., 2007.** Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? *Cell. Microbiol.* 9(1):21-30.

**-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

**-DIALLO A. 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologique de *Syzygium guineense* ; Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université BAMAKO, MALI ; p: 38-47.

**-DICKEY, R.S., 1961.** Relation of some edaphic factors to *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, vol. 51. Pp: 607-614.

**-DICKO, MH., GRUPPEN, H., TRAORÉ, A.S., ALPHONS, G.J., WILLEM, J.H., AND BERKEL, V., 2006.** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1(1) 21-38.

**-DIHAZI A. 2012.** Interaction Palmier dattier-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* : Induction des réactions de défense par l'acide salicylique et rôle de quelques microorganismes antagonistes

de l'agent pathogène dans le contrôle de la maladie du Bayoud. Doctorat National en Biotechnologies et physiologies végétales. Maroc.

**-DIXON RA, STRACK D., 2003.** Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry* 62:815-816.

**-DOHOU.N ; YANI.K ; THAHROUCH.S ; IDRISSE HASSAN.L.M ; BADO.C.A ; GMIRA.N., 2003.** Screening phytochimique d'une endémie ibéro-marocaine; thynelaea lythroides. *Bull. Soc. pharm. Bordeaux.*142:61-78.

**-DOSS, A., MOHAMMED, MUBARACK, H. & DHANABALAN, R., 2009.** Antibacterial activity of tanins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian Journal of Science and Technology.*2(2), 41 – 43.

**-DURRANT, W. AND DONG, X., 2004.** Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185-209.

## E

**-EL TAYEB MA., 2005.** Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regul* 45:215–224.

**-EULGEM T, 2005.** Regulation of the Arabidopsis defence transcriptome. *Trends in Plant Science*, 10, 7 1-78.

## F

**-[F A TOMAS-BARBERAN](#); [MIGIL](#)., 2008.** Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. Woodhead publishing limited CRC.

**-FIEHN O., 2002.** Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155-171

**-FLAISHMAN M. EYEL 2. VOISARD C. ET HAAS D., 1990.** Suppression of sepl & bitici by phenazine- or siderophore-deficient mutants of pseudo-nasC- u n- *Microbiol* 20, 121-124.

**-FLEURIET, A., MACHEIX, J.-J., 1981.** Quinyl esters and glucose derivatives of hydroxycinnamic acids during growth and ripening of tomato fruit". *Phytochemistry.* 20(4): 667-671.

**-FLEURIET A, MACHEIX., 1990.** Le brunissement enzymatique et la qualité des fruits. In la maîtrise de la qualité des fruits frais; 9ème colloque sur les recherches fruitées. INRA, 249-258. In: Les polyphénols en agroalimentaire. Sarni-Manchado, P;Cheynier, V. 2006. Tec et Doc. Lavoisier-Paris.

**-FLEURIET A; MACHEIX, J.J., 2003.** Acids in fruits and vegetables. Pp 1-41. In: Les polyphénols en agroalimentaire. Sarni-Manchado, P;Cheynier, V. 2006. Tecet Doc. Lavoisier-Paris.

**-FLOR, H., 1971.** Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.

**-Fowler, Z. L. and M. A. G. Koffas., 2009.** Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives." *Applied Microbiology and Biotechnology* 83: 799-808.

**-FRONZES R., P.J. CHRISTIE ET G. WAKSMAN. 2009.** The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 703-714.

## G

**-GARRETT C.M.E., 1973.** Crown gall (*Arobacterium tumefaciens* ). Report of East Malling Research Station for 1972 : 134-135.

**-GAUTIER H., DIAKOU-VERDIN V., BENARD C., PFEIFFER F., REICH M., BURET M., BOURGAUD F., POËSSEL J. L., CARIS-VEYRAT C.GENARD M., 2008.** How does tomato quality (sugar, acid and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature and irradiance?" *J. Agric. Food Chem.* , 56 (4), pp 1241–1250.

**-GOMEZ-GOMEZ, L. AND BOLLER, T., 2002.** Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 6(6):251-256.

**-GUGGENBÜHL N., 2003.** Les polyphénols sont à la fête (en ligne) : <http://www.healthandfood.be/html/fr/article/62/polyphenol.htm>.

**-GOZZO F. 2003-** Systemic acquired resistance in crop protection from nature to a chemical approach *J. Agri Food chem.* 51, pp.4487-4503.

**-GUIGNARD, J., 2000.** Biochimie végétal . 2éme edition Dunod. 188P.

**-GUNES A., INAL A., ALPASLAN M., 2005.** Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) growth under salinity. Department of soil science and plant nutrition. Ankara University. Turkey.

