

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

---

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université de BLIDA 1  
Faculté des Sciences de la nature et de la vie  
Département de Biotechnologie**

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Mastère  
académique en Sciences de la nature et de vie

**Spécialité :** Protection des végétaux

**Option :** Biologie des interactions plante microorganismes

**Thème :**

**Recherche d'*Agrobacterium* spp. dans la rhizosphère de quelques vignobles  
de la Mitidja et Médéa**

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup>: ISSÂAD Nabila

**Le 18/06/2014 Devant le jury composé de :**

CHAOUIA C.	Maitre de Conférences A.	U.S.D.B	présidente
BERRAF A.	Maitre de Conférences B.	U.S.D.B	Examinatrice
BOUDJEMIA A.	Chargée de Cours	U.S.D.B	Examinatrice
KRIMI Z.	Professeur	U.S.D.B	Promotrice

**Promotion :**

**2012/2013**

## Chapitre III : résultats

### III.1 Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les sols des vignobles étudiés présentent des caractéristiques physico-chimiques assez voisines surtout en pH (7.36-7.87) et en conductibilité électrique (0.91-1.4  $\mu$ S). Cependant, ils ont révélé une différence plus ou moins importante dans la texture du sol et le taux de calcaire (tableau 03).

**Tableau 03** : Les caractéristiques physico-chimiques des sols

Région Paramètre	Birtouta	Ouamri	Baraki	Oued El Alleug	Saoula
pH	7.69	7.87	7.36	7.74	7.72
Calcaire total(%)	4.1	17.54	1.55	23.06	18.11
C.E ( $\mu$ S)	0.91	0.99	0.96	1.4	0.92
Granulométrie (%)					
Argile	3.16	4.03	2.9	17.1	0.76
Limons	53.93	83.38	33.69	69.7	63.55
Sables	42.91	12.53	63	13.2	35.69
Texture :	Limono sablo- argileux	Argilo- Limoneuse	Sablo- limoneux	Limono- argileux	Limono- sableux

## III.2 Analyse microbiologique

### III.2.1 Dénombrement des agrobactéries au niveau de la rhizosphère

Après une analyse microbiologique des échantillons, la distribution des bactéries au niveau de la rhizosphère est très hétérogène. Nous avons constaté qu'il y a une variabilité au sein des échantillons. Ainsi, nous avons enregistré des taux faibles et des taux élevés (annexe B : tableau01).

L'étude des caractères cultureux consiste à observer les colonies qui poussent sur le milieu MG. Ce milieu permet l'isolement et la numération des colonies d'*Agrobacterium* spp. Ces isolats présentent les caractères cultureux suivants: colonies convexes non fluorescentes, blanchâtres, translucides et possèdent un contour lisse et régulier d'environ 2 mm de diamètre (Moore et al., 1988) (figure11). Ces isolats sont repartis dans les échantillons selon la provenance. Les résultats sont détaillés dans le tableau 04 :

**Tableau 04** : Répartition des isolats dans les sols étudiés.

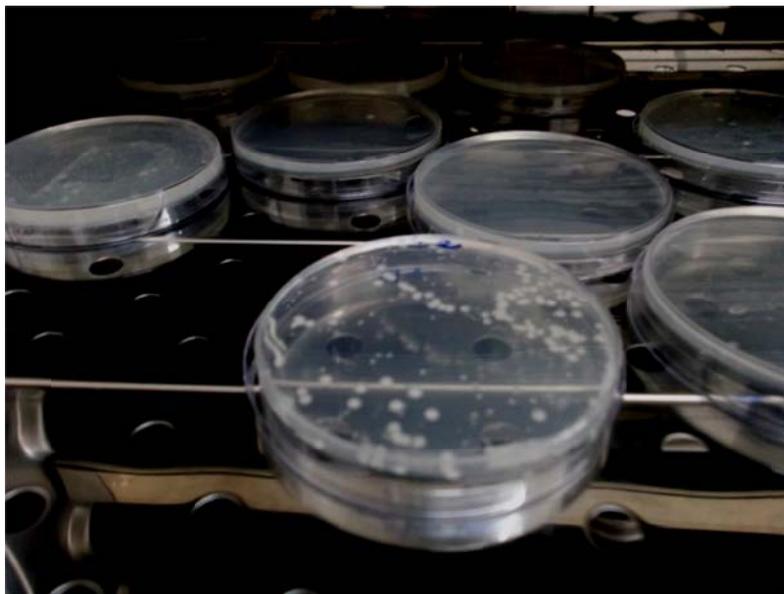
Provenance dilution	Birtouta	Baraki INRA	Oued El Alleug	Ouamri	Saoula
$10^{-1}$	141	186	209	133	177
$10^{-3}$	$5 \times 10^3$	$47 \times 10^3$	$82 \times 10^3$	$59 \times 10^3$	$7 \times 10^3$
$10^{-5}$	$4 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$52 \times 10^5$	$23 \times 10^5$	abs
Moyenne	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$8 \times 10^5$	$3 \times 10^3$

Les résultats sont donnés par CFU/g (Unités Formant une Colonie).

### III.2.2 Caractérisation des souches

Après les purifications sur milieu MG (trois purifications successives), les colonies fluorescentes sont éliminées après leur passage sous les rayons UV d'une lampe adaptée pour ce test. Ces colonies pourraient s'agir du groupe des *Pseudomonas* fluorescents.

Les colonies pures ont subi des tests d'appartenance au genre. Cependant, ces tests sont précédés par la coloration de Gram. On a choisi au hasard, cinq isolats de chaque sol selon l'appellation : B1, B2, B3, B4, B5, S1.....

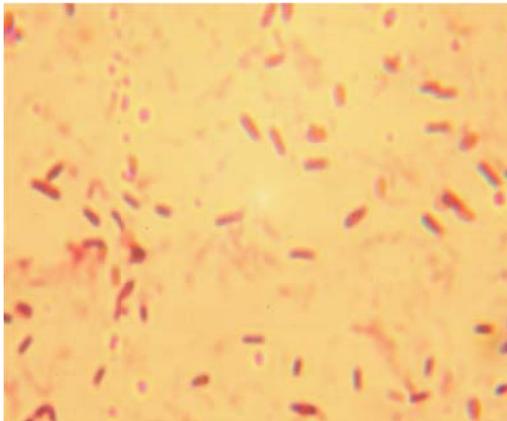


**Figure 11** : Colonies d'*Agrobacterium* spp. sur milieu MG

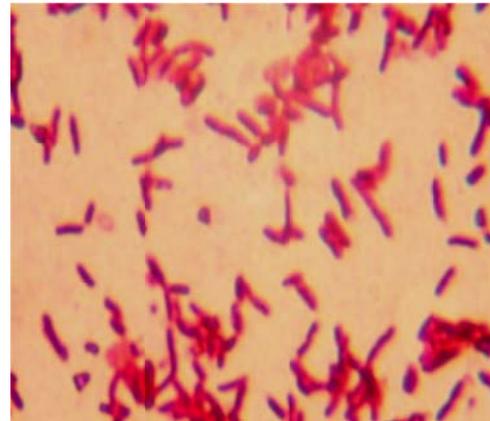
## 1. Coloration de Gram

### Description des cellules bactériennes

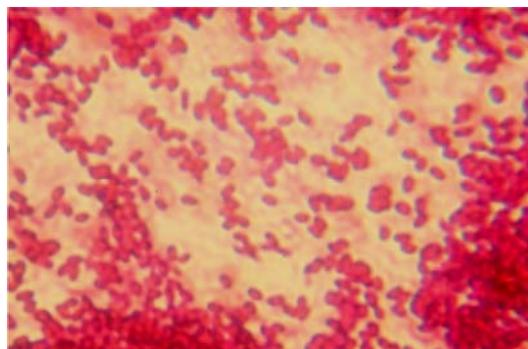
L'examen microscopique après la coloration de Gram nous a permis de décrire les caractéristiques des cellules bactériennes. Les cellules bactériennes du genre *Agrobacterium* ont la forme de bâtonnet, ne forment pas de spores et possèdent des flagelles péritriches et sont Gram négatives. Trois souches sont des cocci à Gram positif et six souches sont des cocci à Gram négatif et une souche est un bâtonnet à Gram positif. Ces souches ne présentent pas les caractéristiques d'*Agrobacterium* (tableau 03). Au total, quinze souches sont sélectionnées et ont subi des tests d'appartenance au genre.



**Figure 12** : Cellules bactériennes d'un isolat bâtonnet à Gram Négatif (GX1000)



**Figure 13** : Cellules bactériennes d'un isolat bâtonnet à Gram positif (Gx1000)



**Figure 14**: Cellules bactériennes d'un isolat cocci à Gram positif (GX1000)

**Tableau 05** : Résultat de la coloration de Gram

isolat	bâtonnet	cocci	Gram
B1	+		-
B2	+		-
B3	+		-
B4		+	-
B5	+		-
S1	+		-
S2	+		-
S3	+		-
S4	+		-
S5		+	+
N1	+		-
N2		+	+
N3	+		-
N4		+	-
N5		+	-
W1	+		-
W2	+		-
W3	+		+
W4		+	-
W5	+		-
O1		+	+
O2		+	-
O3	+		-
O4	+		-
O5		+	-

## **2. Appartenance au genre *Agrobacterium* spp.**

Les isolats retenus sélectionnés de différents sols ont subi des tests pour confirmer leur appartenance au genre *Agrobacterium*. Les quinze isolats sont à Gram négatif et incapables d'utiliser l'amidon, le tween 80 et la gélatine. Par contre, ils sont esculine positive (annexe B : tableau02). Ces souches sont donc présumées appartenir au genre *Agrobacterium*.

# *Dédicaces*

Au nom d'allah le tout miséricordieux, le très miséricordieux.

Je dédie ce modeste travail à des personnes qui me sont chères.

A mon père ;

Pour son encouragement, son aide morale durant ma formation, à qui je dois exprimer mon respect.

A ma mère ;

A ma mère qui m'a nourri d'amour ;

A ma mère pour sa patience ;

A ma mère qui ne cesse de m'implorer dans ses prière, à qui je dois tout mon respect.

A mes chers frères : Youcef, Amine, Yacine.

A mes chères sœurs : Achoik, Zahra, Fatima.

A mes nièces et neveux: Chorouk, Basma, Sundus, Taha, Abderahim et Chaïmaa.

A mes amis : Nawel, Asma, Jinene, Rokia, Naïma, Amel, Chahra, Nedjma et Imene.

A tous les étudiants de la promotion 2012-2013 de département d'Agronomie de Blida.

## Résumé

### Recherche d'*Agrobacterium* spp. dans la rhizosphère de quelques vignobles de Mitidja et Médéa

Parmi les bactéries colonisant la rhizosphère, on distingue le genre *Agrobacterium* comportant des espèces phytopathogènes dont l'*Agrobacterium vitis* ; l'agent causal de la maladie du crown gall sur la vigne.

Des échantillons de sol provenant de la rhizosphère de 5 vignobles de la région de la Mitidja et Médéa ont subi des analyses physico-chimiques et microbiologiques en vue de la recherche des bactéries du genre *Agrobacterium*.

Notre travail a pour but l'isolement ainsi que le dénombrement des agrobactéries contenues dans le sol rhizosphérique de la vigne et parallèlement de déterminer les facteurs édaphiques affectant la survie des agrobactéries dans le sol.

Nos résultats d'isolement sur le milieu MG ont révélé un taux très élevé d'*Agrobacterium* dans la rhizosphère de la vigne d'Oued El Alleug ( $2 \times 10^6$  CFU/g), et Ouamri ( $8 \times 10^5$  CFU/g) contrairement au sol rhizosphérique de Saoula ( $3 \times 10^3$  CFU/g). La coloration de Gram de quelques isolats sélectionnés au hasard a montré une bactérie bâtonnet à Gram<sup>+</sup> ainsi que des cocci Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. L'analyse biochimique par utilisation des tests d'appartenance a montré l'affiliation au genre *Agrobacterium*, des bactéries à Gram négatives isolées et sélectionnées sur la base des caractères cultureux des colonies.

Les analyses physico-chimiques des sols étudiés ont montré qu'ils présentent des caractères physicochimiques assez voisins à l'exception de quelques paramètres qui semblent différents notamment la teneur en calcaire et la texture.

**Mots clés:** *Agrobacterium* spp., rhizosphère, analyse physico-chimiques, tests biochimiques, la survie.

## Abstract

### **Search of *Agrobacterium* spp. in the rhizosphere of grapevines of the Mitidja and Medea region**

Among the bacteria which colonize the rhizosphere, we distinguish the genus of *Agrobacterium* because many pathogens species including *Agrobacterium vitis*, the causal agent of crown gall on grapevine. Samples of soil were collected from five vineyards of Mitidja and Medea regions; these samples undergo physico-chemical and microbiological analyses for the research of the *Agrobacterium* spp. bacteria.

Our work aims for the isolation and the counting of agrobacteria contained in one gram of grapevine rhizosphere soil, and the determination of the edaphic factors affected the agrobacteria survival in soil.

Our data of the isolation on MG media reveal a high agrobacterial density in the rhizosphere of Oued El Alleug ( $2 \times 10^6$  CFU/g) and Ouamri ( $8 \times 10^5$  CFU/g), contrary to the soil of Saoula ( $3 \times 10^3$  CFU/g). The coloration of Gram of some isolates showed bacteria stick with Gram + as well as cocci Gram + and Gram-. The biochemical analyses reveal the appurtenance of the bacteria isolated from the rhizosphere of different soils to *Agrobacterium* genus following the appurtenance genus tests.

The physico-chemical analyses of the studied soils did not show marked pH or electric conductivity differences but it's significantly different in texture and limestone count.

**Keywords:** *Agrobacterium* spp., rhizosphere, physico-chemical analyses, biochemical analyses, persistence.

## المخلص

من بين البكتيريا المتواجدة في هذه التربة يوجد جنس الاقروبوكتيريا وهو العامل المسبب لمرض التدرن التاجي عند العنب.

عينات من التربة الجذرية لخمسة مزارع عنب تقع في منطقتي متيجة والمدية خضعت لتحاليل فيزيوكيميائية و ميكروبيولوجية للبحث عن الاقروبوكتيريا.

الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتعداد البكتيريا الموجودة في 1غ من التربة الجذرية لكل عينة وكذلك معرفة العوامل الترايبية المؤثرة في نمو هذا الجنس في التربة.

نتائج العزل في الوسط الحيوي أظهرت كثافة عالية للاقروبوكتيريا في التربة الجذرية لمزرعة واد العلايق (2 x 10<sup>6</sup>) ومزرعة وامري (8 x 10<sup>5</sup>) بعكس التربة الآتية من مزرعة سحاولة (3 x 10<sup>3</sup>).

اختبار التلوين لبعض المعزولات بين وجود بكتيريا على شكل عصيات ذات تلوين ايجابي إلى جانب كريات ذات تلوين سلبي و ايجابي، التحليل البيوكيميائي لهذه العينات بين انتماؤها لجنس *Agrobacterium spp.* تبعا لاختبار الانتماء للجنس .

التحاليل الفزيوكيميائية للتربة المدروسة بينت أنها تحوي مواصفات فزيوكيماوية متقاربة باستثناء بعض العوامل التي تبدوا متباينة (النسيج الترايب و نسبة الكلس).

**الكلمات المفتاحية:** تربة جذرية، التحاليل الفزيوكيماوية، التحاليل البيوكيماوية. *Agrobacterium*

*spp.*

# Table des matières

## Introduction

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Présentation générale de la vigne.....	04
1.1 Présentation botanique... ..	04
1.2 Le cycle de développement de la vigne.....	04
1.2.1 Le cycle végétatif.....	05
1.2.2 Le cycle reproducteur.....	05
2. Genre <i>Agrobacterium</i> spp.....	07
2.1 Généralités .....	07
2.2 Caractères de la bactérie.....	08
2.3 Taxonomie de la bactérie.....	10
2.3.2 Classification phytopathogènes.....	11
2.3.3 Classification phénotypiques.....	12
2.3.4 Classification moléculaire.....	13
2.4 Diversité des plasmides.....	14
2.4.1 Le plasmide Ti.....	14
2.4.2 Le plasmide TAR.....	15
2.5 Importance de la bactérie en Algérie.....	17
2.6 Facteurs affectant la survie d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	18
2.6.1 Effet de la rhizosphère.....	18

2.6.2	Compétition entre microorganisme dans le sol et dans la rhizosphère.....	20
2.6.3	Effet de l'environnement.....	21
2.6.3.1	Facteur température.....	21
2.6.3.2	Facteur pH.....	22
2.6.3.3	Facteur texture du sol.....	23
2.6.3.4	Facteur eau.....	23
2.7	Processus d'infection.....	24
2.8	La survie d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	26
2.8.1	Dans le sol et la rhizosphère des vignes.....	26
2.8.2	Dans les sarments de la vigne .....	27
2.8.3	Dans les débris de la vigne et les mauvaises herbes.....	30
2.9	Les fluctuations saisonnières.....	33

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

II.1	Prélèvement des échantillons du sol .....	34
II.2	Echantillonnage.....	35
II.3	Diagnostic au laboratoire	
II.3.1	Analyses pédologiques .....	35
II.3.1.1	Analyses granulométriques.....	35
II.3.1.2	Détermination du pH.....	36
II.3.1.3	Conductibilité électrique.....	36
II.3.1.4	Dosage de calcaire total.....	36

I.3.2 Analyses microbiologiques	
II.3.2.1 Isolement des bactéries.....	37
II.3.2.2 Dénombrement d'agrobactéries par g de sol.....	37
II.2.2.3 La purification des isolats.....	38
II.2.2.4 Caractérisation des souches isolées.....	38
II.2.2.4.1 La coloration de Gram.....	38
II.2.2.4.2 Les tests d'appartenance au genre.....	39
1. Test Hydrolyse de Tween 80.....	39
2. Test Hydrolyse de l'amidon .....	40
3. Test hydrolyse de gélatine .....	40
4. Test hydrolyse de l'esculine.....	40
<b>Chapitre III : Résultats</b>	
III.1 Caractéristiques physico-chimiques des sols.....	41
III.2 Analyse microbiologique	
III.2.1 Dénombrement des agrobactéries au niveau de rhizosphère.....	42
III.2.2 Caractérisation des souches.....	43
III.2.2.1Coloration Gram.....	45
III.2.2.2 Appartenance au genre.....	46
<b>Chapitre IV : Discussion.....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>52</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>54</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>67</b>

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Graphique du cycle végétatif de la vigne indiquant les périodes critiques approximatives et les phases les plus importantes.....	06
<b>Figure 02</b> : Tumeurs au point du greffage.....	07
<b>Figure 03</b> : Tumeurs sur le tronc de la vigne .....	08
<b>Figure 04</b> : Tumeurs sur les sarments de lavigne.....	08
<b>Figure 05</b> : Colonies d' <i>Agrobacterium</i> spp. sur milieu artificiel.....	09
<b>Figure 06</b> : Principales régions du plasmide Ti .....	16
<b>Figure 07</b> : Une bactérie d' <i>Agrobacterium</i> transfère un fragment d'ADN dans le génome de la plante.....	25
<b>Figure 08</b> : Colonisation d'une racine par les agrobactéries.....	28
<b>Figure 09</b> : Infection de la plante par <i>Agrobacterium</i> induit le développement d'une galle.....	30
<b>Figure 10</b> : Cycle écologique d' <i>Agrobacterium vitis</i> .....	32
<b>Figure 11</b> : Colonies d' <i>Agrobacterium</i> spp. sur milieu MG.....	43
<b>Figure 12</b> : Cellules bactériennes d'un isolat bâtonnet à Gram négatif.....	44
<b>Figure 13</b> : Cellules bactériennes d'un isolat bâtonnet à Gram positif.....	44
<b>Figure 14</b> : Cellules bactériennes d'un isolat cocci à Gram positif.....	44

# Table des matières

## Introduction

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Présentation générale de la vigne.....	04
1.1 Présentation botanique... ..	04
1.2 Le cycle de développement de la vigne.....	04
1.2.1 Le cycle végétatif.....	05
1.2.2 Le cycle reproducteur.....	05
2. Genre <i>Agrobacterium</i> spp.....	07
2.1 Généralités .....	07
2.2 Caractères de la bactérie.....	08
2.3 Taxonomie de la bactérie.....	10
2.3.2 Classification phytopathogènes.....	11
2.3.3 Classification phénotypiques.....	12
2.3.4 Classification moléculaire.....	13
2.4 Diversité des plasmides.....	14
2.4.1 Le plasmide Ti.....	14
2.4.2 Le plasmide TAR.....	15
2.5 Importance de la bactérie en Algérie.....	17
2.6 Facteurs affectant la survie d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	18
2.6.1 Effet de la rhizosphère.....	18

2.6.2	Compétition entre microorganisme dans le sol et dans la rhizosphère.....	20
2.6.3	Effet de l'environnement.....	21
2.6.3.1	Facteur température.....	21
2.6.3.2	Facteur pH.....	22
2.6.3.3	Facteur texture du sol.....	23
2.6.3.4	Facteur eau.....	23
2.7	Processus d'infection.....	24
2.8	La survie d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	26
2.8.1	Dans le sol et la rhizosphère des vignes.....	26
2.8.2	Dans les sarments de la vigne .....	27
2.8.3	Dans les débris de la vigne et les mauvaises herbes.....	30
2.9	Les fluctuations saisonnières.....	33

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

II.1	Prélèvement des échantillons du sol .....	34
II.2	Echantillonnage.....	35
II.3	Diagnostic au laboratoire	
II.3.1	Analyses pédologiques .....	35
II.3.1.1	Analyses granulométriques.....	35
II.3.1.2	Détermination du pH.....	36
II.3.1.3	Conductibilité électrique.....	36
II.3.1.4	Dosage de calcaire total.....	36

I.3.2 Analyses microbiologiques	
II.3.2.1 Isolement des bactéries.....	37
II.3.2.2 Dénombrement d'agrobactéries par g de sol.....	37
II.2.2.3 La purification des isolats.....	38
II.2.2.4 Caractérisation des souches isolées.....	38
II.2.2.4.1 La coloration de Gram.....	38
II.2.2.4.2 Les tests d'appartenance au genre.....	39
1. Test Hydrolyse de Tween 80.....	39
2. Test Hydrolyse de l'amidon .....	40
3. Test hydrolyse de gélatine .....	40
4. Test hydrolyse de l'esculine.....	40
<b>Chapitre III : Résultats</b>	
III.1 Caractéristiques physico-chimiques des sols.....	41
III.2 Analyse microbiologique	
III.2.1 Dénombrement des agrobactéries au niveau de rhizosphère.....	42
III.2.2 Caractérisation des souches.....	43
III.2.2.1Coloration Gram.....	45
III.2.2.2 Appartenance au genre.....	46
<b>Chapitre IV : Discussion.....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>52</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>54</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>67</b>

**Tableau 06** : Dénombrement de la population agrobactérienne totale (pris de 20/04/2013 au 05/05/2013)

paramètre échantillon	Nombre d'isolats	T° (°C)	PH	C.E (μS)	Calcaire (%)	Argiles (%)	Limons (%)	Sables (%)
Oued El Alleug	2 x 10 <sup>6</sup>	21°C	7.74	1.4	23.06	17.1	69.7	13.2
Ouamri	8 x 10 <sup>5</sup>	20°C	7.87	0.99	17.54	4.03	83.38	12.53
Baraki INRA	2 x 10 <sup>5</sup>	15°C	7.36	0.96	1.55	2.9	33.69	63
Birtouta	1 x 10 <sup>5</sup>	12°C	7.69	0.91	4.1	3.16	53.93	42.91
Saoula	3 x 10 <sup>3</sup>	19°C	7.72	0.92	18.11	0.76	63.55	35.69

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Comparaison de l'ancienne et la nouvelle nomenclature des espèces appartenant au genre <i>Agrobacterium</i> .....	13
<b>Tableau 02:</b> Provenances et dates d'échantillonnage .....	34
<b>Tableau 03 :</b> les caractéristiques physico-chimiques des sols .....	41
<b>Tableau 04 :</b> Répartition des isolats dans les sols étudiés.....	42
<b>Tableau 05 :</b> Résultats de la coloration de Gram.....	45
<b>Tableau 06 :</b> Les facteurs de l'environnement et dénombrement de la population agrobactérienne totale.....	47

## Introduction

---

### Introduction

Le crown gall ou la galle de collet est une maladie bactérienne qui affecte diverses espèces végétales. Actuellement on connaît plus de 634 espèces de plantes dicotylédones ou gymnospermes réparties dans 331 genres et 93 familles qui sont sensibles à cette maladie (De Cleene et De Ley, 1976).

