

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires

Département des Sciences Agronomiques

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Phytopathologie.

**SURVIE D'AGROBACTERIUM SPP DANS LA SEVE DE
QUELQUES GENOTYPES DE VIGNE ET IMPLICATION DE LA
MULTIPLICATION VEGETATIVE DANS LA DISSEMINATION DE
LA MALADIE DU CROWN GALL**

Par

AIGOUN Wassila

Devant le jury composé de :

A. Boutekrabt	Professeur, USD de Blida	Président
F. Z. Chaouch	Maitre de conférence A, USD de Blida	Examinatrice
C. Chaouia	Maitre de conférence B, USD de Blida	Examinatrice
Z. Krimi	Professeur, USD de Blida	Promotrice

Blida, 19 Novembre 2012

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé à le réaliser.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Krimi Zoulikha, pour avoir accepté la direction de ce travail, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de phytopathologie et de m'avoir guidé avec une grande patience tout au long de ce travail. Je la remercie également pour ces précieux conseils, ces encouragements et pour son aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur A. Boutekrabt, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes remerciements vont au Dr. F.Z. Chaouch, pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour ces encouragements et conseils précieux dans les moments difficiles.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements au Dr. C. Chaouia, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements et mon profond respect vont à Mr. Djazouli. Z.D et Mr. Ali Oussalah, pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté et pour leurs encouragements.

Un grand merci à mes très chers parents, mes sœurs et mes frères pour leurs encouragements sans oublier Rokaya et Adam, Hafida et Djahida

Je remercie profondément mes voisins, pour leur soutien moral, leur aide et leur solidarité.

Enfin, un remerciement spécial à mon époux Said, mes deux anges MOURAD et YOUSRA, qui ont vécu avec moi la réalisation de ce travail étape par étape.

RESUME

120 boutures de vigne de 6 génotypes âgées d'une année, provenant de diverses provenances ont été indexés pour la présence d'*Agrobacterium vitis*. Après extraction du liquide vasculaire et isolement sur des milieux spécifiques et non spécifiques, 38 souches ont été identifiées comme *Agrobacterium* spp. L'analyse biochimique a révélé que 38 isolats soit 100 p. cent des isolats étaient affiliés au biovar 3 d'*Agrobacterium* et le test biologique a mis en évidence la capacité de ces souches à induire des nécroses sur les feuilles du tabac, confirmant par conséquent leur pathogénicité.

Dans les expériences de PCR, deux amorces hautement spécifiques pour la détection du plasmide Ti ont été utilisées (F14 et F749), l'ADN extrait des souches donne des signaux d'amplification d'une séquence du plasmide située entre les gènes *virG15* et *vir B11* encadrant une séquence correspondant à 300 Pb.

L'utilisation des gènes *vir* par l'analyse moléculaire a montré que les isolats étaient pathogènes. Le taux de 73.09 % d'agents pathogènes d'*Agrobacterium* analysés, indique la capacité d'*A. vitis* pour survivre systématiquement dans les tissus vasculaires des boutures de vigne. Cet état de fait, peut représenter un risque sérieux de propagation et de diffusion de la maladie du crown gall en Algérie.

Mots clés : *Agrobacterium vitis*, crown gall, boutures de vigne, liquide vasculaire, isolement, détection, PCR, plasmide Ti, propagation, dissémination, multiplication végétative.

SUMMARAY

120 cuttings of grapevine with 6 genotypes, having one year old, collected from different regions, were indexed for the presence of *Agrobacterium vitis*. After extraction of sap and isolation on selective and non-selective media, 38 strains had been identified as *Agrobacterium* spp. The biochemical tests revealed that the 38 strains were affiliated to the biovar 3 of *Agrobacterium* and the biological test on tobacco leaves demonstrate the ability of the strains to induce necrosis, confirming their pathogenicity.

In the PCR tests, two primers highly specific for the Ti plasmid detection were used (F14 and F749), the DNA extracted from strains designed the amplification of the plasmid sequence localized between *virG15* and *virB11* genes limiting a sequence corresponding to 300 pb.

The use of *vir*-genes in molecular analysis indicated the pathogenicity of the isolates. The rate of 73.09 % of analyzed pathogenic *Agrobacterium* strains indicates the capacity of *Agrobacterium vitis* to survive systemically in the vascular tissues of grapevine cuttings. This situation can be very dangerous in propagation and the dissemination of the disease of crown gall in Algeria.

Key words: *Agrobacterium vitis*, crown gall, grapevine cuttings, sap, isolation, detection, PCR, Ti plasmid- propagation- dissemination, vegetative propagation.

ملخص

لإنجاز هذه الدراسة , قمنا بجمع 120 طعم من أشجار العنب , تنتمي إلى 6 أنماط وراثية مختلفة , عمرها سنة من جهات مختلفة , وذلك للكشف عن تواجد *Agrobacterium vitis* داخل هذه الطعوم .

بعد استخلاص النسغ المتواجد في الأوعية و عزل البكتيريا في أوساط نوعية ولا نوعية, تبين أن 38 منها تنتمي إلى النوع *Agrobacterium spp.*

التحليل البيو كيميائي اظهر أن الـ 38 بكتيريا المعزولة تنتمي إلى فصيلة *Agrobacterium vitis* , و الاختبار البيولوجي أكد قدرتها على إحداث ثقب على أوراق نبتة التبغ, مما يعني أنها ممرضة.

في الاختبار الجزيئي PCR استعملنا شفرتين عاليتي التخصص لاكتشاف البلاسميد Ti المسبب للورم و هما (F749 و 14), (ADN) المستخلص من البكتيريا أعطى إشارات تدل على تضاعف قطعة من البلاسميد Ti المتواجدة في المنطقة بين الجينات *virG15* و *virB11* و التحليل الجزيئي باستعمال الجينات *vir* أوضح أن 73.09 % من البكتيريا المحللة ممرضة, وهذا يشير إلى قدرة بكتيريا *Agrobacterium vitis* على العيش داخل النسغ ضمن الأنسجة التي تشكل الأوعية التي تقود النسغ داخل طعوم أشجار الكروم, مما يشكل خطر جدي لانتشار و تفشي مرض التدرن التاجي (le crown gall) في الجزائر.

الكلمات المفتاحية: التدرن التاجي- الطعوم- اشجار العنب- النسغ- *Agrobacterium vitis*- عزل- التحليل

الجزيئي- البلاسميد Ti - انتشار - تفشي.

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure1.1. Schéma du plasmide Ti et de ces différentes régions géniques.

Figure1.2. Le processus de pathogénèse chez *Agrobacterium vitis*.

Figure 3. 1. Les différentes colonies issues du premier isolement.

Figure3.2. Le plant de tabac exprimant une réaction d'hypersensibilité suite à l'inoculation.

Figure3.3. Les différentes réponses du test de pathogénicité sur le tabac

Figure 3. 4. Répartition des profils biochimiques par génotype.

Figure 3.5. Migration sur gel d'électrophorèse (1%) des produits d'amplification par les amorces *virG15/virB11*.

Tableau 1.1. La situation de la viticulture en Algérie.

Tableau 2. 1. Variétés et porte-greffes de vigne utilisés, leur provenance et codification.

Tableau 3.1. Les colonies issues du premier isolement à partir du liquide vasculaire.

Tableau 3. 2. Résultats de la coloration de Gram des isolats issus de l'ensemencement sur les trois milieux de cultures.

Tableau 3. 3. Les résultats des tests biochimiques.

Tableau 3.4. Répartition des profils biochimiques par génotype.

TABLE DES MATIERES

RESUME

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION.....	8
1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR <i>Agrobacterium vitis</i> AGENT DE LA MALADIE DU CROWN GALL DE LA VIGNE.....	10
1.1.Le genre <i>Agrobacterium</i> spp.	10
1.2.Espèce <i>Agrobacterium vitis</i>	10
1.3.La maladie du crown gall de la vigne.....	15
1.4.Situation de la viticulture en Algérie.....	29
2. MATERIEL ET METHODES.....	31
2.1.Matériel végétal utilisé.....	31
2.2.Isolement et identification de l'agent causal.....	32
2.3.La caractérisation des souches isolées.....	34
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	40
3.1.Résultats.....	40
3.1.1. Etape d'isolement.....	40
3.1.2. La caractérisation des souches d' <i>Agrobacterium</i>	41
3.1.3. Répartition des différents profils biochimiques obtenu par rapport aux génotypes étudiés.....	46
3.1.4. Analyse moléculaire des souches isolées.....	48
3.2.Discussion.....	49
CONCLUSION.....	54
APPENDICES	
LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	62

INTRODUCTION

Lorsque les bactéries du genre *Agrobacterium*, agents de la galle du collet acquièrent par conjugaison le plasmide Ti (Tumor inducing, ou plasmide inducteur de tumeur), celles-ci peuvent devenir phytopathogènes provoquant la galle du collet (1). Cette maladie résulte du transfert à la plante d'un fragment d'ADN, l'ADN-T (ADN de transfert), porté par le plasmide Ti, induisant une tumeur productrice d'opines dans les tissus de la plante (2). Les opines sont des composés carbonés utilisés comme source de carbone par les agrobactéries ayant provoqué la tumeur (3).

La maladie du crown gall a été décrite comme une forme de colonisation génétique dans laquelle le transfert et l'expression des gènes de pathogénicité d'*Agrobacterium* spp. dans la cellule de la plante hôte se traduit par une prolifération incontrôlée des tissus ainsi transformés (4).

Le crown gall de la vigne peut conduire à la mortalité des plants dans les vignobles (5). Les vignes plantées dans les régions caractérisées par le gel sont plus sensibles au crown gall car il cause des blessures où la maladie peut s'initier.

L'agent pathogène du crown gall survit d'une manière systémique dans les tissus et les vaisseaux conducteurs de la vigne (6). Par ailleurs, les vignes qui sont indemnes du crown gall peuvent être infectées lorsqu'elles sont plantées dans des sols contenant des débris de vignes infectées par *Agrobacterium vitis* (7).

En effet, les plants de vignes infectées peuvent rester sans symptômes apparents, jusqu'à ce que la vigne soit blessée (7). *Agrobacterium vitis* survit en phase saprophyte et systémique dans le xylème de la vigne et peut être transmis d'un plant à un autre nouveau plant par la multiplication végétative des boutures de vigne (8)

Dans le cadre de lutte contre les maladies des plantes, l'introduction de la PCR dans la phytopathologie des plantes a ouvert de nouvelles possibilités pour une détection et une identification rapide des organismes phytopathogènes présentant une importance agronomique (9). Dans le cas d'*Agrobacterium* spp. Pathogènes, les amorces désignées pour l'amplification des souches pathogènes sont basées sur des séquences spécifiques du plasmide Ti comprenant la région *vir* (10) ou l'ADN-T (11).

Notre travail consiste à isoler les souches d'*Agrobacterium* spp. à partir du liquide vasculaire de trois porte-greffes et trois variétés de vigne de différentes provenances et procéder par la suite à leur identification par les méthodes classiques (tests biochimiques et tests biologiques) et par la méthode moléculaire (la PCR).

Une fois la présence des souches dans les boutures de vigne analysées est mise en évidence, l'implication de la multiplication végétative dans la dissémination de la maladie du crown gall de la vigne sera discutée dans la partie consacrée à cet effet.

CHAPITRE I

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR *AGROBACTERIUM VITIS*

AGENT DE LA MALADIE DU CROWN GALL DE LA VIGNE

Le 'crown gal' ou la galle du collet de la vigne est une maladie bactérienne causée essentiellement par *Agrobacterium vitis* (12). Cette maladie est répandue à travers le monde dans les vignobles où elle cause des dégâts importants.

1.1. Genre *Agrobacterium* spp.

Les agrobactéries sont des bactéries naturellement présentes dans les sols appartenant au genre *Agrobacterium* (13). *Agrobacterium* spp. comprend plusieurs espèces réparties en différents biovars (14). Si ces espèces acquièrent le plasmide Ti (Tumor inducing), elles peuvent devenir pathogènes, provoquant la galle du collet ou le crown gall (15).

Cette maladie se traduit par l'apparition d'une tumeur au niveau du collet de la plante. Celle-ci est le résultat du transfert à la plante d'une portion d'ADN du plasmide Ti et son intégration dans le matériel chromosomique végétal.

Du fait de leur importance économique, ces bactéries ont été étudiées d'un point de vue phytopathologique et surtout elles ont beaucoup intéressé le domaine de la biotechnologie, en effet, le plasmide Ti, qui porte les gènes de virulence chez *Agrobacterium*, a permis la construction des plantes génétiquement modifiées consistant en l'insertion de gènes d'intérêt dans l'ADN du plasmide Ti pour être transférés par la suite au génome de la plante (16).

Il existe plusieurs espèces d'*Agrobacterium*, telles *Agrobacterium vitis*, responsable de la maladie du crown gall de la vigne, ou *Agrobacterium rhizogenes*, responsable du hairy root, maladie caractérisée par l'apparition d'un chevelu racinaire au point d'infection.

1.1.1. Espèce *Agrobacterium vitis*

Agrobacterium vitis cause la maladie du crown gall seulement sur la vigne (17). C'est une bactérie endophyte de la vigne, elle peut être isolée à partir du liquide vasculaire des jeunes pousses (17). Cela permet sa dissémination par la multiplication végétative de la vigne lors du bouturage.

Agrobacterium vitis induit une réaction d'hypersensibilité sur la plante non hôte comme le tabac (*Nicotiana tobacco*) et cause des lésions nécrotiques sur les racines de la vigne (18). Cette propriété nécrotique que présente *Agrobacterium vitis* est spécifique au crown gall de la vigne. Dans le cas du crown gall des arbres fruitiers causé par *Agrobacterium tumefaciens*, les symptômes se manifestent seulement sous forme de tumeurs racinaires ou au niveau du collet.

Une autre particularité d'*Agrobacterium vitis*, qui est étroitement associée à la vigne, est sa capacité inhabituelle d'utiliser préférentiellement le L(+) tartrate par rapport au glucose, cela pourrait jouer un rôle dans la spécificité d'hôte (19). En effet, la vigne accumule des quantités importantes de cet acide organique le L(+)-tartrate (20). Chez plusieurs souches d'*Agrobacterium vitis*, les gènes de dégradation du L(+) tartrate sont portés sur des plasmides conjugatifs (21). Les souches d'*Agrobacterium vitis* préfèrent comme source de carbone le tartrate par rapport au glucose. Par contre, *Agrobacterium tumefaciens* n'utilise pas le L(+) tartrate (18).

1.1.2. Plasmide Ti

Le caractère pathogène des agrobactéries est lié à la présence dans la bactérie du plasmide Ti (22). Ce matériel extra-chromosomique représente 5% du génome bactérien (23). D'une manière générale, les plasmides se disséminent dans la population bactérienne par transfert conjugatif (2). Le plasmide Ti présente une structure moléculaire où les gènes codant pour la même fonction sont groupés en cinq régions (figure 1.1) (24).

a. Région ADN-T

Cette région est la portion transférable de la bactérie à la cellule végétale cible (25). Elle comporte les oncogènes ou les gènes de production d'hormones végétales

(auxines et cytokinine) qui provoquent la tumeur et les gènes de production d'opines qui seront utilisées comme source de carbone par les agrobactéries.

b . Région *vir*

Non transférable, cette région porte les gènes responsables de l'activation de la virulence, de l'excision de l'ADN-T et de son transport au sein de la cellule végétale infectée (26).

c . Région *tra* et *trb*

Ces gènes sont impliqués dans le transfert conjugatif du plasmide. Ils sont activés par les opines.

d . Région *Rép*

Les trois gènes de cette région permettent une réplication stable du plasmide.

e .Région de catabolisme des opines

Une quarantaine de gènes permet aux agrobactéries d'utiliser les opines libérées par le végétal suite à sa transformation par l'ADN-T.