**-GURBUZ, I., YESILADA, E. & ITO, S., 2009.** An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(3), 360-365.

## H

**-HAAS D. KELL C. 2003.** Regulation of antibiotic production in root colonizing of *Pseudomonas spp* And relevance for biological control of plant disease *Annu Rev Phytopathol* , 41: 117-153.

**-HAAS, D. AND DEFAGO, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by *Pseudomonas fluorescent*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4):307-319.

**-HADI. M (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en Sciences. Spécialite: Pharmacochimie. Université de Louis Pasteur Domaine.155p.

**-HARBORNE, J.B., 1999.** Methods in Plant Biochemistry, Vol. 1 Plant Phenolics, Dey, P.M. and Harborne, J.B. (Eds.), Academic Press, London, 1.

**-HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I. AND LORITO, M., 2004.** *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43–56.

**-HAUDECOEUR, E., TANNIERES, M ., CIROU, A., RAFFOUX, A., DESSAUX, Y. ET FAURE, D. 2009.** Different regulation and roles of lactonases AHB and AHM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 529-537.

**-HAYAT S. ALI, B. AHMAD A . 2007.** Salicylic acid : biosynthesis, metabolism physiological role in plants.

**-HAYOUNI E.K., ABEDRABBA M., BOUIX M. ET HAMDIM., 2007.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry, Vol. 105, p.p. 1126–1134.

**-HILDEBRAND E. M. 1940.** Cane gall of brambles caused by *Phytoplasma rubi* n. sp. J. Agr. 61 : 685-696.

**-HILDEBRAND, D. C., M.N. SCHROTH, AND D.C. SANDS., 1988.** *Pseudomonas*, p. 60–80. In: N.W. Schaad (ed.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. Amer. Phytopathological Soc. Press, St. Paul, Minn.

**-HOWELL C.R., 1998.** The role of antibiosis in biocontrol, 173-180. In Harman G.E., Kubicek C.P., *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Taylor & Francis LTD, London.

## I

**-IQBAL HUSSAIN ; MONEEB UR REHMAN KHATTAK ; RIAZ ULLAH ; ZIA MUHAMMAD ; NAEEM KHAN ; FARHAT ALI KHAN ; ZAHOOR ULLAH AND SAJJAD HAIDER., 2011.** Phytochemicals screening and antimicrobial activities of selected medicinal plants of Khyberpakhtunkhwa Pakistan African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5(6), pp. 746-750.

## J

**-JEAN BRUNETON., 1999.** Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales, 1120p.

**-JI, P., CAMPBELL, H.L., KLOPPER, J. W., JONES, J.B., SUSLOW, T.V. AND WILSON, M ., 2006.** Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. Biol. Control. 36(3):358-367.

**-JOSHI S.R., 2006.** Biotechnological approach. 74-76.

**-JOURDAN E., ONGENA M. ET THONART P., 2008.** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes, Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 12, (4), pp 437-449.

## K

**-KAMILOVA F., LAMERS G., LUGTENBERG B., 2008.** Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. Environmental Microbiology, 10, (9), pp 2455-2461.

**-KANSOLE M., 2009.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth.

**-KEMPF. H-J. ET WOLF., 1989.** *Envinia crotowra* a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. Tritici on wheat. Phytopathology 79, 990-994.

