

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Blida 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biotechnologie

Mémoire fin d'étude en, vue de l'obtention Du Diplôme Master

Option : Biologie des interactions plantes microorganismes

Thème

**L'induction de la résistance par *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1
chez le pathosystèmes : Tomate/*Agrobacteriumtumefaciens***

Présenté par :MIRAD Hadjer

BENTOUIL Ouissam

Devant le jury composé de :

KRIMI Z.	Professeur	U.S.D.B	Présidente
TAFIFET L. MAB		Univ. Bouira	Promotrice
Benoussaid N.	MAA	U.S.D.B	examinatrice
Djellout H.	Doctorante	U.S.D.B	Invitée

Année universitaire 2015-2016

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier Humblement **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la volonté pour bien mener notre travail.*

*Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de la phytobactériologie du département d'agronomie, de l'université Saad Dahlab de Blida, sous la direction de Madame **Krimi**. Que nous tenons à la remercier, pour son soutien et sa vision pragmatique des problèmes. En de nombreuses occasions, son recul et sa vision d'ensemble du monde des bactéries se sont avérés essentiels, pour trouver des Solutions et mener à terme notre projet de fin d'études*

*On remercie vivement Professeur **KRIMI Z**, Mme **TAFIFET L**, Mme **BENOUSSAID**, Mme **DJELLOUT H** pour avoir accepté d'examiner notre travail
Et pour l'honneur qu'ils nous ont fait pour leur participation au jury.*

*Une mention spéciale à notre promotrice Mme **Tafifet** pour son aide précieuse et Sa patience. Nous permettant ainsi d'effectuer ces travaux de recherches dans de meilleures conditions.*

*Un très grand merci à l'ingénieure du laboratoire **Selma** qui a su être présente par son soutien morale et physique dans tous les moments, mauvais soit ils ou bons, ses conseils et ses aides nous ont été d'une très grande importance lors de notre parcours.*

*On remercie aussi madame **Djellout** pour nous avoir fait profiter de son expérience bienveillante qui nous a permis de surmonter toutes les difficultés.*

*On salue également **Amohassan** et toute la promotion 5^{ème} année biologie des interactions plantes microorganismes, spécialement **Rachida** et **Bouchra**. On remercie également tous ceux qui nous ont accompagné et soutenu, dans cette grande expérience de la vie que constitue une thèse.*

Nos frères et sœurs on vous remercie pour le soutien moral et l'encouragement que vous nous Avez accordés, on vous souhaite tout le bonheur que vous méritez et un avenir brillant.

Et pour finir un grand merci à nos parents auxquels on doit notre réussite. Qu'ils trouvent dans ce travail, le témoignage de notre reconnaissance, de notre respect et de notre affection

*pour tous les sacrifices, l'extrême amour et le soutien qu'ils nous ont apportés pour nous voir
réussir.*

DEDICACES

Je dédie cette thèse à ...

*Ma très chère **maman**, Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*Mon très cher **papa**, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*Mon cher fiancé **Billel**, Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.*

*Mon cher petit frère **Mohamed** Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux, Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.*

Mes grands-parents maternels et ma grand-mère paternelle que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

*Tous les membres de **ma famille** petits et grands ainsi que **ma belle-famille**.*

Mes tantes, mes oncles mes cousins et cousines. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

*Mes chères meilleures amies, **Sarah, hadjar, Selma et Imen**. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs des moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail.*

Ouissam

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

*A mon cher grand père « **Djedo** » mon héros, l'homme qui est près de moi durant les 18 années d'études.*

Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant. Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.

Veillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.

*A ma chère grande mère « **mama lila** » ma source de tendresse, tes conseils ont toujours guidés mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter je t'aime ma grande mère.*

*A ma chère **maman** Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.*

*A mon cher **père** que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout maux.*

*A mes sœurs **Mounia** et **Manel** et mes frères **zaki** et **oussama***

*A ma copine de ma vie **imene** (tomatichti) qui a été toujours là pour moi en tant que sœur. Il n'y a pas assez de place pour exprimer ce que je ressens pour toi.*

A ma grande famille :

Mes tantes, mes oncles ainsi que mes cousins et cousines.

*A un ami spécial **Peter Ragaey** qui a été près de moi depuis le début.*

*A **Tata Zina** je vous remercie d'être près de moi toujours en tant que mère*

*A mes vraies copines **Selma**, **Sarah** et **Wissem** surtout les **ISSH***

*A mes cousines **ihsen** et **sarah***

Hadjer

L'induction de la résistance par *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 chez le pathosystème : Tomate/*Agrobacterium tumefaciens*

Résumé

Ce travail a pour objectif d'étudier le pouvoir antagoniste *in vivo* de la bactérie endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 envers trois souches tumorigènes C58, E2X et E6 de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*.

Le test d'antagonisme *in planta* a été effectué sur des plantules de tomate (*Lycopersicon esculutum*) variété hybride 67703 F1 au stade deux à trois vraies feuilles.

Les résultats obtenus ont montré une diminution du développement des symptômes de la maladie du crown gall sur les plantules de tomate trempées préalablement dans une suspension bactérienne de l'endophyte et inoculées par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* comparés aux témoins positifs qui correspondent aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches *Agrobacterium tumefaciens* et aux témoins négatifs trempés dans l'eau distillée stérile.

Le délai attribué aux souches endophytes (24h) a donné un meilleur contrôle de la galle du collet. La souche PS1 a montré un effet protecteur remarquable dont la taille des tumeurs des plantules de tomate trempées dans les suspensions des bactéries antagonistes ne dépasse pas en moyenne les 3.5 mm de diamètre par contre les plantules inoculées directement par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* présentent des tumeurs qui dépassent les 7 mm de diamètre .

La production d'antibiotiques et la capacité des *Pseudomonas spp.* à induire une résistance systémique chez la plante pourraient jouer un rôle important dans la suppression de la maladie du crown gall.

Ces résultats sont très intéressants et suggèrent l'utilisation de cette souche endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 comme agent de lutte biologique contre les maladies phytopathogènes et dans le biocontrôle de la santé des plantes.

Mots clés : antagoniste, endophyte, *Pseudomonas brassicacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, galle du collet, biocontrôle.

تحريض المقاومة عن طريق *Pseudomonas brassicacearum* سلالة PS1 في pathosystème الطماطم /*Agrobacterium tumefaciens*

ملخص

هذا العمل يهدف الى دراسة القدرة المعادية في النبات لبكتيريا *Pseudomonas brassicacearum* سلالة PS1 نحو ثلاث سلالات *Agrobacterium tumefaciens* سلالة E6 E2X , C58 المسببة لمرض التدرن التاجي. اختبار القدرة المعادية في النبات تم تحقيقه على شتلات الطماطم وهي عبارة عن تشكيله مختلطة و تم اختيارها في مرحلة ورقتين إلى ثلاث أوراق حقيقية. النتائج المحصل عليها أظهرت انخفاض في أعراض التدرن التاجي على شتلات الطماطم المغموسة في معلق البكتيريا الداخلية مقارنة مع الشواهد الايجابية الممثلة في الشتلات المغموسة في الماء المقطر المعقم. المهلة الممنوحة للسلالة الداخلية 24 ساعة قد أعطت تحكم أفضل في التدرن التاجي, حيث أن السلالة الداخلية بينت تأثير وقائي ملحوظ, إذ أن قطر الأورام المتشكلة على شتلات الطماطم المغموسة مسبقا في معلق البكتيريا الداخلية لا يتعدى 3.5 مم مقارنة مع شتلات الطماطم المطعمة مباشرة بسلالات *Agrobacterium tumefaciens* حيث أن هذه الأخيرة أظهرت أورام بقطر يتعدى 7 مم. إنتاج المضادات الحيوية و قدرة أصناف *Pseudomonas brassicacearum* على تحريض المقاومة الشاملة عند النباتات قد تلعب دورا مهما في إزالة مرض التدرن التاجي. هذه النتائج مثيرة للاهتمام و أثبتت استعمال هذه السلالات الداخلية في التحكم البيولوجي ضد أمراض النباتات و أيضا في مكافحة البيولوجية لصحة النباتات

الكلمات المفتاحية *Pseudomonas brassicacearum* التدرنالتاجي, *Agrobacterium tumefaciens*,

القدرة المعادية , بكتيريا داخلية.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. Synthèse bibliographique sur les maladies bactériennes.....	4
2. Description des principales maladies causées par les bactéries phytopathogènes	8
3. Les méthodes de lutte contre les maladies bactériennes.....	12
4. l'utilisation de <i>Pseudomonas spp</i> et <i>Bacillus spp</i> dans la lutte biologique.....	23
Chapitre II: Matériel et Méthodes	
1. Matériel biologique.....	26
2. Test du pouvoir pathogène des souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
3. Test d'antagonisme <i>in planta</i>	27
4. La souche antagoniste.....	30
5. Souche d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a inoculer.....	30
6. Technique d'inoculation des plantules de tomate <i>in planta</i>	31
7. Lecture de résultats	32
8. Analyse statistique des résultats	32
Chapitre III :Résultats et interprétation	
1. Résultats test de virulence des souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
2. La réponse de la bactérie antagoniste <i>Pseudomonas brassicacearum</i> souche PS1 au teste d'hypersensibilité sur les limbes foliaires de <i>Kalanchoë (Kalanchoë daigremontiana)</i>	35
3. Résultats de l'essai de bioprotection de la tomate contre la galle du collet <i>in planta</i> par l'utilisation des bactéries antagonistes <i>Pseudomonasbrassicacearum</i> souche PS1.....	36
Chapitre IV : Discussions	42
Conclusion et perspectives	48

Introduction	1
 Chapitre1 : Synthèse bibliographique	
1. Synthèse bibliographique sur les maladies bactériennes.....	4
1.1. Généralité sur les maladies des plantes.....	4
1.2. Les maladies bactériennes	4
1.3. Les bactéries phytopathogènes	5
1.4. Mécanismes de virulence	6
1.5. Les symptômes des maladies bactériennes.....	6
2. Description des principales maladies causées par les bactéries phytopathogènes	8
2.1. Le flétrissement bactérien	8
2.2. La pourriture molle bactérienne.....	8
2.3. Le chancre bactérien de la tomate	8
2.4. La tumeur du collet et de la tige.....	9
2.4.1 Mécanismes naturels de l'infection des plantes par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
3. Les méthodes de lutte contre les maladies bactériennes	11
3.1. La lutte intégrée.....	11
3.2. La lutte préventive et culturale.....	13
3.3. La lutte physique	13
3.4. La lutte chimique	14
3.5. La lutte génétique.....	15
3.6. La lutte biologique.....	15
3.6.1. La lutte par l'utilisation des microorganismes antagonistes	16
3.6.2. Le mode d'action des bactéries antagonistes	17
3.6.2.1. L'antibiose	17
3.6.2.2. Compétition	17

3.6.2.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments.....	17
3.6.2.2.2. Compétitions pour le fer et production de sidérophores.....	18
3.6.2.3. Parasitisme	18
3.6.2.4. Médiation L'induction de la résistance de l'hôte	19
3.6.2.4.1. L'induction de la résistance ISR par les bactéries endophytes.....	21
3.6.2.4.1.1. L'élicitation.....	21
3.6.2.4.1.2. Transmission du signal.....	21
3.6.2.4.1.3. L'expression des mécanismes de défense.....	21
4. l'utilisation de <i>Pseudomonas spp</i> et <i>Bacillus spp</i> dans la lutte biologique.....	23
4.1. Le Genre <i>Pseudomonas</i>	23
4.1.1. Morphologie.....	24
4.1.2. L'intérêt des <i>Pseudomonas spp</i>	24
4.2. Le genre <i>Bacillus spp</i>	24
4.2.1 Classification.....	25
4.2.2. L'intérêt des <i>Bacillus spp</i>	25

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique.....	26
1.1. Culture des bactéries antagonistes et pathogène.....	26
1.2. Souche d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilisées.....	26
2. Test du pouvoir pathogène des souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
2.1. Inoculation des feuilles de <i>Kalanchoë</i>	27
3. Test d'antagonisme <i>in planta</i>	27
3.1. Matériel végétale.....	28
3.2. Méthodologie de semis.....	28
3.3. La pré-germination.....	28
3.4. La transplantation des graines germées.....	29
3.5. La sélection des plantes pour l'inoculation	29
3.6. Dispositif expérimentale.....	30
4. La souche antagoniste.....	30

5. Souche d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a inoculé.....	30
6. Technique d'inoculation des plantules de tomate <i>in planta</i>	31
7. Lecture de résultats.....	32
8. Analyse statistique des résultats.....	32

Chapitre 3 :Résultats et interprétation

1. Résultats test de virulence des souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
2. La réponse de la bactérie antagoniste <i>Pseudomonas brassicacearum</i> souche PS1 au teste d'hypersensibilité sur les limbes foliaires de <i>Kalanchoë (Kalanchoë daigremontiana)</i>	35
3. Résultats de l'essai de bioprotection de la tomate contre la galle du collet <i>in planta</i> par l'utilisation des bactéries antagonistes <i>Pseudomonasbrassicacearum</i> souche PS1.....	36
3.1. Pouvoir antagoniste <i>in planta</i> de la bactérie endophytes contre le crown gall.....	36

Chapitre 4 : Discussions	42
---------------------------------------	----

Conclusion et perspectives	48
---	----

Référence bibliographique

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1 : les déterminants bactériens et les types de résistance de l'hôte induite par des agents de lutte biologique.....	20
Tableau 2 : la moyenne de diamètre des tumeurs pour chaque traitement.....	39
Tableau 3 : ModèleGLM appliqué à l'effet de la souche antagoniste PS1 et les souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de tomate testées par rapport au diamètre des tumeurs.....	40

Liste des figures

Figure 1 : Les symptômes causés par différentes bactéries phytopathogènes.....	7
Figure 2 : Principales régions d'un plasmide Ti.....	10
Figure 3 : Mécanisme de transfert de l'ADN chez <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
Figure 4: Les cinq types d'approches en protection des végétaux.....	12
Figure5 : les différentes phases du phénomène d'induction de résistance chez les plantes par les rhizobactéries.....	22
Figure6 : l'inoculation des feuilles de la plante de Kalanchoë au niveau des blessures par les souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
Figure 7 : les semences pré-germées après 3 semaines.....	29
Figure 8 : plantule de tomate trompée dans la suspension bactérienne d'antagoniste.....	31
Figure 9: Test de virulence des différentes souches d'A. Tumefaciens, souches E6, E2X et C58, sur les feuilles de Kalanchoë (<i>Kalanchoë daigremontiana</i>). Photo prise 3 semaines après l'inoculation. Des tumeurs sont visibles après inoculation avec les souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
Figure 10: l'inoculation des feuilles de Kalanchoë (<i>Kalanchoë daigremontiana</i>) avec l'eau distillée stérile.....	34
Figure 11 : l'inoculation des feuilles Kalanchoë (<i>Kalanchoë daigremontiana</i>) avec <i>Pseudomonas</i> souche PS1. Photo prise après quatre semaines d'inoculation.....	35
Figure 12: Réponse des plantules de tomate aux différentstraitements.....	37
Figure 13 : analyse de variance de diamètre (D) de tumeur.....	41

Liste des abréviations

°C: degrés Celsius.

A.tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*.

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid.

al. : Collaborateurs.

CFU : colony-forming unit.

Cm : centimètre.

DAPG: 2,4-diacetylphloroglucinol.

DO : densité optique.

EDS : l'eau distillée stérile.

EPA : Environmental Protection Agency.

EPS : Exopolysaccharides.

ET3 : Effecteurs de type III.

Fe³⁺ : Ferric iron.

G: gramme.

GLM: General Linear Models.

H:heure.

HCN : Acide cyanhydrique.

HR : hypersensitivereaction.

ISR : Résistance systémique induite.

JA: Acidejasmonique.

K.daigremontiana: *Kalanchoë daigremontiana*.

LPS : Lipopolysaccharidiques.

MI : millilitre.

Mm : millimètre.

NM: Nanomètre.

OEPP/EPPO :Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.

PR :pathogenesis-relatedprotiens.

SA : Acide salicylique.

SAR : Résistance systémique acquise.

Introduction

Les maladies des plantes peuvent être causées par des conditions environnementales défavorables liées au climat, à la nutrition et à la pollution ou par des agents parasitaires. Ces derniers peuvent être des virus, des bactéries, des oomycètes, des champignons ou des nématodes (Vierling et Kimpel, 1992; Shao, Guo *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces stress est responsable de lourdes pertes agronomiques. Il est estimé que les maladies des plantes sont à l'origine de la perte de 14% des cultures mondiales. De nombreux travaux de recherche sont donc menés dans ce domaine afin d'approfondir les connaissances sur les maladies des plantes et de pouvoir développer de nouvelles stratégies de lutte (Agrios, 2005).

Les agents pathogènes peuvent altérer plusieurs fonctions physiologiques des plantes en s'attaquant à leurs différents organes ce qui réduit le rendement et la qualité des cultures. L'infection des racines les rend incapables de prélever de l'eau et des nutriments dans le sol. La prolifération microbienne dans les vaisseaux conducteurs perturbe les flux hydriques et conduit au flétrissement. L'infection des feuilles, observée dans le cas des tavelures, le feu bactérien et le mildiou, interfère avec la photosynthèse. Enfin l'atteinte des fleurs et des fruits limite les capacités de reproduction et de stockage des réserves (Poueymiro, 2009).

Parmi les agents pathogènes responsables des pertes économiques importantes; les bactéries phytopathogènes, qui sont considérées comme des agents bioterroristes ou bioagresseurs classés dans la liste des organismes de quarantaine (Beale *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2008).

Ces bactéries phytopathogènes sont capables d'infecter les plantes et entraîner des maladies responsables de perte importante pour les récoltes. C'est pour cela la protection contre les agents pathogènes est une importance majeure. Si les cultures ne sont pas protégées contre ces bactéries phytopathogènes, elles peuvent être endommagées.

Parmi les maladies les plus connues pour être causées par les bactéries phytopathogènes est la galle du collet, elle engendre une importante perte économique au niveau des pépinières du fait que la commercialisation des plants malades n'est pas autorisée et les plants atteints doivent être impérativement incinérés (Zonia et Raio, 1999).

Le contrôle de ces maladies des plantes doit être efficace en utilisant des méthodes de lutte conventionnelles représentées par les méthodes physiques, chimiques, génétiques, biologiques (Vincent et Panneton, 2001). La plupart des substances chimiques utilisées pour lutter contre les maladies phytopathogènes sont dangereuses pour l'homme, les animaux et les organismes bénéfiques en persistant dans les écosystèmes naturels (Kouassi 2001; Thakore 2006). Les mesures de contrôle alternative telles que l'utilisation d'antagonistes sont nécessaires et ont besoin d'être explorés. Cette stratégie est basée sur l'utilisation des micro-organismes (bactéries, levures ou champignons) qui ont un potentiel protecteur sur la plante (De Doer et *al.*, 1999; Silva et *al.*, 2004). Le contrôle des micro-organismes phytopathogènes de manière biologique est plus respectueux pour l'environnement en comparaison avec le contrôle chimique (Nautiyal, 2001).

L'utilisation des bactéries pour l'amélioration du rendement et la protection des cultures est initiée depuis le début de ce siècle. Dès le milieu des années 60, plusieurs applications expérimentales ont été rapportées (Weller, 1988), elles tirent profit des propriétés bénéfiques des bactéries envers les plantes et/ou des capacités antagonistes des micro-organismes contre les pathogènes.

D'ailleurs, le pourcentage d'utilisation de biopesticides a progressivement augmenté depuis 1997 avec un accroissement de 10 % par an (Bailey et Mupondwa, 2006).

Le marché des pesticides synthétiques avait diminué au cours des 5 dernières années grâce au développement des biopesticides et des récoltes génétiquement modifiées. Les biopesticides représentent 2.5% (672 millions \$ en 2005) des ventes de produits phytosanitaires (26 milliards \$) alors qu'il était seulement de 0.2% en 2000. En dépit de sa petite taille comparée aux pesticides synthétiques, le marché des biopesticides se développe donc et on prédit qu'il atteignait plus d'un milliard de dollars en 2010 (Thakore, 2006).

Parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste vis-à-vis des agents phytopathogènes, on rencontre presque toujours une espèce du genre *Pseudomonas* et *Bacillus* (Weller et *al.*, 2002, Van loon, 2007).

Les bactéries endophytes peuvent constituer une approche écologique durable. Elles sont capables de réduire ou d'empêcher les infections causées par les microorganismes phytopathogènes. Certaines bactéries endophytes peuvent protéger la plante en déclenchant

ses mécanismes de défense et en lui permettant de mieux se défendre envers une large gamme de pathogènes (Rayan et *al.*, 2008). Les deux genres bactériennes telluriques et endophytiques *Pseudomonas* et *Bacillus* comprennent la majorité des bactéries utilisées comme antagonistes. Ils sont connus par leur diversité de mécanismes d'action et métabolites impliqués dans la protection des végétaux face aux différentes maladies (Lodewyckx et *al.*, 2002).

Dans ce contexte, ce travail consiste à évaluer l'effet antagoniste *in planta* de la bactérie endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 vis-à-vis des souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* (E6, E2X et une souche de référence C58) sur des plantules de tomate.

1- Synthèse bibliographique sur les maladies bactériennes et les méthodes de lutte

1.1 Généralités sur les maladies des plantes

La maladie est une anomalie dans la structure ou la fonction d'une plante causée par un facteur pathogène éventuellement virulent c'est-à-dire qui peut provoquer une maladie chez la plante. Les maladies peuvent être divisées en deux principaux groupes:

Infectieuses (ou biotiques) et non infectieuses (ou abiotiques) (Schiffers, 2011).

Les maladies infectieuses sont causées par des micro-organismes (champignons, bactéries, virus, mollicutes) qui peuvent être transmises par divers vecteurs (vent, eau, contacts entre végétaux, nématodes, insectes, etc.) à d'autres plantes saines, ou être présents dans le sol, provoquant ainsi la maladie chez les nouveaux hôtes sensibles. Les maladies infectieuses ne se développent que si les 3 conditions suivantes sont remplies:

- La plante hôte doit être sensible.
- L'agent pathogène doit être virulent et capable d'attaquer la plante.
- L'environnement doit favoriser le développement de la maladie (Moreira, 2011).

Les maladies bactériennes sont moins nombreuses que les infections fongiques et moins pernicieuses et généralisées que les viroses, certaines bactérioses des plantes ont cependant un caractère de gravité et un impact socio-économique (Paulin, Ride et al, 2001).

1.2 Les maladies bactériennes

Les bactéries sont des organismes unicellulaires qui ne mesurent guère plus que quelques milliers de millimètres. Elles sont observables au microscope mais pas à l'œil nu.

Les bactéries ne provoquent pas aussi souvent des maladies que les champignons, mais elles peuvent attaquer gravement certaines cultures. Ces dernières peuvent s'accroître sur la surface de la plante, entre les cellules des tissus (apoplaste) ou dans le système vasculaire (Aflano et Collmer, 1996 ; Agrios. 1997). Tout comme les maladies fongiques, les bactérioses se manifestent sur les feuilles, les tiges, les branches, les troncs et les parties souterraines de la plante ainsi que sur et à l'intérieur des fruits.

Les maladies bactériennes sont responsables de pertes économiques considérables dans plusieurs pays, dépassent 120 billions de dollars chaque année (Elmhirst, 2007). Les semences ou les plants infectés jouent un rôle important dans la dissémination des maladies aussi bien à l'échelle régionale qu'à l'échelle mondiale.

Il existe différentes sortes de bactéries, mais quelques-unes d'entre elles seulement sont responsables des maladies bactériennes les plus courantes chez les plantes (Poueymiro, 2009).

Les échanges de semences et de matériel végétal peuvent introduire des maladies dans les pays jusqu'alors indemnes. En plus des pertes directes de production, l'introduction de maladies de quarantaine peut constituer un facteur limitant des échanges commerciaux entre les pays (Sallouk, 2008).

La bactérie *Ralstonia solanacearum* est un exemple d'organisme de quarantaine (OEPP/EPPO, 1978). L'existence de plusieurs races et souches de ce pathogène de virulence diverse suivant les conditions environnementales est un grave danger pour les productions européennes et méditerranéennes de pomme de terre et de tomate.

1.3 Les bactéries phytopathogènes

Actuellement, 350 espèces, sous-espèces ou pathovars ont été dénombrés appartenant à 21 genres, se répartissant dans diverses familles (Paulin et al., 2001). Elles sont non sporulées, aérobies strictes ou anaérobies facultatives et appartiennent aussi bien à la sous-division des *Fimicutes* (Gram positif) qu'à celle des *Gracillicutes* (Gram négatif). La sous-division des *Ténéricutes* contient aussi des bactéries phytopathogènes (les spiroplasmes et les phytoplasmes) dont l'absence de paroi, les caractères de parasites généralement biotrophes intracellulaires en font des micro-organismes au comportement pathogène particulier (Paulin et al., 2001).

