

REPUBLIQUE ALGERIENNE
MINISTERE DES UNIVERSITES

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE BLIDA
INSTITUT D'AGRONOMIE

THESE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

MAGISTER EN SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : PHYTOPATHOLOGIE

INTITULEE :

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE D'UNE
POPULATION TELLURIQUE D'AGROBACTERIUM :
EVIDENCE D'UNE ASSOCIATION PREFERENTIELLE
ENTRE PLASMIDE ET CHROMOSOME

PRESENTEE PAR :

Djaouida OUADAH

SOUTENUE LE 1^{er} JUILLET 1992 DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Mme. Nicole BOUNAGA, President
M. Z. BOUZNAD
M. N. SABAOU
M. E. KHEMICI
M. H. BOUZAR, Rapporteur

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère des Universités

Université des Sciences et Technologies de Blida

Institut d'Agronomie

THESE

pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Option: Phytopathologie

intitulée:

**Caracterisation Phénotypique d'une Population Tellurique
d'Agrobacterium: Evidence d'une Association Préférentielle entre
Plasmide et Chromosome**

Présentée par:

Djaouida OUADAH

Soutenu le 1er Juillet 1992 devant le jury composé de:

Mme. Nicole BOUNAGA, Président
M. N. SABAOU
M. Z. BOUZNAD
M. E. KHEMICI
M. H. BOUZAR, Rapporteur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'U.S.T.B. (Université des Sciences et Technologies de Blida) et au C.N.R.S. (Centre National de la Recherche Scientifique, France) de Gif-sur Yvette.

Je témoigne donc ma gratitude au Dr. Dessaux, Chargé de Recherches au C.N.R.S., ainsi qu'au Dr. Bouzar, Responsable du laboratoire de phytobactériologie à l'U.S.T.B., pour m'avoir permis de mener à bien cette étude. Je leur exprime ma profonde reconnaissance pour avoir orienté et suivi mes recherches; leurs aide et conseils prodigués avec bienveillance ont permis l'achèvement de ce travail.

Je tiens par ailleurs à dire toute ma reconnaissance au Professeur Nicole Bounaga, Directeur du Centre National de Recherches sur les Zones Arides, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury d'examen.

Je remercie le Dr. Bouznad, Maître de Conférence à l'Institut National Agronomique d'El-Harrach, le Dr. Sabaou, Maître de Conférence à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, et le Dr. Khemici de l'U.S.T.B., pour avoir consenti à participer au jury.

Je remercie également le Dr. Annik Petit, Directeur de Recherches au C.N.R.S., Mme. Nicole Froger et M. Travato pour les conseils précieux qu'ils m'ont prodigués, ainsi que tous les membres et amis du laboratoire de phytobactériologie pour leurs aide et sympathie.

Je n'oublie pas enfin, mes parents et beaux-parents qui, par leur affectueux soutien, m'ont aidée tout au long de ce travail.

RESUME

L'analyse de quatre échantillons de sol collectés au hasard dans une parcelle qui n'a pas été cultivée pendant cinq années a révélé la présence d'une importante population agrobactérienne estimée à 3×10^7 agrobactéries g^{-1} . La caractérisation de 72 souches isolées de quatre milieux d'isolement, suggère la prédominance dans ce sol d'agrobactéries appartenant aux biovars 1 (55,6%) et 2 (44,4%). L'analyse fine des souches d'*Agrobacterium* par la comparaison de marqueurs chromosomiques naturels (profils d'ADN digéré, profils de protéines cellulaires et caractères cultureux) a permis de révéler que la population du biovar 2 est homogène (chr B) mais que la population du biovar 1 est composée de cinq groupes chromosomiques différents (chr A, C, D, E, et F). Les chr A, B, C et D sont représentés à des niveaux similaires à travers les différents sites de prélèvement d'échantillons. Le test de pathogénicité sur cinq espèces de plantes a révélé la présence d'une proportion exceptionnellement élevée de souches tumorigènes (33%). Toutes ces souches tumorigènes appartiennent au biovar 1. L'analyse d'autres caractères plasmidiques (métabolisme opinique et réaction à l'agrocine 84) a révélée une association préférentielle entre le plasmide et la bactérie hôte. En effet, l'échantillon de population tellurique d'*Agrobacterium* est composé comme suit: i) 16 souches de chr A portent un plasmide Ti de type nopaline, ii) huit souches de chr C ont un plasmide Ti de type octopine, iii) quatre souches non pathogènes du biovar 1 (deux des quatre chr D, une chr E et une chr F) ont des profils d'utilisation d'opines uniques, et iv) les souches du biovar 2 (chr B) sont non pathogènes mais utilisent la nopaline. Bien que la sensibilité à l'agrocine 84 soit un trait des plasmides Ti à nopaline, 14 des 16 souches de chr B se sont révélées être sensibles à cette bactériocine; ce résultat suggère la présence dans ces souches d'un plasmide Ti défectueux.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
INTRODUCTION	1
1. Taxonomie du genre <i>Agrobacterium</i>	2
2. L'infection tumorale	5
3. Expression de gènes plasmidiques dans la cellule végétale transformée	8
4. Les molécules médiatrices de la pathogénèse	9
5. Objectifs de l'étude	15
 MATERIELS ET METHODES	 17
1. Isolement et culture des agrobactéries	17
2. Identification des souches agrobactériennes	18
3. Caractères culturaux sur PDA-CaCO ₃	22
4. Electrophorèse de l'ADN digéré par <i>HindIII</i>	22
5. Electrophorèse (SDS-PAGE) des protéines cellulaires	25
6. Test du pouvoir pathogène sur une gamme de plantes indicatrices	27
7. Réaction à l'agrocin 84	27
8. Analyse du catabolisme des opines	29
9. Extraction des opines présentes dans les tumeurs de crown gall induites par les souches d' <i>Agrobacterium</i> isolées	32
 RESULTATS	 33
 DISCUSSION	 44
 CONCLUSION	 52
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 54
 ANNEXES	 61

INTRODUCTION

Les membres du genre *Agrobacterium* sont des bactéries du sol (Bouzar et Moore, 1987). Certaines de ces bactéries telluriques sont capable d'infecter des plantes appartenant à près d'une centaine de familles botaniques, principalement des dicotylédones (De Cleene et De Ley, 1976). L'infection déclenche chez la plante hôte un processus de multiplication cellulaire anarchique engendrant la formation d'une tumeur. Ces cellules cancéreuses se maintiennent indéfiniment sur cultures axéniques (i.e., sans apport d'hormones) contrairement aux tissus non infectés qui requièrent un apport exogène d'hormones pour pousser in vitro (Dessaux et al., 1992). Cette excroissance peut se développer sur la racine, le collet ou la tige et peut affecter la circulation de la sève entraînant un retard de croissance, une nécrose des organes tuméfiés et parfois le dépérissement du plant (Bouzar et al. 1983; Goodman et al., 1987; Moore et al., 1988). La maladie se nomme galle du collet, mais est plus souvent désignée sous le nom de "crown gall". Le crown gall existe à travers les régions tempérées du monde où il cause d'importantes pertes économiques estimées à plus de 100 millions de dollars par an (Kennedy et Alcorn, 1980; Schroth et al., 1988). Cette maladie aurait été décrite pour la première fois en Allemagne en 1822 par Horter (Faivre-Amiot, 1984), mais c'est en 1907 qu'aux Etats Unis, Smith et Townsend

isolent la bactérie et l'identifient comme l'agent pathogène responsable de la formation de tumeurs sur *Chrysanthemum frutescens*.

1. Taxonomie du genre *Agrobacterium*:

Taxonomiquement, cette bactérie appartient à la famille *Rhizobiaceae* de la division Gracilicutes (i.e., Eubactérie Gram négative). Dans la dernière édition du manuel de Bergey (Kerstens et De Ley, 1984), le genre *Agrobacterium* est subdivisé en quatre espèces: *A. radiobacter*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* et *A. tumefaciens*. Ces espèces se distinguent par leur pouvoir pathogène et leur gamme d'hôtes. *A. radiobacter* est une espèce non pathogène, communément rencontrée dans le sol. *A. rhizogenes*, l'agent responsable du chevelu racinaire ou "hairy root", conduit à une multiplication cellulaire avec prolifération de racines latérales sans géotropisme (David et al., 1984); cette condition est observée généralement sur pommier (*Malus sylvestris*). *A. rubi*, l'agent responsable du "cane gall", provoque des tumeurs sur les tiges des plantes du genre *Rubus*. Et enfin, *A. tumefaciens* qui est l'agent causal du crown gall. L'émergence des techniques de biologie moléculaire a permis l'analyse du contenu du matériel génétique des souches d'*Agrobacterium* démontrant la présence d'un large plasmide dans les cellules des souches tumorigènes ou rhizogènes et son rôle

dans l'induction tumorale. Ce plasmide n'est pas présent dans les souches non pathogènes. La perte du pouvoir pathogène est liée à la perte de ce plasmide, et la virulence est restaurée si le plasmide est introduit par conjugaison ou transformation dans des souches non pathogènes (Van Larebeke et al., 1975; Kerr et al., 1977), démontrant ainsi le rôle de ce plasmide oncogène dans la pathogénèse. Un plasmide d'*Agrobacterium tumefaciens* responsable de la tumorigénèse est nommé plasmide Ti (i.e., tumor inducing); similairement, un plasmide d'*A. rhizogenes* qui engendre une prolifération racinaire est nommé plasmide Ri (i.e., root inducing). Les plasmides Ti et Ri étant des plasmides conjugatifs, ils peuvent donc être transférés à une souche non pathogène (i.e., *A. radiobacter*), transformant cette dernière en souche tumorigène ou rhizogène, suivant le type de plasmide acquis. Ainsi, d'après la taxonomie présentée dans la dernière édition du manuel de Bergey (Kerster & De Ley, 1984), l'acquisition d'un plasmide oncogène par une souche d'*A. radiobacter* entraîne son reclassement au sein d'une autre espèce: *A. tumefaciens* s'il s'agit d'un plasmide Ti et *A. rhizogenes* dans le cas de l'acquisition d'un plasmide Ri. Bien que cette taxonomie soit utile au phytopathologue, elle ne reflète pas la réalité de la structure taxonomique de ce genre bactérien.

Depuis la découverte de l'instabilité relative des

oncogènes, les principaux groupes taxonomiques du genre *Agrobacterium* sont distingués par des caractères phénotypiques d'origine chromosomique. Dans cette classification, qui est basée sur la relative stabilité des phénotypes codés par les gènes chromosomiques, les agrobactéries qui possèdent les mêmes caractéristiques sont assignées à un même groupe chromosomique ou biovar (Keane et al., 1970; White, 1972; Kersters et al., 1973; Kerr et Panagopoulos, 1977; Holmes et Roberts, 1981). Le biovar 1 regroupe des souches non pathogènes (i.e., *A. radiobacter*), des souches tumorigènes (i.e., *A. tumefaciens*), ainsi que quelques souches rhizogènes (i.e., *A. rhizogenes*) qui ont la capacité de produire du 3-cétolactose à partir du lactose. Le biovar 2 regroupe des souches tumorigènes, rhizogènes, ou non pathogènes qui sont incapable de produire du 3-cétolactose. Les différences phénotypiques entre les biovars 1 et 2 sont confirmées par l'analyse numérique de caractères physiologiques et biochimiques, la comparaison des profils protéiques et les analyses génétiques (Kersters & De Ley, 1984). Le troisième groupe phénotypique (i.e., biovar 3), qui a été découvert plus récemment, regroupe des souches tumorigènes et des souches non pathogènes isolées principalement de vigne (*Vitis vinifera*). Différentes propositions ont été faites pour élever les biovars au rang d'espèce (Holmes, 1988), mais seul le biovar 3 a fait l'objet d'une proposition officielle dans la revue de taxonomie bactérienne (Ophel et Kerr, 1990).

2. L'infection tumorale:

Le mécanisme par lequel la bactérie infecte la plante hôte est complexe, les travaux effectués ces dernières années ont permis de découvrir les principales étapes de ce transfert d'information génétique d'un organisme Procaryote à un organisme Eucaryote (figure 1). Au cours du processus d'infection, un fragment du plasmide Ti, dénommé T-DNA (i.e., "transfer DNA"), est transféré de la bactérie à la cellule végétale blessée. Le T-DNA est intégré au niveau du génome de la cellule hôte, transformant cette dernière en une cellule tumorale (Chilton *et al.*, 1977; Willmitzer *et al.*, 1980). Le transfert du T-DNA est dirigé par un ensemble de gènes de virulence (i.e., régulon *vir*) situés dans la région non transférée du plasmide Ti (Stachel et Nester, 1986). L'analyse génétique du régulon de virulence du plasmide Ti a révélé la présence de six opérons (Stachel et Nester, 1986). Ces derniers sont positivement contrôlés (régulés) par le produit du gène *virG*, qui est lui-même activé par une protéine transmembranaire, qui est le produit du gène *virA*, lorsque celle-ci est en présence de composés phénoliques exudés par la plante blessée (Stachel *et al.*, 1985). Ces composés sont principalement l'acétosyringone (3,5-diméthoxy-4-hydroxyacétophenone) et l'hydroxyacétosyringone (figure 2).