L'agent causal de cette maladie est une espèce bactérienne tellurique appartenant au genre *Agrobacterium* spp. (Smith et Townsend, 1907). Les symptômes se manifestent sous forme d'excroissances tissulaires ou tumeurs au niveau du site d'infection (De Cleene, 1985). Le crown gall peut être causé par diverses espèces d'agrobactéries dont *Agrobacterium vitis* est l'espèce dominante sur la vigne (Ridé et al., 2000). D'autres auteurs ont montré que l'espèce *Agrobacterium tumefaciens* peut également causer des tumeurs sur la vigne (Kawaguchi et Inoue, 2009). En plus des tumeurs, *Agrobacterium vitis* cause une réaction nécrotique sur les racines de la vigne (Rodriguez Palenzuela et al., 1991). D'autres symptômes peuvent être engendrés par les espèces appartenant à ce genre de bactéries; tels que les chevelus racinaires ou hairy root causés par l'espèce *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al., 1930). Il existe également d'autres souches non pathogènes appartenant aussi à ce genre (Beijerinck et Van Delden, 1902).

Plusieurs classifications pour ce genre sont adoptées (Kneuf et al., 1983). Elles sont basées sur des caractères phytopathogènes et biochimiques qui permettent leur classification en 3 biovars, mais la taxonomie moléculaire est la plus adoptée en raison de la fiabilité des tests basés sur l'utilisation des acides nucléiques (Mougel et al., 2001).

La maladie du crown gall est une maladie grave car difficile à réprimer du fait qu'elle peut causer une baisse de la production et réduire la vigueur de la plante et dans des cas extrêmes peut provoquer la mort de la plante (Jodi et al., 2006). Elle est considérée comme une maladie de quarantaine dans de nombreux pays d'Afrique du nord et d'Amérique du sud (Portier, 2004).

## Introduction

---

Durant ces dernières années, le crown gall de la vigne ou broussin a été signalé dans plusieurs pays du monde, au Canada, en Chine, en Australie, au Japon, en Amérique du sud, en Afrique du sud, au Québec (2007), Hongrie et en Slovaquie (Filo et *al.*, 2012). En Algérie, cette maladie a été retrouvée dans les principales régions viticoles à savoir Médéa (Toua, 1990) et Ain T'émouchent (Bensaada, 1992 ; Krimi et Benkacimi, 2009).

A l'interface entre le sol et les racines des plantes, il existe une niche écologique très spécifique, la rhizosphère. Elle correspond au volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes et qui se caractérise par la présence d'exsudats racinaires. Cela conduit à la concentration d'une population microbienne spécifique par rapport à celle présente dans la masse de sol (Moore et Cooskey, 1981). Parmi ces micro-organismes, on distingue les bactéries qui prolifèrent dans un milieu riche en azote et peu acide. Elles sont surtout abondantes autour des racines de certaines plantes au sein de la rhizosphère, ce sont les bactéries non sporulées à Gram négatives tels qu'*Agrobacterium* spp. et *Pseudomonas* spp. qui sont les plus favorisées dans la rhizosphère (Davet, 1996).

Les agrobactéries sont des bactéries qui peuvent survivre d'une manière saprophyte dans les sols agricoles (Bouzar et *al.*, 1987), leur popularité est due à leur capacité à transférer un fragment d'ADN depuis leur cytoplasme vers le noyau des cellules végétales.

Cette capacité est à l'origine des outils de génie génétique utilisé pour la création des plantes génétiquement modifiées (Rene et *al.*, 2000).

Le développement de la biologie moléculaire a permis une connaissance plus approfondie du processus d'infection d'*Agrobacterium*, alors que les informations concernant son écologie sont loin d'être élucidées. Il existe plusieurs facteurs qui peuvent être pris en compte dans la survie et la dissémination des agrobactéries dans leur habitat naturel.

## Introduction

---

De nombreux auteurs soulignent la nécessité de développer plus d'efforts pour l'étude de la dynamique de la population d'*Agrobacterium* et de la diversité des souches entre les espèces au sein de ce genre dans la tumeur et le sol. Cette étude conduit à la mise en place d'une stratégie de lutte efficace mais qui doit passer par une bonne connaissance du cycle biologique du pathogène et une compréhension de l'épidémiologie de la maladie (Burr et al, 1999).

L'objectif de notre travail est de rechercher la population d'*Agrobacterium* et d'évaluer la densité de celle-ci dans le sol et la rhizosphère de quelques vignobles situés dans la région de la Mitidja et Médéa. Ainsi, l'estimation du taux des agrobactéries existantes dans chaque vignoble étudié. Cette approche d'étude nous permettra de connaître le type de sol qui apparait favorable au développement d'*Agrobacterium* spp.

## 1. Présentation générale de la vigne

### 1.1 Présentation botanique

La vigne est une Angiosperme dicotylédone qui appartient à la famille des vitacées, anciennement appelée Ampélidées (Planchon, 1887). Les plantes de cette famille sont des arbrisseaux grimpants, comme des lianes, à tige le plus souvent sarmenteuse mais parfois herbacée, possèdent des vrilles opposées aux feuilles. La famille des Vitacées comprend 19 genres dont le genre *Vitis* qui regroupe les vignes cultivées.

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le phylloxéra, puceron originaire de l'Est des Etats-Unis, a failli anéantir les vignobles européens. A fin de surmonter cette invasion phylloxérique, le greffage de la vigne a été mis en place en utilisant des porte-greffes issus de plants américains naturellement résistants au phylloxéra (Reynier, 2003). Cette technique a permis d'associer la qualité des cépages européens à la résistance des vignes américaines.

Le greffon est la partie supérieure du cep de vigne, est donc constitué d'un tronc qui se divise en bras portant des bois de taille longs ou courts, appelés sarments.

Le porte-greffe, ou partie inférieure, produit le système racinaire qui colonise le sol tout au long de sa vie.

### 1.2 Le cycle de développement de la vigne

Sous les climats tempérés, la vigne connaît chaque année différentes phases successives qui ont lieu dans un ordre constant et dont l'ensemble forme le cycle végétatif, et le cycle reproducteur de la vigne (Brisson et *al.*, 1998) (Figure01).

### 1.2.1 Le cycle végétatif

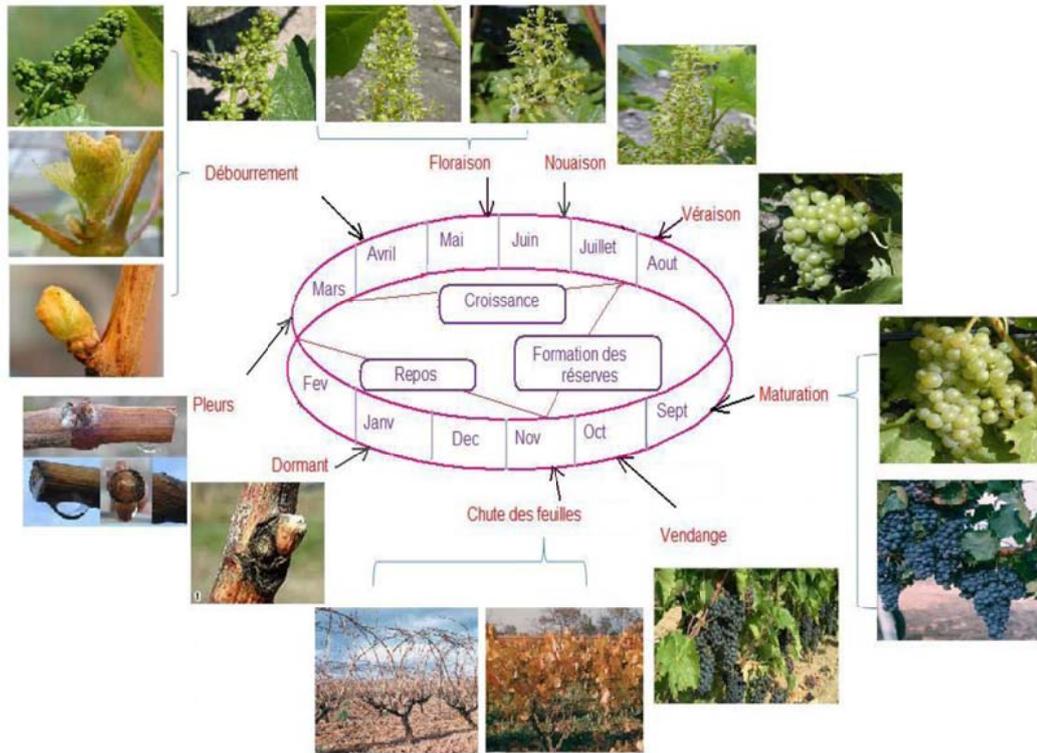
A la fin de l'hiver, lorsque la température du sol s'élève, le système racinaire rentre en activité (Huglin, 1986). Vers la mi-avril, les bourgeons commencent à gonfler en écartant les deux écailles protectrices faisant apparaître, la bourre. Cette première manifestation de la croissance est appelée débourrement. Puis l'extrémité verte de la jeune pousse devient visible et se poursuit par le développement des feuilles, leur activité photosynthétique devient excédentaire (Koblet, 1969). La formation des feuilles est suivie par l'évolution de l'appareil reproducteur.

L'aoûtement, débute lors de la maturation des baies. Les rameaux se lignifient et accumulent des réserves, en particulier sous forme d'amidon (Reynier, 2003). Au mois de novembre, c'est la sénescence des feuilles, elles jaunissent puis tombent. La plante rentre dans la phase de repos végétatif ou repos hivernal.

### 1.2.2 Le cycle reproducteur

La floraison débute vers la mi-juin et correspond à l'épanouissement de la fleur par l'ouverture de la corolle, appelée capuchon floral. Les capuchons se détachent progressivement de la base du réceptacle floral puis chutent (Gerrath, 1993 ; Boss et *al.*, 2003). La chute du capuchon met à nu l'ovaire et permet aux étamines de s'écarter du pistil et de libérer les graines de pollen.

La nouaison correspond au début du développement de l'ovaire fécondé. Un certain nombre de fleurs non pollinisées et d'ovaires fécondés tombent : c'est la coulure (Bessis et Fournioux, 1992). La véraison marque le début de la transformation des baies et donc de la maturation. Une fois que les baies ont atteint leur taille maximale et que leur concentration en glucides et leur acidité sont stabilisées, les baies sont à maturité et peuvent être vendangées.



**Figure 01** : Graphique du cycle végétatif de la vigne indiquant les périodes critiques approximatives et les phases les plus importantes (Hammoum et Derkaoui, 2010).

## 2. Genre *Agrobacterium* spp.

### 2.1 Généralités

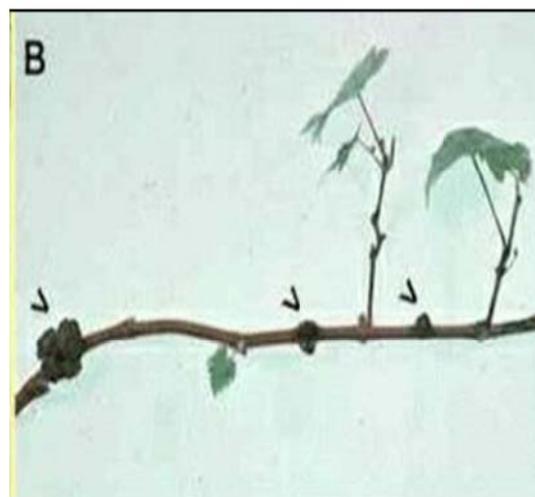
Les agrobactéries sont des habitants naturels du sol, elles vivent principalement dans la partie aérée du sol (Tourte, 2001). Les espèces phytopathogènes sont responsables de la maladie du crown gall ou tumeur du collet (figure 02). Plus de 634 espèces de plantes dicotylédones ou gymnospermes réparties dans 331 genres et 93 familles sont considérées comme sensibles à cette maladie (De Cleene et De Ley, 1976) dont 280 espèces différentes qui comprennent, la vigne, les fruitiers à noyaux, les espèces florales et les arbres fruitiers (Portier, 2004).



**Figure 02** : Tumeurs sur la vigne au point de greffage (Cabernet, 2003).



**Figure 03** : Tumeurs sur le tronc de la vigne (Kado, 2002).



**Figure 04** : Tumeurs sur les sarments de la vigne (Anonyme, 2011).

## 2.2 Caractéristiques de la bactérie

*Agrobacterium* spp. est un agent tellurique à Gram négatif, les cellules ont la forme de bâtonnets de  $0,6 - 1,0\mu\text{m} \times 1,5 - 3,0\mu\text{m}$ . Elles ne forment pas des spores et sont mobiles grâce à des flagelles (de 1 à 6). Elles sont aérobies strictes, oxydase positive (Moore et *al.*, 1988). La plupart des souches d'*Agrobacterium* sont capables de pousser sous une pression d'oxygène réduite ; ce qui est le cas dans les tissus végétaux (Pionnât et *al.*, 1999). Ces bactéries peuvent être isolées à partir du sol ou des tumeurs formées sur les différents organes des plantes (Burr et Kartz, 1983). La température optimale de croissance de ces bactéries se situe entre 25 et 28°C jusqu'à 30°C. Elles poussent facilement sur des milieux standards ou sélectifs. Les colonies sont de couleur blanche ou légèrement crème pour *Agrobacterium vitis* ou bien rose pâle pour *Agrobacterium tumefaciens*. Elles nécessitent 2 à 4 jours pour une croissance normale sur milieu complexe à métabolisme de glucose oxydatif (Mathysse, 2006).

Les agrobactéries sont identifiées par une absence de pigmentation sur les milieux King B et MG. Cependant, sur des milieux contenant des sucres elles produisent beaucoup d'exo-polysaccharides ce qui donne aux colonies un aspect volumineux et muqueux (figure 05). En effet, les colonies d'*Agrobacterium vitis* sont plus muqueuses que celles d'*Agrobacterium tumefaciens* (Argun et al., 2002). Elles produisent de la catalase et généralement aussi de l'uréase et de l'oxydase. Certaines souches regroupées dans le biovar 1 produisent aussi des 3-cétoglycosides (Portier, 2004).

Selon Mougel et al. (2001), l'addition de tellurite de potassium  $K_2TeO_3$  aux milieux, favorise le développement des agrobactéries et l'inhibition des autres bactéries, ce qui permet l'analyse directe du plasmide Ti à partir du sol même si la population d'*Agrobacterium* est faible.



**Figure 05** : Colonies d'*Agrobacterium* spp. sur milieu de culture.

(Schaad et al., 2001).

### 2.3 Taxonomie de la bactérie

Le genre *Agrobacterium* appartient à la classe des *Alpha Proteobacteria* et à la famille des *Rhizobiaceae* (Rene et al., 2000). Ce genre regroupe une douzaine d'espèces à Gram négatif (Paulus et al., 1989). En effet, selon Sawada et al. (1993), les agrobactéries dans le sens large, appartiennent aussi bien au genre *Rhizobium* qu'au genre *Agrobacterium*, mais Farrand et al. (2003), ont proposé la conservation de l'ancienne nomenclature du genre *Agrobacterium*. Ces bactéries telluriques sont considérées comme un habitant normal de certains sols (Bouzar et Moore, 1987).

#### Classification d'*Agrobacterium* spp.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Alpha Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Rhizobiales</i>
Famille	<i>Rhizobiaceae</i>
Genre	<i>Agrobacterium</i> (Ophel et Kerr, 1990) <i>Rhizobium</i> (Young et al., 2001).

Plusieurs classifications ont été adoptées pour la taxonomie du genre *Agrobacterium* (Kneuf et al., 1983). Elles sont basées essentiellement sur les caractères phénotypiques, moléculaires et sur le pouvoir pathogène de la bactérie.

### 2.3.1 Classification phytopathologique

En se basant sur le pouvoir pathogène et la gamme d'hôtes, Keresters et De Ley (1984), ont estimé que ce type de classification est fondé sur des critères liés à un élément mobile, le plasmide pathogène (pTi ou pRi). Cette taxonomie est très discutée du fait qu'elle est basée sur des accessoires conjugatifs qui peuvent être acquis ou perdus. Ainsi, la perte ou l'acquisition d'un plasmide conduit à la reclassification de la souche dans une autre espèce (Paulus et *al.*, 1989).

La classification basée sur le pouvoir pathogène compte six espèces d'*Agrobacterium* (Escobar et Dandekar, 2003) :

*Agrobacterium tumefaciens* (De Cleene, 1985) agent de la galle du collet ou crown gall.

*Agrobacterium rhizogenes* (Riker et *al.*, 1930 ; Braun, 1952) agent des racines chevelues ou hairy root.

*Agrobacterium rubi* (Hildebrand, 1940 ; Starr et weiss, 1943) agent du 'cane gall' sur le genre *Rubus*.

*Agrobacterium vitis* (Ophel et Kerr, 1990) agent du crown gall de la vigne.

*Agrobacterium fici* (*Agrobacterium larrymoorei*) (Bouzar et Jones, 2001) agent du crown gall sur *Ficus benjamina* une espèce ligneuse ornementale.

*Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck et Van Delden, 1902) non pathogène.

### 2.3.3 Classification phénotypique

Basée sur des critères biochimiques et physiologiques à savoir l'utilisation de certaines sources de carbone, la dégradation d'acides et de bases organiques, la production d'acides, les profils protéiques, les profils d'acides gras,.....etc.

L'analyse phénotypique des souches d'*Agrobacterium* spp. permet leur classification en trois groupes distincts appelés biotypes ou biovars (Mougel et al., 2001).

Le biovar 1 : Comprend des souches 3-cétolactose positive, tumorigènes (*Agrobacterium tumefaciens*) et non pathogènes (*Agrobacterium radiobacter*) et quelques souches rhizogènes (*Agrobacterium rhizogenes*).

Le biovar 2 : Comprend des souches 3-cétolactose négatives tumorigènes (*Agrobacterium tumefaciens*), souches rhizogènes (*Agrobacterium rhizogenes*) et des souches virulentes d'*Agrobacterium radiobacter*.

Le biovar 3 : Regroupant les espèces d'*Agrobacterium vitis* et *Agrobacterium rubi* (Ophel et Kerr, 1990) ; comporte des souches isolées de la vigne et du genre *Rubus* présentant une gamme d'hôte très restreinte.

**Tableau 01:** Comparaison de l'ancienne et de la nouvelle nomenclature des espèces appartenant au genre *Agrobacterium* (Moore et al., 2001).

La nouvelle taxonomie	L'ancienne taxonomie
<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 1 <i>A. radiobacter</i> biovar 1 <i>A. rhizogenes</i> biovar 1
<i>A. Rhizogenes</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 2 <i>A. radiobacter</i> biovar 2 <i>A. rhizogenes</i> biovar 2
<i>A. vitis</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 3 <i>A. radiobacter</i> biovar 3
<i>A. rubi</i>	<i>A. rubi</i>

En effet, selon Mougel (2001) et Portier (2004), les plantes peuvent jouer un rôle dans la structure génétique des populations d'*Agrobacterium* associées aux plantes.

#### 2.3.4 Classification moléculaire

Cette classification est la plus adoptée en raison de la fiabilité des tests moléculaires tels que la PCR. Elle considère l'analyse de l'ADN génomique de la bactérie, les pourcentages d'homologie entre deux génomes, le pourcentage des bases puriques C+G par rapport A+T+C+G et l'analyse de l'opéron ribosomique du 16S et du 23S et l'espace intergénique entre eux *ITS* (*Intergenic Spacer*) (Mougel et al., 2001). Le gène *rrs* détermine l'ARN 16S de la petite sous-unité du ribosome chez les bactéries. Il est universel chez les procaryotes, et les organites des eucaryotes ; son séquençage permet de comparer rapidement de nombreux isolats entre eux.

---

En effet, le génome d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche de référence C58) a été totalement séquencé en 2001 (Wood et al., 2001). Il a été montré que le génome de cette bactérie est suffisamment variable pour apporter des informations taxonomiques et suffisamment conservé pour être facilement analysable (Woese, 1987). Il a été observé que les gènes *rrs* des souches d'une même espèce bactérienne présentent au moins 97% de similarité (Stackebrandt et Gobel, 1994). Ce type d'analyse s'est révélé très semblable pour classer les bactéries jusqu'au niveau du genre. Par contre, cette méthode n'est pas suffisamment résolutive pour classer les individus par espèces. Certaines espèces génomiques d'*Agrobacterium* partagent des gènes *rrs* identiques (Mougel et al., 2002). A l'inverse, certaines bactéries possèdent plusieurs gènes *rrs* qui ne sont pas identiques (Garcia Martinez et al., 1999).

## 2.4 Diversité des plasmides

### 2.4.1 Plasmide Ti

En étudiant les souches d'*Agrobacterium*, Braun (1947), a distingué des particules de grand poids moléculaire qui transportent l'information génétique. Ce plasmide est nommé le plasmide Ti ou pTi pour (*Tumor inducing*) chez *Agrobacterium tumefaciens* et plasmide Ri ou pRi pour (*root inducing*) chez *Agrobacterium rhizogenes* (Moore et al., 1979 ; Ream, 1989). Il constitue 5% du génome bactérien (Allardet-Servent et al., 1993).

Pour étudier les principaux types de plasmides d'*Agrobacterium*, les cartes de restriction, le clonage et le séquençage des fragments d'ADN sont maintenant disponibles (figure 06), il existe actuellement différents type de plasmides Ti à savoir :

- 
- Plasmide Ti de type *octopine / cucumopine* qui possède la région-TA importante. Le gène qui code pour la synthèse de la *cucumopine* est localisé sur l'ADN-T du plasmide *octopine / cucumopine* (Fournier et al., 1994).
  - Plasmide Ti de type *nopaline* qui est fortement conservé dans différentes souches d'*Agrobacterium vitis*, le gène *nopaline* synthétase (OCS) dirige la synthèse de la *nopaline* (Dessaux et al., 1992).
  - Plasmide Ti de type *vitopine* qui porte des gènes codant pour la synthèse de la *vitopine*, un dérivé de la Putrescine et de l'acéto-glutamate (Dessaux et al., 1992).