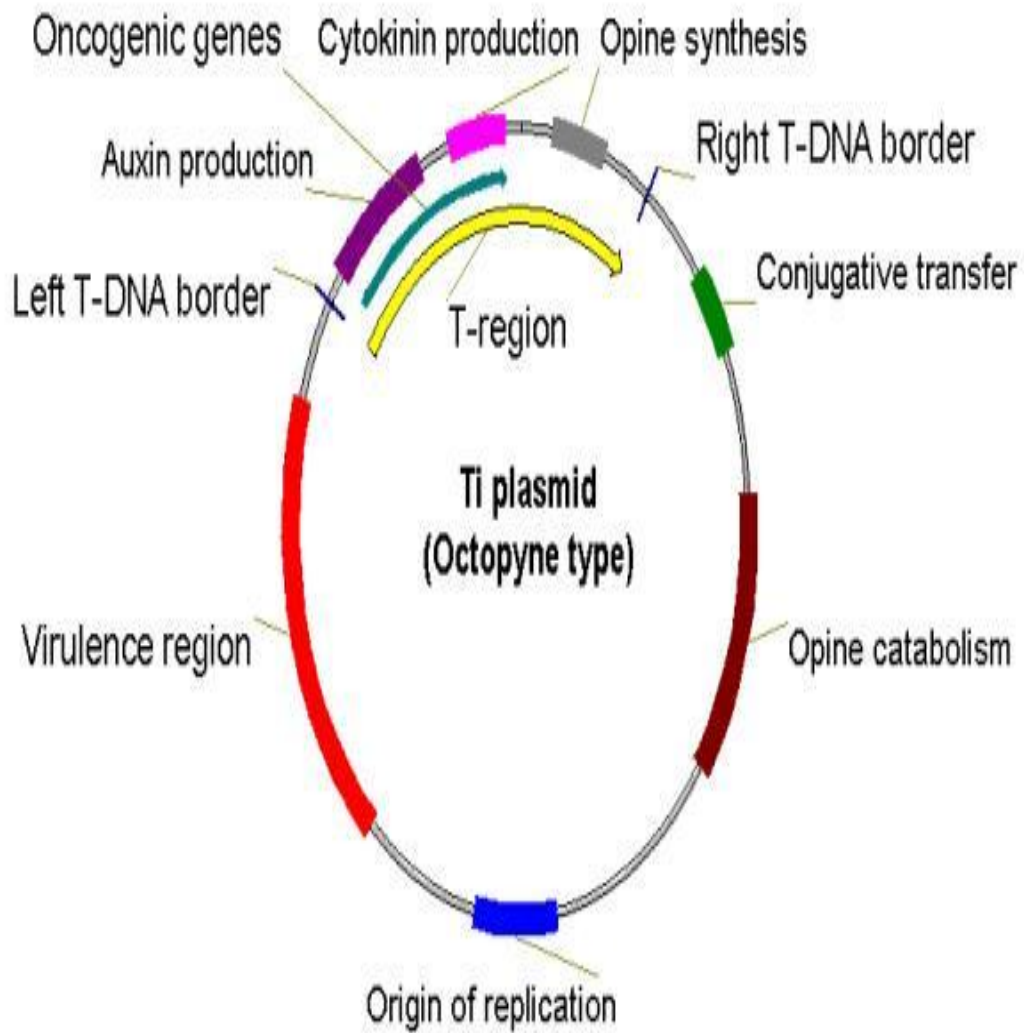


Figure 1.1 : Schéma du plasmide Ti et de ses différentes régions géniques (27)

1.1.3. Gamme d'hôte d'*Agrobacterium* spp.

La gamme d'hôtes d'*Agrobacterium* spp. est déterminée par un ensemble de facteurs liés à la bactérie et à la plante.

Une révision de la gamme d'hôtes des bactéries du genre *Agrobacterium* spp. a révélé que 634 plantes hôtes sont sensibles (approximativement 60% des espèces testées) appartenant à 93 familles, principalement les gymnospermes et dicotylédones (28). Par contre, seulement 3% des monocotylédones testées (257 espèces appartenant à 27 familles) ont été trouvées susceptibles à l'infection par *Agrobacterium tumefaciens*, par la formation de tumeur (29).

Les souches d'*Agrobacterium* spp ont été isolées de plusieurs plantes hôtes par exemple : Le peuplier (30), le Rosier (31), Le chrysanthème (32), la vigne (33), plusieurs arbres fruitiers (34) et *Ficus Benjamina* (35),

1.1.4. Diversité des souches d'*Agrobacterium vitis*

Les premiers plasmides Ti et ADN-T d'*Agrobacterium vitis* ont été décrits en 1984 (36). Après cela, plusieurs souches ont été étudiées et plusieurs types de Ti et d'ADN-T ont été définis.

Agrobacterium vitis est la seule des espèces du genre *Agrobacterium* spp. qui a été étudiée et décrite par rapport à son ADN-T, son plasmide Ti et les structures de ses chromosomes. Ces études ont été possibles car la gamme d'hôtes naturelle d'*Agrobacterium vitis* est limitée à une seule espèce qui est la vigne et parce que les collections de souches d'*Agrobacterium vitis* existent à travers tout le monde (17).

Trois structures de base de l'ADN-T ont été définies chez *Agrobacterium vitis*, chacune diffère de l'autre par le nombre de T-DNAs et l'arrangement des oncogènes (37).

a)- Structure de type octopine/cucumopine :

C'est la structure la plus abondante, retrouvée dans environ 60 % des souches d'*Agrobacterium vitis*, elle est constituée de deux T-DNAs indépendants (le TA-DNA et le TB-DNA) sur le plasmide Ti. (38)

- La région TA contient 5 oncogènes : *5*, *TA-iaaM*, *TA-iaah*, *ipt*, *6b* et les gènes des opines *acs* et *ocs* (ces deux derniers codent pour la synthèse de l'agrocinoïdine et l'octopine).
- La région TB contient les oncogènes *TB-iaam* et *TB-iaah* et les gènes d'opine *acs* et *cus* (pour la synthèse de cucumopine).

b)- Structure de type nopaline

Elle représente environ 30% des souches, elle contient un seul T-DNA avec les oncogènes :*5*, *iaam*,*iaah*,*6b* et le *3'* et contient les gènes d'opines *acs* et *nos* (pour la synthèse de la nopaline) (38) .

c)- Structure de type vitopine

Elle représente 10 % des souches qui comportent trois T-DNA indépendants : le T1, T2 et le T3 .Cette situation est retrouvée seulement chez *Agrobacterium vitis*

- Le T1 porte les gènes *6b* et *vis* pour la synthèse de la vitopine.
- Le T2 porte deux gènes : *iaaH* et *iaaM*.
- Le T3 porte le gène *ipt* et des gènes mutants inactifs *vis* (39).

1.2. Maladie du crown gall de la vigne

Le crown gall de la vigne est causé essentiellement par *Agrobacterium vitis* (40). Cette maladie s'exprime par une multiplication anarchique des cellules de la plante conduisant à la formation de galles ou tumeurs .Cette multiplication a lieu lorsque certains gènes du plasmide bactérien s'intègrent au génome de la plante causant ainsi la transformation génétique de la plante et par conséquent son infection.

Les signaux chimiques émis par la plante blessée et la spécificité de la bactérie d'adhérer sur les cellules végétales sont les facteurs déclenchant le processus d'infection. Le pathogène pénètre à la faveur des blessures causées par les incidents climatiques comme le gel, les pratiques culturales, les insectes, les nématodes (41). De même, des facteurs naturels déclenchant la formation de racines latérales et créant des blessures à la jonction des racines principales ainsi que les cicatrices foliaires à la suite de la chute des feuilles constituent également des facteurs de prédisposition (42).

L'infection se traduit par une prolifération rapide incontrôlée des cellules, entraînant la formation de la tumeur au site de la blessure. Il a été montré, en effet, qu'il s'agit d'un véritable cancer végétal (43). Les tumeurs peuvent ceinturer le tronc, bloquer la circulation des éléments nutritifs vers les rameaux et affecter ainsi la croissance, la longévité et la biomasse du végétal atteint, si elles ne génèrent pas sa mort. La galle du collet est une maladie responsable d'épidémies dans plusieurs régions du monde (34). Elle présentait et présente, jusqu'à nos jours, une grande importance économique pour les pépinières et les vergers. Les pertes financières ont été estimées à des millions de dollars par an (44).

1.2.1. Crown gall de la vigne en Algérie.

Les premières études sur le crown gall de la vigne en Algérie ont été initiées par Bouzar (45), Toua (46) et Bensaada (47). Ces études étaient basées sur l'estimation des taux d'infection et la caractérisation des populations d'*Agrobacterium vitis* dans les vignobles Algériens.

Les études réalisées en Algérie sur le crown gall ont permis d'évaluer les pertes des pépinières d'arbres fruitiers et des zones viticoles.

En effet, dans l'algérois, les pertes signalées sur les arbres fruitiers à noyaux et à pépins ont été estimées en 1990 à plus de 260.000,00 DA, avec un taux d'infection de 5 % (48).

Alim(48), a également signalé des pertes qui dépassent les 250000.00 DA sur les mêmes espèces fruitières. Le taux d'infection dans les vignobles de la région de Médéa a été estimé par Toua(46) à 0.3 %. Quant aux vignobles de la région Oranaise, ce taux s'élève à 1.3 % (47).

D'après Alim(49), l'épidémiologie d'*Agrobacterium vitis* n'a reçu que très peu d'attention comparée à la part réservée aux autres espèces.

1.2.2. Répartition géographique de la maladie.

La maladie du crown gall a été enregistrée dans plusieurs pays à travers le monde dont notamment la Hongrie (50), l'Inde (51), la Grèce (52), l'Espagne (53), l'Afrique du sud (53), la Chine (55), les USA (56), l'Italie (57), l'Australie (58), le Canada (59), l'Allemagne (60), la Palestine occupée (61) et l'Afghanistan (62).

1.2.3. Symptômes du crown gall sur la vigne.

Les premiers symptômes sont observés le plus souvent en Juin-Juillet, elles apparaissent de couleur pâle et elles sont charnues.

Les symptômes sur tout le plant se manifestent par des feuilles et des pousses qui flétrissent, tout le plant ou seulement certains sarments de vigne meurent. Initialement, les tumeurs sont blanchâtres, spongieuses puis deviennent foncées et cassantes. Ces tumeurs sont de taille variable et se localisent généralement sur le pied.

Le crown gall peut se développer sur une blessure fraîche ou sur les parties ligneuses de la vigne. Il est généralement repéré dans les parties basses du tronc ou au point de soudure des greffes. Les galles ont été aussi observées dans les racines, ce qui peut conduire à une sous estimation de l'incidence de la maladie dans un vignoble (6).

En plus des symptômes de tumeurs, cette maladie cause des nécroses dans certaines parties de racines de vignes infectées. Ces nécroses sont liées à la spécificité-hôte (8). Toutes les souches tumorigènes et non tumorigènes causent une réaction nécrotique, qui se traduit par une morte rapide des cellules. De plus, il a été rapporté que les nécroses sur les tissus de la vigne sont associées à la production de polygalacturonase (PG) par la bactérie (63). Il a été rapporté que les bactéries qui causent des nécroses sur les plantes hôtes sont capables d'induire une réaction hypersensible (HR) sur les plantes non hôtes (64). Cette propriété est souvent utilisée dans les méthodes de détection de la bactérie.

1.2.4. Incidence de la maladie du crown gall

Le crown gall des arbres fruitiers et de la vigne engendre une importante perte économique au niveau des pépinières du fait que la commercialisation des plants malades n'est pas autorisée (65) et les plants atteints doivent être impérativement incinérés (66).

Au court du 20^{ème} siècle, le crown gall était devenu la maladie la plus importante dans les pépinières et dans les plantations. Quoique dans certains cas, comme les cerisiers, aucun effet alarmant n'a été démontré (67). Dans d'autres cas comme la vigne, la réduction de la vigueur et du rendement peut atteindre les 40% surtout dans des conditions climatiques caractérisées par le gel comme celles signalés en Californie (68).

Durant les dernières décennies, la dissémination de la maladie du crown gall a considérablement augmenté à cause des échanges économiques intensifs du matériel de propagation infecté où la bactérie se trouve dans les tissus du végétal à l'état latent (8).

La baisse de la production des plantes comprenant des galles est causée par la destruction de la vascularisation dans le site de développement de la galle, conduisant ainsi à une mauvaise circulation de l'eau et des éléments nutritifs dans les différentes parties de la plante (69). Par ailleurs, le crown gall constitue un foyer d'infection secondaire pour d'autres pathogènes comme la bactérie *Pseudomonas syringae* et le champignon *Armillaria mellea* qui peuvent augmenter la sensibilité de la plante aux stress abiotiques (70).

Les populations tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. peuvent affecter négativement la portée des greffes parce que les tissus de la tumeur développés sur le lieu de l'union de la greffe empêchent la ligature entre le greffon et le porte greffe (68). Si la galle est petite et localisée, la vigne peut survivre avec un système vasculaire réduit mais fonctionnel se traduisant par la diminution de la vigueur et la production de la vigne. Les galles de grande taille étranglent la vigne, causant une décroissance significative et conduisant à la mort de la vigne (37).

De plus, le crown gall peut avoir une incidence économique d'une part, par les effets directs de perte de récolte quantitativement et qualitativement, et d'autre part, par des effets indirects concernant le coût économique, social et éventuellement environnemental des pratiques de lutte et la limitation des échanges internationaux.

1.2.5. Dissémination du crown gall de la vigne

Les *Agrobacterium* spp. sont des pathogènes qui envahissent l'entrée des plantes à partir des racines et les tumeurs via les vaisseaux conducteurs, les parties saines de la plante peuvent lentement devenir infectées sans apparition de symptômes. La dissémination systémique d'*Agrobacterium* spp. a été décrite sur plusieurs plantes hôtes comme le chrysanthème (71), le rosier (35) et exclusivement sur la vigne (72).

Comme le matériel de propagation infecté est la principale source de dissémination d'*Agrobacterium vitis* dans la vigne, il est d'une grande importance de sélectionner ou produire un matériel végétal sain et cela pour réduire les pertes économiques causées par le crown gall (37).

Quoi que le matériel de propagation infecté est la principale source de dissémination du pathogène dans la vigne, une contamination de plant sain de vigne a partir du sol a été démontrée (73). L'infection par *Agrobacterium* spp. à partir du sol est probablement favorisée par les nématodes comme le cas du coton (74), le cerisier (75) et la vigne(76). Les portes greffe résistants n'ont pas été infectés par le crown gall, par contre les symptômes ont apparu sur ceux qui sont sensibles (77).

Cela indique qu'*Agrobacterium* spp. peut s'introduire par les racines à travers les blessures causées par les nématodes. De plus les nématodes peuvent transporter la bactérie d'une plante à une autre.

1.2.6. Cycle de la maladie du crown gall de la vigne

Dans le cas de la vigne, la majorité des infections sont le résultat de matériel de multiplication contaminé.

A. Survie de la bactérie dans la vigne

Le point clef dans le cycle de la maladie du crown gall de la vigne est la survie systémique d'*Agrobacterium vitis* dans la vigne. En 1968, Lehoczky a présenté la première évidence qu'*Agrobacterium vitis* survit d'une manière systémique dans la vigne et induit le crown gall en faveur des blessures causées par le gel à de basses températures ou par d'autres sources. Cette information est devenue particulièrement importante pour expliquer l'induction du crown gall, la nature systémique du pathogène ainsi que son mode de dissémination a travers le matériel végétal.

Des études plus poussées réalisées par Lehoczky et d'autres ont montré qu'*Agrobacterium vitis* peut être isolée à partir du liquide vasculaire des vignes blessées (78). Des échantillons du liquide vasculaire ont parfois donné des cellules pures d'*Agrobacterium vitis*, alors que d'autres échantillons pris de la même vigne infectée ou d'autres vignes montrent une distribution inégale de la bactérie.

Lehoczky (1978) met en évidence l'hypothèse que le pathogène hiverne en premier lieu dans le système racinaire, il ajoute que sous les conditions d'humidité au printemps, la poussée de la sève exercée par la pression racinaire à travers le xylème cause l'entraînement des cellules bactériennes avec le fluide dans le xylème à partir des racines de bas en haut, ou elles peuvent être attirées vers les blessures. En effet, les cellules du

xylème de la vigne sont assez larges et peuvent permettre l'entraînement d'un certain nombre d'organismes.

Plusieurs travaux ont montré que l'isolement d'*Agrobacterium vitis* peut être effectué directement à partir de sarments âgés d'un an, mais le pourcentage de bactéries dans les boutures dans lesquelles *A.vitis* a été détectée est souvent très variable, cela peut refléter la distribution aléatoire de la bactérie dans la vigne.

La translocation d'*A.vitis* dans les jeunes pousses de vigne a été démontrée par Tarbab et Goodman (1987), qui ont inoculé les pousses en submergeant leur base dans une suspension bactérienne et ils ont surveillé le mouvement des bactéries. Ces auteurs ont constaté que les bactéries se déplacent vers le haut à partir du point de départ de 30cm pendant 24 heures.

B. Survie dans le sol

Le genre *Agrobacterium* est un habitant naturel du sol, c'est la raison pour laquelle le sol est généralement considéré comme une source d'infection. Ceci est vraie pour les arbres fruitiers, mais pour le cas du crown gall de la vigne, c'est le matériel de propagation infecté qui est considéré comme la source d'infection principale (79).

Aux USA, dans les sols de prairies, c'est les bactéries non pathogènes d'*Agrobacterium radiobacter* qui prédominent (80). D'autre part en Algérie, il a été montré que les sols non cultivés sont peuplés avec des bactéries d'*Agrobacterium spp* appartenant aux biovar 1 et 2 avec relativement une proportion élevée de bactéries pathogènes du biovar 1(81). Le nombre de bactéries pathogènes varie en fonction des saisons. Durant la période de végétation, le nombre de bactéries pathogènes est élevé, mais il diminue considérablement durant l'hiver (82).

