

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA**  
**FACULTE DES SCIENCES AGRO- VETERINAIRES**  
**DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES**

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Phytopathologie

# **IDENTIFICATION ET SELECTION D'ANTAGONISTES BACTERIENS INDUISANT UNE RESISTANCE SYSTEMIQUE VIS-A-VIS D'AGROBACTERIUM SPP. AGENTS DU CROWN GALL DES ARBRES FRUITIERS ET DE LA VIGNE**

Par

**DJELLOUT Hafidha**

Devant le jury composé de :

A.BOUTEKRABT	Professeur U.S.D.Blida	Président
Z. BOUZNAD	Professeur (E.N.S.Alger)	Examineur
A.GUENDOZ- BENRIMA	Professeur U.S.D.Blida	Examinatrice
Z.DJAZOULI	Maitre de conférences U.S.D.Blida	Examineur
Z.KRIMI	Professeur U.S.D.Blida	Promotrice

Blida, Novembre 2011

# IDENTIFICATION ET SELECTION D'ANTAGONISTES BACTERIENS INDUISANT UNE RESISTANCE SYSTEMIQUE VIS- A-VIS D'AGROBACTERIUM SPP. AGENTS DU CROWN GALL DES ARBRES FRUITIERS ET DE LA VIGNE

La présente étude a pour objectifs d'identifier et d'évaluer le pouvoir antagoniste d'une collection de souches endophytes isolées initialement de cinq plantes spontanées.

L'identification morphologique, biochimique et moléculaire, nous a permis d'affilier ces isolats à deux genres majeurs, à savoir le genre à Gram positif *Bacillus* spp. avec trois espèces (*B. cereus*, *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens*), le genre à Gram négatif *Pseudomonas* spp. et l'espèce *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *betae*.

Les tests du pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta* ont été effectués sur trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, C58, E2 et E14, et trois souches d'*Agrobacterium vitis* AL9/95, AV25/95 et BU20/95. L'évaluation du pouvoir antagoniste *in vitro* a été réalisée sur le milieu LPGA selon la technique des spots. Toutes les souches endophytes se sont révélées actives *in vitro* sur toutes les souches d'*Agrobacterium* spp. testées, les diamètres des zones d'inhibition varient de 20 à 45 mm.

Sur la base des résultats du test d'antagonisme *in vitro*, cinq souches endophytes ont été sélectionnées pour le test d'antagonisme *in planta*. Ce dernier test est effectué par un trempage préalable des plantules de tomate *Lycopersicon esculentum* cv. Saint Pierre dans la suspension bactérienne antagoniste. Les résultats obtenus ont montré une diminution voire même une absence de développement des symptômes du crown gall. La bactérisation avec *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* (EHF3) et *Pseudomonas* spp. (EPR3 et CR2) a limité l'installation et l'expression des *Agrobacterium* spp. tumorigènes. La colonisation rhizosphérique et endophytique ainsi que la production d'antibiotiques et la capacité des espèces de *Bacillus* et *Pseudomonas* à induire une résistance systémique chez la plante auraient joué un rôle important dans la bioprotection.

Ces résultats sont intéressants et suggèrent une utilisation prometteuse de ces souches endophytes dans le biocontrôle et comme moyens alternatifs aux produits chimiques synthétiques qui sont inefficaces sur les bactéries phytopathogènes.

**Mots clés:** *Agrobacterium* spp., crown gall, antagonisme, *in vitro*, *in planta*, biocontrôle, endophytes, résistance systémique.

# IDENTIFICATION AND SELECTION OF ANTAGONISTIC BACTERIA INDUCING A SYSTEMIC RESISTANCE TO *AGROBACTERIUM* SPP. AGENT OF CROWN GALL OF FRUIT TREES AND VINES

## Abstract

The objectives of this present study are to identify, select and estimate the antagonistic capacity of a collection of bacterial endophytes isolated initially from five spontaneous plants.

The morphological, biochemical and molecular identification, reveal two important genera namely positive Gram *Bacillus* spp. with three species (*B. cereus*, *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*), *Pseudomonas* spp. for negative Gram and the species *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae*.

The tests of the *in vitro* and *in planta* antagonistic activity were conducted by using three strains of *Agrobacterium tumefaciens*; C58, E2 and E14, and three strains of *Agrobacterium vitis* AL9 / 95, AV25 / 95 and BU20 / 95. The evaluation of the *in vitro* antagonistic capacity was carried out on LPGA medium by using the spot technique. The entire bacterial endophytes appeared active *in vitro* on all tested *Agrobacterium* spp. strains, the diameters of inhibition zones varied from 20 to 45 mm.

On the basis of the *in vitro* antagonism capacity results, five endophytes were selected for the *in planta* antagonism capacity. This latest test was carried out by preliminary soaking of tomato seedlings *Lycopersicon esculenum* cv. *Saint Pierre* in the selected bacterial endophytes. Results showed a decrease or an absence of the development of crown gall symptoms. Bacterization with *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola* (EHF3) and *Pseudomonas* spp. (EPR3, CR2) limited the installation and the expression of tumorigenic *Agrobacterium* spp.. The rhizospheric and endophytic colonization as well as the ability of antibiotic production of *Bacillus* and *Pseudomonas* species might have induced systemic resistance in the tested plants which played an important role in the bioprotection.

These results are interesting and suggest a promising use of these endophytes in the biocontrol and as alternative means of the synthetic chemicals which are ineffective on phytopathogenic bacteria.

**Keywords:** *Agrobacterium* spp., crown gall, antagonism, *in vitro*, *in planta*, biocontrol, endophytes, systemic resistance.

## تحديد و اختيار بكتيريا ضد بكتيرية محفزة للمقاومة الشاملة تجاه بكتيريا الأغروبيكتيريوم المسببة لمرض التدرن التاجي للأشجار المثمرة و الكروم

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد و تقييم القوة ضد بكتيرية لتسع و ثلاثون بكتيريا داخلية معزولة من خمسة نباتات برية: *Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia peplus* et *Euphorbia heliscopia*.

ذو *Bacillus* التحديد المورفولوجي، البيوكيميائي و الجزيئي، سمح بملاحظة نوعين أساسيين، هما النوع ذو البكتيريا سالبة الجرام *Pseudomonas* البكتيريا إيجابية الجرام و النوع

أجريت تجارب تقييم القدرة الضد بكتيرية في المختبر وفي النبات، على ستة سلالات بكتيريا *Agrobacterium vitis* BU20/95 و AV25/95 و AL9/95 الأغروبيكتيريوم، ثلاثة بكتيريا

E14 و E2 و *Agrobacterium tumefaciens* C58، و ثلاثة بكتيريا

تقييم هذه القدرة الضد بكتيرية في المختبر، أجريت على وسط باستعمال طريقة البقع

كل البكتيريا الداخلية أظهرت نشاط على جميع سلالات الأغروبيكتيريوم، حيث أن أقطار التثبيط تراوحت من 20 إلى 40 ملم

من نتائج تجارب تقييم الضد بكتيري في المختبر، تم إختيار خمسة بكتيريا داخلية نشطة من بين البكتيريا الداخلية AL9/95, AV25/95 et BU20/95 A. الواعدة من أجل إجراء تجارب تقييم الضد بكتيرية في النبات عل بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* E14 و *Agrobacterium vitis*

*Lycopersicum esculenum* cv. Saint Pierre هذه التجارب قامت على شتلات الطماطم

النتائج المتحصل عليها أظهرت انخفاض أو حتى انعدام ظهور أعراض مرض التدرن التاجي للنباتات المغموسة في البكتيريا الداخلية النشطة مقارنة مع الشهود الإيجابية الممثلة بالنباتات الملقحة مباشرة ببكتيريا الأغروبيكتيريوم ، و الشهود السلبية الممثلة بالنباتات المغموسة في الماء المقطر المعقم

المحفزة للمقاومة الشاملة عند النباتات *Pseudomonas* و *Bacillus* إفراز المضادات الحيوية و قدرة السلالات يمكن أن تلعب دورا مهما في قمع مرض التدرن التاجي

هذه النتائج مثيرة للاهتمام و تقترح استعمال واعد لهذه البكتيريا الداخلية النشطة في التحكم البيولوجي و طريقة بديلة لاستعمال المواد الكيميائية المركبة التي تعتبر غير فعالة على بكتيريا المسببة لأمراض النباتات

الكلمات المفتاحية: النشاط الضد بكتيري، في المختبر، في النبات، البكتيريا الداخلية، نباتات برية، التدرن التاجي، *Agrobacterium spp.*، المقاومة الشاملة

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie **Dieu** le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la volonté pour bien mener ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, Mr **BOUTEKRABT A.**, Mr **BOUZNAD Z.**, Mr **DJAZOULI Z.** et Madame **GUENDOZ-BENRIMA A.**, pour avoir accepté de juger ce travail, pour leurs remarques et leurs conseils constructifs.

Je remercié ma promotrice, Professeur **KRIMI Z.**, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe de phytopathologie et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour réaliser ce travail. Merci pour le temps que vous avez consacré à la correction de ce modeste travail et merci pour vos conseils et votre disponibilité.

**Nerjess**, je te remercie pour ta gentillesse, pour tous les bons moments passés ensemble. Je te souhaite beaucoup de réussite et un avenir radieux.

Merci à toutes les personnes qui, grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, m'ont soutenu en rendant agréable les moments passés ensemble au laboratoire: Nesrine, Abderahmane, Fadhéla et Amel.

Un grand MERCI pour mes **Chers parents**, pour leur soutien et leur encouragement depuis toujours et à qui je dois tant. Sans vous tout ceci n'aurait pas été possible. *Je remercie aussi mes deux frères, Mounir et Ishak pour leur amour.*

Un énorme merci pour ma sœur **Nour El Houda**, pour son aide et sa compréhension, merci de m'avoir prêté ton PC portable qui grâce à lui que j'ai pu terminer la rédaction!! J'en suis profondément reconnaissante ☺

Je garde le meilleur pour la fin...MERCI mon cher mari **Mustapha**, tu sais tous les sentiments que j'éprouve à ton égard, je t'adore tous autant que tu es, tu es ma force et ma motivation. Merci pour ton soutien moral.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

**Hafidha**

# *Dédicaces*

*À celle qui m'a appris que la patience est la clé du succès et de la Victoire.*

*À ma mère*

*À celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la science et la  
volonté forgent les grands esprits*

*À mon père*

*Et à ceux qui m'ont aidé et conseillé et qui ont fait preuve d'une patience  
sans égal face à tous mes caprices d'étudiante exigeante, perfectionniste et  
infatigable*

*À mes deux frères et ma sœur*

*À celui qui m'apporte chaque jour le bonheur, la joie et qui me couverte  
avec la chaleur de son amour et son soutien*

*À mon cher mari*

*Je leur dédie avec grand amour les fruits de ma réussite et prie Dieu le  
tout puissant de leur donner santé et longue vie*

*Ainsi à toutes les amies qui ont répondu à mon invitation.*

*Hafidha*

# TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....13

**CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES *AGROBACTERIUM* SPP. PATHOGENES, AGENTS DE LA MALADIE DU 'CROWN GALL' ET LES APPLICATIONS ENDOPHYTIQUES BACTERIENNES EN LUTTE BIOLOGIQUE**  
.....17

1. Les caractéristiques taxonomiques et cellulaires d'*Agrobacterium* spp.....17

2. La classification d'*Agrobacterium* spp.....18

3. Symptomatologie et gamme d'hôtes d'*Agrobacterium* spp.....20

4. Mécanisme de pathogénicité d'*Agrobacterium* spp.....20

5. Le processus d'infection d'*A.tumefaciens* et *A. vitis*.....22

6. Les dégâts provoqués par la maladie du crown gall.....26

7. Les moyens de contrôle du crown gall causé par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> et <i>A. vitis</i> .....	27
8. Lutte biologique par l'utilisation des microorganismes antagonistes, diversité des mécanismes d'action .....	30
9. Induction de la résistance systémique induite chez les plantes par des microorganismes de la rhizosphère.....	33
10. La colonisation naturelle des plantes par les bactéries endophytes, une nouvelle tendance de la lutte biologique.....	33
10.1. La pénétration et propagation des bactéries endophytiques au sein de la plante.....	34
10.2. La diversité des bactéries endophytiques.....	36
10.3. Importance des bactéries endophytiques en bioprotection.....	38
<b>CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>40</b>
1. Origine des isolats de bactéries antagonistes.....	40
2. Culture et identification des isolats de bactéries antagonistes.....	41
3. Test du pouvoir pathogène des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	47
4. Evaluation de la densité optique nécessaire pour la réalisation des tests d'antagonisme .....	47
5. Le test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	49
6. Test d'antagonisme <i>in planta</i> .....	51
7. Analyse statistique des résultats.....	55
<b>CHAPITRE 3: RESULTATS ET INTERPRETATION.....</b>	<b>57</b>

1. Identification des isolats de bactéries antagonistes.....	57
1.1. Les caractères culturaux des isolats antagonistes.....	57
1.2. Les caractères biochimiques et physiologiques des isolats antagonistes.....	58
1.3. La caractérisation biologique des isolats antagonistes.....	62
1.4. L'identification moléculaire par l'utilisation du marqueur moléculaire l'ADNr 16S.....	63
2. Test du pouvoir pathogène des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	64
3. Le test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	70
3.1. Evaluation du pouvoir antagoniste des souches endophytes.....	70
3.2. Etude des corrélations des souches antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	73
4. Essai de bioprotection de la tomate contre la galle du collet <i>in planta</i> par l'utilisation des bactéries antagonistes endophytes sélectionnées.....	77
4.1. Pouvoir antagoniste des souches endophytes contre la galle du collet.....	77
4.2. Effet du trempage des plantules de tomate dans la suspension bactériennes d'antagonisme sur l'expression de la virulence des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. testées (par rapport au poids des tumeurs).....	85
<b>CHAPITRE 4: DISCUSSION.....</b>	<b>85</b>
1-Diversité des endophytes antagonistes identifiés.....	89
2-Pouvoir pathogène cryptique de quelques endophytes antagonistes.....	93
3-Les bactéries endophytes des plantes spontanées sélectionnées, sont efficaces <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> contre le crown gall causé par les <i>Agrobacterium</i> spp.....	94

94-Endophytisme et antagonisme de <i>Bacillus</i> spp. et <i>Pseudomonas</i> spp. et <b>potentiel d'induction d'une résistance systémique.....</b>	<b>103</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>110</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>116</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>139</b>

## LISTE DES ILLUSTRATION, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.1 :</b> Exemples de tumeurs produites par <i>A. tumefaciens</i> .....	20
<b>Figure 1.2:</b> Principales régions d'un plasmide Ti à octopine.....	21
<b>Figure 1.3:</b> Cycle d'infection d' <i>Agrobacterium</i> spp. pathogènes, agents du crown gall.....	23
<b>Figure 1.4:</b> Représentation schématique d'une infection par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	25
<b>Figure 1.5:</b> Illustration des sites possibles d'infection et de colonisation des racines par des bactéries endophytes .....	35
<b>Figure 1.6:</b> Effet du traitement de graines avec <i>Serratia phymuthica</i> sur le développement des symptômes causés par <i>Pythium ultimum</i> chez la plantule de concombre ( <i>Cucumis sativus</i> L.).....	39
<b>Figure 3.1:</b> Colonies de quelques isolats endophytes cultivées sur milieu de culture LPGA pendant 24h à 28°C.....	57
<b>Figure 3.2:</b> Réaction de quelques isolats aux différents tests biochimiques.....	59
<b>Figure 3.3:</b> Réaction d'hypersensibilité sur feuilles de tabac après une semaine d'inoculation.....	62
<b>Figure 3.4:</b> Test de virulence des différentes souches d' <i>A. tumefaciens</i> , souche de référence C58, E2 et E14 et d' <i>A. vitis</i> souches AI9/95, Bu20/95 et Av25/95 sur des feuilles de <i>K. daigremontiana</i> .....	66
<b>Figure 3.5:</b> Le développement des symptômes de crown gall sur les plantules de tomate de la variété Marmande.....	68
<b>Figure 3.6:</b> Le développement des symptômes de crown gall sur les plantules de tomate de la variété Saint pierre.....	69

<b>Figure 3.7:</b> Pouvoir antagoniste des souches endophytes antibactérien représentés par les zones d'inhibition.....	73
<b>Figure 3.8:</b> Cercle de corrélation des souches antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	74
<b>Figure 3.9:</b> Classification ascendante hiérarchique des différentes souches antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes d' <i>Agrobacterium</i> spp. testées....	75
<b>Figure 3.10:</b> Analyse en Composantes Principales (ACP) des six souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. testées.....	77
<b>Figure 3.11:</b> Effets des souches antagonistes en fonction du temps et de la position des blessures, sur les souches pathogènes d' <i>Agrobacterium</i> spp. testées.....	79
<b>Figure 3.12:</b> Réponses des plantules de tomate aux différents traitements.....	81
<b>Figure 3.13 :</b> Effet du trempage des plantules de tomate dans la suspension bactérienne antagoniste sur l'expression de la virulence des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. testées (taille des tumeurs).....	83
<b>Figure 3.14 :</b> Des graphes représentant l'effet du trempage des plantules de tomate dans la suspension des bactéries antagoniste sur l'expression des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. en fonction du temps.....	84
<b>Figure 3.15:</b> Effet antagoniste des souches endophytes utilisées sur les souches d' <i>Agrobacterium</i> spp.....	87
<b>Figure 3.16:</b> Effets des souches antagonistes, en fonction de la position des blessures, sur l'expression des souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. testées (poids des tumeurs).....	87

<b>Tableau 1.1</b> : Quelques bactéries endophytes.....	37
<b>Tableau 3.1</b> : Caractérisation biochimique des différents isolats à Gram négatif..	60
<b>Tableau 3.2</b> : Caractérisation biochimique des différents isolats à Gram positif...	61
<b>Tableau 3.3</b> : Réponse des isolats endophytes au test d'hypersensibilité sur le tabac ( <i>Nicotiana tabacum</i> var White Burley).....	63
<b>Tableau 3.4</b> : Résultat d'identification moléculaire des isolats endophytes par l'utilisation du marqueur moléculaire l'ADNr 16S.....	64
<b>Tableau 3.5</b> : Résultats des tests de sensibilité des six souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. aux souches bactériennes antagonistes .....	72
<b>Tableau 3.6</b> : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de tomates testées (en fonction du temps, position des blessures).....	78
<b>Tableau 3.7</b> : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d' <i>Agrobacterium</i> spp. sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de tomates testées par rapport au poids des tumeurs et en fonction de la position des blessures.....	85

## INTRODUCTION

Dans leur environnement, les plantes sont en permanence en contact avec de nombreux parasites, Ces organismes sont capables d'infecter les plantes et d'entraîner des maladies responsables de pertes importantes pour les récoltes; c'est pourquoi la protection des cultures contre les agents pathogènes est d'une importance majeure.

Le contrôle des maladies des plantes doit d'être efficace en utilisant des méthodes de lutte conventionnelles représentées par les méthodes physiques, chimiques, génétiques, biologiques, et les facteurs humains. Les méthodes de lutte chimiques ont apporté des solutions rapides, simples et efficaces aux problèmes de protection des cultures. Elles sont efficaces contre les champignons par l'utilisation de fongicides alors que les maladies virales et bactériennes sont incurables et nécessitent des moyens de lutte préventifs [1].