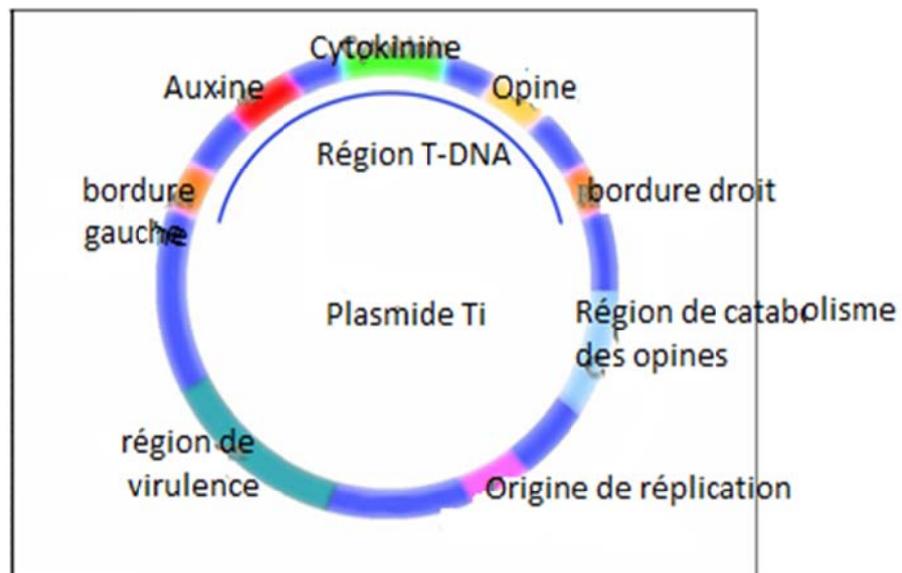
La maladie du crown gall de la vigne est généralement causée par les souches d'*Agrobacterium vitis* qui hébergent un plasmide *Ti* de type *octopine nopaline* ou *vitopine* (Ridé et al., 2000) et occasionnellement par *Agrobacterium tumefaciens* muni d'un plasmide *Ti* de type *octopine* ou *nopaline* (Kawaguchi et Inoue 2009).

Outre le plasmide *Ti*, *Agrobacterium vitis* contient un autre plasmide appelé le plasmide *tar* pour l'utilisation du tartrate (Otten et al., 1995).

### 2.5.2 Plasmide TAR

Le tartrate est un acide organique très abondant dans les organes de la vigne, l'utilisation du tartrate est un caractère commun aux souches du biovar 3 d'*Agrobacterium vitis* et du biovar 2 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Cependant, les souches de biovar 1 sont incapables d'utiliser l'acide tartrique comme seule source de carbone (Szegedi et al., 2005). Ce composé est utilisé d'une manière préférentielle par rapport au glucose chez les biovars 2 et 3 (Salomone et al., 1998) ; cette propriété est due à l'existence d'une enzyme spécifique qui permet la dégradation des tartrates.

Les gènes qui codent pour la synthèse de cette enzyme sont localisés sur la région *tar* portée par le plasmide TAR (Szegedi et al., 1992). Il existe trois régions d'utilisation d'acide tartrique : *TARI*, *TARII* et *TARIII*; selon la possession de ces régions il existe trois types de plasmides conjugatifs de tartrate, *pTr AB3* (245KBS), *pTi AB3* (234KBS) et le *pTr AB4* (170KBS) (Szegedi et al., 1999). Le plasmide *pTi AB3* est le seul plasmide qui porte simultanément les gènes oncogènes se trouvant dans le *pTi* et la région *tar* responsable de l'utilisation du tartrate qui joue un rôle dans la colonisation de la vigne (Salomone et al., 1998) et par conséquent une gamme d'hôte naturellement étroite (Salomone et Otten, 1999). Certains résultats montrent que l'utilisation du tartrate est seulement associée aux plasmides *Ti* de type *octopine / cucumopine* et non par d'autres types de plasmide *Ti* dans les isolats de la vigne d'*Agrobacterium tumefaciens* (Szegedi et al., 2005).



**Figure 06** : Principales régions du plasmide Ti

(Beijersbergen et Hooykaas, 1993).

## 2.5 Importance de la maladie du crown gall en Algérie

Les agrobactéries forment un genre bactérien capable de déclencher sur de nombreuses plantes un processus de multiplication cellulaire anarchique engendrant la formation de tumeurs (crown gall) ou des chevelus racinaires (hairy root) (Smith et Townsend, 1907). Le crown gall est considéré comme une maladie redoutable car il peut provoquer des pertes économiques très importantes dans les pépinières d'arbres fruitiers, les plantes ornementales telles que le rosier, le Ficus, le peuplier et le chrysanthème. Chez les arbres forestiers tels que l'eucalyptus, le taux d'infection dans les pépinières forestières peut atteindre plus de 95% (Krimi et *al.*, 2006).

Une étude est réalisée par Krimi et Benkacimi (2009), sur cinq cent boutures destinées au greffage de la vigne de 11 génotypes collectés de diverses provenances d'Algérie, révèle que ces scions sont porteurs de la maladie, et cela constitue un risque dans la dissémination de la maladie.

Selon Bouzar et *al.* (1991), la galle de collet sévit dans 99% des pépinières de production des plants fruitiers de l'Algérie, à l'exception du figuier et cognassier, toutes les espèces étudiées sont atteintes par la maladie. Les espèces les plus touchées sont : le pêcher (5.39%), l'amandier (3.43%), le cerisier (1.5%), le pommier (1.47%) et l'olivier (1.3%).

D'autre part, au sein d'une même espèce, les proportions de plants atteints de crown gall varient en fonction du porte greffe utilisé. Une grande partie des pépinières prospectées s'avère touchée par cette maladie dans l'étude réalisée par Bouzar et *al.* (1991). Les pertes estimées ne prennent pas en compte un tiers de la production des boutures vendues sans avoir été contrôlées.

En effet, certains producteurs font l'élagage des galles des troncs avant de les soumettre à un contrôle phytosanitaire. De telles pratiques peuvent nuire à la survie des jeunes arbres fruitiers après la plantation et promouvoir ainsi la propagation de la maladie par la contamination des vergers nouvellement plantés (Bouzar et *al.*, 1991).

Les pertes causées par cette bactérie sont considérables, les tumeurs du collet peuvent réduire la vigueur et la production après un ou deux ans, ce qui entraînerait à long terme la mort de la plante qui doit être arrachée (Jodi et *al.*, 2006). Pour cela la production des boutures indemnes de cette bactérie, soit à partir de culture *in vitro*, soit à partir des rameaux aériens a fait l'objet d'une étude particulière dans le cadre du projet européen INCO « *Integrated Control of crown gall in Mediterranean Countries* » impliquant la France, l'Espagne, l'Italie, le Maroc, l'Algérie, la Tunisie et la Jordanie (Nesme, 2001).

## **2.6 Facteurs affectant la survie d'*Agrobacterium***

### **2.6.1 Effet de la rhizosphère**

Le sol avec les racines constituent un écosystème dynamique très complexe. Les interactions entre les végétaux et les microorganismes telluriques se manifestent avec une intensité accrue dans la rhizosphère, qui est le volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes et qui se caractérise par la présence d'exsudats racinaires (Burr et Kartz, 1983). L'activité microbienne est particulièrement intense dans la rhizosphère qui constitue la surface ou se concentre une population microbienne spécifique quantitativement et qualitativement et différente de celle présente dans la masse de sol (Moore et Cooksy, 1981).

De nombreuses substances exsudées par les racines ont un effet stimulant ou inhibiteur sur la microflore. Ces effets sélectionnent ou sanctionnent une population microbienne relativement stable et spécifiquement associées à la rhizosphère de la plante concernée (Burr et *al.*, 1998). Parmi ces micro-organismes, on distingue les bactéries non sporulées à Gram négative tels que *Pseudomonas spp.* et *Agrobacterium spp.* qui sont les plus favorisées dans la rhizosphère (Davies, 1996). En effet, la présence des exsudats racinaires dans la rhizosphère, influe d'une manière significative sur la croissance des bactéries.

La multiplication des souches d'*Agrobacterium vitis* dans la rhizosphère de la vigne est favorisée par la production de l'acide L(+) tartrique qui est un acide organique très abondant dans les organes de la vigne (Otten et *al.*, 1996). Cet élément nutritif est un substrat sélectif de croissance dans la rhizosphère, la présence d'*Agrobacterium vitis* est abondante dans un environnement où la compétition microbienne est intense. Le métabolisme de cet acide par les agrobactéries contribue à la colonisation de la plante hôte par ce pathogène (Szegedi et *al.*, 2005).

Une étude a montré qu'au cours de la période de végétation, le nombre des agrobactéries est élevé mais diminue régulièrement pendant l'automne et l'hiver, ce qui dénote le rôle essentiel de la rhizosphère dans la régulation des populations (Krimi et *al.*, 2002).

Outre la relation plante-pathogène, les agrobactéries sont également impliquées dans des relations associatives commensales notamment dans les rhizosphères (Petit et Tempe, 1978).

Les agrobactéries sont capables de survivre dans le sol et garder leur pouvoir pathogène pendant une période de 23 semaines, mais elles vivent en association avec les racines et les cals de la vigne pour une période plus longue (Burr et *al.*, 1995).

### 2.6.2 Compétition entre microorganismes dans le sol et dans la rhizosphère

La population d'*Agrobacterium* est affectée par d'autres microorganismes du sol (De Boer, 1982). Dans la rhizosphère comme dans le sol, les sources nutritionnelles et énergétiques sont limitées de sorte qu'il apparait une compétition importante entre les microorganismes. En effet, certaines espèces de *Pseudomonas* possèdent la capacité d'utiliser d'une large gamme de substances pour la production d'énergie. Cette capacité compétitive des *Pseudomonas* spp. exercée sur la population agrobactérienne à une action inhibitrice sur cette population en chélatant le fer dispersé dans le sol (Khmel et al., 1998). Les activités antagonistes entre les microorganismes ne présentent pas les mêmes caractères et la même intensité dans la rhizosphère et dans le sol (Dommergues et Mangenot, 1970). La densité des microorganismes synthétisant des antibiotiques agissent sur la population d'*Agrobacterium* par la synthèse de bactériocines qui inhibent sa croissance.

Une étude est réalisée par Chen et al. (2007), sur les sols des vignobles de Chine montre que les souches HX2 de *Rahnella aquatilis* inhibent (même avec des concentrations minimales) les souches d'*Agrobacterium vitis* en produisant des antibiotiques qui ne provoquent pas la lyse des cellules bactériennes, mais ils ont un effet thermostable. Peu après, ces mêmes auteurs ont découvert que ces bactéries inhibent l'ARN et la synthèse des protéines (Chen et al., 2009).

### 2.6.3 Effet de l'environnement

Les conditions offertes dans le sol déterminent pour une large part la nature et le nombre des microorganismes (Page et *al.*, 1982). Il y a plusieurs facteurs environnementaux qui affectent la survie des agrobactéries dans leur habitat naturel.

#### 2.6.3.1 Facteur température

L'activité microbienne est déterminée par la température du sol. Cette température subit des variations journalières et ces variations sont beaucoup moins marquées en profondeur qu'à la surface du sol. Il est possible que ces variations n'entraînent pas des fluctuations importantes des densités bactériennes, tant que le sol reste dans une gamme de températures comprises entre 2° et 22°C (Dommergues et Mangenot, 1970). En effet, selon De Boer (1982), dans cet intervalle de température, c'est le facteur humidité qui prédomine. Il n'en est plus de même dans des conditions extrêmes, c'est-à-dire lorsque le sol est gelé ou lorsque sa température dépasse 25°C. Il a été montré que la température du sol est spécifique pour chaque espèce pour laquelle il existe un optimum de croissance et un intervalle entre un minimum et un maximum en dehors duquel sa croissance est impossible (Dommergues et Mangenot, 1970).

En effet, *Agrobacterium* croit à une température comprise entre 25° et 28°C (Keresters et De Ley, 1984). Une température de 30°C diminue progressivement leur viabilité (Al Momani et Abussaud, 1991). Cette sensibilité est un facteur très important dans la lutte contre la maladie du crown gall en utilisant la solarisation des sols (Otten et *al.*, 2008) et la thérapie des boutures en dormance (Burr et *al.*, 1989).

---

Concernant les biovars, selon Eastwell et *al.* (1995), les souches d'*Agrobacterium vitis* sont plus sensibles aux extrêmes de température que les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* appartenant aux biovar 1 et 2.

Les basses températures de l'hiver diminuent aussi l'activité biologique d'*Agrobacterium*, contrairement au réchauffement printanier qui permet la reprise de l'activité de celui-ci (Krimi et *al.*, 2002). Par ailleurs, il a été montré que les dégâts les plus importants sur le Rosier sont observés en serre, car les conditions environnementales et surtout la température sont très favorables au développement des agrobactéries pathogènes (Pionnât et *al.*, 1999).

### 2.6.3.2 Facteur pH

L'action du pH sur les microorganismes dépend de leur tolérance vis à vis de ce facteur. Pour le cas des bactéries se développant dans une large gamme de pH, leur croissance est satisfaisante à un pH compris entre 6 et 9 (Stanier et *al.*, 1966). En général, la survie d'*Agrobacterium* est favorisée par un pH neutre (Cook et Baker, 1983). Notons qu'à l'intérieur d'un même groupe de microorganismes, il peut y avoir des différences considérables suivant les espèces ou même les souches en ce qui concerne leurs exigences vis à vis du pH (Dommergues et Mangenot, 1970).

Cependant, le nombre de souches du biovar 1 augmente progressivement avec l'augmentation du pH par rapport aux souches du biovar 2 ; la croissance de ces dernières se situe à un pH compris entre 5 et 8. Les souches du biovar 3 ne représentent aucune activité motrice à un pH compris entre 7 et 8 (Bush et Pueppke, 1991). D'autre part, la plante blessée émet des signaux glucidiques, qui sont captés par une protéine codée par *chvI*. L'augmentation du pH du milieu est captée par *ChvE*, pour activer également les gènes de virulence (Mantais et Winans, 1993).

### 2.6.3.3 Facteur texture du sol

La texture limoneuse est caractérisée par une forte capacité de rétention d'eau ce qui favorise la multiplication et la propagation des bactéries (Lynch et Ebben, 1986). La matière organique joue un rôle important dans le développement des agrobactéries. La stimulation agrobactérienne entraîne la solubilisation du phosphore tout en augmentant la teneur du sol en phosphore assimilable (Duthyl, 1973).

Une fraction de ce substrat nutritif peut être utilisée par les bactéries (Dommergues et Mangenot, 1970). La mobilité du potassium dans le sol permet aux agrobactéries de concurrencer les plantes en utilisant pour leurs besoins, une partie de cet élément disponible (Duthyl, 1973). D'autre part, les fluctuations du pH sont atténuées dans le sol car les argiles comme les substances humiques jouent un rôle de tampon. La montmorillonite maintient le pH à un niveau favorable pour la croissance bactérienne. Cette argile stimule aussi la respiration bactérienne d'un large spectre d'espèces bactériennes (Stotzky et Rem, 1965). Aussi, elle protège les bactéries contre les effets destructeurs de la dessiccation, la température élevée et les rayons x. La kaolinite et la montmorillonite servent comme source de minéraux pour les bactéries telluriques (Stotzky et Rem, 1965).

### 2.6.3.4 Facteur eau

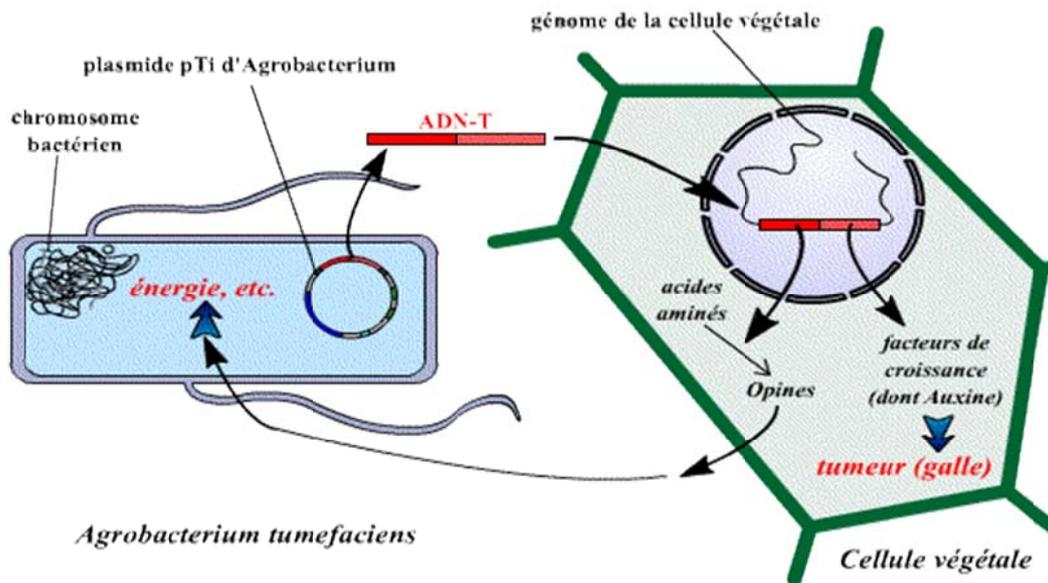
L'humidité est un des facteurs écologiques les plus puissants. La microflore tellurique est très sensible aux variations de l'humidité. Selon Curl et Truelove (1986), l'humidité du sol est un paramètre clé dans la composition de la microflore du sol. Des travaux ont montré qu'il existe une relation directe entre le nombre d'agrobactéries et l'humidité du sol (Deckey, 1961), et parallèlement, l'eau favorise la multiplication et la dispersion d'*Agrobacterium* dans le sol (Lynch et Ebben, 1986).

## 2.7 Processus d'infection

Les mécanismes de l'infection et de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* sont détaillés dans plusieurs articles de revues. Selon Zhu et *al.* (2000), le processus de transfert de gènes à partir d'*Agrobacterium* vers les cellules de la plante implique cinq étapes importantes (figure 07):

- 1) colonisation bactérienne
- 2) induction du système de virulence bactérien formation du complexe de transfert de l'ADN-T
- 3) Transfert de l'ADN-T par le système de sécrétion de type IV.
- 4) Intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante.
- 5) Expression de l'ADN-T.

La colonisation bactérienne débute par la perception et le mouvement des bactéries vers les cellules végétales. Cette première étape est suivie par l'adhérence des bactéries aux cellules formant un biofilm de bactéries à la surface du tissu végétal (Windels et *al.*, 2008).



**Figure 07** : Une bactérie d'*Agrobacterium* transfère son fragment d'ADN (l'ADN-T) dans le génome de la plante (Anonyme 2003).

## 2.8 La survie d'*Agrobacterium* spp.

### 2.8.1 Dans le sol et la rhizosphère des vignes

Les agrobactéries forment un genre bactérien capable de déclencher sur de nombreuses plantes un processus de multiplication cellulaire anarchique. Ce sont des hôtes courants du sol et de la rhizosphère; certaines études montrent que cette bactérie peut être systémique et peut même induire des tumeurs aériennes (Lehozcky, 1978 ; Pionnât et *al.*, 1999). Cependant, l'environnement habituel de ces bactéries est le sol ou la rhizosphère (Burr et *al.*, 1998).

Par ailleurs, les agrobactéries telluriques ne sont généralement pas pathogènes mais peuvent le devenir après acquisition d'un plasmide Ti (Paulus et *al.*, 1989). La dissémination par conjugaison du plasmide Ti aux bactéries indigènes du sol (Genetello et *al.*, 1977) pourrait expliquer la persistance des agrobactéries pathogènes dans certains sols (Krimi et *al.*, 2003).

A travers la littérature, de nombreux auteurs soulignent la nécessité de développer l'étude de la dynamique de la population d'*Agrobacterium* et de la diversité des souches entre les espèces au sein de ce genre, dans la tumeur, dans le sol et dans la rhizosphère. Cette étude conduirait à la mise en place d'une stratégie de lutte efficace, mais qui doit passer par une bonne connaissance du cycle biologique du pathogène et une compréhension de l'épidémiologie de la maladie (Portier, 2004). Pionnât *et al.* (1999), ont montré la très grande diversité, au niveau des souches, des espèces et des genres, des agrobactéries impliquées dans une même épidémie. Cette diversité des agents pathogènes est une caractéristique très originale des épidémies de la galle du collet qui ne se rencontre pas dans d'autres modèles pathogènes végétaux ou animaux.

---

Krimi *et al.* (2002), ont étudié la survie d'*Agrobacterium spp.* pathogènes et non pathogènes dans des sols infectés après élimination des plantes. Cette étude a montrée que dans un sol en jachère où ne poussent que des plantes sans symptômes, il est possible de détecter des agrobactéries pathogènes 16 ans après en avoir retiré les plantes infectées. Les agrobactéries pathogènes peuvent donc persister à long terme dans les sols.

Selon Abarca-grau *et al.* (2010), les souches d'*Agrobacterium* sont capables d'adhérer à des supports inertes et d'y former des biofilms, ce qui explique leur survie pendant de longues périodes, notamment dans le sol à la surface des particules de terre ou sur le matériel de culture. Leur potentiel d'adhésion varie en fonction des souches, de la surface colonisée et de l'environnement (Tomlinson *et al.*, 2010).

La rhizosphère offre une protection pour les agrobactéries dont le nombre est estimés à  $10^6$  bactéries par g des racines soit 100 à 1000 fois plus que la population retrouvée dans 1g de sol (Moore et Cooksy, 1981). Ainsi, les génotypes des agrobactéries associés au sol rhizosphérique et aux tissus racinaires, sont différents de ceux des sols nus (Mougel, 2000). Ces études ont montré le rôle prépondérant de la plante dans la structuration génétique des populations d'agrobactéries (Mougel, 2000; portier, 2004).

### **I.8.2 Dans les sarments de la vigne**

Dans les vignobles où le crown gall sévit, les densités des agrobactéries sont supérieures à  $10^4$  /g de sol (Moore et Cooksey, 1981). Chez la vigne, le contact entre les racines et le pathogène est permanent, la rhizosphère est l'habitat favori pour les agrobactéries, ces dernières colonisent les racines sans infection (figure 08) jusqu'à ce qu'il y ait une sécrétion importante de l'acéto-séringone suite à une blessure (Burr *et al.*, 1987). L'accroissement de la densité agrobactérienne est sous l'influence des excréments racinaires.

D'un point de vue écologique, la présence d'acide L(+) tartrique dans la rhizosphère des vignes favorise la multiplication des agrobactéries (Otten et *al.*, 1996). L'utilisation de L(+) tartrique est une caractéristique du biovar 2 et 3 d'*Agrobacterium* spp. Le métabolisme de cet acide par ces agrobactéries contribue à la colonisation de la plante hôte par ce pathogène (Szegedi et *al.*, 2005).



**Figure 08 :** Colonisation d'une racine par les agrobactéries (Anonyme, 2013).

De plus, la présence de cette substance dans les tissus conducteurs des sarments de la vigne donne à ces deux biovars la particularité de survivre d'une manière systémique pendant la période de repos végétatif dans les tissus aériens de la vigne et dans le système racinaire (Burr et Reid, 1994). Cependant, peu après, Burr et *al.* (1999) ont isolé des souches d'*Agrobacterium vitis* à partir de *Vitis riparia* qui sont incapables de dégrader ce produit.