Les bactéries sont disséminées par le vent, la pluie, les insectes ou les pratiques culturales. Elles pénètrent dans les plantes au niveau de blessures ou des ouvertures naturelles telles que les stomates, les hydathodes, les néctarthodes, les cicatrices foliaires et les lenticelles (Agrios, 2005). Elles occupent le xylème ou les espaces intercellulaires de différents tissus végétaux regroupés sous le terme d'apoplasme (Poueymiro, 2009). Les bactéries phytopathogènes causant les principales maladies sont réparties chez les principaux

genres suivants: *Pseudomonas spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Erwinia spp.*, *Clavibacter spp.*, *Ralstonia spp.* et *Ponthoea spp.*

1.4 Mécanismes de virulence des bactéries phytopathogènes

Les bactéries phytopathogènes sont des microorganismes extracellulaires. En se basant sur la spécificité parasitaire (Alfano et Collmer, 1996 ; Agrios, 1997).

La plante constitue pour l'agent pathogène une source importante de substrat à exploiter pour assurer sa propre croissance. Les bactéries phytopathogènes pour se nourrir et se multiplier aux dépens de la plante, utilisent plusieurs mécanismes de pathogénie (Boucher et al., 2001).

Pour proliférer dans leur hôte et établir la maladie, les bactéries utilisent plusieurs stratégies de virulence comme la dégradation de la paroi végétale par des enzymes hydrolytiques et la production de phytotoxines et d'exopolysaccharides (EPS) (Boucher et al., 2001).

Cependant, une des armes les plus efficaces et partagée avec les bactéries pathogènes d'animaux est le système de sécrétion de type III (Preston et al., 2005). Il permet aux bactéries des genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* et *Ralstonia* d'injecter un ensemble de protéines, dites effecteurs de type III, directement dans le cytoplasme des cellules hôtes (Cornelis et Van, 2000).

1.5 Les symptômes des maladies bactériennes

Les bactéries sont la cause de nombreuses maladies chez les végétaux. Au nombre de symptômes des maladies causées par des bactéries (Figure 1), on recense des nécroses, des jaunissements, des dépérissements, des pourritures molles, des flétrissements, lésions chancreuses, taches sur les feuilles et des tumeurs, des galles ou des déformations diverses (Lepoivre, 2003). Elles peuvent provoquer la mort cellulaire dans différentes parties de la plante: racines, tubercules, tiges, feuilles, fruits et fleurs (Poueymiro, 2009).

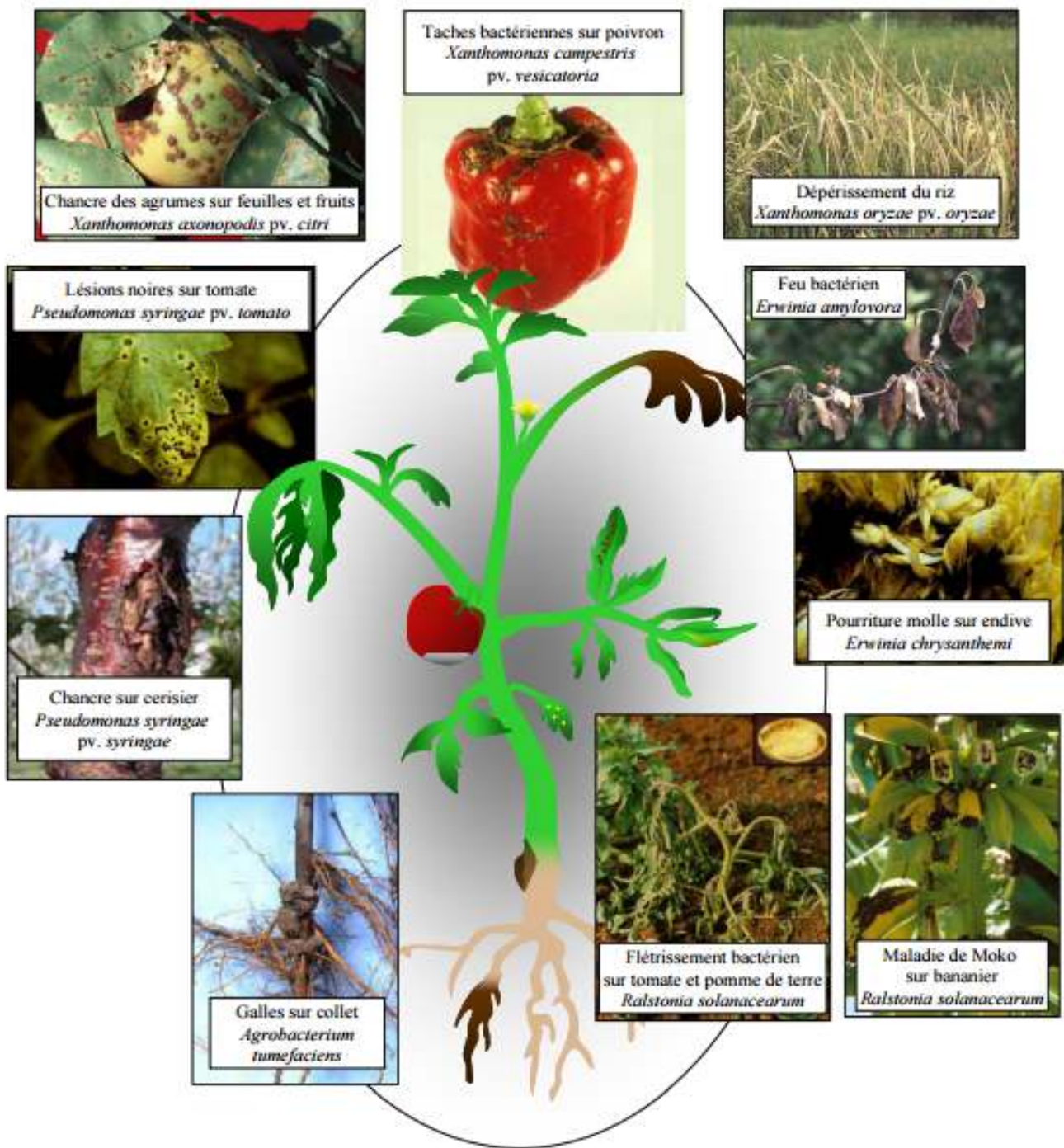


Figure 1: symptômes causés par les bactéries phytopathogènes (Poueymiro, 2009).

2. Description des principales maladies causées par les bactéries phytopathogènes

2.1. Le flétrissement bactérien

Le flétrissement bactérien est une phytobactériose d'origine tellurique provoquée par *Ralstonia solanacearum*.

La bactérie pénètre dans les racines des plantes par les blessures artificielles ou naturelles telles que la zone d'émergence des racines secondaires latérales ou l'apex. Elle peut aussi pénétrer par des lésions de la tige (plaies de taille, ébourgeonnage...) ou par les stomates. *Ralstonia solanacearum* se multiplie dans les vaisseaux du xylème de la plante. L'infection mène au flétrissement de la plante lorsque les bactéries bloquent totalement les vaisseaux. Le résultat final est la mort de la plante (Zolobowska et Van Gijsegem, 2006).

2.2. La pourriture molle bactérienne

La pourriture molle bactérienne est causée par la bactérie *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, un résident du sol courante dans le monde entier. Les bactéries de la pourriture molle s'attaquent à une vaste gamme des légumes à racines, à feuilles et à fruits, tels que la carotte, le chou, l'oignon et la tomate (Hueck, 1998). C'est l'une des plus graves maladies de post-récolte de pommes de terre à travers le monde. Les pertes se produisent pendant le stockage, le transport et la commercialisation. Toutes les variétés sont sensibles (Guy et al., 2013).

2.3. Le Chancre bactérien de la tomate

Le chancre bactérien est problématique dans la tomate de champ depuis le milieu des années 1990. C'est une maladie de quarantaine causée par la bactérie *Clavibacter michiganensis* qui survit dans et sur la semence, dans les résidus de culture, le sol, certaines mauvaises herbes, les tuteurs et la serre (contenants de culture, tables, structures...) (OEPP/EPP, 1982). En cas d'infection cette dernière bactérie se localise dans les vaisseaux du xylème (Leyns et Cleene, 1983).

2.4. La tumeur du collet et de la tige

Les maladies les plus connues pour être causées par les bactéries du genre d'*Agrobacterium spp.* sont la tumeur du collet et la tumeur de la tige.

L'agent responsable de la maladie de la galle du collet « crown gall » a été identifié en 1907 (Smith et Townsend, 1907); il s'agit d'*A. tumefaciens*, une alpha-Proteobactérie de la famille des *Rhizobiaceae*. Comme son nom l'indique. Le crown gall est la maladie prédominante la plus rencontrée dans les pépinières d'arbres fruitiers, de plante ornementales, de la vigne et d'arbres forestiers dans plusieurs régions du monde affectant fortement le rendement commercial (Poncet *et al.*, 1996 ; Zonia et al., 2001 ; Krimiet *al.*, 2006).

Les symptômes causés par *Agrobacterium tumefaciens* ont une apparence spectaculaire et caractéristique. Dans le cas de la tumeur du collet, les symptômes peuvent s'observer au collet ou sur les racines. Pour ce qui est de la tumeur de la tige, les symptômes se développent sur la tige (Lacroix, 2003).

Les symptômes se traduisent par la présence d'excroissances plus ou moins sphériques, blanchâtres, spongieuses à fermes et dont la surface est irrégulière rappelant celle de l'inflorescence d'un chou-fleur (Lacroix, 2003).

Le crown gall engendre une importante perte économique au niveau des pépinières du fait que la commercialisation des plants malades n'est pas autorisée et les plants atteints doivent être impérativement incinérés (Zonia et Raio, 1999).

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

En 1977, il a été établi que la tumorigenèse résultait du transfert à la plante de fragments oncogènes pour la plupart extrachromosomiques portés par le plasmide bactérien Ti (tumor-inducing ou inducteur de tumeurs) (Chilton et al., 1977) en réponse à l'émission de signaux chimiques de la plante hôte blessée (Johnson & Das, 1998).

- **Le plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens***

Les agrobactéries virulentes (c'est-à-dire capable d'infecter des cellules végétales) possèdent en plus de leur génome chromosomique un plasmide Ti de 200 kb responsable de leur virulence (Hooykaas et al., 1977). Le plasmide Ti d'*Agrobacterium* (Figure 2) est composé de différents éléments :

- Un ADN-T (ADN de transfert) flanqué de bordures droite et gauche de 25 pb en orientation directe. Elles sont appelées RB et RG pour right et left borders.
- Une région de virulence comprenant des gènes vir organisés en 8 opérons permettant le transfert de l'ADN-T à la cellule végétale.
- De gènes servant au transfert de plasmides entre bactéries par conjugaison.
- D'une séquence servant à sa réplication.
- De gènes impliqués dans le catabolisme des opines.

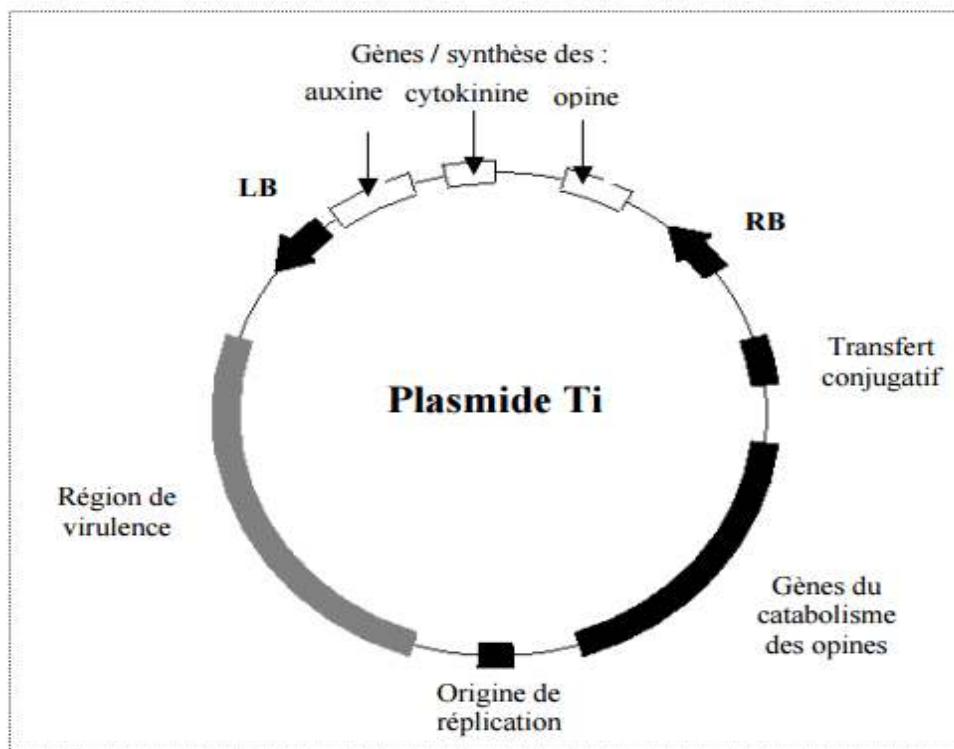


Figure 2 : Principales régions d'un plasmide Ti (Hooykaas & Schilperoort, 1992).

• L'ADN-T

L'ADN-T est une séquence d'ADN encadrée par des bordures droite et gauche et constituée de plusieurs types de gènes. Certains d'entre eux sont des oncogènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de phytohormones telles que les auxines et les

cytokinines et responsables de la formation de tumeurs chez la plante infectée (Hooykaas & Schilperoort, 1992). D'autres gènes codent pour la synthèse d'opines. Ces composés, produits par la condensation d'acides aminés et de sucres, sont synthétisés et excrétés par les cellules tumorales végétales et sont des sources de carbone et d'azote pour *Agrobacterium tumefaciens*.

- **Le transfert de gènes d'*Agrobacterium tumefaciens* à la plante**

Différentes étapes du transfert de gènes Le transfert de gènes d'*Agrobacterium* à la plante nécessite un grand nombre d'étapes distinctes et essentielles. Tout d'abord, la plante doit être blessée pour permettre l'entrée de la bactérie. Les composés que synthétisent la plante blessée activent le système de virulence de la bactérie. L'ADN-T est ensuite transféré puis transcrit dans les cellules de la plante avant même son intégration dans le génome (Janssen & Gardner, 1989). On parle d'expression transitoire. Après son intégration, le niveau d'expression de l'ADN-T est en partie déterminé par son site d'intégration dans le génome végétal. Les cellules végétales se multiplient et forment des tumeurs grâce à la synthèse continue d'auxines et de cytokinines. Les cellules végétales transformées continuent à synthétiser des opines qui sont des sources de carbone et d'azote métabolisables par *Agrobacterium tumefaciens* (Klapwijk et al., 1978). Elles favorisent, de ce fait, la multiplication des agrobactéries.

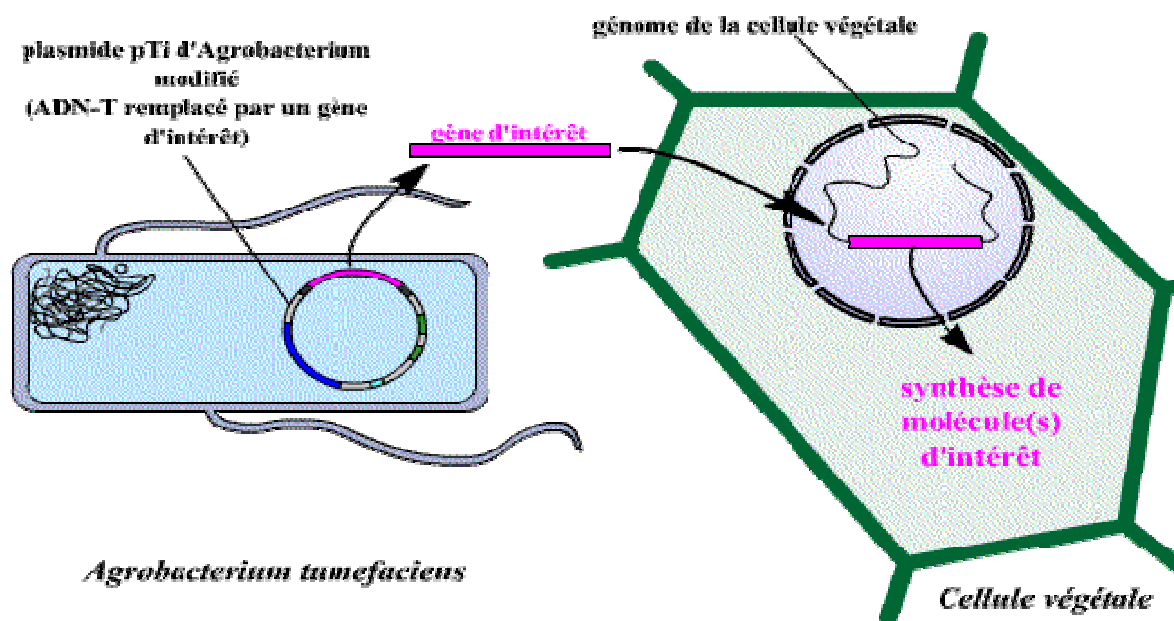


Figure 3 : Mécanisme de transfert de l'ADN chez *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin, 2003).

2. les méthodes de lutte contre les bactéries phytopathogènes

En matière de protection des végétaux en agriculture, on peut utiliser cinq types d'approches soient la lutte chimique, la lutte biologique, la lutte physique, les biopesticides et les facteurs humains (Figure 2). Théoriquement, la lutte intégrée ouvre à toute technique de protection des plantes en fonction de ses mérites dans une situation donnée (Vincent et Panneton, 2001).

3.1. Lutte intégrée

La lutte intégrée est une stratégie multidisciplinaire de contrôle des ravageurs qui inclut plusieurs approches comme par exemple la lutte biologique, les méthodes culturales et l'usage judicieux et limité des pesticides chimiques. Cette méthode considère l'écosystème dans son ensemble, dont les interactions entre les organismes. Le but ultime est de réduire les dommages aux cultures économiquement, avec le moins de menaces à l'environnement et à la santé humaine possible (EPA, 2009).

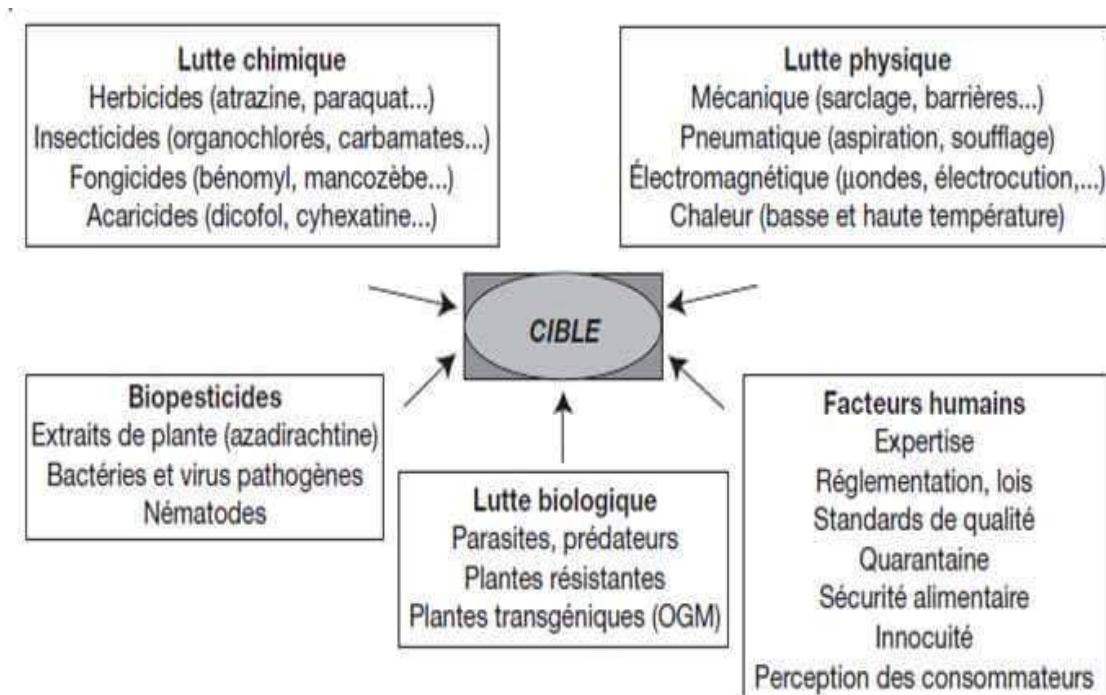


Figure 4: Les cinq types d'approches en protection des végétaux (Panneton *et al.*, 2000).

2.2 . La lutte préventive et culturale

La lutte culturale et les mesures préventives assurent une réduction importante des maladies, Le matériel de plantation et de greffage doit être obtenu à partir de plantes indemnes ainsi que l'utilisation des variétés ou d'espèces résistantes ou peu sensible aux maladies(Lacroix,2003).

La lutte contre des maladies bactériennes base sur les mesures sanitaires préventives suivantes:

- désinfection des graines et outils tranchants avec du lysol.
- arrachage des mauvaises herbes qui peuvent servir d'hôtes, guérison des plaies dues à la taille et désinfection du sol.
- éliminer les insectes qui propageront éventuellement les maladies à la nouvelle culture (Joep van, 2004).
- privilégier l'utilisation de cultivars résistants dans les régions concernées par la maladie (Christine, 2004).
- détruire les foyers en éliminant les arbres porteurs de maladie. L'abattage ou l'élagage sont à effectuer préférentiellement en hiver, en dehors de la période d'activité de la bactérie. Les outils doivent être désinfectés afin d'éviter tout risque de dissémination (Christine, 2004).
- Enfouier des débris végétaux permet de lutter contre les organismes telluriques comme *Rhizoctonia solani* (N'deye. 1995).
- Créer simultanément des conditions défavorables pour les ennemis des cultures, telle que la rotation des cultures, les pratiques culturales, la fertilisation raisonnée et le travail du sol (Deguine et Ferron. 2005).

3.3. La lutte physique

La lutte physique en protection des plantes regroupe toutes les techniques de lutte dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique, biochimique ou toxicologique, L'utilisation de méthodes de lutte physique doit s'inscrire dans une démarche de lutte intégrée.

Le traitement des semences de blé à l'aide de micro-ondes pour le contrôle de *Fusarium gramineauma* été évalué. (Vincent et Panneton, 2010).

La solarisation est une technique efficace qui consiste à couvrir le sol durant la période chaude de l'année par une bâche en plastique transparent (Katan *et al.*, 1976 ; Stapleton et De Vay, 1986). Les modifications chimiques, physiques et biologiques se produisent sous le plastique en raison de la température élevée du sol, ont entraîné dans plusieurs essais une importante réduction des microorganismes phytopathogènes (Katan et De vay, 1991).

La thermothérapie peut être effectuée par un traitement à l'eau chaude (Fleurat, 2005). Généralement des températures de 50 à 54 °C. Pendant 5 à 30 minutes, à la vapeur humide à 50°C. Pendant 1 heure ou à la chaleur sèche à 70°C. Pendant 3 à 7 jours sont utilisées (Shiomi, 1992; Dhanvantari et Brown, 1993). Cette technique a été appliquée avec succès sur de nombreuses maladies en particulier les maladies bactériennes transmises par les semences (Janse et Wenneker, 2002).

3.4 La lutte chimique

En fait, il n'est pas toujours nécessaire de traiter, particulièrement lorsque la maladie est sous le seuil économique de traitement et que les facteurs tels la sensibilité du cultivar et la présence ou non de la maladie sont aussi pris en considération.

En pratique, la lutte chimique constitue et de loin, le type de méthode le plus utilisé en agriculture commerciale. Ceci est dû à des raisons essentiellement économiques et techniques (Vincent et Panneton, 2010). La plupart des substances chimiques utilisées pour combattre les maladies en plus d'être dangereuses pour l'homme, les animaux et les organismes bénéfiques, persistent dans les écosystèmes naturels. En plus ces substances ont des conséquences néfastes sur l'environnement comme l'accumulation de résidus et la pollution des sols (Kouassi, 2001; Thakore, 2006).

La streptomycine est considérée comme l'antibiotique le plus efficace contre le feu bactérien (Moller *et al.*, 1972). La kasugamycine montre une efficacité variable (Psallidas et Tsiantos, 2000). Son usage est restreint du fait de sa forte phytotoxicité sur pommier et poirier aux doses recommandées pour le contrôle de la maladie. Une autre molécule, autorisée contre le feu bactérien, est le fosétyl aluminium. Il s'agit d'une molécule qui, outre une action antifongique, présente une efficacité irrégulière (Tsiantos et Psallidas, 2002).

3.5. La lutte génétique

L'utilisation de variétés génétiquement résistantes aux maladies est ainsi la principale méthode de lutte efficace pour différents pathosystèmes.