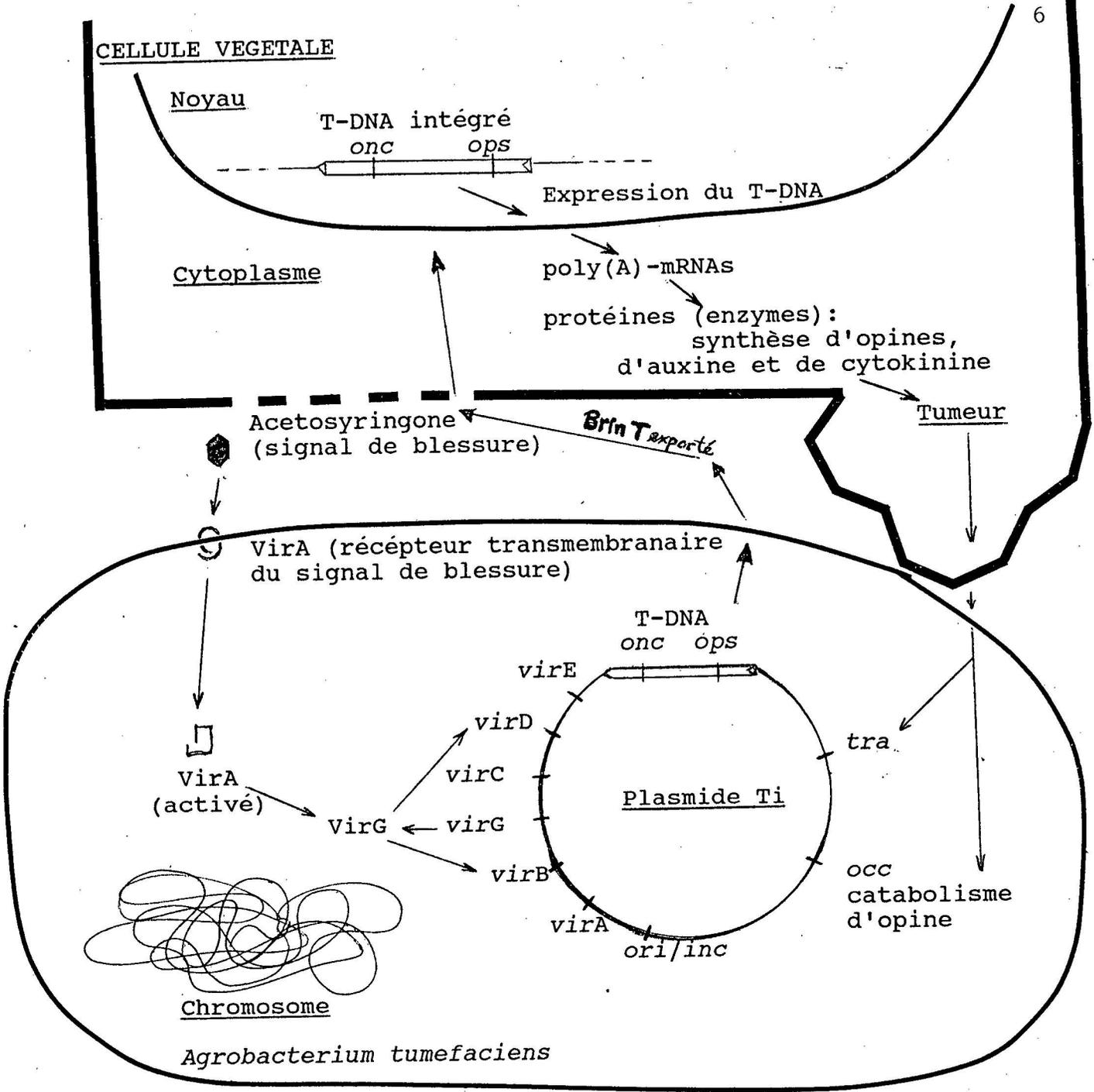
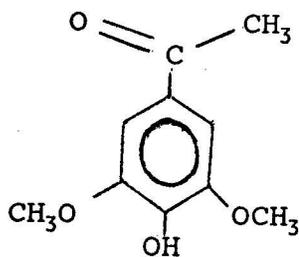


Figure 1. Schéma général de l'interaction entre la cellule végétale et *Agrobacterium tumefaciens* (adapté de Ream, 1989).



ACETOSYRINGONE

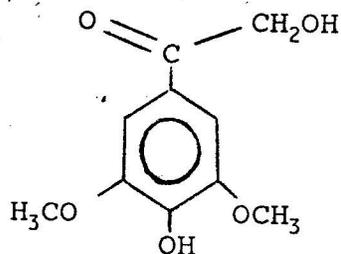
 α -HYDROXYACETOSYRINGONE

Figure 2. Exemples de la structure de composés phénoliques qui induisent le régulon *vir* (d'après Stachel et al., 1985).

Les gènes *vir* codés par le plasmide Ti sont allumés en cascade et exprimés dans l'ordre *virG*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*. L'étape finale de cette série de réactions en cascade résulte en une excision d'un brin monocaténaire du T-DNA par l'activité endonucléase codée par le gène *virD*, la protection de ce brin par la protéine VirE2 du gène *virE*, et le transfert par *virD2* de ce brin vers le noyau de la cellule végétale blessée (Ream, 1989).

3. Expression de gènes plasmidiques dans la cellule végétale transformée:

Le T-DNA porte les oncogènes qui perturbent la division cellulaire (Akiyoshi *et al.*, 1984; Schroder *et al.*, 1984) ainsi que des gènes codant pour la synthèse de composés de faible poids moléculaire, dont le nom générique d'opine leur a été attribué (Tempé et Goldman, 1982). Les séquences d'ADN plasmidique du T-DNA sont exprimées et maintenues dans la cellule végétale hôte. Le T-DNA est intégré dans le génome de la plante. L'expression des gènes du T-DNA est sous le contrôle directe des mécanismes de transcription et de traduction de la cellule végétale. Les éléments eucaryotiques de contrôle, boîtes "TATA" et "CAAT", sont présents en position 5' des sites d'initiation de transcription du T-DNA, ce qui permet la transcription de ce dernier par l'ARN polymérase II de la plante (Willmitzer *et al.*, 1981).

Les oncogènes codent pour la synthèse des hormones végétales auxine (phytohormone responsable de la croissance longitudinale des cellules végétales) et cytokinine (phytohormone qui accélère la division des cellules végétales). Le gène *ipt* (isopentyl transferase) ou *tmr* ("tumor morphology root") code pour l'isopentenyl transferase, une enzyme qui catalyse la transformation de l'AMP en isopentenyl-AMP (ipa), un composé initial conduisant à la synthèse de la cytokinine. Les autres oncogènes sont *tms-1* ("tumor morphology shoot-1") ou *iaaM* (indole 3-acetamide monooxygénase) et, *tms-2* ou *iaaH* (indole 3-acetamide hydrolase) codent respectivement pour une monooxygénase et une hydrolase qui ensemble catalysent la conversion du tryptophan (via l'indoleacetamide) en acide indole acétique, un composé nécessaire à l'activité de l'auxine (Hooykaas, 1989).

4. Les molécules médiatrices de pathogénèse:

Le second groupe de gènes du T-DNA sont les gènes codant pour la synthèse d'opines. Les opines sont synthétisées par la cellule végétale transformée et sont métabolisées comme source de carbone, d'azote et d'énergie, de façon spécifique par la bactérie donatrice pour sa propre croissance (Petit et al., 1970; Bomhoff et al., 1976). La nature des opines présentes dans la tumeur est déterminée par le T-DNA de la souche bactérienne inoculée. Les opines sont les médiateurs de la

relation hôte-parasite. Elles sont utilisées comme substrats de croissance par la bactérie et leur synthèse dans la tumeur réalise un asservissement de la cellule végétale qui conduit à la création d'un environnement propice à la propagation de la bactérie pathogène. Ainsi, la présence d'opines dans la rhizosphère crée une niche écologique pour l'agent pathogène. Ce processus d'infection où un environnement favorable à la bactérie est créé par la réorientation du métabolisme de la plante par la bactérie pour son propre bénéfice porte le nom de "Concept d'opine" (Petit *et al.*, 1978; Petit *et al.*, 1983) ou de "Théorie de la colonisation génétique" (Schell *et al.*, 1979). Les opines sont généralement des substances azotées dérivées d'acides aminés (tableau 1) (Tempé et Petit, 1983), plus exactement des dérivés azotés comportant la fonction imine (i.e., -NH) (figure 3) et une ou plusieurs fonctions d'acide carboxylique que l'on désigne généralement sous le nom d'iminoacides. Il existe une autre classe d'opines, celle des agrocinoïnes qui sont des sucres phosphodiester.

Les opines du groupe des imines sont toutes des dérivés d'amines et peuvent être divisées en sous-groupes selon la nature de la substitution sur le groupement -NH. La voie biosynthétique conduisant à la formation des imines fait intervenir une étape commune qui est l'établissement d'un bond chimique entre l'atome d'azote d'un imine primaire et le carbone d'un groupement aldéhyde ou céto. Une base de Schiff est formée

d'abord et peut subir une des trois réactions suivantes: une réduction pour former l'octopine, la nopaline, ou la succinamopine; un réarrangement Amadori pour donner les mannityl opines; une réaction Pictet-Spengler pour la synthèse des membres de la famille cucumopine. Le groupement céto ou aldéhyde peut être un sucre tel que le glucose, cas des mannityl opines, ou un α -cétoacide tel que le pyruvate, cas de la lysopine, de l'octopine, de l'acide octopinique, de l'histopine, ou encore, un α -cétoglutarate, cas de la nopaline, la succinamopine, la cucumopine, la cucumopine lactam (Dessaux et al., 1992). La vitopine qui a été récemment découverte serait un dérivé de la putrescine et de l' α -cétoglutarate (Dessaux et al., 1992).

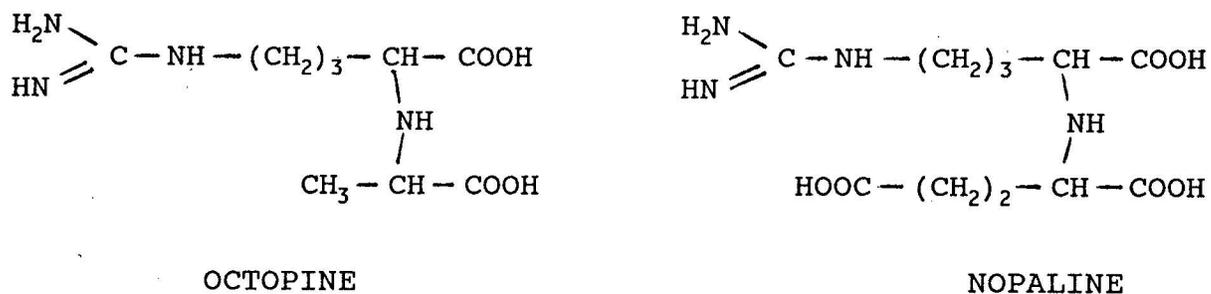


Figure 3. Formule structurale de deux opines communément rencontrées. L'octopine et la nopaline sont des dérivés de la condensation de l'arginine avec respectivement, le pyruvate et l' α -cétoglutarate (Dessaux et al., 1992).