L'utilisation de chacune des stratégies de lutte (physiques, chimiques, génétiques, biologiques, et les facteurs humains) séparément se révèle peu efficace, orientant le contrôle des maladies des plantes vers une perspective de lutte intégrée.

Parmi les agents pathogènes responsables des pertes économiques importantes, les bactéries phytopathogènes sont considérées comme des agents bioterroristes ou bioagresseurs et classées dans la liste des organismes de quarantaine [2]. Ces microorganismes constituent une menace, causant des pertes graves s'élevant à plus de 120 billions de dollars par an et dont leur contrôle est très difficile [3]. Parmi les graves bactérioses 'le crown gall' ou la galle du collet causé par les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. Conn [4]. Cette maladie présente une gamme d'hôtes très large, comprenant plus de 643

espèces végétales appartenant à 331 genres, dont la majorité sont des dicotylédones avec quelques gymnospermes et peu de monocotylédones [5].

De nombreuses stratégies de lutte ont été développées à l'encontre des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. mais leurs efficacités sont limitées et n'ont pas encore permis de réduire significativement l'expansion et les pertes économiques engendrées par cette maladie.

La lutte par des antagonistes microbiens semble être une solution à la fois élégante et respectueuse de l'environnement. Elle répond aux exigences économiques, toxicologiques et écologiques. Cette forme de bioprotection consiste en l'utilisation de microorganismes pouvant contrer la croissance des agents pathogènes et par conséquent l'atteinte de la plante. Des études dans ce sens, ont mené à des résultats satisfaisants. Elles déterminent des antagonistes efficaces pouvant bloquer le développement du pathogène et parfois même stimuler la croissance des plantes hôtes.

Le premier biobactéricide homologué en 1989 été à base d'*Agrobacterium radiobacter* souche K84. Il existe 225 biopesticides microbiens manufacturés dans 30 pays membres de l'organisation de développement et de coopération économique (ODCE). Plusieurs formulations ont été synthétisées comme le bio-save 10 LP 110, qui est à base de *Pseudomonas syringae* contre les champignons phytopathogènes ; le Blight Ban A 506 à base de *Pseudomonas fluorescens* contre *Erwinia amylovora*, et le Messenger à base d'*Erwinia amylovora* qui constitue un biopesticide à action polyvalente [6].

Jusqu'ici, les organismes d'origine microbienne utilisés en lutte biologique ont été isolés du sol, de la rhizosphère ou de la plante. Les organismes isolés des plantes constituent les endophytes qui peuvent être des champignons ou / et des bactéries. L'association intime des endophytes bactériens avec les plantes offre une occasion unique pour leur application potentielle dans la protection des végétaux et la lutte biologique [7].

De multitudes bactéries résident dans les feuilles, tiges, racines, graines et fruits des plantes qui sont apparemment neutres en termes de santé des

végétaux. Cependant, plusieurs études ont suggéré que de nombreuses associations endophytes ne sont pas neutres mais au contraire sont bénéfiques pour les plantes. Depuis le début des années 2000, ces organismes sont couramment étudiés dans les plantes tropicales pour leur utilisation en lutte biologique ou pour la production de substances ayant des propriétés pharmacologiques [8].

Les endophytes offrent un large éventail d'avantages pour les plantes telles que la promotion de la croissance, réduisant la gravité de la maladie, induisant des mécanismes de défense des plantes, la production de produits anti-herbivores, la fixation biologique de l'azote, et l'augmentation de l'absorption minérale des végétaux [9 ; 10]. Les effets bénéfiques que les endophytes peuvent conférer aux plantes, ont fait des sujets de recherches importants pour les scientifiques pour l'étude des associations végétales- endophytes, dont le contrôle biologique des maladies [11 ;12].

Les succès évoqués par la littérature concernant l'utilisation des bactéries endophytes comme agents de lutte biologique, nous ont amené à continuer les travaux menés au laboratoire de bactériologie. Les objectifs tracés relatent l'identification d'une collection de bactéries endophytes isolées initialement à partir de cinq plantes spontanées : *Urtica dioïca*, *Plantago lanceolata*, *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus* et l'étude du pouvoir bioprotecteur de ces organismes.

Ainsi par ce présent travail, nous avons projeté de tester tout d'abord l'effet antagoniste *in vitro* de ces souches endophytes envers des souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Agrobacterium vitis*.

Ensuite, les souches antagonistes manifestant un important effet antagoniste *in vitro* sont sélectionnées pour étudier leurs capacités à coloniser *in planta*, afin d'évaluer leurs potentiel en tant qu'agents de contrôle biologique pour gérer la maladie du crown gall.

En résumé, les objectifs de cette étude sont tracés selon les étapes suivantes :

1- Réalisation d'une identification biochimique et moléculaire d'une collection de bactéries endophytes.

2- Etude du test d'hypersensibilité sur le tabac (*Nicotiana tabacum* var. White Burley), pour les isolats endophytes afin d'écartier ceux qui présentent un pouvoir phytopathogène.

3- Etude du pouvoir antagoniste des souches endophytes *in vitro* par la technique des spots et *in planta* par l'utilisation de plantules de tomate (*Lycopersicum esculentum* var. St Pierre) vis-à-vis de la collection de souches d'*Agrobacterium* spp.

Nous émettons l'hypothèse que ces souches antagonistes peuvent également être efficaces dans la réduction de la colonisation et de la sévérité de la maladie de la galle du collet *in planta* par induction d'une résistance systémique.

# CHAPITRE 1: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES *AGROBACTERIUM* SPP. PATHOGÈNES, AGENTS DE LA MALADIE DE DU 'CROWN GALL' ET LES APPLICATIONS DES INTERACTIONS ENDOPHYTIQUES BACTÉRIENNES EN LUTTE BIOLOGIQUE

## 1. LES CARACTÉRISTIQUES TAXONOMIQUES ET CELLULAIRES D'*AGROBACTERIUM* SPP.

D'un point de vue taxonomique, les espèces d'*Agrobacterium* (Conn, 1942) spp. sont classées dans l'arbre phylogénétique des *Rhizobiaceae* [13], membre de la section des 2- Alpha *Proteobacteria*. Elles sont parfois définies comme des *Rhizobium* qui ne fixent pas l'azote mais produisent d'autres types d'hypertrophies [14]. Les espèces appartenant au genre *Agrobacterium* spp. occupent différents habitats, elles peuvent vivre librement dans le sol, dans l'environnement racinaire (rhizosphère) ou comme pathogènes des plantes [15].

Les agrobactéries ont la forme de bâtonnets de 0,6 -1,0 µm X 1,5 - 3,0 µm. Les cellules sont à Gram négatif et peuvent être seules ou en paires. Elles ne forment pas de spores et sont mobiles grâce à des flagelles (de 1 à 6) péti-triches. Elles sont chimio-organotrophes aérobies, mais la plupart des souches d'agrobactéries sont capables de pousser sous une pression d'oxygène réduite; ce qui est le cas dans les tissus végétaux par exemple. Elles produisent de la catalase et aussi de l'uréase et de l'oxydase. Certaines souches regroupées dans le biovar 1, produisent des 3 - céto-glycosides [16].

L'organisation génomique des bactéries appartenant au genre *Agrobacterium* spp. est assez simple, tous les gènes essentiels à la survie de la bactérie sont réunis sur un unique chromosome circulaire. Les gènes de maintien

cellulaire se retrouvent sur le chromosome circulaire et linéaire [17]. Pour leur part, deux mégaplasmides présents, contiennent les gènes nécessaires à la conjugaison [18].

## **2. LA CLASSIFICATION D'AGROBACTERIUM SPP.**

### **2.1. Selon les caractères phytopathogènes**

Les premières classifications du genre *Agrobacterium* étaient fondées sur la pathogénie. Ainsi, plusieurs espèces ont été définies sur la base des symptômes qu'elles causent sur plantes : *A. tumefaciens*, induisant la formation de tumeurs, *A. vitis*, responsable d'une galle spécifique de la vigne, *A. rhizogenes*, responsable du « hairy root », maladie caractérisée par l'apparition d'un chevelu racinaire au point d'infection ou encore *A. rubi* causant la galle sur tige chez les *Rubus* (framboisier, ronce sauvage...) [19]. Les souches non pathogènes ont été rassemblées au sein de l'espèce *A. radiobacter*. *A. larrymoorei* isolée de *Ficus benjamina* a permis de définir une nouvelle espèce, différenciée sur la base de sa séquence d'ADNr 16S [20]. Ces données sur la taxonomie ont en effet beaucoup évolué avec les méthodes moléculaires de classification.

### **2.2. Selon les caractères physiologiques et biochimiques**

Keane et al. (1970), classe les souches d'*Agrobacterium* spp. sur la base de plusieurs dizaines de caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques, dans le biotype 1 et 2 indépendamment de leur pouvoir phytopathogène ; biotype plus tard appelé biovar [21].

Au fil du temps il a été démontré qu'un nombre limité de tests phénotypiques, tels que la production de 3-Ketolactose à partir du lactose, la croissance sur le citrate d'ammonium ferrique, la présence de C- oxydase, l'utilisation de citrate de sodium et de L-tyrosine, est utile pour la différenciation des espèces et biovars d'agrobactéries [22].

### 2.3. Selon le type de plasmide

Le plasmide des souches d'*Agrobacterium* spp. est d'un grand poids moléculaire, généralement de 180 à 400 kb, ce plasmide inducteur du mécanisme de pathogénèse est désigné par le "plasmide Ti" ou pTi pour (*Tumor inducing*) chez *A. tumefaciens* et "plasmide Ri" ou pRi pour (*Root inducing*) chez *A. rhizogenes* [23]. Ces plasmides sont conjugatifs et peuvent être acquis ou perdus. Ainsi, la perte ou l'acquisition d'un plasmide engendre la reclassification de la souche dans une autre espèce [24]. C'est pourquoi, il était nécessaire de proposer une autre taxonomie basée sur des caractères plus stables.

### 2.4. Selon les caractères phénotypiques et génotypiques

Contrairement à la dernière, cette nouvelle structure taxonomique se base sur des caractères phénotypiques et génotypiques stables. En effet, l'analyse des caractères chromosomiques, l'ADN chromosomal et la comparaison des modèles électrophorétiques des protéines ont montré que la plupart des membres du genre *Agrobacterium* sont groupés dans au moins trois groupes (biovars) taxonomiques ne correspondant pas à la pathogénicité [25].

Le genre *Agrobacterium* se compose au minimum de quatre taxa qui sont : *Agrobacterium tumefaciens* (correspondant au biovar 1) *A. rhizogenes* (correspondant au biovar 2), *A. vitis* (correspondant au biovar 3) et *A. rubi*. A ces quatre taxa, s'ajoutent aussi d'autres espèces telles que *A. larrymoorei* et les souches isolées du murier sauvage (*Rubus* sp) [20].

Des résultats d'études génomiques ont montré que les souches du biovar 1 se répartissent en 9 espèces génomiques distinctes. Certaines espèces partagent la même séquence du gène *rrs*, c'est le cas pour les espèces G6 et G8 ou encore G2 et G9. Les neuf génomovars étaient clairement délimités en utilisant les marqueurs AFLP, et plus récemment par le gène *recA* [26].

La taxonomie du genre *Agrobacterium* est toujours en évolution. En 2001, Young et al. à la suite de Sawada et al. (1993), ont proposé de supprimer le genre *Agrobacterium* et d'inclure ces bactéries dans le genre *Rhizobium* car l'analyse du gène *rrs* montrait que les bactéries nommées alors *Agrobacterium* avaient une

origine polyphylétique. Farrand *et al.* en 2003, ont répondu que les bactéries du biovar 1 d'*Agrobacterium*, ainsi que les espèces *A. vitis* et *A. rubi*, formaient une entité cohérente dans la famille des *Rhizobiacées* [13]. Ils proposent donc de conserver le genre *Agrobacterium*.

### 3. SYMPTOMATOLOGIE ET GAMME D'HOTES D'AGROBACTERIUM SPP.

La maladie du crown gall se traduit par le développement de galles, ou excroissances tissulaires aussi appelées tumeurs (Figure 1.1). Celles-ci se forment le plus souvent au niveau du collet ; zone de jonction entre la tige et le système racinaire souvent localisée au niveau de la surface du sol, mais parfois aussi sur des racines ou des tiges souterraines [27].

La gamme d'hôtes la plus large est attribuée à des agrobactéries appartenant au biovar 1 et 2. D'autres espèces comme *A. vitis*, *A. rubi* et *A. larrymoorei* sont considérées comme agents pathogènes à une gamme d'hôtes spécifiques. *A. vitis* affecte principalement la vigne, mais il a été également constaté comme un agent pathogène du chrysanthème [28] et du kiwi [22].



**Figure 1.1** : Exemples de tumeurs produites par *A. tumefaciens* chez : A) pommier, B) le pêcher et C) vigne.

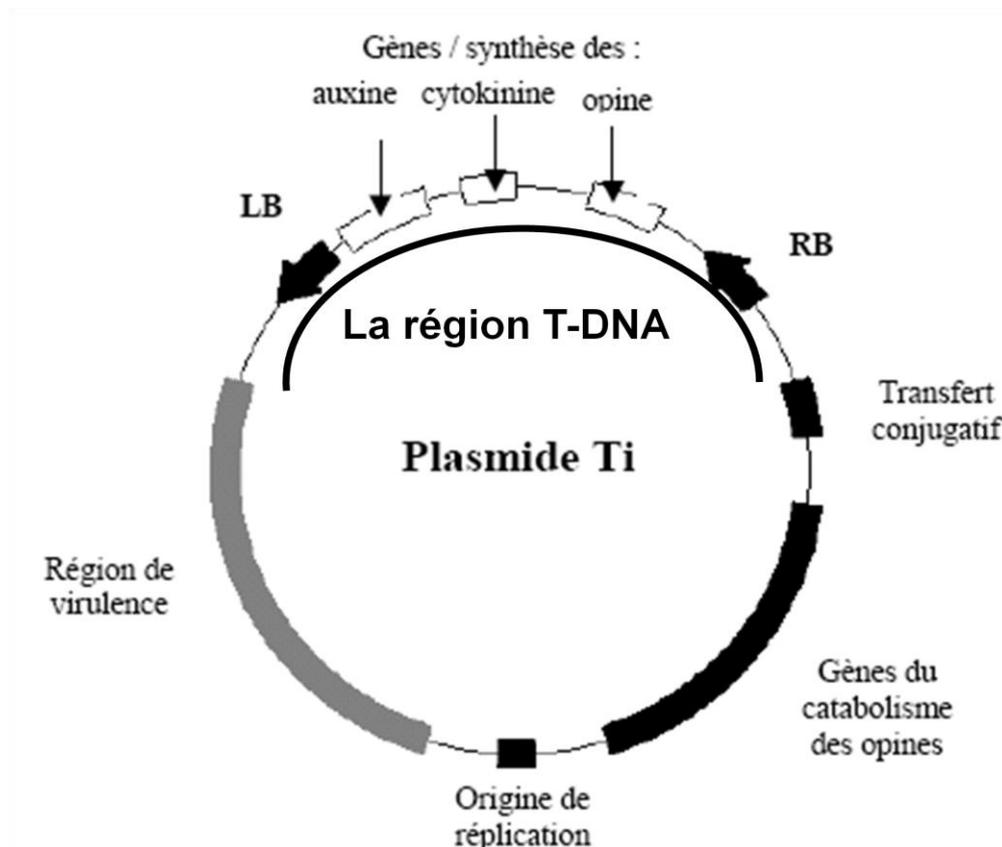
### 4. MECANISME DE PATHOGENICITE D'AGROBACTERIUM SPP.

#### 4.1. Plasmide Ti et pathogénie

La galle du collet est liée à la présence chez les agrobactéries du plasmide Ti, qui peut être disséminé dans la population bactérienne par transfert conjugatif

non seulement à d'autres souches d'*Agrobacterium* mais aussi à de nombreux membres des *Alpha-Proteobacteria*. En effet, si ce plasmide est transféré chez une souche non virulente d'agrobactéries, celle-ci devient à son tour capable d'infecter les cellules végétales [29].

Le plasmide Ti porte cinq types de gènes [30] (figure 1.2) :



**Figure 1.2:** Principales régions d'un plasmide Ti à octopine [30].

- La région de virulence (région *vir*) portant tous les gènes permettent le transfert de l'ADN-T vers la plante. Cette région est commune aux différents types de plasmides Ti. Elle comporte 20 gènes essentiels à l'induction de la tumeur chez l'hôte.

- La région T (ADN-T), c'est un segment de taille variable porté par les plasmides Ti ou Ri d'*Agrobacterium* spp. La région T est bordée de séquences spécifiques bien définies qui permettent leur excision des plasmides Ti ou Ri. Ces frontières appelées RB et LB pour 'Right Border' et 'Left Border' respectivement ont une taille de 25 pb et sont en répétition directe [30].

Les T-DNAs comprennent un certain nombre de gènes dont des gènes de synthèse d'hormones végétales comme l'auxine et la cytokinine ou des oncogènes qui vont permettre la prolifération cellulaire et aider à la formation des tumeurs ou des racines adventives. Ils comportent également, les gènes de synthèse des opines, petites molécules résultant de la condensation d'un sucre ou d'un acide  $\alpha$ -cétonique et d'un acide aminé. Ces composés sont des sources de carbone et d'azote pour les bactéries et ne sont catabolisés que par les agrobactéries à l'origine de leur synthèse.

- La région de catabolisme des opines (région *occ* pour un plasmide à octopine et région *noc* pour un plasmide à nopaline). La présence de ces gènes chez les agrobactéries leur permet d'utiliser les opines produites par la plante ainsi transformée, comme source de nutriments.

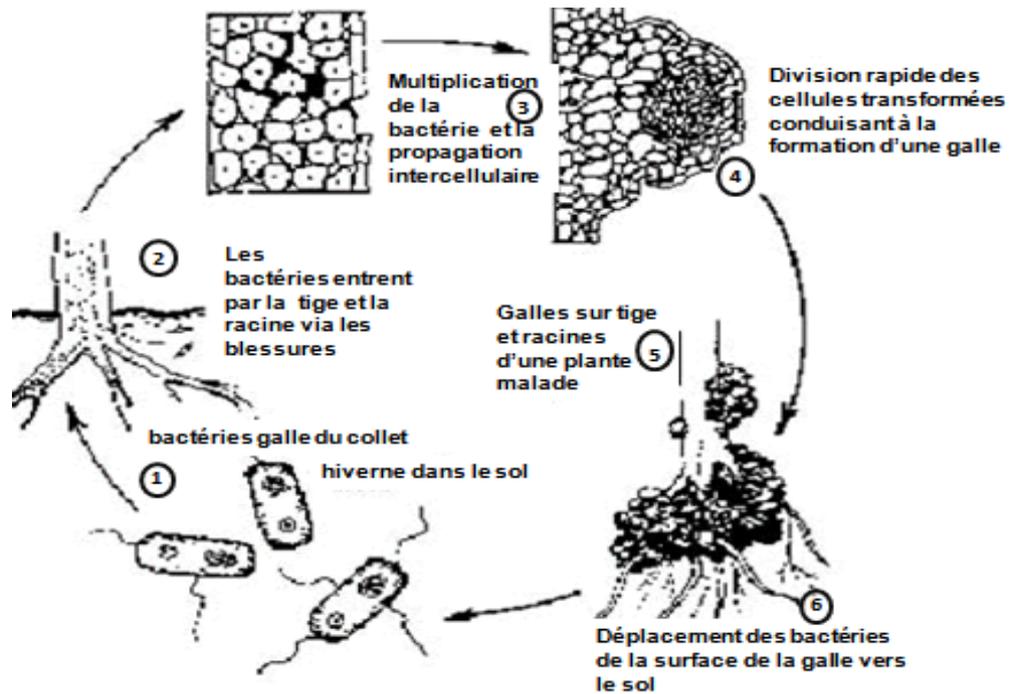
- Les locus *tra* et *trb*. Ces gènes sont impliqués dans le transfert conjugatif du plasmide. Ils sont activés par les opines.