Aux USA, les études dans les vignobles ont montré qu'*Agrobacterium vitis* peut être isolée seulement de la rhizosphère des plantes malades (83).

Il faut noter qu'*Agrobacterium vitis* survit dans les débris racinaires pendant plusieurs années, et peut initier de nouvelles infections à partir des sols où des plantes infectées ont été plantées (84). Quand des sols ont été analysés spécifiquement pour *Agrobacterium spp*. Les bactéries d'*Agrobacterium vitis* n'ont pas été détectées (81).

Le potentiel d'*Agrobacterium vitis* à persister dans le sol a été testé. Les souches d'*Agrobacterium vitis* restaient tumorigènes dans les débris de vigne (84).

Dans ce dernier cas, *Agrobacterium vitis* tumorigène persiste dans une phase saprophyte lorsque les galles ne se forment sur aucun tissu de la vigne. Ces données indiquent que lorsque le vignoble devient contaminé par *Agrobacterium vitis*, les bactéries vont survivre dans leurs débris plusieurs années après l'arrachage des vignes. Par conséquent, la probabilité d'éradiquer le pathogène des sites de vignobles en arrachant les vignes infectées et en laissant le sol en jachère ou en plantant des plantes non hôte peut varier en fonction des débris de vigne dans le sol et de la vitesse de décomposition.

1.2.7. Processus de pathogénicité chez *Agrobacterium vitis*

La pathogénèse d'*Agrobacterium* spp. nécessite deux éléments de base :

Le transfert et l'intégration de l'ADN bactérien dans le génome de la plante et l'altération résultante du métabolisme cellulaire des plantes qui se traduit par la prolifération des cellules et la synthèse de composés nutritifs qui procure un avantage sélectif pour la bactérie (Figure 1.2)

Le processus d'infection par *Agrobacterium* spp. se fait selon les étapes suivantes :

1.2.7.1. La reconnaissance d'une cellule sensible.

Les cellules des plantes blessées secrètent des acides aminés, des acides organiques et des sucres qui agissent comme une source d'attraction chimique pour les *Agrobacterium* tumorigènes, qui se lient aux cellules de la plante dans une orientation polaire au site de la blessure (85).

1.2.7.2. L'attachement de la bactérie à la cellule végétale

En premier lieu, un attachement faible aux cellules de la plante est accompli à travers la synthèse de polysaccharides d'acétylates, suivie par une forte fixation à travers les fibrilles de cellulose (85). Simultanément, l'opéron exigé pour le transfert de l'ADN virulent est activé par deux constituants régulateurs du système : le Vir A/Vir G (86).

1.2.7.3. L'induction de l'expression des gènes vir

La présence de conditions d'acidité extracellulaire (PH= 5.0-5.5), les composés phénoliques et les monosaccharides aux sites de blessures induit directement ou indirectement l'autophosphorylation des récepteurs de la Kinase VirA transmembranaire (87).

1.2.7.4. Production d'une copie transférable de l'ADN-T

A travers l'action coopérative des protéines Vir D₁ et Vir D₂, un seul fragment d'ADN coupé (le brin T) est synthétisé à partir d'une ou plusieurs régions du plasmide Ti (tumor inducing) délimité par 25 séquences de nucléotides répétés (87). La protéine Vir D₂ reste liée à la terminaison 5' du brin T-DNA par une liaison covalente qui est couverte par plusieurs copies (environ 600) de la protéine Vir E2 (88).

1.2.7.5. Transfert du complexe T à la cellule végétale

Le complexe protéinique brin T-DNA/Vir (T-complexe) est exporté de la bactérie *Agrobacterium* vers le cytoplasme de la cellule de la plante via un appareil de sécrétion bactérien codé par l'opéron vir B et vir D₄ (88). Les protéines Vir D₂ et Vir E₂ possèdent une séquence de localisation nucléaire, ils interagissent avec les protéines endogènes de la plante pour faciliter l'intégration du complexe-T au noyau de la plante. (89).

1.2.7.6. L'intégration du complexe T dans le génome nucléaire de la plante

L'ADN transféré d'*Agrobacterium* spp. s'intègre dans le génome de la cellule végétale à travers une recombinaison non homologue dans un processus qui exige des protéines déterminées de la plante en rapport avec la recombinaison de l'ADN (Figure 1.2) (90).

1.2.7.7. L'expression des gènes portés par l'ADN-T

Il ya deux classes générales de gènes sur le T-DNA

1. Les oncogènes

Ces gènes s'expriment dans la plante en modifiant la synthèse des phytohormones, dans la cellule infectée de la plante conduisent ainsi à la génération du phénotype sous forme de tumeur (91).

L'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* de type octopine comporte 5 oncogènes : *iaaM*, *iaaH*, *ipt*, *6b*, *5b* (91).

-*iaaM* (Tryptophane mono-oxygénase) converti le tryptophane en indole

3- Acétamide

- *iaaH* (Indole Acétamide Hydrolase) catalyse la synthèse d'acide indole acétique (AIA, hormone de la plante) (92).

Les produits des gènes *ipt* agissent comme des médiateurs à travers la condensation de l'adénosine mono phosphate (AMP) et l'isopentyl mono- phosphate (iPe PP) avec ou sans un terpénoïde qui est inconnu conduisant à la formation de la zeatine (93).

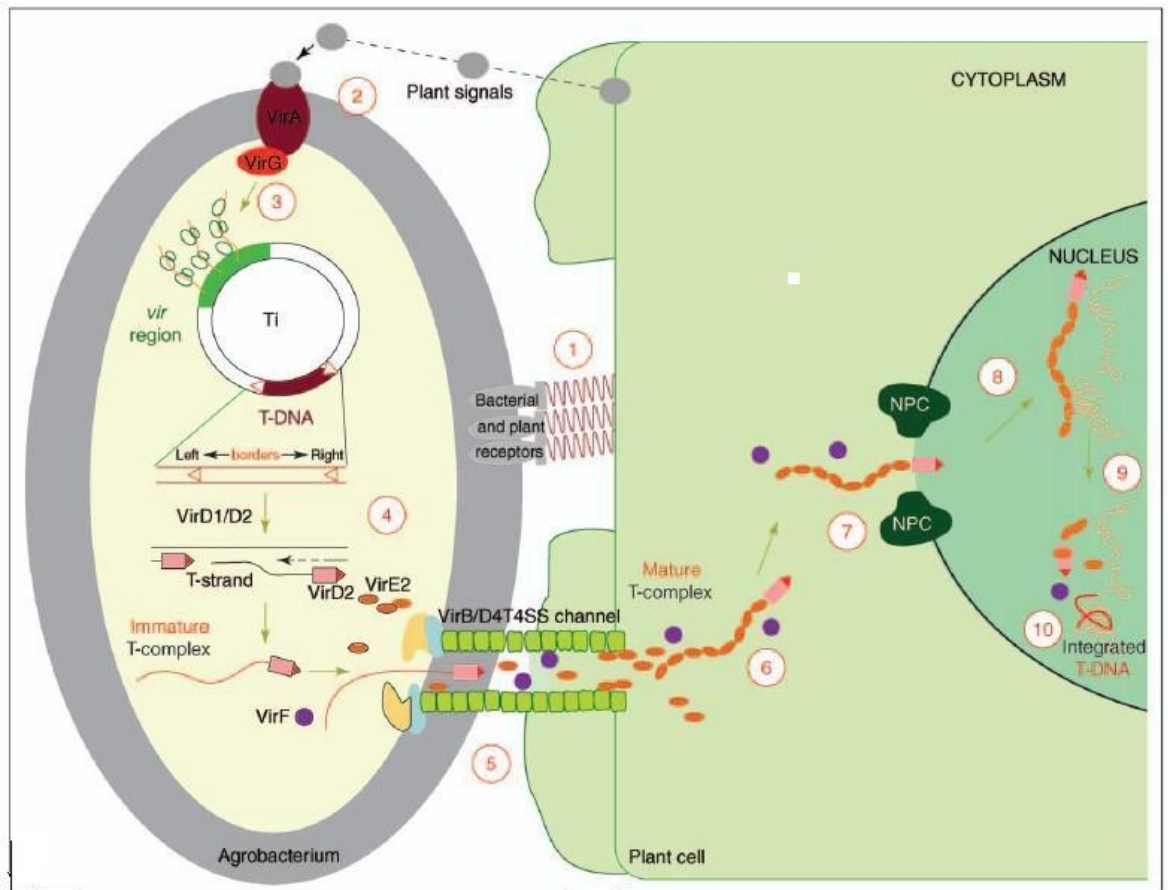
L'accumulation massive des produits des auxines et des cytokinines résultant de l'activité des enzymes des gènes *iaaM*, *iaaH* et *ipt* est la première voie vers la tumorigénèse.

Les gènes *6b* et *5* jouent un rôle secondaire dans la modification de l'effet des phytohormones dans la cellule infectée.

2. Les gènes responsables de la synthèse des opines

La seconde classe des gènes du T-DNA est impliquée dans la synthèse d'acides aminés de faible poids moléculaire et les dérivés des sucres phosphates appelés les opines. Plus de 20 types d'opines différentes ont été identifiées dans la maladie du crown gall et du chevelu racinaire (94).

La production des opines dans les cellules de la plante transformée crée une niche écologique sélective et bien distincte pour les souches infectieuses d'*Agrobacterium* spp. (95).



Le processus de transformation comprend 10 étapes majeures : (1) la reconnaissance et l'attachement d'*Agrobacterium* à la cellule de la plante hôte (2) perception des molécules signale spécifique à la plante par les deux composés de transduction de signal d'*Agrobacterium* Vir A/VirG (3) l'activation des gènes de la région de virulence (4) la régénération d'une copie mobile du T-DNA par le complexe protéique VirD2/ D2 (5) la livraison du complexe VirD2-DNA avec d'autre protéines Vir dans le cytoplasme de la cellule hôte (6) l'association du VirE2 avec le brun T et la formation du complexe T qui va se déplacer vers le noyau de la cellule hôte (7) la pénétration du complexe- T dans le noyau de la cellule hôte (8) le déplacement du T-DNA vers le point d'intégration (9) la privation du complexe -T de ces protéines de déplacement (10) l'intégration de l'ADN-T avec le génome de la plante hôte.

Figure 1. 2: Le processus de pathogénèse chez *Agrobacterium vitis* (87)

1.2.8. Méthodes de diagnostic de la maladie du crown gall de la vigne

Les premiers protocoles de détection des agrobactéries dans le matériel de propagation concernaient à isoler les bactéries à partir des sarments sur un milieu sélectif, leur identification par des tests biochimiques, physiologiques et enfin la détermination de leur pathogénicité sur des plants tests (96).

Comme le test de virulence pour *Agrobacterium* spp. prend typiquement 3-4 semaines, plusieurs autres méthodes ont été développées y compris les tests sérologiques (97) et l'hybridation de l'ADN (98).

L'introduction de la PCR (Polymérase Chaîne Réaction) dans la pathologie des plantes a ouvert de nouvelles possibilités pour une détection plus rapide et l'identification d'*Agrobacterium* spp. dans les plantes à importance agricole (13). En effet, les premières études ont commencé au début des années 90 (99).

La source du matériel désigné pour l'amplification des souches pathogènes est basée sur des régions spécifiques du chromosome (100) ou des séquences du plasmide Ti comprenant la région de virulence (*vir*) (16).

Dans le but d'augmenter le degré de détection, les méthodes de la PCR ont été combinées avec des techniques sérologiques (immunocapture) pour éviter les faux positifs et pour augmenter la spécificité de la réaction, la (semi) nested PCR peut être utilisée (101).

La diversité génétique élevée d'*Agrobacterium* spp. encore sur un seul hôte, peut exiger l'utilisation de la technique de la PCR multiplex. Comme ces techniques ne permettent pas seulement la détection des souches pathogènes, mais aussi leur identification précise, elles peuvent être utilisées efficacement pour remonter à l'origine de l'infection dans le matériel végétal (102).

1.2.9. Les méthodes actuelles de lutte contre la maladie du crown gall de la vigne

Comme pour chaque maladie, le crown gall est le résultat de l'interaction entre l'environnement, le pathogène et la plante hôte. L'absence de conditions favorables pour chacun de ces éléments empêche le développement de la maladie. Cibler chaque paramètre de ce triangle de la maladie assure un bon contrôle du crown gall.

1.2.9.1. La lutte culturale

Jusqu'à présent, seules les méthodes préventives permettent de réduire l'impact du crown gall sur la vigne (103). La désinfection des outils et des lieux de travail aura pour effet de réduire les risques d'infections (104).

Il a été montré que la rotation et l'assolement avec des plantes non hôtes, les tailles soignées et la bonne protection des plaies de greffage et de taille, peuvent également limiter l'extension de la maladie (105). Par ailleurs, l'utilisation de plantes indemnes de bactéries, ainsi que l'indexage périodique sont essentiels dans le contrôle de la maladie du crown gall (97).

Comme il a été souligné au paravent, les sols lourds et humides, le gel et les nématodes peuvent avoir une grande incidence sur la maladie du crown gall, c'est pour cela que les pratiques de gestion qui réduisent de tels dommages seraient plus efficaces pour réduire l'impact de cette maladie (76).

La bactérie peut demeurer dans les racines en décomposition pendant plusieurs années, et par conséquent peut constituer une source d'inoculum pour la réinfection de nouvelles vignes (84). Il est préconisé cependant de procéder à l'arrachage d'une plus grande masse du matériel racinaire qui permettra de réduire les chances de réinfection des vignes replantées.

1.2.9.2. La sélection du matériel de propagation sain indemne de pathogènes

La présence systémique d'*A. vitis* a été démontrée sur plusieurs espèces de plantes qui causent la dissémination du pathogène avec la propagation du matériel végétal.

Pour la détection d'*A. vitis* dans le matériel de propagation de la vigne, l'indexage doit être effectué à différentes étapes de la propagation, cela inclut le test sur les plantations de pieds-mère et les sarments aoûtés utilisés pour l'enracinement et le greffage.

La présence d'*Agrobacterium spp* Pathogènes dans les plantations de pieds-mère peut être détectée simplement par l'analyse de la sève.

1.2.9.3. La production de plants sains d'*Agrobacterium* spp.

Plusieurs méthodes ont été utilisées :

1.2.9.3.1. La thermothérapie

Le trempage des boutures dormantes de la vigne dans de l'eau chaude de 50-52°C pendant 30 à 45 mn élimine la plupart des cellules d'*A.vitis* des sarments. Le traitement avec des températures élevées peut être néfaste pour les bourgeons dormants de la vigne, et cela dépend de la variété et de l'état des boutures (106).

Le traitement avec de l'eau chaude pour éliminer *A.vitis* du matériel de propagation de la vigne a été testé en Australie (12), l'Italie(107), aux USA (108) et en Iran (109). Des études ont montré qu'*in vitro*, chaque traitement à la chaleur élimine totalement *A.vitis*, mais *in vivo*, l'élimination de ces bactéries dans les boutures est partielle. Cela limite l'application de cette méthode simple car elle n'élimine pas toutes les cellules pathogènes.

1.2.9.3.2. La culture de méristèmes

La culture des bourgeons apicaux et des méristèmes *in vitro* peut être aussi utilisée pour obtenir des plants indemnes d'*Agrobacterium* spp. La propagation *in vitro* consomme du temps et nécessite un équipement de laboratoire, mais elle est très efficace. En utilisant cette méthode, un grand nombre de plants de *Vitis vinifera* indemne d'*A.vitis* a été produit à partir de bourgeons de 2 cm de long (110). Similairement, Thies et collaborateurs (111) ont régénéré la vigne muscadine stérile *Vitis rotundifolia Michx* à partir d'un méristème apical de 0.2-0.4 cm de long. A la fin de l'expérimentation, il s'est avéré que le crown gall n'a pas été détecté sur les jeunes pousses vertes, ce qui signifie qu'elles peuvent être utilisées comme une source initiale pour la production de plants de vigne sains.

1.2.9.4. Le contrôle biologique

L'une des stratégies utilisées pour combattre les maladies des plantes est l'utilisation d'organismes antagonistes non pathogènes comme les virus, les bactéries, les champignons

et les insectes. Pour les agrobactéries pathogènes, la plupart des microorganismes antagonistes utilisés appartiennent au genre *Agrobacterium* spp.

La première bactérie efficace qui a montré un effet inhibiteur sur les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium* spp. sur le pêcher est *Agrobacterium radiobacter* K84 qui a été isolée en Australie par Kerr (1972). Cette souche K84 a par la suite été rapidement testée sur plusieurs autres plantes (112).

La souche K84 contient un plasmide responsable de l'effet bactériocinogène : Le pAgK84 de taille 47 kb. Ce dernier code pour la production de l'agrocine 84 et confère aux souches K84 la résistance à l'agrocine (113). L'agrocine 84 est un analogue du nucléotide d'adénine qui ressemble à l'agrocinopine qui inhibe la synthèse de l'ADN.