Actuellement, la méthode la plus utilisée pour lutter contre les maladies est la résistance génétique, par l'utilisation de variétés résistantes aux maladies. Deux types de résistance variétale existent: la résistance spécifique (à déterminisme mono-génique, basée sur une reconnaissance gène pour gène) et la résistance quantitative (à déterminisme polygénique). Elles mettent en jeu des processus différents au niveau de l'interaction plante/agent pathogène (Hossard *et al.*, 2010).

La résistance spécifique est à effet total pour les agents pathogènes compatibles (gène d'avirulence) et empêche de fait les dommages, la résistance quantitative est à effet partiel et va seulement limiter l'épidémie et réduire les dommages sans les supprimer totalement, par comparaison avec une variété sensible.

Toujours, pour parvenir à une meilleure protection contre la galle du collet, une méthode prometteuse a été développée. Les plantes sensibles aux souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. ont été modifiées pour reconnaître la transformation génétique causée par les bactéries et sont capables de réagir. La prolifération des gènes bactériens provoquant la tumeur est réprimée de manière active et les plantes deviennent ainsi résistantes (Escobar *et al.*, 2001). La technique a déjà été testée expérimentalement avec succès sur les plants et pommier et promet des résultats positifs avec d'autres plantes (Viss *et al.*, 2003).

3.6 La lutte biologique

La lutte biologique fait partie des méthodes de plus en plus favorisées en phytopathologie pour contrôler les maladies végétales, avec un impact escompté plus réduit sur l'environnement et la santé humaine, par rapport aux pesticides chimiques (Sharga *et Lyon*, 1998). Des souches de *Pseudomonas* spp. ont permis de contrôler expérimentalement le développement des bactéries responsables de la pourriture molle, bien que dans certains cas, des résistances à l'agent de lutte biologique aient été rapportées (Colyer *et Mount*, 1984).

Les agents de lutte biologique, peuvent être définis comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou l'un de ses dérivés. Ils peuvent donc être constitués d'organismes (plantes, insectes, nématodes) ou de micro-

organismes (bactéries, levures, champignons, virus) exerçant une activité protectrice sur les plantes et peuvent limiter ou réduire les pertes ou les dommages causés par les organismes nuisibles (Thakore 2006)

3.6.1 Lutte biologique par l'utilisation des microorganismes antagonistes

La plupart des microorganismes dérivent de la rhizosphère, les 2 à 5 mm de sol entourant le système racinaire ou des populations microbiennes sont en relation avec la plante (Gray et Smith 2005), Certains de ces microorganismes sont épiphytiques, c'est-à-dire qu'ils colonisent les surfaces racinaires, tandis que d'autres peuvent également entrer à l'intérieur des plante et devenir ainsi des endophytes. Certains d'entre eux peuvent également former des symbioses remarquables avec leur plante hôte (Hallmann et Kloepper, 1997).

Parmi les microorganismes bénéfiques, qu'ils soient épiphytiques ou endophytiques voire même à l'origine de symbioses remarquables (de type mutualisme), existent des champignons et des bactéries (Cook et Baker, 1983).L'utilisation des bactéries pour l'amélioration du rendement et la protection des cultures a été initiée depuis le début de ce siècle. (Becker et Hedoes, 1985).Elles tirent profit des propriétés bénéfiques des bactéries envers les plantes et/ou des capacités antagonistes des microorganismes contre les pathogènes.

Parmi les bactéries bénéfiques, les PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), qui peuvent présenter des activités antagonistes, induire une résistance systémique chez la plante et produire des composés stimulant la croissance des plantes. (vessey, 2003 ; welbaumetal., 2004).

Un microorganisme est considéré antagoniste lorsqu'il empêche le développement d'une maladie ou la suivie d'un agent pathogène. (Chaube et Singh,1991). Les modes d'action des microorganismes antagonistes sont: la compétition, l'antibiose, le parasitisme ou l'induction des mécanismes de défense de la plante par la synthèse de différents composés qui agissent directement sur le développement de l'agent pathogène (Wisniewski et Wilson. 1992).

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Bacillus*, *Pseudomonas*, (Gray et Smith, 2005) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Ils influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

3.6.2. Les modes d'actions des bactéries antagonistes

3.6.2.1 L'antibiose

L'antibiose est définie comme « l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme » (Cook et Baker, 1974). Les antibiotiques constituent un groupe chimique hétérogène comprenant des composants organiques à faible poids moléculaire produits par des microorganismes (Raaijmakers *et al.*, 2002).

Les produits métaboliques aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques, sont de différentes natures (Defago, 1993, De Souza *et al.*, 2003).

Chez *Pseudomonas*, des molécules antifongiques comme le HCN qui est un liquide très volatil, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4- diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliquées dans le biocontrôle (Haas et Keel 2003; Haas et Defago 2005).

Certaines souches de PGPR ont la capacité d'excréter des métabolites qui jouent un rôle important dans l'inactivation des facteurs de germination du pathogène ou la dégradation de leurs facteurs de pathogénicité comme les toxines. Ainsi, la capacité de certaines bactéries à parasiter et à dégrader les spores des pathogènes à travers la production d'enzymes détruisant la barrière cellulaire a été démontrée (Whipps 2001).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur activité antagoniste envers plusieurs phytopathogènes (Haas et Defago, 2005).

3.6.2.2 La compétition

Park (1960), définit la compétition comme la réduction de croissance résultant de la lutte entre organismes pour les nutriments, La compétition trophique s'exerce essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer.

3.6.2.2.1 Compétition pour l'espace et les nutriments

La compétition pour les nutriments de la rhizosphère est un mécanisme fondamental avec lequel les PGPR protègent les plantes.

La chimiotaxie pour le carbone, les sucres, les vitamines et les acides aminés qui sont exsudés dans la rhizosphère par les plantes hôtes peut expliquer la compétition au niveau de la

rhizosphère (Compant et al., 2005). Plus de 40 % des produits photosynthétiques peuvent être présents au niveau des racines ce qui implique que les PGPR doivent avoir des facultés chimiotactiques pour atteindre les composants sécrétés avant les pathogènes pour protéger les plantes (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

3.6.2.2.2. Compétition pour le fer et production de sidérophores

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des sidérophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. La synthèse des sidérophores est induite lors de carence en fer disponible dans le milieu (Meyer, 2000). Ces composés ont une grande affinité pour le Fe³⁺. En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. Certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer.

Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent (Ongena et al., 2002). D'autre part, malgré que la production des sidérophores soit un mécanisme important pour l'activité des PGPR, elle est rarement essentielle dans le biocontrôle (Ongena et al., 2000; Meziane et al., 2005).

3.6.2.3 Parasitismes

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et Holmes, 2005).

Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste (Corbaz, 1990). L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques tels que des glucanases, des chitinases et des lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène.

Certains actinomycètes produisent des chitinases et glucanases pour dégrader les parois de *Fusarium oxysporum* (Sabaou et al., 1998; Errakhi, 2008).

3.6.2.4 Médiation de l'induction de la résistance de l'hôte

Les plantes répondent activement à une variété de stimuli environnementaux et à une variété de stimuli chimiques produits par les microorganismes du sol et des plantes associées. Ces stimuli peuvent soit induire ou déterminer la défense de la plante hôte par un ensemble de changements biochimiques qui augmente la résistance contre une infection ultérieure causée par une variété d'organismes phytopathogènes (Pal et Mcspadden, 2006).

Il a été observé que certaines bactéries endophyte déclenchent le phénomène de résistance systémique induite (ISR), un phénomène similaire à la résistance systémique acquise (SAR) (Tableau 1). La SAR se développe lorsque les plantes réussissent à activer leurs mécanismes de défense en réponse à une primo-infection par un pathogène, notamment lorsque celle-ci induit une réaction d'hypersensibilité. A travers cette dernière réaction, le pathogène devient limité dans une lésion locale nécrotique du tissu desséché (Bakker et *al.*, 2007).

L'induction de défense de l'hôte peut être locale et/ou systémique, selon le type, la source, et la quantité de stimuli. Récemment, les études ont pu caractériser les déterminants et les voies de la résistance induite stimulés par des agents de lutte biologique et autres microorganismes non pathogènes. La première de ces voies, appelée résistance systémique acquise (SAR), est médiée par l'acide salicylique (SA), un composé qui est souvent produit après infection par un pathogène (Pal et Mcspadden, 2006).

Un deuxième phénotype, appelé résistance systémique induite (ISR), est médiée par l'acide jasmonique (JA) et/ou l'éthylène, qui sont produits après l'application de certaines rhizobactéries non pathogènes (Bakker et *al.*, 2007).

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (van loon, 2007). Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (Van Loon *etal.*, 2005 ; Jourdan et *al.*, 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *etal.*, 2008). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés incluent des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartiennent au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*Marcesens*, *Plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan et *al.*, 2008).

Romeio et ses coll (2005), ont isolé des macromolécules produites par *Bacillus cereus* UFV-101 capables de déclencher l'ISR chez la tomate contre plusieurs pathogènes champignons ou bactéries.

Tableau 1: les déterminants bactériens et les types de résistance de l'hôte induite par des agents de lutte biologique. (Pal et Mcspadden, 2006).

Souche bactérienne	Plante	Déterminants bactériens	Type
<i>Bacillus mycoides</i> souche Bac J	Betteravesucrière	Peroxydase, chitinase and B-1,3-glucanase	ISR
<i>Bacillus subtilis</i> GB03 et IN937a	Arabidopsis	2,3-butanediol	ISR
<i>Bacillus subtilis</i> CHA0	Tabac	Sidérophores	SAR
	Arabidopsis	Antibiotiques (DAPG)	ISR
	Tomate	Lipopolysaccharide	ISR
<i>Pseudomonas putida</i>	Arabidopsis	Lipopolysaccharide	ISR
<i>Pseudomonas putida</i> souche WCS 358	Arabidopsis	Lipopolysaccharide	ISR
		Sidérophores	ISR
<i>Pseudomonas putida</i> souche BTP1	Haricots	Z,3-hexenal	ISR

3.6.2.4.1 L'induction de la résistance systémique (ISR) par les bactéries endophytes

L'ISR induite par les endophytes représente une défense systémique dont la protection des différentes parties de la plante est garantie sans migration des bactéries. Le signal est souvent transporté à travers le système vasculaire ou à travers les tissus (Ramamoorthy *et al.*, 2001 ; Bent, 2005).

L'induction d'une résistance systémique par un endophyte comprend des étapes principales (Figure 3) qui sont:

3.6.2.4.1.1. L'élicitation

Plusieurs molécules bactériennes peuvent jouer le rôle d'éliciteurs induisant la résistance systémique (Bakker *et al.*, 2007). Les flagelles bactériens sont nécessaires pour la mobilité et l'attachement des PGPR avec les racines des plantes et donc ils sont importants pour une colonisation efficace des tissus végétaux (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

Les molécules lipopolysaccharidiques (LPS) qui constituent la paroi des bactéries peuvent être impliqués dans l'élicitation de l'ISR (Meziane *et al.*, 2005). D'autres molécules produites par les endophytes présentent un effet éliciteur tel que l'acide salicylique et les antibiotiques (Weller *et al.*, 2004).

3.6.2.4.1.2 La transmission du signal

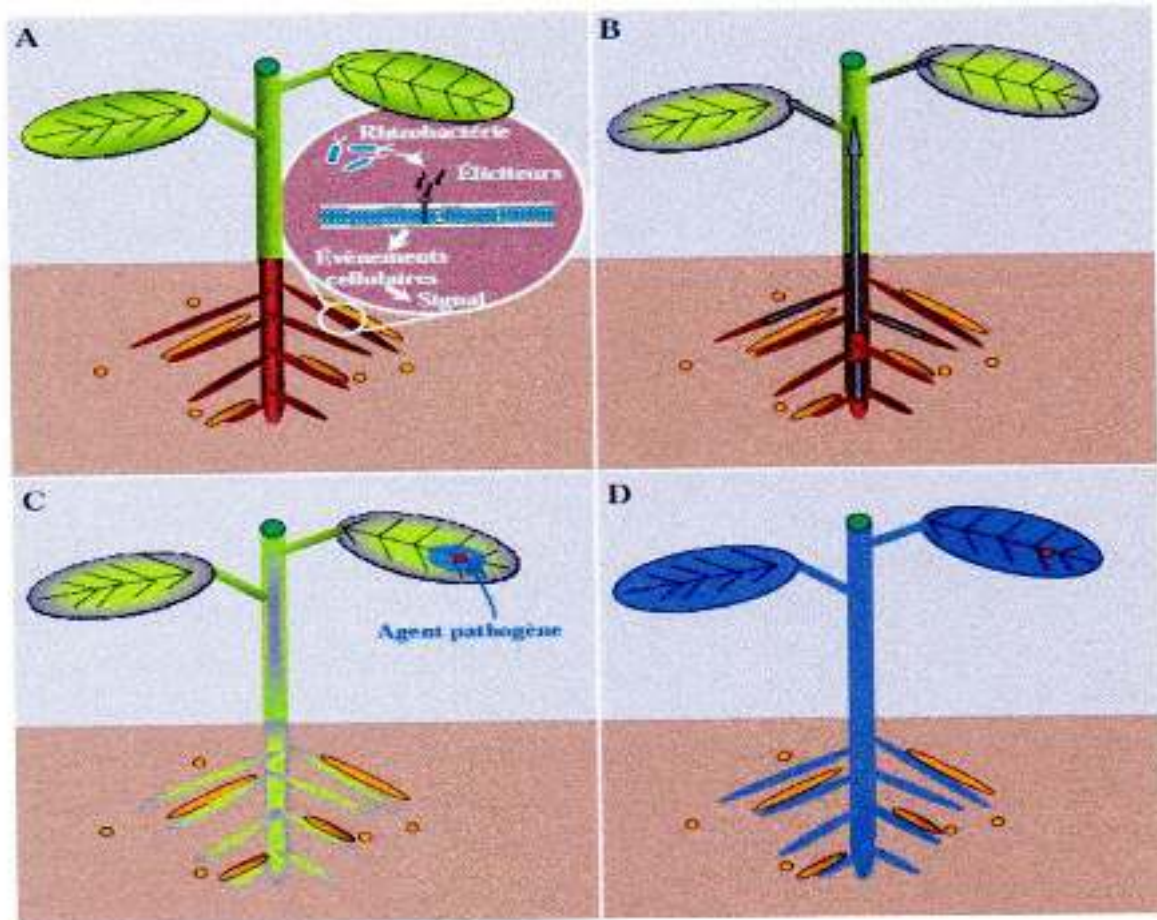
La transmission du signal de l'ISR implique la perception des deux phytohormones : l'acide jasmonique et l'éthylène (Van wees *et al.*, 2000 ; van loon *et al.*, 2006). Par exemple, l'application du précurseur d'éthylène ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) a stimulé l'ISR dans les plants d'*Arabidopsis thaliana* exprimant le gène *etr-1* (qui ne sont pas capables de produire l'éthylène) de la même façon que des plantes traitées avec une bactérie PGPR (Van Loon et Bakker, 2005).

3.6.2.4.1.3 L'expression des mécanismes de défense

Pour l'expression des mécanismes de défense, l'ISR peut être associée à l'accumulation des enzymes hydrolytiques (Maurhofer *et al.*, 1988). Par exemple, le traitement des graines de pois par *Pseudomonas fluorescens* 63-28 a induit la production d'enzymes hydrolytiques telles que des chitinases et des β -1,3-glucanases. Ces enzymes hydrolytiques s'accumulent au site de pénétration de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* et par conséquent, elles peuvent être directement impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire fongique (Benhamou *et al.*, 1996). Le renforcement de la paroi ainsi que la production de

phytoalexines sont aussi des mécanismes de défenses pouvant être induit par les PGPR (Nandakumar *et al.*, 2001 ; jeun *et al.*, 2004).

Figure 5: Les différentes phases du phénomène d'induction de résistance chez les plantes par les rhizobactéries (Jourda, 2008).



(A): La perception de la bactérie par l'hôte végétal via un (des) éliciteur(s) moléculaire(s).

(B) : émission d'un signal à travers toute la plante menant à un état (induit) systémique alors que la bactérie inductrice ne migre pas.

(C) : La plante réagit rapidement et limite une infection ultérieure d'abord localement autour du site d'attaque.

(D) : Réaction systémique menant à un renforcement de tous les organes qui permet une certaine résistance vis-à-vis d'une agression future.

4. l'utilisation de *Pseudomonas* spp et *Bacillus* spp dans la lutte biologique

La plupart des souches bactériennes exploitées comme biopesticides appartiennent aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago 2005). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique des maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler en laboratoire.

4.1 Le genre *Pseudomonas* spp.

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula. C'est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe des γ protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al.*, 2000):

Phylum..... *Proteobacteria*
Classe..... *Gammaproteobacteria*
Famille..... *Pseudomonaceae*
Ordre..... *Pseudomonales*

Ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, les eaux, et souvent pathogènes des animaux et des végétaux. Elles possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003).

Cette grande rhizocompétence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries ; et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Moore *et al.*, 2006).

Le genre *Pseudomonas* est communément divisé en deux groupes:

1. **Les *Pseudomonas* spp. fluorescents:** *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ou *P. syringae*).
2. **Les *Pseudomonas* spp. non-fluorescents :** *P. alcaligenes*, *P. fragi* ou *P. stutzeri*) (Gaëlle rossignol, 2007).

4.1.1 Morphologie des *Pseudomonas* spp.

Ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif de 1,5 à 5µm de long et de 0,5 à 1 µm de diamètre, mobiles et asporulées (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Elles sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines qui peuvent utiliser le NO₃⁻ comme accepteur d'électrons. Elles ont un métabolisme mésophile et chimio-organotrophe oxydatif (Moore *etal.*, 2006).

4.1.2 L'intérêt des *Pseudomonas* spp.

Certaines espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui promouvoient la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes. La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires et à induire l'ISR chez les plantes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001 ; Whipps, 2001; Weller *etal.*, 2002 ; van Loon, 2007).

4.2 Le genre *Bacillus* spp

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à gram positif, appartenant à la famille des bacillacées (Bacillaceae), l'ordre des Bacillales, la classe des bacilles (Bacilli), le phylum des Firmicutes. De forme bacille, ils sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs, Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables (Richardson *et al.*, 2009).

Les *Bacillus* sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires. Elles sont fréquemment retrouvées dans le sol ou certaines espèces ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote on peut trouver des *Bacillus* dans des denrées alimentaires (Richardson *et al.*, 2009).

4.2.1 Classification

Le genre *Bacillus* est classé comme suite:

Règne	: <i>Bacteria</i>
Embranchement	: <i>Firmicutes</i>
Classe	: <i>Bacilli</i>
Ordre	: <i>Bacillales</i>
Famille	: <i>Bacillaceae</i>
Genre	: <i>Bacillus</i>

4.2.2 L'intérêt des *Bacillus spp*

Plusieurs espèces du genre *Bacillus* sont efficaces dans le bio contrôle de divers champignon phytopathogènes (Williams et Asher, 1996 ; Landa *et al.*, 1997 ; Commare *et al.*, 2002 ; Swain et Ray, 2006).

Les espèces de *Bacillus* productrices d'antibiotiques sont *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus*. Les antibiotiques polypeptidiques produits par *Bacillus* les plus utilisés dans les traitements médicaux sont la bacitracine, les polymyxines, la tyrotridicine (Morikawa *et al.*, 1992 ; Perez *et al.*, 1993 ; Drabloset *et al.*, 1999). Ils ont un large spectre d'action et sont utilisés comme agent anti-fongiques (Milner *et al.*, 1995).

La plupart de *Bacillus* ont été capables d'inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum* efficacement *in vitro*. D'autres pathogènes parmi le *F. oxysporum* dont *F.o. ciciris*, *F.o. phasioli* et *F.o. melonis* sont inhibés par des isolats de *Bacillus spp.* de la rhizosphère du pois chiche (Landa *et al.*, 1997).

Matériel et méthodes

Notre expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de phytobactériologie à l'université Saad Dahleb de Blida et concerne l'étude d'antagonisme *in planta* de *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 isolé à partir d'une plante spontanée (Krimi et al., 2012) vis-à-vis des trois souches phytopathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* (E2x, E6 et C58).

1. Matériel biologique

1.1. Culture des bactéries antagonistes et pathogènes

Tout au long de notre étude, toutes les bactéries pathogènes et antagonistes ont été cultivées sur le milieu de culture LPGA.

La bactérie antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 et les pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* souches E6 ; E2x et C58 ont été préparés à partir des cultures préalablement purifiées. La purification est une opération nécessaire afin d'assurer de la pureté de ces souches pour leur utilisation ultérieure. La méthode consiste à faire des étalements sectoriels avec la culture bactérienne de chaque souche à l'aide d'une anse, à raison de 3 secteurs par boîte de Pétri contenant le milieu LPGA, suivie d'une étape d'incubation à 28-30°C jusqu'à l'obtention de clones purs.

1.2. Souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées

Les trois souches bactériennes pathogènes utilisées dans la présente étude appartiennent à la collection du laboratoire de phytobactériologie (département d'Agronomie de l'Université Saad Dahleb, Blida). Parmi ces souches, deux souches locales E2X et E6 ont été isolées à partir des tumeurs de « crown gall » issues des espèces d'eucalyptus (Krimi et al., 2006) et une souche de référence C58 isolée de *Prunus* (Dickey, 1961).

2. Test du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens*

Pour tester le pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (la souche de référence C58, et les souches E2X et E6), la plante test utilisée est le Kalanchoë (*Kalanchoë daigremontiana*). Les limbes foliaires de la plante *Kalanchoë daigremontiana* sont fréquemment utilisés pour vérifier la virulence d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Ainsi, on a inoculé les feuilles de la plante *Kalanchoë daigremontiana* avec l'eau distillée stérile et avec la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 afin de vérifier son pouvoir pathogène sur les limbes foliaires de la plante.

2.1. Inoculation des feuilles de *Kalanchoë*

L'inoculation sur les plantes test est réalisée à l'aide d'une culture bactérienne âgée de 48h et cultivée sur le milieu LPGA (Hildebrand et *al.*, 1988). La souche à tester est déposée sur des blessures réalisées aseptiquement sur le limbe des jeunes feuilles de *Kalanchoë* d'une couleur vert tendre.



Figure 6: l'inoculation des feuilles de la plante de *Kalanchoë* au niveau des blessures par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*.

3. Test d'antagonisme *in Planta*

Plusieurs études ont montré que certains microorganismes ont un effet antagoniste *in vitro*, et réussissent à produire le même effet *in vivo* (Besnard et Davet, 1993 ; Bardin et *al.*, 2003).

Nous avons vérifié l'effet d'antagoniste des *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 contre les souches phytopathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* E2X, E6, et une souche locale C58.

3.1. Matériel végétal

La tomate (*Lycopersicon esculutum*) appartient à la famille des solanacées. Le choix de tester l'activité antagoniste sur la tomate, est dû au fait qu'elle constitue une plante hôte commune utilisée lors des expérimentations pour les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium spp* car en cas de réponse positive, elle développe des tumeurs en temps très court et facilement a mesuré.

La variété testée est la 67703 F1 (var. hybride), les semences de tomate utilisées sont fournies par la pépinière (de Staoueli).

3.2. Méthodologie de semis

Les semences de tomate ont été désinfectées dans une solution constituée d'eau distillée stérile et d'environ 2 à 3 gouttes d'eau de javel à 12⁰, la désinfection est suivie de 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile. Les graines sont séchées sur papier filtre stérile (Djellout.,2011).

Pour le semi, le substrat utilisé est un mélange de 2/3 de terre végétale récupéré au niveau de la station expérimentale et 1/3 de tourbe. La stérilisation du substrat a été réalisée selon la méthode Rapilly (1986), qui consiste à stériliser le sol à 2 reprises pendant une période d'une heure à 250⁰C au four Pasteur. En intervalle de 24h (Rapilly, 1968).

3.3. La pré-germination

Les semences désinfectées ont été disposées dans des boîtes de Pétrie stérilisées dans un four pasteur à 250⁰ pendant 20 min.

Ces graines ont été imbibées à l'eau distillé stérile sur un papier Wattman stérile, ces dernières ont été menées sous une mini-serre réglé à une température de 25⁰C, jusqu'à germination (2 à 3 semaine) (Figure 5).

Cette opération a été suivie par une imbibition régulière à l'eau distillée stérile.