- La région *Rep*, comporte trois gènes permettant une réplication stable du plasmide et leur implication dans les fonctions d'incompatibilités.

Il existe plusieurs types de plasmides Ti qui sont classés selon le type d'opine qu'ils synthétisent. Le plasmide Ti de la souche *A. tumefaciens* C58 (pTIC58) est de type nopaline-agrocinopine, les souches d'*Agrobacterium vitis* hébergent des plasmides Ti de type, vitopine, octopine ou cucumopine [31].

## **5. LE PROCESSUS D'INFECTION D'*A. TUMEFACIENS* ET *A. VITIS***

Le processus d'infection d'*Agrobacterium* spp. comporte trois étapes essentielles (figure 1.3) ; i) la reconnaissance plante / bactérie, ii) le transfert et l'intégration d'une partie de l'information génétique du pTi dans le génome de la cellule végétale et iii) l'expression des gènes du T-DNA, entraînant une multiplication anarchique de cellules et la production de composés opiniques [32].



**Figure 1.3 :** Cycle d'infection d'*Agrobacterium* spp. pathogènes, agents du crown gall [32].

### 5.1. Reconnaissance et attachement bactérie/hôte

Avant le transfert du T-DNA dans le génome de la cellule hôte, la bactérie reconnaît spécifiquement la cellule végétale et un contact physique s'établit alors entre elles (Figure 1.4, étape 1). Les molécules de la cellule végétale reconnues par la bactérie sont localisées sur la paroi cellulaire et seraient apparentées à la vitronectine. Ces protéines sont reconnues par un polysaccharide acylé dont la biosynthèse implique le locus *attR* du chromosome bactérien. L'interaction de ces deux molécules entraîne la synthèse de filaments de type cellulose qui renforce l'attachement entre la bactérie et la cellule végétale.

En plus des symptômes de type tumeurs, *A.vitis* contrairement à *Agrobacterium tumefaciens* est unique à produire des lésions nécrotiques typiques sur les racines de vigne et d'induire une réponse d'hypersensibilité sur les plants non hôtes comme le tabac. Cette bactérie produit la polygalacturonase (PG), une enzyme qui catalyse la dégradation des polymères pectiques de la paroi de la cellule végétale. Cette enzyme est codée par le gène *pehA* (pectic enzyme hydrolase), qui se localise au niveau du chromosome bactérien [33].

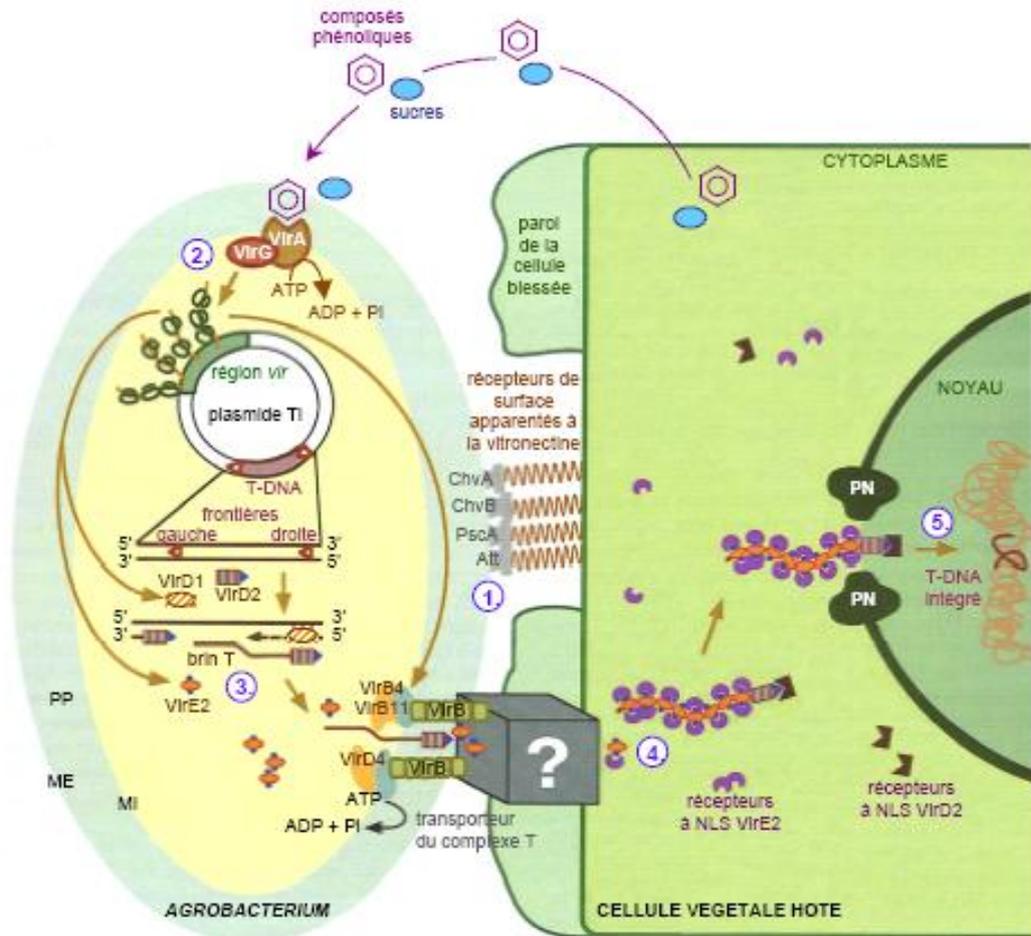
## **5.2. Induction des gènes *vir***

Les gènes *vir* sont impliqués dans le transfert du T-DNA et 4 loci (*virA*, *virB*, *virD* et *virG*) sont nécessaires au processus quel que soit l'hôte. Quant à *virE* et *virC*, ils sont importants pour l'infection de certaines espèces de plantes et permettent ainsi d'élargir le spectre d'hôte d'*Agrobacterium*. Ces gènes sont extrêmement conservés d'une souche à l'autre et même d'une espèce à l'autre [34]. Contrairement aux gènes de virulence chromosomiques, les gènes de virulence plasmidique d'*Agrobacterium* spp. ont besoin d'être induits par la plante pour être exprimés (Figure 1.4, étape 2). En effet, les gènes *vir* sont induits par l'exsudat des cellules blessées qui a un pH acide et est riche en sucres et en composés phénoliques appartenant à la famille des phénylpropanoïdes, comme l'acétosyringone.

## **5.3. Transfert du T-DNA**

Le processus de transfert d'ADN par *Agrobacterium* est unique car il a lieu entre deux organismes de règnes différents. Les endonucléases VirD1 et VirD2 engagent le transfert et vont agir de concert pour couper le brin inférieur du T-DNA au niveau de la frontière droite. La protéine VirD1 se fixe sur la séquence de la bordure droite et permet ainsi l'attachement de la protéine VirD2 à cette séquence spécifique en relâchant l'ADN plasmidique grâce à son activité hélicase. VirD2 coupe alors le T-DNA au niveau de la frontière droite et se fixe d'une manière covalente à l'extrémité 5' du T-DNA et du brin coupé sur le plasmide Ri ou Ti.

Cette étape nécessite parfois l'intervention de deux autres protéines, VirC1 et VirC2. Le simple brin se sépare ensuite du reste du plasmide par déplacement de brin utilisant des hélicases, des enzymes de réparation de l'ADN et des polymérases bactériennes. Le brin T est ainsi formé (Figure 1.4, étape 3) [35].



**Figure 1.4 :** Représentation schématique d'une infection par *Agrobacterium*. Schéma résumant les principales étapes du processus d'infection [35].

1. : Attachement de la bactérie à la surface de la cellule hôte.
2. : Induction des gènes *vir* par des signaux de la plante.
3. : Production du brin T et assemblage du complexe T.
4. : Exportation et transport vers le noyau de la cellule végétale.
5. : Intégration du T-DNA dans un chromosome de l'hôte.

Légende : ME, membrane externe ; MI, membrane interne ; PN, pore nucléaire ; PP, périplasme.

#### **5.4. Intégration du brin T dans le génome de l'hôte**

A son entrée dans la cellule végétale, le brin T est recouvert de la protéine VirE2 qui protège l'ADN simple brin contre les nucléases de la cellule végétale en se fixant le long du brin T. Cette protéine est produite en grande quantité dans la bactérie et possède les propriétés classiques des protéines SSB ('Single Strand

Binding'). Elle semble entrer dans la cellule hôte indépendamment du brin T à travers le transporteur T. Le brin T comprend à présent le T-DNA sous forme d'un simple brin avec la protéine VirD2 à son extrémité 5' et est recouvert des protéines VirE2. VirD2 guide ensuite le brin T dans la cellule végétale et sa séquence NLS ('Nuclear Localisation Signal') ainsi que celles des protéines VirE2 qui permettent l'entrée du brin T à l'intérieur du noyau (Figure 1.4, étape 4).

Les gènes portés par le T-DNA sont ensuite transcrits et traduits grâce à la machinerie cellulaire de l'hôte et leur régulation est fonction de leur propre promoteur [36].

## **6. LES DEGATS PROVOQUES PAR LA MALADIE DU CROWN GALL**

Le crown gall est l'une des plus importantes maladies causées par les *Agrobacterium* tumorigènes, qui sont responsables de vastes pertes économiques pour les productions de pépinière d'arbres fruitiers, des rosiers et les vignes dans de nombreux pays. Le crown gall est considéré comme la principale maladie bactérienne des arbres fruitiers à noyaux dans les pépinières des pays méditerranéens [37].

### 6.1. Dégâts sur les arbres fruitiers, forestiers, les plantes ornementales et la vigne

Les maladies causées par les souches pathogènes d'*Agrobacterium* réduisent fortement la rentabilité économique de la population des plants fruitiers, forestiers et ornementaux dans toutes les pépinières du monde. Les tumeurs qui se forment sur des plantes affaiblissent leur qualité esthétique si elles n'entraînent pas leur mort. En l'occurrence, le crown gall engendre une importante perte économique au niveau des pépinières du fait que la commercialisation des plants malades n'est pas autorisée et les plants atteints doivent être impérativement incinérés [38].

Au siècle dernier, la galle du collet a été décrite comme l'une des maladies les plus graves d'arbres fruitiers. Elle provoque une perte annuelle de 23 millions de dollars dans le seul État de la Californie [39]. En conséquence, l'importation de matériel végétal de pépinière de l'étranger est également sous strict contrôle

sanitaire [40]. En Algérie, Bouzar et *al.*, 1991, ont constaté que l'incidence du crown gall était directement corrélée avec le type de porte greffe utilisé [41].

La galle du collet sur la vigne est une maladie importante dans tous les pays où cette espèce est cultivée dans le monde, mais elle est particulièrement grave dans les régions à climat froid. L'importance du crown gall sur vigne a conduit Schroth et al. (1988) à en évaluer l'incidence agronomique. Ils ont observé sur une période de 4 ans une diminution de la production de raisin allant jusqu'à 40% et une baisse de vigueur de 9% par rapport aux plants sains. Parallèlement, des études sur l'épidémiologie de la maladie ont montré que la bactérie est systémique chez la vigne. Le principal site réservoir de la bactérie dans la plante est le système racinaire. Le crown gall, chez la vigne, peut induire des galles couvrant jusqu'à 25% à 75% de la circonférence du tronc, influe la productivité de la culture, et induit des baisses considérables du rendement, voire même une destruction totale des vignobles comme dans le Kentucky (U.S.A) [42].

## **7. LES MOYENS DE CONTROLE DU CROWN GALL CAUSE PAR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ET *A.VITIS***

L'incidence du crown gall sur des plantes d'intérêt économique a conduit à de nombreuses recherches en vue de développer des moyens de contrôle efficaces à l'encontre d'*A. tumefaciens* et *A.vitis*.

### **7.1. La lutte culturale et prophylactique**

Une fois la plante transformée, la tumeur se développe même si la bactérie n'est plus présente. Les techniques pour contrôler la maladie sont par conséquent, surtout préventives.

La prévention de la galle du collet passe par un contrôle de l'état sanitaire des plantes et du sol. Il est recommandé d'éviter les conditions favorisant les blessures, qui peuvent fournir un moyen idéal pour la pénétration du pathogène. Par la même, la taille soignée et la protection des plaies de greffage peuvent limiter l'extension de la maladie [43].

Le sol peut être désinfecté à la vapeur ou par solarisation. En effet, *Agrobacterium* ne pousse plus au-delà de 38°C. Les plantes, notamment la vigne, peuvent être désinfectées par thermothérapie [44]. Des essais en plein champ de solarisation du sol effectués par Raio et Zoina (1999), ont montré que les agrobactéries pouvaient être curées de leur plasmide Ti suite à leur exposition à de fortes températures [38]. Par ailleurs, la rotation des cultures, en alternance avec des plantes insensibles ou résistantes à *Agrobacterium*, permet aussi de limiter les épidémies [44].

## 7.2. La lutte chimique

Le contrôle chimique est un procédé onéreux qui s'est souvent révélé inefficace. Les organismes phytopathogènes montrent par le temps, une forte résistance et le produit réduit l'efficacité des compétiteurs naturels [45].

## 7.3. La lutte génétique

Benjama et coll. (2004), Krimi et coll. (2002), proposent un moyen de prédiction où une approche moléculaire a été essayée afin de détecter les souches pathogènes dans le sol, en détectant les plasmides Ti et en les caractérisant via la *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Ce procédé de détection évalue le potentiel de virulence des sols, avertit et prévient l'importance d'une éventuelle infection [37 ; 46].

Les plantes sensibles aux souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. ont été modifiées pour reconnaître la transformation génétique causée par les bactéries et sont capables de réagir. La prolifération des gènes bactériens provoquant la tumeur est réprimée de manière active (« *gene silencing* »); et les plantes deviennent ainsi résistantes. La technique a déjà été testée expérimentalement avec succès sur les plants de pommier et promet des résultats positifs avec d'autres plantes [47].

#### 7.4. La lutte biologique par utilisation de la souche K84 d'*Agrobacterium radiobacter*

Une fois le végétal infecté par *Agrobacterium*, aucune méthode de lutte curative n'est efficace, car même en l'absence du pathogène, la croissance de la tumeur progresse. En effet, la souche K84 d'*Agrobacterium radiobacter* Conn constitue une méthode de lutte exceptionnelle contre la galle du collet. La souche K84 est utilisée depuis que les propriétés uniques de cet organisme ont été découvertes par Dr Allen Kerr au début des années 70. Depuis lors, l'antagoniste K84 a été testé avec succès en Angleterre, en Ecosse, en France, au Canada, en Grèce, en Hongrie, en Italie, en Australie, au Japon, en Nouvelle Zélande, en Afrique du Sud, aux Etats Unis et aussi en région méditerranéenne [48].

La souche K84 d'*A. radiobacter* protège les blessures des racines contre l'infection par *A.tumefaciens* et cela par l'antibiotique « agrocine 84 » qu'elle produit et qui présente une toxicité spécifique contre les souches sensibles [49].

Il existe plusieurs produits commerciaux à base de l'antagoniste K84 (pesticides biologiques) destinées à la lutte biologique contre la galle du collet. Les produits sont utilisés comme préventifs pour traiter les semences, les boutures et les pousses de plantes ligneuses et certaines plantes ornementales. Généralement, le matériel végétal est trempé dans la solution du produit avant d'être mis au champ.

Malgré les succès qu'a connu le contrôle biologique par les souches non pathogènes d'*A.radiobacter* K84 et ses mutants ont été inefficaces sur certaines plantes hôtes et sur certaines populations naturelles d'*Agrobacterium* [49].

#### **7.5 Inefficacité de K84 à l'égard des souches d'*Agrobacterium vitis*, recherche d'autres agents de lutte biologique**

Dans le cas d'*Agrobacterium vitis*, l'agrocine 84 ne présente aucun effet bactériocinogène. Les recherches sur l'antagonisme à l'égard d'*Agrobacterium tumefaciens* et *A.vitis* ont abouti à l'isolement de nouvelles souches antagonistes efficaces. Parmi elles, la souche d'*Agrobacterium* HLB-2, produisant un antibiotique inhibiteur des souches d'*Agrobacterium* de biovar 3, des

*Pseudomonas* ou des *Penicillium* spp. ont été étudiés pour pallier les déficiences de la souche K84 et aussi inhibe la croissance de différentes souches d'*A. vitis* et atténue le développement de la maladie sur la vigne. Cette bactérie agit en interférant avec les sites d'attachement des souches pathogènes, mais aucun n'a été réellement efficace [50].

Une autre souche non tumorigène d'*Agrobacterium vitis* F2/5 décrite par Burr et Reid (1994), présente de grandes potentialités pour le contrôle du crown gall. Elle s'applique avant l'infection à des concentrations supérieures ou égales à celle du pathogène ; elle peut être aussi introduite dans le sol, juste avant la plantation de la vigne [51].

Herlache et Triplett (2002) pensent que l'addition de la trifolitoxine et du gène de résistance à la souche F2/5 peut accroître le contrôle biologique de cette souche. La trifolitoxine (TRX) est un antibiotique peptide produit par *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* T24. La production d'antibiotique et la fonction de résistance sont codées par l'opéron tfx [52].

*Agrobacterium tumefaciens* et *A.vitis* sont dotés d'une stratégie unique et d'un mécanisme performant pour dominer le système de défense des plantes. Face à leur pouvoir pathogène, on est toujours à la recherche d'autres méthodes complémentaires pour mieux parvenir à lutter contre le crown gall et les autres maladies causées par les souches pathogènes de cette bactérie [44].

## **8. LUTTE BIOLOGIQUE PAR L'UTILISATION DES MICROORGANISMES ANTAGONISTES, DIVERSITE DES MECANISMES D'ACTION**

La plupart des microorganismes dérivent de la rhizosphère des 2 à 5 mm de sol entourant le système racinaire où des populations microbiennes sont en relation avec la plante. Certains de ces microorganismes sont épiphytiques, c'est à dire qu'ils colonisent les surfaces racinaires, tandis que d'autres peuvent également entrer à l'intérieur des plantes et devenir ainsi des endophytes. Certains peuvent former des symbioses remarquables avec leur hôte végétal [53].

Le terme "épiphyte", désigne un microorganisme capable de coloniser les surfaces de la plante comme décrit par Hallman *et al.* (1997) [54]. Le terme

“endophyte”, correspond à un microorganisme capable d’entrer à l’intérieur d’une plante et d’y survivre au moins une partie de sa vie sans provoquer de symptômes apparents à son hôte végétal. Cette définition correspond à celle d’Hallman (2001), pour les bactéries endophytiques et inclut également les microorganismes de nature fongique [55].

Parmi les microorganismes bénéfiques, qu’ils soient épiphytiques ou endophytiques voire même à l’origine de symbioses remarquables (de type mutualisme), existent des champignons et des bactéries [53].