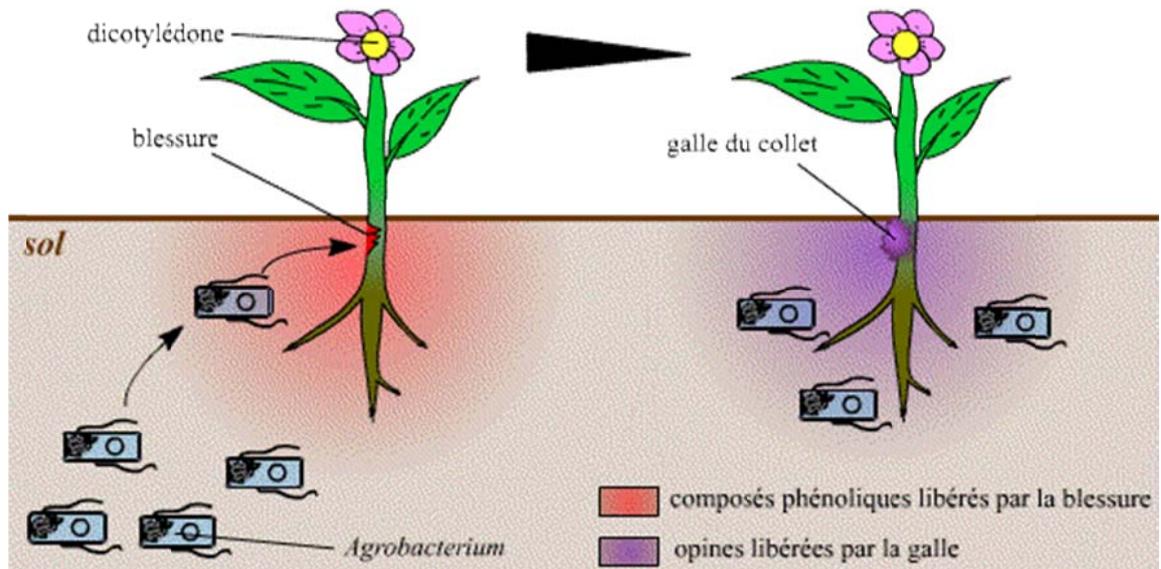
Ainsi, la nature systémique de la maladie du crown gall (Burr *et al.*, 1987) ; pose un problème phytosanitaire majeur en raison du fait qu'*Agrobacterium vitis* peut coloniser les vaisseaux des plants de vigne ce qui engendre une dissémination du pathogène *via* le matériel végétal de propagation (Krimi et Benkacimi, 2009 ; Filo *et al.*, 2012).

L'étude épidémiologique de crown gall de la vigne indique la propagation végétative des boutures infectées comme la majorité des disséminations d'*Agrobacterium vitis* (Bazzi *et al.*, 1987). En effet, les principales sources de contamination dans ces lieux privilégiés sont les sols infectés, les plantes malades et les plantes porteuses saines (Jäger *et al.*, 1990).

D'autre part, après l'infection de la plante par les agrobactéries, il se produit une insertion du T-DNA dans l'ADN du noyau de la cellule végétale. L'expression des gènes portés par le TDNA se traduit par la surproduction d'hormones de croissance et la sécrétion d'opines ; ces dernières ne sont dégradées que par les bactéries inductrice de tumeur qui les utilisent pour leur propre croissance et leur multiplication comme source de carbone, d'azote et d'énergie (Rene *et al.*, 2000 ; Sabec-Paradiz et Skerlavaj, 2000).

Les opines favorisent le transfert conjugatif du plasmide Ti. Donc, sur les tumeurs, les agrobactéries majoritaires sont celles qui portent le plasmide Ti qui a permis l'induction de la tumeur. Donc, en présence d'opines, les bactéries pathogènes sont favorisées. Par contre, en absence de la tumeur et donc d'opines, les agrobactéries non-pathogènes vont être avantagées et la population pathogènes va décliner (Guyon *et al.*, 1993).

Selon Ridé *et al.* (2000) la présence de ces molécules opiniques dans les tissus tumoraux constitue une niche écologique favorisant le développement d'agrobactéries pathogènes entourant la rhizosphère (figure 09).



**Figure 09 :** Infection de la plante par *Agrobacterium* induit le développement d'une galle (Les échelles ne sont pas respectées) (Anonyme, 2003).

### 2.8.3 Dans les débris de la vigne et les mauvaises herbes

La population agrobactérienne tellurique peut devenir une source d'inoculum non négligeable dans les épidémies en particulier lorsque la population initiale pathogène est fortement représentée et en présence continue d'une culture de vigne (Nesme, 1995). Cependant, plusieurs bactéries phytopathogènes peuvent probablement survivre dans les débris de racines de la vigne (Burr et *al.*, 1995 ; Filo et *al.*, 2012).

Généralement, ces débris influent considérablement sur la survie des bactéries pathogènes et non pathogènes. Ils servent comme base nutritive pour ces bactéries, leur longévité dépend de persistance de ces débris dans le sol (De Boer, 1982).

Dans ce cas, *Agrobacterium* persiste sous la forme saprophyte et peut survivre dans les débris au moins deux ans après l'arrachage des plants (Burr et al., 1995) et cela constitue un véritable réservoir d'inoculum (Deckey, 1961). La diminution du temps de survie est obtenue en accélérant la décomposition des organes présents au sol par arrosage ou fumigation (Pinkerton et al. 2000). Les résidus de la vigne analysés ne portaient pas des tumeurs et toutes les souches isolées ont gardé leur pouvoir pathogène ainsi que leur plasmide Ti. D'autre part, les souches d'*Agrobacterium vitis* ont été signalées sur les racines de plusieurs espèces de mauvaises herbes (Burr et al., 1995).

Une autre étude où la vigne et l'avoine ont fait l'objet d'une plantation dans les sols infectés d'*Agrobacterium vitis*, la bactérie s'est maintenue dans la vigne avec des densités de population plus importantes que celles obtenues dans la rhizosphère de l'avoine (Bishop et al., 1988). Chez l'avoine (*Avena sterilis*) la bactérie s'est maintenue à de faibles niveaux de façon indépendante à la surface des racines pendant environ 10 semaines. Il semble que les racines d'*Avena sterilis* fournissent à cette bactérie un habitat favorable à sa survie (Bishop et al., 1988).

Outre les débris et l'avoine, des études montrent qu'*Agrobacterium* spp. persiste dans les espèces de vigne sauvage (Burr et al., 1999). Le pathogène est détecté dans des échantillons de racines de vigne sauvage et toutes les souches sont affiliées à *Agrobacterium vitis*, dans ce cas ils s'avèrent non tumorigènes avec un ratio de 1 pathogène contre 28 non pathogènes (Moore et Coosky, 1981).

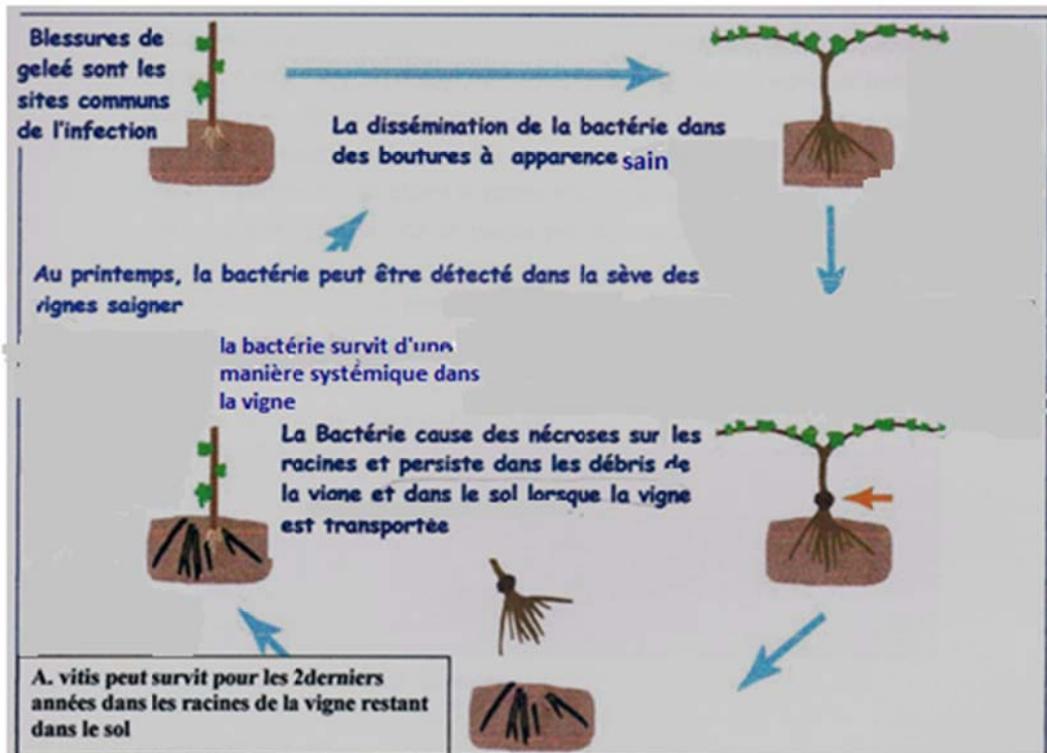


Figure 10 : Cycle écologique d'*Agrobacterium vitis*

(Moudoude et Issaad, 2006).

D'autres espèces de vigne sauvage peuvent héberger les souches d'*Agrobacterium vitis*. La bactérie a été isolée à partir de plants de *Vitis riparia* et semble bien adaptée à la survie sur ceux-ci (Burr et al., 1995). La plupart des hybrides issus des croisements ayant comme l'un des parents *Vitis riparia*, sont très résistants au crown gall (Stover et al., 1997). L'inoculum nécessaire à l'infection peut provenir de deux sources, soit des plants et des boutures ou du sol. Ce qui implique une attention particulière quant à l'état sanitaire du vignoble, des boutures et des pratiques culturales requises pour prévenir les infections par *Agrobacterium* spp.

## 2.9 Fluctuations saisonnières

En 2002, Krimi et *al.* ont observé des fluctuations saisonnières des populations d'*Agrobacterium* spp. Dans certains sols, la population totale des agrobactéries augmente au printemps et en été ( $10^6$  CFU/g). Cette augmentation de la population correspond probablement à une augmentation de la quantité de nutriments relégués dans le sol par les plantes, mais aussi de particularités propres aux sols dits alors «conductifs». Dans ces sols, les agrobactéries pathogènes ne sont détectables qu'au printemps et en été. Lorsque la population totale revient à des niveaux moins élevés ( $10^3$  CFU/g), en automne et en hiver, il n'est plus possible d'isoler des agrobactéries pathogènes. Cette étude suggère que les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. sont avantagées par rapport aux non pathogènes en période de croissance des plantes (Krimi et *al.*, 2002).

Aux Etats Unis, les analyses du sol de certains vignobles montrent des niveaux de population d'*Agrobacterium vitis* faible voire même indétectables (Burr et *al.*, 1987).

*Agrobacterium vitis* n'est détecté que dans la rhizosphère des plantes malades (Bien et *al.*, 1990 ; Jager et *al.*, 1990) et rarement dans les sols (Bouzar et Moore, 1987). Or, selon Lopez Gonzales et *al.* (2007) *Agrobacterium vitis* ne se retrouverait que dans les plants de vigne. Les agrobactéries pathogènes se manifestent dans le sol lorsque les tumeurs sont complètement lavées par les eaux de pluie et que le pathogène passe dans le sol (Burr et Katz, 1983).

## II. Matériels et méthodes

Ce travail a pour objectif la recherche d'*Agrobacterium* spp. dans le sol de vignobles, il a porté sur un choix de parcelles situées dans différentes régions de la Mitidja et Médéa dans un but de comparaison du taux des agrobactéries existantes dans chaque vignoble.

### II.1 Prélèvement des échantillons du sol

#### II.1.1 parcelles d'étude

Notre travail consiste à effectuer des prélèvements du sol dans 5 vignobles situés dans différentes régions de la Mitidja et Médéa à savoir :

- Station expérimentale de l'Institut National des Recherches Agronomique I.N.R.A centre Mahdi Bouâlem Baraki Alger.
- Exploitation privée de production de la vigne Saoula Alger (S).
- Exploitation privée de production de la vigne Birtouta Alger (B).
- Exploitation privée de production de la vigne Oued El Alleug Blida (O).
- Exploitation privée de production de la vigne Ouamri Média (W).

Les renseignements sur les échantillons sont reproduits dans le tableau 02 :

**Tableau 02:** Provenances et dates d'échantillonnages

Code	Date d'échantillonnage	T° du sol	L'âge du vignoble	Symptômes de crown gall
N	05/05/2013	15°C	7 ans	absence
S	01/05/2013	19°C	15 ans	absence
B	20/04/2013	12°C	4 ans	absence
O	26/04/2013	21°C	20 ans	absence
w	23/04/2013	20°C	8 ans	absence

### **II.1.2 Echantillonnage**

L'échantillonnage a été effectué selon la méthode décrite par Burr et Katz (1983). Pour chaque vignoble, 5 échantillons de sol ont été collectés au hasard à une profondeur qui s'étale entre 10 et 20cm autour des racines. Au total, nous avons collecté 1kg pour chaque parcelle. Les échantillons sont prélevés à l'aide d'une tarière stérile (stérilisation de matériel par flambage) et transportés aseptiquement dans des sachets en plastique. Le sol est séché à l'ombre sur une paillasse puis broyé à l'aide d'un broyeur (IKA Werk M20).

## **II.2 Diagnostic au laboratoire**

### **II.2.1 Analyses pédologiques**

Les analyses pédologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire des analyses physicochimiques du sol de l'Ecole Nationale Supérieure d'Hydraulique Soumâa, Blida.

#### **II.2.1.1 Analyses granulométriques**

La méthode consiste à faire subir au sol broyé (20g), une attaque par l'eau oxygénée pour détruire la matière organique, suivie d'une attaque par l'acide chlorhydrique dans le but d'éliminer le calcaire. L'échantillon est ensuite mis en suspension dans une solution dispersante constituée d'hexa méta-phosphate de sodium qui est un sel neutre. Ce sel élimine tous les ions et maintient les colloïdes à l'état floculé. Après cette dispersion, la séparation des différentes particules peut se faire selon leurs diamètres, soit par sédimentation dans le cas des argiles et les limons fins selon la loi de Stokes à l'aide de pipette de Robinson, soit par siphonage pour les fractions sableuses.

Les limons grossiers sont déduits par différence entre la totalité de la terre fine (100%) et les proportions de l'argile, limons, fins de sables fins et grossiers. Le type de texture est déterminé en utilisant le diagramme textural selon le système international ATTERBEG (Mc Bride, 2002).

#### **II.2.1.2 Détermination du pH**

Pour déterminer le pH de notre sol, nous avons utilisé la méthode d'électrométrie. Cette méthode est basée sur la loi de Nernst (Lopes, 2008) qui consiste à mesurer à l'aide d'un pH-mètre dans des conditions bien déterminées, la différence de potentiel existant entre une électrode de mesure et une électrode de référence plongée dans une suspension de l'échantillon de sol à 40%.

#### **II.2.1.3 Conductivité électrique**

Dans une solution à 50% de l'échantillon on plonge l'électrode d'un conductimètre pour mesurer la conductibilité électrique qui correspond à la salinité totale contenue dans ce sol (Mc Bride, 2002). Cette salinité peut être exprimée de deux façons, soit par les sels solubles soit par le sodium échangeable. Les résultats sont donnés en micro Siemens ( $\mu\text{S}$ ).

#### **II.2.1.4 Dosage du calcaire total**

Le dosage du calcaire total est fondé sur la réaction caractéristique du carbonate de calcium au contact du HCl. A l'aide d'un calcimètre de Bernard on dose le calcaire ( $\text{CaCO}_2$ ) contenant dans chaque sol. Après avoir étalonné l'appareil avec 0.3g de  $\text{CaCO}_3$  en notant le volume dégagé. On procède à doser 2g de chaque échantillon, selon les résultats obtenus on peut les classer en sol normal ( $\leq 5\%$ ), faiblement calcaire (5-12.5), moyennement calcaire (12.5-20%) ou très calcaire ( $\geq 50$ ) (Boischot et Hébert, 1947).

## II.2.2 Analyses microbiologiques

### II.2.2.1 Isolement des bactéries

Il s'agit de libérer les bactéries contenues dans le sol en prélevant 1g du sol broyé et séché auquel on ajoute 9 ml d'eau distillée stérile. Une macération plus ou moins prolongée est nécessaire pour permettre la diffusion des bactéries dans le liquide. A partir de cette suspension mère on effectue des dilutions au dixième ( $10^{-1}$ ) au  $10^{-5}$  à partir desquelles un ensemencement sectoriel est effectué sur le milieu MG (annexe A.1) à l'aide d'une anse en platine. Trois répétitions sont effectuées pour chaque dilution. Ainsi, les répétitions augmentent la chance d'isoler un grand nombre de souches. Les boîtes sont mises en incubation à 28°C pendant une à deux semaines avant la lecture des résultats (Huang et *al.*, 1993).

### Caractères cultureux

L'étude des caractères cultureux consiste à observer les colonies qui poussent sur le milieu MG. Les colonies sélectionnées présentent les caractères cultureux d'*Agrobacterium* spp., ces colonies sont blanches, translucides à un diamètre de 2-5mm, elles sont convexes d'une surface lisse et d'un contour rond régulier (Moore et *al.*, 1988).

### II.2.2.2 Dénombrement des agrobactéries

Au terme de l'incubation, les bactéries contenues dans le sol seront développées, chaque bactérie sera à l'origine d'une colonie. Le comptage est effectué pour chaque boîte issue des différents prélèvements à l'aide d'un compteur des colonies.

### II.2.2.3 Purification

La pureté est considérée comme suffisamment assurée après trois purifications successives sur le milieu MG (Moore et *al.*, 1988). Les boîtes sont mises en incubation à 28°C pendant 48 à 72 heures. Les colonies qui ne rendent pas le milieu fluorescent (les colonies fluorescentes sont des *Pseudomonas* spp.), sont placées en agitation dans de l'eau stérile, puis transférées à nouveau sur le milieu MG jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Tous les isolats doivent être conservés dans des tubes en pente de MG gélosée à 4°C en vue d'une éventuelle utilisation. Ces isolats vont par la suite subir une série de tests pour la caractérisation.

### II.2.2.4 Caractérisation des souches isolées

Pour la caractérisation des souches isolées, nous avons procédé d'abord à la coloration de Gram selon Marchal et *al.*, (1988), puis aux testes d'appartenance au genre selon la méthode décrite par Moore et *al.*, (1988).

#### II.2.2.4.1 Coloration de Gram (Marchal et *al.*, 1988)

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les types de bactéries présentes dans un substrat.

Pour effectuer cet examen, (Gram+ ou Gram-), on doit tout d'abord préparer des frottis en étalant une goutte de la suspension bactérienne sur la lame, puis on fait fixer les structures cytologiques au-dessus de la flamme du bec Bunsen par plusieurs passages.

La coloration se fait en respectant les étapes suivantes :

1. Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet, se produit pendant 30 secondes à 1 minute. Puis rinçage à l'eau déminéralisée.
2. Mordançage au Lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : Le Lugol est étalé et laissé en action 20 secondes ; puis rinçage à l'eau déminéralisée.
3. Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone) : L'alcool est versé goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement, en surveillant la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration.  
A la fin de l'opération, un rinçage est pratiqué sous un filet d'eau déminéralisée.
4. Recoloration à la fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute. Puis lavage doucement à l'eau déminéralisée. Le séchage de la lame se fait sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes.
5. L'observation sous microscope optique a appareil photo numérique avec une goutte d'huile à immersion et à un objectif 100 (grossissement ×1000). Les bactéries à Gram<sup>-</sup> sont de couleur rose, tandis que les bactéries de couleur violet sont considérées comme bactéries à Gram<sup>+</sup>.

#### **II.2.2.4.2 Tests d'appartenance au genre *Agrobacterium***

Quatre tests sont décrits et souvent utilisés pour vérifier si les souches isolées appartiennent au genre *Agrobacterium* (Jordan et Allen, 1974).

#### **Hydrolyse du Tween 80 (Bien *et al.*, 1990) (annexe A.3)**

Le test consiste à ensemencer les souches en spot sur un milieu à base de Tween 80 afin de déterminer la présence d'estérase. L'hydrolyse du Tween 80 libère l'acide oléique de celui-ci et la réponse positive de l'activité se traduit par une opacification du milieu (formation d'un halo opaque au tour du spot) après 72 h d'incubation.

**Hydrolyse de l'amidon (Bien *et al.*, 1990) (annexe A.5)**

Le test consiste à ensemencer les souches en spot sur un milieu à base d'amidon. Après 48h d'incubation, le Lugol est versé sur la surface du milieu. L'hydrolyse de l'amidon peut être mise en évidence par la disparition de la couleur bleue, caractéristique de la réaction amidon-Lugol. Inversement, la zone des souches (amylase négative) se colore en bleu, indiquant que l'amidon n'a pas été dégradé.

**Hydrolyse de la gélatine (Gardan et Luisetti, 1981) (annexe A.4)**

Le test consiste à ensemencer les souches sur un milieu contenant de la gélatine en tubes. Après une semaine d'incubation, les tubes sont mis à 4°C pendant 30 mn. Le milieu devient liquide si la bactérie dégrade la gélatine. Cependant, l'absence de la gélatinase se met en évidence si le milieu reste solide.

**Hydrolyse de l'esculine (Vidaver et Davis, 1988) (annexe A.6)**

Le test consiste à ensemencer les souches dans des tubes inclinés qui contiennent un milieu gélosé à base d'esculine, en plus du témoin négatif. Les tubes sont placés à 2°C, si la réaction est positive le milieu vire au noir en 2h environ. Cependant, on laisse la réaction se produire pour la nuit pour donner le temps à toutes les souches de réagir. L'hydrolyse de l'esculine rompt la liaison glucosidique et libère du glucose et de l'esculétine qui donne une coloration noire (réponse positive) en présence de sels de fer.

## Chapitre III : résultats

### III.1 Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les sols des vignobles étudiés présentent des caractéristiques physico-chimiques assez voisines surtout en pH (7.36-7.87) et en conductibilité électrique (0.91-1.4  $\mu$ S). Cependant, ils ont révélé une différence plus ou moins importante dans la texture du sol et le taux de calcaire (tableau 03).

**Tableau 03** : Les caractéristiques physico-chimiques des sols

Région Paramètre	Birtouta	Ouamri	Baraki	Oued El Alleug	Saoula
pH	7.69	7.87	7.36	7.74	7.72
Calcaire total(%)	4.1	17.54	1.55	23.06	18.11
C.E ( $\mu$ S)	0.91	0.99	0.96	1.4	0.92
Granulométrie (%)					
Argile	3.16	4.03	2.9	17.1	0.76
Limons	53.93	83.38	33.69	69.7	63.55
Sables	42.91	12.53	63	13.2	35.69
Texture :	Limono sablo- argileux	Argilo- Limoneuse	Sablo- limoneux	Limono- argileux	Limono- sableux

### III.2 Analyse microbiologique

#### III.2.1 Dénombrement des agrobactéries au niveau de la rhizosphère

Après une analyse microbiologique des échantillons, la distribution des bactéries au niveau de la rhizosphère est très hétérogène. Nous avons constaté qu'il y a une variabilité au sein des échantillons. Ainsi, nous avons enregistré des taux faibles et des taux élevés (annexe B : tableau01).