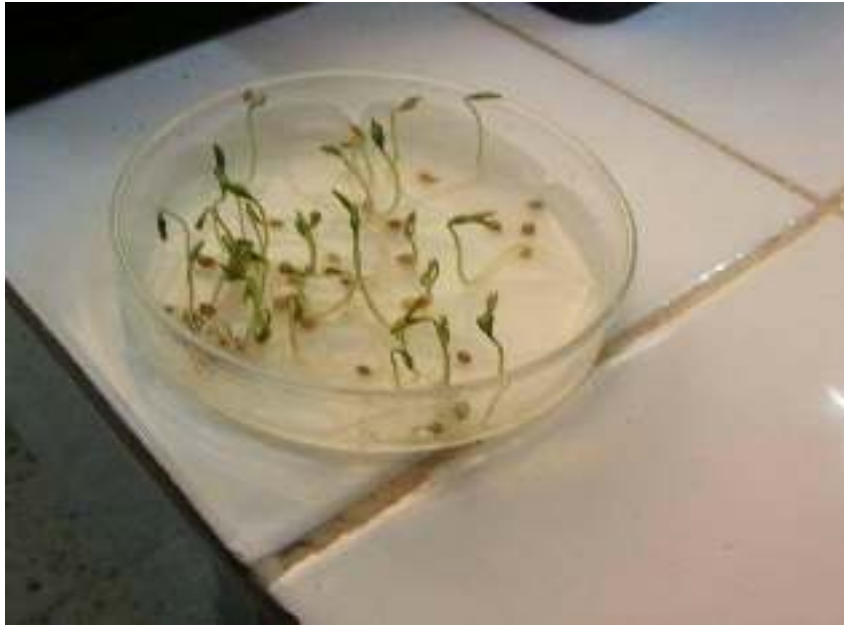


Figure 7 : les semences pré-germées après 3 semaines.

3.4. La Transplantation des graines germées

Après la pré-germination les graines germées ont été transplantées dans des plaques alvéoles contenant du sol arrosé 48h avant l'opération avec l'eau du robinet stérile, cette étape nécessite 2 à 3 semaines.

Une autre transplantation a été réalisée dans des gobelets en plastique (10cm ×6.5cm) a raison de 200g de sol par pot.

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

L'irrigation des plantes de tomate a été réalisée a l'eau du robinet stérile suivant les besoins des plantes (en maintient un niveau adéquat d'humidité du sol).

3.5. La sélection des plantes pour l'inoculation

Les plantes de tomate ont été choisies au stade 2 à 3 vraies feuilles pour l'étape de l'inoculation par la bactérie endophyte, pour que l'ensemble des plantes soient homogène et de même stade phénologique.

3.6. Dispositif expérimentale

L'essai de l'antagonisme *in planta* a été réalisé sous serre selon un dispositif expérimental, qui est en bloc randomisé avec plusieurs traitements, un plan avec vingt répétitions pour le test d'antagonisme, dix répétition pour les témoins positive et cinq répétition pour le témoin négatif. Un total de 100 plants a été testé.

Les traitements sont les suivant :

T1 : Témoin négatif représenté par les 5 plantes inoculées avec l'eau distillé stérile.

T2 : Trempage des 60 plants de tomate dans la suspension bactérienne d'antagoniste puis inoculé par les souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens* E6 ; E2x et une souche de référence.

T3 : Trempage des 5 plants de tomate dans la suspension d'antagoniste qui est la souche PS1

T4 : Représente les 30 plants de tomate inoculés directement avec la suspension de souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens* souche E6, E2X et C58.

4. La souche antagoniste

La souche endophyte utilisée pour notre essai est la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1. Cette souche a été cultivée sur le milieu LPGA puis incubée à 28°C.

La suspension de la souche bactérienne endophyte a été préparée à partir d'une culture préalablement purifiée. Pour l'étape de bactérisation, nous avons préparé des suspensions bactériennes à une densité optique de 0.47 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond à une densité cellulaire de concentration 10^7 CFU/ml (Djellout. 2011).

5. Souches d'*Agrobacterium tumefaciens* à inoculer

Les suspensions des souches bactériennes d'*Agrobacterium tumefaciens* E6 ; E2X et C58 à inoculer ont été préparée à partir d'une culture préalablement purifiées. La pureté de la souche a été vérifiée sur le milieu LPGA en réalisant plusieurs repiquages successifs, puis incubation à 28°C (Hildebrand et al., 1988).

Pour l'étape d'inoculation, nous avons préparé des suspensions bactériennes des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* E6, E2X et C58 à une densité optique qui est respectivement

de 0.14 ; 0.20 et 0.18 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond à une densité cellulaire de 10^6 bactérie/ml, confirmé par plusieurs travaux effectués sur *Agrobacterium tumefaciens* (Portier, 2004).

6. Techniques d'inoculation des plantules de tomate *in planta*

Au stade deux à trois vraies feuilles, les plants de tomate sont retirés de leur pots pour créer des microblessures, rincés à l'eau du robinet pour éliminer l'excès de sol, puis trempés pendant 24h dans une suspension bactérienne de *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 à une densité optique de 0.47CFU/ml qui correspond à une concentration de 10^7 CFU/ml(Figure6).

Pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne de la souche antagoniste, la plupart des études de basent sur le ratio de 10 :1 qui correspond pour l'antagoniste un ration dix (10) fois supérieur par rapport à celui de la souche pathogène (Eastwell et *al.*, 2006). Comme le cas dans notre expérimentation.

Le témoin négatif correspond à des plantes trempées dans de l'eau distillé stérile.

Après 24h les plantules de la tomate sont re-transplantés dans leur pots, et pour le rappel de bacterisation avec une micropipette de volume 100µl on a arrosé les racines de chaque pot avec la suspension de la bactérie endophyte souche PS1.



Figure 8 : plantule de tomate trempée dans la suspension bactérienne d'antagoniste.

Après 24h, les plantules de la tomate traitées par l'antagoniste seront inoculées par les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* E6, E2X et C58 à la concentration cellulaire 10^6 CFU/ml.

La méthode d'immersion ou de trempage des racines des plantes par la souches PS1a été utilisés par plusieurs auteurs à savoir : Bouzar et *al.*, 1991 ; Vicedo et *al.*, 1993 ; Guessas et Hadadji, 2009 ; Polymnia et *al.*, 2004 ; Long et *al.*, 2004 ; Djellout, 2011).

Avec un scalpel stérile, on réalise trois blessures dans la tige des plantules de tomate, à intervalles de 1 cm à partir de l'extrémité en croissance. Un volume de 0.5ml d'eau distillé stérile (témoins) ou de la suspension bactérienne de l'agent pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens*, va être introduit au niveau des blessures (Kenneth et *al.*, 2006). La tige inoculée est ensuite enveloppée avec du papier aluminium stérile afin d'éviter la dessiccation de l'inoculum (Kenneth et *al.*, 2006). Les plantules sont maintenues en serre à une température de 25-27°C, puis inspectées pour le développement de la tumeur.

4. Lecture de résultats

L'infection par les *Agrobacterium tumefaciens* se manifeste principalement par la formation d'une tumeur au niveau du point d'inoculation (Bouzar et *al.*, 1991). Dans notre expérimentation nous avons suivie les plantules de la tomate inoculées au niveau du collet pendant cinq semaines.

Chaque semaine, on suit attentivement et de près les plantules traitées par la prise des photos de développement ou non des symptômes et à la fin c'est-à-dire à la cinquième semaine, on a mesuré seulement la taille de tumeurs formées.

5. Analyses statistiques des résultats

Les résultats obtenus pour le test d'antagonisme *in planta* de la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* Souche PS1 envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* souches E6, E2X et C58 ont été reportés en premier lieu sur EXCEL puis analysés par le logiciel SYSTAT vers. 12, SPSS 2009 systat afin d'analyser tous les paramètres considérés.

Les analyses de covariance ont été conduites en considérant les tailles des tumeurs comme moyennes et les souches a testées comme les variances.

Résultats et interprétation

1. Résultats du Test de virulence des souches d'*Agrobacterium tumefaciens*

Toutes les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, les deux souches locales (E6, E2x) et la souche de référence (C58) testées pour leur pouvoir pathogène sur les feuilles de *Kalanchoë* (*Kalanchoë daigremontiana*) se sont révélées pathogènes.

Le test de virulence a montré que les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées induisent la production des tumeurs sur les feuilles de *Kalanchoë* à partir de la 3^{ème} semaine après l'inoculation (Figure 9), par rapport au témoin qui ne montre qu'une légère cicatrisation de la blessure et qui correspondait aux limbes des feuilles de *Kalanchoë* blessées et inoculées de l'eau distillée stérile (Figure 10).

Le test de vérification du pouvoir pathogènes des souches *Agrobacterium tumefaciens* Choisies lors de cette étude a été fréquemment utilisé pour vérifier la virulence d'*Agrobacterium tumefaciens*. sur limbes foliaires de la plante *Kalanchoë* (*Kalanchoë daigremontiana*) (Moore et Bouzar, 1988).

Ces tumeurs n'ont pas les mêmes caractéristiques, ni de taille ni de vitesse d'apparition que celles induites par la souche E6. En effet, cette dernière produit des tumeurs plus importantes et plus rapides (après deux semaines d'inoculation) que les autres souches d'*Agrobacterium tumefaciens* testées lors de cette étude sur les feuilles de *Kalanchoë* (Figure 9).

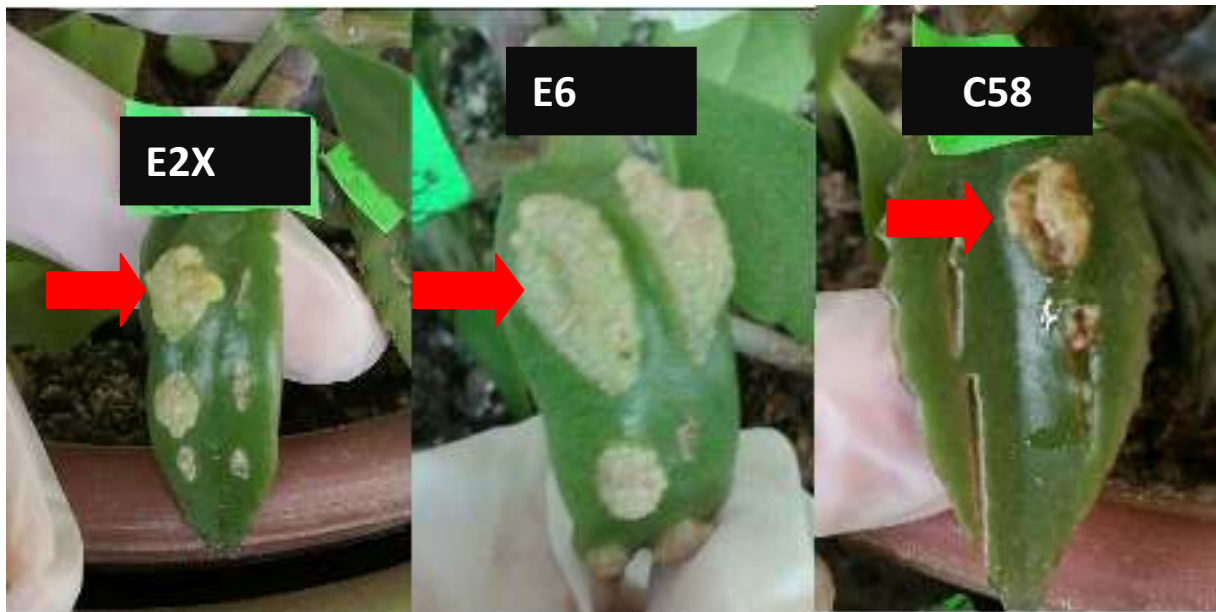


Figure 9 : Test de virulence des différentes souches d'*A. Tumefaciens* C58, E6 et E2X sur les feuilles de *Kalanchoë* (*Kalanchoë daigremontiana*). Photo prise 3 semaines après l'inoculation. Des tumeurs sont visibles après inoculation avec les souches d'*A.tumefaciens*.



Figure 10: l'inoculation des feuilles de *Kalanchoë* (*Kalanchoë daigremontiana*) avec l'eau distillée stérile (Témoin).

2. La réponse de la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 au test de pathogénicité sur les limbes foliaires de *Kalanchoë* (*Kalanchoë daigremontiana*)

Cette réaction basée sur l'inoculation des feuilles de *k.daigremontiana* avec la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1, est négative, elle ne montre qu'une légère cicatrisation de la blessure au niveau du point d'inoculation (figure 11).



Figure 11: l'inoculation des feuilles *Kalanchoë* (*Kalanchoë daigremontiana*) avec *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1. Photo prise après 3 semaines d'inoculation.

Un test d'hypersensibilité sur limbes de tabac a été réalisé par des travaux antérieurs pour vérifier la virulence de la souche PS1. Ce test s'est montré négatif ce qui confirme la non pathogénicité de la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* (Djellout, 2009 ; Alim, 2011)

3. Résultats de l'essai de bioprotection de la tomate contre la galle du collet *in planta* par l'utilisation de la bactérie endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1

Le test d'antagoniste *in planta* s'est réalisé sur les plantules de tomate, (variété hybride 67703 F1), inoculées avec *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 pour le but de confirmer le pouvoir antagoniste et bioprotecteur *in planta* de cette souche à l'égard de la collection des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* choisies (E6, E2X et C58).

En effet, les résultats obtenus nous ont permis de constater une diminution de la sévérité des symptômes du crown gall sur les plantules de tomate, préalablement trempées dans la suspension bactérienne de *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 par rapport au témoin positif qui correspond aux plantules de tomates inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, et au témoin négatif trempées dans l'eau distillée stérile (Figure 12).

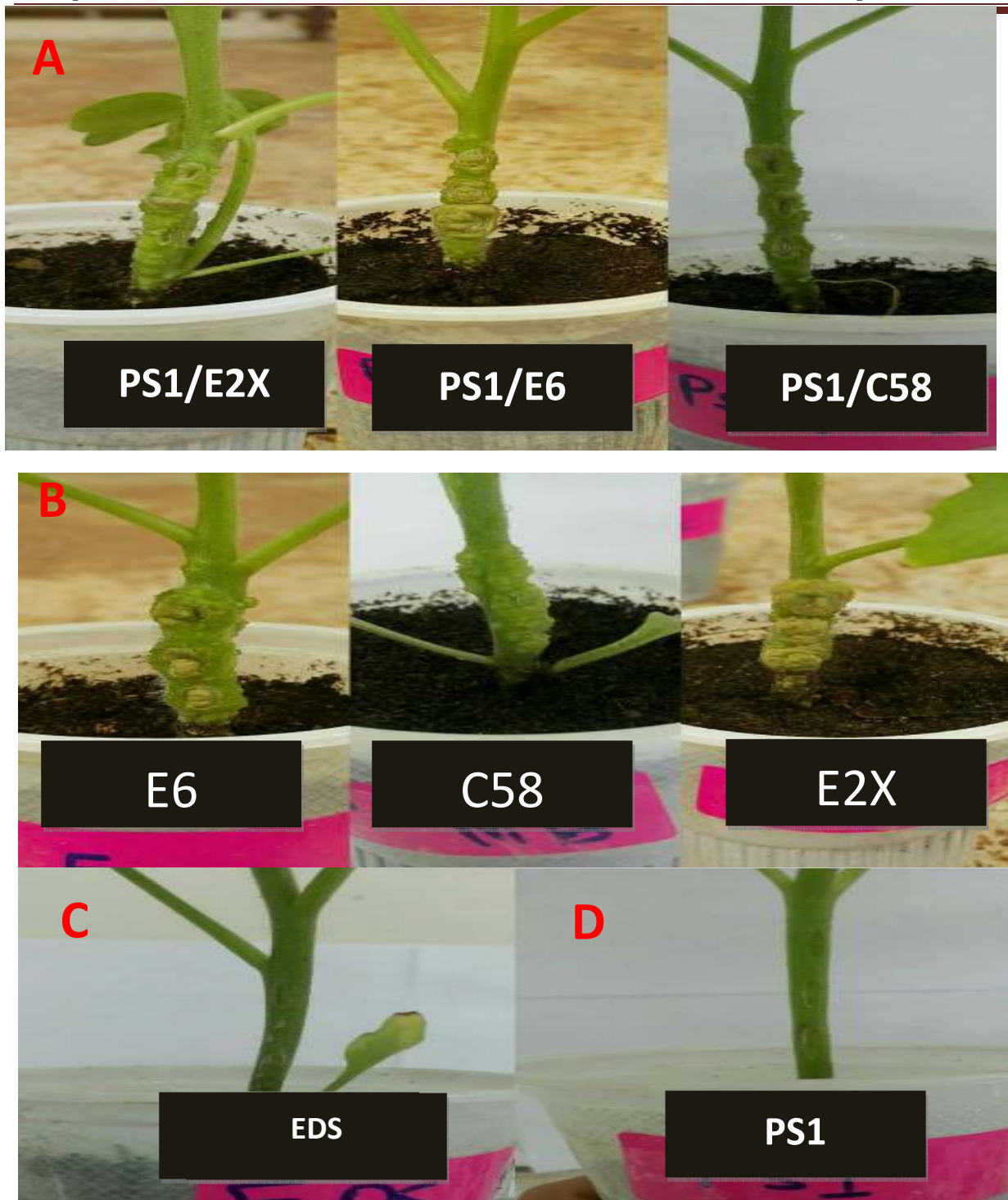


Figure 12 : Réponses des plantules de tomate aux différents traitements (photos prises à la 5^{ème} semaines).

(A : plante trempée dans la souche antagoniste puis inoculée par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ; B : plante inoculée directement par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ; C : plante inoculée avec l'eau distillée stérile ; D : plante inoculée avec *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1).

La formation des tumeurs a été induite à la deuxième semaine après l'inoculation par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, par rapport aux plantules trempées préalablement dans la suspension bactérienne d'endophyte souche PS1, qui ont parfois développé des tumeurs à partir de la 4^{ème} semaine.

Nous avons remarqué une variabilité dans la taille des tumeurs si on compare les plantules trempées dans la suspension bactérienne *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 (figure 12, A) par rapport aux témoins positifs plantules inoculés directement par les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* souches E2X, E6 et C58 (figure 12, B). dont la taille des tumeurs des plantules trempées dans la suspension bactérienne PS1 est plus faible que la taille des tumeurs des plantules inoculées directement par les souches d'*A. tumefaciens*.

La souche E6 d'*A. tumefaciens* est relevée la plus virulente par rapport aux souches d'*A. tumefaciens* C58 et E2X, Un effet retardé s'est manifesté et a permis d'influencer la virulence des souches d'*Agrobacterium spp.*

L'exemple typique concernant cet effet est généré par la souche E6 d'*Agrobacterium tumefaciens*, qui est la plus sévère, où l'induction des tumeurs a été observé à la deuxième semaine pour les plantules inoculées directement avec la souche E6 et à partir de la quatrième semaine pour les plantules trempées dans la suspension bactérienne PS1.

La souche d'*A. tumefaciens* E6 est relevée la plus virulente où la taille des tumeurs dépassent les 7mm de diamètre par rapport aux souches d'*A. tumefaciens* C58 et E2X. Cependant, à travers les résultats obtenus, nous avons remarqué que les plantules de tomate inoculées par les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* souche E2X et E6 sont virulentes avec une taille des tumeurs correspond successivement a 5 et 7 mm de diamètre par rapport à la souche de référence C58 qui présente une taille de tumeurs correspond à 4.5 mm de diamètre.

La taille des tumeurs développées sur les plantules traitées par la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1, puis inoculées par la souche d'*A. tumefaciens* souche E6 n'a pas dépassée les 4.33 mm alors que les plantules inoculées directement par la souche d'*A. tumefaciens* E6 ont présenté des galles de 9.33 mm de diamètre, même pour les autres traitements on observe une diminution de la taille des tumeurs on comparaison avec le témoin positif (tableau 2).

Plantes	Traitement antagoniste/Pathogène			témoin positif				témoin négatif	
	PS1/C58	PS1/E6	PS1/E2X	C58	E6	E2X	PS1	ED	
1	2,33	3,66	2,66	4,33	7,66	5,33	0	0	
2	1,67	3,66	2,33	3,33	6,33	4,33	0	0	
3	1	4,33	3	1,66	5,33	3	0	0	
4	1	3,33	1,33	5,33	5,66	3,33	0	0	
5	2	4,33	2,33	4,33	4,66	10,33	0	0	
6	2,66	6	2,66	2,66	5,66	5,33			
7	1,33	4,33	1,66	4,66	5,66	5			
8	1	3,66	2,66	3,33	6	4,66			
9	1,66	4	2	3,66	9	4,33			
10	2,66	3	2,33	2,33	9,33	6			
11	1	1,66	2,66						
12	1,66	1,66	3						
13	1	3	2,66						
14	1,66	3,33	2,33						
15	1,33	3	3,33						
16	1	2,33	3						
17	0,66	2,33	3,33						
18	2,33	2,66	2,33						
19	1,33	2,33	Plante morte						
20	Plante morte	1,33	Plante morte						

Tableau 2 : la moyenne de diamètre (mm) des tumeurs pour chaque traitement.

L'application du modèle GLM sur les résultats d'antagonisme bactérien a permis de déduire que les effets antagonistes de la souche endophyte testée sont hautement significatifs selon les différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* inoculées ($P=0,000$; $p < 0,05$).

Tableau 3 : Modèle GLM appliqué sur l'effet de la souche antagoniste PS1 et les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de tomate testées par rapport au diamètre des tumeurs.

Source	Somme des carrés	d.d.1	Carré moyens	F-ratio	P
Traitement	310.073	7	44.296	37.105	0.000

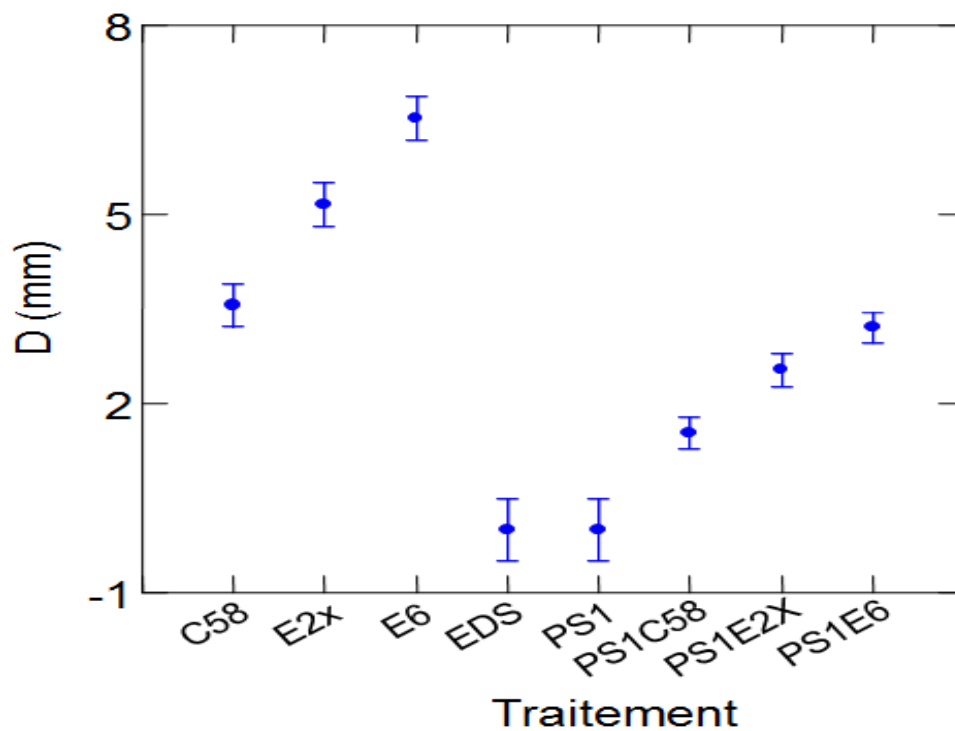


Figure 13 : Modèle GLM appliqué sur le diamètre des tumeurs pour chaque traitement.

D : diamètre de tumeur (mm)

EDS : eau distillé stérile

L'essai *in planta* est très important pour la confirmation de l'effet antagoniste de la souche PS1 qui se traduit soit par l'absence de tumeur aux points d'inoculation ou par la formation des tumeurs de faible taille.

Nous avons pu constater que la souche PS1, a retardé la formation et l'induction des tumeurs au niveau des plantules de tomate trempées au préalable, dans la suspension bactérienne d'endophyte, comparées aux témoins positifs qui correspondent aux plantules de tomate inoculées directement avec les souche d'*Agrobacterium tumefaciens* Ou aux témoins négatifs trempés dans l'eau distillée stérile.

Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* inoculées sur les plantules de tomate après trempage dans la souche PS1, ont développé des tumeurs qui ne dépassent pas en moyenne les 3.5 mm de taille comparées aux plantules qui n'étaient pas traitées par les souches PS1 ou bien les plantules qui ont été traitées par l'eau distillée stérile. Ces derniers ont développé des tumeurs de taille qui dépassent en moyenne 5,7 mm de diamètre (figure 13).

La souche endophytes PS1 de *Pseudomonas brassicacearum* a été plus efficace sur les plantules inoculées par la souche pathogène d'*A.tumefaciens* C58 où elle montre des tumeurs moins importantes (1.7mm), que les plantules inoculées par les souches d'*A.tumefaciens* E6 (3.3mm).