Tableau 1. Classification des opines (Davioud et al., 1988; Dessaux et al., 1992; Winans, 1992)

Opine	Structure

Famille de l'octopine	
Octopine	Arginine et pyruvate
Acide octopinique	Ornithine et pyruvate
Lysopine	Lysine et pyruvate
Histopine	Histidine et pyruvate
Famille de la nopaline	
Nopaline	Arginine et α -cétoglutarate
Acide nopalinique	Ornithine et α -cétoglutarate
Succinamopine	Asparagine et α -cétoglutarate
Leucinopine	Leucine et α -cétoglutarate
Cucumopine	Histidine et α -cétoglutarate
Famille des mannityl opines	
Mannopine	Glutamine et mannose
Acide mannopinique	Acide glutamique et mannose
Agropine	Mannopine lactone
Acide agropinique	Mannopine lactam
Famille de l'agrocinopine	
Agrocinopine A	Sucrose et arabinose
Agrocinopine B	Fructose et arabinose
Agrocinopine C	Sucrose et glucose
Agrocinopine D	Fructose et glucose

Les opines sont synthétisées à partir des métabolites de la plante transformée grâce aux gènes *ops* (opine synthase) du T-DNA. Le gène nopaline synthase (*nos*) dirige la synthèse de la nopaline, le gène octopine synthase (*ocs*) celle de l'octopine, et celui de la mannopine synthase/agropine synthase (*mas/ags*) code pour la synthèse des mannityl opines (Dessaux et al., 1992). Ce dernier groupe de gènes se trouve localisé sur le plasmide Ti de type octopine. Le locus codant pour

l'agrocinopine-A synthase (*acs*) est localisé sur le plasmide Ti de type nopaline (Joos et al., 1983 in Dessaux et al., 1992). Le gène qui code pour la synthèse de la cucumopine a été localisé sur le T-DNA du plasmide octopine/cucumopine des souches du biovar 3. L'octopine synthase reconnaît également comme substrat la lysine, l'histidine et l'ornithine. L'activité de l'enzyme conduit respectivement à une synthèse de la lysopine, de l'histopine et de l'acide octopinique; dans ces cas l'opine est synthétisée en une seule étape. Par contre, la synthèse de la mannopine et de l'acide mannopinique nécessitent deux étapes à partir du glucose et, respectivement, de la glutamine ou du glutamate, via le déoxy-fructosyl. L'activité du produit du gène *ags* est responsable de la cyclisation de la mannopine pour former l'agropine. L'acide agropinique est le résultat de réarrangements spontanés de la mannopine et de l'agropine. Finalement, la voie biochimique qui conduit à une biosynthèse de l'agrocinopine-A n'est pas encore connue, mais elle découle de la formation d'un bond phosphodiester entre la molécule d'arabinose et celle de sucrose. Les gènes *ops* sont généralement localisés près du bord droit du T-DNA. Puisque le transfert du T-DNA commence au niveau de ce bord, les gènes *ops* sont donc les premiers à être transférés dans la cellule végétale (Dessaux et al., 1992).

Plusieurs études ont montré que le catabolisme de

l'octopine (*occ*) est induit par la présence de cette opine, de l'acide octopinique, et de la lysopine (Dessaux *et al.*, 1992). La dégradation de la nopaline est induite par la présence de la nopaline seulement. L'octopine, l'acide octopinique et la lysopine sont dégradées par des enzymes membranaires pour donner respectivement, arginine et pyruvate, ornithine et pyruvate, lysine et pyruvate. Une autre fonction catabolique est la dégradation de l'arginine par le produit du gène *arc* qui est associé avec les plasmides Ti de type octopine et nopaline. La dégradation des mannityl opines est une propriété de plusieurs plasmides pathogènes tel que les plasmides Ti de type octopine et agropine (Dessaux *et al.*, 1992).

Le type d'opines synthétisées par la plante transformée ne dépend que du type de plasmide présent dans la souche qui a induit la transformation tumorale (Kerr et Roberts, 1976). La cellule végétale ainsi transformée est reprogrammée par le pathogène pour la synthèse d'opines. La surproduction de cytokinine et d'auxine permet la formation et la croissance de la tumeur, ce qui se traduit par une multiplication des sources de synthèse d'opine. Cette production d'opine par les cellules de crown gall fournit au pathogène des substrats sélectifs de croissance favorisant ainsi la propagation du pathogène dans un environnement où la compétition microbienne est intense. Un autre rôle important est joué par certaines opines qui ont la capacité d'induire le transfert spécifique par conjugaison du

plasmide Ti à une souche non pathogène (Petit et al., 1978), ce qui théoriquement permettrait la propagation d'un plasmide à travers une population non pathogène. Cependant, différentes opines sont synthétisées par différents plasmides Ti, ce qui par conséquent rend l'induction de la conjugaison relativement spécifique. L'octopine induit la conjugaison des souches portant un plasmide Ti de type octopine, alors que les souches à nopaline ne sont stimulées à la conjugaison ni par l'octopine ni par la nopaline, mais par une autre opine, l'agrocinosine-A. Cette dernière est aussi présente dans les tissus transformés par les plasmides de type nopaline. L'induction sélective par les différentes opines du transfert par conjugaison du plasmide Ti contribue à la propagation des gènes de pathogénicité et joue, par conséquent, un rôle subtil dans l'écologie de cette bactérie et l'épidémiologie de la maladie.

5. Objectifs de l'étude:

Les infections de crown gall peuvent engendrer des pertes relativement importantes dans les pépinières de production de plants fruitiers en Algérie (Bouzar et al., 1991). Afin d'évaluer le potentiel épidémique de la maladie et l'efficacité des mesures de contrôle qui font appel à l'introduction de la souche antagoniste K84 (Kerr, 1980), une connaissance plus approfondie du comportement de la bactérie et de son plasmide Ti à l'extérieur de la tumeur est nécessaire. Actuellement,

l'information sur la capacité de survie et la stabilité génétique des souches tumorigènes dans le sol est très limitée ou n'existe pas du tout. Cette situation est en partie due à la rare détection des souches tumorigènes dans le sol et sur les racines des plantes saines, et ce bien que les souches non pathogènes y soient communément rencontrées (Schroth et al., 1971; Bouzar et Moore, 1987; Burr et al., 1987; Bell et Ramey, 1991). Ces niveaux de population tumorigène dans le sol d'apparence faibles sont en contradiction avec la régulière apparition des épidémies de crown gall et l'efficacité de la protection par K84 contre les infections telluriques (Moore et Cooksey, 1981; Bouzar et al., 1991). Cette nécessité d'améliorer nos connaissances sur l'écologie de ce pathogène et de son plasmide est à l'origine de l'analyse préliminaire du sol d'une parcelle d'expérimentation par Melle. Z. Krimi dans le cadre de son Magister (1990). Cette étude a révélé la présence d'une population agrobactérienne riche en souches tumorigènes. La particularité de cette population a suscité notre curiosité quant à la nature de ces bactéries qui, apparemment, se sont maintenues dans cette jachère pendant au moins cinq années, et ce apparemment en l'absence de tumeur qui, selon le "concept des opines", favorise la multiplication des souches tumorigènes. L'objectif de la présente étude était donc d'analyser la composition de cette population bactérienne et des plasmides y résidant.

MATERIELS ET METHODES

1. Isolement et culture des agrobactéries (Krimi, 1990):

L'isolement des agrobactéries a été effectué par Melle. Krimi dans le cadre de son Magister (1990). Les agrobactéries isolées des échantillons I, II, III, IV (respectivement B, E, F et G de Krimi, 1990) d'un sol alcalin (pH 8.5) ont été prélevés dans un parcelle située au niveau de la Station de Multiplication et de Contrôle du Matériel Végétal de l'Institut Technique d'Arboriculture Fruitière et de Viticulture (Béni-Tamou, Blida). Cette parcelle, d'une superficie de 1216 m² (38 m x 32 m), a servie de 1983 à 1985 pour la multiplication d'abricotiers, de pêchers et de pruniers. Depuis 1985, cette parcelle a été maintenue en jachère, régulièrement travaillée à l'automne. Les échantillons de sol (environ 500 g) ont été choisis au hasard et prélevés à une profondeur de 5 à 10 cm. Pour chaque échantillon, 1 g de sol a été mis en suspension dans un volume final de 10 ml d'eau distillée stérile. Après 10 minutes d'agitation, une série de dilutions au dixième a été préparée à partir de la solution mère. Un volume de 0.1 ml, prélevé à partir de chaque dilution, a été étalé sur les milieux décrits en annexe. Les colonies bactériennes sélectionnées sur la base des caractères cultureux spécifiques à *Agrobacterium* (Moore et al., 1988) ont été purifiées par des étalements

successifs sur Potato Dextrose Agar (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI) supplémenté de calcium carbonate (0.05%) et sur milieu King B (King et al., 1954). Les souches gram-négatif (Doetsch, 1981), non fluorescentes sur milieu King-B sont conservées sur PDA et dans de l'eau distillée (Moore et al., 1988).

2. Identification des souches agrobactériennes:

La caractérisation physiologique des souches et l'identification de leur biovar d'appartenance sont faites sur la base des tests classiques (tableau 2).

Tableau 2. Tests biochimiques d'identification des trois biovars d'*Agrobacterium* (Moore et al., 1988; Bouzar et Jones, 1992).

Test d'identification	Biovar		
	1	2	3
3-cétolactose	+	-	+/-
Croissance sur 2% NaCl	+	-	+
Croissance à 35 C	+	-	+/-
Citrate d'ammonium ferrique	+	-	-
Réaction de l'oxidase	+	-	+/-
Lait de tournesol	Alcalin	Acide	Alcalin
Erythritol	-	+	-
Acide tartarique	-	+	+
Utilization du citrate	-	+	+
Acide sur PDA-CaCO ₃	-	+	-

Ces tests permettent de distinguer les trois biovars sans distinction du pouvoir pathogène. Tous les milieux ou tests

sont inoculés avec de la crème bactérienne âgée de 24 à 48 h. Si le temps d'incubation n'est pas spécifié dans la description du test, les résultats sont enregistrés après deux semaines d'incubation à 27 C.

Production de 3-cétolactose (Bernaerts et De Ley, 1963): Les bactéries sont ensemencées en spot sur le milieu lactose (g/l: lactose, 10; extrait de levure, 1; agar, 20). Le milieu inoculé est incubé pendant 48 h à 27 C. Après croissance de la souche bactérienne, le milieu est inondé de réactif de Benedict. Après une heure, la présence de 3-cétolactose est révélée par la formation d'un halo jaune-orangé. La composition du réactif de Benedict est la suivante: 15 ml d'une solution de sulfate de cuivre à 11.5% est mélangée à 60 ml d'une solution chaude contenant 17.3 g de citrate de sodium et 10 g de carbonate de sodium.

Tolérance au chlorure de sodium (Moore et al., 1988): le milieu de gélose inclinée (g/l: extrait de boeuf, 3; peptone, 5.0; glucose, 2.5; chlorure de sodium, 20; agar 15) est ensemencé avec la souche à tester. Les tubes contenant les souches du biovar 2 ne supportent pas cette concentration de sel et donc ne poussent pas; par contre, les souches des deux autres biovars tolèrent cette concentration.

Croissance à 35 C (Moore et al., 1988): Le milieu de

gélose inclinée (g/l: extrait de boeuf, 3; peptone, 5.0; glucose, 2.5; agar 15) estensemencé avec la souche bactérienne à tester. Après 2 à 4 jours d'incubation à 35 C, les souches du biovar 1 poussent normalement, alors qu'aucune croissance n'est détectée chez celles du biovar 2.

Croissance et pigmentation du citrate d'ammonium ferrique (Hendrickson et al., 1934): Le bouillon de culture (g/l: citrate d'ammonium ferrique, 10.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; K_2HPO_4 , 0.5; $CaCl_2$, 0.2; extrait de levure, 0.01; pH 7) est mis en tube, puis autoclavé. Les tubes sontensemencés et mis en incubation sans agitation. Les souches du biovar 1 produisent à la surface du bouillon une pellicule de couleur rouille.

Réaction de l'oxidase (Kovacs, 1956): Des bactéries cultivées sur milieu NA-glucose (g/l: extrait de boeuf, 3; peptone, 5; glucose, 10; agar, 15) âgées de 24 h sont étalées à l'aide d'une pipette pasteur stérile sur du papier filtre imbibé d'une solution fraîche contenant 1% de tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride. Les souches du biovar 1 provoquent le développement d'un violet intense dans les dix secondes qui suivent le contact de la crème bactérienne avec la solution.

Action sur le lait de tournesol (Moore et al., 1988): Le bouillon de culture est préparé en rehydratant 10.5 g de lait de

tournesol en poudre (Difco Laboratories) dans 100 ml d'eau distillée. Après stérilisation à l'autoclave et refroidissement, le bouillon est ensemencé. La production d'acide par les souches du biovar 2 fait virer le tournesol au rose. La production d'alcalin par les souches du biovar 1 ou 3 fait virer l'indicateur de pH au bleu-gris.

Production d'acide à partir de l'érythritol (Hayward, 1964): Des tubes à essai contenant le milieu de base (g/l: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1; KCl , 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; extrait de levure, 1; solution de 1% de bleu de bromothymol, 3 ml, agar, 1.5) sont stérilisés à l'autoclave. L'érythritol est stérilisé par filtration avant d'être ajouté pour obtenir une concentration finale de 1%. Dans le cas où de l'acide est produit, suite à l'oxydation par la bactérie de la source de carbone, l'indicateur de pH contenu dans le milieu semi-gélosé vire du bleu-vert au jaune.