Un microorganisme est considéré antagoniste lorsqu’il empêche le développement d’une maladie ou la survie d’un agent pathogène [56]. Les modes d’action des microorganismes antagonistes sont : la compétition, l’antibiose, le parasitisme ou l’induction des mécanismes de défense de la plante, ce qui implique la synthèse de différents composés par la plante. Ces composés agissent directement sur le développement de l’agent pathogène ou forment des barrières au niveau de la plante, réduisant ainsi l’infection [57].

Pour qu’un microorganisme antagoniste puisse éventuellement être utilisé comme agent de lutte biologique, il doit présenter certaines propriétés. Il doit être stable génétiquement, efficace à de faibles concentrations, en mesure de rentrer en compétition avec les autres microorganismes du milieu et survivre aux stress environnementaux. Il devrait également être peu coûteux, facile d’utilisation et compatible avec les autres méthodes de lutte utilisées dans le cadre d’une lutte intégrée contre l’agent pathogène [58].

L’utilisation des bactéries pour l’amélioration du rendement et la protection des cultures a été initiée depuis le début de ce siècle. Elles tirent profit des propriétés bénéfiques des bactéries envers les plantes et/ou des capacités antagonistes des microorganismes contre les pathogènes [59].

*Pseudomonas fluorescens* souche 2-79 est capable de neutraliser le piétin échaudage du blé grâce à la production d’un antibiotique, l’acide phénazine I - carboxylique. Ce composé inhibe la croissance de *Gaunaomyces. graminis* var. *tritici in vitro* à une concentration de 1  $\mu$ g/ml. Les mutants Tn5 non producteurs de

phénazîne (Phz') ne sont plus capables d'inhiber ce phytopathogène *in vitro*, comme ils protègent moins contre le piétin échaudage du blé, même s'ils sont aptes à coloniser le système racinaire de la plante hôte, avec la même efficacité que la souche-mère [60].

Les genres *Bacillus*, *Streptomyces* ou des *Stenotrophomonas* sont aussi capables de produire l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine A ou la xanthobacine. Ces composés de haut poids moléculaires, sont capables à faibles doses d'interférer avec la sporulation et la croissance mycélienne d'un large spectre de champignons [61].

Certains champignons antagonistes ont également recours à l'antibiose. C'est en particulier le cas des espèces appartenant aux genres *Trichoderma* spp. et des *Gliocladium* spp. qui produisent certains composés qualifiés d'antifongiques. D'autres métabolites produits par certains champignons participent à leurs activités antagonistes. Il s'agit des enzymes glucanases et chitinases qui sont capables d'hydrolyser les constituants de la paroi des champignons cibles. En plus de leur action directe sur les organismes cibles, ces enzymes interviennent dans les modes d'action indirects car elles sont impliquées dans les mécanismes d'induction de la résistance [62].

La production des antibiotiques a été aussi observée chez les bactéries *Erwinia herbicola*, qui est un agent de lutte biologique important contre *Erwinia amylovora*. Les peptides antibiotiques ont typiquement un large spectre d'action et sont résistants aux peptidases et protéases d'origine végétale ou animale, contrairement aux bactériocines qui sont des structures antibactériennes ayant un effet inhibiteur spécifique, sur des organismes étroitement apparentés [62].

Plusieurs bactériocines nécessitent la présence de récepteurs spécifiques sur la surface membranaire des cellules des organismes qu'elles inhibent. L'exemple typique est celui de l'agrocine 84, une substance bactériocine produite par la bactérie *Agrobacterium radiobacter* souche K84, qui présente la propriété de s'attacher à une protéine spécifique dans l'espace périplasmique de la cellule bactérienne d'*Agrobacterium tumefaciens*. L'application de l'agrocine 84 purifiée sur le site d'infection, mime l'effet de l'inoculation avec la souche K84 [63].

Plusieurs facteurs abiotiques comme l'oxygène, la température, des sources spécifiques de carbone et d'azote et des microéléments, d'autres d'origine biotique tels que ; la plante hôte, le pathogène, la microflore indigène et la densité de cellules de la souche productrice ainsi que physiologiques (quorum sensing) ont été identifiés influencer la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle [64].

## **9. INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE (ISR) INDUITE CHEZ LES PLANTES PAR DES MICROORGANISMES DE LA RHIZOSPHERE**

La production d'antibiotiques chez les *Pseudomonas* spp. est décrite comme un important mode d'action dans la suppression des maladies par antibiose. Cependant, plusieurs études illustrent le potentiel de certains de ces composés à induire une réponse de type ISR chez les plantes. L'exploitation de l'ISR constitue une des voies les plus prometteuses de traitement biologique des cultures en vue de leur protection [65].

Plusieurs microorganismes récemment mis sur le marché en tant que biopesticides agissent, du moins en partie, par renforcement de la plante hôte via l'ISR. Cela inclut les champignons *Fusarium oxysporum* souche Fo47, mais aussi plusieurs bactéries dont *Bacillus subtilis* GBO3 et *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 [66]. Le 2,4-diacetylphoroglucinol (DAPG) produit par *Pseudomonas fluorescens* CHA0 protège *Arabidopsis thaliana* de *Peronospora parasitica*. Toujours chez *Arabidopsis*, la rhizobactérie *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 est également apte à protéger son hôte contre *Pseudomonas syringae* via l'ISR induite par le DAPG [67].

Romeiro et ses collaborateurs (2005), ont isolé des macromolécules produites par *Bacillus cereus* UFV-101 capables de déclencher l'ISR chez la tomate contre plusieurs pathogènes fongiques et bactériens [68].

## **10. LA COLONISATION NATURELLE DES PLANTES PAR LES BACTERIES ENDOPHYTES, UNE NOUVELLE TENDANCE DE LA LUTTE BIOLOGIQUE**

La capacité des bactéries endophytes d'infecter et de coloniser les racines ou d'autres types d'organes de la plante comme les semences, les tubercules, les

racines, les nodules, les tiges, les feuilles et les fruits, peut être considérée comme étant un facteur majeur qui détermine l'efficacité de ce bio-inoculum aussi bien sur l'amélioration de la production des plantes que sur leur protection contre les agents pathogènes. Ces bactéries peuvent infecter et coloniser l'intérieur des tissus de diverses plantes y compris les légumineuses et y prospérer en tant qu'endophytes naturels des racines, des tiges, des xylèmes, des feuilles et des fruits [54].

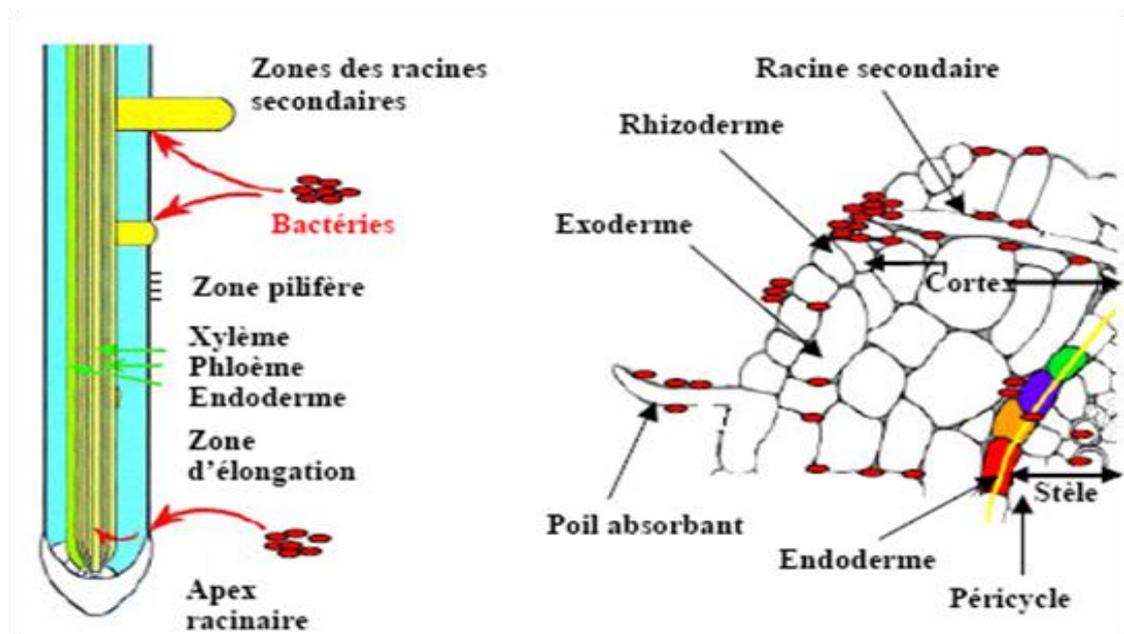
L'infection et la colonisation de la plante hôte par les bactéries endophytes se réalise d'une manière passive, enzymatique ou spécifique. L'infection passive et enzymatique constitue la principale voie empruntée par ces endophytes. La pénétration passive a lieu au niveau des craquelures que provoque l'émergence des racines latérales ou secondaires de la zone d'élongation des racines et des espaces intercellulaires entre les cellules corticales et épidermiques. L'infection enzymatique se réalise souvent, après une dégradation cellulosique localisée au niveau de la surface racinaire [69].

Dans le cas de la pénétration spécifique, l'initiation de l'infection est tributaire des exsudats racinaires (flavonoïdes) d'où spécificité entre les deux associés. En effet, Webster et *al.*, (1998), ont démontré que l'infection des racines du Blé (*Triticum aestivum* L.) par *Azorhizobium caulinodans* nécessite la présence du flavonoïde (naringenin) à des concentrations allant de 10 et 100 mmol/m<sup>3</sup>. Divers autres flavonoïdes (daidzein, genistein, myricetin et apigenin) à 10 mmol/m<sup>3</sup> stimulent d'une manière significative la colonisation de craquelures des racines latérales du Blé par *Azospirillum brasilense*. Toutefois, ces différents flavonoïdes ont été incapables de stimuler la colonisation des racines du blé par *Rhizobium meliloti* 2011 [69].

#### 10.1. La pénétration et propagation des bactéries endophytiques au sein de la plante

La colonisation des plantes par les bactéries endophytes au niveau racinaire peut se réaliser de différentes façons (Figure 1.5). Tout d'abord, la zone d'émergence des racines secondaires constitue une ouverture naturelle permettant l'entrée des bactéries endophytes à l'intérieur de la plante. Ensuite, les

blesures provoquées par des facteurs biotiques, comme par exemple les agents pathogènes, peuvent également permettre l'entrée des bactéries endophytes [70]. Une autre possibilité consiste en la sécrétion par ces microorganismes d'enzymes dégradant les parois cellulaires de la plante telles que des cellulases, des endoglucanases, des polygalacturonases et des xylanases. Cette sécrétion enzymatique est cependant de faible intensité et n'est pas une sécrétion continue qui détruirait les tissus de la plante. Elle permet ainsi juste à certaines PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) endophytiques d'entrer à l'intérieur de leur hôte végétal [71].



**Figure 1.5 :** Illustration des sites possibles d'infection et de colonisation des racines par des bactéries endophytes montrée par une section longitudinale et transversale d'une racine [70].

Suite à leur pénétration dans les racines, certaines bactéries endophytes vont se propager dans différents tissus de leur hôte. La colonisation affecte tout d'abord le cortex racinaire par la voie intercellulaire et atteint ensuite la barrière de l'endoderme [70]. Cette barrière peut être partiellement détruite par certaines bactéries endophytes. Néanmoins, des cellules de l'endoderme sont détruites lors du développement des racines secondaires, ce qui facilite la progression des bactéries endophytes jusqu'au cylindre central. Les endophytes bactériens

peuvent alors atteindre les vaisseaux conducteurs du xylème et les utiliser pour se propager jusqu'aux parties aériennes de la plante.

Il a ainsi été rapporté par certains botanistes que les endophytes ne se propagent pas par le xylème, mais plutôt par l'apoplaste de ces vaisseaux, la lumière du xylème étant utilisée, selon eux, seulement par les agents pathogènes. Cependant, la migration des bactéries endophytiques par la lumière du xylème a bien été prouvée et diverses publications citent, ainsi, une propagation des endophytes bactériens par cette voie de colonisation [71].

### **10.2 La diversité des bactéries endophytes**

La taxonomie des bactéries endophytes reste encore mal cernée. Cependant, la plupart de ces bactéries identifiées jusqu'à présent font partie des espèces appartenant aux genres, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Bradyrhizobium* et *Sinorhizobium* (Tableau 1.1) [12 ; 72].

**Tableau 1.1** : Quelques bactéries endophytes [12 ; 72].

Bactéries endophytes	Plante hôte	Organe (s) colonisé (s)
<i>Azospirillum</i>		
<i>A.amazonense</i>	<i>Saccharum officina</i>	Racine, tige et feuilles
<i>A.brasilense</i>	Blé, Sorgho, Maïs	Racine et tige
<i>A.lipoferum</i>	Blé, Sorgho, Maïs	Racine et tige
<i>Bacillus</i>		
<i>B.endophyticus</i> sp.	<i>Gossypium</i> sp	Racine
<i>Bacillus</i> sp	Cotonnier, Epinette ( <i>Picea abies</i> ), Raisin,	Racine, tige et feuilles
<i>Beijerinckia indica</i>	Petits pois Canne à sucre	Racine
<i>Burkholderia</i>		
<i>B.brasilensis</i>	Banane ( <i>Musa</i> spp.)	Tige
<i>B.cepacia</i>	<i>Lupinus luteus</i> , maïs	Racine, xylème
<i>Burkholderia</i> sp. (PsJn)	<i>Vitis vinifera</i>	Racine, tige et feuille
<i>B.tropicalis</i>	<i>Ananas comosus</i> L.	Tige et fruit
<i>Herbaspirillum</i>		
<i>H.seropedicae</i>	Canne à sucre, riz, sorgho, banane	Racine, xylème, feuille et fruit
<i>H.rurisubalcans</i>	( <i>Musa</i> spp.) Banane et <i>Ananes comosus</i> L.	Racine, tige et feuille et fruit
<i>Pseudomonas</i> sp PsJN	<i>Vitis vinifera</i>	Racine
<i>Serratia</i>		
<i>Serratia phymuthica</i>	<i>Cucumis sativa</i> L.	Racine
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Oriza sativa</i> L.	Racine

### **10.3. Importance des bactéries endophytes en bioprotection**

Ces dernières années, de nombreux auteurs ont rapporté l'implication de ces endophytes dans l'amélioration de la croissance des plantes, la résistance aux agents pathogènes et la production agricole [9].

Ces bactéries endophytes sont, en général, reconnues pour les rôles importants qu'elles jouent dans le développement et dans l'amélioration de la production des plantes hôtes qui les hébergent. Plusieurs auteurs ont rapporté leur efficacité dans la fixation de l'azote moléculaire à l'intérieur des tissus des plantes hôtes (en dehors des nodules) [69].

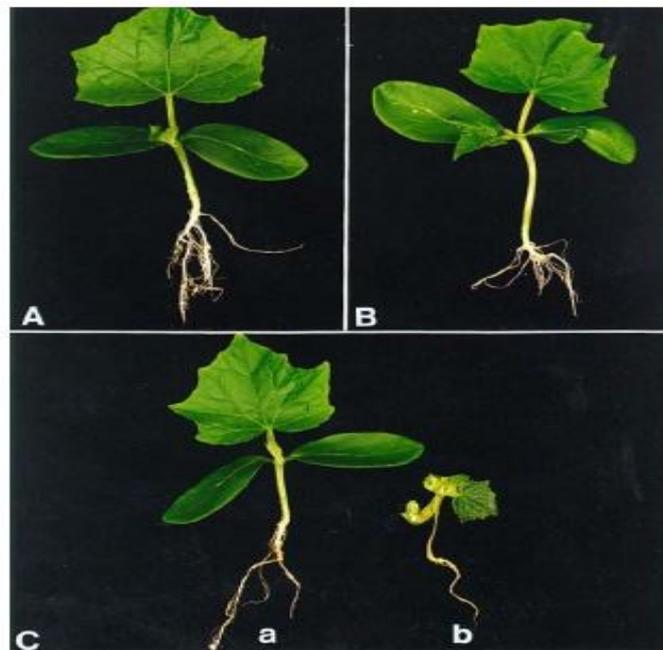
En plus des rôles précédemment cités, elles possèdent une grande faculté de solubiliser et libérer certains éléments d'origine minérale ou organique essentiels pour la nutrition des plantes, tels que le phosphore et le fer [12]. Par ailleurs, elles sont très utilisées comme étant des agents de biocontrôle et donc une alternative à l'usage des fongicides. Elles jouent un rôle significatif dans la protection des plantes contre les champignons et d'autres microorganismes ou insectes pathogènes, entraînant ainsi la protection de la productivité globale de l'écosystème agricole [9].

Selon Backman et *al.* (1997), l'efficacité des endophytes comme agents de lutte biologique est tributaire de nombreux facteurs. Ces facteurs comprennent: la spécificité d'hôte, la dynamique des populations et le mode de colonisation de l'hôte, la capacité de se déplacer dans les tissus de l'hôte, et la capacité d'induire la résistance systémique [73].

Comme les bactéries endophytes sont en contact intime avec la plante, elles constituent un choix attractif comme agents de biocontrôle. Elles représentent une source importante de composés biologiquement actifs contre les phytopathogènes. En plus de l'antagonisme direct contre les organismes pathogènes, ces bactéries bénéfiques peuvent induire une forme de résistance systémique chez les plantes. Cette induction est généralement due aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram négatives, mais d'autres molécules comme les sidérophores et l'acide salicylique sont aussi

considérés comme des molécules candidates. Les LPS induisent une série de gènes protecteurs parmi eux ceux qui codent pour les protéines liées à la pathogénèse (PR) [74].

Sturz et *al.*, (1999) ont constaté que 61 des 192 endophytes bactériennes isolées à partir des tissus de la tige de la pomme de terre étaient des agents de biocontrôle effectifs à l'égard de *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus*. Plusieurs chercheurs ont isolé et étudié l'antagonisme et l'effet des endophytes comme agents de biocontrôle et ont suggéré que les bactéries endophytes peuvent être utilisées comme pré-traitement des graines avant leur culture [75]. C'est ainsi que le traitement préalable des graines de concombre (*Cucumis sativus* L.) avec une bactérie endophyte, *Serratia phymuthica* a provoqué la suppression de l'effet du champignon, *Pythium ultimum* agent causal de la fonte des semis chez ces plantules (Figure 1.6) [76].



**Figure 1.6 :** Effet du traitement de graines avec *Serratia phymuthica* sur le développement des symptômes causés par *Pythium ultimum* chez la plantule de concombre (*Cucumis sativus* L.) [76]

**A.** Témoins ; **B.** Traitement bactérien et pas d'inoculation fongique ; **C.** Inoculation fongique, en présence (**a**) ou en absence (**b**) du traitement bactérien.

## Chapitre 2 : **MATERIELS ET METHODES**

Notre travail est constitué de trois parties principales : la première concerne l'identification biochimique et moléculaire d'une collection d'isolats endophytes ainsi qu'une caractérisation biologique par l'étude du test d'hypersensibilité sur tabac, effectué sur des isolats endophytes afin d'écarter ceux qui présentent un pouvoir phytopathogène. La seconde partie est consacrée à la réalisation de test de pathogénicité pour une collection de souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et des souches d'*Agrobacterium vitis*. La dernière partie concerne l'étude du pouvoir antibactérien de ces isolats endophytes *in vitro* et *in planta* à l'égard de la collection de souches d'*Agrobacterium spp* choisies.