L'étude des caractères culturels consiste à observer les colonies qui poussent sur le milieu MG. Ce milieu permet l'isolement et la numération des colonies d'*Agrobacterium* spp. Ces isolats présentent les caractères culturels suivants: colonies convexes non fluorescentes, blanchâtres, translucides et possèdent un contour lisse et régulier d'environ 2 mm de diamètre (Moore et al., 1988) (figure11). Ces isolats sont repartis dans les échantillons selon la provenance. Les résultats sont détaillés dans le tableau 04 :

**Tableau 04** : Répartition des isolats dans les sols étudiés.

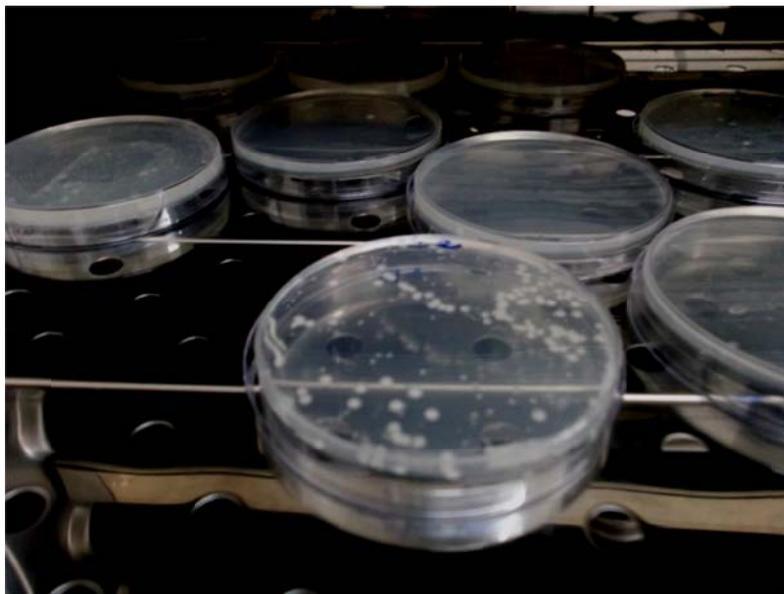
Provenance dilution	Birtouta	Baraki INRA	Oued El Alleug	Ouamri	Saoula
$10^{-1}$	141	186	209	133	177
$10^{-3}$	$5 \times 10^3$	$47 \times 10^3$	$82 \times 10^3$	$59 \times 10^3$	$7 \times 10^3$
$10^{-5}$	$4 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$52 \times 10^5$	$23 \times 10^5$	abs
Moyenne	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$8 \times 10^5$	$3 \times 10^3$

Les résultats sont donnés par CFU/g (Unités Formant une Colonie).

### III.2.2 Caractérisation des souches

Après les purifications sur milieu MG (trois purifications successives), les colonies fluorescentes sont éliminées après leur passage sous les rayons UV d'une lampe adaptée pour ce test. Ces colonies pourraient s'agir du groupe des *Pseudomonas* fluorescents.

Les colonies pures ont subi des tests d'appartenance au genre. Cependant, ces tests sont précédés par la coloration de Gram. On a choisi au hasard, cinq isolats de chaque sol selon l'appellation : B1, B2, B3, B4, B5, S1.....

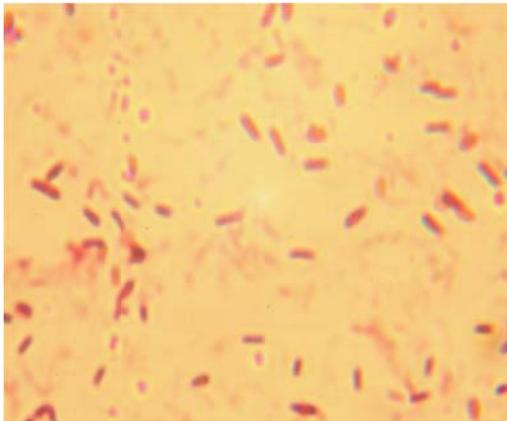


**Figure 11** : Colonies d'*Agrobacterium* spp. sur milieu MG

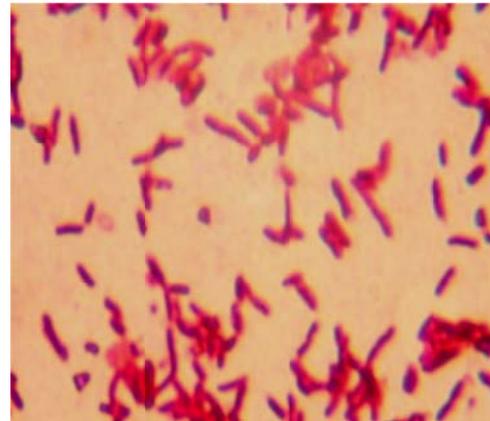
## 1. Coloration de Gram

### Description des cellules bactériennes

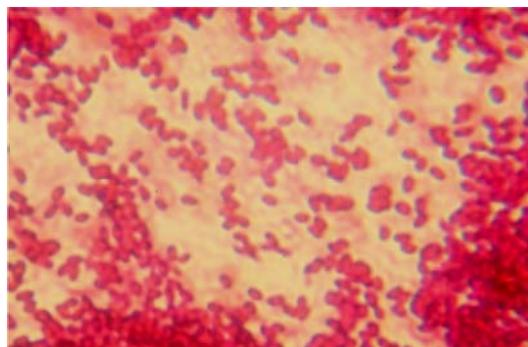
L'examen microscopique après la coloration de Gram nous a permis de décrire les caractéristiques des cellules bactériennes. Les cellules bactériennes du genre *Agrobacterium* ont la forme de bâtonnet, ne forment pas de spores et possèdent des flagelles péritriches et sont Gram négatives. Trois souches sont des cocci à Gram positif et six souches sont des cocci à Gram négatif et une souche est un bâtonnet à Gram positif. Ces souches ne présentent pas les caractéristiques d'*Agrobacterium* (tableau 03). Au total, quinze souches sont sélectionnées et ont subi des tests d'appartenance au genre.



**Figure 12** : Cellules bactériennes d'un isolat bâtonnet à Gram Négatif (GX1000)



**Figure 13** : Cellules bactériennes d'un isolat bâtonnet à Gram positif (Gx1000)



**Figure 14**: Cellules bactériennes d'un isolat cocci à Gram positif (GX1000)

---

## DISCUSSION

La rhizosphère constitue une zone de forte activité de la flore bactérienne, une population de  $10^6$  CFU/g de sol y est dénombrée, ces résultats se rapprochent de ceux enregistrés par Krimi et *al.* (2002). L'analyse des échantillons de sol provenant de différentes régions de la Mitidja et Médéa a révélé un taux élevé des agrobactéries dans le sol d'Oued El Alleug ( $2 \times 10^6$  CFU/g), et Ouamri ( $8 \times 10^5$  CFU/g), Ces valeurs sont très élevées, par rapport à celles enregistrées sur les autres sols ( $3 \times 10^3$  CFU/g pour le sol de Saoula) (tableau 03). Ils traduisent probablement des niches écologiques particulières où les microorganismes ont proliféré grâce à un ou plusieurs facteurs, tels que le traitement de sol et l'irrigation, l'humidité, le pH, la température, les interactions microbiennes et la nature du végétal et ses exsudats racinaires.

La multiplication bactérienne est favorisée par l'accumulation importante de réserves de nature glucidiques. Ces réserves glucidiques produites par la vigne jouent un rôle primordial dans la nutrition et la multiplication des agrobactéries (Bauer et *al.*, 1994). Ces réserves diffèrent d'un porte greffe à une autre et cela peut expliquer en partie, la différence considérable observée de la population agrobactérienne, entre les sols de différentes provenances et de portes greffes variés.

Il faut également signaler que les prélèvements sont effectués au printemps durant des périodes différentes et qui ont connu des temps pluvieux (le cas du sol d'Oued El Alleug et Baraki). Selon Dickey (1961), il existe une relation directe entre le nombre d'agrobactéries et l'humidité du sol. En effet, l'eau favorise la multiplication et la dispersion d'*Agrobacterium* dans le sol (Lynch et Ebben, 1986). Aussi, certains échantillons sont collectés à des températures relativement basses environ  $12^\circ\text{C}$  (Birtouta) (tableau 02). Selon Krimi et *al.* (2002), les basses températures diminuent aussi l'activité biologique d'*Agrobacterium*, contrairement au réchauffement printanier qui permet la reprise de l'activité des agrobactéries phytopathogènes.

---

La prédominance des *Pseudomonas* par certains sols notamment dans le sol de Saoula, peut expliquer en partie l'absence et la diminution de la population agrobactérienne. Cette prédominance des *Pseudomonas* pourrait expliquer leur taux de croissance rapide et leur aptitude à produire des pigments fluorescents capables d'inhiber d'autres espèces bactériennes notamment *Agrobacterium* (Khmel et al., 1998). Cette hypothèse pourrait expliquer le cas de l'échantillon de Saoula qui a révélé un taux élevé de colonies fluorescentes. En revanche, la valeur adaptative (fitness) chez les souches d'*Agrobacterium* spp. est acquise avec l'augmentation de la population agrobactérienne dans le sol, cette valeur s'exprime mieux au printemps par rapport à l'automne et l'hiver, ce qui les favorise comme habitants telluriques. Cela peut expliquer en partie, l'absence des isolats fluorescents dans le sol d'Oued El Alleug.

D'autre part, la présence de cette fitness est observée aussi bien dans la rhizosphère des plantes infectées que dans la rhizosphère des plantes non infectées, probablement en absence de la niche écologique favorisée par les opines. Des facteurs inconnus favorisent la survie des souches d'*Agrobacterium* dans la rhizosphère des plantes non infectées, ces facteurs peuvent être des opines secrétées par des plants à lésions asymptomatiques ou à des tumeurs cryptiques.

Il faut signaler que toutes les exploitations qui font l'objet de cette étude ne présentent aucun symptôme de crown gall, mais le taux des agrobactéries isolées dans certaines vignobles est très élevé ( $2 \times 10^6$  CFU/g).

Selon Krimi et al. (2002), l'augmentation de la population agrobactérienne correspond probablement à une augmentation de la quantité de nutriments secrétés dans le sol par les plantes, mais aussi à la particularité propres aux sols dits alors « conductifs ». Dans ces sols, les agrobactéries pathogènes ne sont détectables qu'au printemps et en été.

---

Les souches pathogènes peuvent être isolées seulement lorsque la densité de population d'*Agrobacterium* spp. est supérieure à  $10^5$  CFU/g dans la masse de sol et la rhizosphère (Krimi et *al.*, 2002). Ces bactéries pathogènes sont avantagées par rapport aux non pathogènes en période de croissance des plantes. Ce qui augmente la possibilité d'apparition de la maladie de crown gall chez les plantes en question (notamment dans les vignobles d'Oued El Alleug et Ouamri). On peut considérer ces sols comme des sols conductifs, lorsque la population totale revient à des niveaux moins élevés ( $10^3$ CFU/g) en automne et en hiver et qu'il n'est plus possible d'isoler des agrobactéries pathogènes (Krimi et *al.*, 2002).

Les facteurs édaphiques tels que le pH et la texture, affectent considérablement la densité de la population des micro-organismes associés aux plantes y compris les membres des *Rhizobiaceae* tels qu'*Agrobacterium* spp. (Naseby et Lynch, 1999).

Dans la présente étude, les sols supposés conductifs ne présentent pas une différence significative en pH, en calcaire totale et en conductibilité électrique par rapport aux sols supposés suppressifs (tableau 05). Cependant, le sol provenant de l'exploitation privée d'Oued El Alleug semble riche en sels minéraux et très calcaire (23.06%), ce qui permet de favoriser la croissance et la multiplication des microorganismes notamment les agrobactéries, car la présence de calcaire en forte quantité dans le sol permet d'augmenter le pH du sol et de neutraliser le milieu.

Selon Cook et Baker (1983), la survie d'*Agrobacterium* est favorisée par un pH neutre. Mais selon Bush et Pueppke (1991), les souches du biovar 3 ne représentent aucune activité motrice à un pH compris entre 7 et 8 et cela peut expliquer en partie l'absence des symptômes de crown gall dans les exploitations qui font l'objet de cette étude.

---

D'autre part, la texture des sols analysés est très diversifiée (tableau 03), le sol de la région d'Oued El Alleug contient un taux élevé d'argile (17%) ce qui explique la densité élevée des agrobactéries se développant dans ce sol, car l'argile permet l'adhérence des agrobactéries sur les particules de sol. Il a été montré que l'argile stimule la respiration bactérienne d'un large spectre d'espèces bactériennes (Stotzky et Rem, 1965). En effet, La kaolinite et la montmorillonite servent comme source de minéraux pour les bactéries telluriques (Stotzky et Rem, 1965). Il a été démontré que les fluctuations du pH sont atténuées dans le sol car les argiles comme les substances humiques jouent un rôle de tampon (Stotzky et Rem, 1965).

En outre, la texture limoneuse et le faible taux de sable mentionnés dans les sols supposés conductifs (Ouamri et Oued El Alleug) peut fournir à ces sols la capacité de retenir mieux l'eau par rapport aux sols suppressifs. Ce qui favorise la multiplication et la propagation des bactéries dans ces sols (Lynch et Ebben, 1986).

Le sol peut être une source mineure de survie pour l'inoculum, comparé au matériel végétal de multiplication qui héberge une forte population agrobactérienne (Burr et Katz, 1984). Le risque de voir apparaître la maladie est minime du fait que les souches d'*Agrobacterium vitis* sont rares dans le sol (Lopez Gonzales, 2007). Les agrobactéries non pathogènes sont prédominantes dans le sol et dans la rhizosphère des plantes malades (Almomani et Abussaud, 1991). Mais, il est probable que les souches du biovar1 peuvent devenir pathogènes en présence d'une population importante d'*Agrobacterium* spp. (supérieure à  $10^5$  CFU/g) en présence de la plante hôte (c'est le cas de la majorité des rhizosphères qui ont fait l'objet de l'étude). Ce qui nécessite un contrôle rigoureux du matériel destiné à la multiplication (portegreffes) avec des pratiques culturales soignées pour réduire le pourcentage de l'infection par le crown gall.

---

## Conclusion

Les isollements réalisés à partir des sols de vignobles provenant de la région de la Mitidja et Médéa (Nord d'Algérie), nous ont permis de mettre en évidence la présence d'une population agrobactérienne très importante dans certains sols et cela nous a permis d'avancer de les classer en sols conductifs et sols suppressifs (non conductifs).

Ces sols conductifs constituent une menace pour la culture vis à vis du crown gall. Ce qui nécessite un contrôle rigoureux du matériel destiné à la multiplication (portes greffes) avec des pratiques culturales soignées pour éviter les blessures et donc, réduire le pourcentage de l'infection par le crown gall. Ainsi, l'achat des plants à racines nues diminue le risque d'importer du sol contaminé. Les pratiques culturales comme un bon drainage de l'eau en surface et en profondeur doivent être aussi préconisées. La solarisation est une technique efficace pour diminuer la population d'*Agrobacterium* dans le sol en augmentant sa température (Szegedi et Süle, 2005).

Les analyses physico-chimiques des sols rhizosphériques en question ont montré que les sols étudiés présentent des paramètres physicochimiques assez voisins à l'exception de quelques paramètres qui semblent différents (la teneur en calcaire et la texture). Il semble qu'il existe quelques sols très calcaires (plus de 15%), cela nécessite un apport des fumures humifères pour atténuer un peu le pH du sol et favoriser ainsi la croissance des plantes et parallèlement diminuer les populations de bactéries phytopathogènes.

La population d'*Agrobacterium* dans le sol peut être sous l'influence de plusieurs facteurs à savoir, la température, l'humidité, le pH, la plante hôte (les exsudats racinaires) et les interactions entre les micro-organismes.

---

Ces facteurs jouent d'une manière considérable directement sur les variations de densités de population, et seule une étude particulière de chaque facteur pris séparément, permettrait d'en préciser le rôle.

La rhizosphère est un milieu favorable et un réservoir de micro-organismes dont la nature et le nombre dépendent des conditions offertes par cette rhizosphère. Par conséquent, l'environnement du sol peut jouer un rôle majeur dans la détermination de l'incidence et de la sévérité de la maladie du crown gall qui nécessite l'abondance d'un sol extrêmement infecté avec des plants sensibles et blessés.

Les études sur l'écologie des agrobactéries dans la rhizosphère et dans le sol ne sont pas faciles en raison de l'existence de plusieurs facteurs qui sont difficilement maîtrisables.

La compréhension de la dynamique de la population d'*Agrobacterium* spp. dans le sol et sa relation avec la vigne est essentielle pour le développement et la mise en place d'une stratégie de lutte contre le crown gall de la vigne.

D'autre part, l'utilisation des techniques moléculaires de détection par PCR ou RFLP peut permettre d'obtenir des informations précieuses sur l'évolution et la dynamique des populations d'*Agrobacterium* spp. dans le sol.

## Références bibliographiques

- **Abarca-Grau, A.M., Penyalver, R., Lopez, M.M., Marco-Noales, E. 2010.** Pathogenic and non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* and *A. vitis* strains form biofilms on abiotic as well as on root surfaces. *Plant Pathology*.60: 416–425.
- **Al Momani, F., Abussaud, M.1991.** Environmental effects bacterial count from grapevines nurseries in Jordan. *Pakistan. Journal of Agricultural Research*.12: 289-292.
- **Allardet-Servent, A., S. Michaux-Charachon, E. Jumars-Bilak, L. Karayan, M. Ramuz. 1993.** Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J. Bacteriol.* 175:7869-7874.
- **Anonyme, 2003.** D'après Weidner, M., Furelaud, G. La transgénèse grâce à *Agrobacterium tumefaciens*. [www.snv.jussieu.fr/vie/transgénèse/Agrobacterium/agro.htm](http://www.snv.jussieu.fr/vie/transgénèse/Agrobacterium/agro.htm).
- **Anonyme, 2011.** The Microbial World: Biology and Control of Crown Gall (*Agrobacterium tumefaciens*). <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/crown.htm>.
- **Anonyme, 2013.** Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre. *Agrobacterium tumefaciens* <http://fr.search.yahoo.com>
- **Argan, N., Momol, M.T., Maden, S., Momol, E.A., Reid, C. L., Gelet, H., Burr, T.J. 2002.** Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in central Antalya region. *Plant disease* 86:162-166.
- **Bauer, C., Schulz, T.F., Lorenz, D., Eichhorn, K. W., Plapp, R. 1994.** Population's dynamic of *Agrobacterium vitis* in two grapevine varieties during the vegetation period. *Vitis*.33: 25-29.
- **Bazzi, C., Piazza, C., Burr, T.J.1987** Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings. *EPPO Bulletin* 17: 105-112.
- **Beijerinck M.W. Van Delden A.1902.** Uber die assimilation des freien stickstoffs durch bakterien. *Zentralbi. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abdt. li*: 3-43.
- **Beijersbergen, A., Hooykaas, P.J.J. 1993.** The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. P. 37-49. *In*: Nester, E.W., & Verma, D.P.S. (ed.). *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.

- **Bensaada, A. 1992.** Le crown Gall dans les pépinières viticoles d'Algérie. Estimation de taux d'infection et caractérisation des populations locales d'*Agrobacterium vitis*. These de magister. institut national agronomique Alger. 93P.
- **Bessis, R., Fournioux, J.C., 1992.** Abscission zone and berry drop in grapevine. *Vitis* 31 : 9-21.
- **Bien, E., Lorenz D., Eichorn, K., Plapp, R., 1990.** Isolation and characterization of *Agrobacterium tumefaciens* from the German vin region Rheinpfalz. *Z Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 97: 313-322.
- **Bishop, A. L., Katz B.H., Burr T.J., 1988.** Infection of grapevines by soil borne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and non host rhizosphers. *Phytopathology* 78(7):945-948.
- **Boischot, P., Hébert, J. 1947.** Sur le dosage du calcaire actif des sols par la méthode à l'oxalate d'ammonium et son application au dosage du calcaire facilement assimilable des amendements. *Duond*. 9P.
- **Boss, P.K., Buckeridge, E.J., Poole, A., Thomas, M.R., 2003.** New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* 30 : 593-606.
- **Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A., Khemici, E. 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.
- **Bouzar, H., Jones, J.B. 2001.** *Agrobacterium larrymoorei* sp. Nov., a pathogen isolated from aerial tumors of *Ficus benjamina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1023-1026.
- **Bouzar, H., Moore, L.W. 1987.** Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tall grass prairie. *Appl Environm Microbiol.* 53: 717- 721 from other chromosomal groups by differential acid production. *Letters in Applied Microbiology*.
- **Braun, A.C. 1947.** Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *Am. J. Bot.* 34: 234-240.
- **Braun, A.C. 1952.** Conditioning of the host cell as a factor in the transformation process in crown gall. *Growth.* 16: 65-74.

- **Brisson, D., Turcotte, C., Bernier, D., Barriault, E., Dube, G., Laplante, G., Peloquin, J.F., Burr, T.J, Bazzi, C., Sule, S., Otten, L., 1998.** Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease* 82: 1288-1297.
- **Burr, T. J., Reid, C.L. 1994.** Biological control of grape crown gall with non-tumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. *Am. J. Enol. Vitic.* 45:213–219.
- **Burr, T. J., Reid, C.L. Yochimura, M., Momol, E.A., Bazzi, C., 1995.** Survival and tumorinicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. *Plant disease.*79: 677-682.
- **Burr, T.J, Otten. L. 1999.** Crown gall of grape vine: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathology* 37:9004.
- **Burr, T.J., Bazzi, C., Süle, S., Otten, L.1998.** Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease* 82: 1288-1297.
- **Burr, T.J., Katz, B. H. 1984.**Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Disease* 68: 976- 978.
- **Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L., Myers, C. A., Mittak, V.L. 1988.** Effect of shoot age and tip culture propagation of grapes on systemic infestations by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:67–70.
- **Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L.1987.** Populations of *Agrobacterium* in vineyard and non-vineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Disease* 71: 617-620.
- **Burr, T.J., Katz, B.I.1983.** Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine gall and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology* 73:163-165.
- **Burr, T.J., Ophel, K., Katz, B.H., Kerr, A. 1989.** Effect of hot water treatment on systemic *Agrobacterium* biovar 3 in dormant grape cuttings .*plant disease.*73: 242-245.
- **Burr, T.J., Reid, C. L., Splittstoesser, D.F.,Yoshimura,M.1996.** Effect of heat treatments on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis* in vitro and in dormant grape cuttings. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:119–123.