Utilisation du citrate (Simmons, 1926): Des tubes de gélose inclinée contenant le milieu de Simmons (g/l: NaCl , 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1; K_2HPO_4 , 1; citrate de sodium, 2; solution à 1% de bleu de bromothymol, 15 ml; agar, 20; pH 6.8; stérilisation à l'autoclave) sont ensemencés. Après 24 à 48 h, l'utilisation du citrate est révélée par l'indicateur de pH qui vire du bleu-vert au bleu foncé.

Production d'alcali à partir de l'acide tartarique (Kerr et Panagopoulos, 1977): Le milieu de base (g/l: NaNH_4PO_4 , 0.5; NaH_2PO_4 , 0.17; KCl , 0.2; solution à 1% de bleu de bromothymol, 2.5 ml; pH 7.5) est dispensé dans des tubes à essai avant d'être stérilisé à l'autoclave. L'acide tartarique est neutralisé avec de la soude, stérilisé par filtration, puis ajouté au milieu de base pour une concentration finale de 0,1%. Après inoculation et une incubation de 15 jours, les souches qui utilisent cette source de carbone font virer la couleur du milieu du vert au bleu.

Pour déterminer la structure taxonomique de cette communauté agrobactérienne au dessous du niveau du biovar, les sous-populations ont été identifiées par la comparaison des caractères morphologiques des colonies sur milieu PDA- CaCO_3 , l'analyse des profils d'ADN digéré et l'étude des profils des protéines des différentes souches.

3. Caractères cultureux sur PDA- CaCO_3 :

Les bactéries sont ensemencées pour obtenir des colonies individuelles sur milieu PDA- CaCO_3 (g/l: Potato Dextrose Agar Difco, 20; carbonate de calcium, 0.5, agar, 7.5). Après 4 jours d'incubation à 27 C, les colonies sont décrites. Ce test permet également de distinguer les souches du biovar 2 qui

éclaircissent le milieu (Bouzar et Jones, 1992).

4. Electrophorèse de l'ADN digéré par *Hind*III:

Extraction de l'ADN génomique: L'ADN total est extrait suivant la méthode décrite par Dhaese et coll. (1979). Les bactéries sont cultivées pendant 24 h à 30 C en milieu YEB (g/l: Bacto beef nutrient broth, 5; extrait de levure, 1; peptone, 5; mannitol, 5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5). Les bactéries du biovar 2 poussent plus lentement et sont donc cultivées pendant 36 h. Après centrifugation à 6.000 rpm (rotor JA-17, centrifugeuse Beckman model J2-21 M) pendant 10 minutes à 4 C, les cellules sont traitées successivement avec 0.5 ml d'une solution de sarcosyl à 5% (faible détergent qui permet de solubiliser la paroi bactérienne) et 0.5 ml d'une solution de Pronase à 5 mg/ml dans du tampon TE (tris-Cl, 50 mM, pH 8.0; EDTA, 20 mM). Les cellules sont incubées pendant 1 h pour dégrader les protéines. La phase suivante est celle de l'extraction des protéines. La préparation est soumise à une centrifugation de 10.000 rpm pendant 1 min, 0.9 ml du lysat est prélevé de la préparation mère, pour être traité deux fois avec un volume de phénol équilibré avec 3% de NaCl. Quatre autres extractions sont faites avec un volume d'ether pour éliminer toute trace de phénol. L'ADN est précipité par un mélange d'éthanol (95%) froid en présence d'acétate de sodium (0.3 M) pendant 5 min à -80 C. Le surnageant est décanté, le culot est rincé avec de

l'éthanol (70%) et est séché avec un pompe à vide. Le culot est resuspendu dans 0.1 à 0.2 ml de TE avant d'être traité avec 10 μ l de RNase (2.5 mg/ml) à 37 C.

Digestion de l'ADN: *Hind*III (New England Biolabs, Beverly, MA) est l'endonucléase de restriction utilisée. Dans chaque tube microfuge (Eppendorf), les réactifs sont ajoutés dans l'ordre suivant: 15 μ l H₂O, 2 μ l ADN, 2 μ l 10xTp (50 mM tris-Cl pH 8, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) et 15 unités d'enzyme *Hind*III (20000 u/ml). L'incubation à 37 C dure 2 h.

Séparation et révélation des fragments d'ADN digéré: Un gel d'agarose à 0.8% est préparé avec 2 g d'agarose dissous dans 250 ml de tampon d'électrophorèse TAE (40 mM tris-acetate, 1 mM EDTA), refroidi à 50 C et versé sur la plaque de l'appareil d'électrophorèse portant le peigne qui permet de former les puits dans le gel. Avant de charger le gel avec les différents échantillons, 3 μ l de tampon de charge (0.25% bleu de bromophenol, 0.25% de xylène cyanol, 30% glycerol) sont ajoutés à la solution d'ADN, pour visualiser la migration des brins d'ADN. Pour chaque échantillon, 25 μ l d'ADN digéré sont déposés dans le puits. La migration se fait sous 15 v durant 15 h (migration de l'indicateur jusqu'aux 2/3 de la longueur du gel). Les bandes d'ADN sont révélées par trempage (20 min) dans du bromure d'ethidium (0.5 μ g/ml). Après rinçage à l'eau déionisée (20 min), le gel est observé sous rayonnement U.V. Pour

améliorer la visualisation et la séparation des brins d'ADN, il est procédé soit à une extraction supplémentaire au chloroforme, soit à une augmentation de la quantité d'ADN chargé dans le puits, ou encore, à une diminution du voltage concomitante avec une prolongation du temps de migration.

5. Electrophorèse (SDS-PAGE) des protéines cellulaires:

Extraction des protéines: Les bactéries sont cultivées dans 3 ml AT-mannitol (g/l: mannitol, 2; KH_2PO_4 , 10.9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.16; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.002; KOH 6N, 110ml). Après 3 jours d'incubation, 1 ml de bouillon est placé dans un tube microfuge et centrifugé à 13000 rpm pendant 3 minutes. Les bactéries sont rincées avec du tampon PBS (10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl), recentrifugées et resuspendues dans 1 ml de PBS. la suspension bactérienne est transférée dans une cuvette de spectrophotomètre pour la lecture de la densité optique à 600 nm. Les bactéries sont une nouvelle fois centrifugées avant d'être resuspendues dans le tampon Laemmli (1970) (65 mM tris-Cl pH 6.8, sodium dodecyl sulfate "SDS" 2%, 2-mercaptoéthanol 5%, glycérol 10%) à un volume égal à 100 μl par unité de densité optique. L'échantillon est ensuite bouilli pendant 5 min, puis centrifugé pendant 10 min. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube microfuge et maintenu dans un bac de glace ou conservé à -20 C.

Préparation du gel discontinu d'acrylamide: Les protéines sont séparées à travers un gel discontinu composé d'un gel de concentration (5% d'acrylamide avec 2.6% polymérisation "crosslinking", 125 mM tris-Cl pH 6.8, 0.1% SDS) et d'un gel de séparation (12% acrylamide avec 2.6% polymérisation, 375 mM tris-Cl pH 8.8, 0.1% SDS). Avant de verser les solutions de gel entre deux plaques de verre (sandwich), une solution de persulphate d'ammonium à 10% (0.5% du volume du gel) et de Temed (0.05% du volume du gel) sont ajoutés pour catalyser la réaction de polymérisation. Deux heures après polymérisation du gel de séparation, la solution de gel de concentration est versée au dessus du premier gel et le peigne est inséré avant polymérisation du gel de concentration pour former les puits devant recevoir les échantillons de protéines solubilisées.

Séparation et révélation des protéines: Une fois les échantillons déposés dans les puits, le sandwich contenant le gel discontinu est placé dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon Tris-Glycine (250 mM tris; 192 mM glycine; 0.1% SDS; pH non ajusté doit être entre 8 et 8.5). Un courant constant de 25 mA est appliqué jusqu'à ce que le bleu de bromophenol arrive au niveau du gel de séparation (environ 1 h). Le courant est ensuite augmenté à 35 mA jusqu'à ce que le front du colorant ait migré de 100 mm à travers le gel de séparation. Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie. Le gel est trempé 1 h dans le colorant (0.125% bleu de Coomassie; 50% méthanol; 10 % acide

acétique) et rincé pendant la nuit dans une solution de 50% méthanol-10% acide acétique. Les protéines apparaissent bleues dans le gel transparent.

6. Test du pouvoir pathogène sur une gamme de plantes

indicatrices:

Les souches sont testées initialement sur *Kalanchoe daigremontiana* et tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Marmande). Les souches qui n'induisent pas de tumeur sur ces deux espèces sont inoculées sur courgette (*Cucurbita pepo*), ricin (*Ricinus communis*) et tournesol (*Helianthus annuus* cv. Xanthi). Une blessure est faite à l'aide d'un scalpel au deuxième entrenœud et de la crème bactérienne y est déposée. Le développement d'une tumeur peut être observé dès la troisième semaine qui suit l'inoculation. Le test de pathogénicité sur *Kalanchoe* est fait sur les jeunes feuilles charnues. Pour obtenir rapidement des résultats, l'inoculation du tournesol est faite au niveau de cotylédons blessés. Les plants de tournesol sont issus de graines désinfectées à l'hypochlorite de calcium (9%). Après stérilisation, les graines sont rincées pendant 30 min à l'eau distillée stérile puis placées sur une boîte de pétri contenant de l'eau et de l'agar (0.7%). Les graines sont mises à germer à l'obscurité à 25 C. Après germination, chaque plantule est transférée dans un tube à essai contenant le même milieu. Si au bout de deux jours les graines ne germent pas, un traitement de

2 min à l'azote liquide permet de stimuler la germination.

7. Réaction à l'agrocin 84:

Une caractéristique des plasmides Ti de type nopaline, est la sensibilité à l'agrocin 84 conférée par ce type de plasmide à la bactérie hôte (Ellis et al., 1979). La souche bactériocinogène *Agrobacterium radiobacter* K84 est ensemencée dans 20 ml de milieu YEB. Après 12 h d'incubation à 27 C, 0.1 ml de cette suspension bactérienne est déposée au centre d'une boîte de pétri contenant le milieu MPB (g/l: mannitol, 2; $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, 2; extrait de levure, 0.005; KH_2PO_4 , 10.9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.16; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.002; KOH 6N, 110ml; agar, 20). Après 24 h d'incubation à 27 C, la crème bactérienne (K84) est enlevée par raclage et les boîtes sont retournées sur un papier filtre (4 cm de diamètre) imbibé de 300 μl de chloroforme. Le traitement au chloroforme dure 90 min. Les boîtes sont ensuite aérées sous flux laminaire stérile pendant 15 min. Les souches à tester sont suspendues dans 4.5 ml d'une préparation de 0.5 ml d'eau distillée stérile et de 4 ml d'une gélose molle de MPB (agar, 0.6%) maintenue liquide à 45 C. La suspension bactérienne contenue dans la gélose molle est versée en deuxième couche sur la boîte contenant du MPB. Les témoins utilisés sont C58 (plasmide Ti de type nopaline) et C58C1 (souche C58 dépourvue du plasmide Ti), respectivement témoins positif et négatif pour la sensibilité à l'agrocin 84.

Les souches sensibles à l'agrocine ne poussent pas près de la zone de croissance de K84; une zone d'inhibition apparaît sous forme de halo translucide. Les souches résistantes poussent sur le milieu sans être affectées par la présence d'agrocine.

8. Analyse du catabolisme des opines:

Préparation des cocktails de dégradation: Pour chaque souche à tester, trois différents cocktails de consommation sont préparés par l'addition d'opine(s) au milieu AT contenant du sulfate d'ammonium (0.2%) et de l'extrait de levure (0.01%). Le premier cocktail contient de la mannopine (2.5 mM) et de l'agropine (2.5 mM), le deuxième contient de l'acide mannopinique (5 mM), et le troisième de l'octopine (5 mM), de la nopaline (5 mM) et de la cucumopine (4 mM). Chaque cocktail est distribué dans des tubes microfuges à raison de 0.1 ml par tube. Chaque souche est inoculée dans les trois cocktails avec 0.1 ml d'une suspension bactérienne.

Séparation électrophorétique des opines: Après 2 et 7 jours d'incubation à 27 C, l'utilisation d'opine est révélée par la disparition de l'opine du cocktail. Une suspension bactérienne (1 μ l) provenant de chacun des cocktails est déposée sur du papier Whatman 3MM de dimensions 46 cm x 57 cm. Les échantillons sont déposés sur un tracé de 5 mm au centre de la feuille (à 23 cm des deux bords) et sont espacés entre eux de

1.5 cm. Les feuilles de papier Whatmann sont plongées dans un milieu tampon (eau, 910 ml; acide formique, 30 ml; acide acétique, 60 ml; pH 1.9) et les opines sont soumises à un courant de 2500 mA (3300 à 3400 V) pendant 15 minutes (appareil d'électrophorèse à haute tension, Gilson Medical Electronics). La migration se fait vers le pôle négatif, qui est le compartiment extérieur de la cuve. Après migration, les feuilles sont suspendues et séchées devant un radiateur soufflant de l'air chaud; le papier devant être sec avant de procéder à la révélation des composés.