- KENNEDY B.W., ALCORN S.M., 1980.** Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant pathogens. Plant Disease* 64: 674-676.
- KIM. J.J., BEN-YEHOSHUA, S., SHAPIRO, B., HENIS, Y., AND CARMELI, S., 1999.** *Plant Physiol.* 97, 880.
- KIRAD S., DAHMAN S., 2016.** Induction de la résistance par *Bacillus methylotrophicus* souche OS4 chez le pathosystème (tomate/ *Agrobacterium tumefaciens*). Mémoire de master. Université de blida.
- KLARZYNSKI, O. AND FRITIG, B., 2001.** Stimulation of plant natural defense. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III.* 324(10):953–963.
- KRIEF .S., 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal :surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en ouganda activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. thèse, doc, écologie et chimie des substances naturelles, Ecologie et chimie des substances naturelles, France.
- KRIMI Z., PETIT A., MOUGEL C., DESSAUX Y., NESMEX X., 2002.** Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. In soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 3358-3365.
- KRIMI Z., 2003.** Persistance du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* dans le sol et sa stabilité *in situ* et *in vitro*. Thèse de doctorat d'état en sciences. Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie.
- KRIMI Z., RAIQA., PETIT A., NESME X., AND DESSAUX Y., 2006.** *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European journal of plant pathology*, vol. 116. pp: 237-246.
- KRIMI Z., RAIQA 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.
- KOFUJITA H.; YAGUCHI M.; DOI N.; SUZUKI K., 2004.** A novel cytotoxic prenylated flavonoid from the root of *Morus alba*. *Journal of Insect Biotechn000gy and Sericology* 73,113-116.
- KRIMI Z., ALIM D., DJELLOUT H., TAFIFET L., MOHAMED MAHMOUD F. ET RAIQA A., 2016.** Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., and promote growth of tomato plants. *Phytopathologia mediterranea* (2016) 55, 2, 184-196.
- KONGO N 2009** Evaluation in vitro des pouvoirs antifongique des extraits de feuille de papayer sur des souches de candidas albicans ISTL kinshasa
- KORKMAZ A.,UZUNLU M., DEMIRKIRAN AR., 2007.** Treatment with acetyl salicylic acid protects muskmelon seedlings against drought stress. *Franciszed Gorski institute of plant physiologie. polish Academy of science. Krakaow.Tyrkey.*
- KOSTOVA, I., 2005.** Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agentss*, 5, 29-46.
- KUNKEL B. N. BROOKS D.M. 2012-** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense , *Curr.Opin Biol.*5, 2002, pp. 325-331.

## L

- LAHOUEL.M., 2004.** Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. thèse de doctorat de l'université mentouri de constantine.
- LARBAT, R., LE BOT, J., BOURGAUD, F., ROBIN, C., ADAMOWICZ, S., 2012.** Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation". *Plant Biology*. 14(5): 760-769.
- LATOUR X. ET LEMANCEAU P., 1997.** Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes à oxydase positive. *Agronomie*, 17, pp 427-423.
- LE BOT, J., BÉNARD, C., ROBIN, C., BOURGAUD, F., ADAMOWICZ, S., 2009.** The 'trade-off' between synthesis of primary and secondary compounds in young tomato leaves is altered by nitrate nutrition: experimental evidence and model consistency". *Journal of Experimental Botany*. 60(15): 4301-4314.
- LEE.Y.J ; ERDOS.G ; HOU. Z ; KIM.S.H ; KIM.J.H ; CHO.J.M ET CORRY.P.M., 2010.** Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 137: 141- 154.
- LENDVAI B ; ZELLES T ; ROZSA B ; VIZI ES., 2002.** Vinca alkaloid exchanges morphological dynamics of dentric neocortical Layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin*, 59 (4) : 257-260.
- LESLIE M. SHAW; TAI C KWONG; BARBARAJEAN MAGNANI., 2000.** *Clinical Approach to the Poisoned Patient". The clinical toxicology laboratory. American Association for Clinical Chemistry Inc. p. 31. ISBN 1-890883-53-0.*
- LEPOIVRE P. 2003.** Phytopathologie. Ed De Boeck université. P 154.
- LIGON. J. M., HILL. D. S. HAMMER. P. E. TORKEWITZ. N. R. ET HOFMANN. D., 2000.** Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest management science* 56: 688-695.
- LONG H.H., FURUYA N., KUROSE D., TAKESHITA M. AND TAKANAMI Y., 2003.** Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 48: 21-28.

## M

- MACHEIX J. J.; FLEURIET A.; BILLOT J., 1990.** Fruit phenolics (pp: 1-26). Boca Raton, FL: CRC Press.
- MACHEIX J.J., FLEURIET A., JAY-ALLEMAND C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, Lausanne, 192 p.
- MADI.A., 2010.** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister Université de Constantine. p 12.
- MAISUTHISAKUL, P., SUTTAJIT, M. AND PONGSAWATMANIT, R., 2008.** Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 100: 1409–1418.