Les résultats de notre expérimentation présentent des valeurs très hautement significatives malgré qu'on ait travaillé sur une variété hybride (peu sensible).

Nos résultats corroborent avec la bibliographie qui rapporte que le genre *Pseudomonas* peut coloniser les tissus des plantes (Bossis et *al.*, 2000), connue pour leur effet antagoniste et leur pouvoir protecteur sur un grand nombre de culture (Nielsen et *al.*, 1998 ; Dorrance et *al.*, 2004). ces derniers (les *Pseudomonas spp.*) possèdent de nombreux traits qui les rendent bien adaptés comme agent de lutte biologique par la production de métabolites qui comprennent des enzymes lytiques, des auxines, des sidérophores et des antibiotique qui agissent directement sur l'agent pathogène.

Discussion

La présente étude a porté sur l'évaluation de l'activité antagoniste *in planta* de la bactérie endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 envers des souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* sur des plantules de tomates.

Cette étude a été conduite dans le but ultime de recherche des agents de lutte induisant une résistance systémique chez les végétaux atteints de maladies bactériennes.

La réalisation du test de pathogénicité sur la plante Kalanchoë (*Kalanchoë daigremontiana*) a révélé que les trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sont tumorigènes et cela est confirmé par la formation des tumeurs, des galles au niveau des feuilles de Kalanchoë.

Cette plante modèle est fréquemment utilisée dans les tests biologiques des espèces du genre *Agrobacterium* (Djellout, 2011 ; Tolba et Soliman, 2013).

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie à Gram-négatif vivant dans le sol. C'est un pathogène de différentes plantes dicotylédones qui provoque l'apparition de tumeurs au point de l'infection (Zonia et al., 2001).

Le crown gall est la maladie prédominante la plus rencontrée dans les pépinières d'arbres fruitiers, de plantes ornementales, de la vigne et d'arbres forestiers dans plusieurs régions du monde affectant fortement le rendement commercial (Zonia et al., 2001 ; Krimi et al., 2006).

Une fois la plante transformée, la tumeur se développe même si la bactérie n'est plus présente. La gravité de ces dégâts a incité le déploiement de grands efforts pour trouver des moyens de luttés adéquates et efficaces. (Raio et al., 1997)

Les techniques pour contrôler la maladie sont donc surtout préventives. L'utilisation d'un matériel de propagation sain, il est préconisé d'utiliser des plantes exemptes de tumeur, il faut détruire les plants présentant de tels symptômes et l'utilisation des variétés ou d'espèces résistantes ou peu sensibles au crown gall (Lacroix, 2003).

Une méthode de lutte efficace envers un agent pathogène est celle qui garantit la protection de la plante avec un coût économique acceptable tout en préservant l'équilibre de

l'écosystème (Lepoivre, 2003). Les techniques de lutte microbiologique par l'utilisation de pesticides d'origine microbienne, font appel à deux principes ; la réduction de l'inoculum infectieux pendant la phase de conservation ou de survie du pathogène et/ou l'interférence avec le processus d'infection de la plante hôte.

Les bactéries endophytes sont localisées spécifiquement dans les espaces intercellulaires des tissus épidermiques, elles ont même été trouvées dans les tissus conducteurs de la sève (Bowen, 1979 ; Bennett et Lynch, 1981). Elles adhèrent aux cellules de la plante par des filaments, montrant ainsi qu'il existe une compatibilité structurale entre l'endophyte et les parois des cellules végétales (Bowen, 1979). Cependant, d'autres bactéries endophytes peuvent être localisées à l'intérieur des cellules végétales (Jacobs *et al.*, 1985) et dans les tissus vasculaires (Bell *et al.*, 1995).

Les bactéries endophytes vivant dans les tissus sains des plantes sont relativement une source potentielle et un produit naturel pour des fins d'exploitation dans l'agriculture, la médecine, et d'autres industries (Strobelet *et al.*, 2004). En effet, certaines souches appartenant aux genres bactériens telluriques comme les *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, et *Azospirillum* se sont dévoilés expérimentalement des agents efficaces dans le cadre de la lutte biologique (Lodewyckx *et al.*, 2002 ; Smadja *et al.*, 2004). Ces endophytes peuvent assurer une bioprotection de la plante envers certaines agressions parasitaires (Berg *et al.*, 2005).

En effet, le microorganisme du genre *Pseudomonas* est généralement une bactérie tellurique, et peut même coloniser les tissus des plantes, il est connu pour son effet antagoniste et son pouvoir protecteur sur un grand nombre de cultures (Ligon *et al.*, 2000).

Des travaux précédents mis en évidence la capacité de plusieurs *Pseudomonas* et *Bacillus* à réprimer la croissance bactérienne des *Agrobacterium spp.* (Djellout, 2011).

D'après Alim et Djellout (2011), les résultats d'analyse moléculaire obtenus après séquençage de l'ADN ribosomal 16S a permis de dégager deux genres majeurs très importants ; le genre *Bacillus sp.* et le genre *Pseudomonas sp.* Auxquels nos isolats endophytes appartiennent.

Les *Pseudomonas spp.* ont suscité un grand intérêt. Elles sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents pathogènes *in*

vitro (Dorrance et al., 2004). Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antimicrobiens qui comprennent des enzymes lytiques, des auxines, et des sidérophores (Sunish Kumar et al., 2005 ; Ongena et Thonart, 2006).

Dans le sol, les *Pseudomonas spp.* représentent une fraction non négligeable de la communauté microbienne, partageant leur milieu avec des commensaux représentés principalement par les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve dans tous les horizons, plus particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique (Allaire, 2005).

Dans notre travail, on a testé *in vivo* l'effet antagoniste de la bactérie endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche (PS1). Ainsi, nous avons réalisé notre étude d'antagonisme bactérien à l'encontre des trois souches virulentes d'*Agrobacterium tumefaciens* sur la tomate qui répond efficacement à ces organismes pathogènes.

Un effet protecteur a été observé pour les plantules de tomate trempées dans la suspension antagoniste vis-à-vis des souches tumorigènes d'*Agrobacterium tumefaciens* E6, E2X et une souche de référence C58 où la taille de tumeur est réduite (la taille des tumeurs ne dépassent pas au moyenne les 3.5mm de diamètre) et parfois même élimination complète des tumeurs par rapport aux plantules inoculées seulement avec les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* où la taille des tumeurs observé dépassent les 7mm.

D'une manière générale, les résultats obtenus à travers l'étude d'antagonisme *in vivo*, nous ont permis de constater une diminution et parfois même une absence totale de symptômes de la gall du collet au niveau des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne endophyte, comparées aux témoins positifs qui correspondent aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et aux témoins négatifs trempés dans l'eau distillée stérile.

Ces résultats suggèrent que la bactérie antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 inoculée aux plantules de tomate, se multiplie au niveau de la rhizosphère, et probablement pénétré à travers le système racinaire, elle est introduite par voie systémique et s'installe dans les tissus de la tomate comme des hôtes normaux. Le succès de cette

colonisation rhizosphérique et endophytique et d'une telle réponse antagoniste est certainement dû au fait que ce sont des bactéries isolées des tissus des plantes et elles se sont adaptées facilement à ce milieu.

Nos résultats concordent avec ceux de Djellout (2011) qui a évalué l'effet antagoniste des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*. ces dernières conduisent à une diminution et même une absence totale de symptômes de la galle du collet au niveau des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'endophytes ayant une concentration cellulaire de 10^7 CFU/ml (Djellout, 2011).

Le délai de 24h dans nos conditions expérimentales *in planta*, a permis de retarder la formation et l'induction des tumeurs au niveau des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne endophyte, comparés aux témoins positifs qui correspondent aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. ces dernières ont induit la formation des tumeurs à la deuxième semaine après l'inoculation par rapport aux plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste, qui ont parfois développés des tumeurs à partir de la quatrième semaine, et cela été influence par la sévérité de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, par exemple la souche E6 d'*A.tumefaciens*, qui est la plus sévère, ou l'induction des tumeurs a été observé a la 2^{ème} semaine pour les plantules inoculées directement avec la souche E6 et a partir de la 4^{ème} semaines pour plantules trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* (PS1).

Le traitement par ces souches de *Pseudomonas* avec une concentration cellulaire plus élevée que celle du pathogène a pu inhiber la formation des galles sur la tige de la tomate (Djellout,2011).

L'efficacité de *Pseudomonas spp* réside dans la concentration cellulaire, qui doit être plus élevée que celle du pathogène, et dans le temps attribué à l'antagoniste qui doit être plus large que les 24h (Pal Bais et al. ,2004; Hammami et al. ,2009; Djellout, 2011).

Le succès de cette protection dépend du moment de l'application de l'antagoniste .Ainsi, l'inoculation des plants de tomate avec la suspension d'antagoniste protecteur bien avant les agrobactéries virulentes leur confère une protection intéressante. Ce délai, dans nos conditions expérimentales, est de 24heures. Les plants sont ainsi mis en alerte ``priming`` suite à la reconnaissance de la bactérie pour réagir de manière systémique et plus rapidement

vis-à-vis de l'expression des gènes de défense et de l'accumulation de produits inhibiteurs pour le pathogène après la perception d'un agent pathogène. Il apparaît clairement que ce phénomène de priming fasse partie intégrante des deux types de réactions de défense systémique, SAR et ISR. (Van Wess et *al.*, 1999 ; Ton et *al.*, 2007). Nos résultats renforcent ce concept dans le contexte spécifique de l'ISR.

Cette protection n'était pas durable car elle a juste retardé l'induction des tumeurs, et elle n'était pas maximale, car il y a eu quand même formation des tumeurs pour quelques plantules même si ces tumeurs étaient de petite taille.

Le changement dans les métabolismes de la plante hôte exige un délai entre l'application de l'agent protecteur et celle du pathogène. Ce délai dépend du trio plante hôte, agent protecteur et agent pathogène (Ryan et *al.*, 2004).

D'une manière générale, cette capacité d'inhibition chez les *Pseudomonas spp* peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antimicrobiens et de sidérophores. Ces derniers, permettent la compétition pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie (Allaire, 2005). On note également, pour certaines souches de ce groupe de bactéries, une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (Jourdan et *al.*, 2008).

La présence de la plante hôte fait que l'agent protecteur exige d'autres facteurs pour exercer son antagonisme, notamment une période suffisante pour induire la résistance des plantes à l'attaque par les pathogènes.

La protection conférée aux plantules de tomate inoculées par les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* (E2X, E6 et C58) au niveau des blessures induites sur la tige alors que l'inoculation par la bactérie antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 a été faite au niveau racinaire, ce qui suggère un effet d'induction systémique de la résistance (ISR), tant que cette dernière n'est pas en contact avec l'agent phytopathogène (Van Loon et Bakker, 2005).

La colonisation rhizosphérique et endophytique ainsi que la production d'antibiotiques et la capacité des espèces de *Pseudomonas* à induire une résistance systémique chez la plante auraient joué un rôle important dans la bioprotection de la tomate (Jourdan et *al.*, 2008).

L'ISR s'est avérée être induite par des microorganismes variés et plus particulièrement par des rhizobactéries. Celles-ci incluent des bactéries à Gram-négatif qui sont les plus étudiées dans le contexte de l'ISR.

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

Le rôle des antibiotiques produits par les bactéries endophytes semble être important dans les mécanismes de suppression de la maladie. Kemper et ses coll. (année) ont démontré que la résistance induite par un prétraitement avec *Pseudomonas spp* peut être impliquée dans le mécanisme de suppression de flétrissement bactérien de la pomme de terre (Zonia et Raio, 1999). La suppression de la maladie montrée dans notre expérimentation peut être aussi le résultat de la résistance systémique induite par la bactérie *Pseudomonas brassicacearum*.

Notre étude a confirmé le pouvoir antagonistes *in planta* de la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 envers les trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* souche E2X, E6 et C58. Ces résultats sont très prometteurs et suggèrent des études plus approfondies afin de mettre en place une formulation permettant leur homologation et par la suite leur utilisation.

Bien que la lutte biologique par l'utilisation des bactéries antagonistes présente l'une des méthodes de contrôle des maladies la plus recherchée, elle peut soigner les problèmes dus aux pressions biotiques et abiotiques exercées sur la plante surtout si ces pressions n'ont pas des achèvements efficaces. La conscience du coût environnemental des pratiques chimiques et les craintes formulées par le consommateur ne peuvent trouver des solutions dans la lutte biologique.

Annexes

Introduction

Induction of resistance by *Pseudomonas brassicacearum* strain PS1 in the pathosystem: tomato /*Agrobacterium tumefaciens*.

Abstract

This work aims to study the antagonist *in vivo* to the endophytic bacteria strain *Pseudomonas brassicacearum* PS1 to three tumorigenic stem C58, E6 and E2x of phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens*.

The antagonism *in planta* testing was performed on tomato seedlings (*Lycopersicon esculantum*) F1 hybrid variety 67703 in stage two to three true leaves.

The results showed a decrease of development of the symptoms of crown gall disease on tomato seedlings previously soaked in a bacterial suspension of endophyte and inoculated by *Agrobacterium tumefaciens* strains compared to positive controls which correspond to the tomato seedlings directly inoculated with the *Agrobacterium tumefaciens* strains and negative controls soaked in sterile distilled water.

The time allocated to endophyte strains (24) gave better control of crown gall. PS1 strain showed a remarkable protective effect, the size of tomato seedlings tumors dipped in suspensions antagonistic bacteria does not exceed the average by 3.5 mm diamètre against seedlings inoculated directly by *Agrobacterium tumefaciens* strains have tumors that exceed 7 mm in diameter.

Antibiotic production and the ability of *Pseudomonas spp.* inducing systemic resistance in plants could play an important role in the suppression of the crown gall disease.

These results are very interesting and suggest the use of this endophyte *Pseudomonas spp.* as a biocontrol agent against plant diseases and biocontrol of plant health.

Keywords: antagonist, endophyte *Pseudomonas brassicacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, gall, biocontrol.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre II

Matériel et méthodes

Chapitre III

Résultats et interprétation

Chapitre IV

Discussion

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La galle du collet est une maladie causée par les agrobactéries tumorigènes. Cette maladie est responsable d'épidémies dans plusieurs régions du monde. Elle présente jusqu'à nos jours, une grande importance économique pour les pépinières et les vergers.

L'utilisation des agents de lutte biologique constitue une approche écologique très prometteuse contrairement aux traitements chimiques, car l'utilisation des bactéries antagonistes n'interfère pas l'équilibre de la biocénose. Les antagonistes colonisent les tissus de la plante et ils ont des effets stimulateurs sur l'hôte. Ces souches antagonistes peuvent être facilement appliquées dans les pratiques des pépinières par l'immersion des racines des jeunes plantes et boutures dans les suspensions bactériennes avant la plantation (Limansaka, 2012).

Le travail de ce mémoire avait pour objectifs d'étudier le pouvoir antagoniste *in vivo* de la bactérie endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 envers trois souches tumorigènes de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*, ainsi de contribuer à faire progresser les connaissances sur les interactions bénéfiques entre les plantes et les microorganismes.

Agrobacterium tumefaciens est la bactérie phytopathogène qui induit la formation d'une tumeur du collet au niveau du site d'infection de la plante. Ces tumeurs dont l'extension peut-être parfois considérable, détournent les flux de métabolites de la plante, abaissant par-là même la croissance, et le rendement. Sur des tissus jeunes, leur développement peut conduire à un « étranglement » des tiges ou des racines, et à un arrêt de la circulation de la sève.

Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes attaquées par cette bactérie phytopathogène en limitant sa croissance. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique. Durant les trois dernières décennies, les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont été identifiées comme agents potentiels de biocontrôle, à l'encontre des phytopathogènes (Schroth et al., 1992).

Ces capacités antagonistes des *Pseudomonas spp.* sont dues à différents mécanismes, comprennent la production d'antibiotiques contre les bactéries pathogènes (Thomashow et al., 1990), la réduction de fer disponible pour les phytopathogènes présents dans la rhizosphère (Scher et Baker, 1982), la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante. La séquestration

du fer pour les plantes par les sidérophores. La production de phytohormones ou encore par solubilisation de formes de phosphore insolubles.

L'induction d'une résistance systémique est l'un des mécanismes d'action pouvant être assuré par les bactéries endophytes et plus précisément par les *Pseudomonas spp.* Ce type de résistance peut protéger la plante même si l'endophyte n'est pas en contact avec l'agent pathogène (vanloon et bekker, 2005).

C'est l'un des plus importants mécanismes de biocontrôle, ce phénomène consiste en l'activation d'un certain nombre de gènes qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance (compant et al, 2005). La bactérie *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 a été examinée pour son pouvoir antagoniste *in planta*, dont elle a pu supprimer ou réduire la taille des tumeurs causées par les trois souches pathogènes *Agrobacterium tumefaciens* E2X, E6 et C58, et elle a montré un effet protecteur remarquable dont la taille des tumeurs des plantules de tomate trempées dans les suspensions des bactéries antagonistes ne dépasse pas en moyenne les 3.5 mm de diamètre par contre les plantules inoculées directement par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* présentent des tumeurs qui dépassent les 7 mm de diamètre. Dans ce test les suspensions de la souche antagoniste a été ajustée à une concentration cellulaire 10 fois plus élevée que celle du pathogène. Ceci nous a permis de constater que cette concentration cellulaire pour la souche antagoniste a réduit la taille des galles formées sur les plantules de tomate mais elle n'a pas été suffisante pour empêcher leur formation complètement.

Etant donné que l'effet bénéfique des souches *Pseudomonas spp.* a été prouvé *in vivo*, il est souhaitable de continuer ce travail dans le but de quantifier les métabolites secondaires produits par ces bactéries, et qualifier d'autres métabolites pouvant être impliqués dans la promotion de la protection des plantes.

Des expériences sur une plus large gamme de plantes sont nécessaires. De même, l'élargissement du spectre d'efficacité contre d'autres pathogènes. Il serait intéressant également d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes déclenchés par l'application des bactéries dans la lutte biologique.

Les résultats de la recherche que nous avons menée, nous a permis de confirmer le pouvoir antagoniste de la bactérie endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1

contre la maladie du crown gall , nous souhaitons que d'autres recherches seront menées a l'avenir sur cette bactérie.

Références bibliographiques

Agrios G., 1997- Plant Pathology. 4th ed. San Diego, California : Academic Press. 635p.

Agrios, G. (2005) Plant Pathology. Fifth Edition.

Alfano Jr., Collmer A., 1996- Bacterial pathogens in plants : life up against the wall. Plant Cell, Ithaca, New York vol 8 : 1683-1698.

Allaire M., 2005. Diversité fonctionnelle des pseudomonas producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel pp 5-10.

Bailey, K.L., Mupondwa, E.K., 2006. Developing microbial weed control products : commercialization, biological, and technological considerations. In : Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (EDs.), Handbook of Sustainable Weed Management. The Haworth Press Inc., Binghamton, NY, USA, PP 431-437.

Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. & Van Loon L.C., 2007. Induced systemic resistance by *fluorescent Pseudomonas spp.* Phytopathology, 97,239-243.

Bardin S.D., Huang H.C., Liu L. & Yanke L.J., 2003 – Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium sp.* on canola, safflower, dry pea, and sugar beet. Canadian Journal of Plant Pathology 25 (3).

Beale J., Brown W., Cline M., Cook J., Desjardins A., Fletcher J., Leach J., Levesique A., Madden L., And Schaad N. 2002-Crop biosecurity and countering agricultural bioterrorism : Responses of The American Phytopathological Society. APSnet Feature. Published online by The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Bell, C.R., G. A. Dickie, W.L.G. Harvey, AND J.W.Y.F. Chan. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. Can. J. Microbiol. 41:46-53.

Bell-Perkins, L. J., Et J.M. Lynch. 2002. Rhizosphere Microbiology,. In G. Bitton (Ed.), Encyclopedia Of Environmental Microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada. P.2713-2728.

Benhamou N., Kloepper J. W., Quandt-Halmam A. And Tuzons S. (1996). Induction of defense-related ultrastructural modification in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiol. 112 : 919-929.

Benjama P.A., El Gadda M., El Boustani E., el Modafar C., Nesme X., et Cubero J., 2004. Détection moléculaire spécifique de la région vir du plasmide pTi d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les sols et plants au Maroc. Bull. OEPP. 34 :403-406.

Bennett ,R.A., Lynch, J.M., 1981. Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. J. Gen. Microbiol. 125 :95-102.

Bent E., 2005. Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In *Multigenic and induced systemic resistance in plants*, edited by S. Tuzun and E. Bent : Springer, NY.

Berag G., Eberl L. and Hartmann A., 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environ. Microbiol. 7 : 1673-1685.

Berggren, I., van Vuurde, J.W.L. and Martensson, A.M. (2001). Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* ssp. *viceae*. Appl. Soil Ecol. 17(2):97-106.

Besnard O. and Davet P, 1993 – Mise en évidence de souches de *Trichoderma* spp à la fois antagoniste de *Pythium ultimum* et stimulatrice de la croissance des plantes. Agronomie 13 : 413-421.

Bloemberg ,G.V., Lugtenberg, B.J. 2001. Molecular Basis of Plant Growth Promotion and Biocontrol by Rhizobacteria. *Current Topics in Plant Biology* 4: 343-350.

Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie .20: 51-63.

Boucher C., Genin S., Arlat M., 2001- Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes. Inra-CNRS, BP 27, 31326 Sciences 324(2001) 915-922.

Bouzar H., Daouzli N., Alim A. and 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.

Bowen,G.D., 1979. Integrated and experimental approaches to the study of growth of organisms around roots. In : Schippers, B., Gams, W. (Eds). *Soilborne Plant Pathogens*, Academic Press, London, pp.207-227.

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

Christine Villeneuve, 2004. Le chancre bactérien de la tomate. MAPAQ Montérégie Secteur Ouest.

Colyer P. D., Et M. S. Mount. 1984. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest of rot diseases. Plant Disease. 68 :703-706.

Commare,R.R.,Nandakumar,R.,Kandan,A.,Suresh,S.,Bharthi,M.,Ragushanger,T.,Sami yapan,R.2002.*Pseudomonas fluorescens* Based Formulation Of The Management Of Sheath Blight Disease And Leaf Folder Insect To Rice .Crop Prot .,21,pp.671-677

Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. and Barka E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases : principales, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology 71 : 4951-4959.

Cook, R. Et Baker, K. (1974). Biological control of plant pathogens. Freeman, San Francisco, CA, USA. 380 pages.

Corbaz R. (1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes

Cronelis Gr., Van Gijegem F., 2000- Assembly and function of type iii secretory systems. AnnuRev Microbiol. ; 54 :735-774.

De Boer, M., Van Der Sluis, I., Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. Strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. European Journal of Plant Pathology, 105,pp.201-210.

De Souza, J. T., M. De Boer, P. Dewaard, T.A. Van Beek, Et J.M. Raaijmakers. 2003. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. 69 : 7161-7172.

Defago, G. 1993. 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. Plant Pathol. 42 : 311-312.

Deguine.J-P , Ferron.P, 2005- Gestion agroécologique des populations d'insectes piqueurs suceurs en culture cotonnière. In Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène , B J.R . Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.Lavoisier Tec & Doc, Paris, p367-384.

Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* 6(2):177-185.

Dhanvantari, B.N., Brown, R.J. 1993- Improved seed treatments for the control of bacterial canker of tomato. *Canadian Journal of Plant Pathology*15, 201-5.

Djellout H., 2009- Evaluation du pouvoir antibactérien de quatre plantes spontanées. The ingphytopathol. Univ Blida. 60p.

DorranceA.E.,BerryS.A.,Bowen P. and Lipps P.E., 2004. Characterization of *pythium* spp. from three Ohio fields for pathogenicity on corn and soybean and metalaxyl sensitivity. *Plant Health Progress*.

Drablos, F., Nicholson, D., Ronning, M., 1999. EXAFS study of zinc coordination in Bacitracin A. *Biochim, Biophys, Acta* 1431, 433–442.

Duggar B.M.,1909. Fungous diseases of plants. Ginn&Co.,Boston.

ELMHIRST J, 2007-Profile des Cultures aux champs P15.

El-Tarabily K.A., Hardy G.E.St.J., Sivasithamparam K., Hussain A.M. And Kurtboke D.I. (1997). The potential for the biological cavity-spot disease of carrot, caused by *Pythium coloratum*, by *Streptomyces* and non-*Streptomyces* actinomycetes. *New Phytologist*, 137: 495-507.

Environmental Protection Agency (Epa) (2009b). Our mission and what we do. In Environmental Protection Agency. About EPA, [En ligne].

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2013. Diagnostics PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*, 43: 21–45.

Errakhi R. (2008). Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc

Fleurat Lessard, F., 2005-Bases écophysiologicals de la lutte physique contre les insectes. In Regnault-Roger, C, Fabres G. Philogène, B J.R. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Lavoisier Tec & Doc, paris,p787-804.