L'utilisation de la souche K84 est limitée vis-à-vis d'*A.vitis* car son plasmide pTi est résistant (60). Comme *Agrobacterium radiobacter* K84 est inefficace vis-à-vis d'*A.vitis*, plusieurs expériences ont été réalisées pour isoler d'autres souches antagonistes capables d'empêcher la maladie du crown gall de la vigne.

En effet, la souche pathogène d'*A.tumefaciens* biovar 2 appelée j73 isolée en Afrique du Sud a inhibé la croissance de plusieurs souches d'*A.vitis in vitro* et ont montré quelques activités sur la vigne *in planta* (114). Les souches non virulentes d'*A.radiobacter* biovar1 nommées HLB-2 isolées en Chine ont été aussi antagonistes à plusieurs souches d'*A.vitis* (115). Une autre souche non pathogène d'*A.vitis* la F2/5 isolée en Afrique du Sud inhibe la croissance d'un certain nombre de souches d'*A.vitis in vitro* et a même été capable d'arrêter la formation du crown gall sur vigne dans une pépinière expérimentale. (116).

1.2.9.5. La sélection et l'hybridation d'espèces résistantes au crown de la vigne

La solution la plus efficace pour prévenir le crown gall est l'utilisation de plants résistants à *Agrobacterium* spp.

La résistance au crown gall peut être définie comme la capacité d'un plant à maintenir une croissance normale en présence d'une souche pathogène d'*Agrobacterium* spp donnée.

La résistance au crown gall a été bien étudiée sur la vigne (*Vitis sp*). Les génotypes *Vitis* testés ont montré trois réponses différentes sur le niveau phénotypique vis-à-vis des infections avec *Agrobacterium spp*. Le premier groupe forme une galle au site de la blessure mais les opines ne sont pas détectées. Dans le second groupe, les blessures contiennent des opines, mais il n'y a pas de formation de tumeur. Cela indique que la transformation a eu lieu sans apparition de la tumeur. Dans le troisième groupe, une réaction nécrotique apparaît (117).

Ces données rapportent que l'interaction *Vitis spp-Agrobacterium spp* dépend de la plante hôte et du pathogène.

Des études plus poussées ont été réalisées en Afrique du Sud, en Hongrie, aux USA, en Suisse, en Allemagne et récemment en Iran, pour sélectionner des génotypes de porte-greffe résistants (118 ; 119). Ces études ont révélé des porte-greffes résistants prometteur dont *Vitis riparia* cv Gloire de Montpellier, le 3309 C et le Paulsen. Les bases génétiques et physiologiques de résistance au crown gall de ces espèces sont encore inconnues.

Dans le domaine expérimental, l'utilisation du porte-greffe *Vitis riparia* cv Gloire de Montpellier a significativement réduit la fréquence de la maladie du crown gall sur la vigne (120).

1.2.9.6. L'introduction de la résistance au crown gall par le biais du génie-génétique

Dans le future proche, la résistance au crown gall peut être améliorée par l'innovation génétique en ciblant les protéines de virulence et les fonctions de pathogénicité qui contribuent au transfert de l'ADN-T et à la formation de la tumeur. Le ciblage des gènes de la plante hôte nécessaire pour le transport nucléaire et l'intégration de l'ADN-T aux chromosomes de la plante hôte peut aussi être envisagé (79).

1.3. Situation de la viticulture en Algérie.

Avant 1962, la superficie viticole était composée en grande partie par des cépages a vin occupant une superficie de 355.000,00 ha contre seulement 5000 ha réservée aux raisins de table (121).

La viticulture nationale est répartie en trois grandes zones ; la zone littorale cultivée en raisin précoce, les plaines intérieures cultivées en raisin de saison et les coteaux et les montagnes cultivées en raisin tardif (122)

Les statistiques en 2003-2004 indiquent que la superficie totale réservée à la vigne est de 99.432 ha soit 9% de la SAU (superficie agricole utile) (tableau 1.1). Ce faible taux d'occupation est lié en grande partie aux arrachages massifs opérés dans les années 1970, avec toutes les conséquences induites en matière de nouvelles plantations. Cependant, le développement de la viticulture a pris une place importante dans la nouvelle vision du développement du secteur agricole, à travers le Plan National de Développement Agricole(PNDA) qui a été initié à partir de l'an 2000.

Tableau 1.1 : La situation de la viticulture en Algérie (123)

Année	Superficie(Hectare)				Production (quintaux)			
	2001	2002	2003	2004	2001	2002	2003	2004
Vigne de table	38.260	41.860	48.520	50.465	1.612.580	1.881.390	2.157.140	2.220.550
Vigne de cuve	30.190	38.010	45.380	47.070	347.570	458.510	619.140	616.000
Raisin sec	90	120	125	161	1.440	4.070	3.100	2.450
Champs de pied-mère	1.140	1.560	1.605	1.736	n.d	n.d	n.d	n.d
TOTAL	69.680	81.550	86.550	99.432	1.961.590	2.323.970	2.668.120	2.839.000

Les principaux inconvénients de climat que rencontre la vigne en Algérie sont les gelées et la faiblesse ou la mauvaise répartition des précipitations qui définissent l'aire de la culture de vigne(122).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

Afin de contrôler la propagation du crown de la vigne, la connaissance des caractéristiques épidémiologiques de la bactérie responsable de la maladie, comme la source de contamination et les moyens de dissémination semble être des informations importantes. Dans cet objectif, nous allons procéder à un isolement des souches d'*Agrobacterium vitis* directement à partir du liquide vasculaire de différents génotypes de vignes âgés d'un an, ensuite, nous allons procéder à leur identification et caractérisation par des tests biochimiques, biologiques et moléculaires.

1.1. Matériel végétal utilisé

Le matériel végétal utilisé dans cet essai est composé de boutures de vigne sans symptômes apparents, appartenant à six génotypes différents: trois variétés (Cardinal, Muscat d'Alexandrie et Dattier de Beyrouth) et trois porte-greffes (So4, 41B et le 1103). Chaque cultivar est issu de deux provenances différentes.

L'échantillonnage a été effectué au mois de janvier 2008, le matériel végétal nous a été fourni par deux centres : L'ITAFV à Tassala El Merdja et le centre de GDSP d'El Harrach.

Nous avons effectué notre expérimentation sur un effectif de 120 boutures à raison de cinq répétitions par traitement. Les sarments aoutés de l'année ont une dimension moyenne de 50-60 cm de longueur et de 10-15 mm de diamètre.

Lors de l'expérimentation, pour faciliter l'étiquetage des échantillons des boutures de vigne, pour chaque phénotype un code a été attribué, en fonction du nom du porte-greffe ou de la variété et de sa provenance. La première lettre correspond au nom de la variété ou du porte-greffe en grande majuscule et la deuxième lettre correspond à sa provenance en petite majuscule (Tableau 2.1)

Tableau 2.1: Variétés et porte-greffe de vigne utilisés, leur provenance et codification.

Génotype	Provenance	Nombre de boutures	Le code
Le Cardinal (V)	SKIKDA(ITAFV)	10	CS
	HADJOUT(GDSP)	10	CH
Muscat d'Alexandrie (V)	GUELMA(GDSP)	10	Mg
	SKIKDA(ITAFV)	10	Ms
Dattier de Beyrouth (V)	SKIKDA(ITAFV)	10	Ds
	HADJOUT(GDSP)	10	DH
SO4 (PG)	SKIKDA(ITAFV)	10	Ss
	CHEBLI(GDSP)	10	Sc
41B (PG)	SKIKDA(ITAFV)	10	4. s
	TASSALA MERDJA(GDSP)	10	4. T
1103 (PG)	SKIKDA(ITAFV)	10	1. s
	OUED EL ELAIG(GDSP)	10	1. o

Avant leur analyse, les boutures de vigne sont entreposées dans des sachets en plastique au réfrigérateur à une température de 2 à 4°C et une humidité de 90%, pour éviter leur dessèchement.

1.2. Isolement et identification de l'agent causal

Sur la vigne, *Agrobacterium vitis* se comporte comme un organisme systémique, cette propriété nous a amené à son isolement à partir du liquide vasculaire.

D'abord nous allons procéder à l'isolement des souches d'*Agrobacterium* spp. puis à la caractérisation biochimique, biologique et moléculaire.

1.2.1. Préparation des boutures pour l'extraction du liquide vasculaire

Les boutures sont trempées dans de l'eau distillée stérile pendant 24 à 48 h pour faciliter l'extraction du liquide vasculaire.

Chaque échantillon comporte 10 boutures.

La surface des boutures est essuyée avec de l'alcool 96°, puis elle subit quelques passages sur un bec bunsen afin de la désinfecter.

La bouture est découpée au niveau des nœuds en deux morceaux de 10 cm chacun à l'aide d'un sécateur désinfecté puis chaque morceau de 10cm est coupé en 4 morceaux. Donc on obtient au total 8 morceaux de 2cm de long par bouture.

Les morceaux de sarments de 3 à 4 cm de longueur sont placés dans des eppendorfs stériles et mis à centrifuger .Le programme de centrifugation est de 8000 tours pendant 4 mn, ensuite le liquide vasculaire des 08 morceaux de vigne est récupéré dans un seul eppendorf

1.2.2. L'étape d'enrichissement

Le liquide vasculaire récupéré par la centrifugation, contient une faible concentration de bactéries. Afin d'augmenter celle-ci, le liquide vasculaire est incorporé à un milieu nutritif d'enrichissement liquide qui est le milieu L.B (Luria Berhani).

Le mélange est mis en agitation sur un agitateur-secoueur horizontal pendant 24 heures à la température du laboratoire (environ 25-27°C)

Après 24 heures d'agitation, le milieu prend un aspect trouble ce qui signifie que la concentration bactérienne a augmenté suite à leur croissance.

1.2.3. L'ensemencement des bactéries

Pour chaque échantillon, deux méthodes d'ensemencement ont été pratiquées :

L'étalement sectoriel à partir de la solution mère et la méthode de dilution au dixième.

Pour chaque génotype de vigne, 10 échantillons sont considérés (10 boutures par génotype). Chaque échantillon est répété 10 fois donc on a 10 répétitions par échantillon.

Pour les deux méthodes, l'ensemencement s'effectue sur trois milieux, pour augmenter les chances d'isoler un plus grand nombre de souches d'*Agrobacterium vitis* : Le milieu RS (124), Le milieu NKS (125) qui constituent des milieux sélectifs pour le biovar 3 et le milieu MG (126) qui est un milieu général non sélectif et qui permet la croissance des souches d'*Agrobacterium* spp . en général (Appendice A).

Dans la méthode des dilutions, la suspension bactérienne mère est diluée à 10^{-3} , 10^{-4} 10^{-5} , et cela pour voir quelle est la dilution qui donne une meilleure distribution des

colonies bactériennes (des colonies bien distinctes et faciles à réensemencer lors des purifications). Un volume de 100 µl est prélevé de chacune des dilutions, puis étalé stérilement à l'aide de billes en verre stériles sur les trois milieux RS, NKS et MG. Chaque dilution est répétée cinq fois par milieu pour augmenter les chances d'isoler le plus grand nombre de bactéries.

Dans la méthode de l'étalement sectoriel, une goutte de la suspension bactérienne de la solution mère est étalée en trois secteurs sur les trois milieux MG, RS et NKS.

1.2.4. La purification des isolats

Les colonies bactériennes *Agrobacterium-like* représentant les caractères culturaux d'*Agrobacterium* spp. (Couleur blanche ou beige claire, contour lisse et régulier, forme convexe, diamètre de 0,2 – 0,5 cm), sont purifiées par étalement sectoriel répété sur le milieu MG jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

Les souches fluorescentes sous rayonnement ultra-violet sont éliminées car elles appartiennent au groupe fluorescent du genre *Pseudomonas* spp.

Les isolats retenus sont conservés sur le milieu MG en tubes inclinés à 4°C pour subir par la suite une série de tests de caractérisation biochimique, biologique et moléculaire pour la détermination du biovar des souches isolées.

La souche de référence d'*Agrobacterium vitis* est issue de la Collection Française des Bactéries Pathogènes (la CFBP) N° 5523. Cette souche est réensemencée et purifiée en même temps que les autres isolats retenus après l'isolement.

1.3. La caractérisation des souches isolées

Pour la caractérisation des souches, nous avons d'abord procédé à la coloration de Gram selon la méthode de Marchal et al, (1988), puis les tests biochimiques selon la méthode de Moore *et al*, (1988), le test de pathogénicité sur tabac et enfin au test moléculaire en utilisant la PCR (Polymérase Chaîne Réaction).

1.3.1. La coloration de Gram

Des isolats âgés de 24 à 48h, ensemencés sur le milieu NGA (Nutriment, Glucose Agar) (127) sont passés à la coloration de Gram. Cette coloration permet de distinguer les

bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification. Seront retenus uniquement les isolats à Gram négatif.

En premier lieu, un frottis est réalisé à partir des isolats âgés de 24 h et fixé à la flamme. Le violet de gentiane est versé sur la lame et mis en contact avec le frottis bactérien pendant une minute. Ensuite, le colorant est entraîné avec la solution de lugol (iodo-ioduré de potassium) qui agit pendant 1 minute avec le frottis bactérien. Puis, le lugol est jeté et de l'alcool à 95% est coulé sur la préparation suivi d'un rinçage immédiat avec de l'eau. Après cela, la lame est couverte avec de la safranine (Fuchsine phéniquée de Ziehl) qui agit de 10 à 20 seconde avec le frottis bactérien suivi d'un rinçage abondant avec de l'eau. La lame est séchée en l'épongeant délicatement entre deux feuilles de papier filtre et passée à l'examen microscopique à l'huile à immersion.

Les isolats observés au microscope optique sous forme de bâtonnet Gram négatif prenant une couleur rose sont retenus.

1.3.2. Tests d'appartenance au genre *Agrobacterium* spp.

Quatre tests sont utilisés pour voir si les souches isolées appartiennent au genre *Agrobacterium* spp.

Hydrolyse du tween 80

Le test consiste à ensemencer les souches en spot sur un milieu à base de tween 80, afin de déterminer la présence d'estérase. L'hydrolyse du tween 80 libère l'acide oléique de celui-ci et la réponse positive de l'activité se traduit par une opacification du milieu (formation d'un halo opaque au tour du spot) après 72 heures d'incubation, indiquant la présence de l'enzyme estérase (60).

Hydrolyse de l'amidon

Le test consiste à ensemencer les souches en spot sur le milieu à base d'amidon, après 48h d'incubation, le lugol est sur la surface du milieu. L'hydrolyse de l'amidon peut être mise en évidence par la disparition de la couleur bleu, caractéristique de la réaction amidon-lugol. Inversement, la zone des souches (amylase négative) se colore en bleu, indiquant que l'amidon n'a pas été dégradé (30).

Hydrolyse de la gélatine

Le test consiste à ensemencer les souches sur milieu contenant de la gélatine en tube. Après 21 jours d'incubation, les tubes sont mis à 4°C pendant 20min. si la bactérie dégrade la gélatine, le milieu devient liquide. Cependant, la persistance du milieu solide indique l'absence de la gélatinase (128).

Hydrolyse de l'Esculine

Le test consiste à ensemencer les souches par pique centrale dans un milieu à base d'esculine. L'hydrolyse de l'esculine rompt la liaison glucosidique et libère du glucose et de l'esculine qui donne une coloration noire (réponse positive) en présence de sels de fer (129).

1.3.3. Tests d'affiliation aux biovars reconnus pour *Agrobacterium spp*

Ces tests permettent de classer les souches isolées dans les trois biovars 1, 2, 3 reconnus pour le genre *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* respectivement) (96). Les tests sont réalisés selon la méthode décrite par (127).

Production du 3-cétolactose

Les souches sont ensemencées en spot sur un milieu à base de lactose. Après 48h d'incubation à 27°C, la surface du milieu est inondée par le réactif de Benedict. Après quelques minutes, un halo jaune d'oxyde de cuivre met en évidence les souches produisant le 3-cétolactose qui appartiennent au biovar 1 (130).

Croissance et pigmentation sur bouillon à base de citrate de fer ammoniacal

Les souches sont ensemencées dans un bouillon à base de citrate de fer ammoniacal. La réaction positive des souches du biovar 1 se traduit par la formation d'une pellicule rouge-marron à la surface du bouillon (131).

Tolérance à 2% de NaCl

Les souches sont ensemencées sur le milieu NGA auquel une proportion de (2%) de NaCl est additionnée. La lecture d'une éventuelle croissance se fait après 5 jours (132).

Croissance à 35°C et 37 °C

Les souches sont ensemencées sur milieu NGA et incubées à deux températures de 35°C et 37°C. Une éventuelle croissance est vérifiée au bout de 10 jours (132).

Utilisation du citrate

Les souches sont ensemencées sur milieu de Simmons (1926). Après 24 à 48 h, l'utilisation du citrate se traduit par le virage du milieu vers le bleu (133).