### **1. ORIGINE DES ISOLATS DE BACTERIES ANTAGONISTES**

Trente-neuf (39) isolats de bactéries endophytes isolées initialement de cinq plantes spontanées : *Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus* [77] selon la technique décrite par Long et ses collaborateurs (2003) ont été choisis pour la suite de ce travail [78].

Ces 39 bactéries antagonistes ont été sélectionnées pour leur identification biochimique et moléculaire afin d'effectuer ultérieurement des tests d'antagonisme *in vitro* puis des tests d'antagonismes *in planta* à l'égard d'une collection de souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Agrobacterium vitis*.

Les isolats endophytes sélectionnés pour les tests d'antagonisme sont ceux qui ont produit des zones d'inhibition envers la souche de référence C58 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le choix des 39 isolats a été porté sur la zone d'inhibition supérieure à 20 mm [77].

## **2. CULTURE ET IDENTIFICATION DES ISOLATS DE BACTERIES ANTAGONISTES**

Tous au long de notre étude, tous les isolats de bactéries antagonistes ont été cultivés sur le milieu de culture LPGA qui s'est révélé plus performant que le milieu LB en termes de croissance bactérienne. Le milieu LPGA contient l'extrait de levure, la peptone bactériologique, le glucose et l'agar [79].

Les isolats antagonistes ont été préparés à partir de cultures préalablement purifiées. La purification est une opération nécessaire afin de s'assurer de la pureté des isolats antagonistes pour leur identification. La méthode consiste à faire des étalements sectoriels avec la culture bactérienne de chaque isolat à l'aide d'une anse, à raison de 3 secteurs par boîte de Pétri contenant le milieu LPGA [79], suivie d'une étape d'incubation à 28-30°C, jusqu'à l'obtention de clones purs.

### **2.1. Les caractères cultureux des isolats antagonistes**

Les colonies des isolats de bactéries antagonistes sont prélevées individuellement et repiquées sur le milieu LPGA par épuisement en trois secteurs pour obtenir des colonies bactériennes totalement individualisées. Les colonies des isolats obtenues après 24h d'incubation ont été identifiées sur la base des caractères cultureux suivants : taille (diamètre de la colonie), couleur, forme, le taux de croissance et la régularité ou l'irrégularité du contour des colonies.

### **2.2. Les caractères biochimiques et physiologiques des isolats antagonistes**

les trente-neuf (39) isolats antagonistes sont caractérisés pour les traits suivants : coloration de Gram, production de pigment fluorescent sur milieu B de King (KB), test d'oxydase et de catalase, test d'arginine déshydrolase, production de levane, fermentation du glucose, transformation du sucrose, production d'indole, liquéfaction de la gélatine et hydrolyse de l'amidon.

### **2.2.1. Coloration de la paroi des bactéries**

La coloration de la paroi des bactéries a été réalisée selon la méthode de la coloration de Gram décrite par [79] et selon la technique du test KOH décrit par [80].

#### **2.2.1.1. La coloration de Gram**

La fixation de la culture bactérienne à identifier se réalise à la chaleur et en présence d'une goutte d'eau distillée stérile. Elle consiste en une préparation du frottis par étalement d'une culture bactérienne âgée de 24h sur une lame. Le frottis ainsi fixé est d'abord coloré par le violet de gentiane suivi par l'application d'une solution de lugol. La décoloration est ensuite effectuée par un lavage à l'alcool des lames jusqu'à la disparition de la couleur violette. Après un lavage abondant avec un jet d'eau distillée stérile, le frottis subit une deuxième coloration à l'aide d'une solution de fuschine basique. On réalise ensuite une observation microscopique des frottis après un lavage à l'eau et un séchage au dessus de la flamme d'un bec bunsen. Les bactéries colorées en rose sont à Gram négatif, alors que celles colorées en violet sont à Gram positif [79].

#### **2.2.1.2. Le test au KOH**

Le test au KOH peut être utilisé en cas de doute sur les résultats d'une coloration de Gram. Il se base sur le fait que la paroi des bactéries à Gram négatif est lysée par le KOH alors que la paroi des bactéries à Gram positif n'est pas détruite. Chez les bactéries à Gram négatif, la lyse de la paroi libère l'ADN qui formera une substance visqueuse au contact du KOH.

Le test se réalise de manière extrêmement simple et rapide. Les cultures à examiner doivent être âgées de moins de 48 heures. Avec une effilure de pipette Pasteur, on prélève un fragment de la colonie bactérienne qui est placée dans deux gouttes d'une solution de KOH à 3%. Après avoir homogénéisé la culture dans le KOH durant 15 à 30 secondes, l'effilure de la pipette est retirée lentement du liquide.

Lorsque la bactérie est à Gram négatif, il se forme un filament visqueux, bien visible. Pour une bactérie à Gram positif, la formation de filaments n'est pas observée [80].

### **2.2.2. Production de pigments fluorescents sur le milieu B de King**

Les colonies ciblées sont prélevées individuellement et repiquées sur le milieu KB [81]. La production de pigments fluorescents est notée par la présence d'une couleur verdâtre diffusible sur le milieu gélosé King B, la fluorescence est visible sous lumière UV.

### **2.2.3. Test d'oxydase**

Une culture bactérienne âgée de 24h cultivée sur le milieu King B [81] est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur papier filtre dans une boîte de Pétri contenant du papier Wattman, imprégné d'une goutte de réactif de l'oxalate di-méthyl-phenylène diamine préparé préalablement dans une solution d'eau distillée stérile à 1%. Le développement d'une coloration violette au bout de 10 à 60 s indique la présence du cytochrome C oxydase [79].

### **2.2.4. Test de catalase**

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'oxygène  $H_2O_2$ . Sur une lame, une goutte de peroxyde d'hydrogène (3%) est déposée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les souches bactériennes âgées de 24 h sont déposées dans la solution de peroxyde d'hydrogène, après 2 minutes, la présence de bulles révèle le dégagement d'oxygène et par conséquent une réaction positive [82].

### **2.2.5. Test d'arginine déshydrolase**

Le test Arginine déshydrolase sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine par l'enzyme arginine déshydrolase. À l'aide d'une anse stérile, une culture bactérienne âgée de 24 h est déposée sur le milieu de culture liquide. Après 24 h d'incubation à 27°C, le milieu devient jaune orangé indiquant la transformation de l'arginine par l'enzyme [79].

### **2.2.6. Test de levane**

Le test levane sert à déterminer la polymérisation du fructose en polyfructose. Ce test se réalise selon la technique décrite par Hildebrand et *al.*, (1988) [79], qui consiste à ensemencer en stries une culture jeune sur un milieu gélosé levane. Après une incubation de trois jours à 28°C, la présence de la levane sucrase est indiquée par l'apparition d'une culture abondante, muqueuse et brillante.

### **2.2.7. Fermentation du glucose**

Le milieu Hugh et Leifson est utilisé pour différencier entre la voie fermentative et la voie oxydative. Une culture de 24h ensemencée sur milieu de base Hugh et Leifson. La présence de la couleur jaune indique la fermentation du glucose par la bactérie [83].

### **2.2.8. Transformation du sucrose**

Le test sucrose sert à déterminer si la bactérie transforme le sucrose en une substance réductrice. Une culture bactérienne de 24h est déposée à l'aide d'une anse stérile sur le milieu de culture liquide RS [84]. A la suite de l'incubation, 2,5 ml de réactif de Bénédict est ajouté puis amené à ébullition sur une plaque chauffante. Un changement de la couleur indique que la réaction est positive [84].

### **2.2.9. Production d'indole**

Une culture bactérienne âgée de 24h, sur milieu de culture liquide d'indole est déposée à l'aide d'une anse stérile. A la suite de l'incubation, trois gouttes de réactif de Kovac's sont ajoutées, la présence d'un anneau rouge en surface indique la production de l'indole à partir du tryptophane par la bactérie [85].

### **2.2.10. Liquéfaction de la gélatine**

Les souches bactériennes sont ensemencées sur le milieu à base de gélatine. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les tubes sont placés à 4°C pendant 30 minutes. Un résultat positif est indiqué par l'hydrolyse de la gélatine car le milieu devient liquide si la bactérie dégrade la gélatine. Cependant, l'absence de la gélatine se met en évidence si le milieu reste solide [82].

### **2.2.11. L'hydrolyse de l'amidon**

Sur des boîtes de Pétri contenant le milieu amidon, les bactéries sont ensemencées en spots à raison de 5 spots par boîte. Après 24 à 48h d'incubation à 27°C, l'addition du colorant lugol ne provoque pas l'apparition d'une coloration jaune autour du spot, ce qui indique que la bactérie n'utilise pas l'amidon. Dans le cas d'une hydrolyse de l'amidon, un anneau transparent apparaît autour du spot bactérien [79].

## **2.3. Les caractéristiques biologiques des isolats antagonistes**

### **2.3.1. La réponse des isolats antagonistes au test d'hypersensibilité sur tabac**

L'éventuelle pathogénicité de chaque isolat antagoniste a été évaluée et mesurée en utilisant le test d'hypersensibilité sur le tabac (*Nicotiana tabacum*) [86]. Le test d'hypersensibilité du tabac sert à mettre en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement des zones inoculées sur les feuilles de tabac [87]. Dans un tube de 2ml d'eau distillée stérile, une suspension bactérienne concentrée a été ensemencée à partir d'une culture bactérienne âgée de 24 h. Les feuilles de tabac *Nicotiana tabacum* var. *White Burley* sont inoculées par injection sous épidermique d'une suspension bactérienne à l'aide d'une seringue stérile de 1ml. Le témoin négatif consiste à injecter de l'eau distillée stérile au niveau du limbe foliaire. Pour chaque souche bactérienne à identifier, une feuille de tabac de taille moyenne a été inoculée et codifiée. Les feuilles de tabac injectées ont été suivies quotidiennement pendant 10 jours après inoculation pour le développement des symptômes.

Un résultat positif se traduit par la présence d'une zone nécrotique mettant en évidence ainsi le pouvoir pathogène de la bactérie testée [87].

## 2.4. Identifications moléculaire par utilisation du marqueur moléculaire l'ADNr 16S

Les techniques moléculaires basées sur l'étude de l'ARNr 16S comme un marqueur phylogénétique fournit une approche efficace pour contourner les inconvénients liés aux conditions de culture. Les techniques telles que l'analyse

séquentielle des gènes d'ARNr 16S permettent une caractérisation rapide des populations microbiennes [88].

L'identification moléculaire des bactéries endophytes a été réalisée par séquençage de l'ADN ribosomal 16S, cette étape a été réalisée au laboratoire (CNR, Protezione Delle Piante Firenze, Italie) par Krimi Z. et Raio A. Treize souches endophytes ont pu être identifiées sur la base de cet opéron ribosomique.

#### **2.4.1. Mise en culture et extraction de l'ADN**

De chaque isolat endophyte, une colonie a été utilisée pour l'extraction d'ADN. Chaque colonie a été déposée de façon aseptique dans 5 ml de bouillon LB (Luria Bertani) puis mise en croissance sous un agitateur rotatif pendant une nuit pour extraire l'ADN ultérieurement.

L'extraction d'ADN a été effectuée en utilisant un kit d'extraction 'DNeasy' (Qiagen), dont 1 ml de chaque culture a été utilisé pour l'extraction de l'ADN en utilisant le protocole suivant que l'isolat soit à Gram positif ou à Gram négatif.

#### **2.4.2. L'amplification par PCR**

Le mélange pour la réaction PCR contient: (25µl) par tube eppendorf, le tampon, la Taq DNA polymérase 0,5U, 0,75 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTP, 15,75 µl de H<sub>2</sub>O et des primers FD1 1.0 /rP1/rP2 1.0 et enfin 3µl d'ADN [89].

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Cycler ADN) [89]. Les produits d'amplification ont été purifiés et séquencés par Primm s.r.l. (Milan, Italie) en utilisant les amorces impliquées dans la réaction PCR.

#### **2.4.3. Le séquençage des fragments amplifiés**

La similitude des séquences nucléotidiques partielles d'ADNr 16S (1400-1500 bp) avec des séquences connues dans la base de données NCBI GenBank a été déterminée par le logiciel BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les souches ont été attribuées à une espèce si elles présentent une homologie d'identité de séquences supérieure à 99% d'ADNr 16S ou bien à un genre si l'homologie des séquences est supérieure à 97% d'ADNr 16S [90].

### **3. TEST DU POUVOIR PATHOGENE DES SOUCHES D'AGROBACTERIUM SPP.**

Pour tester le pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium* spp. qui appartiennent à deux espèces ; *Agrobacterium tumefaciens*, (la souche de référence C58, et les souches E2, E14) et l'espèce *Agrobacterium vitis* avec les espèces ; AL9/95, Bu 20/95 et AV25/95. Deux plantes tests ont été utilisées à savoir, le kalanchoë (*Kalanchoë daigremontiana*), la tomate (*Lycopersicum esculenum* cv. Marmande et cv. Saint Pierre). Les limbes foliaires de la plante *Kalanchoe daigremontiana* sont fréquemment utilisées pour vérifier la virulence d'*Agrobacterium* spp.[91].

#### **3.1. Inoculation des feuilles de kalanchoë et de tomate**

L'inoculation sur les plantes test est réalisée à l'aide d'une culture bactérienne âgée de 48h et cultivée sur le milieu LPGA [79]. La souche à tester est déposée sur des blessures réalisées aseptiquement sur le limbe des jeunes feuilles de kalanchoë d'une couleur vert tendre et d'une taille d'environ 7 cm. L'inoculation des plantules de tomate se fait au niveau du 2<sup>ème</sup> entre nœud de la tige. Trois répétitions (plantules) par isolat sont réalisées. Pour le test témoin, en plus de la souche de référence, nous avons utilisé des plantules blessées, inoculées d'eau distillée stérile et des plantules blessées non inoculées. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une tumeur au niveau du site de l'inoculation après 2 à 3 semaines [91].

### **4. EVALUATION DE LA DENSITE OPTIQUE NECESSAIRE POUR LA REALISATION DES TESTS D'ANTAGONISME**

Nous présentons ci-dessous les informations relatives au calcul de la densité optique pour la détermination de la quantité d'inoculum nécessaire à la réalisation des tests d'antagonismes.

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats antagonistes contre les souches d'*Agrobacterium* spp., nous avons considéré le ratio de 10: 1 c'est-à-dire, pour l'antagoniste, d'un ratio 10 fois supérieur par rapport à celui de la souche pathogène [92 ; 93]. La concentration cellulaire d'isolats antagonistes prise

est de  $10^7$  CFU/ml et celle des souches d'*Agrobacterium* spp. est de  $10^6$  CFU/ml [94].

De très nombreuses techniques permettent de mesurer la biomasse d'une suspension bactérienne. La mesure de la densité optique est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600 nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible. D'une manière générale, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire.

Sous une hotte à flux laminaire et dans des conditions aseptiques, nous avons préparé la solution mère en raclant à l'aide d'une anse stérile, la culture bactérienne d'une souche âgée de 48h cultivée sur le milieu LPGA. Une souche parmi la collection d'*Agrobacterium* spp. à tester, a été choisie au hasard. Cette dernière a été par la suite mise en suspension dans un tube à essai contenant de l'eau distillée stérile. Après agitation, nous avons réalisé une série de dilutions (suspensions-dilutions) par prélèvement d'un millilitre pour chaque dilution à l'aide d'une micropipette stérile. Le volume prélevé (1 ml) est mis dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile.

A l'aide du spectrophotomètre (Prolabo, Paris), nous avons effectué la lecture de la densité optique de chaque dilution des suspensions bactériennes à la longueur d'onde de 600 nm.

Afin de réaliser le comptage des colonies bactériennes, nous avons prélevé avec une micropipette un volume de 0,1 ml de chaque dilution. Ce dernier est étalé en boîtes de Pétri contenant le milieu LPGA. L'étalement a été réalisé en utilisant des billes en verre préalablement stérilisées. Enfin, nous avons réalisé une étape d'incubation à 28°C pendant 48h.

Après une incubation de 48h à 72h, le comptage des colonies est réalisé sous la loupe. Pour le comptage des colonies bactériennes issues des isollements, les boîtes dont le nombre est inférieur à 30 et supérieur à 300 ne sont pas dénombrées [92].

Des expérimentations antérieures menées au laboratoire de phytobactériologie ont déjà développé le calcul de la valeur de la densité optique pour des densités cellulaires d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Agrobacterium vitis* qui sont souvent utilisées pour des inoculations *in planta* ou des essais d'antagonisme *in vitro* [78]. La densité cellulaire de  $10^6$  bactéries par millilitre (CFU/ml) correspond à une valeur de DO égale à 0.12 pour *Agrobacterium vitis* et 0,16 pour *Agrobacterium tumefaciens* [53 ; 95].

#### **4.1. Préparation des suspensions bactériennes à inoculer**

Les suspensions des souches bactériennes à inoculer ont été préparées à partir de cultures préalablement purifiées. La purification est une opération nécessaire afin de s'assurer de la pureté des souches bactériennes à inoculer. La méthode consiste à faire des étalements sectoriels avec la culture bactérienne de chaque souche à l'aide d'une anse. A raison de 3 secteurs par boîte contenant le milieu LPGA, suivie d'une étape d'incubation à 28-30°C.

### **5. LE TEST D'ANTAGONISME *IN VITRO***

Trente neuf souches endophytes ont été testées pour leurs effets antagonistes envers six (6) souches d'*Agrobacterium* spp. dont trois (3) souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, la souche C58 qui est une souche de référence, elle fait partie de la collection de souches phytopathogènes du laboratoire de bactériologie végétale. Elle nous a été soigneusement fournie par le laboratoire d'Ecologie microbienne (CNRS, Lyon I, France), la souche E2 et la souche E14 qui sont des souches isolées d'*Eucalyptus occidentalis* [179], et trois autres souches d'*Agrobacterium vitis* qui sont AL9/95, AV25/95 et Bu20/95, ces dernières sont fournies gracieusement par Marilyn L. Canfield, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, Oregon.

Le test d'antagonisme *in vitro* a été fait suivant la méthode décrite par Stonier (1960), et modifiée par Moore et *al.* (1988) [180 ; 175]. La méthode est constituée de plusieurs étapes successives qui sont présentées comme suit :

### 5.1. Dépôts des spots des isolats endophytes

Après la préparation de la densité optique des souches antagonistes qui variait de 0,22 à 0,26, nous prélevons à l'aide d'une micropipette un volume de 20  $\mu$ l de la suspension bactérienne antagoniste que nous déposons en spots dans les boîtes contenant le milieu de culture LPGA. Nous préparons 3 spots de 0.8 mm de diamètre correspondant par conséquent à 3 répétitions par boîte et par souche.

Les boîtes contenant les spots des souches endophytes à tester pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis des souches d'*Agrobacterium* spp. sont mises en incubation de 24 à 48 h à 28°C.

### 5.2. Préparation des suspensions bactériennes phytopathogènes pour le spray

Les souches d'*Agrobacterium* spp. à pulvériser sur les boîtes contenant les spots, doivent avoir le même âge que les isolats bactériens ; soit 24h à 48h.

Nous mesurons la DO des suspensions des souches d'*Agrobacterium* spp. qui est égale à 0,16 correspondant à une densité cellulaire  $10^6$  CFU/ml pour les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et une densité optique de 0,12 correspondant à une densité cellulaire  $10^6$  CFU/ml pour les souches d'*Agrobacterium vitis* [94]. Les souches phytopathogènes d'*Agrobacterium* spp. ont été pulvérisées par spray sur les boîtes contenant les spots en se servant d'un atomiseur à parfum.