Révélation des produits catabolisés par les souches: La présence d'opine est révélée par trempage des feuilles de papier dans des réactifs spécifiques. C'est le côté du papier correspondant au pôle négatif qui est d'abord trempé; c'est de ce côté que les opines migrent. Les techniques de détection varient selon le type du groupement chimique de l'opine à analyser.

Détection de l'octopine et de la nopaline: La détection de ces composés se fait à l'aide de la phénanthrène quinone qui est spécifique pour les guanidines monosubstituées tel l'arginine (Yamada et Itano, 1966 *in* Dessaux *ét al.*, 1992). La révélation se fait sous rayonnement U.V. (312 nm) après trempage du papier dans la solution de révélation préparée de la façon suivante: 10 ml d'une solution de phénanthrène quinone (0.1% phénanthrène

quinone dans 90% d'éthanol) sont dilués dans 90 ml d'éthanol (95%); à cette solution on ajoute 25 ml de soude (6N NaOH dans de l'eau). Cette solution ne peut être gardée plus de 2 h (corrosive). Les opines ainsi traitées fluorèscent sous U.V.

Détection des mannityl opines: La détection de ces composés se fait à l'aide du nitrate d'argent qui est spécifique aux α -diols (Trevelyan et al., 1950 in Dessaux et al., 1992). La famille des mannityl opines est aussi appelée la famille de l'agropine. Cette famille comprend la mannopine, l'acide mannopinique, l'agropine et l'acide agropinique (Dessaux et al., 1992). La révélation se fait comme suit: le papier est trempé dans du nitrate d'argent (0.4% nitrate d'argent dans 99% acétone), séché à l'air frais avant d'être trempé dans de la soude (2% NaOH dans 90% d'éthanol). Après quelques secondes, les tâches d' α -diols apparaissent noires. Finalement, pour conserver les résultats, le papier est trempé dans un fixateur dilué (1/4 Kodak AL-4) puis rincé profusement à l'eau.

Détection de la cucumopine: La détection de cette opine se fait à l'aide du réactif de Pauley (Dawson et al., 1968 in Dessaux et al., 1992) qui réagit avec le groupement imidazole de la molécule. Ce réactif est préparé 5 min avant utilisation en mélangeant un volume d'une solution d'acide sulfanylique (0.5% dans de l'acide chloridrique 1 N) à un volume d'une solution aqueuse de nitrite de sodium (5%). Après séchage de

l'électrophorégramme, le papier est légèrement imprégné du réactif à l'aide d'un pulvérisateur, puis séché sous air froid avant d'être traité par pulvérisation d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (15%) jusqu'à l'apparition de tâches rose-orangé.

9. Extraction des opines présentes dans les tumeurs de crown gall induites par les souches d'*Agrobacterium* isolées:

L'échantillon de tissu tumoral est pesé, introduit dans un tube microfuge, et recouvert d'eau distillée. Le volume d'eau varie en fonction du poids de l'échantillon: 0.1 ml pour un poids inférieur à 30 mg, 0.2 ml de 30 à 60 mg, et 0.3 ml pour un poids entre 60 et 100 mg. L'échantillon est placé dans un bain-marie pendant 10 min. Le liquide est rassemblé au fond du tube par centrifugation (13000 rpm pendant 10 min) pour être transféré dans un autre tube microfuge et évaporé (1 h par 0.1 ml de liquide) dans une centrifugeuse chauffante sous vide (SpeedVac). Après évaporation, chaque échantillon est resuspendu dans un volume d'eau distillée égal au cinquième du poids de l'échantillon. La présence d'opines est détectée par électrophorèse à haute tension et révélée selon les méthodes présentées précédemment. La détection de la lysopine, de l'acide octopinique, et l'acide nopalinique se fait à l'aide de la ninhydrine qui est un réactif spécifique pour les amines primaires (i.e., les acides aminés et les sucres aminés). Pour

détecter la présence de ces opines, les électrophorogrammes sont plongés dans une solution contenant 0.25% de ninhydrine dans 95% d'ethanol. Les feuilles sont ensuite rincées à l'eau et séchées. Ces opines produisent des tâches rose-violet.

RESULTATS

L'analyse phénotypique des souches isolées de quatre échantillons a permis de déterminer la composition de cette population agrobactérienne. La caractérisation biochimique et physiologique a révélée la présence de deux biovars: 40 souches sont du biovar 1 et 32 sont du biovar 2. D'après les milieux d'isolement utilisés, 37 des 40 souches du biovar 1 ont été isolées des milieux 1A et RS, alors que 28^s des 32 souches du biovar 2 ont généralement été obtenues à l'aide des milieux 2E et MG (tableau 3).

Tableau 3. Nombre (et pourcentage) de souches des biovars 1 et 2 isolées de différents milieux

Biovar	Milieu d'isolement			
	1A	2E	RS	MG
1	24 (89%)	--	13 (93%)	3 (25%)
2	3 (11%)	19 (100%)	1 (7%)	9 (75%)

L'inoculation des souches sur cinq espèces de plantes indicatrices a permis l'identification de 24 souches tumorigènes, soit un tiers des souches d'*Agrobacterium* isolées. Il est intéressant de noter que toutes les souches ayant la capacité d'induire une transformation tumorale appartiennent au biovar 1 (tableau 4).

Le test in-vitro de sensibilité à l'agrocine 84 a révélé la présence au sein de cette population d'une large proportion de souches (41.6%) dont la croissance est inhibée par cette bactériocine. Les 30 souches agrocine-sensibles se répartissent de la façon suivante: 16 souches tumorigènes du biovar 1 et 14 souches non pathogènes du biovar 2 (tableau 4).

Sur les 72 souches d'*Agrobacterium*, isolées des quatre échantillons de sol, 10 souches du biovar 1 et 16 du biovar 2 sont non pathogènes et résistantes à l'agrocine.

Les opines présentent dans les tumeurs causées par les 24 souches tumorigènes du biovar 1 sont de deux types suggérant la présence de deux types de tumeurs (tableau 4). Deux tiers (16/24) des tumeurs synthétisent de la nopaline (i.e., tumeur de type nopaline), les autres tumeurs (8/24) contiennent de l'octopine, de la mannopine, de l'agropine, et de l'acide agropinique (i.e., tumeur de type octopine).

La caractérisation au niveau infraspécifique de 46 souches présumées tumorigènes ou agrocine-sensibles s'est faite par i) l'analyse des profils d'ADN digéré par l'enzyme de restriction *Hind*III et, ii) la comparaison des profils protéiques. Ces 46 souches comprennent les 24 souches tumorigènes du biovar 1, les 14 souches agrocine-sensibles du biovar 2, ainsi que huit souches (6 biovar 1 et 2 biovar 2)

initialement identifiées comme pathogènes ou agrocin-sensibles et qui se sont révélées être non pathogènes et agrocin-résistantes. La comparaison des profils d'ADN digéré a permis d'identifier six types chromosomiques différents (tableau 4 et figure 4). Cinq fonds chromosomiques ont été identifiés parmi les souches du biovar 1: chr A, chr C, chr D, chr E et chr F (tableau 4 et figure 4). Par contre, toutes les souches du biovar 2 possèdent le même fond chromosomique (i.e., chr B).

Lorsque les protéines cellulaires de ces mêmes souches sont séparés électrophorétiquement dans un gel discontinu de polyacrylamide, les profils obtenus permettent de grouper les souches dans un schéma identique à celui obtenu par l'analyse génomique. Les profils protéiques sont identiques pour les souches appartenant à un profil génomique particulier (tableau 4 et figure 5).

Une corrélation existe également entre la présence d'un fond chromosomique et les caractères culturels d'une souche sur milieu PDA-CaCO₃ (tableau 4). Bien que toutes les souches produisent des colonies uniformément circulaires et de couleur crème, plusieurs groupes chromosomiques ont pu être distingués après 48 h de croissance sur ce milieu. Les colonies des souches du chr A ont un diamètre de 3 mm, sont plates avec un centre légèrement convexe, et forment une pellicule, ou film de croissance bactérienne, qui ne peut être facilement dispersée.

Les colonies des souches ayant un fond chromosomique de type D, E ou F produisent des colonies typiques du genre *Agrobacterium*; ces colonies ont un diamètre de 3 à 4 mm. Les souches de chr C forment des colonies convexes et élevées (i.e., bombées) ayant un diamètre de 1.5 mm. Les souches présentant un fond chromosomique de type B, produisent des colonies punctiformes (i.e., 0.5 mm de diamètre). Après 4 jours, ces colonies ressemblent aux colonies de type chr C, mais se distinguent par la production d'un halo transparent dans le milieu. Cet éclaircissement du carbonate de calcium présent dans le milieu est caractéristique des souches du biovar 2 et est le résultat d'une production importante d'acide suite au métabolisme du glucose par ce groupe de bactéries (Bouzar et Jones, 1992).

Tableau 4. Résumé des caractères phénotypiques d'origine chromosomique ou plasmidique de 46 souches d'*Agrobacterium* isolées de quatre échantillons de sol

Souche type	Chromosome ^a			Plasmide		Opine ^e	Catabolisée	Synthétisée
	Cln ^b	Bv	Chr ^c	Agrocin ^d	Tumeur			
D39 (16) ^f	X	1	A	+	+	N O ^g	N	N
D41 (8)	Z	1	C	-	+	O M Ma A Aa	O M A Aa	O M A Aa
D73 (2)	Y	1	D	-	-	O	n.a.	n.a.
H4 (2)	Y	1	D	-	-	-	n.a.	n.a.
D72 (1)	Y	1	E	-	-	Aa	n.a.	n.a.
H25 (1)	Y	1	F	-	-	C N O	n.a.	n.a.
H5 (14)	Za	2	B	+	-	N O ^g	n.a.	n.a.
D69 (2)	Za	2	B	-	-	N O ^g	n.a.	n.a.

^a Cln = colonie; Bv = biovar; Chr = fond chromosomique.

^b Morphologie des colonies sur PDA-CaCO₃: X, plate avec centre relevé; Y, convexe; Z, dôme élevé; Za, similaire à Z mais avec production d'un halo.

^c Groupes chromosomiques déterminés par les profils protéiques et génomiques (c.f., Matériels & Méthodes).

^d +, souche sensible; -, souche résistante.

^e N, nopaline; O, octopine; M, mannopine; Ma, acide mannopinique; A, agropine; Aa, acide agropinique; C, cucumopine.

^f Nombre de souches de phénotype identique.

^g Octopine utilisée seulement en présence de nopaline.

^h Non applicable.

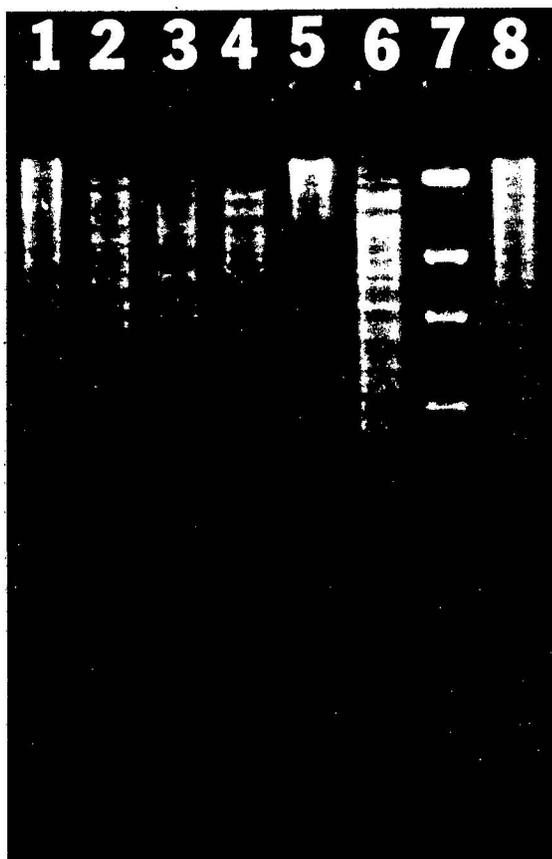


Figure 4. Electrophorégrammes de l'ADN génomique digéré par l'enzyme de restriction *Hind*III. Les profils sont séparés en gel d'agarose (0.8%) et représentent les fonds chromosomiques rencontrés dans la population tellurique d'*Agrobacterium* étudiée. Les couloirs 1, 2, 3, 4, 6 et 8 représentent, respectivement les profils des fonds chromosomiques E, C, B, A, F et D. Le couloir 5 représente le profil d'une souche ultérieurement identifiée comme n'appartenant pas au genre étudié. Pour référence, le couloir 7 présente le profil de l'ADN du phage Lambda digéré par la même endonucléase.