Gelvin, S. B. (2003). "Improving plant genetic engineering by manipulating the host." Trends in Biotechnology 21(3): 95-98.

Grover, J.P. (2004). Predation, competition, and nutrient recycling: stoichiometric approach with multiple nutrients. J. Theor. Biol. 229(1):31-43.

Guy R. Knudsen, Ph.D., J.D. Louise-Marie Dandurand, Ph.D. 2013. Phytopathologie: l'Étude de la Santé des Plantes. Université d'Idaho Moscow, Idaho, États-Unis.

Hammami I., Rhouma A Jaouadi B., Rebai A. and Nesme X., 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. Letters in Applied Microbiology 48 :253-260.

Hass, D., et G. Defago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat. Rev. Microbiol. 3 : 307-319.

Hass, D., et C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Ann. Rev. Phytopathol. 41 : 117-153.

Helluy S. And Holmes J.C. (2005). Parasitic manipulation: further considerations. Behav. Processes. 68, 185-99.

Hildebrand D.C., Schroth M.N., Sand D. C., 1988. In plant pathogenic bacteria, laboratory guide for identification, in Schaad (Ed) N.W.APS. Minnesotc. Usa, 158p.

Hooykaas, P. J. J. and R. A. Schilperoort (1992). "Agrobacterium and plant genetic engineering." Plant Molecular Biology 19: 15-38.

Hooykaas, P. J. J., P. M. Klapwijk, M. P. Nuti, R. A. Schilperoort and A. Rorsch (1977). "Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium ex planta*." Journal Of General Microbiology 98: 477-484.

Hossard L., Lannou C., Papaix J., Monod H., Lô-Pezler E., Souchère V., M.H. Jeuffroy.2010. Quel déploiement spatio-temporel des variétés et des itinéraires techniques pour accroître la durabilité des résistances variétales.

<http://www.epa.gov/epahome/whatwedo.htm> (Page consultée le 4 avril 2016).

Janse, J. D., Et Wenneker, M. 2002- Possibilities of avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen-tested (certified) or- treated planting material. BReview. Section Bacteriology, *Plant Protection Service, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, the Netherlands. Plant pathology* (2002)51, pp. 523-536.

Janssen, B. J. and R. C. Gardner (1989). "Localised transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*." *Plant MolecularBiology* 14: 61-72.

Jeun Y.C., Park K.S., Kim C.H., Fowler W.D. and Kloepper J.W., 2004. Cytological observation of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biol. Control.* 29(1) : 34-42.

Jofre, E., Lagares, A. and Mori, G. (2004). Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillumbrasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 231(2):267-275.

Johnson, T. M. and A. Das (1998). Organization and regulationof expression of the *Agrobacterium* virulence genes. *The Rhizobiaceae : molecular biology of model plant-associated bacteria.* H. P. Spaink, A. Kondorosi and P. J. J. Hooykaas, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 265-279.

Jourdan, E. 2008. Dialogue moléculaire entre les rhizobactéries et leur hôte végétal : deux nouveaux éliciteurs impliqués dans l'induction de résistance aux pathogènes. Thèse Doctorat d'état. Univliège. Be. 25p.

Jourdan, E., M. Ongena, Et P. Thonart. 2008. Caractéristique moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 : 437-449.

Katan, J., 1980. Solar pasteurization of soil for disease control : status and prospects. *Plant Disease.*

Katan, J., Greenberger, H.A., Grinstine, A., 1967. Solar heating by polyethylene mulching for the control of disease caused by soil-borne pathogen. *Phytopathol*, **66**, pp :683-688.

Kenneth C. Eastwell, Peter L. Sholberg, Ronald J. Saylor, 2006. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Protection*. P3.

Klapwijk, P. M., T. Scheulderman and R. A. Schilperoort (1978). "Coordinated regulation of octopine degradation and conjugative transfer of Ti plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* : evidence for a common regulatory gene and separate operons." *Journal Of Bacteriology* 136: 775-785.

Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J., 1992. A review of issues related to measuring of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*.38, 1219-1232.

Kouassi, M. (2001). La lutte biologique: une alternative viable à l'utilisation des pesticides? *VertigO*. 2(2).

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*, **116**, pp : 237-246.

Lacroix.M., 2003. LA TUMEUR DU COLLET ET DE LA TIGE CAUSÉE PAR *AGROBACTERIUM* Laboratoire de diagnostic en phytoprotection Direction de l'innovation scientifique et technologique.

Landa B. B., Hervas A., Bettiol I. W. and Jimenez-Diaz R. M., 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*., 4:305-318

Landa,B.B.Harvas ,A.,Bethiol,W.,Jimenez-Diaz,R.M.1997.Antagonistic Activity Of Bacteria From The Chickpea Rhizosphere Against *Fusariumoxysporumf.sp.ciceris*. *Phytoparasitica*, 25, pp.305-318.

Lepoivre P.& Semal J., 1989- La lutte biologique en phytopathologie. In Semal J. Ed. *Traité de Pathologie végétale* Gembloux. Press Agronomique : 465-487.

Lepoivre P., 2003- Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. Les presses agronomiques de Gembloux. De Boeck 1, Bruxelles, 427p.

Leyns F. ; De Cleene M. 1983- Histopathology of the bacteriosis caused by inoculation of *Corynebacterium michiganense* and *Xanthomonas campestris* sp. Vesicatoria in tomato stems. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 48 (3), 663-670.

Ligon J.M., Hammer P.E., Torkewiz N.R and Hofmann D., 2000. Naturel products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. Pest Management Science 56 : 688-659.

Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M. and van der lerie D., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. Crit. Rev. Plant Sci. 21 : 583-606.

Long hoanghoa, Furuyanaruto, Kurose Daisuke, AmamotoLchinari, Takeshita Minour and Takanami Yoichi, 2004. Identification of the Endophytic Bacterial Isolates and their in vitro and in vivo Antagonism against *Ralstonia solanacearum*. J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 49 (2) 233 241 (2004).

Lugtenberg B. and Kamilova F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology 63 : 541-556.

Marie POUEYMIRO., 2009. Caractérisation fonctionnelle des effecteurs de type III de *Ralstonia solanacearum* AvrA et PopP1, délimitant le spectre d'hôte et RipTPS, synthétisant une molécule signal chez les plantes. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse.

Maurhofer M., Reimann C., Schmidli-Sacherer P., Heeb S., Haas D. and Défago G., 1988. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. Phytopathology 88(7) : 678-684.

Meyer JM (2000). Pyoverdins: Pigments siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Arch. Microbiol. 174: 135-142.

Meziane H., van der Sluis I., van Loon L.C., Hofte M. and Bakker P.A.H.M.,2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol.PlantPathol.* 6(2) : 177-185.

Milner J.L. Milner, S.J. Raffel, B.J. Lethbridge, J., 1995. Handelsman Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin a by *Bacillus cereus* UW85 *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43 (4), pp. 685–691

Moller WJ, Beutel JA, Reil WO, Zoller BG (1972) Fire blight resistance to streptomycin in California. *Phytopathology* 62:779 (abstract)

Moore L.W., Kado C.I., Bouzar H., 1988. *Agrobacterium*. In *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 158.2 ed., Vol.

Moore, E.R.B., B.J., Tindall, V.A.P., Martins Dos Santos, D.H., Pieper, J.L., Ramos, Et N.J. Palleroni. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*., In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, Et E. Stackebrandt (Ed.), *Prokaryotes*, Springer, USA. Pp 646-703.

MOREIRA, C., SCHIFFERS, B. & HAUBRUGE, E. 2002. Caractérisation de la résistance au Sénégal d'*Helicoverpa armigera* Hubner (Lépidoptère, Noctuidae) par bioessais et méthodes moléculaires. *Annales de l'ANPP*, 6ème Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture (CIRA, Montpellier), Tome II : 685-692.

Morikawa, M., Ito, M., Imanaka, T., 1992. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. *J.Ferment. Bioeng.* 74, 255–261.

Nandakumar R., Babu S., Viswanathan R., Raguchander T. and Samiyappan R., 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescense*. *Soil Biol. Biochem.* 33(4-5) : 603-612.

Nautiyal, C.S. 2001. Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In: Upadhyay, R.K., Muker, K.G., Chamola, B.P. *Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture*. vol. I: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes. Ed. Kluwer Academic, New York, pp.9-23.

OEPP/EPPO, 1982- Data sheets on quarantine organisms No. 50, *Corynebacterium michiganense*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 12 (1).

OEPP/EPPO., 1978. Data sheets on quarantine organisms No. 58, *Pseudomonas solanacearum*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 8 (2).

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

Ongena, M., Daayf, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T. C. and Bélanger, R. R. (2000). Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent *Pseudomonas*. *Plant Pathol.* 49(4):523-530.

Ongena, M., Jacques, P., Delfosse, P. and Thonart, P. (2002). Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *Biometals.* 15(1):1-13.

Ophel, K. Kerr, A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. For strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *IJSB.* 40, pp : 236-241.

Ordentlich, A., Elad, Y., Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in the biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78 :84-88.

Pal Bais H., Fall R. and Vivanco J.M., 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* 134 :307-319.

Pal, K. K. And B. Mcspadden Gardener, 2006. Biological Control of Plant Pathogens *the plant Health Instructor*. DOI : 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Pannton, B., C. Vincent Et F. Fleurat-Fleurat-Lessard ., 2000- Place de la lutte physique en phytoprotection, pp. 1-24 in C. Vincent, B. Panneton et F. Fleurat-Lessard (Eds.) *La Lutte physique en phytoprotection*, INRA Editions, Paris, 347p.

Paulin J-P., Ride M., And Prunier J-P., 2001- Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans : controverses et polémiques transatlantiques *Discovery of plant pathogenic bacteria : dispute and controversy between America and Europe.* *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences- Series III - Sciences de la vie.* Volume 324, Issue 10, October 2001, Pages 905-914.

Perez, C., Suarez, C., Castro, G.R., 1993. Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster. *Folia Microbiol.* 38, 25–28.

Persello-Cartieaux F., Nussaume L. and Robaglia C., 2003. Tales from the underground : molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26(2) : 189-199.

Polymnia P. Antoniou, Spyros M. Christoglou, Eleftherios C. Tjamos, 2004. Glasshouse and field evaluation of the antagonistic rhizosphere bacteria *Bacillus subtilis* 5-127 and *Paenibacillus alvie* K-165 in controlling *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis* of tomatoes. Working groups : biological control of fungal and bacterial plant pathogens interated control in protected corps, temperate cliamte. S. Micheleall' Adige, Trentino, Italy 9-13 June 2004. Abstract, p. 126.

Poncet, C., Antonini, C., Bettachini, A., Pionnat, S., Simonini, L., Dessaux, Y., Nesme, X., 1996. Impect of crown gall disease on vigour and yield of rose trees. *Acta. Hortic.* 424, pp : 221-225.

Portier P., 2004. Sélection d'écotypes bactériens pathogènes et non pathogènes par la plante en relation avec la différenciation en espèces génomiques chez *Agrobacterium spp.* L'Université Claude Bernard-Lyon 1. Thèse de doctorat. Laboratoire d'Ecologie Microbienne- Université Claude Bernard- UMR CNRS 5557- USC INRA 1193 Bat. Gregor Mendel -43, Bd du 11 novembre 1918-69622 Villeurbanne Cedex. 123p.

Prak, D. 1960. Antagonism: The Background In Soil Fungi Dans The Ecology Soil Fungi (D Parkinson Et J.S Waid Eds) Liverpool University Press, Liverpool, Pp 148- 159.

Preston Gm., Studholm Dj., Caldelari I., 2005- Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. / *FEMS Microbiology Reviews* 29. UK. 331-360.

Psallidas and Tsiantos (2000) Chemical control of fire blight. In: Vanneste J (ed) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora.* CABI Publishing, Oxon, pp199-234.

Raio A., Zoina A., Moore L.W. (1997). The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria. *Plant Pathol.* 46:320-328.

Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V. and Samiyappan R., 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protect.* 20(1) : 1-11.

Ramos Solano, B., J. BarriusoMaicas, M.T. Pereyra De La Iglesia, J. Domenech, Et F. J. GutiérrezManero. 2008 B. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains : relationship between metabolic responses, Systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*. 98 : 451-457

Rapilly F., 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétal. *Annales des épiphytes* 19 (No. H.S). 1-102p

Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339.

Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. Et Al. (1998). Les sols du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. 9, 147-153.

Sallouk N-E., 2008 -Agadir- lutte contre les bactéries phytopathogènes transmissibles par les semences et les plants .Maroc.

Schell MA, 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology*, 38 :263-292.

Scher, F.M. and Baker, R., 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathol.* 72:1567–1573

Schroth, M.N., Hildebrand, D.C. and Panopoulos, N., 1992. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. In: *The Prokaryotes* (MP Balows, ed), Springer-Verlag, New York, pp. 3104-3131.

Shao,H., Guo, Q., Chu, L., Zhao,X., Su, Z., Hu, Y. & Cheng, J.,2007. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids surf B Biointerfaces*, 54, 37-45.

Sharga B. M., Et G.D. Lyon. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Can. J. Microbiol.* 44 :777-783.

Shiomi T., 1992- Black rot of cabbage seeds and its disinfection under a hot air treatment. *Japan Agricultural Research Quarterly* 26, pp. 13-8.

Silva, H.S.A., Romeiro, R.S., Carrer-Filho, R., Pereira, J.L.A., Mizubuti, E.S.G., Munteer, A. 2004. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field condition. *Journal of Phytopatology*, 152, pp. 371-375.

Smadja B, Latour X, Trigui S, et al. 2004. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp). *Can J Microbiol* ; 50 : 19-27.

Smith, E. F. Et Townsend, C. O. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science*. 25: 671-673

Stapleton, J.J., De Vay, J.E., 1986.soil solarization : a non-chemical approach for managment of plant pathogens and pests. *Corp Protection*, 5, pp : 190-198.

Strobel G, Daisy B, Castillo U & Harper J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod* 67 : 257-268.

SunishKumarR.,Ayyadurai N.,Pandiaraja P., Reddy A.V., Venkateswarlu Y., Prakash O. and Sakathivel N., 2005. Characterization of antifungalmetaboliteproduced by a new strain*pseudomonasaeruginosa* PUPa3 thatexhibitsbroad-spectrumantifungalactivity and biofertilizing traits. *Journal of AppliedMicrobiology* 98(1) :145-154.

Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2(3):294-208.

Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. and Pierson, L.S., 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.* 56: 908-912.

Thomson, S.V. (2000) In: *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI.

Tilma .P, Fontaine.R, 2015.fiche phytosanitaire, cultures maraichères flétrissement bactérien.

Tolba I.H. and Solaiman M.A., 2013. Efficacy of native antagonistic bacterial isolates in biological control of crown gall disease in Egypt. *Annals of Agricultural Sciences* 48 : 43-49.

Tsiantos J and Psallidas P (2002)The effect of inoculum concentration and time of application of various bactericides on the control of fire blight (*Erwinia amylovora*) under artificial inoculation. *PhytopatholMediterr* 41:246-251.

Valueva T.A. And Mosolov V.V. (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochem.* 69, 1305-1309.

Van loon L.C., Geraats B.P.J. and Linthorst H.J.M., 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 11(4) : 184-191.

Van Loon Lc. 2007. Plant Responses To Plant-Growth Promoting Bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243–254.

Van Loon, L.C., Et P.A.H.M. Bakker. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, p. 39-66. In Z.A. Siddiqui (ed). *PGPR : biocontrol and biofertilization*. Springer Science Dordrecht, The Netherlands.

Van Wees S.C.M., de Swart E.A.M., van Pelt J.A., van Lon L.C. and Pieterse C.M.J., 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate- dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(15) :8711-8716.

Vierling, E. & Kimpel, J.A., 1992. Plant reponses to environmental stress. *CurOpin Biotechnol*, 3, 164-70.

Vincent C., Panneton B., 2001- les méthodes de lutte physiques comme alternatives aux pesticides. *VertigO- la revue en sciences de l'environnement*, Vol2, N° 2, Octobre 2001. 24p.

Viss W., Humann J.I., Cook M., Driver J., And Ream W., 2003.” Crown gall resistant transgenic apples trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes”, *Molecular Breeding* 12 : 283-295.

Weller D. M., Howie W. J. Cook R.J. 1988. Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomycesgraminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by Fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathology* 78(8): 1094-1100

Weller D.M., van Pelt J.A., Mavrodi D.V., Pieterse C.M.J., BakkerP.A.H.M.andvan Loon L.C., 2004.Induced systemicresistance (ISR) in *Arabidopsis*against *Pseudomonas*

syringaepv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) producing *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology 94(S) :108.

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Mcspadden Gardener, B.B., Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 40, 309e348.

Whipps, J.M., Turnbull, G.A., Morgan, J.A.W., Saunders, J.R. 2001. The Role Of Bacterial Motility In The Survival And Spread Of *Pseudomonas Fluorescens* In Soil And In The Attachment And Colonization Of Wheat Roots. FEMS Microbiol Ecol, 36:21-31.

Williams,G.E.,Asher,MJC.1996. Selection Of Rhizobacteria For The Control Of *Pythium Ultimum* And *Aphanomyces Cochlioides* on Sugar-Beet Seedlings. Crop Prot., 15,PP.479-486.

Yong J. M., Allen C., Coutinho T., Denny T., Elphinston J., Fegan M., Gillings M., Gottwald T. R., Graham J. H., Iacobellis N. S., Janse J. D., Jacques M.-A., Lopez M. M., Morris C. E., Parkinson N., Prior P., Pruvost O., Rodrigues Neto J., Scortichini M., Takikawa Y., And Upper C. D.2008- Plant- Pathogenic Bacteria as Biological Weapons – Real Threats ? The American Phytopathological Society. Vol. 98, No. 10, 2008, PP : 1060-1065.

Zoina, A., Raio, A., 1999. Susceptibility of some peach rootstocks to crown gall. J.Plant. Pathol. 81, pp : 181-157.

Zolobowska L, Van Gijsegem F (2006) Induction of lateral root structure formation on petunia roots: A novel effect of GMI1000 *Ralstonia solanacearum* infection impaired in hrp mutants. Mol Plant Microbe Interact 19: 597-606.

Zonia, A., Raio, A., Peluso, R., Spasiano, A., 2001. Characterization of agrobacteria from weeping fig (*Ficusbanjamina*). Plant. Pathol. 50, pp : 620-627.

Références bibliographiques

Composition du milieu de culture LPGA
(Hildebrand *el al.*,1988)

5g d'extrait de levure.

5g de bactopeptone.

10g de glucose.

17 d'agar-agar.

1l d'eau distillée stérile.

Le pH est ajusté entre 7 et 7.2.

Autoclaverà une température de 120⁰C pendant 20 minutes

Tableau1 : Test d'antagonisme *in planta* : la souche PS1 de la bactérie antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* envers la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Site d'inoculation Plantes	Taille des tumeurs par blessure (PS1/C58)(mm).			
	a	b	c	MOYENNE
1	2	3	2	2,33
2	2	1	2	1,66
3	1	1	1	1
4	2	0	1	1
5	1	3	2	2
6	2	3	3	2,66
7	1	2	1	1,33
8	1	1	1	1
9	2	1	2	1,66
10	3	3	2	2,66
11	2	0	1	1
12	1	2	2	1,66
13	1	1	1	1
14	2	2	1	1,66
15	2	1	1	1,33
16	2	1	0	1
17	1	1	0	0,66
18	3	2	2	2,33
19	1	2	1	1,33

Tableau 2 : Test d'antagonisme *in planta* : la souche PS1 de la bactérie antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* envers la souche E6 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

		Taille des tumeurs par blessure (PS1/E6) (mm).			
		a	b	c	MOYENNE
Site d'inoculation	Plantes				
1		4	4	3	3,66
2		4	4	3	3,66
3		9	2	2	4,33
4		4	3	3	3,33
5		4	3	6	4,33
6		6	8	4	6
7		3	6	4	4,33
8		5	3	3	3,66
9		5	4	3	4
10		2	3	4	3
11		2	2	1	1,66
12		2	1	2	1,66
13		4	3	2	3
14		5	3	2	3,33
15		3	2	4	3
16		2	4	2	2,66
17		2	4	1	2,33
18		3	2	3	2,66
19		3	2	2	2,33
20		1	1	2	1,33

Tableau 3 : Test d'antagonisme *in planta* : la souche PS1 de la bactérie antagoniste *Pseudomonas brassicacearum* envers la souche E2X d'*Agrobacterium tumefaciens*.

		Taille des tumeurs par blessure (PS1/E2X) (mm).			
		a	b	c	MOYENNE
Plantes	Site d'inoculation				
	1	2	1	5	2,66
	2	2	4	1	2,33
	3	4	2	3	3
	4	1	2	1	1,33
	5	3	2	2	2,33
	6	3	2	3	2,66
	7	2	2	1	1,66
	8	2	3	3	2,66
	9	3	1	2	2
	10	3	1	3	2,33
	11	3	3	2	2,66
	12	3	2	4	3
	13	2	3	3	2,66
	14	3	2	2	2,33
	15	5	3	2	3,33
	16	3	3	3	3
	17	4	3	3	3,33
18	2	3	2	2,33	

Tableau 4 : Test d'antagonisme *in planta* : Taille des tumeurs des plantes inoculées directement par la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

		Taille des tumeurs par blessure (témoin positif) (mm).			
		a	b	c	MOYENNE
plantes	Site d'inoculation				
	1	5	5	3	4,33
	2	4	3	3	3,33
	3	5	0	0	1,66
	4	6	5	5	5,33
	5	4	4	5	4,33
	6	3	3	2	2,66
	7	4	5	5	4,66
	8	3	4	3	3,33
	9	2	6	3	3,66
10	3	2	2	2,33	

Tableau 5 : Test d'antagonisme *in planta* : Taille des tumeurs des plantes inoculées directement par la souche E6 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

		Taille des tumeurs par blessure (témoin positif) (mm).			
		a	b	c	MOYENNE
plantes	Site d'inoculation				
	1	5	14	4	7,66
	2	11	4	4	6,33
	3	5	5	6	5,33
	4	6	6	5	5,66
	5	5	5	4	4,66
	6	5	8	4	5,66
	7	6	6	5	5,66
	8	6	5	7	6
	9	7	8	12	9
10	12	9	7	9,33	

Tableau 6 : Test d'antagonisme *in planta* : Taille des tumeurs des plantes inoculées directement par la souche E2X d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Site d'inoculation Plantes	Taille des tumeurs par blessure (témoin positif) (mm).			
	a	b	c	MOYENNE
1	4	8	4	5,33
2	5	3	5	4,33
3	3	3	3	3
4	3	3	4	3,33
5	14	9	8	10,33
6	5	6	5	5,33
7	6	6	3	5
8	4	4	6	4,66
9	5	4	4	4,33
10	1	9	8	6

Université de Blida 1
Faculté des Sciences de la nature et de la vie .
Département de biotechnologie
Option : **biologie des interactions plantes
microorganismes**

en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2
sur thème:

**«l'induction de la résistance des *Pseudomonas
trassicacearum* souche PS1 chez le pathosystèmes
tomate/*A.tumefaciens*»**

hla	Professeur	U.S.D.B	Présidente
t L.	MAB	Univ. Bouira	Promotrice
ussaid N.	MAA	U.S.D.B	examinatrice
out H.	Doctorante	U.S.D.B	Invitée

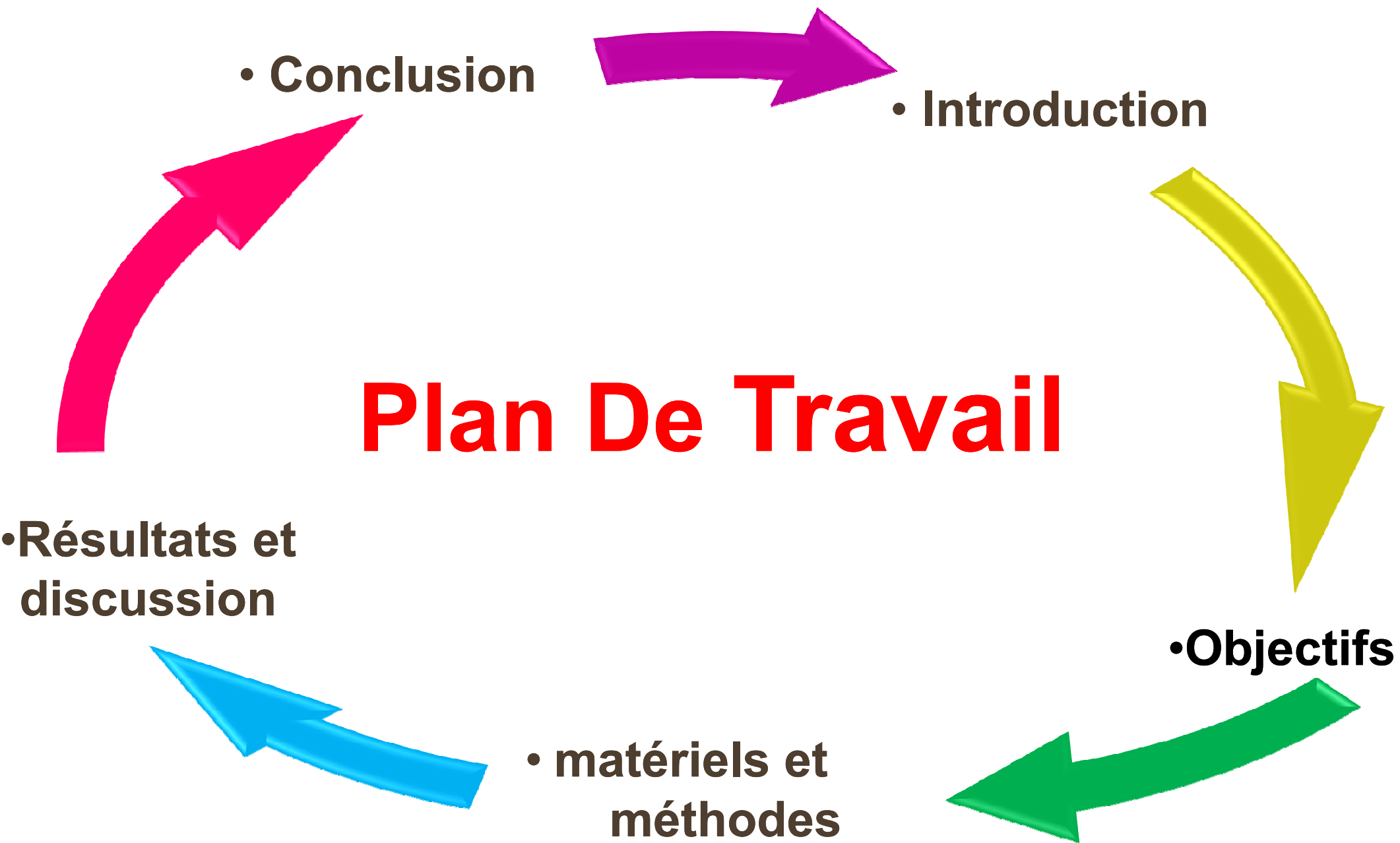
présenté par :

AD hadjer
NTOUIL Ouissam

Encadré par :

Promotrice : Mme Tafifet







Introduction



Les plantes constituent la majorité **des ressources énergétiques** dont dépendent directement ou indirectement l'homme et les animaux.

plante est atteinte d'une **maladie**, sa productivité sont affectées.

les

Le
ba

dies des p
biologiques

rs comme
dégâts et
cultures.

iques

nons
r les



Mécanismes de virulence des bactéries phytopathogènes

la dégradation de la paroi végétale par des **enzymes hydrolytiques**.