- **Bush, A.L., Pueppke, S.G. 1991.** A rapid and efficient new essay for determination of the three biotypes of *Agrobacterium tumefaciens*. Letters in applied Microbiology. 13:126-129.
- **Canfield, M. L., Moore, L.W. 1989.** Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* from apple rootstocks with crown gall disease: clement. 2ed Proceeding 7th int. conf. Plant Pathogenic Bacteria (pp 829- 833) Publishing House of the Hungarian Academy of sciences Buda best-Hungary.
- **Chen, F., Li. J.Y., Guo, .Y.B., Wang, .J.H., Wang. .H.M. 2007.** Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2. Plant Dis. 91:957–963.
- **Chen, F., Li. J.Y., Guo, .Y.B., Wang, .J.H., Wang. .H.M. 2009.** Biological control of grapevine crown gall: Purification and partial characterization of an antibacterial substance produced by *Rahnella aquatilis* strain HX2. Eur. J. Plant Pathol. 124:427–437.
- **Cook, J.R., Baker, K.F. 1983.** The nature and the practice of biological control of plant pathogens Saint Paul, MN: the American Phyto-pathological Society.
- **Cooksey, D. A., Moore, L.W. 1980.** Biological control of crown gall with fungal and bacterial antagonists. Phyto-pathology 70:506-509.
- **Curl, E. A., B. Truelove. 1986.** The rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- **Davies, C., Robinson, S.P.1996.** Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putatives acuolar invertase DNA and their expression in grapevine tissues. Plant Physiology 111: 275-283.
- **De Boer, S.H.1982.** Survival of phyto-pathogenic bacteria in soil; in phyto-pathogenic prokaryote I. Edition Academic press. London: 285- 305.
- **De Cleene M., 1985.** The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathologische Zeitschrift **113**: 81-89.
- **De Cleene, M., De Ley, J. 1976.** The host range of crown gall. Bot. Rev. 42:389-466.
- **Dickey, R.S. 1961.** Relation of some edaphiques factors to *Agrobacterium tumefaciens*. Phyto-pathology. 51: 607-614.
- **Dessaux. Y., Petit A., Tempé J.1992.** Opines in *Agrobacterium* biology, p.109-136. in D.P.S. Verma (ed.), Molecular Signals in plant-microbe communications. CRC Press Boca Raton, Florida. écologie microbienne de sol. Edition Masson, Paris. 796 P.

- **Dommergues, y ; Mangenot, F. 1970.** Ecology microbienne du sol. Edition Masson, Paris. 796 p.
- **Duthyl, J. 1973.** Eléments d'écologie et d'agronomie: exploitation et amélioration du milieu. Editioon J-B. Baillière, Paris. Tome 3. 656p.
- **Eastwell, K. C., Willis, L.G. Cavlieer, T. D. 1995.** Rapid and sensitive methods to detect *A. vitis* in Grapevine cutting using polymerase chain reaction. Plant disease. 79: 822-827.
- **Escobar, M.A., Dandekar, A.M. 2003.** *Agrobacterium tumefaciens* an Agent of disease. Trends Sin plant science 8: 380-385.
- **Farrand S.K., Van Berkum P.B. Oger P. (2003).** *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. I.J.S.E.M. 53: 1681-1687.
- **Filo, A., Sabatini, P., Sunin, W. G.,Zabadal,T.J.,Safe,G.R.,Cousins,P.S.2012.** Grapevine Crown Gall Suppression Using Biological Control and Genetic Engineering: A Review of Recent Research. American Journal of Ecology and Viticulture vol. 64 no. 1 1-14.
- **Fournier P., De Ruff-ray P., Otten L., 1994 -** Natural instability of *Agrobacterium vitis* Ti plasmid due to unusual duplication of a 23-kb DNA fragment. Mol. Plant-Microbe Interact. 7:164-172.
- **Garcia Martinez, J., Acina, S., Anton, A. I., Rodriguez-Valera, F. 1999.** use of 16S-23S ribosomal gene spacer region in studies of prokaryotic diversity. J. Microbiol Methods.
- **Gardan, L., and Luisetti, G.1981.** Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes. Station de pathologie. INRA .Angers 32P.
- **Genetello, C., Van Larebeke, N., Holsters, M., De Picker, A., Van Montagu, M., Schell, J. 1977.** Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* as conjugative plasmids. Nature (London) 265: 561-563. **Gerrath JM (1993).** Developmental morphology and anatomy of grape flowers. Horticultura review 13: 315-337.
- **Guyon P., Petit A., Tempé J., Dessaux Y.1993.** Transformed plants producing opines specifically promote growth of opine-degrading agrobacteria. Mol. Plant Microbe Interact. 6: 92-98.

- **Hildebrand E.M.1940.** Cane Gall of brambles causes by *Phytopomonas rubi* n. Sp. J. Agr. Res. 61: 685-696.
- **Huang, Y., Stoke, D.D., Diner, A.M., Barnes, W.M., and Karnosky, D.F. 1993.** Virulence of *Agrobacterium* on *Larix deciduas* and their cellular interactions as depicted by scanning electron microscopy. J. Exp. Bot. **44**: 1191-1201.
- **Huglin. P** (1986) Biologie et écologie de la vigne. Editions Payot Lausanne, Paris, France, 372 p.
- **Jäger, J., Lorenz, D., Plapp, R.,Eichhorn,. K.W.1990.** Untersuchung enzumlatenten Vorkom menvon *Agrobacterium tumefaciens* Biovar 3 in der Weinrebe (*Vitis vinifera*L.). Die Weinwissenschaft 45:14-20.
- **Jodi, E., Creasap, R., Burr, T.J. 2006.** Grape crown gall. Department of plant pathology. Cornell university NYSEAES. Geneva NY USA. 1. 2P.
- **Jordan, D.C., and Allen, O.N. 1974.** Family II Rhizobiaceae Conn 1938, in Buchanan and Gibbons (ed.), Berge's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. The Williams and Wilkins Co. , Baltimore, pp. 261-264.
- **Kado, C. I. 2002.** Crown gall tumors. Pages 1-3.in: Encyclopedia of Genetics. S. Brenner and J. H. Miller, eds. Academic Press, San Diego, CA.
- **Kawaguchi, A., Inoue,K.2009.**Grapevine crown gall caused by Rhizobium radiobacter (Ti) in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 75:205–212.
- **Keresters, K., De Ley, J.1984.** Genus III. Agrobacterium Conn 1942. In “Berge's manual of systematic bacteriology”. Krieg N.R. & Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins, Baltimore, USA. I: 244-254.
- **Khmel, I.A., Sorokina, T.A., Lemanova, N.B., Lipasova, V.A., Metlitski, O.Z., Burdeinaya, T.V., Charmin, L.S. 1998.**Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two Pseudomonas spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. Biocontrol Sci. Tech. 8:45
- **Kneuf, N. C., Yanofsky, H. F., Gordon, M.L., Nester, E.W. 1983** Genetic analyze of host rang expression by Agrobacterium molecular genetics of bacteria.Plant interaction.240-242.

- **Koblet W** (1969) Mouvement des assimilats dans les tiges de vigne et influence de la surface foliaire sur le rendement et la qualité des raisins. *Wein Wissenschaft* 819 : 277-319.
- **Krimi, Z., Benkacimi, A. 2009.** Detection of *Agrobacterium vitis* in Algerien grapevine propagation material Laboratoire de Phyto-bacteriologie, Département des Sciences Agronomiques, Université Saad Dahlab, Blida, 09000, Algeria. *Microbiol.* 68:3358-3365.
- **Krimi, Z., Petit. A., Mougel, C., Desseaux, Y., Nesme, X. 2002.** Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. In soil. *Appl Environ Microbiol* 68:3358-3365.
- **Krimi, Z., Raio, A., Petit, A., Nesme, X., Dessaux, Y. 2006.** *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European Journal of Plant Pathology.* Vol. 116: 237-246.
- **Krimi, Z; 2003** Relationship between Spatial and Genetic Distance in *Agrobacterium* spp. in 1 Cubic Centimeter of Soil *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3 1482-1487.
- **Lehozcky, J. 1978.** Root-system of the grapevine as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. In *Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria.* Station de Pathologie Végétale et Phyto-bactériologie. (ed.),pp. 239–243. Institut National de la Recherche Agronomique, Angers, Beau Couzé, France.
- **Lepoivre, P. 2003.** *Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte* P83-84. Editions De Boeck université. P428.
- **Levadoux. 1971.** Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue Romande d'Agricultures et d'Arboriculture* 8 : 4-6.
- **Lopes, L. 2008** .Méthode de la réaction prépondérante : proposition d'une approche quantitative systématisée. *Bulletin de l'union des physiciens*, vol. 102, no 904, Mai, p. 707-726.
- **Lynch, J.M., Ebben, M.H. 1986.** The use of micro-organisms to control plant disease. *Journal of Applied Bacteriology.* 1158-1268.
- **Mantis, N. J., Winans, S.C. 1993.** The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *E. coli phoB* mutation and is required for virulence. *J. Bacteriol.* **175**: 6626-6636.

- **Mathysse, A.G.2006.** The genus *Agrobacterium*. *Prokaryotes*5:91–114.
- **McBride, R.A. 2002.** Atterberg limits. *Methods of soil analysis. Part 4. Physical methods. SSSA Book Series no. 5. SSSA, Madison, WI. J.H. Dane and G.C. Topp (eds.). p. 519-527.*
- **Moore, L.W., Bouzar, H, Burr, T.J. 2001.***Agrobacterium. In* NW Schaad, JB Jones, W Chun, ed, *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phyto-pathological Society Press, St. Paul, Minnesota.*
- **Moore, L.W., Cooksey, D. A. 1981.** Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: plant interactions. *Internet Rev Cytol supp 13: 15-46.*
- **Moore, L.W., Kado, C., Bouzar, H. 1988.** Gram-negative bacteria. A. *Agrobacterium.* pp 16-36. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2ed. N.W. Schaad, ed. American Phyto-pathological Society, St. Paul, MN.*
- **Moore, L.W., Warren, G.1979.** *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Ann. Rev. Phytopathologie. 17:163–179.*
- **Moore, L.W.,1976.** Latent infection and seasonal variability of crown gall development in seeding of three *Prunus* species. *Phytopathology.66: 1097-1101.*
- **Moudoude, R., Issaad, N. 2006.** Caractérisation biochimique et pouvoir pathogène d'une population d'*Agrobacterium* spp. Isolée de bouture de la vigne. Mémoire d'ingénieur. université de Blida. 49P.
- **Mougel C., Cournoyer B. Nesme X.2001.** Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Appl. Environ. Microbiol. 67: 65-74.*
- **Mougel C., Thioulouse, J., Perrier G. Nesme X. 2002.** A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 573-586.*
- **Mougel, C. 2000.** Structure génétique des populations d'*Agrobacterium* spp.:Effet sélectif de la plante et implication dans la diffusion conjugative du plasmide Ti. Thèse. Université Claude Bernard, Lyon 1.
- **Naseby, D. C., J. M. Lynch. 1999.** Effects of *Pseudomonas fluorescens* F113 on ecological functions in the pea rhizosphere are dependent on pH. *Microb. Ecol. 37:248-256.*

- **Nesme X.** (2001). Integrated Control of Crown Gall in Mediterranean Countries (CGMED). Final Report. European Union Contract number: ERBIC18CT970198.
- **Nesme, X., Picard, C., Simonies, P. 1995.** Specific DNA sequences for detection of soil bacteria, p. 111-139. In J. T. Trevors and J. D. van Elsas (ed.), Nucleic acids in the environment. Methods and applications. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- **Ophel, K., Kerr, A. 1990.** *Agrobacterium vitis* - new species for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:236-241.
- **Otten, L., Burr, T.J., Szegedi, E. 2008.** *Agrobacterium*: A disease-causing bacterium. In *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. Tzfira, T., and V. Citovsky. (eds.), pp. 1–46. Springer, New York.
- **Otten, L., Crozet, P., Salomone, J., De Ruffray, P., Szegedi, E. 1995.** *Agrobacterium vitis* strain AB3 harbors two independent tartrate utilization systems, one of which is encoded by the Ti plasmid. Mol. Plant-microbe Interact 1: 138-146.
- **Otten, L., De Ruff ray, P., E. A. Momol, E.A., Momol, M.T., Burr, T.J. 1996.** Phylogenetic relationships between *Agrobacterium vitis* isolates and their Ti plasmids. Mol. Plant Microbe In. 9:782–786.
- **Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. 1982.** Chemical and microbiological properties, 2<sup>nd</sup> Edition Agronomy 9.Part. 2: 781 p.
- **Paulus, F., Huss, B., Bonnard, G., Ridé, M., Szegedi, E., Tempé, J., Petit, A., Otten, L. 1989.** Molecular systematic of biotype III Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Plant Microbe In. 2:64–74.
- **Petit, A., Tempe, J. 1978.** Isolation of *Agrobacterium* Ti-plasmid regulatory mutants. Mol. Gen. Genet. 167:147-155.
- **Pinkerton, J.N., Ivors, K.L., Miller, M.L., Moore, L.W. 2000.** Effect of soil solarization and cover crops on populations of selected soil borne plant pathogens in western Oregon. Plant Dis. 84:952–960.
- **Pionnât, S., Keller, H., Hériche, D., Bettachini, A., Dessaux, Y., Nesme, X., Poncet C. 1999.** Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated an

outspread of crown gall disease in Mediterranean countries. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4197-4206.

- **Planchon, J.E.**, 1887. Monographie des Ampélicées vraies. *Monographia Phanerogamerum* 5 :305-364.
- **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 1.179P.
- **Ream, W.** 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and inter-kingdom genetic exchange. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 583-618.
- **Rene, H., Esnault, R., Lance, C.** 2000. *Physiologie vegetal*. 6ème édition a l'abregie Paris. 2.226.
- **Reynier, A.** 2003. *Manuel de viticulture*, 9e édition. TEC & DOC, Paris, France, 554 p.
- **Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y., and Gardan, L.** 2000. Characterization of Plasmid-Borne and Chromosome-Encoded Traits of *Agrobacterium* Biovar 1, 2, and 3 Strains from France. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 :1818–1825.
- **Riker, A.J., Benfield, W.M., Wright, W.H., Keith, G.W. Sagan, H.E.**1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agr. Res.* 41: 507-540.
- **Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T.J., Collmer, A.** 1991. Polygalacturonase is a virulence factor *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Journal of bacteriology.* 173: 6547-6552.
- **Sabec-Paradiz, M., Skerlavaj, V.,** 2000. Crown gall of grapevine in Slovenia. *Zbornik Biotehniske fakultete univerze.* 75 : 27-33.
- **Salomone J.Y., Otten, L.,** 1999. Structure and function of a conserved DNA region coding for tartrate utilization in *Agrobacterium vitis*. *FEMS Microbiology Letters.*174: 333-337.
- **Salomone, J. Y., Szegedi, E., Cobanov, P., Otten, L.,** 1998. Tartrate utilization genes promote growth of *Agrobacterium* spp. On grapevine, *Mol Plant-Microbe Interact.* 11: 836-838.

- **Sawada H., Loki H., Oyaizu H. Matsumoto S.1993.** Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 694-702.
- **Schaad, N.W., J.B. Jones & W. Chun. 2001.** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3<sup>rd</sup> Ed. APS Press, St. Paul, MN. pp. 17-35.
- **Smith, E.F., Townsend, C.O.1907.** A plant-tumor of bacterial origin. Science (New York). 25: 671-673.
- **Stackebrandt E. Goebel B.M.1994.** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846-849
- **Stanier, R., Palleron, Y .Doudoroff, N.G. 1966.** The aerobic Pseudomonas : a taxonomic study. Journal of general microbiology. 43: 159-271.
- **Starr, M.P., Weiss, J.E.1943.** Growth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagine medium. Phytopathology. 33: 314-318.
- **Stotzky. Ram, L.T. 1965.** Influence of clay minerals on microorganisms. Montmorillonite and kaoulinite on bacteria Canadian journal of microbiology. 12 : 547- 563.
- **Stover, E. Swartz, H.J. ;burr.TJ. 1997.** Endophytie *Agrobacterium* in crown gall resistant and susceptible vitis genotypes *Vitis*. 36: 21-26.
- **Szegedi, E., Bottka, S., Mikulás, J., Otten, L., Süle, S. 2005.** Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. *Vitis*44:49–54.
- **Szegedi, E., Otten, L., Czako, M. 1992.** Diverse types of tartrate plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* biotype III strains. Mol. Plant-Microbe Interact.5:435-438.
- **Szegedi, E., Süle, S. Burr, T. J. 1999.** *Agrobacterium vitis* strain F2/5 contains tartrate and octopine utilization plasmids which do not encode functions for tumor inhibition on grapevine. J. Phytopathol. 147:665–669.
- **Tomlinson, A., D., Bronwyn, R. H., Day, T. W., Merritt, P.M. Fuqua, C., 2010.** *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succino-glycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. Microbiology. 156: 2670-2681.

- **Toua, D. 1990.** Le crown gall dans les vignobles de Médéa. Estimation de taux d'infection et caractérisation des souches d'*Agrobacterium*. Mémoire d'ingénieur. Université de Blida. 46P.
- **Tourte, Y. 2001.** Les OGM - La transgénèse chez Les Plantes. Dunod. 144p.
- **Vidaver, A.K., Davis, M.J. 1988.** Coryneform plant pathogens. *In*: Shaad, N. W. (ed) Laboratory guide for identification of pathogene bacteria. 2nd St paul, M. N: APS Press. 19-36.
- **Williams, A. 2006.** The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil*287:3–14.
- **Windels, P., De Buck, S., Depicker, A. 2008.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: patterns of T-DNA integration into the host genome. *In Agrobacterium: from Biology to Biotechnology*. Springer, New York, pp 442–483.
- **Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microb. Rev.* 51: 221-271.
- **Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen L., Wood G.E., Almeida Jr N.F., Woo L., Chen Y., Paulsen I.T., Eisen, J.A., Karp P.D., Bovee, Sr, D., Chapman P., Glendenning, J., Deatherage G., Gillet, W., Grant C., Kutuyavin T., Levy R., Li M.J., Mcclelland E., Palmieri A., Raymond, C., Rouse G., Saenphimmachak C., Wu Z., Romero P., Gordon D., Zhang S., Yoo, H., Tao Y., Biddle P., Jung M., Krespan W., Perry M., Gordon-Kamm B., Liao L., Kim S., Hendrick C., Zhao, Z.Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S.V., Tomb, J.F., Milton, P.G., Maynard, V.O., Nester, W.E. 2001.** The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*. 294: 2317-2323.
- **Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A. Sawada H.2001.** A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicol* De Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *IJSEM*. 51: 89-103.
- **Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H., 2001.** Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of *crown gall* disease in grapevines. Department of Plant Pathology, Washington State University – I.A.R.E.C, Prosser, WA 99350, USA. 2006.

- **Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada H.2003.** Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - a reply to Ferrand *et al.* (2003).IJSEM. 53: 1689-1695.
- **Zhu,J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Ferrand, S.K., Winans, S.C. 2000.** The bases of crown gall tumorigenesis. J. Bacteriol. 182:3885-3895.

## 1. Présentation générale de la vigne

### 1.1 Présentation botanique

La vigne est une Angiosperme dicotylédone qui appartient à la famille des vitacées, anciennement appelée Ampélidées (Planchon, 1887). Les plantes de cette famille sont des arbrisseaux grimpants, comme des lianes, à tige le plus souvent sarmenteuse mais parfois herbacée, possèdent des vrilles opposées aux feuilles. La famille des Vitacées comprend 19 genres dont le genre *Vitis* qui regroupe les vignes cultivées.

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le phylloxéra, puceron originaire de l'Est des Etats-Unis, a failli anéantir les vignobles européens. A fin de surmonter cette invasion phylloxérique, le greffage de la vigne a été mis en place en utilisant des porte-greffes issus de plants américains naturellement résistants au phylloxéra (Reynier, 2003). Cette technique a permis d'associer la qualité des cépages européens à la résistance des vignes américaines.

Le greffon est la partie supérieure du cep de vigne, est donc constitué d'un tronc qui se divise en bras portant des bois de taille longs ou courts, appelés sarments.

Le porte-greffe, ou partie inférieure, produit le système racinaire qui colonise le sol tout au long de sa vie.

### 1.2 Le cycle de développement de la vigne

Sous les climats tempérés, la vigne connaît chaque année différentes phases successives qui ont lieu dans un ordre constant et dont l'ensemble forme le cycle végétatif, et le cycle reproducteur de la vigne (Brisson et *al.*, 1998) (Figure01).

### 1.2.1 Le cycle végétatif

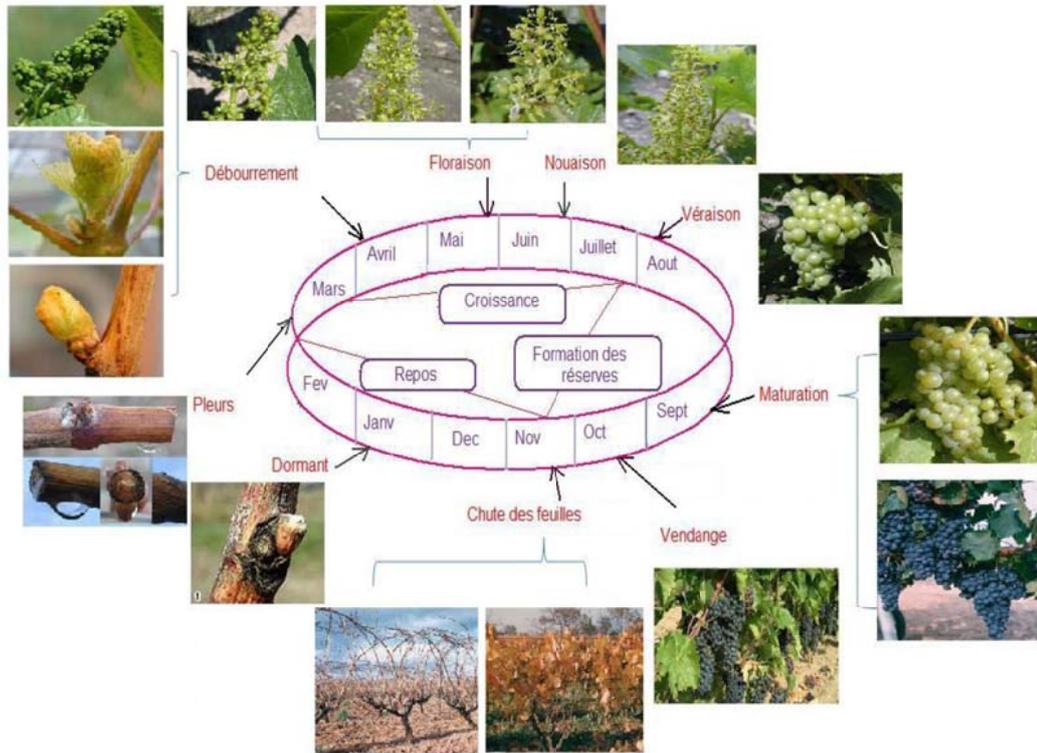
A la fin de l'hiver, lorsque la température du sol s'élève, le système racinaire rentre en activité (Huglin, 1986). Vers la mi-avril, les bourgeons commencent à gonfler en écartant les deux écailles protectrices faisant apparaître, la bourre. Cette première manifestation de la croissance est appelée débourrement. Puis l'extrémité verte de la jeune pousse devient visible et se poursuit par le développement des feuilles, leur activité photosynthétique devient excédentaire (Koblet, 1969). La formation des feuilles est suivie par l'évolution de l'appareil reproducteur.

L'aoûtement, débute lors de la maturation des baies. Les rameaux se lignifient et accumulent des réserves, en particulier sous forme d'amidon (Reynier, 2003). Au mois de novembre, c'est la sénescence des feuilles, elles jaunissent puis tombent. La plante rentre dans la phase de repos végétatif ou repos hivernal.

### 1.2.2 Le cycle reproducteur

La floraison débute vers la mi-juin et correspond à l'épanouissement de la fleur par l'ouverture de la corolle, appelée capuchon floral. Les capuchons se détachent progressivement de la base du réceptacle floral puis chutent (Gerrath, 1993 ; Boss et *al.*, 2003). La chute du capuchon met à nu l'ovaire et permet aux étamines de s'écarter du pistil et de libérer les graines de pollen.