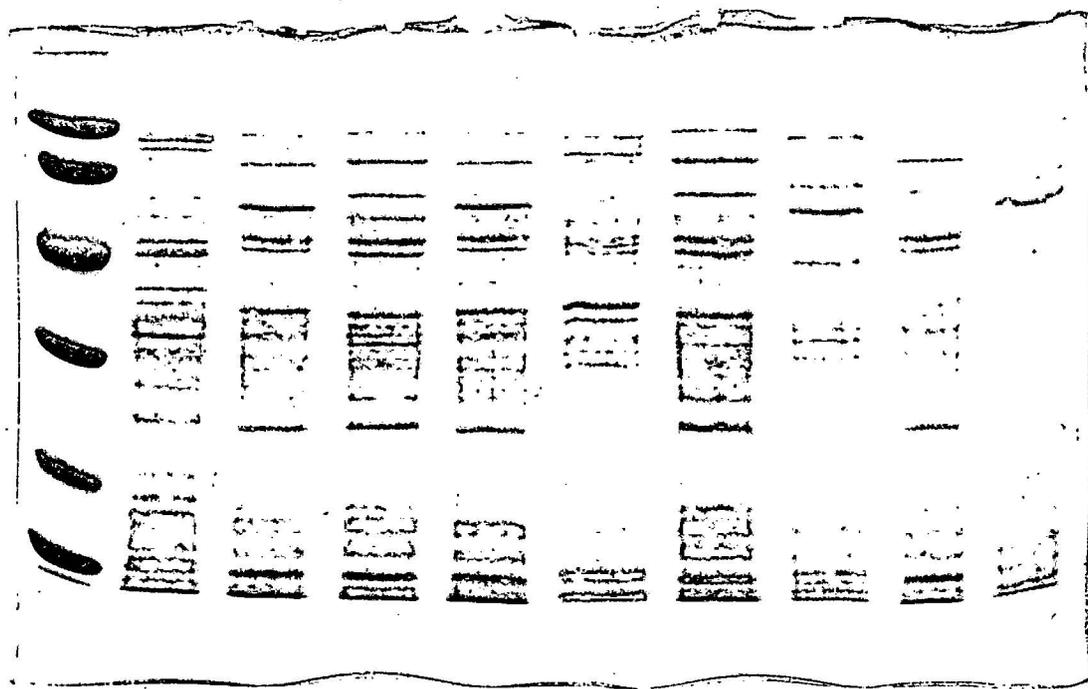


Figure 5. Profils des protéines cellulaires séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les couloirs 1 à 6 représentent respectivement les fonds chromosomiques A, B, C, D, E et F d'*Agrobacterium*. Le couloir de gauche représente différents marqueurs (protéines de poids moléculaire déterminé).

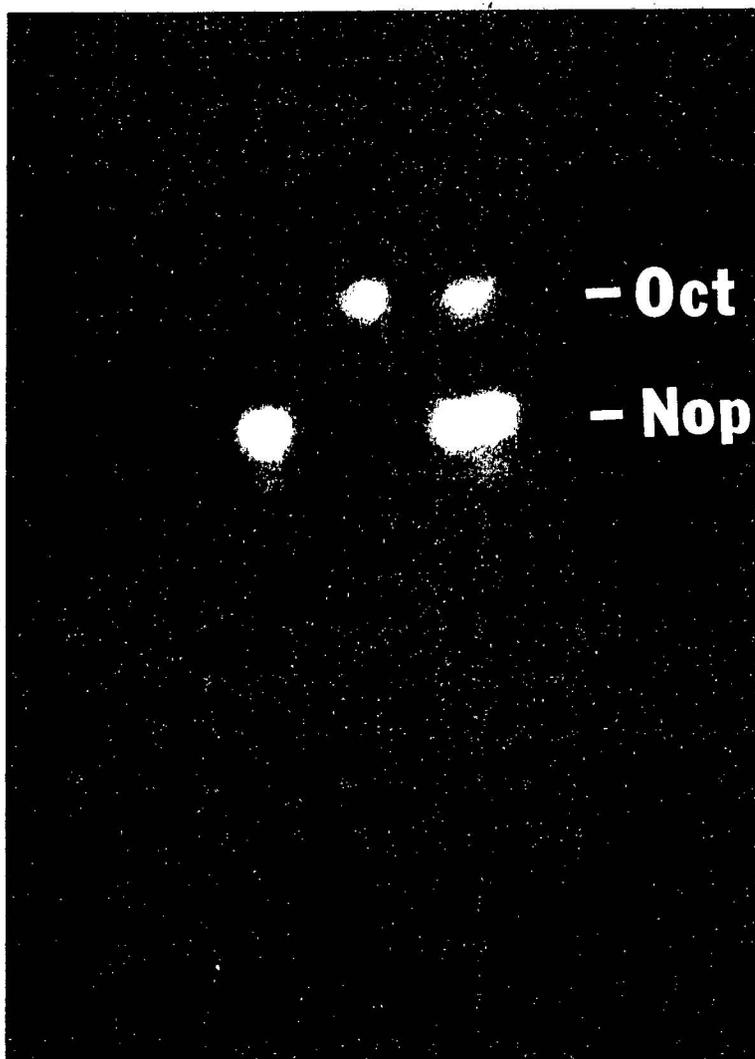


Figure 6. Révélation d'échantillons contenant de l'octopine et de la nopaline. Ces opines sont séparées électrophorétiquement, traitées à la phénanthrène quinone, et révélées sous rayonnement U.V. (312nm).

L'analyse des caractères d'origine chromosomique montre qu'au sein de la population du biovar 1, le chr A prédomine avec 16 souches, suivi du chr C avec huit souches et du chr D avec quatre souches; les chr E et F ne sont chacun représentés qu'une seule fois (tableau 5). Les souches possédant un fond chromosomique de type A, B, C, ou D sont présentes à travers les quatre échantillons de sol et à des niveaux similaires. Les souches uniques, ayant un chr E ou F, ont été isolées d'échantillons différents.

Tableau 5. Distribution des groupes chromosomiques d'*Agrobacterium* dans les différents échantillons de sol

Chromosome	Echantillon de sol			
	I	II	III	IV
Biovar 1				
A	5	4	3	4
C	3	2	1	2
D	1	1	1	1
E	-	1	-	-
F	-	-	1	-
Biovar 2				
B	4	6	4	2

L'analyse de l'utilisation des opines a permis de distinguer différents profils cataboliques (tableau 4). Les souches tumorigènes et sensibles à l'agrocin 84 ayant un fond chromosomique de type A utilisent la nopaline et l'octopine. Cette dernière n'est utilisée qu'en présence de la nopaline;

cette propriété est commune aux plasmides Ti de type nopaline. Les huit autres souches tumorigènes présentent des profils cataboliques typiques des plasmides Ti de type octopine (Dessaux *et al.*, 1987). En effet, ces souches utilisent l'octopine et les mannityl opines (*i.e.*, mannopine, acide mannopinique, agropine, et acide agropinique) et sont résistantes à l'agrocine 84. Les huit souches à octopine possèdent un fond chromosomique de type C. Il est remarquable que l'utilisation d'opines par les six souches non pathogènes du biovar 1 a révélé la présence de souches au métabolisme opinique particulier. Deux souches possédant un fond chromosomique D utilisent l'octopine mais diffèrent des souches à octopine normales par leur incapacité de dégrader les mannityl opines. Les deux autres souches de type D n'utilisent aucune des opines testées dans la présente étude. La souche possédant un fond chromosomique E catabolise l'acide agropinique sans toutefois utiliser les autres mannityl opines. L'autre souche au fond chromosomique unique (*i.e.*, chr F) a la capacité d'utiliser la cucumopine, la nopaline et l'octopine. Quatorze souches de type chr B (*i.e.*, biovar 2) présentent un profil catabolique typique des souches possédant un plasmide Ti à nopaline; ces souches sont sensibles à l'agrocine 84 et utilisent la nopaline et l'octopine, cette dernière n'étant utilisée qu'en présence de nopaline. Toutefois, ces souches sont incapables d'induire le développement de tumeurs et contiennent probablement un plasmide Ti désarmé de type pAtK84b (Clare *et al.*, 1990). Enfin, les deux dernières souches de type

B possèdent, à l'exception de leur résistance à l'agrocine 84, les mêmes caractéristiques que les autres souches appartenant à ce groupe chromosomique.

Tableau 6. Distribution des plasmides Ti présents dans les souches d'*Agrobacterium* isolées des quatre échantillons de sol

Plasmide	Echantillon de sol			
	I	II	III	IV
Ti à nopaline	5	4	3	4
Ti désarmé à nopaline	4	6	4	2
Ti à octopine	3	2	1	2

D'après le type et le nombre de plasmides détectés dans les quatre échantillons de sol (tableau 6), la répartition des trois principaux types de plasmides est homogène à travers cette parcelle.

DISCUSSION

La présente étude a révélé la distribution et la diversité d'une population d'*Agrobacterium* résidant dans un sol alcalin qui n'a pas été cultivé pendant cinq années consécutives et apparemment en l'absence de plants tuméfiés. Ce sol en jachère abrite une population estimée à 3×10^7 agrobactéries g^{-1} (Krimi, com. pers.). Ce qui est remarquable, c'est qu'une agrobactérie sur trois induit la formation de tumeurs sur au moins l'une des plantes indicatrices de pathogénicité. Cette proportion de souches tumorigènes est exceptionnellement élevée, si l'on considère que les niveaux de populations estimés par d'autres auteurs ne dépassent pas 10^6 agrobactéries g^{-1} (Schroth et al., 1971; Bouzar et Moore, 1987; Burr et al., 1987). Différents travaux suggèrent que les souches tumorigènes introduites artificiellement ne survivent pas plus d'un an dans un sol dépourvu de plantes hôtes (Patel, 1929; Dickey, 1961; Moore et Cooksey, 1981; Bishop et al., 1988). Par contre, il a été rapporté la persistance pendant plusieurs années de souches tumorigènes présentes naturellement dans le sol (Cochran, 1941; Schroth et al., 1971). La persistance d'une population tumorigène indigène aussi large dans ce sol de la Mitidja peut être due aux propriétés de ce sol ou à la rhizosphère de certaines espèces de plantes poussant naturellement dans cette parcelle en jachère. Un facteur édaphique qui pourrait avoir contribué au maintien de cette population est la texture

limoneuse de ce sol. En effet, ce type de texture a une capacité élevée de rétention d'eau, ce qui facilite la multiplication et la propagation des bactéries (Lynch et Ebben, 1986). Un autre paramètre qui pourrait avoir contribué à la survie de ces souches tumorigènes dans le sol est le pH. Un pH acide réduirait la survie des souches introduites artificiellement dans un sol en l'absence d'un hôte (Dickey, 1961). Par ailleurs, il a été rapporté que les épidémies de crown gall sont beaucoup plus importantes dans les régions à sols alcalins (Seigler, 1938; Moore, 1979). En effet, la maladie est rarement observée dans les sols acides de l'Oregon, alors que les infections sont communément rencontrées en Californie (Seigler, 1938) et dans l'état de Washington (Moore, 1979) où les sols sont alcalins. Il a été également rapporté que les sols alcalins sont plus favorables à la survie et à la production de nodosités par *Rhizobium* (Dughri et Bottomley, 1983), qui est une bactérie tellurique très proche taxonomiquement d'*Agrobacterium*. Il faut noter cependant, que l'environnement du sol et de la rhizosphère est à la fois riche et diversifié et que, par conséquent, le comportement des souches dans ce biotope est le résultat de l'expression du potentiel génétique de la bactérie dans un environnement riche en stimuli et inhibitions.