Les boîtes comportant les spots des bactéries endophytes, supposées produire des molécules antagonistes à l'égard des souches phytopathogènes d'*Agrobacterium* spp. pendant le temps d'incubation sont préparées pour une pulvérisation (le spray). L'opération de spray nécessite une désinfection de l'atomiseur à l'aide de l'éthanol 95° suivie de deux rinçages à l'eau distillée stérile. Les boîtes sont inclinées verticalement sur un support, puis pulvérisées sur toute la surface de manière à répartir d'une manière homogène toutes les micro-gouttelettes des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp.

Cette étude *in vitro* est menée dans le but de sélectionner parmi les bactéries antagonistes testées, les plus performantes en vue de leur utilisation dans le contrôle biologique *in vivo* envers les souches d'*Agrobacterium* spp.

### 5.3. Lecture des résultats

Après incubation, si la souche est sensible à l'antagoniste, sa croissance sera inhibée autour du spot laissant apparaître une zone d'inhibition claire autour du spot bactérien. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant le diamètre en mm des zones d'inhibition à l'aide d'un double décimètre. Par la suite, un calcul des valeurs moyennes des trois zones est effectué.

## 6. TEST D'ANTAGONISME *IN PLANTA*

Etant donné que plusieurs études ont montré que certains microorganismes manifestent un important effet antagoniste *in vitro*, et réussissent à produire le même effet *in vivo* [96]. Cette hypothèse nous a encouragés à vérifier si l'effet antagoniste présenté par certaines souches antagonistes contre les souches phytopathogènes d'*Agrobacterium* spp. *in vitro*, pourrait servir dans la bioprotection de la tomate contre le crown gall *in situ*. L'antagonisme bactérien *in planta* à l'encontre des souches d'*Agrobacterium vitis* AL9/95, AV25/95 et Bu20/95 ainsi qu'une seule souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche E14 a été analysé.

### 6.1. Matériel végétal

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

La variété testée est la Saint pierre (var. fixe), les semences de tomate nous ont été fournies par la station expérimentale du département d'Agronomie (Blida).

## **6.2. Méthodologie de semis**

Les semences de tomate ont été désinfectées dans une solution constituée d'eau distillée stérile et d'environ 2 à 3 gouttes d'eau de javel à 12 °, la désinfection est suivie de 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile. Les graines sont séchées sur papier filtre stérile.

Pour le semis, le substrat utilisé est un mélange de 2/3 de terre végétale récupéré au niveau de la station expérimentale et 1/3 de tourbe. La stérilisation du substrat a été réalisée selon la méthode Rapilly (1986), qui consiste à stériliser le sol à 2 reprises pendant une période d'une heure à 250°C, en intervalle de 24h [97].

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

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

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

## **6.3. Sélection des plantes pour l'inoculation**

La sélection est faite après la germination des semences de tomate et avant leur inoculation par les bactéries antagonistes. Les plantes ont été choisies au stade de deux (2) vraies feuilles, pour que l'ensemble des plantes soient homogène et de même stade phénologique.

## **6.4. Dispositif expérimental**

L'essai de l'antagonisme *in planta* se réalise sous serre selon un dispositif expérimental, qui est en bloc randomisé avec plusieurs traitements, un plant avec trois répétitions, pour chaque traitement, soit un total de 24 plants. Au total, pour tous les traitements de l'essai d'antagonisme, nous avons 130 plants à analyser.

Les traitements sont les suivants :

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

T2 : trempage des plants de tomate dans la suspension bactérienne d'antagoniste puis inoculés par les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. les trois souches d'*Agrobacterium vitis* AL9/95, Bu20/95, AV25 /95 et une seule souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche E14.

T3 : un second traitement consiste à tremper les plants de tomate dans la suspension d'antagonistes qui sont les souches : CR2, OS1, OS4, EHF3, EPR3.

T4 : le quatrième traitement représente les plants de tomate inoculés directement avec la suspension de souches tumorigènes d'*Agrobacterium vitis* AL9/95, Bu20/95, AV25 /95 et *A. tumefaciens* souche E14.

#### 6.5. Les souches antagonistes

Pour le test d'antagonisme *in planta*, nous avons sélectionné cinq (5) souches antagonistes les plus prometteuses et les plus performants envers les souches d'*Agrobacterium* spp choisies. Le choix était porté sur le résultat du test d'antagonisme *in vitro* sur la base de l'inhibition représentée en mm par la zone claire autour du spot central.

Les cinq (5) souches de bactéries antagonistes choisies pour effectuer le test d'antagonisme *in planta* sont: CR2, OS1, OS4, EHF3 et EPR3. Ces cinq souches ont été cultivées sur milieu LPGA puis incubées à 28°C.

La suspension de la souche antagoniste à bactériser a été préparée à partir d'une culture préalablement purifiée. Pour l'étape de bactérisation, nous avons préparé des suspensions bactériennes à une densité optique variant de 0.22 à 0, 26 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond respectivement à une densité cellulaire de concentration  $10^7$ CFU /ml.

## **6.6. Souche d'*Agrobacterium* spp. à inoculer**

La suspension de la souche bactérienne à inoculer et qui s'agit soit d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* E14 ou des souches d'*Agrobacterium vitis* (AL9/95, Bu20/95, et AV25/95) a été préparée à partir d'une culture préalablement purifiée. La pureté de la souche a été vérifiée sur le milieu LPGA [79] en réalisant plusieurs repiquages successifs, puis incubation à 28°C.

Pour l'étape d'inoculation, nous avons préparé des suspensions bactériennes à une densité optique qui varie de 0,12 à 0,16 à une longueur d'onde de 600 nm, ce qui correspond à une densité cellulaire de  $10^6$  bactéries/ml. En effet, pour notre expérimentation, nous avons utilisé la densité d'inoculum de  $10^6$  bactéries/ml, indiquée par plusieurs travaux effectués sur *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium vitis* [94].

6.7. Essai de bioprotection de la tomate contre la galle du collet *in planta* par l'utilisation des bactéries antagonistes

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

Au stade de deux feuilles, les plants de tomate sont retirés de leur pots, rincés pour éliminer l'excès de sol puis trempés pendant 24h dans une suspension des bactéries antagonistes à une densité optique de 0.26 qui correspond à une concentration de  $10^7$  CFU /ml. Les plantules de tomate traitées par l'antagoniste seront par la suite inoculées par la souche pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* (E14) à la concentration cellulaire de  $10^7$  CFU /ml. Le même procédé est réalisé pour les plantules inoculées à l'aide des souches pathogènes d'*Agrobacterium vitis* (AL9/95, Bu20/95 et AV25/95). La méthode d'immersion ou de trempage des racines des plantes par les souches antagonistes a été utilisés par plusieurs auteurs à savoir : Bouzar et *al.*, 1991 ; Vicedo et *al.*, 1993 ; Polymnia et *al.*, 2004 ; Guessas et Hadadji, 2009 [98 ; 99 ; 100 ; 101].

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

Avec une aiguille ou un scalpel stérile, on réalise trois blessures dans la tige des plantules de tomate, à intervalles de 1 cm à partir de l'extrémité en croissance. Un volume de 0,5 ml d'eau distillé stérile ou de la suspension bactérienne de l'agent pathogène d'*Agrobacterium* spp. va être introduit au niveau des blessures [102]. Pour chaque cas, le volume inoculé est de 0,5 ml. La tige inoculée est ensuite enveloppée avec du papier aluminium stérile afin d'éviter la dessiccation de l'inoculum [102]. Les plantules sont maintenues en serre à une température de 25-27°C, puis inspectées pour le développement de la tumeur.

### **6.7.2. Estimation de l'infection ou la suppression de la maladie de crown gall lors de l'essai d'antagonisme *in planta***

#### **6.7.2.1. Lecture des résultats**

L'infection par les *Agrobacterium* spp. se manifeste principalement par la formation d'une tumeur au niveau du point d'inoculation [98]. Dans ce test, les plantules de tomate inoculées au niveau du collet sont suivies pendant neuf (9) semaines.

Chaque semaine, on suit attentivement et de près les plantules traitées, par la prises des photos de développement ou non des symptômes et par la mesure de la taille des galls chaque semaine, jusqu'à la dernière semaine et cela pendant une période de neuf semaines, et à la fin c'est-à-dire à la neuvième semaine, on pèse le poids finale du la tumeur pour les plantules qui ont développé des tumeurs.

## **7. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS**

Les zones claires présentes autour des souches antagonistes, ont été mesurées à l'aide d'un double décimètre. L'activité antagoniste *in vitro* des souches endophytes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. a été indiquée par des zones d'inhibition de croissance claires autour des spots des bactéries antagonistes. Trois répétitions ont été maintenues pour chaque traitement, par la suite un calcul de la moyenne a été effectué.

Afin de vérifier une éventuelle efficacité des souches endophytes vis-à-vis des souches bactériennes d'*Agrobacterium* spp. testées et la comparaison entre

les souches antagonistes, et pour faire ressortir les groupes des souches antagonistes, les plus actifs vis-à-vis de les souches d'*Agrobacterium* spp. testées, nous avons utiliser la procédure décrite dans le logiciel de statistique PAST vers 1.81 [103]. Les analyses de covariance ont été conduites en considérant les diamètres des zones d'inhibition comme moyennes et les souches a testées comme les variances.

Les corrélations existantes entre les différentes souches antagonistes et les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. sont mises en évidence par une analyse en composantes principales (ACP). Dans ce type de test, les différents souches antagonistes ont des coordonnées comprises entre  $-1$  et  $+1$  et appartiennent à un cercle de corrélation. L'interprétation de l'ACP se fait à partir de l'examen du cercle des corrélations et de la position du statut des variables sur les axes factoriels [103].

L'hypothèse de l'efficacité antagoniste *in vitro* des souches endophytes est testée par le modèle de la distance euclidienne à un facteur contrôlé par le logiciel PAST - PAlaeontological STatistics, ver. 1.81

Alors que les résultats obtenus pour le test d'antagonisme des souches endophytes envers les souches d'*Agrobacterium* spp. *in planta* ont été analysés par le logiciel statistique « Systat » vers. 12, SPSS 2009, afin d'analyser tous les conditions paramétriques considérés (souches endophytes, souches d'*Agrobacterium* spp. testées, variation dans le temps, la variation de la position des tumeurs, la taille des tumeurs, le poids des tumeurs), le test ANOVA (ANalysis Of Variance) est effectué, la distribution de la variable quantitative doit être normale.

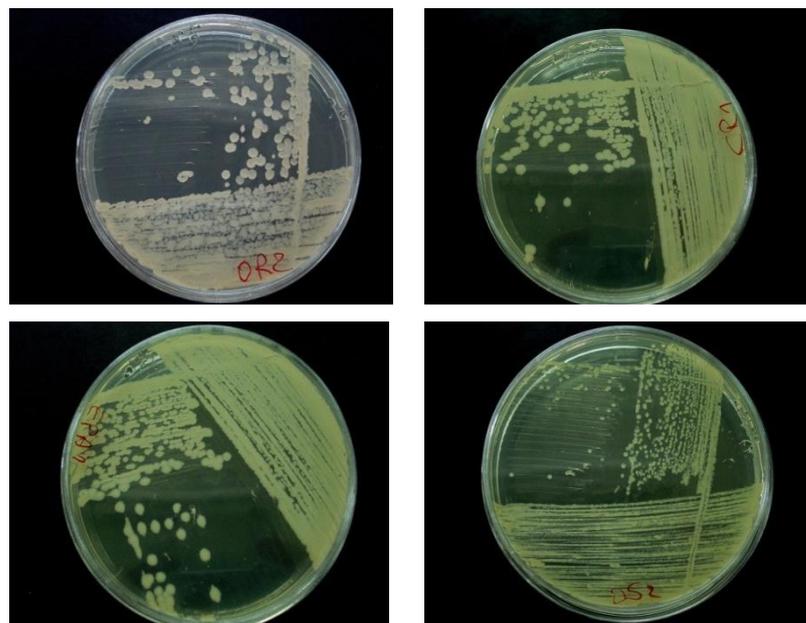
## Chapitre 3 : RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

### 1. IDENTIFICATION DES ISOLATS DE BACTERIES ANTAGONISTES

#### 1.1. Les caractères culturaux des isolats antagonistes

Les colonies des trente neuf isolats endophytes obtenues après 24-48h d'incubation sur milieu LPGA, ont été identifiées sur la base des caractères culturaux suivants : la taille (diamètre de la colonie), la couleur, la forme, le taux de croissance et la régularité ou l'irrégularité du contour des colonies.

En se basant sur ces traits culturaux, nous remarquons une grande variabilité dans la morphologie, la couleur, la forme et la taille des colonies des isolats endophytes (Figure 3.1) et que ces caractères culturaux ne suffisent pas pour regrouper ou identifier les isolats endophytes. L'analyse de la composition par la coloration de Gram a montré la prédominance des bactéries à Gram négatif, ce qui présente 56, 41% du total des isolats.

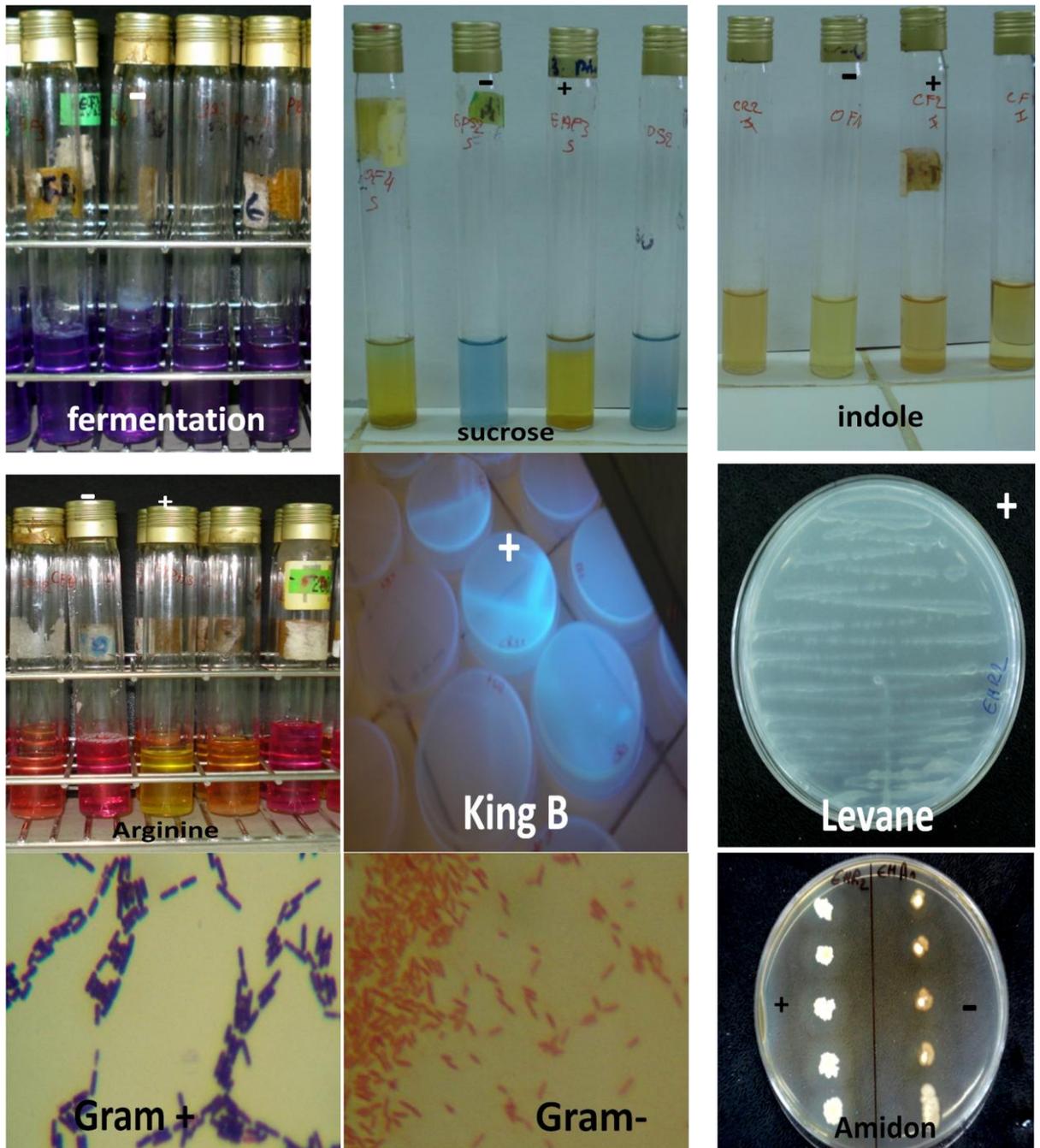


**Figure 3.1 :** Colonies de quelques isolats endophytes cultivées sur milieu de culture LPGA pendant 24h à 28°C.

La classification des isolats endophytes sur la base des caractères morphologiques ne semble pas être évidente, ces derniers ont été caractérisées biochimiquement pour orienter leur identification.

#### 1.2. Les caractères biochimiques et physiologiques des isolats antagonistes

La caractérisation phénotypique (biochimique et physiologique) des isolats des bactéries endophytes a permis de diviser les trente neuf isolats en 12 profils (Tableau 3.1 ; 3.2 et figure 3.2). Dix-sept isolats étaient des bactéries à Gram positif, avec neuf profils biochimiques, dont les profils 3, 4 et 9 ont été ultérieurement caractérisés en tant que membres du genre *Bacillus* sp., du fait qu'ils possèdent les caractéristiques morphologiques des colonies et les caractéristiques biochimiques du genre *Bacillus* sp. Cependant, les vingt-deux isolats restants constituaient des bactéries à Gram négatif, dont sept ont été classés en tant que membres du genre *Pseudomonas* sp., sur la base des caractéristiques générales suivantes : la production de pigments fluorescents sur KB, oxydase positive et catalase positive.



**Figure 3.2 :** Réaction de quelques isolats aux différents tests biochimiques.

+ : Réponse positive.

- : Réponse négative.

**Tableau 3.1:** Caractérisation biochimique des différents isolats à Gram négatif. (+: Réponse positive, - : Réponse négative).