- MAKKAR H. P. S. ET BECKER K., 1998.** Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity. *Agroforestry Systems*, 40:59-68.
- MALAMY, J., CARR, J.P., KLERSIG, D.F. AND RASKIN, I., 1990.** Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250: 1002-1004.
- MARFAC, A., 2003.** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de Depsides. Thèses de Doctorat. Université de Limoges.
- MATHILDE ROYER., 2013.** Etude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioengresseurs en Sciences Agronomiques .thèse , doc, Université de Lorraine – INRA.
- MAUCH, F., MAUCH-MANI, B., GAILLE, C., KULL, B., HAAS, D. AND REIMMANN, C., 2001.** Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J.* **25**(1):62-77.
- MEENA, B., MARIMUTHU, T., VIDHYASEKARAN, P. AND VELAZHAHAN, R., 2000.** Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Plant Dis. Protect.* 108: 369–381.
- MEKHALDI D., 2013.** Etude du pouvoir antagoniste (in vitro et in planta) des souches de *Bacillus* spp. Et de *Pseudomonas* spp. Et de la bioprotection par induction d'une résistance systémique vis-à-vis d'*Agrobacterium vitis* agent causal de la galle du collet de la vigne. Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en sciences agronomiques. Université de SAAD DAHLEB. Blida
- METRAUX, J.P., 2002.** Recent breakthroughs in study of Salicylic acid biosynthesis. *Tr. Plant Sci.*, 7:331-334.
- MEZIANE. H. VAN DER SLUIS. I. VAN LOON. LC. L.C. HOFTE. M. AND BAKKER. P.A.H.M., 2005.** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants . *Mol plant pathol.* 6(2) : 177-185.
- MEZIANI 2010.** Stratégies de défense biochimique mise en oeuvre par les olives attaquées par le ravageur *Bctocera oleae* (Diptera-trypetidae) dans la région d'oudjlida Tlemcen Mem mages Univ ABOUBAKR BELK.
- MISKO A.L., GERMIDA-JAMES J., 2002.** Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiology Ecology*, 42, pp 399-407.
- MOHAMMED I.Z, 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Tlemcen.
- MOORE L.W., TINGEY D.T., 1976.** Effect of temperature. Plant age and infection site on the severity of crown gall disease in radish. *Phytopathology* 66: 1328-1333.
- MOORE L.W., KADO C.I. AND BOUZAR H., 1988.** *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2<sup>nd</sup>ed. New York, APS, Minnesota, USA. 158p.
- MOUNIR I., 1997.** Production des sidérophores chez le rhizobium et leur rôle dans l'inhibition de certains champignons phytopathogènes., Mém Département des sols et de génie agro-alimentaire. UNIV LAVAL
- MOROT-GAUDRY, J. F., 2012.** Métabolisme secondaire : quelques aspects, in: Biologie végétale Croissance et développement. Dunod, Paris, 217-227.

**-MURPHY COWAN M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Crit. Microbiol. Rev.* 12:564-582.

## N

**-NANDAKUMAR, R., BABU, S., VISWANATHAN, R., RAGUCHANDER, T. AND SAMIYAPPAN, R., 2001.** Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* 33(4-5):603-612.

**- NASSIRI-ASL M. ET HOSSEINZADEH H., 2009.** Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research.* 23(9) : 1197-1204.

**-NAVARRO L, BARI R, ACHARD P, LISO´N P, NEMRI A, HARBERD NP, JONES JDG., 2008.** Deltas control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *CurrentBiology* 18, 650–655.

**-NEAL FLOMENBAUM., 2006.** Salicylates". In Lewis R. Goldfrank; Neal Flomenbaum; Mary Ann Howland; Robert S. Hoffman; Neal A. Lewin; Lewis S. Nelson. Goldfrank' stoxicologic emergencies (8th ed.). McGraw-Hill Professional. p. 557. ISBN 9780071437639.

**-NURENBERGER T.; BRUNNER F.; KEMMERLING B.; PIATER L, 2004.** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious différences. *Immunological Reviews*, 198, 249-266.

## O

**-O'BYRNE, D.J., DEVARAJ, S., GRUNDY, S.M., & JIALAL, I., 2002.** Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1367–74.

**-OJHA S., CHATTERJEC M.R., CHATTERJEE N.C. 2012.** Activities of phenol oxidizing enzymes in anthracnose disease of *Saraca asoca* under pathogenesis. *Indian Biol.* 37 (2): 9–11.

**- ONGENA, M., DAAYF, F., JACQUES, P., THONART, P., BENHAMOU, N., PAULITZ, T.C., CORNELIS, P., KOEDAM, N. AND BELANGER, R.R., 1999.** Protection of cucumber against Pythium root rot by fluorescent Pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathol.* 48(1):66-76

**-ONGENA, M., DAAYF, F., JACQUES, P., THONART, P., BENHAMOU, N., PAULITZ, T. C. AND BELANGER, R. R., 2000.** Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent Pseudomonads. *Plant Pathol.* 49(4):523-530.