D'après les résultats de l'analyse des tests biochimiques et physiologiques, la population agrobactérienne indigène du sol

est composée de souches affiliées aux biovars 1 et 2. Aucune souche du biovar 3 n'a été détectée. Les taux élevés d'isolement des souches du biovar 1 à partir du milieu 1A et des souches du biovar 2 du milieu 2E confirment la sélectivité de ces deux milieux. L'isolement à partir du milieu RS de nombreuses souches du biovar 1 suggère que ce milieu, proposé pour l'isolement sélectif des souches du biovar 3 (Roy et Sasser, 1983), doit être utilisé avec précaution dans toute étude visant l'isolement du sol de souches du biovar 3. Le besoin d'utiliser plusieurs milieux d'isolement a été démontré par les milieux RS et MG. Ces deux milieux ont permis l'isolement de souches ayant des caractères plasmidiques ou chromosomiques originaux. Les souches H25 et D72 ont été isolées respectivement des milieux MG et RS. Il est surprenant que toutes les souches pathogènes isolées du sol soient du biovar 1, alors que les souches du biovar 2 sont prédominantes dans les tumeurs se développant sur les plants de pépinières de la région (Bouzar *et al.*, 1991). Ces observations semblent confirmer l'adaptation des souches du biovar 1 pour l'environnement du sol (Nesme *et al.*, 1987; Ophel et Kerr, 1987). La prédominance du biovar 1 dans notre sol peut avoir été le résultat de la motilité différentielle observée entre agrobactéries de différents biovars. En effet, d'après Bush et Pueppke (1991), les souches du biovar 1 sont plus motiles dans un environnement alcalin que les souches du biovar 2; quant aux souches du biovar 3, elles semblent ne présenter aucune activité

motrice en pH alcalin. Il faut cependant noter que sous conditions contrôlées de fermenteur, nos souches ont un pH optimum de croissance de 7 (Moore et Canfield, com. pers.).

Les profils de protéines cellulaires et les profils de digestion de l'ADN génomique permettent de former des groupes contenant les mêmes souches. Cette concordance entre les profils d'ADN et ceux de protéines n'est pas surprenante puisque les protéines sont le résultat de l'expression de l'information génétique. D'après ces techniques, notre collection de souches est constituée de six groupes chromosomiques. La population du biovar 1 est hétérogène, comprenant cinq groupes chromosomiques (chr A, C, D, E et F), alors que les souches du biovar 2 forment un groupe homogène de bactéries possédant le même fond chromosomique (chr B). Par ailleurs, une bonne corrélation existe entre les caractères cultureux d'une souche et son fond chromosomique. Mis à part les six souches de type D, E ou F qui ont le même type de colonies sur PDA-CaCO₃, les souches des autres groupes chromosomiques possèdent des caractères cultureux particuliers. De telles différences de morphologie coloniale reflètent apparemment des différences fondamentales entre les souches, ces différences pourraient servir de marqueurs génétiques ou d'indicateurs de diversité génétique. Les différences observées dans l'aspect des colonies sur PDA-CaCO₃ et dans les électrophorégrammes de protéines cellulaires et d'ADN digéré suggèrent que ces sous-populations pathogènes

diffèrent par un certain nombre de caractères physiologiques non encore déterminés qui pourraient avoir un rôle dans la survie et la compétition dans cet environnement. Vu l'échelle bactérienne, il est intéressant que certains fonds chromosomiques (i.e., chr A, B, C et D) soient rencontrés à travers les différents échantillons de sol et à des niveaux de population similaires entre les différents échantillons. L'étude du comportement de ces souches dans d'autres sols mérite d'être entreprise pour essayer d'élucider les raisons de l'adaptation de ces bactéries dans le sol de la présente étude. Par contre, il y a d'autres souches (i.e., chr E et F) qui n'ont été rencontrées qu'une seule fois; il est remarquable que ces deux souches ont un métabolisme opinique très particulier. Il serait intéressant de savoir si la dégradation d'opines par ces souches est d'origine plasmidique, comme chez certaines agrobactéries non pathogènes, ou si elle est chromosomique, comme c'est le cas de certains *Pseudomonas*.

D'après le métabolisme opinique, les tests de tumorigénicité et de réaction à l'agrocin 84, trois types de plasmides semblent être présents en relative abondance dans tous les échantillons de sol analysés. Le plus commun est le plasmide Ti de type nopaline, suivi du plasmide Ti à octopine et d'un plasmide similaire à pAtK84b, aussi appelé pNoc (Dessaux, com. pers.), qui est un plasmide non pathogène à nopaline présent dans la souche K84 (Clare et al., 1990). L'abondance

relative du plasmide de type pAtK84 est surprenante. Une hypothèse est que ce plasmide serait un mutant non pathogène ayant pour origine le plasmide Ti à nopaline communément rencontré dans ce sol.

L'un des points les plus importants qui ressort de l'étude de cette population d'*Agrobacterium* indigènes et de ses plasmides cataboliques d'opines est que le maintien d'un type de plasmide dans une cellule semble dépendre du fond chromosomique. En effet, toutes les souches de type chr A possèdent un plasmide Ti à nopaline, alors que les souches de type chr C ont un plasmide Ti de type octopine. Il en est de même pour les souches de type chr B qui possèdent un plasmide de type pAtK84b. Une analyse plus fine des plasmides et des chromosomes par hybridation de sondes T-DNA, *vir* et chromosomique (Dessaux com. pers.) a permis de confirmer ces résultats qui suggèrent que certaines combinaisons plasmide-chromosome sont mieux adaptées pour cohabiter que d'autres combinaisons rencontrées moins fréquemment. Cette affinité qu'a un plasmide Ti pour un fond chromosomique particulier a été précédemment suspectée lorsque l'étude de souches tumorigènes de la région a révélé que les souches du biovar 2 avaient trois fois plus de chance de contenir un plasmide à nopaline que les souches du biovar 1 (Daouzli, 1990; Bouzar et al., 1991). Par ailleurs, lors de l'analyse d'une collection de souches du biovar 3 dont les plasmides Ti contenaient des éléments d'insertion (i.e., "IS

elements"), il a été suggéré que les plasmides Ti à nopaline étaient rarement transmis à des souches possédant un fond chromosomique différent (Paulus et al., 1989). Par contre, l'analyse de souches isolées de tumeurs provenant d'une pépinière forestière suggère plutôt une certaine mobilité du plasmide entre certains fonds chromosomiques (Michel et al., 1990). Ces résultats en apparence contradiction suggèrent que certaines associations plasmide Ti-fond chromosomique sont optimales pour les deux entités, permettant ainsi le maintien stable de ces combinaisons. Il est également possible que l'absence de certains plasmides des souches possédant des fonds chromosomiques particuliers soit liée à un phénomène d'incompatibilité similaire à celui existant entre des plasmides possédant le même gène *ori* (i.e., même groupe *Inc*). Dans d'autres cas, le potentiel de transfert et de maintenance du plasmide serait élevé, ce qui expliquerait la présence de ce plasmide dans des souches possédant des fonds chromosomiques différents. La recherche des raisons de ces différences de comportements méritent d'être entreprise.

Enfin, la diversité phénotypique observée dans ce sol peut être le reflet du passé agricole de cette parcelle. La distribution uniforme des différents groupes chromosomiques et des plasmides associés peut être le résultat du travail annuel de la terre. L'analyse préliminaire de quatre autres échantillons de sol prélevés dans la même parcelle confirment la

distribution, observée dans les échantillons de notre étude, des sous-populations bactériennes et de leurs plasmides (résultats non présentés). La présence de populations d'*Agrobacterium* phénotypiquement différentes suggère d'une part une colonisation effective de ce sol et d'autre part, une cohabitation stable entre les membres de cette riche communauté où les échanges de plasmide semblent rares. Pour élucider les raisons écologiques de cette diversité phénotypique, il serait souhaitable de continuer l'étude de cette parcelle en prélevant des échantillons à différents moments de l'année et en enregistrant les caractéristiques de l'environnement (e.g., climat, humidité du sol, identification de la flore). Il faut noter qu'après le prélèvement des échantillons de cette étude, une partie de cette parcelle a été traitée avec la souche K84 pour des essais de lutte biologique (Krimi, 1990). Il serait intéressant de déterminer les effets de l'introduction de cet antagoniste sur les différentes populations agrobactériennes, particulièrement celles sensibles, de par la possession d'un plasmide de type nopaline, à K84. Le temps, la succession des saisons et de la végétation sont des paramètres qui peuvent également affecter de manière importante la composition de cette communauté agrobactérienne. L'identification des facteurs influençant la composition et le comportement des agrobactéries et plasmides Ti dans le sol aidera à mieux comprendre l'épidémiologie du crown gall et par conséquent facilitera le développement de nouvelles méthodes de lutte contre cette maladie.

CONCLUSION

Cette étude a mis en évidence la présence dans un sol agricole en jachère d'une population exceptionnellement riche en souches tumorigènes (une agrobactérie sur trois est capable d'induire une transformation tumorale); et ce, en dépit de l'absence pendant cinq années de plante hôte pouvant, par la présence de tumeur, favoriser le développement ou le maintien d'une telle population.

La population agrobactérienne de ce sol est principalement constituée de souches du biovar 1. Au sein de ce biovar, cinq sous-populations ont été identifiées par l'analyse des profils protéiques et génomiques. Par contre, la composition de la population du biovar 2 est homogène; toutes les souches possèdent le même fond chromosomique.

L'analyse des plasmides résidants dans cette population suggère que le type de plasmide Ti maintenu dans une cellule d'*Agrobacterium* dépend du fond chromosomique de cette cellule. En effet, les souches du biovar 1 de chromosome-type A possèdent un plasmide Ti à nopaline, celles ayant un fond chromosomique de type C portent un plasmide Ti à octopine et les souches du biovar 2 (chr B) semblent posséder un plasmide Ti désarmé à nopaline similaire au plasmide pAtK84b.

Par ailleurs, ce travail a permis l'identification de nouvelles souches d'*Agrobacterium* non pathogènes au métabolisme opinique particulier. L'origine de ces différences de catabolisme opinique pourrait être élucidée par une analyse génétique de ces souches.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akiyoshi D. E., H. Klee, R. M. Amasino, E. W. Nester et M. P. Gordon.** 1984. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:5994-5998.
- Bell C. R. et W. D. Ramey.** 1991. Hybrid biovars of *Agrobacterium* species isolated from conifer roots. Can. J. Microbiol. **37**:34-41.
- Bernaets M. J. et De Ley.** 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. Nature **197**:406-407.
- Bishop A. L., B. H. Katz et T. J. Burr.** 1988. Infection of grapevines by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. Phytopathology **78**:945-948.
- Bomhoff G. H., P. M. Klapwijk, H. C. Kester, R. A. Schilperoort, J. P. Hernalsteens et J. Schell.** 1976. Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. **145**:177-181.
- Bouzar H. et L. W. Moore.** 1987. Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass prairie. Appl. Environ. Microbiol. **53**:717-721.
- Bouzar H. et J. B. Jones.** 1992. Distinction of biovar 2 strains of *Agrobacterium* from other chromosomal groups by differential acid production. Letters Appl. Microbiol. **15** (sous press).
- Bouzar H., L. W. Moore et N. W. Schaad.** 1983. Crown gall of pecan: a survey of *Agrobacterium* strains and potential for biological control in Georgia. Plant Dis. **67**:310-312.
- Bouzar H., N. Daouzli, Z. Krimi, A. Alim et E. Khemici.** 1991. Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. Agronomie **11**:901-908.
- Brisbane P. G. et A. Kerr.** 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. J. Appl. Bacteriol. **54**:425-431.
- Burr T. J., B. H. Katz et A. L. Bishop.** 1987. Populations of *Agrobacterium* in vineyard and nonvineyard soils and grape roots

in vineyards and nurseries. *Plant Dis.* **71**:617-620.

Bush A. L. et S. G. Pueppke. 1991. A rapid and efficient new assay for determination of the three biotypes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Letters Appl. Microbiol.* **13**:126-129.

Chilton M. D., M. H. Drummond, D. J. Merlo, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Gordon, E. W. Nester. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**:263-271.

Clare B. G., A. Kerr et D. A. Jones. 1990. Characteristics of the nopaline catabolic plasmid in *Agrobacterium* strains K84 and K1026 used for biological control of crown gall disease. *Plasmid* **23**:126-137.

Cochran L. C. 1941. A case of the crown gall organism persistent in grain land. *Plant Dis. Repr.* **25**:73.

Daouzli N. 1990. Le crown gall dans les pépinières fruitières de l'Algérie: estimation du taux d'infestation, caractérisation des souches tumorigènes et potentiel de contrôle biologique. Thèse de Magister, Univ. Sci. Technol. Blida.

David C., M. D. Chilton et J. Tempé. 1984. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Bio/Technology* **2**:73-76.

Davioud E., J.C. Quirion, M.E. Tate, J. Tempé et H.P. Husson. 1988. Structure and synthesis of cucumopine, a new crown gall and hairy root opine. *Heterocycles* **27**:2423-2439.

De Cleene M. et J. De Ley. 1976. The host range of crown gall. *Bot. Rev.* **42**:389-466.

Dessaux Y., J. Tempé et S. K. Farrand. 1987. Genetic analysis of mannityl opine catabolism in octopine-type *Agrobacterium tumefaciens* strain 15955. *Mol. Gen. Genet.* **208**:301-308.