La nouaison correspond au début du développement de l'ovaire fécondé. Un certain nombre de fleurs non pollinisées et d'ovaires fécondés tombent : c'est la coulure (Bessis et Fournioux, 1992). La véraison marque le début de la transformation des baies et donc de la maturation. Une fois que les baies ont atteint leur taille maximale et que leur concentration en glucides et leur acidité sont stabilisées, les baies sont à maturité et peuvent être vendangées.



**Figure 01** : Graphique du cycle végétatif de la vigne indiquant les périodes critiques approximatives et les phases les plus importantes (Hammoum et Derkaoui, 2010).

## 2. Genre *Agrobacterium* spp.

### 2.1 Généralités

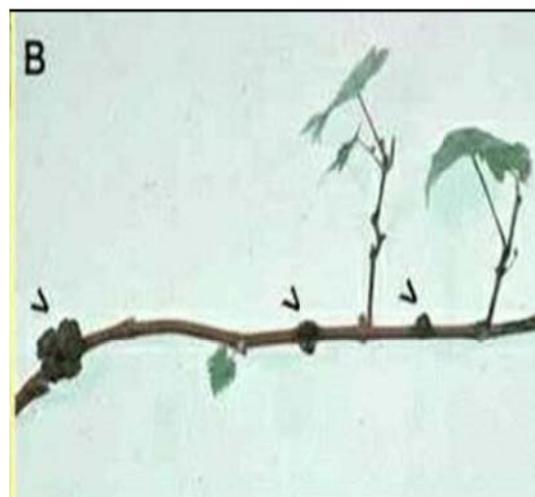
Les agrobactéries sont des habitants naturels du sol, elles vivent principalement dans la partie aérée du sol (Tourte, 2001). Les espèces phytopathogènes sont responsables de la maladie du crown gall ou tumeur du collet (figure 02). Plus de 634 espèces de plantes dicotylédones ou gymnospermes réparties dans 331 genres et 93 familles sont considérées comme sensibles à cette maladie (De Cleene et De Ley, 1976) dont 280 espèces différentes qui comprennent, la vigne, les fruitiers à noyaux, les espèces florales et les arbres fruitiers (Portier, 2004).



**Figure 02** : Tumeurs sur la vigne au point de greffage (Cabernet, 2003).



**Figure 03** : Tumeurs sur le tronc de la vigne (Kado, 2002).



**Figure 04** : Tumeurs sur les sarments de la vigne (Anonyme, 2011).

## 2.2 Caractéristiques de la bactérie

*Agrobacterium* spp. est un agent tellurique à Gram négatif, les cellules ont la forme de bâtonnets de  $0,6 - 1,0\mu\text{m} \times 1,5 - 3,0\mu\text{m}$ . Elles ne forment pas des spores et sont mobiles grâce à des flagelles (de 1 à 6). Elles sont aérobies strictes, oxydase positive (Moore et *al.*, 1988). La plupart des souches d'*Agrobacterium* sont capables de pousser sous une pression d'oxygène réduite ; ce qui est le cas dans les tissus végétaux (Pionnât et *al.*, 1999). Ces bactéries peuvent être isolées à partir du sol ou des tumeurs formées sur les différents organes des plantes (Burr et Kartz, 1983). La température optimale de croissance de ces bactéries se situe entre 25 et 28°C jusqu'à 30°C. Elles poussent facilement sur des milieux standards ou sélectifs. Les colonies sont de couleur blanche ou légèrement crème pour *Agrobacterium vitis* ou bien rose pâle pour *Agrobacterium tumefaciens*. Elles nécessitent 2 à 4 jours pour une croissance normale sur milieu complexe à métabolisme de glucose oxydatif (Mathysse, 2006).

Les agrobactéries sont identifiées par une absence de pigmentation sur les milieux King B et MG. Cependant, sur des milieux contenant des sucres elles produisent beaucoup d'exo-polysaccharides ce qui donne aux colonies un aspect volumineux et muqueux (figure 05). En effet, les colonies d'*Agrobacterium vitis* sont plus muqueuses que celles d'*Agrobacterium tumefaciens* (Argun et al., 2002). Elles produisent de la catalase et généralement aussi de l'uréase et de l'oxydase. Certaines souches regroupées dans le biovar 1 produisent aussi des 3-cétoglycosides (Portier, 2004).

Selon Mougel et al. (2001), l'addition de tellurite de potassium  $K_2TeO_3$  aux milieux, favorise le développement des agrobactéries et l'inhibition des autres bactéries, ce qui permet l'analyse directe du plasmide Ti à partir du sol même si la population d'*Agrobacterium* est faible.



**Figure 05** : Colonies d'*Agrobacterium* spp. sur milieu de culture.

(Schaad et al., 2001).

### 2.3 Taxonomie de la bactérie

Le genre *Agrobacterium* appartient à la classe des *Alpha Proteobacteria* et à la famille des *Rhizobiaceae* (Rene et al., 2000). Ce genre regroupe une douzaine d'espèces à Gram négatif (Paulus et al., 1989). En effet, selon Sawada et al. (1993), les agrobactéries dans le sens large, appartiennent aussi bien au genre *Rhizobium* qu'au genre *Agrobacterium*, mais Farrand et al. (2003), ont proposé la conservation de l'ancienne nomenclature du genre *Agrobacterium*. Ces bactéries telluriques sont considérées comme un habitant normal de certains sols (Bouzar et Moore, 1987).

#### Classification d'*Agrobacterium* spp.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Alpha Proteobacteria</i>
Ordre	<i>Rhizobiales</i>
Famille	<i>Rhizobiaceae</i>
Genre	<i>Agrobacterium</i> (Ophel et Kerr, 1990) <i>Rhizobium</i> (Young et al., 2001).

Plusieurs classifications ont été adoptées pour la taxonomie du genre *Agrobacterium* (Kneuf et al., 1983). Elles sont basées essentiellement sur les caractères phénotypiques, moléculaires et sur le pouvoir pathogène de la bactérie.

### 2.3.1 Classification phytopathologique

En se basant sur le pouvoir pathogène et la gamme d'hôtes, Keresters et De Ley (1984), ont estimé que ce type de classification est fondé sur des critères liés à un élément mobile, le plasmide pathogène (pTi ou pRi). Cette taxonomie est très discutée du fait qu'elle est basée sur des accessoires conjugatifs qui peuvent être acquis ou perdus. Ainsi, la perte ou l'acquisition d'un plasmide conduit à la reclassification de la souche dans une autre espèce (Paulus et *al.*, 1989).

La classification basée sur le pouvoir pathogène compte six espèces d'*Agrobacterium* (Escobar et Dandekar, 2003) :

*Agrobacterium tumefaciens* (De Cleene, 1985) agent de la galle du collet ou crown gall.

*Agrobacterium rhizogenes* (Riker et *al.*, 1930 ; Braun, 1952) agent des racines chevelues ou hairy root.

*Agrobacterium rubi* (Hildebrand, 1940 ; Starr et weiss, 1943) agent du 'cane gall' sur le genre *Rubus*.

*Agrobacterium vitis* (Ophel et Kerr, 1990) agent du crown gall de la vigne.

*Agrobacterium fici* (*Agrobacterium larrymoorei*) (Bouzar et Jones, 2001) agent du crown gall sur *Ficus benjamina* une espèce ligneuse ornementale.

*Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck et Van Delden, 1902) non pathogène.

### 2.3.3 Classification phénotypique

Basée sur des critères biochimiques et physiologiques à savoir l'utilisation de certaines sources de carbone, la dégradation d'acides et de bases organiques, la production d'acides, les profils protéiques, les profils d'acides gras,.....etc.

L'analyse phénotypique des souches d'*Agrobacterium* spp. permet leur classification en trois groupes distincts appelés biotypes ou biovars (Mougel et al., 2001).

Le biovar 1 : Comprend des souches 3-cétolactose positive, tumorigènes (*Agrobacterium tumefaciens*) et non pathogènes (*Agrobacterium radiobacter*) et quelques souches rhizogènes (*Agrobacterium rhizogenes*).

Le biovar 2 : Comprend des souches 3-cétolactose négatives tumorigènes (*Agrobacterium tumefaciens*), souches rhizogènes (*Agrobacterium rhizogenes*) et des souches virulentes d'*Agrobacterium radiobacter*.

Le biovar 3 : Regroupant les espèces d'*Agrobacterium vitis* et *Agrobacterium rubi* (Ophel et Kerr, 1990) ; comporte des souches isolées de la vigne et du genre *Rubus* présentant une gamme d'hôte très restreinte.

**Tableau 01:** Comparaison de l'ancienne et de la nouvelle nomenclature des espèces appartenant au genre *Agrobacterium* (Moore et al., 2001).

La nouvelle taxonomie	L'ancienne taxonomie
<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 1 <i>A. radiobacter</i> biovar 1 <i>A. rhizogenes</i> biovar 1
<i>A. Rhizogenes</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 2 <i>A. radiobacter</i> biovar 2 <i>A. rhizogenes</i> biovar 2
<i>A. vitis</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 3 <i>A. radiobacter</i> biovar 3
<i>A. rubi</i>	<i>A. rubi</i>

En effet, selon Mougel (2001) et Portier (2004), les plantes peuvent jouer un rôle dans la structure génétique des populations d'*Agrobacterium* associées aux plantes.

#### 2.3.4 Classification moléculaire

Cette classification est la plus adoptée en raison de la fiabilité des tests moléculaires tels que la PCR. Elle considère l'analyse de l'ADN génomique de la bactérie, les pourcentages d'homologie entre deux génomes, le pourcentage des bases puriques C+G par rapport A+T+C+G et l'analyse de l'opéron ribosomique du 16S et du 23S et l'espace intergénique entre eux *ITS* (*Intergenic Spacer*) (Mougel et al., 2001). Le gène *rrs* détermine l'ARN 16S de la petite sous-unité du ribosome chez les bactéries. Il est universel chez les procaryotes, et les organites des eucaryotes ; son séquençage permet de comparer rapidement de nombreux isolats entre eux.

---

En effet, le génome d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche de référence C58) a été totalement séquencé en 2001 (Wood et al., 2001). Il a été montré que le génome de cette bactérie est suffisamment variable pour apporter des informations taxonomiques et suffisamment conservé pour être facilement analysable (Woese, 1987). Il a été observé que les gènes *rrs* des souches d'une même espèce bactérienne présentent au moins 97% de similarité (Stackebrandt et Gobel, 1994). Ce type d'analyse s'est révélé très semblable pour classer les bactéries jusqu'au niveau du genre. Par contre, cette méthode n'est pas suffisamment résolutive pour classer les individus par espèces. Certaines espèces génomiques d'*Agrobacterium* partagent des gènes *rrs* identiques (Mougel et al., 2002). A l'inverse, certaines bactéries possèdent plusieurs gènes *rrs* qui ne sont pas identiques (Garcia Martinez et al., 1999).

## 2.4 Diversité des plasmides

### 2.4.1 Plasmide Ti

En étudiant les souches d'*Agrobacterium*, Braun (1947), a distingué des particules de grand poids moléculaire qui transportent l'information génétique. Ce plasmide est nommé le plasmide Ti ou pTi pour (*Tumor inducing*) chez *Agrobacterium tumefaciens* et plasmide Ri ou pRi pour (*root inducing*) chez *Agrobacterium rhizogenes* (Moore et al., 1979 ; Ream, 1989). Il constitue 5% du génome bactérien (Allardet-Servent et al., 1993).

Pour étudier les principaux types de plasmides d'*Agrobacterium*, les cartes de restriction, le clonage et le séquençage des fragments d'ADN sont maintenant disponibles (figure 06), il existe actuellement différents type de plasmides Ti à savoir :

- 
- Plasmide Ti de type *octopine / cucumopine* qui possède la région-TA importante. Le gène qui code pour la synthèse de la *cucumopine* est localisé sur l'ADN-T du plasmide *octopine / cucumopine* (Fournier et al., 1994).
  - Plasmide Ti de type *nopaline* qui est fortement conservé dans différentes souches d'*Agrobacterium vitis*, le gène *nopaline* synthétase (OCS) dirige la synthèse de la *nopaline* (Dessaux et al., 1992).
  - Plasmide Ti de type *vitopine* qui porte des gènes codant pour la synthèse de la *vitopine*, un dérivé de la Putrescine et de l'acéto-glutamate (Dessaux et al., 1992).

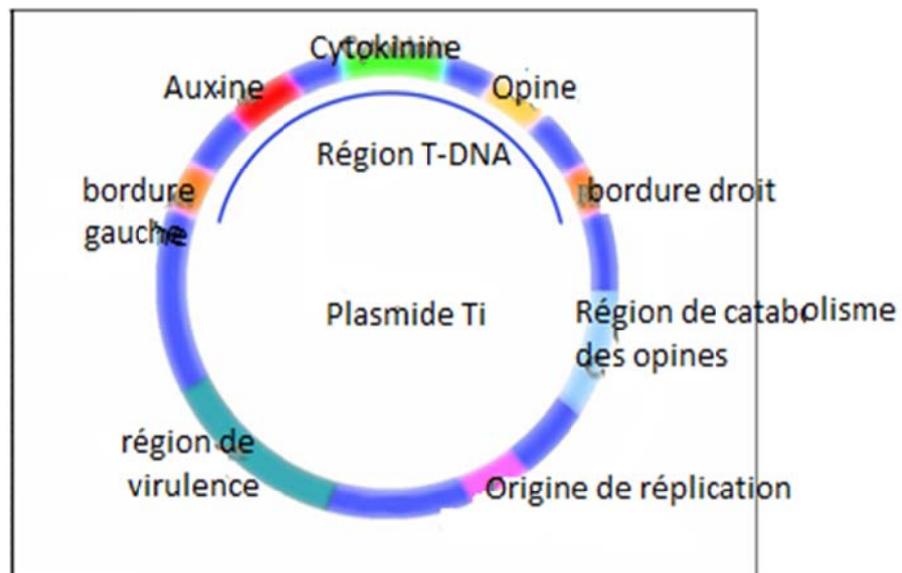
La maladie du crown gall de la vigne est généralement causée par les souches d'*Agrobacterium vitis* qui hébergent un plasmide *Ti* de type *octopine nopaline* ou *vitopine* (Ridé et al., 2000) et occasionnellement par *Agrobacterium tumefaciens* muni d'un plasmide *Ti* de type *octopine* ou *nopaline* (Kawaguchi et Inoue 2009).

Outre le plasmide *Ti*, *Agrobacterium vitis* contient un autre plasmide appelé le plasmide *tar* pour l'utilisation du tartrate (Otten et al., 1995).

### 2.5.2 Plasmide TAR

Le tartrate est un acide organique très abondant dans les organes de la vigne, l'utilisation du tartrate est un caractère commun aux souches du biovar 3 d'*Agrobacterium vitis* et du biovar 2 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Cependant, les souches de biovar 1 sont incapables d'utiliser l'acide tartrique comme seule source de carbone (Szegedi et al., 2005). Ce composé est utilisé d'une manière préférentielle par rapport au glucose chez les biovars 2 et 3 (Salomone et al., 1998) ; cette propriété est due à l'existence d'une enzyme spécifique qui permet la dégradation des tartrates.

Les gènes qui codent pour la synthèse de cette enzyme sont localisés sur la région *tar* portée par le plasmide TAR (Szegedi et al., 1992). Il existe trois régions d'utilisation d'acide tartrique : *TARI*, *TARII* et *TARIII*; selon la possession de ces régions il existe trois types de plasmides conjugatifs de tartrate, *pTr AB3* (245KBS), *pTi AB3* (234KBS) et le *pTr AB4* (170KBS) (Szegedi et al., 1999). Le plasmide *pTi AB3* est le seul plasmide qui porte simultanément les gènes oncogènes se trouvant dans le *pTi* et la région *tar* responsable de l'utilisation du tartrate qui joue un rôle dans la colonisation de la vigne (Salomone et al., 1998) et par conséquent une gamme d'hôte naturellement étroite (Salomone et Otten, 1999). Certains résultats montrent que l'utilisation du tartrate est seulement associée aux plasmides *Ti* de type *octopine / cucumopine* et non par d'autres types de plasmide *Ti* dans les isolats de la vigne d'*Agrobacterium tumefaciens* (Szegedi et al., 2005).



**Figure 06** : Principales régions du plasmide Ti

(Beijersbergen et Hooykaas, 1993).

## 2.5 Importance de la maladie du crown gall en Algérie

Les agrobactéries forment un genre bactérien capable de déclencher sur de nombreuses plantes un processus de multiplication cellulaire anarchique engendrant la formation de tumeurs (crown gall) ou des chevelus racinaires (hairy root) (Smith et Townsend, 1907). Le crown gall est considéré comme une maladie redoutable car il peut provoquer des pertes économiques très importantes dans les pépinières d'arbres fruitiers, les plantes ornementales telles que le rosier, le Ficus, le peuplier et le chrysanthème. Chez les arbres forestiers tels que l'eucalyptus, le taux d'infection dans les pépinières forestières peut atteindre plus de 95% (Krimi et *al.*, 2006).

Une étude est réalisée par Krimi et Benkacimi (2009), sur cinq cent boutures destinées au greffage de la vigne de 11 génotypes collectés de diverses provenances d'Algérie, révèle que ces scions sont porteurs de la maladie, et cela constitue un risque dans la dissémination de la maladie.

Selon Bouzar et *al.* (1991), la galle de collet sévit dans 99% des pépinières de production des plants fruitiers de l'Algérie, à l'exception du figuier et cognassier, toutes les espèces étudiées sont atteintes par la maladie. Les espèces les plus touchées sont : le pêcher (5.39%), l'amandier (3.43%), le cerisier (1.5%), le pommier (1.47%) et l'olivier (1.3%).

D'autre part, au sein d'une même espèce, les proportions de plants atteints de crown gall varient en fonction du porte greffe utilisé. Une grande partie des pépinières prospectées s'avère touchée par cette maladie dans l'étude réalisée par Bouzar et *al.* (1991). Les pertes estimées ne prennent pas en compte un tiers de la production des boutures vendues sans avoir été contrôlées.

---

En effet, certains producteurs font l'élagage des galles des troncs avant de les soumettre à un contrôle phytosanitaire. De telles pratiques peuvent nuire à la survie des jeunes arbres fruitiers après la plantation et promouvoir ainsi la propagation de la maladie par la contamination des vergers nouvellement plantés (Bouzar et *al.*, 1991).

Les pertes causées par cette bactérie sont considérables, les tumeurs du collet peuvent réduire la vigueur et la production après un ou deux ans, ce qui entraînerait à long terme la mort de la plante qui doit être arrachée (Jodi et *al.*, 2006). Pour cela la production des boutures indemnes de cette bactérie, soit à partir de culture *in vitro*, soit à partir des rameaux aériens a fait l'objet d'une étude particulière dans le cadre du projet européen INCO « *Integrated Control of crown gall in Mediterranean Countries* » impliquant la France, l'Espagne, l'Italie, le Maroc, l'Algérie, la Tunisie et la Jordanie (Nesme, 2001).

## **2.6 Facteurs affectant la survie d'*Agrobacterium***

### **2.6.1 Effet de la rhizosphère**

Le sol avec les racines constituent un écosystème dynamique très complexe. Les interactions entre les végétaux et les microorganismes telluriques se manifestent avec une intensité accrue dans la rhizosphère, qui est le volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes et qui se caractérise par la présence d'exsudats racinaires (Burr et Kartz, 1983). L'activité microbienne est particulièrement intense dans la rhizosphère qui constitue la surface ou se concentre une population microbienne spécifique quantitativement et qualitativement et différente de celle présente dans la masse de sol (Moore et Cooksy, 1981).

De nombreuses substances exsudées par les racines ont un effet stimulant ou inhibiteur sur la microflore. Ces effets sélectionnent ou sanctionnent une population microbienne relativement stable et spécifiquement associées à la rhizosphère de la plante concernée (Burr et *al.*, 1998). Parmi ces micro-organismes, on distingue les bactéries non sporulées à Gram négative tels que *Pseudomonas spp.* et *Agrobacterium spp.* qui sont les plus favorisées dans la rhizosphère (Davies, 1996). En effet, la présence des exsudats racinaires dans la rhizosphère, influe d'une manière significative sur la croissance des bactéries.

La multiplication des souches d'*Agrobacterium vitis* dans la rhizosphère de la vigne est favorisée par la production de l'acide L(+) tartrique qui est un acide organique très abondant dans les organes de la vigne (Otten et *al.*, 1996). Cet élément nutritif est un substrat sélectif de croissance dans la rhizosphère, la présence d'*Agrobacterium vitis* est abondante dans un environnement où la compétition microbienne est intense. Le métabolisme de cet acide par les agrobactéries contribue à la colonisation de la plante hôte par ce pathogène (Szegedi et *al.*, 2005).

Une étude a montré qu'au cours de la période de végétation, le nombre des agrobactéries est élevé mais diminue régulièrement pendant l'automne et l'hiver, ce qui dénote le rôle essentiel de la rhizosphère dans la régulation des populations (Krimi et *al.*, 2002).

Outre la relation plante-pathogène, les agrobactéries sont également impliquées dans des relations associatives commensales notamment dans les rhizosphères (Petit et Tempe, 1978).

Les agrobactéries sont capables de survivre dans le sol et garder leur pouvoir pathogène pendant une période de 23 semaines, mais elles vivent en association avec les racines et les cals de la vigne pour une période plus longue (Burr et *al.*, 1995).

---

### 2.6.2 Compétition entre microorganismes dans le sol et dans la rhizosphère

La population d'*Agrobacterium* est affectée par d'autres microorganismes du sol (De Boer, 1982). Dans la rhizosphère comme dans le sol, les sources nutritionnelles et énergétiques sont limitées de sorte qu'il apparait une compétition importante entre les microorganismes. En effet, certaines espèces de *Pseudomonas* possèdent la capacité d'utiliser d'une large gamme de substances pour la production d'énergie. Cette capacité compétitive des *Pseudomonas* spp. exercée sur la population agrobactérienne à une action inhibitrice sur cette population en chélatant le fer dispersé dans le sol (Khmel et al., 1998). Les activités antagonistes entre les microorganismes ne présentent pas les mêmes caractères et la même intensité dans la rhizosphère et dans le sol (Dommergues et Mangenot, 1970). La densité des microorganismes synthétisant des antibiotiques agissent sur la population d'*Agrobacterium* par la synthèse de bactériocines qui inhibent sa croissance.

Une étude est réalisée par Chen et al. (2007), sur les sols des vignobles de Chine montre que les souches HX2 de *Rahnella aquatilis* inhibent (même avec des concentrations minimales) les souches d'*Agrobacterium vitis* en produisant des antibiotiques qui ne provoquent pas la lyse des cellules bactériennes, mais ils ont un effet thermostable. Peu après, ces mêmes auteurs ont découvert que ces bactéries inhibent l'ARN et la synthèse des protéines (Chen et al., 2009).

### 2.6.3 Effet de l'environnement

Les conditions offertes dans le sol déterminent pour une large part la nature et le nombre des microorganismes (Page et *al.*, 1982). Il y a plusieurs facteurs environnementaux qui affectent la survie des agrobactéries dans leur habitat naturel.

#### 2.6.3.1 Facteur température

L'activité microbienne est déterminée par la température du sol. Cette température subit des variations journalières et ces variations sont beaucoup moins marquées en profondeur qu'à la surface du sol. Il est possible que ces variations n'entraînent pas des fluctuations importantes des densités bactériennes, tant que le sol reste dans une gamme de températures comprises entre 2° et 22°C (Dommergues et Mangenot, 1970). En effet, selon De Boer (1982), dans cet intervalle de température, c'est le facteur humidité qui prédomine. Il n'en est plus de même dans des conditions extrêmes, c'est-à-dire lorsque le sol est gelé ou lorsque sa température dépasse 25°C. Il a été montré que la température du sol est spécifique pour chaque espèce pour laquelle il existe un optimum de croissance et un intervalle entre un minimum et un maximum en dehors duquel sa croissance est impossible (Dommergues et Mangenot, 1970).