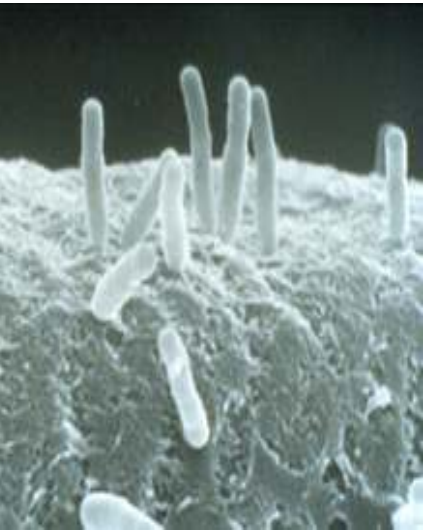
μυαοιλιθινες
αες ευζυμες

le système de sécrétion de type III

σεκρεσιον αε τυπε III

la production de phytotoxines et d'exopolysaccharides (EPS)

(Εβ2)
α,εχοπολγασσαιαες





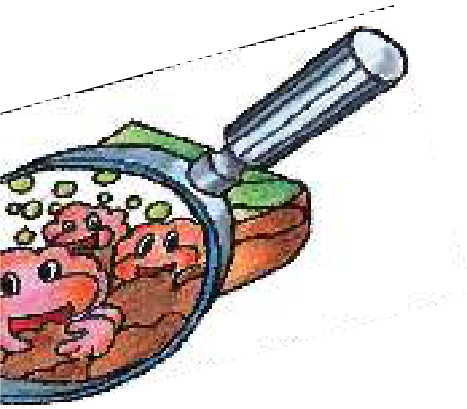
Excroissance



La galle du collet

Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium tumefaciens

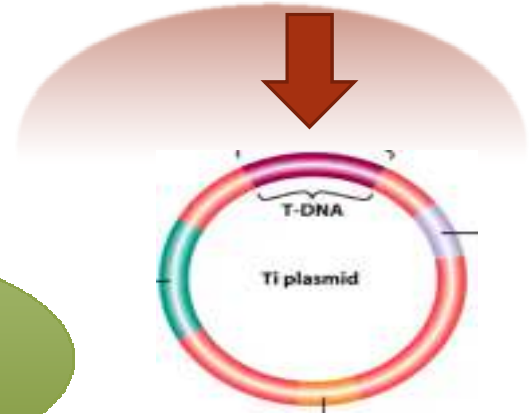


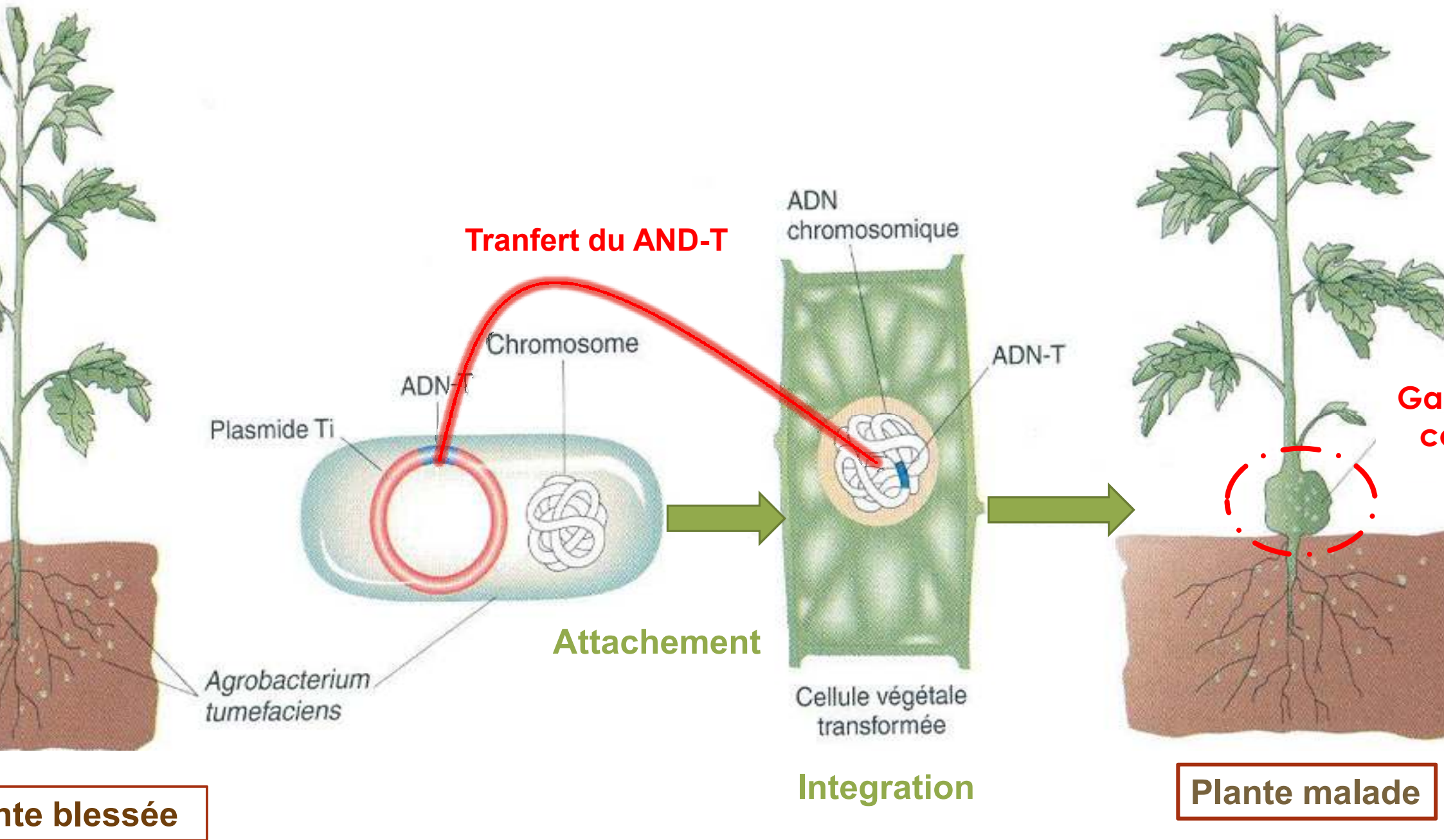
Bactérie
du sol

Plasmid Ti

Gram
negatif

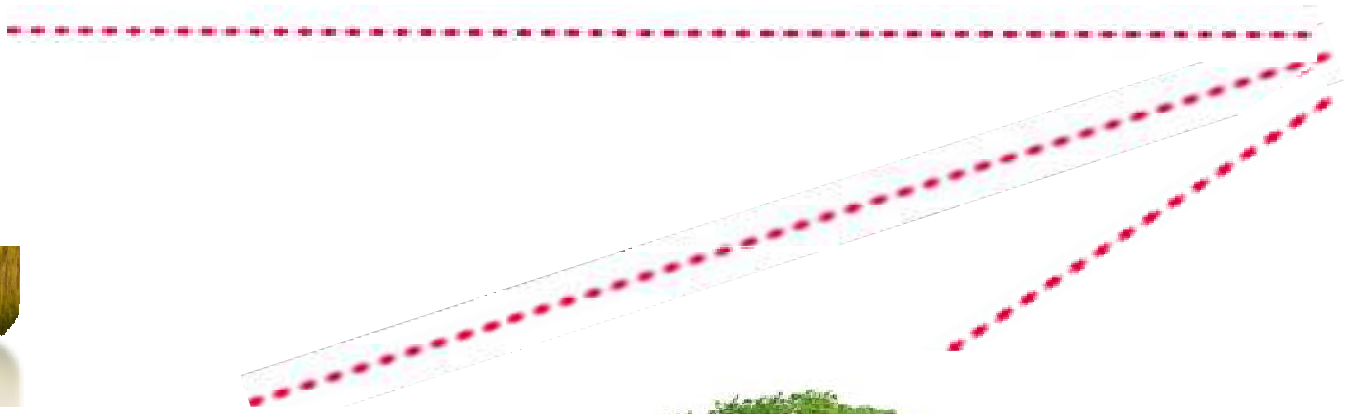
Famille des
Rhizobiaceae





L'arme la plus efficace contre les maladies des plantes

est la





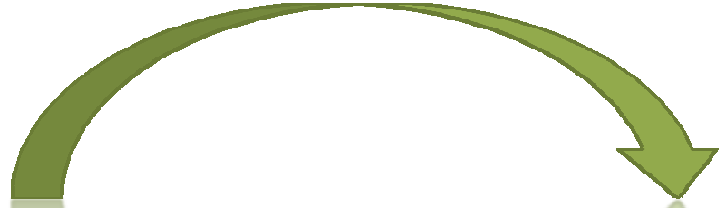
La lutte biologique

L'antibiose

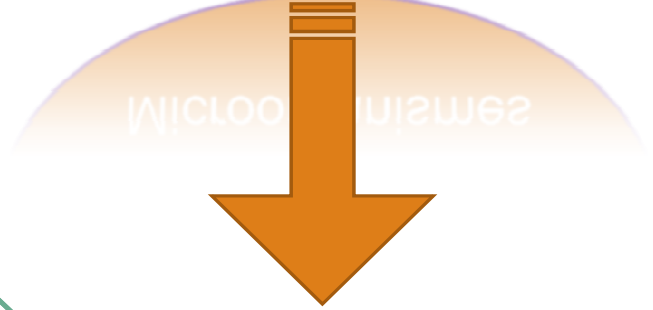
La compétition

Le parasitisme

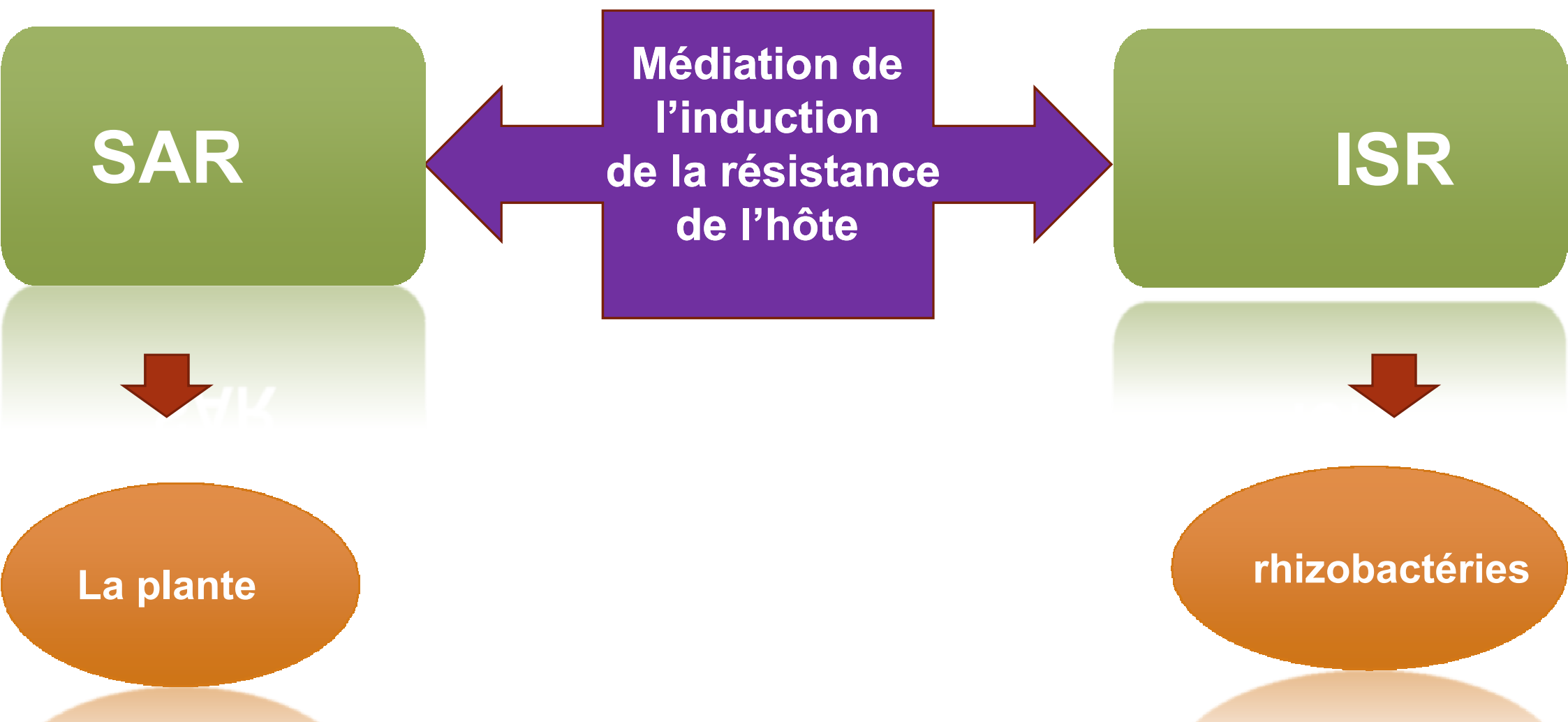
Induction de la résistance de l'hôte



un organisme vivant
telle que les
Microorganismes



empêche le
développement d'une
maladie ou la survie
d'un
agent pathogène



Parmi les microorganismes qui peuvent déclencher Cette
résistance induite



Bacillus spp

*Pseudomonas
spp.*

Grand activité dans le controle biologique

Grand activité dans le controle biologique





Objectifs



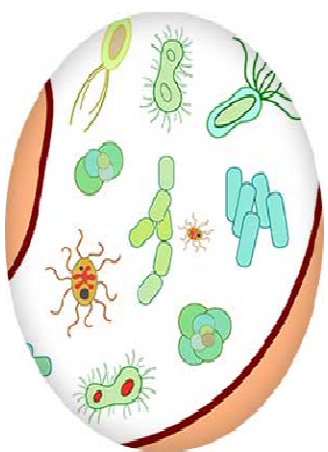
L'étude d'antagonisme *in planta* de la bactérie *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1 vis-a-vis des trois souches phytopathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* E2x, E6 et C58 sur les plantules de tomate.





Matériel Et méthodes





Matériel biologique

La bactérie
*Pseudomonas
brassicacearum*
souche PS1

Les souches
d'*Agrobacterium
tumefaciens*



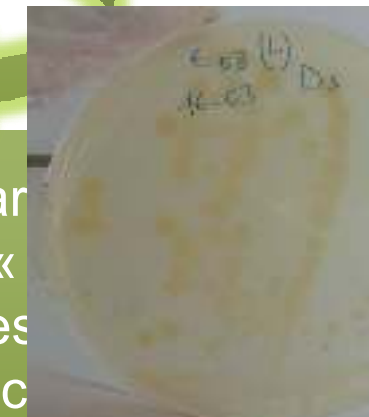
PS1



E6



E2x



C58

Cultivées sur le milieu de culture LPGA.

Materiel végétal



La variété testée est la 67703 F1
(var. hybride)

La tomate
(*Lycopersicon
esculentum*)



une plante hôte commune utilisée
lors des expérimentations

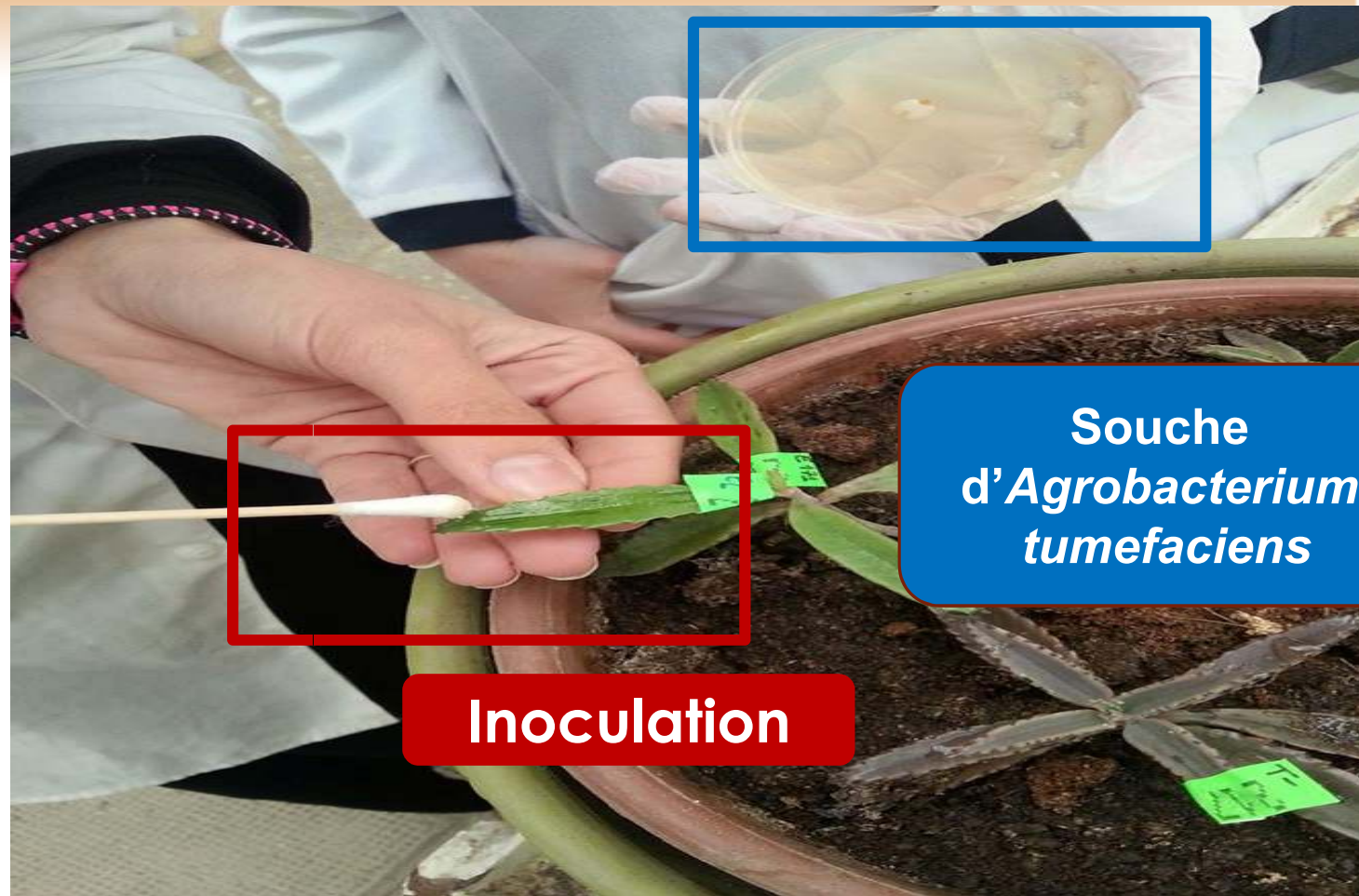
elle développe des tumeurs en temps
très court et facilement à mesurer



Méthode

1^{er} étape

Vérification du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium tumefaciens*



étape

L'essai antagoniste *in planta*

Préparation de semis

1/3 de tourbe



2/3 de sol
végétal



Stérilisé à
2 reprises
pendant 1h à
250°C (Rapilly.,1968)