	K.B	Profils	Souches	levane	oxydase	catalase	Indole	Sucrose	fermentation	arginine	gélatine	Amidon	
Gram -	+	<i>Pseudomonas</i> sp.	PA2	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
			CR2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
			CS1	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
			CR3	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
			EHF4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
			EPR3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
			Oa2	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	-	Profil1	PR2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			CR1	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
			Oa3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
			OR3	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
			OS2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
			OS3	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
			OS6	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
			PS1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
			CF2	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
			OF1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
			EHF2	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
			EHA1	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
		-	Profil2	OR2	+	-	+	-	-	-	-	+	+
EHF5	+			-	+	-	+	-	-	+	+	+	
EHR2	+			-	+	+	-	-	-	+	+	+	

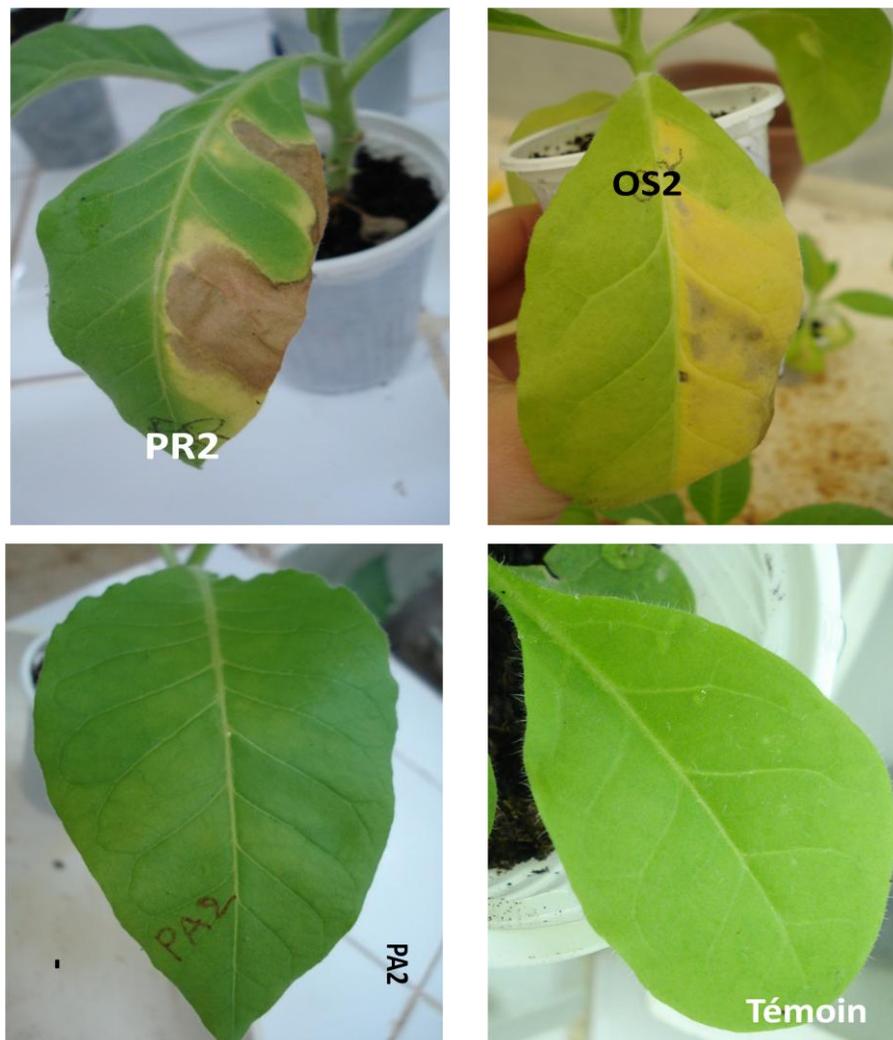
**Tableau 3.2:** Caractérisation biochimique des différents isolats à Gram positif (+: Réponse positive, - : Réponse négative).

	Profils	Souches	Catalase	Indole	Sucrose	fermentation	Arginine	Gélatine	Amidon
Gram +	Profil3	PR1, OS1, OS5	+	-	-	-	-	+	+
	Profil4	Oa1,EPF4,EHR1	+	-	-	-	+	+	+
	Profil5	EHF3,EPA4	+	-	+	-	-	+	+
	Profil6	OS4	+	+	+	+	+	+	+
	Profil7	PF3,EPS1, EPF1	+	-	+	+	+	+	+
	Profil8	CF1	+	+	-	-	-	+	+
	Profil9	EPS3	+	-	+	-	+	+	-
	Profil10	EPS4	+	-	-	-	-	+	-
	Profil11	EPS2	+	+	-	-	+	+	+

### 1.3. La caractérisation biologique des isolats antagonistes

#### 1.3.1. La réponse des isolats antagonistes au test d'hypersensibilité sur tabac

Parmi les 39 isolats endophytes testés, 9 provoquent la réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac. Cette réaction se manifeste par la formation d'une zone nécrotique au niveau de la partie infiltrée par la solution bactérienne à tester (Tableau 3.3 ; figure 3.3).



**Figure 3.3:** Réaction d'hypersensibilité sur feuilles de tabac après une semaine d'inoculation.

- + : réaction positive au test d'hypersensibilité sur tabac (isolat PR2, OS3).
- \_ : réaction négative au test d'hypersensibilité sur tabac (isolat PA2)
- T : témoin inoculé avec l'eau distillée stérile.

**Tableau 3.3 :** Réponse des isolats endophytes au test d'hypersensibilité sur le tabac (*Nicotiana tabacum* var White Burley).

Les isolats endophytes	HR
PR2, CR1, CR3, OS2, OS3, PF3, EHF4, EHF5, EPS3	Positif
Pa2, PR1, CR2, Oa1, Oa2, Oa3, OR1, OR2, OR3, OS1, OS4, OS5, OS6, PS1, Cf1, Cf2, Cs1, OF1, EHF2, EHF3, EPF1, EPF4, EHA1, EHR1, EHR2, EPS4, EPA4, EPS2, EPS1, EPA4, EPR3	Négatif

#### 1.4. Identification moléculaire par utilisation du marqueur moléculaire l'ADNr 16S

Les isolats endophytes sont des bactéries isolées initialement de cinq plantes spontanées : *Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus* [77]. Ces isolats ont subi une amplification du 16S puis une identification moléculaire par séquençage de l'amplicon, cette étape a été réalisée au laboratoire (CNR, Protezione Delle Piante Firenze, Italie) par Krimi Z. et Raio A. [78]. Treize souches endophytes ont pu être identifiées sur la base de cette portion de gène de l'opéron ribosomique.

Les techniques moléculaires basées sur l'étude de l'ARNr 16S comme un marqueur phylogénétique fournit une approche efficace pour contourner les inconvénients liés aux conditions de culture. Les techniques telles que l'analyse séquentielle des gènes d'ARNr 16S permettent une caractérisation rapide et fiable des populations microbiennes [89].

Contrairement à l'identification par voie biochimique, l'analyse de la séquence d'ADNr 16S permet une identification bactérienne universelle plus précise. L'examen moléculaire a permis en premier lieu de confirmer les résultats obtenus par les tests biochimiques réalisés sur les isolats endophytes. Cette analyse moléculaire nous a permis d'amplifier la région 16S des souches endophytes et d'analyser cette séquence grâce au logiciel BLAST qui nous permet de comparer la séquence obtenue à celles disponibles sur une base de données. L'identification séquentielle des treize isolats endophytes a permis de classer neuf souches bactériennes au genre *Bacillus* sp., trois autres appartenant au genre

*Pseudomonas* sp. et une espèce identifiée comme *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola* (Tableau 3.4).

**Tableau 3.4:** Résultat d'identification moléculaire des isolats endophytes par l'utilisation du marqueur moléculaire l'ADNr 16S.

Les souches endophytes	Espèces identifiées
OR1, OS1, EHR1	<i>Bacillus cereus</i>
OR2, OS4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
OS2	<i>Bacillus pumilus</i>
EHF3	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv <i>beticola</i>
EHF5	<i>Bacillus subtilis</i>
	<b>Genres identifiés</b>
EPR3, PS1, CR2	<i>Pseudomonas</i> spp.
CR1, PF3	<i>Bacillus</i> spp

## 2. TEST DU POUVOIR PATHOGENE DES SOUCHES D'AGROBACTERIUM SPP.

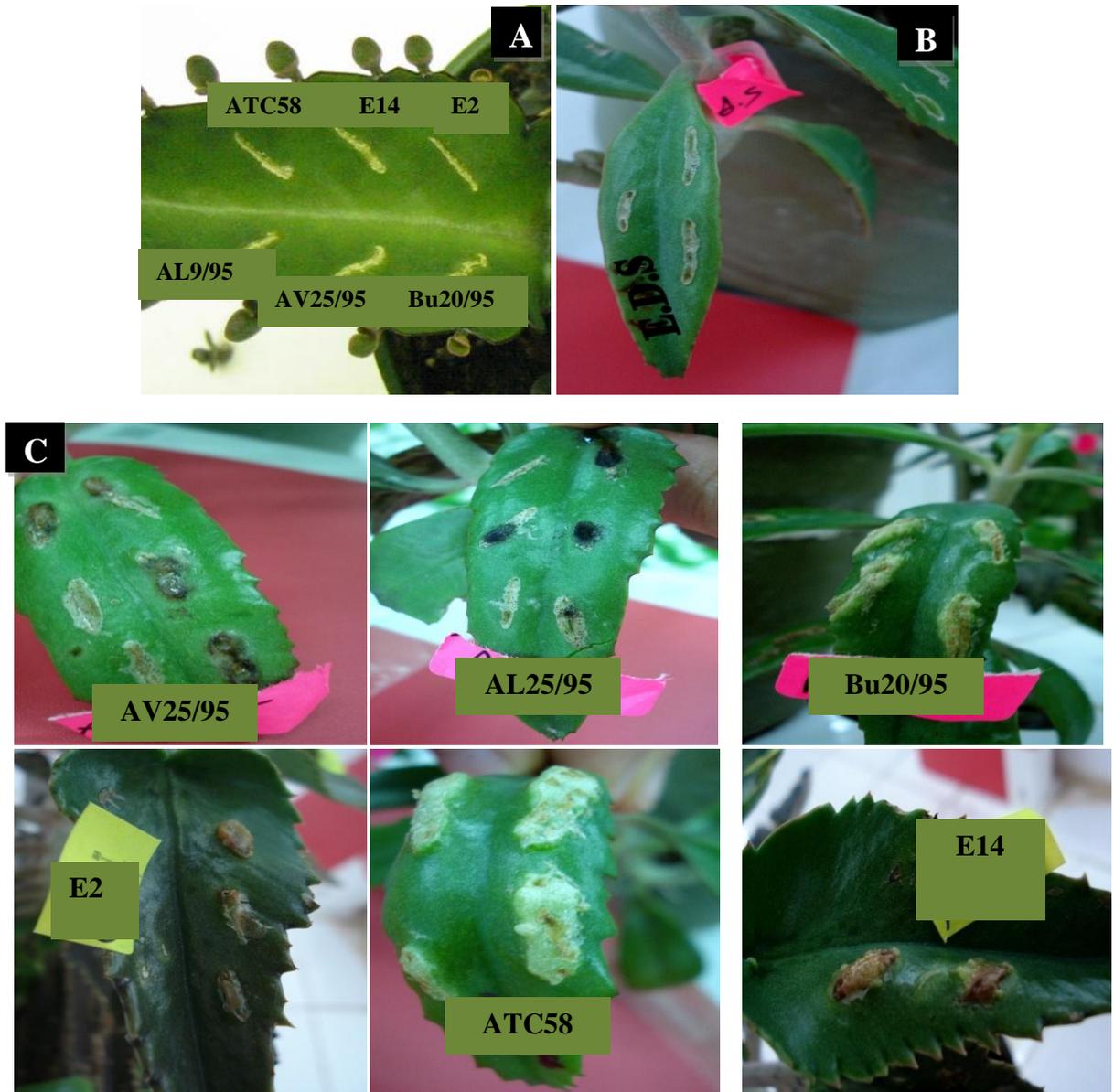
La totalité des souches d'*Agrobacterium* spp. testées pour leur pouvoir tumorigène sur le limbe foliaire de Kalanchoë (*Kalanchoë daigremantiana*) et sur les tiges des deux variétés de tomate (*Lycopersicum esculenum* cv. Marmande et cv. Saint Pierre), s'est montrée positive. La formation d'une excroissance tissulaire de type hyperplasique et hypertrophique (tumeur) au niveau du point d'inoculation a été enregistrée sur les plantes test utilisées.

Trois semaines après l'inoculation, les plants infectés par les souches E14 et C58 ont été les premières à développer les tumeurs, elles se révèlent par conséquent plus virulentes. Quatre semaines après l'inoculation, les plants ont été examinés visuellement pour l'estimation de l'incidence de l'infection. La souche E14 d'*A. tumefaciens* s'est exprimée significativement plus virulente par l'induction de tumeurs plus importantes que la souche de référence C58.

## 2.1. Inoculation des limbes foliaires de *Kalanchoë daigremontiana*

Le test de vérification du pouvoir pathogènes des souches *Agrobacterium* spp. choisies lors de cette étude ont été réalisées sur les limbes foliaires de la plante *Kalanchoe daigremontiana*, qui sont fréquemment utilisées pour vérifier la virulence d'*Agrobacterium* spp.[91].

Le test de vérification du pouvoir pathogènes des souches *Agrobacterium* spp. a été réalisé en utilisant des bactéries d'*Agrobacterium* spp. préparées à partir de cultures préalablement purifiées et âgées de 24 à 48h. Les tests de virulence ont montré que les trois souches d'*A.tumefaciens*, la souche de référence C58, E2 et E14, ainsi que la souche d'*A. vitis* souche Bu20/95, induisent la production de tumeurs sur les feuilles de *K. daigremontiana*. Ces tumeurs n'ont pas les mêmes caractéristiques, ni de taille ni de vitesse d'apparition que celles induites par la souche de référence C58 et la souche E14 d'*A.tumefaciens*. En effet, ces dernières produisent des tumeurs de taille plus importantes et plus rapidement (au bout de 15 jours) que les autres souches d'*Agrobacterium* spp. testées lors de cette étude sur les feuilles de *K. daigremontiana*. Cependant, les souches Al9/95 et Av25/95 d'*Agrobacterium vitis*, n'ont induit la formation des tumeurs sur feuilles de *Kalanchoe daigremontiana*, qu'au bout de la quatrième semaine (figure 3.4).



**Figure 3.4 :** Test de virulence des différentes souches d'*A. tumefaciens*, souche de référence C58, E2 et E14 et d'*A. vitis* souches Al9/95, Bu20/95 et Av25/95 sur des feuilles de *K. daigremontiana*. A) Photo prise avant l'inoculation. B) et C) Photo prise 21 jours après l'inoculation. Des tumeurs sont visibles après inoculations avec les souches tumorigènes et la souche de référence d'*A. tumefaciens* C58. Le témoin négatif correspond à l'inoculation par l'eau distillée stérile.

## 2.2. Inoculation des tiges de tomate

Le test de vérification du pouvoir pathogène des souches d'*Agrobacterium* spp. choisies lors de cette étude, a été réalisé aussi sur des plantules de tomate (*Lycopersicum esculenum* cv. Marmande et cv. Saint Pierre). Ces deux variétés sont fréquemment utilisées pour vérifier la virulence d'*Agrobacterium* spp, du fait que lors des expérimentations pour les agrobactéries pathogènes d'*Agrobacterium* spp., en cas de réponse positive, elles développent des tumeurs en un temps très court.

Les six souches d'*Agrobacterium* spp. testées sur les plantules de tomate avec les deux variétés : *Lycopersicum esculenum* cv. Marmande et *Lycopersicum esculenum* cv. Saint Pierre, se sont révélées pathogènes, avec formation de la tumeur (fig 3.5 et 3.6). Par rapport au témoin qui ne montre qu'une légère cicatrisation de la blessure et qui correspondait aux plantules de tomate blessées et inoculées avec de l'eau distillée stérile (fig 3.5 et 3.6).

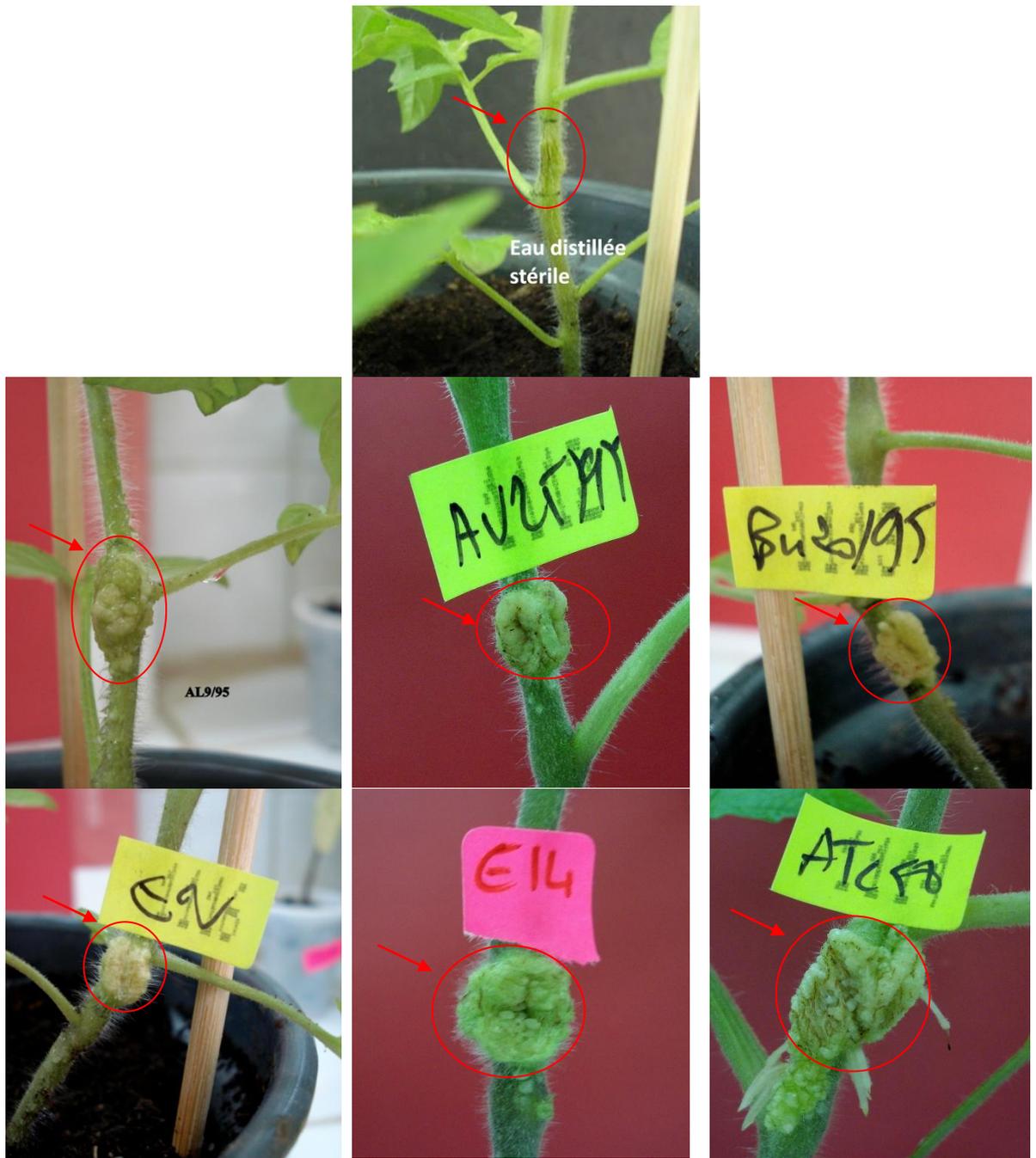
Trois semaines après l'inoculation, les plants infectés par les souches E14 et C58 ont commencé à développer des tumeurs. Environ trois (03) semaines après l'inoculation, toutes les plantules blessées et inoculées par les souches d'*Agrobacterium* spp. testées, ont induit la formations des galles au site d'inoculation.

Il est important de signaler que les plantules de tomate de la variété Saint Pierre et Marmande ont différemment réagi aux inoculations à l'égard des souches d'*Agrobacterium* spp. testées (Figure 3.6). Les plantules de la variété Saint pierre sont les premières à avoir développé les tumeurs avec des tailles importantes en un temps plus court (au bout de 3 semaines) par rapport aux plantules de tomate variété Marmande. Ce résultat nous a permis d'orienter le choix de la variété à utiliser pour le test ultérieur (antagonisme *in planta*) vu que la variété St Pierre semble plus rapide à l'infection et développe des tumeurs plus volumineuses. Ces résultats suggèrent que la variété St pierre constitue un génotype à croissance rapide.