Recherche de l'oxydase

Une culture bactérienne de 24h, ensemencée sur le milieu de base (NGA) est déposée à l'aide d'une pipette stérile sur papier filtre imprégné d'une solution aqueuse à 1% de *tetramethyl-paraphenylenediamine dihydrochloride*. Le développement d'une couleur violette en moins de 10 secondes indique la présence d'oxydase (134).

1.3.4. Test de l'hypersensibilité sur tabac.

Les souches d'*Agrobacterium* spp. du biovar 3 sont les seules bactéries du genre *Agrobacterium* spp. qui causent une réponse d'hypersensibilité (HR) sur des plantes non hôte comme le tabac (18).

Les isolats retenus après la coloration de Gram et les tests biochimiques vont subir un test de pathogénicité sur tabac qui normalement pour les souches d'*Agrobacterium* spp. du biovar 3 se traduit par une réaction d'hypersensibilité.

Pour tester le pouvoir pathogène des souches, des plants de tabac (*Nicotiana tobaccum*) ont été utilisés comme plante-test.

Les cultures bactériennes âgées de 24 h, obtenues des différents échantillons ensemencés sur le milieu MG sont raclées à l'aide d'une anse stérile. Pour chaque échantillon y compris le témoin positif qui est la souche de référence (CFBP5523), la culture bactérienne raclée est mise dans un tube contenant de l'eau distillée stérile et mis en agitation sur un vortex. La solution bactérienne mère est ainsi obtenue. Ensuite, à l'aide d'une micropipette stérile, un volume de 1 ml de la solution mère est pipeté dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution 10^{-1} . Ensuite une série de dilutions est effectuée jusqu'à la dilution 10^{-11} . Pour chaque dilution la densité optique

correspondante est notée. Un volume de 0.1 ml est prélevé de chaque dilution et versé stérilement dans des boîtes à pétri contenant le milieu de culture MG et étalé avec des billes en verre stériles.

Après incubation à 27°C pendant 48 h, un comptage des colonies est effectué pour voir qu'elle est la dilution qui donne une meilleure concentration de l'inoculum permettant une réaction nécrotique. La dilution 10^{-8} est retenue.

Une solution bactérienne est préparée à partir de la culture obtenue de la dilution 10^{-8} , correspondant à la densité optique DO=0.24

A l'aide d'une seringue stérile, la suspension est aspirée, et infiltrée sur la face inférieure des feuilles du tabac en injectant l'inoculum dans les nervures du limbe.

Un témoin négatif est aussi utilisé lors de l'inoculation, il s'agit de l'eau distillée stérile.

Chaque isolat est inoculé sur une feuille, par conséquent, un plant peut servir pour plusieurs souches du moment que la réaction nécrotique est locale. L'apparition de nécrose après 72 h, indique une réaction d'hypersensibilité.

1.3.5. Utilisation du test moléculaire PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette partie de notre expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de phytopathologie de Florence (Italie)

1.3.5.1. Extraction d'ADN

En premier lieu, nous avons procédé à la mise en culture des isolats sur un milieu MG. Après rajeunissement des bactéries, une colonie par souche est cultivée dans des tubes de 5 ml de milieu LB, en incubation et en agitation pendant 48 heures.

Deux étapes principales ont été réalisées:

La lyse des cellules à la protéinase K (1 mg .ml) et l'extraction d'ADN

1.3.5.2. Réaction de Polymérisation en chaîne

Un jeu d'oligonucléotides a été choisi pour amplifier des séquences spécifiques du plasmide Ti. Les amorces utilisées sont *vir* G15 (F749) 5'-

GCTAGCTTGGAAGATCGCAC-3'et *vir* B11(F14) 5'-GAACGTGTTTCAACGGTTCA-3', elles sont localisées dans des régions conservées du pTi (35). La première amorce est localisée dans l'intergène entre les gènes *virB*₁₁ et *virG*, et la seconde débute après la 15ème base du gène *virG*. Elles encadrent une séquence de 300 paires de bases (135).

La réaction d'amplification a lieu dans 25 µl de tampon réactionnel. Les concentrations finales des solutions qui la composent sont les suivantes : la solution tampon 10mM (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, MgCl₂, 0,2 mg/ml) fournie avec la *Taq* polymérase (Cergy pontoise), 20 µM de chaque déoxynucléotide, 1µM de chaque amorce, 2 unités de *Taq* DNA polymérase, 1µl d'ADN sous forme de suspension bactérienne conservée dans du glycérol à 20%. Le milieu réactionnel est préparé dans un tube conique de 200 µl.

Le protocole d'amplification appliqué est réalisé sur la base de celui décrit par Mullis et Fallona (136). La réaction est réalisée sur un thermocycleur (Perkin Elmer, les Ulis, France). Après 5 min de dénaturation de l'ADN des souches, l'amplification est conduite pendant 35 cycles. Chaque cycle se déroule en 3 étapes : une étape de dénaturation de l'ADN à 94 °C durant 2 min, une étape d'hybridation des amorces sur leurs séquences homologues à 72 °C pendant 3 min et une étape d'élongation de l'ADN à partir des amorces à 55 °C pendant 5 min. L'amplification se termine avec une étape à 72 °C durant 3 min afin de compléter l'élongation de tous les brins d'ADN.

Cinq microlitres de la solution d'ADN amplifiée sont mis à migrer (10 V/cm durant 30 min) dans un gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE 0,5X, puis colorés dans une solution aqueuse de bromure d'éthidium (0,5 mg/l) et visualisés sous UV (312 nm). Les marqueurs de taille moléculaire utilisés sont des échelles de 123 pb et 1kb (Gibco BRL, Gaithesburg).

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats

3.1.1. L'étape d'isolement

Après ensemencement et purification des souches issus du liquide vasculaire des boutures de vigne, nous avons abouti par échantillon :

Le premier ensemencement effectué sur le milieu MG, (milieu général non sélectif) directement à partir du liquide vasculaire a donné trois types de colonies bactériennes avec un aspect phénotypique différents pour chacune (tableau 3.1).

Le premier type de colonies est fluorescent sous lumière UV, ces colonies sont majoritaire sur tout les génotypes, allant jusqu'à 86 % dans quelques génotypes. Il s'agit des colonies de *Pseudomonas fluorescens*. Le deuxième type de colonies représente entre 10 à 50% selon le génotype. Ces dernières ne sont pas fluorescentes, mais elles ont des caractères phénotypiques différents de ceux du genre *Agrobacterium* spp. Elles sont donc éliminées car elles n'intéressent pas notre étude. Le troisième type de colonie représente de 2 à 50% de l'ensemble des colonies variant selon le génotype, est obtenu sur les trois milieux de culture MG, RS et NKS, sachant que les deux derniers milieux sont différentiels pour les souches du genre *Agrobacterium* spp. Ces colonies présentent les caractères phénotypiques des colonies du genre *Agrobacterium* spp. (Contour régulier, aspect bombé et convexe, couleur blanc pale luisant et $\varnothing = 2$ à 5 mm), elles ont été choisi et ont subi des purifications sur le milieu MG (Figure 3.1).

Le milieu MG est un milieu général, il a permit la mise en évidence de toute la population bactérienne endophyte contenues dans le liquide vasculaire des boutures de la vigne. Les milieux RS et NKS qui sont plus sélectifs pour les bactéries du genre *Agrobacterium* spp. ont donné des cultures pures de colonies bactériennes ressemblant morphologiquement à *Agrobacterium* spp.

Sur un nombre limité de boites, aucune culture n'est obtenue ou un nombre très limité de colonies.

Tableau 3.1. Les colonies issues du premier isolement à partir du liquide vasculaire

génotype	BF %	BNA %	AL %
Cg	74	22	2
Cs	64	34	2
DH	44	38	16
Ds	60	26	14
Mg	70	4	26
Ms	76	43	0
Ss	86	14	0
Sc	76	22	2
1.s	50	24	26
1.o	26	30	44
4.T	10	56	34
4.s	26	6	48

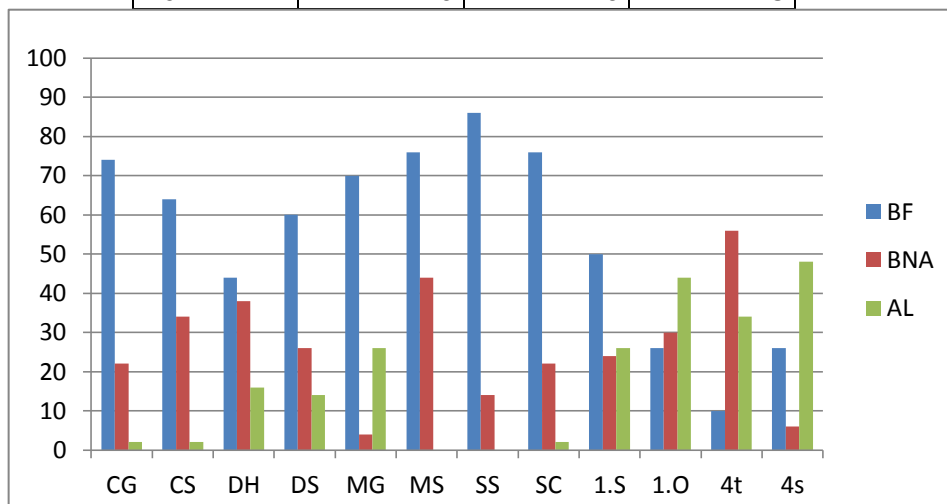


Figure 3.1 : Les différentes colonies issues du premier isolement.

BF : Bactéries fluorescentes. BNA : Colonies qui ne représentent pas le caractère phénotypique d'*Agrobacterium spp*. AL : Colonies présentant les caractères morphologiques du genre *Agrobacterium spp*.

Sur un total de 600 isolats obtenus à partir de l'ensemencement, seulement 107 sont retenus.

3.1.2. La caractérisation des souches d'*Agrobacterium* :

3.1.2.1. La coloration de Gram :

Les isolats à Gram(-), sous microscope optique apparaissent sous forme de bâtonnets et prennent une couleur rose après la coloration de Gram. Dans notre protocole expérimental nous avons procédé par élimination, tout résultat ne correspondant pas à notre objectif est éliminé. Des 107 isolats qui ont subi la coloration de Gram, 38 soit

35.51 % des isolats (tableau 3.2), correspondent aux caractéristiques des souches d'*Agrobacterium* spp. (Forme en bâtonnet à Gram-).

Tableau3.2: Résultats de la coloration de Gram des isolats issus de l'ensemencement sur les trois milieux de culture

Type de souche	Nombre de souches (%)
Cocci Gram+	36,44
Cocci Gram-	20,56
Bâtonnet Gram +	7,47
Bâtonnet Gram-	35,51

3.1.2.2. Réaction d'hypersensibilité sur le tabac

Les souches d'*Agrobacterium* spp. biovar 3 sont les seules bactéries du genre *Agrobacterium* spp. à engendrer une réaction d'hypersensibilité sur les plantes non hôtes comme le tabac (18)

L'inoculation de feuilles du tabac avec les 38 isolats obtenus, a donné le même résultat que celui de la souche de référence CFBP5523 (Figure 3.2). La réponse se traduit par une réaction nécrotique au niveau des parties du limbe infiltrées par les bactéries testées (Figure 3.3).

Nous avons pu noter cependant que, certains isolats expriment des réponses plus sévères par rapport à d'autre, cette différence de réponse est liée probablement à la virulence des souches.



Figure 3.2. Le plant du tabac exprimant une réaction d'hypersensibilité suite à l'inoculation.



A : la réponse d'hypersensibilité du témoin positif (la souche de référence la CFBP5523)



B : Témoin négatif (l'eau distillée stérile) réponse hypersensible négative.



C : La réponse positive caractéristique de la réaction d'hypersensibilité.

Figure 3. 3 : Les différentes réponses du test de pathogénicité sur le tabac

3.1.2.3. Réponses des tests biochimiques :

Les différentes réponses biochimiques des isolats sont comparées avec celles de la souche de référence la CFBP5523 pour identifier le genre et le biovar des isolats.

A. Appartenance des souches au genre *Agrobacterium* spp.

Les isolats retenus ont subi des tests biochimiques pour confirmer leur appartenance au genre *Agrobacterium* spp. D'après les résultats obtenus, la recherche de l'estérase du Tween 80, de la gélatinase de la gélatine, de l'amylase de l'amidon s'est révélée positive pour tous les isolats, ainsi que l'hydrolyse de l'esculine (5).

Cela confirme que ces isolats sont des souches appartenant au genre *Agrobacterium* spp. (127).

B. Affiliation des souches aux biovars d'*Agrobacterium* spp.

Nous avons pu constater que les réponses exprimées par les isolats vis-à-vis des tests biochimiques sont divisées en trois groupes qui diffèrent d'un seul test par rapport à la souche de référence. Le groupe 1 qui présente la même réponse que la souche de référence mais il diffère au niveau du test de l'oxydase qui est positif pour celui-ci. Le groupe 2 aussi qui présente la même réponse que la souche de référence mais il diffère au niveau du test de la croissance à 35°C qui est positif pour celui-ci. En dernier, le groupe trois qui présente une réponse identique que celui de la souche de référence (Tableau 3.3). Cette différence dans les réponses par rapport à un seul test n'est pas suffisante pour affilier les isolats dans des biovars différents car il faut au moins une différence dans deux tests.

Toutes les souches ont le même comportement vis-à-vis des tests ce qui indique qu'elles appartiennent toutes au même biovar, mais il reste à déterminer lequel. En se référant au test de croissance sur 2% NaCl, les souches présentent la même réponse que celles du biovar 1 et du biovar 3 qui est positive. Les souches du biovar 2 présentent une réaction négative pour ce test, alors elles sont écartées. Le test de pigmentation et de croissance sur un bouillon à base de citrate de fer ammoniacal s'est révélé négatif pour ces souches, alors qu'il est positif pour les souches du biovars 1. Selon le protocole de différenciation des biovars (127), ces souches sont affiliées au biovar 3 d'*Agrobacterium* spp. et cela est confirmé par la souche de référence d'*Agrobacterium vitis* la CFBP 5523 qui présente le même comportement que celui des 38 souches testées.

Tableau 3.3. Les résultats des tests biochimiques.

Les isolats bactériens	Groupe 1 M683, M653	Groupe 2 M625	Groupe 3 M614, M632, 1.083, 1.045, 1.063 1.025 1.081 1.075 1.082 1.073 4.s41 4.s14 4.s54 4.s52 4.s23 4.s932 4.s35 4.s73 4.s65 4.s53 4.s15 4.s12 4.s13 1.s02 1.s94 1.s52 1.s103 1.s101 1.s04 4.T11 4.T31 Cs82 S.s2 DH103 T+5523
Réponses aux tests biochimiques			
Hydrolyse du tween 80	+	+	+
Hydrolyse de l'amidon	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine	+	+	+
Hydrolyse de l'esculine	+	+	+
Production du 3-cétolactose	-	-	-
Oxydase	V	+	V
Utilisation des citrates	+	+	+
Pigmentation sur citrate ferrique	-	-	-
Tolérance à 2% Na Cl	+	+	+
Croissance à 35°C	+	-	-
Croissance à 37°C	-	-	-

3.1.3. Répartition des différents profils biochimiques obtenus par rapport aux génotypes étudiés

Après la caractérisation biochimique, biologique et moléculaire des isolats, il s'est avéré que les 38 souches appartiennent à *Agrobacterium* spp. pathogènes.

D'après les résultats obtenus, les six génotypes sont infectés avec les souches d'*Agrobacterium vitis*, mais le taux d'infection varie d'un génotype à un autre. En effet, c'est le porte-greffe 41B provenant de Skikda qui présente le taux d'infection le plus élevé il est de 34.21% (tableau 3.4) suivi du porte-greffe le 1103 de Oued El Allaig avec un taux d'infestation de 23.68% et du 1103 de Skikda avec un taux de 15.78%. Parmi les porte-greffes, le So4 est le moins infecté (2.63 % pour le So4 provenant de Chebli tandis que celui qui provient de Skikda est indemne).

En ce qui concerne les variétés, celle du muscat provenant de Guelma a enregistré le taux d'infection le plus élevé (13.15%) par rapport aux autres qui présentent un taux d'infection faible comme le Cardinal de Skikda et le Dattier provenant de Hadjout dont le taux d'infection est de 2.63% pour chacun. Certains génotypes sont indemnes, comme le Cardinal de Hadjout, le Muscat de Skikda et le Dattier de Skikda (Figure 3.4).

Tableau 3. 4 : Répartition des profils biochimiques en fonction des génotypes.