**-OUAFA M., 2012.** Méthode d'étude d'activité des antioxydants des plantes médicinale

## P

**-PALUMBO, J.D. YUEN, G.Y. JOCHUM, C.C. TATUM, K.ET KOBAYASHI, A., 2005.** Mutagenesis of -1,3- glucanase genes in *lysobacter ensymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward bispolaris leaf spot of trall fescue and *pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology* 95:701-707.

**-PARK, K. S. AND KLOEPPER, J.W., 2000.** Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biol.*

**-PARKER, J.E., 2003.** Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci.* 8(6):245-247.

- PAULITZ, T.C. AND BÉLANGER, R.R., 2001.** Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**:103-133.
- PELUSO R., RAIIO A., MORRA F. and ZOINA A., 2003.** Physiological. Biological and molecular analyses of an Italian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Auro. J. Pathol.* **109**: 291-300.
- PENYALVER R. AND LOPEZ M.M., 1999.** Colonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and nonpathogenic strains k84 and k1026, used for crown gall biocontrol. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, N°5, 1999, pp: 1936-1940.
- PIQUEMAL.G., 2008.** Les flavonoïdes (en ligne) [http://www.detoursante.com/index.php,Option=com\\_content&view=article&id=166&Itemid=215](http://www.detoursante.com/index.php,Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215)
- PLEBAN, S. CHERNIN, L. ET CHET, I., 1997.** Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*, *Letters in applied Microbiology* **25**: 284-288.
- PONCET C., ANTONINI A., BETTACHI A., HERICHER D., PIONNAT S., SIMONINI L., DESSAUX Y., NESME X., 1996.** Impact of the crown gall disease on vigor and yiel of rose stress. *Acta Hortuculturae* (424): 221-225.
- PORTIER P., 2004.** Sélection d'écotypes bactériens pathogènes et non pathogènes par la plante en relation avec la différenciation en espèces génomiques chez *Agrobacterium* spp. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon 1, France. 123p
- POSMYK MM, KONTEK R, JANAS KM., 2009.** Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**(2): 596-602.

## R

- RAAIJMAKERS, J.M., LEEMAN, M., VAN OORSCHOT, M.M.P., VAN DER SLUIS, I., SCHIPPERS, B. AND BAKKER, P.A.H.M., 1995.** Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. **85**(10):1075-1081.
- RAAIJMAKERS, J.M., VLAMI, M. AND DE SOUZA, J.T., 2002.** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**(1-4):537-547.
- RAFFO A, LEONARDI C, FOGLIANO V, AMBROSINO P, SALUCCI M, GENNARO L, BUGIANESI R, GIUFFRIDA F, QUAGLIA G., 2002.** Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *J Agric Food Chem.* **50**(22): 6550-6556.
- RAHIOUI B.; CHARAFI J.; BOULOUHA B.; EL BOUSTANI KHADRI B.; EHNIANE; EL-MODAFAR C., 2002.** Rôle des polyphénols dans la résistance à la maladie de l'oeil de paon causée par *Cycloconium oleaginum*. VIII Journées scientifiques du réseau « Biotechnologies Amélioration des plantes et sécurité Alimentaire » de l'agence universitaire de la Francophonie. Octobre, Marrakech, 263-265
- RAMAMOORTHY, V., VISWANATHAN, R., RAGUCHANDER, T., PRAKASAM, V. AND SAMIYAPPAN, R., 2001.** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protect.* **20**(1):1-11.
- RAN, L.X., VAN LOON, L.C. AND BAKKER, P.A.H.M., 2005.** No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacteria induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology*. **95**(11):1349-1355.
- RAPILLY F., 1986.** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des épiphytes* **19** (No. H.S). p 1-102.