En effet, *Agrobacterium* croit à une température comprise entre 25° et 28°C (Keresters et De Ley, 1984). Une température de 30°C diminue progressivement leur viabilité (Al Momani et Abussaud, 1991). Cette sensibilité est un facteur très important dans la lutte contre la maladie du crown gall en utilisant la solarisation des sols (Otten et *al.*, 2008) et la thérapie des boutures en dormance (Burr et *al.*, 1989).

---

Concernant les biovars, selon Eastwell et *al.* (1995), les souches d'*Agrobacterium vitis* sont plus sensibles aux extrêmes de température que les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* appartenant aux biovar 1 et 2.

Les basses températures de l'hiver diminuent aussi l'activité biologique d'*Agrobacterium*, contrairement au réchauffement printanier qui permet la reprise de l'activité de celui-ci (Krimi et *al.*, 2002). Par ailleurs, il a été montré que les dégâts les plus importants sur le Rosier sont observés en serre, car les conditions environnementales et surtout la température sont très favorables au développement des agrobactéries pathogènes (Pionnât et *al.*, 1999).

### 2.6.3.2 Facteur pH

L'action du pH sur les microorganismes dépend de leur tolérance vis à vis de ce facteur. Pour le cas des bactéries se développant dans une large gamme de pH, leur croissance est satisfaisante à un pH compris entre 6 et 9 (Stanier et *al.*, 1966). En général, la survie d'*Agrobacterium* est favorisée par un pH neutre (Cook et Baker, 1983). Notons qu'à l'intérieur d'un même groupe de microorganismes, il peut y avoir des différences considérables suivant les espèces ou même les souches en ce qui concerne leurs exigences vis à vis du pH (Dommergues et Mangenot, 1970).

Cependant, le nombre de souches du biovar 1 augmente progressivement avec l'augmentation du pH par rapport aux souches du biovar 2 ; la croissance de ces dernières se situe à un pH compris entre 5 et 8. Les souches du biovar 3 ne représentent aucune activité motrice à un pH compris entre 7 et 8 (Bush et Pueppke, 1991). D'autre part, la plante blessée émet des signaux glucidiques, qui sont captés par une protéine codée par *chvI*. L'augmentation du pH du milieu est captée par *ChvE*, pour activer également les gènes de virulence (Mantais et Winans, 1993).

### 2.6.3.3 Facteur texture du sol

La texture limoneuse est caractérisée par une forte capacité de rétention d'eau ce qui favorise la multiplication et la propagation des bactéries (Lynch et Ebben, 1986). La matière organique joue un rôle important dans le développement des agrobactéries. La stimulation agrobactérienne entraîne la solubilisation du phosphore tout en augmentant la teneur du sol en phosphore assimilable (Duthyl, 1973).

Une fraction de ce substrat nutritif peut être utilisée par les bactéries (Dommergues et Mangenot, 1970). La mobilité du potassium dans le sol permet aux agrobactéries de concurrencer les plantes en utilisant pour leurs besoins, une partie de cet élément disponible (Duthyl, 1973). D'autre part, les fluctuations du pH sont atténuées dans le sol car les argiles comme les substances humiques jouent un rôle de tampon. La montmorillonite maintient le pH à un niveau favorable pour la croissance bactérienne. Cette argile stimule aussi la respiration bactérienne d'un large spectre d'espèces bactériennes (Stotzky et Rem, 1965). Aussi, elle protège les bactéries contre les effets destructeurs de la dessiccation, la température élevée et les rayons x. La kaolinite et la montmorillonite servent comme source de minéraux pour les bactéries telluriques (Stotzky et Rem, 1965).

### 2.6.3.4 Facteur eau

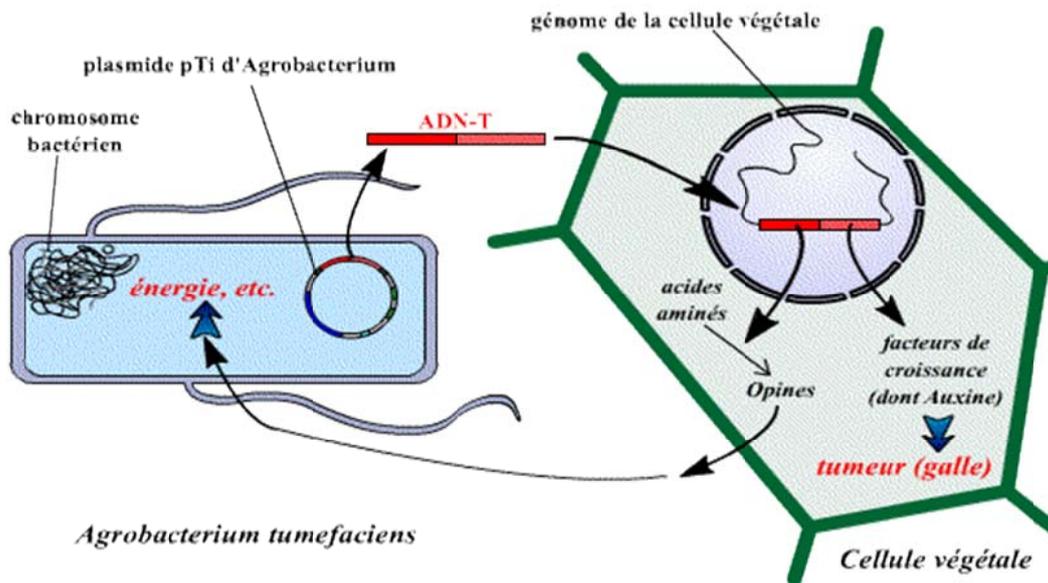
L'humidité est un des facteurs écologiques les plus puissants. La microflore tellurique est très sensible aux variations de l'humidité. Selon Curl et Truelove (1986), l'humidité du sol est un paramètre clé dans la composition de la microflore du sol. Des travaux ont montré qu'il existe une relation directe entre le nombre d'agrobactéries et l'humidité du sol (Deckey, 1961), et parallèlement, l'eau favorise la multiplication et la dispersion d'*Agrobacterium* dans le sol (Lynch et Ebben, 1986).

## 2.7 Processus d'infection

Les mécanismes de l'infection et de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* sont détaillés dans plusieurs articles de revues. Selon Zhu et *al.* (2000), le processus de transfert de gènes à partir d'*Agrobacterium* vers les cellules de la plante implique cinq étapes importantes (figure 07):

- 1) colonisation bactérienne
- 2) induction du système de virulence bactérien formation du complexe de transfert de l'ADN-T
- 3) Transfert de l'ADN-T par le système de sécrétion de type IV.
- 4) Intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante.
- 5) Expression de l'ADN-T.

La colonisation bactérienne débute par la perception et le mouvement des bactéries vers les cellules végétales. Cette première étape est suivie par l'adhérence des bactéries aux cellules formant un biofilm de bactéries à la surface du tissu végétal (Windels et *al.*, 2008).



**Figure 07 :** Une bactérie d'*Agrobacterium* transfère son fragment d'ADN (l'ADN-T) dans le génome de la plante (Anonyme 2003).

## 2.8 La survie d'*Agrobacterium* spp.

### 2.8.1 Dans le sol et la rhizosphère des vignes

Les agrobactéries forment un genre bactérien capable de déclencher sur de nombreuses plantes un processus de multiplication cellulaire anarchique. Ce sont des hôtes courants du sol et de la rhizosphère; certaines études montrent que cette bactérie peut être systémique et peut même induire des tumeurs aériennes (Lehozcky, 1978 ; Pionnât et *al.*, 1999). Cependant, l'environnement habituel de ces bactéries est le sol ou la rhizosphère (Burr et *al.*, 1998).

Par ailleurs, les agrobactéries telluriques ne sont généralement pas pathogènes mais peuvent le devenir après acquisition d'un plasmide Ti (Paulus et *al.*, 1989). La dissémination par conjugaison du plasmide Ti aux bactéries indigènes du sol (Genetello et *al.*, 1977) pourrait expliquer la persistance des agrobactéries pathogènes dans certains sols (Krimi et *al.*, 2003).

A travers la littérature, de nombreux auteurs soulignent la nécessité de développer l'étude de la dynamique de la population d'*Agrobacterium* et de la diversité des souches entre les espèces au sein de ce genre, dans la tumeur, dans le sol et dans la rhizosphère. Cette étude conduirait à la mise en place d'une stratégie de lutte efficace, mais qui doit passer par une bonne connaissance du cycle biologique du pathogène et une compréhension de l'épidémiologie de la maladie (Portier, 2004). Pionnât *et al.* (1999), ont montré la très grande diversité, au niveau des souches, des espèces et des genres, des agrobactéries impliquées dans une même épidémie. Cette diversité des agents pathogènes est une caractéristique très originale des épidémies de la galle du collet qui ne se rencontre pas dans d'autres modèles pathogènes végétaux ou animaux.

---

Krimi *et al.* (2002), ont étudié la survie d'*Agrobacterium spp.* pathogènes et non pathogènes dans des sols infectés après élimination des plantes. Cette étude a montré que dans un sol en jachère où ne poussent que des plantes sans symptômes, il est possible de détecter des agrobactéries pathogènes 16 ans après en avoir retiré les plantes infectées. Les agrobactéries pathogènes peuvent donc persister à long terme dans les sols.

Selon Abarca-grau *et al.* (2010), les souches d'*Agrobacterium* sont capables d'adhérer à des supports inertes et d'y former des biofilms, ce qui explique leur survie pendant de longues périodes, notamment dans le sol à la surface des particules de terre ou sur le matériel de culture. Leur potentiel d'adhésion varie en fonction des souches, de la surface colonisée et de l'environnement (Tomlinson *et al.*, 2010).

La rhizosphère offre une protection pour les agrobactéries dont le nombre est estimé à  $10^6$  bactéries par g des racines soit 100 à 1000 fois plus que la population retrouvée dans 1g de sol (Moore et Cooksy, 1981). Ainsi, les génotypes des agrobactéries associés au sol rhizosphérique et aux tissus racinaires, sont différents de ceux des sols nus (Mougel, 2000). Ces études ont montré le rôle prépondérant de la plante dans la structuration génétique des populations d'agrobactéries (Mougel, 2000; portier, 2004).

### **I.8.2 Dans les sarments de la vigne**

Dans les vignobles où le crown gall sévit, les densités des agrobactéries sont supérieures à  $10^4$  /g de sol (Moore et Cooksey, 1981). Chez la vigne, le contact entre les racines et le pathogène est permanent, la rhizosphère est l'habitat favori pour les agrobactéries, ces dernières colonisent les racines sans infection (figure 08) jusqu'à ce qu'il y ait une sécrétion importante de l'acéto-séringone suite à une blessure (Burr *et al.*, 1987). L'accroissement de la densité agrobactérienne est sous l'influence des excréments racinaires.

D'un point de vue écologique, la présence d'acide L(+) tartrique dans la rhizosphère des vignes favorise la multiplication des agrobactéries (Otten et *al.*, 1996). L'utilisation de L(+) tartrique est une caractéristique du biovar 2 et 3 d'*Agrobacterium* spp. Le métabolisme de cet acide par ces agrobactéries contribue à la colonisation de la plante hôte par ce pathogène (Szegedi et *al.*, 2005).



**Figure 08** : Colonisation d'une racine par les agrobactéries (Anonyme, 2013).

De plus, la présence de cette substance dans les tissus conducteurs des sarments de la vigne donne à ces deux biovars la particularité de survivre d'une manière systémique pendant la période de repos végétatif dans les tissus aériens de la vigne et dans le système racinaire (Burr et Reid, 1994). Cependant, peu après, Burr et *al.* (1999) ont isolé des souches d'*Agrobacterium vitis* à partir de *Vitis riparia* qui sont incapables de dégrader ce produit.

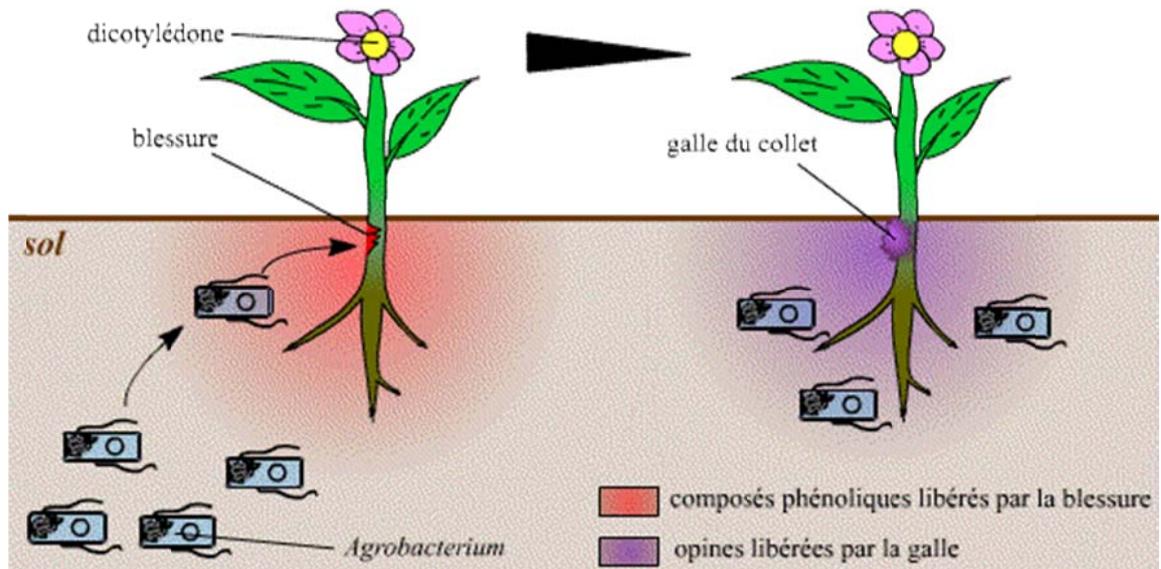
Ainsi, la nature systémique de la maladie du crown gall (Burr et *al.*, 1987) ; pose un problème phytosanitaire majeur en raison du fait qu'*Agrobacterium vitis* peut coloniser les vaisseaux des plants de vigne ce qui engendre une dissémination du pathogène *via* le matériel végétal de propagation (Krimi et Benkacimi, 2009 ; Filo et *al.*, 2012).

L'étude épidémiologique de crown gall de la vigne indique la propagation végétative des boutures infectées comme la majorité des disséminations d'*Agrobacterium vitis* (Bazzi et *al.*, 1987). En effet, les principales sources de contamination dans ces lieux privilégiés sont les sols infectés, les plantes malades et les plantes porteuses saines (Jäger et *al.*, 1990).

D'autre part, après l'infection de la plante par les agrobactéries, il se produit une insertion du T-DNA dans l'ADN du noyau de la cellule végétale. L'expression des gènes portés par le TDNA se traduit par la surproduction d'hormones de croissance et la sécrétion d'opines ; ces dernières ne sont dégradées que par les bactéries inductrice de tumeur qui les utilisent pour leur propre croissance et leur multiplication comme source de carbone, d'azote et d'énergie (Rene et *al.*, 2000 ; Sabec-Paradiz et Skerlavaj, 2000).

Les opines favorisent le transfert conjugatif du plasmide Ti. Donc, sur les tumeurs, les agrobactéries majoritaires sont celles qui portent le plasmide Ti qui a permis l'induction de la tumeur. Donc, en présence d'opines, les bactéries pathogènes sont favorisées. Par contre, en absence de la tumeur et donc d'opines, les agrobactéries non-pathogènes vont être avantagées et la population pathogènes va décliner (Guyon et *al.*, 1993).

Selon Ridé et *al.* (2000) la présence de ces molécules opiniques dans les tissus tumoraux constitue une niche écologique favorisant le développement d'agrobactéries pathogènes entourant la rhizosphère (figure 09).



**Figure 09 :** Infection de la plante par *Agrobacterium* induit le développement d'une galle (Les échelles ne sont pas respectées) (Anonyme, 2003).

### 2.8.3 Dans les débris de la vigne et les mauvaises herbes

La population agrobactérienne tellurique peut devenir une source d'inoculum non négligeable dans les épidémies en particulier lorsque la population initiale pathogène est fortement représentée et en présence continue d'une culture de vigne (Nesme, 1995). Cependant, plusieurs bactéries phytopathogènes peuvent probablement survivre dans les débris de racines de la vigne (Burr et *al.*, 1995 ; Filo et *al.*, 2012).

Généralement, ces débris influent considérablement sur la survie des bactéries pathogènes et non pathogènes. Ils servent comme base nutritive pour ces bactéries, leur longévité dépend de persistance de ces débris dans le sol (De Boer, 1982).

Dans ce cas, *Agrobacterium* persiste sous la forme saprophyte et peut survivre dans les débris au moins deux ans après l'arrachage des plants (Burr et al., 1995) et cela constitue un véritable réservoir d'inoculum (Deckey, 1961). La diminution du temps de survie est obtenue en accélérant la décomposition des organes présents au sol par arrosage ou fumigation (Pinkerton et al. 2000). Les résidus de la vigne analysés ne portaient pas des tumeurs et toutes les souches isolées ont gardé leur pouvoir pathogène ainsi que leur plasmide Ti. D'autre part, les souches d'*Agrobacterium vitis* ont été signalées sur les racines de plusieurs espèces de mauvaises herbes (Burr et al., 1995).

Une autre étude où la vigne et l'avoine ont fait l'objet d'une plantation dans les sols infectés d'*Agrobacterium vitis*, la bactérie s'est maintenue dans la vigne avec des densités de population plus importantes que celles obtenues dans la rhizosphère de l'avoine (Bishop et al., 1988). Chez l'avoine (*Avena sterilis*) la bactérie s'est maintenue à de faibles niveaux de façon indépendante à la surface des racines pendant environ 10 semaines. Il semble que les racines d'*Avena sterilis* fournissent à cette bactérie un habitat favorable à sa survie (Bishop et al., 1988).

Outre les débris et l'avoine, des études montrent qu'*Agrobacterium* spp. persiste dans les espèces de vigne sauvage (Burr et al., 1999). Le pathogène est détecté dans des échantillons de racines de vigne sauvage et toutes les souches sont affiliées à *Agrobacterium vitis*, dans ce cas ils s'avèrent non tumorigènes avec un ratio de 1 pathogène contre 28 non pathogènes (Moore et Coosky, 1981).

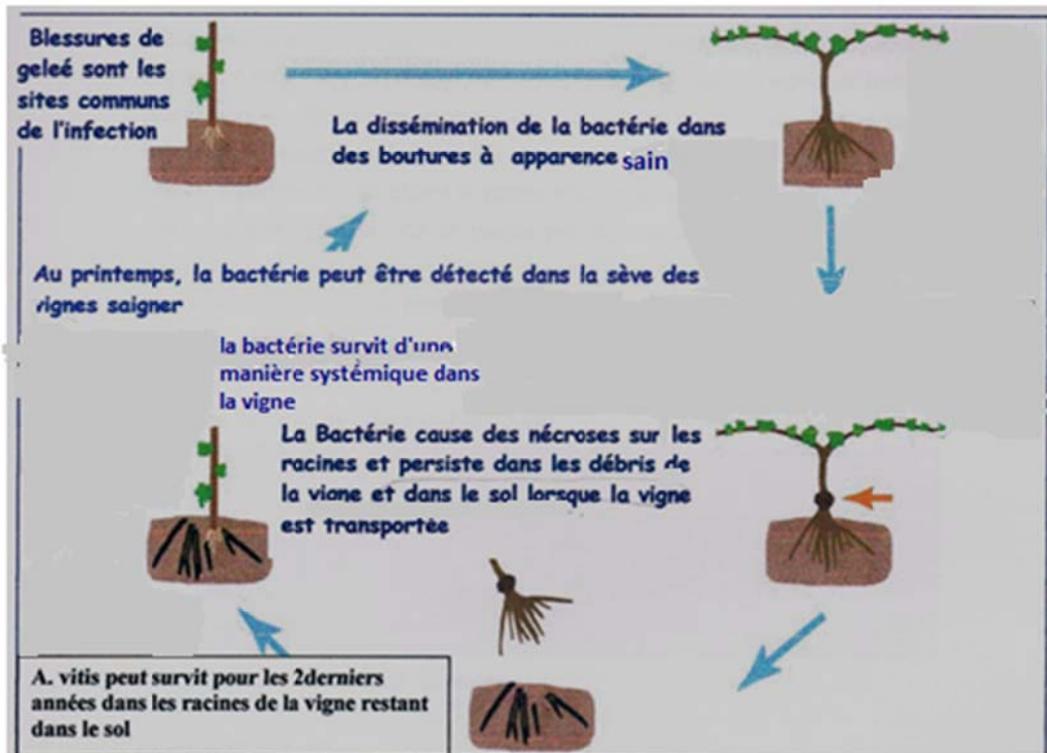


Figure 10 : Cycle écologique d'*Agrobacterium vitis*

(Moudoude et Issaad, 2006).

D'autres espèces de vigne sauvage peuvent héberger les souches d'*Agrobacterium vitis*. La bactérie a été isolée à partir de plants de *Vitis riparia* et semble bien adaptée à la survie sur ceux-ci (Burr et al., 1995). La plupart des hybrides issus des croisements ayant comme l'un des parents *Vitis riparia*, sont très résistants au crown gall (Stover et al., 1997). L'inoculum nécessaire à l'infection peut provenir de deux sources, soit des plants et des boutures ou du sol. Ce qui implique une attention particulière quant à l'état sanitaire du vignoble, des boutures et des pratiques culturales requises pour prévenir les infections par *Agrobacterium* spp.

## 2.9 Fluctuations saisonnières

En 2002, Krimi et *al.* ont observé des fluctuations saisonnières des populations d'*Agrobacterium* spp. Dans certains sols, la population totale des agrobactéries augmente au printemps et en été ( $10^6$  CFU/g). Cette augmentation de la population correspond probablement à une augmentation de la quantité de nutriments relégués dans le sol par les plantes, mais aussi de particularités propres aux sols dits alors «conductifs». Dans ces sols, les agrobactéries pathogènes ne sont détectables qu'au printemps et en été. Lorsque la population totale revient à des niveaux moins élevés ( $10^3$  CFU/g), en automne et en hiver, il n'est plus possible d'isoler des agrobactéries pathogènes. Cette étude suggère que les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. sont avantagées par rapport aux non pathogènes en période de croissance des plantes (Krimi et *al.*, 2002).

Aux Etats Unis, les analyses du sol de certains vignobles montrent des niveaux de population d'*Agrobacterium vitis* faible voire même indétectables (Burr et *al.*, 1987).

*Agrobacterium vitis* n'est détecté que dans la rhizosphère des plantes malades (Bien et *al.*, 1990 ; Jager et *al.*, 1990) et rarement dans les sols (Bouzar et Moore, 1987). Or, selon Lopez Gonzales et *al.* (2007) *Agrobacterium vitis* ne se retrouverait que dans les plants de vigne. Les agrobactéries pathogènes se manifestent dans le sol lorsque les tumeurs sont complètement lavées par les eaux de pluie et que le pathogène passe dans le sol (Burr et Katz, 1983).