Génotype	PSPG %
4. s	34,21
4. T	5,26
1. o	23,68
1. s	15,78
Ss	0
Sc.	2,63
MG	13,15
Ms	0
Cs	2,63
C _H	0
D _H	2,63
Ds	0

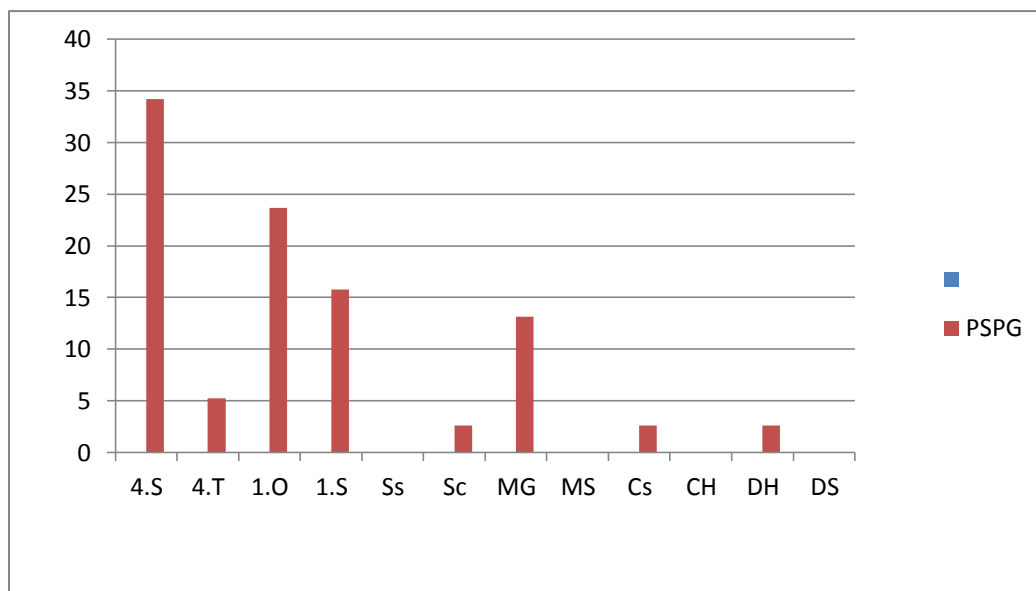


Figure3.4. : Répartition des différents profils biochimiques en fonction des génotypes.

PSPG: pourcentage de souches par génotype.

3.1.4. Analyse moléculaire des souches isolées

Le couple d'amorces F14 /F749 est hautement spécifique pour la détection du plasmide Ti. L'amplification d'une séquence du plasmide située entre le gène *virG* et *virB11* confirme la présence d'un plasmide Ti chez la majorité des souches testées et par conséquent leur pathogénicité (figure 3.5). Dix neuf souches sur 26 analysées, ont été amplifiées.

1Kb T- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 T+

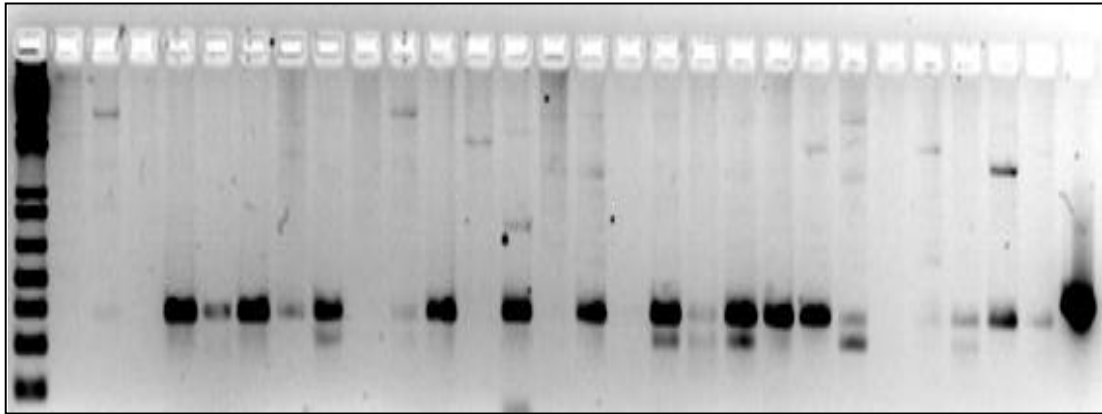


Figure 3.5: Migration sur gel d'électrophorèse (1%) des produits d'amplification par les amorces *virG15/virB11*.

3.2. Discussion :

Les souches fluorescentes sous rayonnement UV éliminées lors des purifications appartiennent au genre *Pseudomonas*, elles font partie de la population endophyte de la vigne.

Nos résultats biochimiques ont montré une prédominance des souches apparentées au biovar 3 survivant dans la sève de la vigne. Cette prédominance a été communément signalée par Burr (83). Les souches du biovar 3 représentent les agents responsables du crown gall sur la vigne. Toutefois, les souches du biovars 1 et 2 ont également été isolées par plusieurs auteurs mais ils ne les considèrent pas comme les agents principaux responsables de la maladie.

Le test de pathogénicité n'a pas mis en évidence le pouvoir pathogène de nos souches.

Par la méthode PCR nous avons pu amplifier la région située entre le gène *virG* et le gène *virB11*. Celle-ci révèle la présence du plasmide Ti pathogène chez les souches testées. A partir de boutures de vigne d'apparence saine, et sur trente huit souches isolées, dix neuf souches portent le gène *vir*, représentant un taux de pathogénie de 73.09 %. Ce taux montre une présence significative du plasmide dans les boutures considérées comme saines. Ce pourcentage de pathogénie montre d'une manière très sérieuse la distribution du plasmide Ti dans la nature et son risque de dissémination dans le matériel de propagation et surtout son transfert par conjugaison dans les souches non pathogènes.

Les résultats révèlent l'exclusivité des souches d'*Agrobacterium* spp. biovar 3 sur tous les génotypes de vigne étudiés, bien que les tests biochimiques ont révélé la présence de trois groupe bactériens. Le groupe 1 diffère de la souche de référence du biovar 3 au niveau de test de croissance à 35°C, le groupe 2 diffère au niveau de test de l'oxydase et le troisième groupe est identique à la souche de référence la CFBP5523.

La différence de réponse au niveau d'un seul test biochimique est insuffisante pour classer un biovars a part. De plus, tous les isolats des trois groupes ont engendré une réaction d'hypersensibilité sur le tabac, qui est une réponse spécifique aux souches du biovar 3 d'*Agrobacterium* spp. (18).

La différence de réponse dans les trois groupes s'explique d'après Moore *et al* 1988, par les mutations et les recombinaisons génétiques naturelles qui sont fréquentes chez les souches d'*Agrobacterium* spp. (127). Ses mutations donnent des souches qui ont des caractères intermédiaires entre les différents biovars, mais leur fréquence est faible.

D'après Burr et Katz, toutes les souches pathogènes isolées à partir de la vigne peuvent être affiliées au biovar 3 (105). Il semble qu'il ya une spécificité d'ordre trophique des souches du biovar 3 d'*Agrobacterium* spp. vis-à-vis de la vigne : cette spécificité est favorisée par la présence de l'acide tartrique dans les organes de la vigne qui assure des conditions nutritionnelles propices aux souches appartenant à ce groupe (19)

Le niveau d'infection des génotypes étudiés par *Agrobacterium vitis* varie d'un génotype à un autre.

En effet, un nombre plus élevé des souches d'*Agrobacterium vitis* est remarqué respectivement sur les génotypes 41B de Skikda avec 34,21%, le 1103 d'Oued El Allaig avec 23.68%, le 1103 de Skikda avec 15,78% et le muscat de Guelma avec 13,15%. Par contre dans les autres génotypes (le SO₄, le dattier, le cardinal) quelque soit la provenance, nous remarquons que les boutures sont indemnes ou contiennent une faible quantité de souches comme c'est le cas pour le Cardinal de Skikda avec 2,63%, le SO₄ de Chebli avec 2,63% et le dattier de Hadjout avec toujours 2,63%.

Cette différence d'infection avec *A. vitis* peut être attribué à la compatibilité entre l'agent pathogène et la plante hôte. En effet, les souches d'*Agrobacterium* biovar 3 se trouvent exclusivement sur la vigne (137 ; 138). De plus, le biovar 3 comporte en général un spectre d'hôte très réduit, et présente une spécificité très marquée et prédominant à travers des régions du monde (125). Mais, il existe en effet des souches qui n'infectent que certaines variétés de vigne (139).

Selon les résultats obtenus, les porte- greffes 1103 et 41B sont les plus sensible vis-à-vis d'*Agrobacterium vitis*, contrairement au porte- greffe du SO₄ qui semble être moins sensibles ou résistant à la bactérie.

Parmi les variétés testées il semble que le muscat est la variété la plus sensible vis-à-vis de la bactérie d'*Agrobacterium* biovar 3 et que les autres variétés : Le Dattier de Beyrouth et le Cardinal semblent être plus résistants vis-à-vis des souches du biovar 3 d'*Agrobacterium* spp.

D'après Burr *et al.*, (1998), certaines variétés de vigne sont résistantes vis-à-vis de certaines souches d'*Agrobacterium* spp. mais sensibles à d'autre. La variabilité vis-à-vis des souches d'*Agrobacterium* spp. est déterminée par des facteurs génétiques liés à la plante, la bactérie et au pathogène. Sparrow *et al.*, (2004), ajoutent que les facteurs génétiques sont à 95% responsables de la variabilité de la sensibilité des plantes à *Agrobacterium* spp. contre 5% des facteurs environnementaux (140).

D'un autre cote, la sensibilité vis-à-vis d'*Agrobacterium* spp. présente en effet, une variabilité marquante en fonction de l'origine géographique (35). Certaines espèces végétales peuvent se montrer très résistantes dans un pays et fort sensibles dans un autre, tel l'abricotier résistant au Maroc (141) et remarquablement sensible dans d'autres pays tel la Tunisie (142) et en Turquie (143).

Ces résultats sont confirmés par les résultats obtenus par Kara (1993), dans les travaux réalisés sur le comportement de certaines variétés de vignes vis-à-vis du crown gall. En effet, ce dernier a conclu que le 41B et le 1103 sont sensibles aux souches d'*Agrobacterium* biovar 3. Le Muscat est la variété la plus sensible vis-à-vis de ces souches, tant dis que le Dattier de Beyrouth et le Cardinal sont moyennement sensibles.

Il a constaté aussi, que la souche local Q₅₄ d'*Agrobacterium* appartenant au biovar 3 présente une grande compatibilité avec le Muscat d'Alexandrie et le 41B et apparait moins virulente sur le porte greffe SO₄. De plus, les portes greffes 1103 et 41B sont signalés par Ferriera et Vanzyl (1986) comme sensibles à *Agrobacterium vitis* (144).

Des 600 souches isolées, 38 souches soit 6,33% des souches sont retenues comme *Agrobacterium vitis*. Cette valeur peut apparaitre faible, mais non négligeable dans la transmission de la maladie du crown gall lors des multiplications par voie végétative.

En effet, *Agrobacterium vitis* survit d'une façon systémique dans le xylème de la vigne (7). Le mouvement systémique et le comportement endophyte permettent la dissémination de ce pathogène via le matériel de culture (145).

Elle est transmise vers de nouvelles plantations par la propagation végétative des boutures de vigne (105 ; 7 ; 9).

Burr et Katz (1983) ont rapporté que les souches d'*Agrobacterium* biovar 3 qui se trouvent uniquement dans les sols où la vigne est plantée, indiquent que la bactérie

d'*Agrobacterium vitis* est introduite avec un matériel de propagation systématiquement infecté (125).

D'autre part, Moore et Cooksey (1981), rapportent que, dans les conditions culturales qui tendent à favoriser la maladie du crown gall de la vigne (sol ou boutures infectée), le pourcentage des plants malades peut atteindre ou dépasser les 80% après une année dans une pépinière (146).

De plus, les infections systémiques latentes par *Agrobacterium vitis* participent à la propagation de l'inoculum dans les vignobles (105 ; 56).

En effet, la bactérie d'*Agrobacterium* spp. peut vivre en état latent dans le végétal, induisant des tumeurs sous d'éventuelles conditions appropriées (147). La tumeur du collet n'est pas la seule source d'inoculum d'*Agrobacterium* spp. Marti et al, (1998), ont montré qu'il n'y a pas toujours une corrélation entre la présence des souches pathogènes et l'apparition des tumeurs (147). Les souches d'*Agrobacterium* spp. peuvent être présentes dans les tissus des végétaux sans que les tumeurs se développent. Marti et al, (1998), ont signalé que cette bactérie peut vivre comme un organisme endophyte, ce qui affirme la gravité de la maladie car les plants de vigne supposés être sains ne le sont pas formellement (147).

Dans ce cas, les plants dépourvus de symptômes de crown gall peuvent clairement présenter le même risque de disséminer l'infection aussi bien que les plants malades. Cette maladie systémique est un véritable réservoir de bactéries pour plusieurs années.

Dans une enquête menée par Kara (1993), lors de la réalisation de son projet d'ingénieur, il a constaté que les plants de vigne sont soumis à des facteurs qui favorisent le développement et l'extension de la maladie, tel que l'absence d'une commission de contrôle, des outils de travail non désinfectés, ainsi que l'ignorance de cette maladie auprès de certains pépiniéristes.

Une enquête a été menée par Belaskri (2005), lors d'une étude sur l'estimation de la maladie du crown gall au niveau des pépinières de plants forestiers destinés au reboisement dans le Nord-Ouest Algérien (Tlemcen, Sidi Bel Abbes, Mostaganem et Saida), a révélée l'absence de commissions d'agrément sensées interdire la vente des plants malades et de prévenir les pépiniéristes des dégâts et conséquences (148). Au cours des sorties avec ces commissions, sur 6 pépinières seulement 2 ont été interdites de livraison. Ils ont aussi

constaté que suite à une négociation entre les pépiniéristes et les autorités locales, les plants ont été autorisés pour reboisement des espaces vert de la ville. Le plus grave est que la plantation de ces plants ne fait que contaminer l'environnement.

Malgré les efforts employés dans la recherche de méthodes efficaces pour lutter contre le crown gall, le contrôle de cette maladie se base surtout sur l'utilisation des espèces et des variétés résistantes aux souches virulentes d'*Agrobacterium* spp. (8). Les variétés résistantes vis-à-vis des souches pathogènes d'*Agrobacterium* ont été recherchées chez plusieurs plantes y compris la vigne (149)

La sélection des espèces et des variétés les moins sensibles voire résistantes ainsi que les hybrides issues des parents résistants est pratiquée dans plusieurs pays pour les arbres fruitiers (66). Il a été montré que le greffage sur des variétés résistantes de la vigne donne des plants résistants et sains et réduit considérablement l'infection du crown gall (120).

Différents auteurs (150; 151 ; 152) rapportent que les plants résistants au crown gall ne permettent pas l'intégration du T-DNA même si elles permettent son transfert et son transport. Sùle *et al.* , (1994), notent que la résistance chez certaines variétés de vignes se manifeste après la phase du transfert du T-DNA, puisque l'attachement de la bactérie et l'induction des gènes *vir* se produisent semblablement chez certaines variétés sensibles (151). L'intégration du T-DNA est une étape critique dans la tumorigénèse et l'inhibition de ce processus semble être strictement liée à la résistance au crown gall (66).

CONCLUSION

Il ressort de cette étude que nous avons pu isoler des souches pathogènes d'*Agrobacterium* ssp. dans les boutures de vigne d'apparence saine, cela nous a permis de démontrer efficacement qu'une survie endophyte d'*Agrobacterium* existe à l'intérieur de la vigne, comme cela a été déjà cité par plusieurs travaux . Cette survie endophyte manifeste par conséquent, une activité systémique de la bactérie dans le matériel végétal de multiplication et peut représenter un phénomène extrêmement grave quant à la dissémination du pathogène dans le matériel de multiplication destiné à la commercialisation.

Cette information est particulièrement importante pour expliquer comment la maladie est diffusée dans les matériels de multiplication. La propagation de la maladie est liée à l'utilisation de méthodes de multiplication végétative du matériel végétal

Afin de contrôler la propagation du crown gall, la connaissance des caractéristiques épidémiologiques de la bactérie comme la source de contamination et les moyens de diffusion semble être des informations importantes.

Les bactéries isolées ont été identifiées et caractérisé par des agents biologiques, biochimiques et des méthodes moléculaires. Trente-huit souches d'*Agrobacterium* spp. ont une réaction positive lorsqu'elles ont été injecté à des feuilles de tabac. La production de nécroses comme une réaction d'hypersensibilité est spécifique à *A. vitis*.

L'analyse moléculaire des souches isolées a révélé l'amplification d'une séquence du plasmide située entre les gènes *virG* et *virB11* ce qui confirme la présence d'un plasmide Ti chez la majorité des souches testées et par conséquent leur pathogénicité.

Ces résultats donnent de la force à l'hypothèse que la maladie pourrait se propager par le matériel de propagation. Sur la base de ces résultats, les applications possibles pour la sélection des plantes saines doivent être discutées.

Cependant, dans le but d'augmenter les chances d'interprétations et d'élargir notre étude, il est souhaitable d'utiliser un nombre plus important d'échantillons appartenant à plusieurs variétés provenant de différente régions du pays.