- RASKIN I, EHMANN A, MELANDER WR, MEEUSE BJD.1987.** Salicylic acid: a natural inducer of heat production in arum lilies. *Science* 237: 1601–1602
- RASKIN LA., 1992.** Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 43: 439-463.
- RAUPACH, G.S. AND KLOEPPER, J.W., 2000.** Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* 84(10):1073-1075.
- REDDY M.S., AXELROOD P.E., RADLEY R., RENNIE R.J., 1994.** Evaluation of bacterial strains for pathogen suppression and enhancement of survival and growth of conifer seedlings. In: *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Workshop PGPR.* Eds M.H. Ryder, P.M. Stephens, G.D. Bowen; CSIRO Div. Soils, Adelaide, Australia: 75-76.
- REES S. B. ET HARBORNE J. B., 1985.** The role of sesquiterpene lactones and phenolic in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochem.* 24, 2225-2231.
- REGNAULT-ROGER CATHERINE ET AL., 2005.** Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement/ pesticides , agriculture durable, OMG, lutte intégrée et biologique 2005 éd tec & doc Lavoisier, 1076 pages.
- REVILLA, E. & RYAN, J.M., 2000.** Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 881, 461–469.
- RICHARD C. DART., 2004.** *Medical toxicology* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins. p. 743. ISBN 9780781728454
- ROSS, A. F., 1961.** Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology.* 14:340-358.
- ROYER. M., 2013.** Etude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs. Thèse Docteur de l'Université de Lorraine En Sciences Agronomiques
- RYALS J.A., NEUENSCHWANDER U.H., WILLITS M.G., MOLINA A., STEINER H., HUNT M.D., 1996.** Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1996, 8:1809-1819.
- RYDER M.H ET JONES D.A., 1990.** Biological control of crown gall, D m biological control of soil-borne plant pathogens (Hornby D. eds.): Oxon ; CAB International, pp. 45-63.
- RYDER M.H. AND JONES D.A., 1991.** Biological control of crown gall using *Agrobacterium* strains K84 and K1026. *Australian Journal of Plant Physiology*, vol. 18, pp: 571-579.
- RYU. E. 1938.** On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *Jpn Soc Vet Sci* 17, 31.
- RYU, C.M., HU, C.H., REDDY, M.S. AND KLOEPPER, J.W., 2003.** Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytol.* 160(2):413-420.

## S

- SAILAJA K AND SUJATHA B, 2013.** Impact of salt stress (NaCl) on pigments, phenols and flavonoids in C4 (*Sorghum bicolor*) AND C3 (*Oryza sativa*) CULTIVARS. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research.* 2013; 4(5): 361-367.

- SAMBA, R.T., SYLLA, S.N., NEYRA, M., GUEYE, M., DREYFUS, B. & NDOYE, I., 2002.** Biological nitrogen fixation in *Crotalaria* species estimated using the <sup>15</sup>N isotope dilution method. *African Journal of Biotechnology*, 1: 17-22.
- SANCHEZ-RODRIGUEZ, E., RUIZ, J. M., FERRERES, F., MORENO, D. A., 2012.** "Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique". *Food Chemistry*. 134(2): 775-782.
- SANNOMIYA, M., FONSECA, V.B., DA SILVA, M.A., ROCHA, L.R.M., DOS SANTOS, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A., SOUZA, A.R.M. & VILEGAS, W., 2005.** Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 1–6.
- SARAVANAKUMAR, D., VIJAYAKUMAR, C., KUMAR, N. AND SAMIYAPPAN, R., 2007.** PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protect.* 26(4):556-565.
- SARNI-MANCHADO, P ; CHETNIER, V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Tec et Doc Lavoisier-Paris
- [SAWA T](#), [NAKAO M](#), [AKAIKE T](#), [ONO K](#), [MAEDA H](#), 1999.** Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. [J Agric Food Chem.](#) ;47(2):397-402
- SCAROTH M. N., MCCAIN A. H., FOOTT J. H., HUISMAN O. C., 1988.** Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant disease* 72: 241-246.
- SCHISLER, D.A., SLININGER, P.J., BEHLE, R.W. AND JACKSON, M.A., 2004.** Formulation of *Bacillus spp.* for biological control of plant diseases. *Phytopathology*. 94(11):1267-1271.
- SEBANE Rym Fafa 2014** Action combinée de la salinité et de l'acide salicylique sur les réponses biochimiques de deux espèces : *Atriplex halimus* L. et *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt, Mém MAG UNIV ORAN.
- SHAH, J., 2003.** The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(4):365-371.
- SINGLETON V L & ROSSI J A JR., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58, 1965. [Department of Viticulture and Enology. University of California, Davis. CA]
- SLIMESTAD, R., VERHEUL, M. J., 2005.** Seasonal variation in the level of plant constituents in green house production of cherry tomatoes". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 3114-3119.
- SMAIN K. ET KHODJA R., 2010.** Pouvoir antagoniste d'isolats bactériens endophytes de diverses plantes adventices à l'égard d'une gamme de bactéries phytopathogènes. Mémoire PFE phytopathologie. Université de Blida
- SOMSSICH L E. AND HAHLBROCK K., 1998.** Pathogen defence in plants -a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3, 86-90.
- SREENIVASULU N., GRIMM, B. WOBUS, W. WESCHKE., 2000.** Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in Salt-tolerant and Salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*), *Physiol. Plant* 109: 435-442. FE phytopathologie. Université de Blida.
- SREEVIDYA VS, SRINIVASA RC, RAO C, SULLIA SB, LADHA JK, REDDY PM., 2006.** Metabolic engineering of rice with soyabean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, 57(9): 1957-1969.

- STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G. AND JONES, J.D.G., 1995.** Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*. 268(5211):661-667.
- STEWART A J, CHAPMAN W, JENKINS G I, GRAHAM I, MARTIN T, CROZIER A., 2001.** "The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues." *Plant, Cell and Environment* 24: 1189-1197.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B. AND MÉTRAUX, J. P., 1997.** Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270.
- STOUT M J, BROVONT R A, DUFFEY S S., 1998.** Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology* 24(6): 945-963.
- STURZ A.V., CHRISTIE B.R., 2003.** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil & Tillage Research*, 72, pp 107–123.
- SULE, S., ET AL. 1994.** Crown gall resistance of vitis spp grapevine rootstocks. *Phytopathology* 84, 607-611.
- SUPRAKASH OJHA, NARAYAN CHANDRA CHATTERJEE., 2012.** Induction of resistance in tomato plants against *fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediated through salicylic acid and *trichoderma harzianum* **journal of plant protection research 52(2):220-226.**
- SWARNALEE D., APPA R.P., 2010.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. *Hyderabad*, 36, (3), pp 232-244.

## T

- THANGESWARI SELVARAJ\* AND SANKARALINGAM AMBALAVANAN., 2013.** Induction of defense-related enzymes in anthurium by application of fungal and bacterial biocontrol agents against *Colletotrichum gloeosporioides* . *ISSN: 2319-7706* Volume 2 Number 12 (2013) pp. 661-670
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., 2003.** Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(4):351-357
- TOMAS-BARBERAN F. A. ESPIN J. C., 2001.** "Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables." *Journal of the Science of Food and agriculture* 81: 853-876.
- TREUTTER D., 2006.** "Significance of flavonoids in plant resistance: a review." *Environment and Chemistry Letter* 4: 147-157.
- TRINDER p., 1969.-** Determination of glucose in blood *using* glucose oxydase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. clin. biochem.*, 6, 24-27.

## U

- UNLÜ H., ALTINDAL N., ÖZDAMAR ÜNLÜ H., ALTINDAL D., ET PADEM H., 2009.** Effect of salicylic acid on salinity stress in Cowpea. In: 1<sup>st</sup> International Symposium on Sustainable Development, June 9-10, 2009, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

**-UPADHYAY A., SRIVASTAVA S., 2010.** Phenazine-1-carboxylic acid is a more important contributor to biocontrol *Fusarium oxysporum* than pyrrolnitrin in *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. Microbiol Res. ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813512> )

**-UTHURRY C.A., HEVIA D., GOMEZ-CORDOVES C. (2011)** Role of honey polyphenols in health. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science 3(4) : 141-159.<http://www.ibra.org.uk/articles/Role-of-honey-polyphenols-in-health>

## V

**-VALLETTE C.; ANDARY C.; GEIGER J. P.; SARAH J. L; NICOLE M., 1998.** Histochemical and cytochemical investigations of phenols in mots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. Phytopathology. Vol. 88, n ° 11, pp. 1141-1148.

**-VAN LOON, L.C., BAKKER, P. AND PIETERSE, C. M. J., 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.

**-VAN LOON, L. C. AND VAN STRIEN, E. A., 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Mol. plant Pathol.* 55(2):85-97.

**-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, Netherlands, Springer, 313 p.

**-VAN SLUYS M. A., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., CAMARGO, L. E. A., MENCK, C. F. M., DA SILVA, A. C. R., FERRO, J. A., OLIVEIRA, M. C., SETUBAL, J. C., KITAJIMA, J. P., AND SIMPSON, A. J. 2002.** Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 40: 169-189.

**-VASYUKOVA, N.I., OZERETSKOVSKAYA, O.L. 2007.** Induced Plant Resistance and Salicylic Acid: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43: 367-373.

**-VERMERRIS W., 2006.** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).

**-VERDU Cindy 2013.** Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme Mem Doc Univ NANTES ANGERS LE MANS

**-VERNOOIJ B, UKNES S, WARD E, RYALS J. 1994.** Salicylic acid as a signal molecule in plant pathogen interactions. *Curr Opinions Cell Biol* 6:275-279.

**-VIEL, J.F. & RICHARSON, S.T., 1993.** Lymphoma, multiple myeloma and leukaemia among French farmers in relation to pesticide exposure. *Soc. Sci. Med* 37 : 771-777.