Disposer les graines dans une boîte de Pétrie

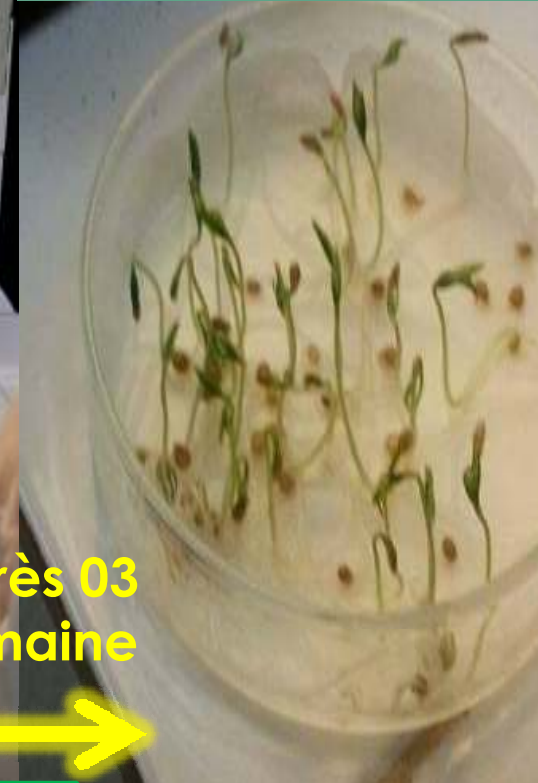


Mettre les boîte de Pétrie dans une mini serre



Prégerminatio

Après 03 semaine



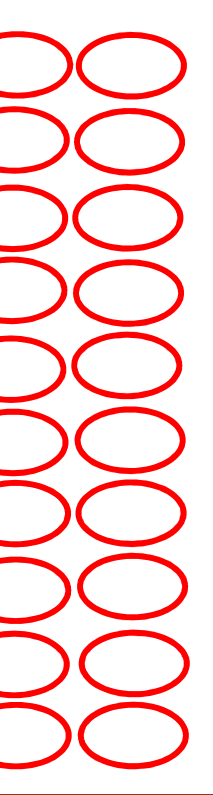
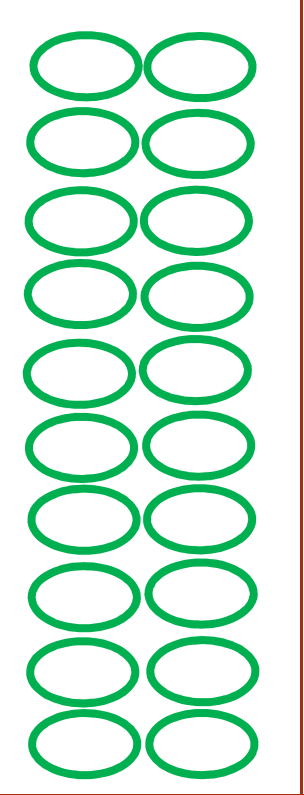
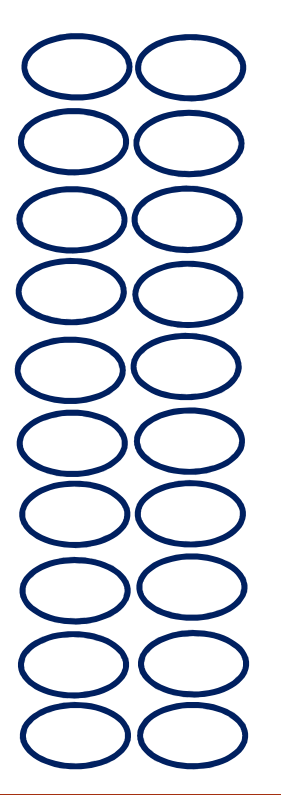
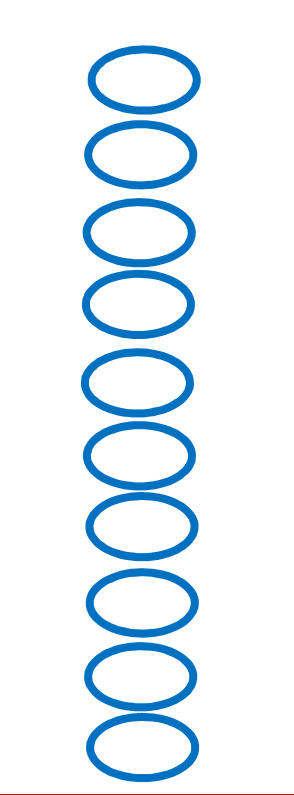
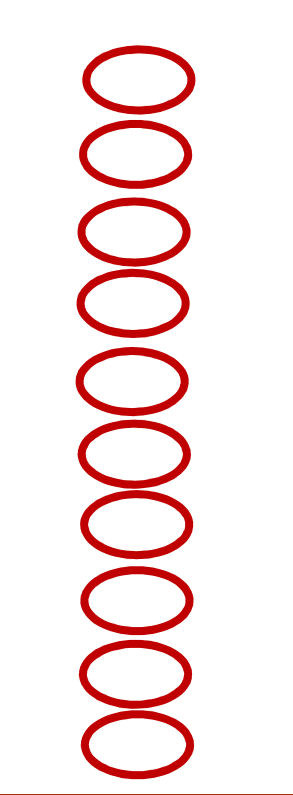
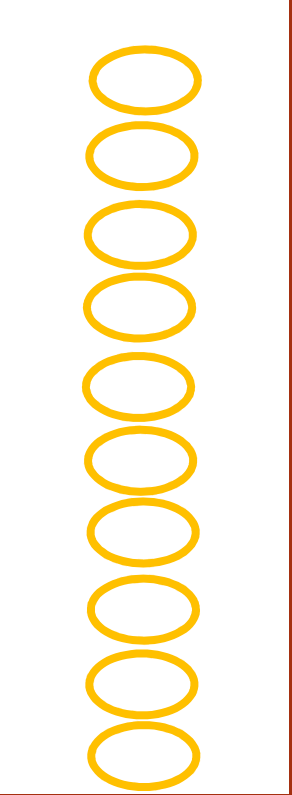
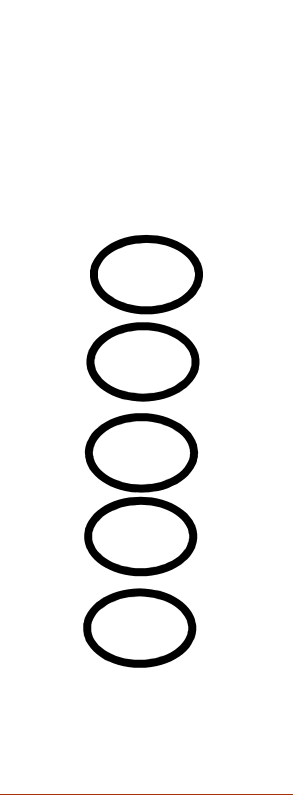

nsplantation

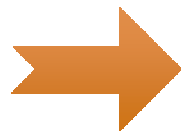


La sélection des feuilles stade 2 a 3 vrais feuilles



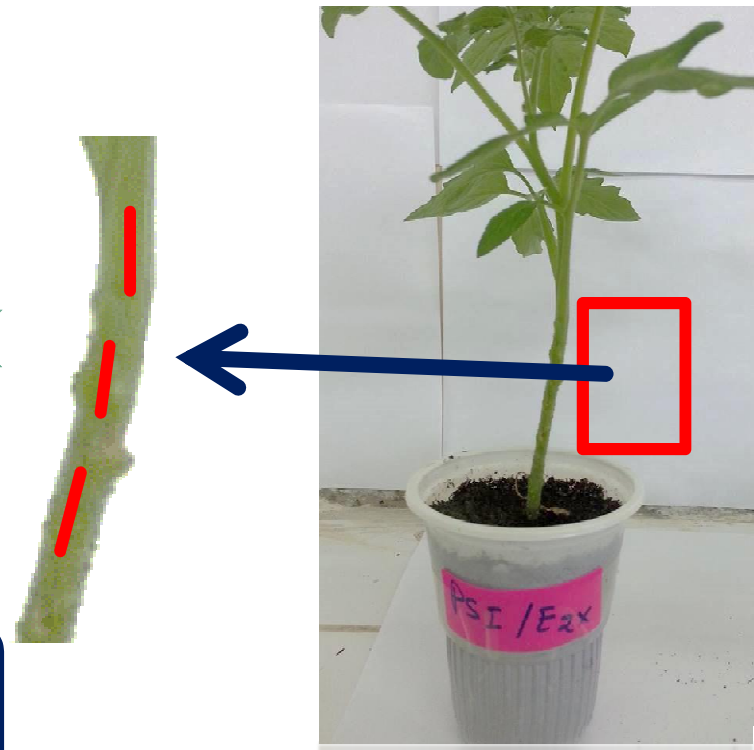
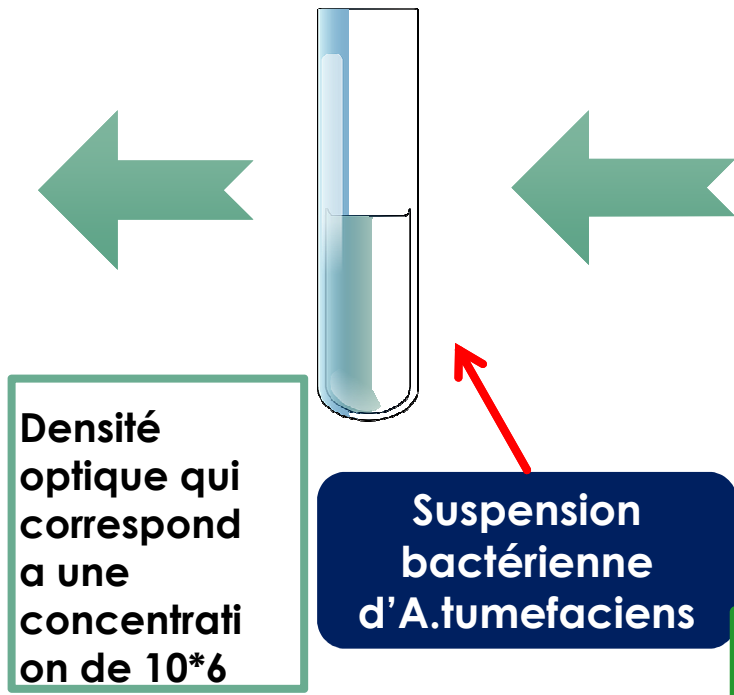
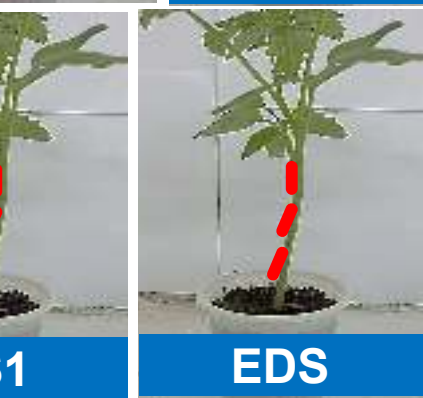
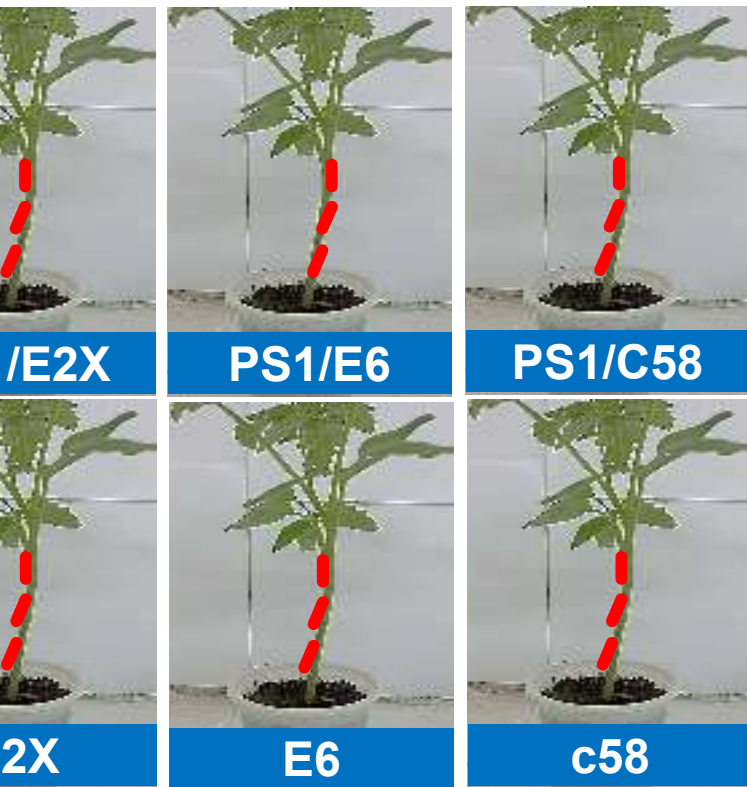
La disposition expérimentale pour les plantules de tomate

<u>Traitements antagonistes</u>			<u>Témoins positifs</u>			<u>Témoin négatif</u>		
PS1/E6	PS1/E2X	PS1/C58	E6	E2X	C58	EDS	PS1	
								
<p>Plantes traité par la souche antagoniste puis inoculé par la souche d'A.tumefaciens</p>			<p>Plantes inoculées avec la suspension de souche tumorigènes d'A.tumefaciens</p>			<p>Plante inoculé avec l'eau distillé stérile</p>		<p>Plant inoculé avec la suspen bactérie</p>

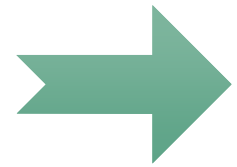


Densité optique
qui correspond a
une concentration
de 10×7





Les plantules sont maintenues en serre à une température de 25-27°C

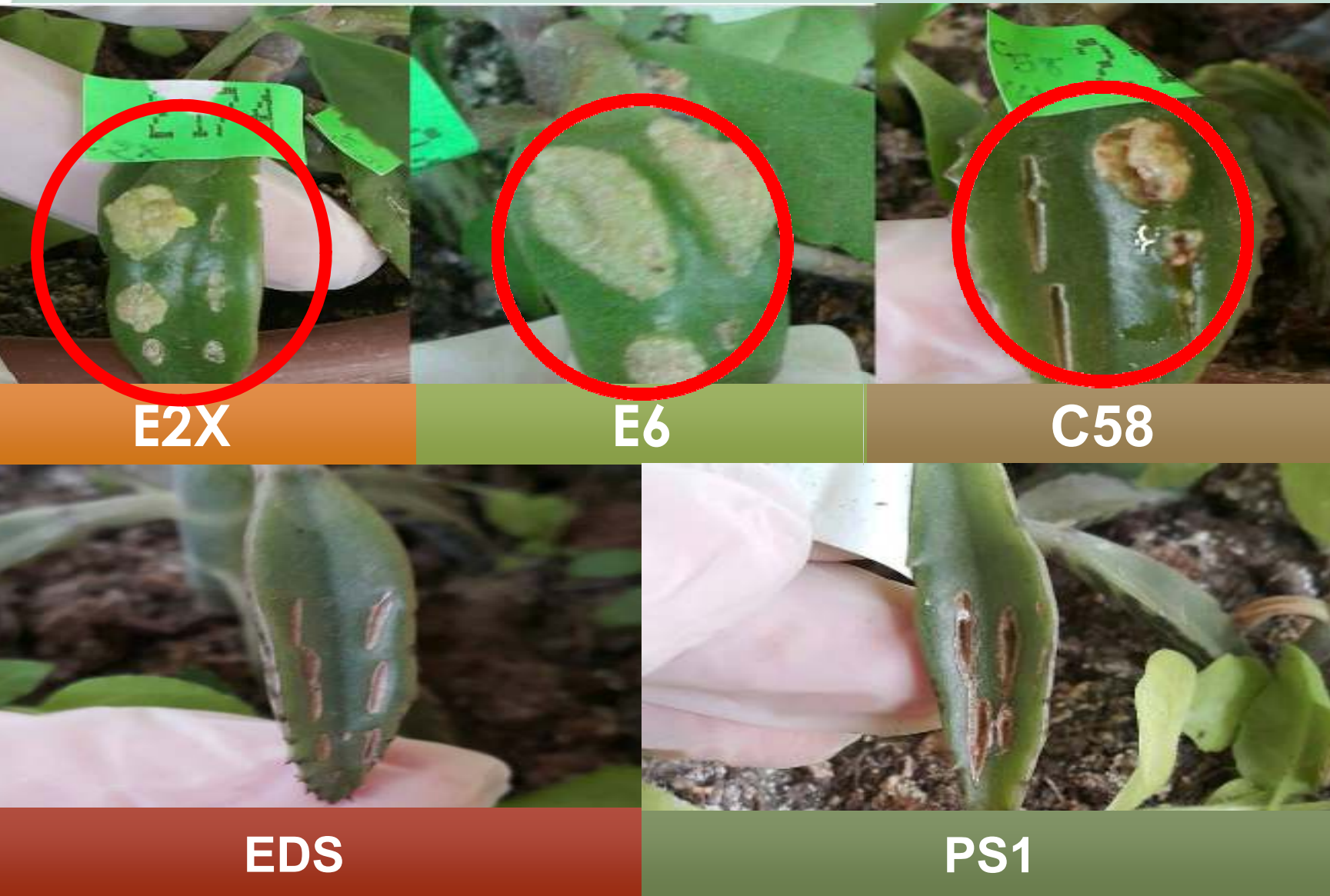




Résultats



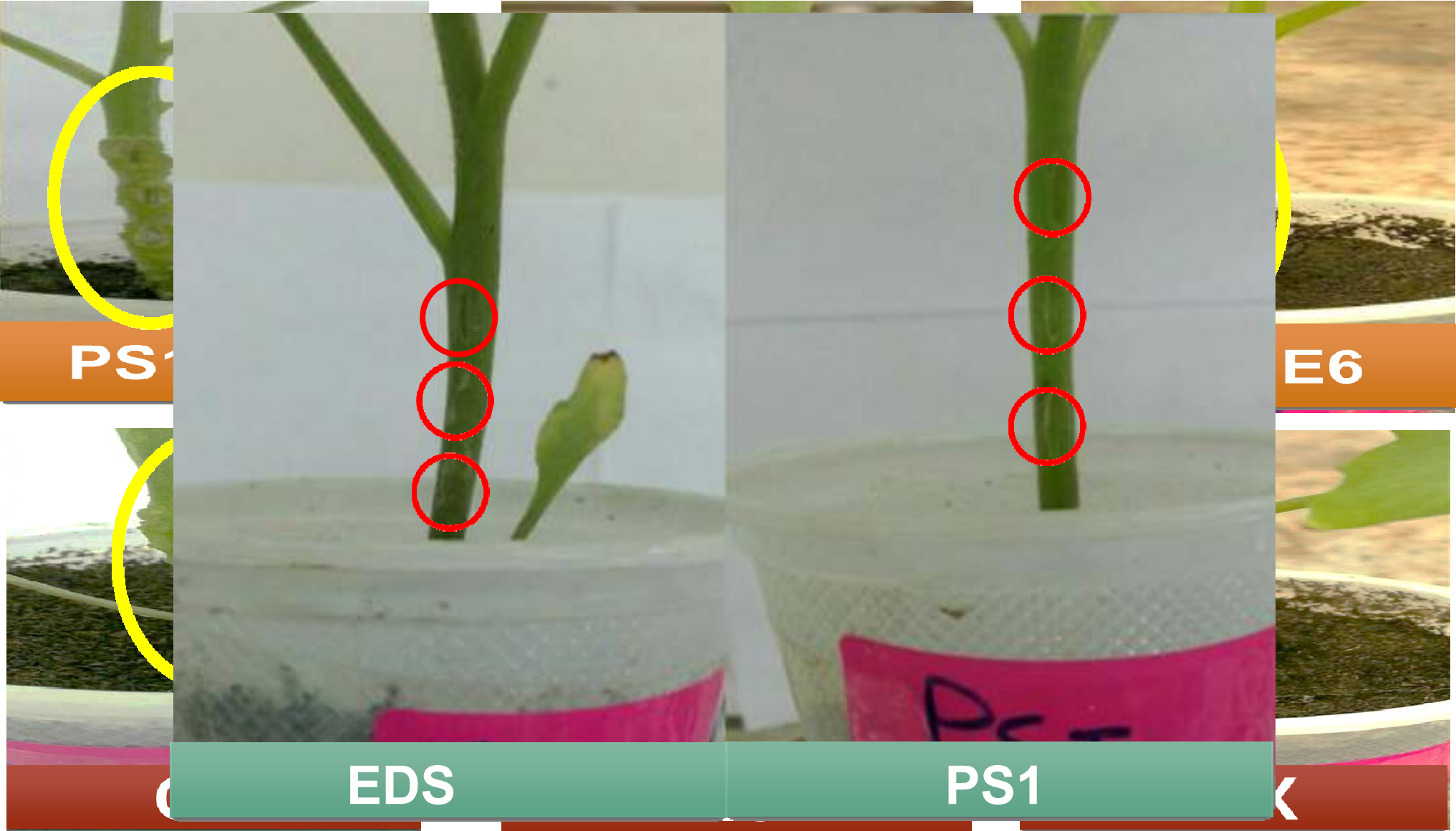
Résultats du test de virulence des souches d'*A.tumefacie*



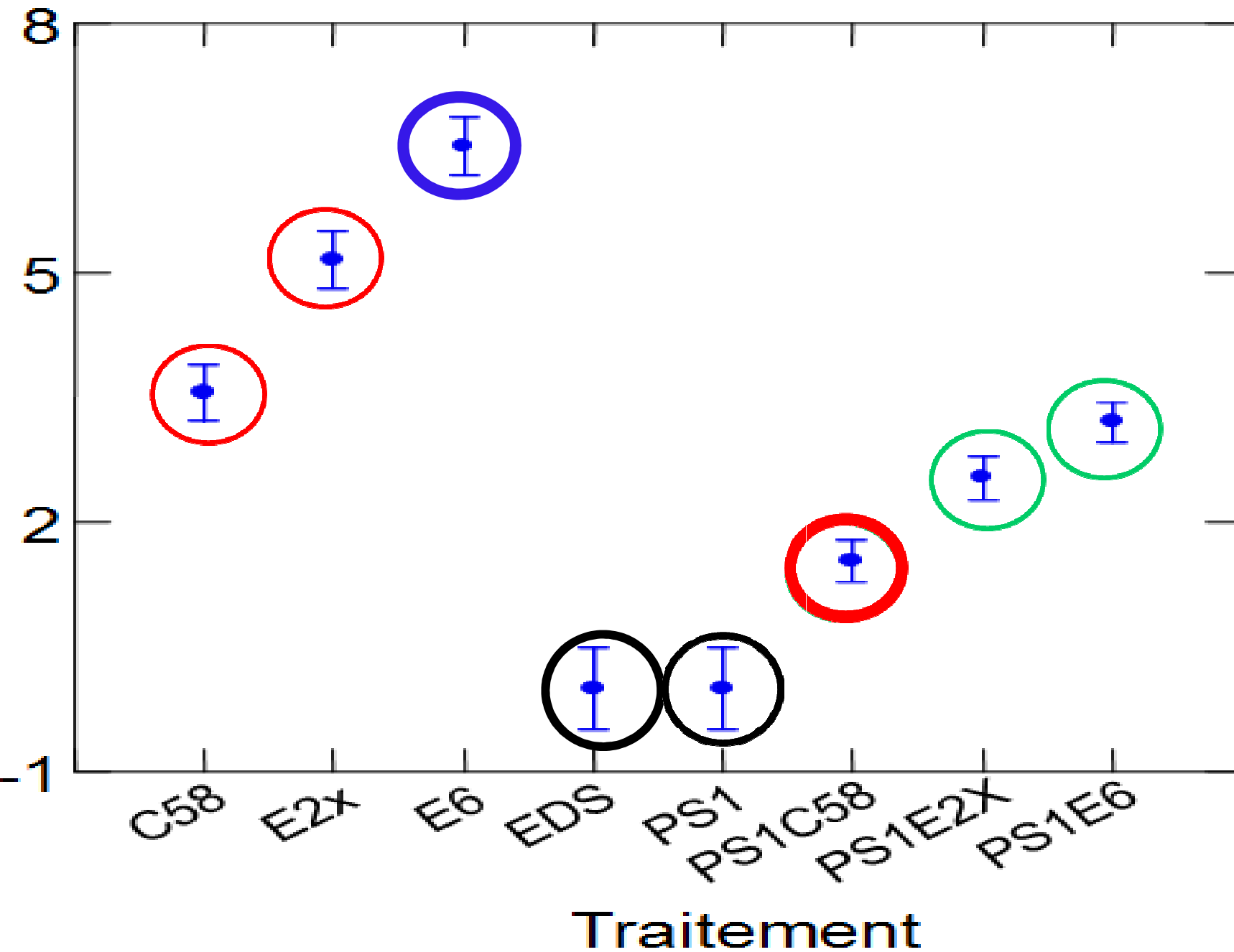
la production
des tumeurs

une
légère
Cicatrisation
de la
blessure
niveau de
point
d'inoculation

Résultats de l'essai de bioprotection de la tomate contre la galle du collet *in planta* par l'utilisation de la bactérie endophyte *Pseudomonas brassicacearum* souche PS1



Date	Traitement antagoniste/Pathogène			témoin positif			témoin négatif	
	PS 1/C58	PS 1/E6	PS 1/E2K	C58	E6	E2K	PS 1	
1	2,33	3,66	2,66	4,33	7,66	5,33	0	
2	1,67	3,66	2,33	3,33	6,33	4,33	0	
3	1	4,33	3	1,66	5,33	3	0	
4	1	3,33	1,33	5,33	5,66	7,33	0	
5	2	4,33	2,33	4,33	4,66	10,33	0	
6	2,66	6	2,66	2,66	5,66	5,33		
7	1,33	4,33	1,66	4,66	5,66	5		
8	1	3,66	2,66	3,33	6	4,66		
9	1,66	4	2	3,66	4	4,33		
10	2,66	3	2,33	2,33	4,33	6		
11	1	1,66	2,66					
12	1,66	1,66	3					
13	1	3	2,66					
14	1,66	3,33	2,33					
15	1,33	3	3,33					
16	1	2,33	3					
17	0,66	2,33	3,33					
18	2,33	2,66	2,33					
19	1,33	2,33						
20		1,33						



P=0.000



Pseudomonas brassicacearum
souche PS1

souche PS1

Efficace dans la
reduction de la
formation des
galles sur la
tomate

Montre un
fort pouvoir
antagoniste
in planta



Conclusion



L'induction d'une résistance systémique est l'un des mécanismes d'action pouvant être assuré par les bactéries endophytes et plus précisément par les *Pseudomonas* spp. Ce type de résistance peut protéger la plante même si l'endophyte n'est pas en contact avec l'agent pathogène.

Notre expérimentation a confirmé le pouvoir *antagoniste de la bactérie *Pseudomonas bradicasearum souche PS1 envers les trois souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, dont elle a pu supprimer ou réduire la taille des tumeurs chez la tomate infecté par l'*A.tumefaciens*. elle a montré un effet protecteur remarquable.**

Le test d'antagonisme in planta nous a permis de constater que le délai de 24h permis de retarder la formation et l'induction des tumeurs au niveau des plantules trempées dans la suspension bactérienne antagonistes mais il n'est pas suffisant pour la suppression total des tumeurs.





perspective

il est souhaitable de continuer ce travail dans le but de quantifier les métabolites secondaires produits par ces bactéries, et qualifier d'autres métabolites pouvant être impliqués dans la promotion de la protection des plantes.

Il serait intéressant d'utiliser l'espèce *Pseudomonas brassicacearum* envers d'autres agents des maladies végétales qui peuvent être considérés comme un problème dans le système agricole.





Mer ci pour votre
attention