Dessaux Y., A. Petit et J. Tempé. 1992. Opines in *Agrobacterium* biology, p.109-136, in *Molecular signals in plant-microbe communications*, D.P.S. Verma (ed.), CRC Press, Boca Raton.

Dhaese P., H. De Greve, H. Decraemer, J. Schell et M. Van Montagu. 1979. Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acid Res.* **7**:1827-1849.

Dickey R. S. 1961. Relation of some edaphic factors to *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology* **51**:607-614.

- Doetsch R. N.** 1981. Determinative methods of light microscopy, p. 21-33, in *Manual of methods for general bacteriology*, P. Gerhardt (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Dughri M. H. et P. J. Bottomley.** 1983. Effect of acidity on the composition of an indigenous soil population of *Rhizobium trifolii* found in nodules of *Trifolium subterraneum* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1207-1213.
- Ellis J. G., A. Kerr, M. Van Montagu et J. Schell.** 1979. *Agrobacterium*: genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. *Physiol. Plant Pathol.* **15**:311-319.
- Faivre-Amiot A.** 1984. Les tumeurs a *Agrobacterium*. *Phytoma* **362**:27-31.
- Goodman R. N., D. Butrov et F. Tarbah.** 1987. The occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine-propagating material and a simplified indexing system. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**:189-193.
- Hayward A. C.** 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* **27**:265-277.
- Hendrickson A. A., I. L. Baldwin et A. J. Riker.** 1934. Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes* and *Bacillus radiobacter*. *J. Bacteriol.* **28**:597-618.
- Holmes B.** 1988. Taxonomy of *Agrobacterium*. *Acta Hort.* **225**:47-51.
- Holmes B. et P. Roberts.** 1981. The classification, identification and nomenclature of agrobacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **50**:443-467.
- Hooykaas P. J. J.** 1989. Tumorigenicity of *Agrobacterium* on plants. p. 373-391, in *Genetics of bacterial diversity*, D. A. Hopwood & K. F. Chater (eds.), Academic Press, London.
- Keane P. J., A. Kerr, and P. B. New.** 1970. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.* **23**:585-595.
- Kennedy B. W. et S. M. Alcorn.** 1980. Estimates of U.S. crop losses to prokaryotic plant pathogens. *Plant Dis.* **64**:674-676.
- Kerr A.** 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* **64**:25-30.

- Kerr A. et W. P. Roberts.** 1976. *Agrobacterium*: correlations between and transfer of pathogenicity, octopine and nopaline metabolism and bacteriocin 84 sensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* **9**:205-211.
- Kerr A. et C. G. Panagopoulos.** 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopath. Z.* **90**:177-179.
- Kerr A., P. Manigault et J. Tempé.** 1977. Transfer of virulence in vitro and in vivo in *Agrobacterium*. *Nature* **65**:560-561.
- Kerstens K. et J. De Ley.** 1984. *Agrobacterium*, p. 244-254, in Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1., N. R. Kreig and J. G. Holt (eds.), Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kerstens K., J. De Ley, P. H. A. Sneath et M. Sackin.** 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* **78**:227-239.
- King E. O., M. K. Ward et D. E. Raney.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44**:301-307.
- Kovacs N.** 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. *Nature* **178**:703.
- Krimi Z.** 1990. La lutte biologique contre le crown gall en Algérie: efficacité de la souche bacteriocinogène K84 et isolement de nouveaux antagonistes bactériens. Thèse de Magister, Univ. Sci. Technol. Blida.
- Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lynch J. M. et M. H. Ebben.** 1986. The use of micro-organisms to control plant disease. *J. Appl. Bacteriol.*, symp. suppl.:115S-126S.
- Michel M. F., C. M. Brasileiro, C. Depierreux, L. Otten, F. Delmotte et L. Jouanin.** 1990. Identification of different *Agrobacterium* strains isolated from the same forest nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3537-3545.
- Moore L. W.** 1979. Practical use and success of *Agrobacterium radiobacter* strain 84 of crown gall control, p.553-568, in Soil-borne plant pathogens, B. Schippers and W. Gams (eds.), Academic Press, New York.
- Moore L. W. et D.A. Cooksey.** 1981. Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: plant interactions. *Int. Rev. Cytol. suppl.* **13**:15-

- 46.
- Moore L. W., C. I. Kado et H. Bouzar.** 1988. *Agrobacterium*, p.16-36, in Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 2nd éd., N.W. Schaad (ed.), APS Press, St Paul.
- Nesme X., M. F. Michel et B. Digat.** 1987. Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus* L. from a single nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:655-659.
- Ophel K. et A. Kerr.** 1987. Ecology of *Agrobacterium*: plasmid and biovars, p.3-5, in D.P.S. Verma and N. Brisson (eds.), Molecular genetics of plant-microbe interactions. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ophel K. et A. Kerr.** 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bact.* **40**:236-241.
- Patel M. K.** 1929. Viability of certain plant pathogens in soils. *Phytopathology* **19**:295-300.
- Paulus F., M. Ridé et L. Otten.** 1989. Distribution of two *Agrobacterium tumefaciens* insertion elements in natural isolates: evidence for stable association between Ti plasmids and their bacterial hosts. *Mol. Gen. Genet.* **219**:145-152.
- Petit A., S. Delhaye, J. Tempé et G. Morel.** 1970. Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall: Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu'elles induisent. *Physiol. Vég.* **8**:205-213.
- Petit A., Y. Dessaux et J. Tempé.** 1978. The biological significance of opines. I. A study of opine catabolism of *Agrobacterium tumefaciens*, p.143-152, in M. Ridé (éd.), Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. INRA - Angers.
- Petit A., J. Tempé, A. Kerr, M. Holsters, M. Van Montagu et J. Schell.** 1978. Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *Nature* **271**:570-572.
- Petit A., C. David, G. A. Dahl, J. G. Ellis, P. Guyon, F. Casse-Delbart et J. Tempé.** 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* **190**:204-214.
- Ream W.** 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27**:583-618.

- Roy M. et M. Sasser.** 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology* 73:810.
- Schell J., M. van Montagu, M. de Beudkeleer, M. de Block, A. Depicker, M. de Wilde, G. Engler, C. Genetello, J. P. Hernalsteens, M. Holsters, J. Seurinck, B. Silva, F. van Vliet et R. Villaroel.** 1979. Interaction and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc. Royal Soc. London, ser. B.* 204:251-266.
- Schröder G., S. Waffenschmidt, E. W. Weiler, J. Schröder.** 1984. The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.* 138:387-391.
- Schroth M. N., A. R. Weinhold, A. H. McCain, D. C. Hildebrand et N. Ross.** 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia* 40:537-552.
- Schroth M. N., A. H. McCain, J. H. Foott et O. C. Huisman.** 1988. Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant. Dis.* 72:241-246.
- Seigler E. A.** 1938. Relation between crown gall and pH of the soil. *Phytopathology* 28:858-859.
- Simmons J. S.** 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J. Infect. Dis.* 39:209-214.
- Smith E.F. et C.O. Townsend.** 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25:671-673.
- Stachel S. E. et E. W. Nester.** 1986. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium*. *EMBO J.* 5:1445-1454.
- Stachel S. E., E. Messens, M. van Montagu et P. C. Zambryski.** 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629.
- Tempé J. et A. Goldman.** 1982. Occurrence and biosynthesis of opines, p.427-449, in *Molecular biology of plant tumors*, Kahl G. et J. Schell (eds.), Academic Press, New York.
- Tempé J. et A. Petit.** 1983. La piste des opines, p. 14-32, in *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*, A. Puhler (ed.), Springer-Verlag, Berlin.
- Van Larebeke N., C. Genetello, J. Schell, R. A. Schilperoort, A. K. Hermans, J. P. Hernalsteens, and M. Van Montagu.** 1975.

- Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* **255**:742-743.
- White L. O.** 1972. The taxonomy of the crown gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **72**:565-574.
- Willmitzer L., W. Schmalenbach et J. Schell.** 1981. Transcription of T-DNA in octopine and nopaline crown gall tumors is inhibited by low concentrations of α -aminatin. *Nucleic Acids Research* **9**:4801-4812.
- Willmitzer L., M. De Beuckeleer, M. Lemmers, M. Van Montagu et J. Schell.** 1980. DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells. *Nature* **287**:359-361
- Winans S. C.** Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* **56**:12-31.

ANNEXE 1

Recettes des milieux d'isolement

Milieu 1A (Brisbane et Kerr, 1983) pour le biovar 1 (par litre):

L(-)arabitol	3.04 g
NH ₄ NO ₃	0.16 g
KH ₂ PO ₄	0.54 g
K ₂ HPO ₄	1.04 g
Taurocholate de sodium	0.29 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
Agar	15.00 g
Violet crystal (solution de 0,1%)	2 ml

Stériliser à l'autoclave, refroidir à environ 50 C avant d'ajouter aseptiquement 10 ml de cycloheximide (solution de 2%) et 6.6 ml de sélénite de sodium (solution de 1%); ces deux composés étant stérilisés par filtration.

Milieu 2E (Brisbane et Kerr, 1983) pour le biovar 2 (par litre):

Erythritol	3.05 g
NH ₄ NO ₃	0.16 g
KH ₂ PO ₄	0.54 g
K ₂ HPO ₄	1.04 g
Taurocholate de sodium	0.29 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
Extrait de levure (solution de 1%)	1 ml
Vert de malachite (solution de 0,1%)	5 ml
Agar	15.00 g

Stériliser à l'autoclave, refroidir à environ 50 C avant d'ajouter aseptiquement 10 ml de cycloheximide (solution de 2%) et 6.6 ml de sélénite de sodium (solution de 1%); ces deux composés étant stérilisés par filtration.

Milieu de RS (Roy et Sasser, 1983) pour le biovar 3 (par litre):

Adonitol	4.00 g
KH ₂ PO ₄	0.70 g
K ₂ HPO ₄	0.90 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20 g
Extrait de levure	0.14 g
NaCl	0.20 g
Acide borique	1.00 g
Chlorothalonil (solution de 4%)	0.5 ml
Agar	15.00 g

Ajuster le pH a 7,2, stériliser à l'autoclave, refroidir à environ 50 C avant d'ajouter aseptiquement des solutions stérilisées par filtration contenant 80 mg de chlorure de triphenyltetrazolium, 20 mg de D-cycloserine et 20 mg de trimethoprim (ajouter à cette dernière solution 1 goutte d'acide chloridrique).

Milieu MG (Moore et al., 1988) non-sélectif (par litre):

Mannitol	5.0 g
Acide L-glutamique	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
NaCl	0.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
Biotine (2 µg/l)*	1 ml
Agar	15.0 g

La solution de biotine est préparée en mélangeant 20 mg de biotine à 100 ml d'eau distillée; 1 ml de cette solution concentrée est ajouté à 99 ml d'eau distillée avant d'être stérilisé par filtration (pore de diamètre 0.2 µ). Cette solution peut être conservée réfrigérée pendant une année.

ANNEXE 2

Résultats de l'analyse phénotypique des souches d'*Agrobacterium*, par échantillon de sol, et des opines synthétisées dans les tumeurs induites par les souches pathogènes.

Souche	Bv	Chr	A84 ^b	T ^c	Opine Dégradée							Opine Synthétisée ^a			
					Aa	M	A	Ma	O	N	C	N	(O M A Aa)		
Sol I:															
D39	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D40	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D43	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D44	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D45	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D41	1	C	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+		
D42	1	C	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+		
D46	1	C	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+		
H4	1	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H5	2	B	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-		
H6	2	B	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-		
H7	2	B	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-		
H8	2	B	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-		
Sol II:															
D66	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D68	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D70	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D71	1	A	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-		
D65	1	C	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+		
D67	1	C	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+		
D73	1	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
D72	1	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
D69	2	B	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-		
D74	2	B	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-		

ANNEXE 2 (suite)

Souche	Bv	Chr	A84 ^b	T ^c	Opine Degradée						Opine Synthétisée ^a						
					Aa	M	A	Ma	O	N	C	N	O	M	A	Aa	
H20	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H21	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H22	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H24	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sol III:																	
D76	1	A	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D77	1	A	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D78	1	A	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D75	1	C	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
H29	1	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H25	1	F	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
H26	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
H27	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
H28	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
H30	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Sol IV:																	
D80	1	A	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D81	1	A	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D82	1	A	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D83	1	A	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D86	1	C	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
D87	1	C	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
D85	1	D	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
D84	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
H31	2	B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-

^a Les souches non pathogènes ne synthétisent pas d'opine puisqu'elles

n'induisent pas de tumeur.

^b A84 = réaction à l'agrocin 84.

^c T = induction tumorale.