**-VINCENZO LATTANZIO1, VERONICA M. T. LATTANZIO2 AND ANGELA CARDINALI, 2006.** Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects, *Phytochemistry: Advances in Research*,: 23-67 ISBN: 81-308-0034-9.

## W

**-WALTON N. J. BROWN D. E., 1999.** Chemicals from plants, Perspectives on secondary products, World Scientific.

- **WAR AR, PAULRAJ MG, WAR MY, IGNACIMUTHU S.2011.** Differential defensive response of groundnut to *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) J Plant Interact. doi: 10.1080/17429145.2011.587898.

-**WILDERMUTH, M. C., DEWDNEY, J., WU, G. AND AUSUBEL, F.M., 2001.** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*. 414(6863):562-565

-**WILKENS R. T., SPOERKE J. M.STAMP N. E., 1996.** Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability." *Ecology* 77(1): 247-258

- **WILKENS R T, 1997.** "Limitations of evaluating the growth-differentiation balance hypothesis with only two levels of light and water." *Ecoscience* 4(3): 319-326.

-**WINKEL B. S. J., 2004.** Metabolic channeling in plants." *Annual Review of Plant Biology* 55:85-107.

- **WONG J.G; ANDERSON R.A; GRAHAM G.M; CHU M.C; SAUER M.V; GUARNACCIA M.M ; LOBO R.A., 2006.** The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome: a pilot study. *FertilSteril*12, 12.

## X

-**XIA, E.Q., DENG, G.F., GUO, Y.J., LI, H.B., 2011.** Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 622-646.

-**XU.Y.C., LEUNG S.W.S., YEUNG .D.K.Y., HU . L.H, CHEN G.H, CHE C.M, MAN.R.Y.K., 2007.** Structure- activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery . *Phytochemistry*.68 : 1179-1188 .

## Y

-**YAMUNARANI K, JAGANATHAN R, BHASKARAN R, GOVINDARAJU P, VELAZHAHAN R, 2004.**

"Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes." *Acta Physiologiae Plantarum* 26(3): 281-290.

-**YALPANI, N., SILVERMAN, P., WILSON, T.M.A., KLEIER, D.A., RASKIN, I.1991.** Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell*, 3: 809-818.

-**YUSUF .Y., 2006.** Novel uses of catechins in foods, trends food sci. tech, 17(2) 64-71.

## Z

-**ZAHIR Z.A., ARSHAD M. AND FRANKENBERGER W.T., JR. 2004.** Plant growth promoting rhizobacteria: perspectives and application in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81, pp 96-168.

**-ZEHNDER, G.W., MURPHY, J.F., SIKORA, E.J. AND KLOEPPER, J.W., 2001.**  
Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 107(1):39-50

## **ANNEXE 1**

### **Composition de milieu de culture utilisée**

**(Pour un litre de milieu)**

#### **1. Milieu LPGA (levure peptone glucose agar) (Hildebrand et *al.*, 1988)**

Bactopeptone	<b>5g</b>
Extrait de levure	<b>5g</b>
Glucose	<b>10g</b>
Agar	<b>15g</b>

Ajuster le pH à 7,2, avant d'ajouter l'agar.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

## **ANNEXE 2**

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

Mannitol	<b>10g</b>
L(-) acide glutamique	<b>2g</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>0,5g</b>
Nacl	<b>0,2g</b>
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	<b>0,2g</b>
Extrait de levure	<b>0,5g</b>
Agar	<b>15g</b>

- $MgSO_4$  doit être soluble séparément dans 20 à 50 ml d'eau distillée
- Pour la préparation du milieu en boîte ; le milieu est stérilisé en autoclavage à une température de  $120^\circ C$  pendant 20 minutes, puis coulé en boîtes de pétries.
- Pour la préparation du milieu en tube ; le milieu est dissout à chaud, puis réparti en tubes à essai, à raison de 3 à 5 ml par tube. Les tubes sont ensuite stérilisés par autoclavage à une température de  $120^\circ C$  pendant 20 minutes.

### ANNEXE 3

#### Réactif de trinder (Neal, 2006 ; Richard, 2004)

Chlorure mercurique	<b>40g</b>
Eau distillé stérile	<b>850ml</b>

Chauffer pour dissoudre. Après refroidissements, ajouter :

Nitrate ferrique $(NO_3)_3Fe, 9H_2O$	<b>40g</b>
HCl N	<b>120ml</b>

Ce réactif est stable indéfiniment