D'un autre côté nous avons pu tester la méthode de la PCR et de confirmer que c'est un outil très pratique et précis dans le domaine de la phytopathologie, car elle permet une détection plus rapide et plus fiable de l'agent pathogène.

APPENDICE A : MILIEUX DE CULTURE UTILISES

I- Milieux de culture utilisés pour l'isolement des souches

I-1- Milieu LB modifié :

Réactif	g/l
Bactotryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	5
Agar	20

I-2-Milieu MG (Mannitol-Glutamate) non sélectif :

(Kean *et al.*, 1970)

Réactif	g/l
Mannitol	5
L(-) acide glutamique	2
KH ₂ PO ₄	0.5
NaCl	0.2
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2
Extrait de levure	0.5
Agar	15
PH=7.2	

N.B :

*MgSO₄ doit être solubilisé séparément dans 20 à 50 ml d'eau distillée.

*Le milieu est stérilisé en autoclave à une température de 120°C pendant 20 minutes.

I-3-Milieu RS (Roy et Sasser, 1983) sélectif :

Réactif	g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2

K_2HPO_4	0.9
KH_2PO_4	0.7
Adonitol	4
Extrait de levure	0.14
NaCl	0.2
H_3BO_3	1
Agar	15
Chlorothalonil (Bravo 500) 4% (W/V) aqueux 0.5 ml	

PH=7.2

Après autoclavage à 50°C, ajouter en asepsie les produits suivant après la dissolution de chacun dans quelques ml d'eau distillée et après microfiltration :

*Triphenyl tetrazolium chlorid	80 mg
*D-cycloserine	20 mg
*Trimethoprim (avec une goutte HCl pour dans l'eau distillée)	20 mg.

I-4-Milieu NKS (Burr et Katz, 1983), sélectif :

Réactif	g/l
Saccharose	5
$NaNO_3$	2.5
KH_2PO_4	0.1
NaCl	0.2
$CaCl_2$	0.2
$MgSO_4, 7H_2O$	0.2
Fe EDTA*	2 ml
Agar	18
*Solution EDTA: $Fe SO_4, 7H_2O$	278 mg
Na EDTA	372 mg
Eau distillée	100 ml

PH=7.2

Après autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, ajouter au milieu en asepsie les solutions suivantes préalablement stérilisées par microfiltration :

Cyclohexamid à 2 %	5 ml
Sodium sélénit à 1 %	1 ml
Biotine à 2ug/ml	1 ml

Préparation de la biotine :

Faire diluer 20 mg de biotine dans 100 ml d'eau distillée puis ajouter 1 ml de cette solution dans 99 ml d'eau distillée et faire une microfiltration.

II-Milieus utilisés pour la caractérisation biochimique des souches

II-1- Milieu à base du tween 80 (Bien *et al.* , 1990) :

Réactif	g/l
CaCl ₂	0.1
Nutrient broth	8
Agar	18

Ajouter au milieu 10 ml du tween 80 stérilisé par microfiltration.

PH=7-7.2

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes.

II-2- Milieu à base d'amidon (Bien *et al.* , 1990) :

Réactif	g/l
Extrait de levure	5
Bactopeptone	5
Amidon soluble	20
Agar	15

PH= 7.2

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes.

II-3- Milieu à base de la gélatine (Gardan et Luisetti, 1981) :

Réactif	g/l
Extrait de levure	3
Bactopeptone	5
Gélatine	120

PH=7.2

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

II-4-Milieu à base de l'esculine (Vidaver et Davis, 1988) :

Réactif	g/l
Bactopeptone	10
Citrate de fer ammoniacal	1
Esculine	1
Agar	10

PH=7.2

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

II-5-Milieu à base lactose (Bernaerts et De Ley, 1963) :

Réactif	% (g/100 ml)
α -Lactose	1
Extrait de levure	0.1
Agar	2

PH=7.2

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

II-6-Milieu à base de citrate de fer ammoniacal (Hendrickson et al . , 1934) :

Réactif	g/l
Citrate de fer ammoniacal	10
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5

CaCl₂ 0.2

PH=7-7.2

Autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

II-7-Milieu NGA (Anderson, 1977) :

Réactifs g/l

Extrait de bœuf 3

Peptone 5

Glucose 2.5

Agar 15

PH=7.2

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

II-8-Milieu de Simmons(1926) :

Réactif g/l

NaCl 5

MgSO₄, 7H₂O 0.2

NH₄H₂PO₄ 1

K₂HPO₄ 1

Sodium citrate (anhydrous) 2

Agar 20

Bleu de bromothymol 15

PH=6.8

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes.

APPENDICE B: LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS.

PCR : Polymerase Chain Reaction

ADN : Acide Desoxyribo Nucléique

Pb : Paire de bases

Kb : Kilo base.

ADN-T : ADN de Transfert.

Ti: Tumor inducing.

vir : virulence.

NGA : Nutriment Glucose Agar.

DO : Densité Optique.

V : Variété.

PG : Porte-greffe.

GDSP : Groupement de Développement de Semences et de Plantes.

ITAFV : Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne.

PNDA : Plan National de Développement Agricole

CFBP : Collection Française des Bactéries Pathogènes.

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Genetello, C., Van Larebek,N., Holsters,M., De Piker,A., Van Montagu, M., Schell, J., « Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* as conjugative plasmids »,Nature(London),(1977),265 :561-563.
2. Thamashow,M.F., Nutter,R., Montoya,A.L., Gordon,M.P., Nester,E.W., « Integration and organazation of Ti plasmid sequence in crown gall tumors »,Cell,(1980),19 :729-739.
3. Montoya,A.L., Chilton,M.D., Gordon,M.P., Sciaky,D., Nester,E.W., »Octopine and nopaline metabolisme in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells :role of plasmid genes »,J Bacteriol,(1977),129 :101-107.
4. Schell,J et al., « Interaction and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens* , the Ti plasmid and the plant host »,Proc.R.Soc.London Ser B204,(1979),251-266
5. Stewart, E.L. and N.G.Wenner., « Grapevine decline in Pennsylvania and New York »,Wine East July-August 32(2),(2004),12-21.
6. Lehoczky,J., « Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection »,Phytopathol.Z.(1968),63 :239-246.
7. Burr,T.J., Bazzi,C., Sùle,S., Otten,L., « Crown Gall of Grape : Biology of *Agrobacterium vitis* and the Development of Disease Control Strategies », Plant Disease .V.82 , n°12,(December 1998), 1288-1297.
8. Tarbah,F.A and R.N.Goodman ., « Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis of an efficient indexing system »,Plant Dis 70,(1986), :566-568.
9. Lows,F., Rademaker,J., De Bruijn,F., « The three ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria : diversity, detection and disease diagnosis » ,Annu Rev Phytopathol (1999), 37 :81-125.
10. Sawada,H., Ieki,H., Matsuda,I., « PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains », Appl Environ Microbiol,(1995),61 :828-831.
11. Pulawska,J., Sobiczewski,p. ; « Development of a semi nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil »,J Appl Microbiol,(2005),98 :710-721.
12. Ophel, K., Kerr,A., « *Agrobacterium vitis* sp.nov.for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines » , Internat J Syst Bacteriol , (1990) ,40 :236-241.

13. Conn, H.J., « Validity of the genus *Alcaligenes* », *J. Bact.*,(1942),44 :353-360.
14. Popoff, M.Y., Kersters,K., Kiredjian,M., Miras,I., Coynault,C., « Taxonomic position of *Agrobacterium* strains of hospital origin », *Annu Microbiol Pari*,(1984),135a :427-442.
15. Smith, E.F and Townsend, C.O., « A plant tumor of bacterial origin », *Science (New York)*, (1907) ,25 :671-673.
16. Valentine,I., « *Agrobacterium tumefaciens* and the plant : The David and Goliath of modern genetic(update on *Agrobacterium*-mediated transformation of plants) », *Plant Pathology*, (2003), 133 :948-955.
17. Burr, T.J., « Grape Crown Gall Biology and Strategies for control », *FPS Grape Program Newsletter*,(October 2004), 16-18.
18. Herlache, T.C., Zhang,H.S., Reid,C.L., Carle,S., Zheng,D., Basaran,P., Thaker,M., Burr,A.T., Burr,T.J., « Mutations that affect *Agrobacterium vitis*-induced grape necrosis also alters its ability to cause hypersensitive response on tobacco », *Phytopathol.* V.91,(July 2001),966-971.
19. Szegedi,E., « Host range and specific L(+) tartrate utilisation of biotype 3 of *Agrobacterium tumefaciens* », *Acta Phytopathol.Acad.Sci.Hung.* V.20,(1985),17-20.
20. Ruffner,H., « Metabolism of tarttric and malic acid in *Vitis* », *Vitis.* V.21,(1982),247-259.
21. Otten,L., Crouzet,J., Y-Salomone., P.de Ruffrag and Szegedi,E., « *Agrobacterium vitis* strain AB3 harbors two independent tartrate utilization system, one of which is encoded by the Ti plasmid », *Mol.Plant.Microbe.Inter.* V.8,(1995),138-146.
22. Van Larebeke,N., Engler,G., Holsters,M., Van den Elsaker,S., Zaenen,I., Schilperrort,R.A., Schell,J., « Large plasmide in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability », *Nature.* V.252,(1974),169-170.
23. Allardet-Servent,A., Michaux., Characon,S., Junas-Bilak,E., Karayan,L and Ramuz,M., « Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome », *J.Bacteriol.* V.175,(1993),7869-7874.
24. Zhu,J., Oger,P.M., Schrammeijer,B., Hookas,P.J., Farrand,S.K., Winans,S.C., « The bases of crown gall tumorigenesis », *J.Bacteriol.* V.182,(2000),3885-3895.
25. Gelvin,S.B., « Chiminal Signalling between *Agrobacterium* and its plant host », *in: "Verm-D.P.S.(ed),Molecular signals in plant microbe communication .C.R.C. Press,Boca Raton,Fla."*, (1992), P.137-167.
26. Stachel,S.E and Nester,E.W., «The genetic and transcripltonal organization of the *vir* region of A6 Ti plasmid of *Agrobacterium*», *EMBO.J.* V.5,(1986), 1445-1454. (*in* Bouzar,H., Ouadah,D., Krimi,Z., Jones,J.B., Travato,M., Petit,A and

- Dessaux, Y., "Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population", *Appl Environ. Microbiol.* V.59, (1993), 1310-1317.
27. Portier, P., « Sélection d'écotypes bactériens pathogènes et non-pathogènes par la plante en relation avec la différenciation en espèce génomiques chez *Agrobacterium* spp. », (2004), 5-30.
 28. De Cleene, M and De Ley, J., "The host range of crown gall", *Botanical review.* V. 42, (1976), 390-466.
 29. De Cleene, M., "The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*" *Phytopathologische Zeitschrift* .V.113,(1985),81-89. (In Scortichini, M., The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective", *J.Plant. Pathol.* V.87, n°1, (2005), 5-12.
 30. Nesme, X., Ponsonnet, C., Picard, C., Normand, P., "Chromosomal and pTi genotypes of *Agrobacterium* strains isolated from *Populus* tumors in two nurseries", *FEMS. Microbiol.Ecol.* V.101, (1992), 189-196.
 31. Pionnat, S., Keller, H., Hericher, D., Bettachini, A., Dessaux, Y., Nesme, X., Poncet, C., Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries", *Appl. Environ. Microbiol.* V.65, (1999), 4197-4206.
 32. Ogawa, Y., Ishikawa, K., Mii, M., "Highly tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall tumors of *Chrysanthemum*", *Arch Microbiol.* V.173, (2000), 311-315.
 33. Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, A., Dessaux, Y., Gardan, L., "Characterization of plasmid-borne and chromosome-encoded traits of *Agrobacterium* biovar 1, 2 and 3 strains from France", *Appl Environ Microbiol.* V.66, (2000), 1818-1825.
 34. Peluso, R., Raio, A., Morra, F., Zoina, A., "Physiological, biochemical and molecular analysis of an Italian collection of *Agrobacterium* strains", *Eur J Plant Pathol.* V. 109, (2003), 291-300.
 35. Raio, A., Peluso, R., Nesme, X., Zoina, A., "Chromosomal and plasmid diversity of *Agrobacterium* strains isolated from *Ficus benjamina* tumors", *Eur J Plant Pathol.* V. 110, (2004), 163-174.
 36. Buchholz, W.B and Thomashow, M.F., "Comparison of T-DNA complements of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmids with limited and wide host ranges", *J Bacteriol.* V.160, (1954), 319-326.
 37. Burr, T.J., Otten, L., "Crown gall of grape: biology and disease management", *Ann Rev Phytopathol.* V.37, (1999), 53-80.

38. Otten, L., Canaday, J., Gerard, J.C., Fournier, P., Crouzet, P., Paulus, F., "Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids», Review. *Mole Plant-microbe Interact.*V.5, (1992), 279-287.
39. Canaday, J., Gerard, J.C., Crouzet, P., Otten., "Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4", *Mol Gen Genet.*V.235, (1992), 292-303.
40. Sawada, H., Ieki, H and Takikawa, Y., "Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan", *Ann Phytopathol. Soc. Jpn.*V.56, (1990), 199-206.
41. Auber, B., Fournier, F., Scotto L A Massese, C., Faivre-Amiot, A., "Un cas de galles sur racines de *Vitis vinifera* occasionnées par un complexe nématodes-crown gall", *Fruit.* V. 38,(1983), 827-830. (*In* Scotto LA Massese, C., « Les problèmes posés par les nématodes phytopathogènes à l'amandier », CIHEAM- Options Méditerranéennes Série Séminaires. V.5, (1989), 33-38.)
42. Orian, D and Zootra, D., "The importance of the rootstock nematode to the penetration of *Agrobacterium tumefaciens* into almond roots", *Hassadeh.* V.50, (1970), 939-940 (*In* Psallidas, P.G., "Bacterial disease of almond rootstocks", *Options Méditerranéennes. Série Séminaires.*V.5, (1989), 25-31).
43. White, P.R and Braun, A.C., "A cancerous neoplasm of plant. Autonomous bacteria-free crown gall tissue", *Cancer Res.* V.2, (1942), 597-617.
44. Kennedy, B.W and Alcorn, S.M., "Estimates of U.S crop losses to prokaryote plant pathogens", *Plant Dis.*V.64,(1980), 674-676. (*In* Moore *et al.*, 2001).
45. Bouzar, H., "Le crown gall des rosacées fruitières en Algérie. Contribution à l'étude de la maladie et de son agent causal *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. Dans les pépinières de l'Algérois. Thèse ingénieur. Institut National Agronomique. Alger. (1979), 7-26.
46. Toua, D., « Le crown gall dans les vignobles de Médéa : Estimation du taux d'infection et caractérisation des souches », (1990), 4-22.
47. Bensaada, A., « Le crown gall dans les pépinières viticoles d'Algérie : Estimation des taux d'infection et caractérisation des populations locales d'*Agrobacterium vitis* » Thèse Magister. Institut National Agronomique. Alger, (1992), 93p.
48. Alim, A., « Estimation de la proportion de plants fruitiers atteints du crown gall dans les pépinières de l'Algérois et identification de souches tumorigènes », Mémoire d'ingénieur, USTB Blida, (1990), 5-33.
49. Alim, F., « Dynamique de la population d'*Agrobacterium vitis* dans trois variétés de vigne durant la période végétative », (1998), 8-23.

50. Lehoczky, J., « Further evidence concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in vascular system of grapevine », Vit is.V.10, (1971), 215-221.
51. Lele, V.C., J.C.Durgapal ., D.K. Atarwal and C.L. Sethi., “Crown and root gall of grape (*Vitis vinifera* L), in Andhra Pradesh. Curr. Sci, 47-280.
52. Panagopoulos,C.G., Psallidas,P.G., Alivizatos,A.S., ”Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var *tumefaciens*”,Porc 4th Int Conf Pth Bact, Angers, (1978),221-228.
53. Sanchez- Serrano,J.Jj., R.Villarores., R, Maenhaut., J.Serrada and R, Beltra., « Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strain ATV isolated from a grape vine tumor »,Zentralbl.Mikrobiol.V.140, (1985), 59-72.
54. Webster, J., Dos Santos, M and J.A. Thomson., “Agrocine-producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevine isolates. Appl. Environ. Microbiol.V.52, (1986), 217-219.
55. Chen, X.Y and Xiang, W.N., “A strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits growth and gall formation by biotype III strains of *A.tumefaciens* from grapevine”, Acta Microbiol. Sin, V.26, n°3, (1986), 193-199.
56. Goodman, R., Butrov, R and Tarbah,F., “The occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and a simplified indexing system”, Am . J. Enol. Vitic, V.38, (1987), 189-193.
57. Bazzi, C., Piazza, C and Burr,J.T., “Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings”, EPPO Bull, V.17, (1987), 105-112;
58. Ophel,K., Burr,T.J., Magarey,P.A and Kerr, A., “detection of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in south Australian grapevine propagating material”, Aust. Plant Pathol, V.17, (1988), 61-68.
59. Bell, C.R., “Crown gall disease survey in Nova Scotian vineyards”,Can. Plant Disease Surv, V.70, (1989), 100-101.
60. Bien, E., Lorenz, D., Eichhorn,K and Plapp, R., “Isolation and characterization of *Agrobacterium tumefaciens* from the german vine region Rheinpfalz”, J.Plant Dis. Prot, V. 97, (1990), 313-322.
61. Haas, J.H., Zveibil, A., Zutra, D., Tanne,E and Manulis, S., « The presence of crown gall of grape incited by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in Israel “, Phytoparasitic , V.19, (1991), 311-318.
62. Bazzi, C.,Stefani, E., Gozzi, R., Burr,T.J., Moore, C.L and Anaclerio, F., “Hot water treatment of dormant grape cuttings – its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on grafting and growth of vine”, Vitis, V.30, n°3, (1991), 177-187.

63. Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T.J and Collmer, A., "Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3", J. Bacteriol, V.173, (1991), 6547-6552.
64. Alfano, J.R and Collmer, A., "Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall", Plant Cell , V.8, (1996), 1683-1698.
65. Raio, A., Zoina,A and Moore, L.W., "Loss of *Agrobacterium tumefaciens* tumor inducing plasmid in solarized soil", IOBC Bull, V.21, (1998), 301-305.
66. Zoina, A and Raio, A., "Susceptibility of some peach rootstocks to crown gall", J. Plant Pathol, V.81, (1999), 181-187.
67. Garret, C.M.E., "The effect of crown gall on growth of cherry trees", Plant Pathol, V.36, (1987), 339-345.
68. Schroth, M.N., Mc Cain, A.H., Foott,J.H., Huisman, O.C., "Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease", Plant Disease, V.72, (1988), 241-246.
69. Klein, R.M and Link,G.K.K., "The Etiology of crown gall", Q. Rev. Biol, V.30, (1955), 207-277.
70. Agrios, G.N., "Plant pathology, 4th edn, Academic Press, (1997).
71. Jones,J.B., Rafu, B.C., "Systemic movement of *Agrobacterium tumefaciens* in symptomless stem tissue of *Chrysanthemum morifolium*", Plant Disease, V.72, (1988), 51-54.
72. Thies,K.L., Griffin,D.E., Hedgewood, C.P., "Characterization of *Agrobacterium* isolates from muscadine grape", Plant Disease , V.75, (1991), 634-637.
73. Pu, X.A and Goodman, R.N., "Effects of fumigation and biological control on infection of indexed crown gall free grape plants", Am J Enol Vitic, V.44, (1993b), 241-248.
74. Zutra, D., "Crown gall bacteria (*Agrobacterium radiobacter* var *tumefaciens*) on cotton roots in Israel", Plant Disease, V.66, (1982), 1200-1201.
75. Vrain, T.C and Coperman, R.J., "Interaction between *Agrobacterium tumefaciens* and *Pratylenchus penetrans* in the roots of two red raspberry cultivars", Can J Plant Pathol, V.9, (1987), 236-240.
76. Sùle, S., Lehoczky, J., Jeneser,G., Nagy, P., Burr, T.J., "Infection of grapevine roots by *Agrobacterium vitis* and *Meloidogyne hapla*", J Phytopathol, V.143, (1995), 169-171.
77. Rubio-Cabetas, M.J., Minot, J.C., Voisin, M., Esmanjoud, D., "Interaction of root-knot nematodes (RKN) and the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* in roots of

- Prunus cerasifera*: evidence of the protective effect of the Ma-RKN resistance genes against expression of crown gall symptoms”, *Eur J Plant Pathol* , V.107, (2001), 433-441.
78. Lehoczky, J., “Root-system of the grapevine as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* for study of the process of crown gall disease”, *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* V.24, (1987), 283-291.
79. Tzfira, T., and Citovsky, V., “*Agrobacterium*: From biology to Biotechnology”, *Departement of Molecular Cellular and Developmental Biology*, (2007), 14-16.
80. Bouzar, H., Moore, L.W., “Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tall grass prairie”, *Appl Environm Microbiol*, V.53, (1987), 717-721.
81. Bouzar, H., Quadah, D., Krimi, Z., Jones, J.B., Travato, M., Petit, A., Dessaux, Y., « Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population », *Appl Environm Microbiol*, V.59, (1993), 1310-1317.
82. Krimi, Z., Petit, A., Dessaux, Y., Nesme, X., « Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils”, *Appl Environm Microbiol*, V.68, (2002), 3358-3365.
83. Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L., “Populations of *Agrobacterium* in vineyard and non vineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries”, *Plant Disease*, V.71, (1987), 617-620.
84. Burr, T.J., Reid, C.L., Yoshimura, M., Momol, E.A., Bazzi, C., “Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil”, *Plant Disease*, V.79, (1995), 677-682.
85. Gelvin, S.B., “*Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration”, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* V.51, (2000), 223-256.
86. Stachel, E.E., and Zambryski, P.C., “VirA and VirG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*”, *Cell*, V.46, (1985), 325-333.
87. Winans, S.C., “Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions”, *Microbiol. Rev.* V.56, (1992), 12-31.
88. Vergunst, A.C *et al.*, “VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells”, *Science*, V.290, (2000), 979-982.
89. Tzfira, T and Citovsky, V., « Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium* », *Trends Cell Biol*, V.12, (2002), 121-128.

90. Van Attikum, H *et al.*, “Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration”, *RMBO J*, V.20, (2001), 6550-6558.
91. Zhu, J *et al.*, “The bases of crown gall tumorigenesis “, *J, Bacteriol*, V.182, (2000), 1728-1732.
92. Klee, H *et al.*, “Nucleotide sequence of the tms genes of the pTiA6NC octopine Ti plasmid: Two genes products involved in plant tumorigenesis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, V.81, (1984), 1728-1732.
93. Astot, C *et al.*, “An alternative cytokinin biosynthesis pathway”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, V.97, (2000), 14778-14783.
94. Dessaux, Y *et al.*, “Chimistry and biochemistry of opines chemical mediators of parasitism”, *Phytochemistry*, V.34, (1993), 31-38.
95. Guyon, P *et al.*, “Agropine in null typer crown gall tumors: evidence for generality of the opines concept”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, V.77, (1980), 2693-2697.
96. Moore, L.W., Bouzar, H., Burr, T.J., “*Agrobacterium*. In N.W. Schaad., Jones, J.B, Chun, W. eds, *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*”, American Phytopathological society Press, St. Paul, Minnesota, (2001), pp17-33.
97. Bishop, A.L., Burr, T.J., Mittak, V.L., Katz, B.H., “A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilization for indexing grapevine propagation material”, *Phytopathology*, V.79, (1989), 995-998.
98. Burr, T.J., Norelli, J.L., Katz, B.H., Bishop, A.L., « Use of Ti plasmid DNA probes for determining tumorigenicity of *Agrobacterium* strains”, *Appl Environm Microbiol*, V.56, (1990), 1782-1785.
99. Schulz, T.F., Lorenz, D., Eichhorn, K.W., Otten, L., “Amplification of different marker sequences for identification of *Agrobacterium vitis* strains”, *Vitis*, V.32, (1993), 179-182.
100. Szegedi, E., Bottka, S., “Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semi selective medium”, *Vitis*, V. 41, (2002), 37-42.
101. Kauffmann, M., Kassemeyer, H.H., Otten, L., “Isolation of *Agrobacterium vitis* from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation”, *Vitis*, V.35, (1996), 151-153.
102. Llop, P., Lastra, B., Marsal, H., Murillo, J., Lopez, M.M., “Tracking *Agrobacterium* strains by a RAPD system to identify single colonies from plant tumors”, *Eur, J.Plant Pathol*, (2003). 109:381-389.
103. Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A., and Khemici, E., “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*, V.11, (1991), 901-908.
104. Faivre-Amiot, A., “Les tumeurs a *Agrobacterium*”, *Phytoma*, V.362, (1984), 27-31.
105. Burr, T.J and Katz, B.H., « Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*”, *Plant Disease*, V.68, (1984), 976-978.
106. Wample, R.L., “Influence of pre. And post-treatment storage on budbreak of hot water treated Cabernet Sauvignon “, *Am J Enol Vitic* , V.44, (1993), 153-158.
107. Bazzi, C., Stefani, E., Gozzi, R., Burr, T.J., Moore, C.L., Anaclerio, F., “Hot water treatment of dormant grape cuttings: Its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on grafting and growth of wine”, *Vitis*, V.30, (1991), 177-155.
108. Burr, T.J., Reid, C.L., Splittstoesser, D.F., Yoshimura, M., “Effect of heat treatment on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis in vitro* and in dormant grapevine cuttings”, *Am. J. Enol. Vitic*, V.47, (1996), 119-123.
109. Mahmoodzadeh, H., Nazemieh, A., Majidi, J., Paygami, I., Khalighi, A., “Effects of thermotherapy treatments on systemic *Agrobacterium vitis* in dormant grape cuttings”, *J. Phytopathol*, V.151, (2003), 481-484.
110. Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L., Meyers, C.A., Mittak, V.L., “Effect of shoot age and tip culture propagation of grapes on systemic infections by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3”, *Am. J. Enol. Vitic*, V.39, (1988), 67-70.
111. Thies, K.L., Graves, C.H., “Meristem micropropagation protocol for *Vitis rotundifolia* isolates from muscadine grape”, *Plant Disease*. V.75, (1992), 634-637.
112. Moore, L.W., Warren, G., “*Agrobacterium radiobacter* strain K84 and biological control of crown gall. *Annu Rev Phytopathol*, V.13, (1979), 15-46.
113. Slota, J.E., Ferrand, S.K., “Genetic isolation and physical characterization of pAgK84, the plasmid responsible for agrocin 84 production”, *Plasmid*, V.8, (1982), 175-186.
114. Webster, J., Dos santos, M., Thomson, J.A., “Agrocin-producing *Agrobacterium tumefaciens* strains active against grapevine isolates”, *Appl. Environ. Microbiol*, V.52, (1986), 217-219.
115. Pu, X.A., Goodman, R.N., “Tumor formation by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grape plants”, *Am. Enol. Vitic*. V.44, (1993b), 249-254.
116. Burr, T.J., Reid, C.L., Tagliati, E., Bazzi, C., Sùle, S., “Biological control of grape grown gall by strain F2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment sites on grape cells”, *Phytopathology*, V.87, (1997), 706-711.

117. Szegedi, E., Korbuly, J., Otten, L., “Types of resistance of grapevine varieties to isolates of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3”, *Physiol. Mol. Plant Pathol*, V.35, (1989), 35-43.
118. Ehemann, A., “Untersuchung von Interaktionen im Wirt-Parasit System *Vitis/Agrobacterium*”, Dissertation. University Hohenheim, Stuttgart, (1998).
119. Mahmoodzadeh, A., Nazemieh, A., Majidi, I., Paygami, I., Khalighi, A., “Evaluation of crown gall resistance in *Vitis vinifera* and hybrids of *Vitis* spp.”, *Vitis*, V.43, (2004), 75-79.
120. Sule, S., Burr, T.J., “The effect of resistance of rootstocks to crown gall (*Agrobacterium* spp.) on susceptibility of scions in grapevine cultivars”, *Plant Pathol*, V.47, (1998), 84-88.
121. Anonym., “Ministère de l’Agriculture”, (2004), Alger.
122. Reyner, A., « Manuel de viticulture », 6ème édition J.B. Baillière. 414P.
123. Anonym., « Ministère de l’Agriculture », (2007), Alger.
124. Roy, M and Sasser, M., “A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3”, *Phytopathology*, V.73, (1983), 810.
125. Burr, T.J., Katz, B.H., “Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil”, *Phytopathology*, V.73, (1983), 163-165.
126. Keane, P., Kerr, A and New, P.B., “Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates”, *Aust. J. Biol. Sci*, V.23, (1970), 585-595.
127. Moore, L.W., Kado, C.L and Bouzar, H., “*Agrobacterium*: in Schaad, (ed). Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria”, 2nd Edition. APS. Press, St Paul. U.S.A, (1988).
128. Gardan. L., Luisetti.J., “Identification de l’agent responsable de la maladie des taches noirs de la mangue (*Mangifera indicae*)”, *Fruits*. Octobre. Vol 30. n°10, (1975), 625-630.
129. Vidaver, A.K et Davis, M.J., “Coryneforme plant pathogens In: Schaad, N.W, (eds). Laboratory guide for identification of pathogen bacteria”, 2nd. St Paul, M.N. APS Press, (1988), 19-36.
130. Bernaerts, M.J and De Ley, J., “A biochemical test for crown gall bacteria”, *Nature*, V.197, (1963), 406-407.
131. Hendrickson, A.A., Baldwin, I.L and Ryder, A.J., “Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes* and *Bacillus radiobacter*”, *J. Bacteriol*, V.28, (1934), 597-618.

132. Anderson, A.R., "Taxonomy and host specificity of genus *Agrobacterium*", Ph.D. Thesis, Oregon State University, (1977), 61P.
133. Simmons, J.S., "A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi", *J. Infect. Dis.*, V.39, (1926), 209-214.
134. Kovacs, L.G., "Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxydase reaction", *Nature*, V.178, (1956), 703P.
135. Lopez, M.M and Penyalver, R., "Chromosomal Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three *Agrobacterium* species isolated from grapevine tumors", *Plant Pathology*, V.54, (2008), 341-348.
136. Mullis, K.B and Fallona, F.A., "Specific synthesis of DNA *in-vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction", *Methods Enzymol*, V.155, (1987), 335-350.
137. Loubser, J.T., "Identification of *Agrobacterium tumefaciens* biotype3 on grapevine in South Africa", *Plant Disease. Rep.*, V.62, (1978), 730-731.
138. Ma, D., Yanovsky, M.F., Gordon, M.P and Nester, E.W., "Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine tumors in China", *Appl Environ. Microbiol*, V.53, n°6, (1987), 1338-1343.
139. Knauf, V., Panagopoulos, C.G., Nester, E.W., "Genetic factors controlling the host range *Agrobacterium tumefaciens*", *Phytopathology*, V.72, (1982), 1545-1549.
140. Sparrow, P.A.C., Townsend, T.M., Arthur, A.E., Dale, P.J and Irwin, J.A., "Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility in *Brassica oleracea*", *Theoretic. Appl. Genet.* V.108, (2004), 644-650.
141. Benjama, A., Redwane, A., El Gadde, M., El Medraoui, L., Ouzrit, M., Boussad, L., El Ouard, R et Nesme, X., « Premier résultat de lutte biologique par les souches K84 et K₁₀₂₆ contre *Agrobacterium radiobacter* var *tumefaciens*, agent du crown gall des rosacées fruitières et du rosier au Maroc », *Bull OEPP.* V.32, (2002), 509-514.
142. Trigui, A., « Les principales maladies de l'amandier en Tunisie », *CIHEAM. Option Med*, V.11, (1984), 151-159.
143. Aysan, Y., Satin, F., Mirik, M., Donmez, M.F and Tekman, H., "First report of crown gall of apricot (*Prunus armeniaca*) caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey", *New Disease Report*, (2003).
144. Ferriera, J.H.S., Van Zyl, F.G.H., "Susceptibility of grapevine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3", *South Afr J Enol Vitic*, V.7, (1986), 101-104.

145. Zoina, A., Raio, A., Peluso, R., Spasiano, A., “Characterization of agrobacteria from weeping fig (*Ficus benjamina*)”, *Plant Pathol*, V.50, (2001), 620-627.
146. Moore, L.W., and Cooksey, D.A., “Biology of *Agrobacterium tumefaciens*: plant interactions”, *Int Rev Cytol*, V.13, (1981), 15-46. *In* (Pionnat *et al.*, 1999).
147. Marti, R., Cubero, J., Daza, A., Piquer, J., Salcedo, C.L., Morente, C and Lopez, M.M., “Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants”, *Euro J Plant Pathol*, (1998), 1-12.
148. Belaskri, A., « Incidence de la maladie du crown gall de l’eucalyptus dans les pépinières forestières de l’ouest algérien », *U. Tlemcen*, (2005), 5-80.
149. Sùle, S., “Survival of *Agrobacterium tumefaciens* in *Berlandieri* x *Riparia* grapevine rootstock.”, *Acta Phytopathol Entomol Hung*, V.21, (1986), 203-206.
150. Bush, A.L and Pueppke, S.G., “Cultivar-strain specificity between *Chrysanthemum morifolium* and *Agrobacterium tumefaciens*”, *Physiol. Molecul. Plant Pathol*, V.39, (1991), 309-323.
151. Sùle, S., Mozsar, J., Burr, T.J., “Crown gall resistance of *Vitis* spp. And grapevine rootstocks”, *Phytopathology*, V.84, (1994), 607-611.
152. Nam, J and Gelvin, S.B., “*Arabidopsis* ecotypes resistant to crown gall tumorigenesis. *In* Sylvanien, M., Kad, C.I, (ed). *Horizontal gene transfer*”, Chapman and Hall, London, (1998), 75-93.