**Figure 3.5:** Le développement des symptômes de crown gall sur les plantules de tomate de la variété Marmande.

 Tumeur au niveau de la blessure.



**Figure 3.6:** Le développement des symptômes de crown gall sur les plantules de tomate de la variété Saint pierre.

→  
○ Tumeur au niveau de la blessure.

### 3. LE TEST D'ANTAGONISME *IN VITRO*

#### 3.1. Evaluation du pouvoir antagoniste des souches endophytes

L'activité antagoniste des trente-neuf souches endophytes, isolées initialement de cinq plantes spontanées : *Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus* selon la technique décrite par Long et ses collaborateurs (2003) [77 ; 79], a été évaluée *in vitro* sur six souches bactériennes d'*Agrobacterium* spp. dont trois (3) souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, la souche de référence C58, les souches E2 et E14 initialement isolées d'*Eucalyptus occidentalis* [179], et trois autres souches d'*Agrobacterium vitis* qui sont AL9/95, AV25/95 et Bu20/95.

Les trente-neuf isolats à tester pour leur effet antagoniste ont révélé une activité très importante sur les souches d'*Agrobacterium* spp. testées, comparées au témoin négatif (spot d'eau distillé stérile).

Les mesures des zones d'inhibition ont prouvé que les souches antagonistes ont des effets intéressants contre les bactéries d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche de référence C58, sur la souche E2 et la souche E14, ainsi que sur les souches d'*Agrobacterium vitis* (AL9/95, AV25/95 et Bu20/95).

Les souches endophytes non actives n'ont montré la formation d'aucune auréole d'inhibition; par contre les souches endophytes antagonistes actives ont abouti à l'apparition d'un halo d'inhibition (fig 3.7). Les résultats présentés au tableau (3.5) montrent que les différentes souches endophytes présentent un pouvoir antagoniste à effet variable contre les six souches d'*Agrobacterium* spp. testées. Il est à noter qu'un effet antagoniste de très faible ampleur a été révélé par tous les isolats endophytes à l'égard de la souche d'*Agrobacterium vitis* AV25/95. Ces résultats suggèrent que la souche AV25/95 constitue la souche bactérienne la moins sensible et dont les diamètres de zones d'inhibition varient entre 0,00 et 30,00 mm.

L'effet antagoniste le plus intéressant est représenté par presque la totalité des souches endophytes isolées de l'espèce *Urtica dioica* vis à vis des six

souches d'*Agrobacterium* spp. testées avec des diamètres de zones d'inhibition variant entre 18,00 à 45,00 mm.

Les souches endophytes isolées des espèces *Plantago lanceolata* et *Euphorbia helioscopia*, ont montré une activité antagoniste élevée sur les six souches d'*Agrobacterium* spp. testées, avec des diamètres de zones d'inhibition moyens variant entre 19,33 à 43,33 mm.

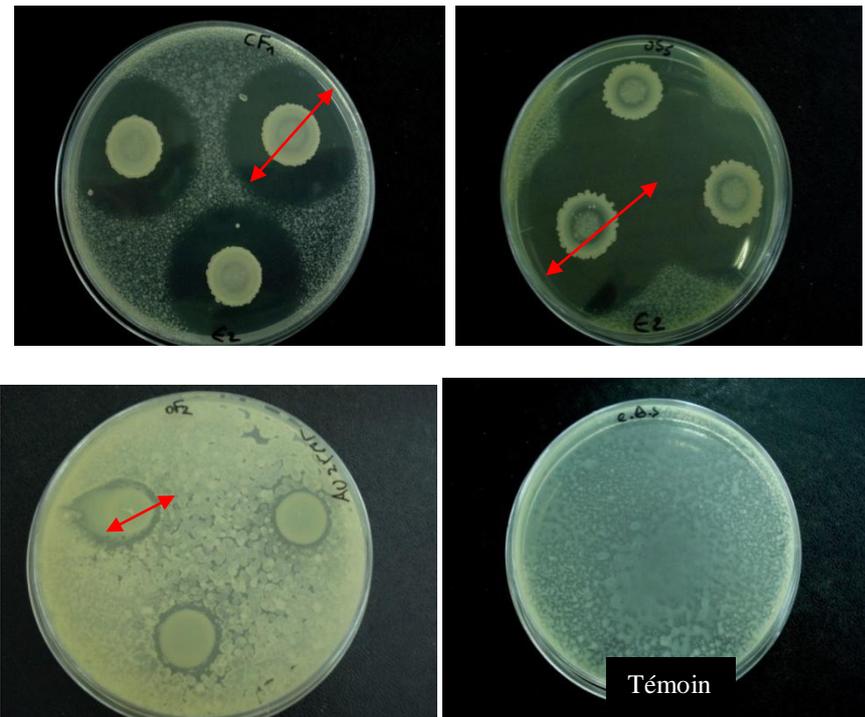
**Tableau 3.5:** Résultats des tests de sensibilité des six souches d'*Agrobacterium* spp. aux souches bactériennes antagonistes (diamètres des zones d'inhibition en mm).

**ATC58, E2 et E14 :** les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. **Bu20/95, AL9/95 et AV25/95 :** les souches d'*Agrobacterium vitis*.

**Pa2, PR1, PR2, CR1, CR2, CR3, Oa1, Oa2, Oa3, OR1, OR2, OR3, Os1, OS2, OS3, OS4, OS5, OS6, PF3, PS1, Cf1, Cf2, Cs1, OF1, EHF2, EHF3, EHF4, EHF5, EPF1, EPF4, EHA1, EHR1, EHR2, EPA4, EPR3, EPS1, EPS2, EPS3, EPS4 :** les trente-neuf souches antagonistes.

**Tableau 3.5:** Résultats des tests de sensibilité des six souches d'*Agrobacterium* spp. aux souches bactériennes antagonistes (diamètres des zones d'inhibition en mm).

Listes	ATC58	E2	E14	BU20	AL9	AV25
Oa1	23,60	0,00	0,00	21,00	19,33	0,00
Oa2	21,30	0,00	18,00	0,00	41,67	0,00
PR1	27,30	0,00	6,67	0,00	0,00	0,00
EPS3	27,30	0,00	23,33	0,00	0,00	0,00
PS1	27,00	0,00	0,00	0,00	19,33	0,00
EHF2	20,60	39,00	0,00	31,67	0,00	0,00
Pa2	35,30	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00
PF3	37,30	21,67	26,00	29,33	28,00	0,00
PR2	33,60	21,67	0,00	40,00	43,33	0,00
CR1	36,60	0,00	18,33	24,33	29,33	17,67
CR2	30,00	23,33	38,33	38,33	38,33	0,00
CR3	21,60	21,67	19,33	19,33	22,33	16,67
Cf1	30,60	39,33	36,67	31,67	41,67	23,33
Cf2	28,30	24,67	23,33	31,33	27,67	0,00
Cs1	29,30	0,00	25,00	22,67	29,33	19,33
Oa3	32,30	22,33	21,33	21,67	20,33	20,67
OR1	24,60	18,67	20,67	23,00	23,33	21,67
OR2	40,00	34,00	28,67	32,00	39,33	31,00
OR3	21,60	43,33	43,33	25,67	45,00	21,67
Os1	20,00	21,33	25,67	21,67	19,33	20,33
OS2	35,00	31,00	27,67	27,00	28,00	28,67
OS3	20,30	0,00	35,00	38,33	36,67	0,00
OS4	30,30	43,33	43,33	31,33	38,33	20,67
OS5	21,30	45,00	45,00	26,67	0,00	0,00
OS6	30,60	21,67	28,33	32,67	32,67	21,67
OF1	30,00	27,67	16,67	31,67	26,67	20,00
EHF3	20,00	34,33	34,33	29,33	28,33	19,33
EHF4	20,30	39,33	0,00	36,60	41,60	0,00
EHF5	33,00	34,67	38,33	43,33	43,33	0,00
EPF1	35,60	16,67	25,00	0,00	40,00	0,00
EPF4	37,60	42,33	40,00	33,00	39,33	19,33
EHA1	24,30	0,00	19,33	23,33	41,67	0,00
EHR1	21,00	21,33	19,33	23,33	26,00	0,00
EHR2	31,60	35,00	19,33	25,00	28,33	0,00
EPA4	24,00	19,33	19,33	38,33	23,33	33,33
EPR3	25,60	20,33	24,00	31,33	29,67	28,67
EPS1	30,00	33,33	40,00	31,33	41,67	0,00
EPS2	33,30	21,67	22,67	26,67	24,00	19,67
EPS4	32,00	28,67	26,67	30,00	27,33	0,00

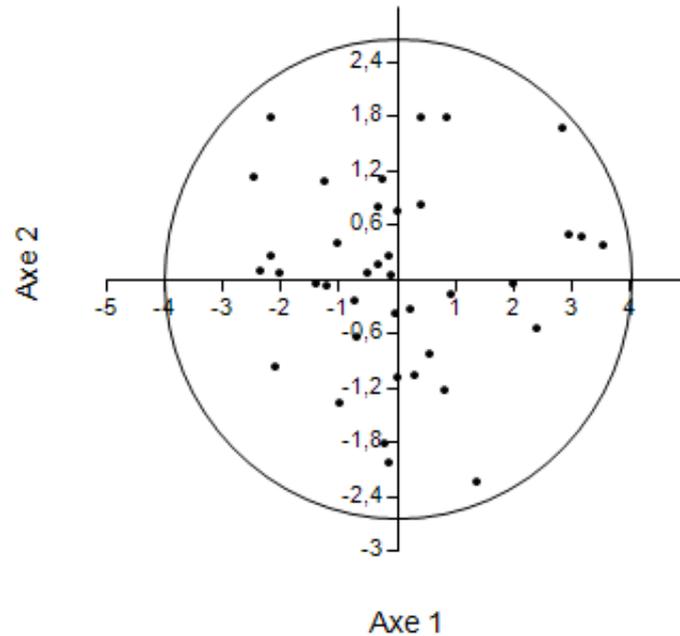


**Figure 3.7:** Pouvoir antagoniste des souches endophytes antibactérien représentés par les zones d'inhibition.

 Zone d'inhibition.

### 3.2. Etude des corrélations des souches antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp.

Une analyse en composantes principales (ACP) est utilisée pour effectuer une analyse globale des résultats du test d'antagonisme *in vitro*. Cette analyse est effectuée sur les trente-neuf souches antagonistes à l'égard des six souches d'*Agrobacterium* spp. testées. La figure 4.8 met en évidence la présence d'une corrélation positive entre les valeurs constituant la matrice des données, ceci, est vérifié par le cercle de corrélation.

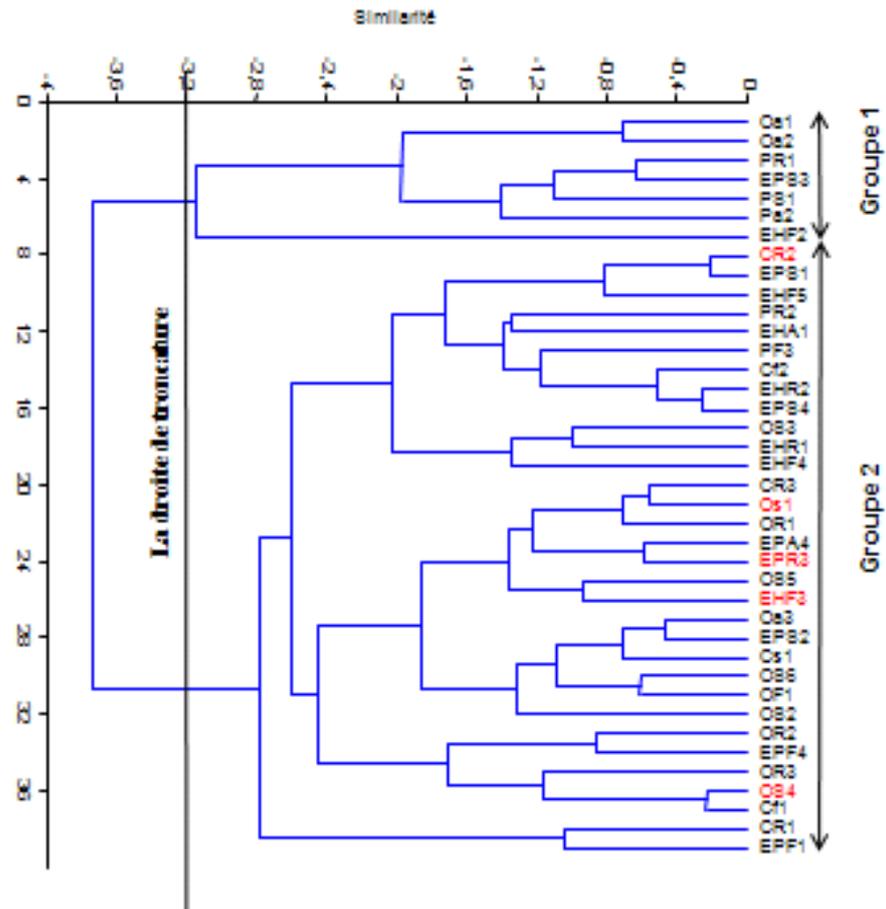


**Figure 3.8 :** Cercle de corrélation des souches antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp.

L'étude des corrélations a été réalisée sur le plan 1 et 2 (Figure 3.8) du moment qu'ils présentent une forte contribution à l'identification des nuages avec des valeurs respectives de 40,32 et 31,82.

L'axe 1 est représenté par la catégorie des souches antagonistes, qui se montrent les plus efficaces et présentent les fortes contributions. À l'opposé de cet axe, les plus faibles contributions sont représentées par les souches antagonistes de faible efficacité.

L'axe 2 est représenté par la variable des différentes souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées. Les calculs de la distance euclidienne et sur la base d'une similarité de -3,3, le cercle de corrélation (fig.3.9 et 3.10) montre la présence de deux groupes de souches antagonistes.



**Figure 3.9:** Classification ascendante hiérarchique des différentes souches antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées (calculée par le biais des distances euclidiennes).

Le premier groupe prend en compte principalement : Oa1, Oa2, PR1, EPS3, Ps1, EHF2, Pa2 et qui correspond aux souches endophytes isolées d'*Urtica dioica*, *Plantago lanceolata* et d'*Euphorbia peplus*. Ce groupe est corrélé négativement avec les vecteurs, c'est-à-dire avec les souches d'*Agrobacterium* spp. testées. Ce premier groupe est caractérisé par une absence et/ou une faible action antibactérienne envers les six souches d'*Agrobacterium* spp. testées.

Une absence de l'effet antagoniste est révélée par l'absence des zones d'inhibition (0 mm) représentée, par exemple, par toutes les souches endophytes de ce premier groupe (Oa1, Oa2, PR1, EPS3, Ps1, EHF2, Pa2) sur la souche

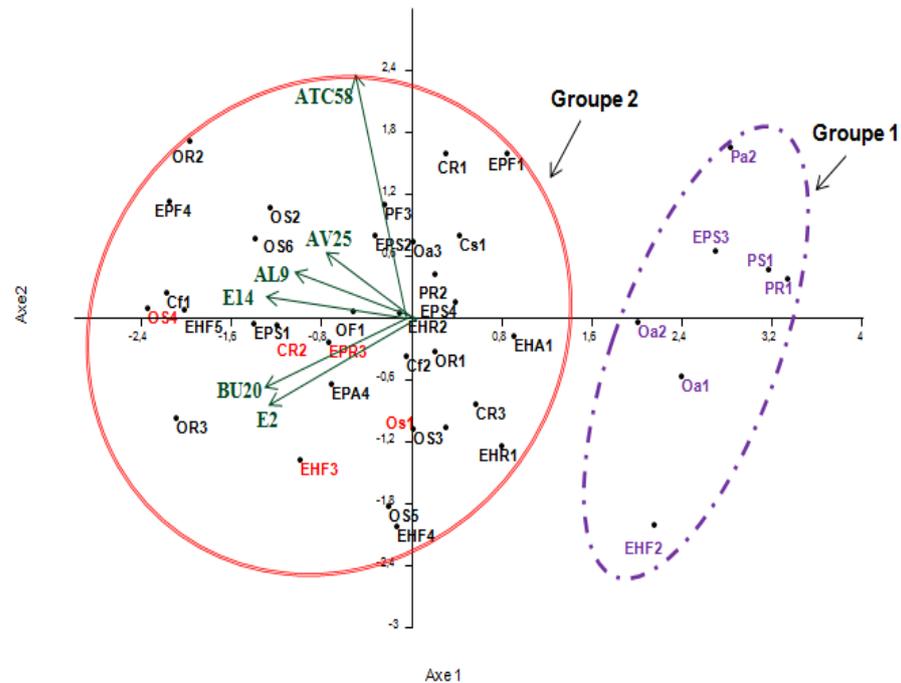
d'*Agrobacterium vitis* AV25/95 (tableau 3.5). Une faible action antagoniste est représentée par des faibles diamètres de zones d'inhibition, dont la plus faible est de 6,67 mm représentée par la souche antagoniste PR1 envers la souche E14 d'*Agrobacterium tumefaciens*, alors que la forte et la plus importante zone d'inhibition est de 41,67 mm, a été marquée par la souche antagoniste Oa2 seulement sur la souche AL9/95 d'*Agrobacterium vitis* (tableau 3.5 ; Figure 3.7).

Le deuxième groupe (II), est corrélé positivement avec les différents vecteurs. Il est représenté par les souches antagonistes isolées initialement de cinq plantes spontanées : *Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus* [77], qui sont corrélés positivement avec les six souches d'*Agrobacterium* spp. testées. Ce groupe est défini par les souches antagonistes à forte action antibactérienne contre toutes les souches d'*Agrobacterium* spp. testées, qui sont la souche de référence d'*Agrobacterium tumefaciens* C58, la souche E2 et la souche E14, les souches d'*Agrobacterium vitis* qui sont AL9/95 et Bu20/95, manifestement les plus sensibles (fig. 3.10).

Tous les vecteurs (les souches d'*Agrobacterium* spp. testées) occupent une zone assez restreinte à l'intérieur du cercle de corrélation. L'angle maximum entre les deux vecteurs est inférieur à 90°. Ceci suggère que tous les vecteurs sont corrélés positivement entre eux, ce qui confirme que toutes ces souches sont sensibles aux souches antagonistes (Fig. 3.10).

Les vecteurs ATC58, AV25, AL9 et E14 sont corrélés positivement à l'axe 1 et négativement à l'axe 2 et l'angle entre ces vecteurs est inférieur à 45°, ce qui signifie que les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* souche C58 et E14, *Agrobacterium vitis* souche AV25/95 et AL9/95, sont toutes sensibles aux souches antagonistes.

Les vecteurs BU20 et E2 sont corrélés négativement aux axes 1 et 2 ainsi que l'angle entre ces deux vecteurs est inférieur à 45°, ce qui signifie que ces deux bactéries: *Agrobacterium tumefaciens* souche E2 et *Agrobacterium vitis* souche Bu20/95 agissent de la même manière sous l'effet des souches antagonistes.



**Figure 3.10:** Analyse en Composantes Principales (ACP) des six souches d'*Agrobacterium* spp. testées.

**ATC58:** *Agrobacterium tumefaciens* souche C58, **AV25 :** *Agrobacterium vitis* souche Av25/95, **AL9 :** *Agrobacterium vitis* souche AL9/95, **E 14:** *Agrobacterium tumefaciens* souche E14, **BU20:** *Agrobacterium vitis* souche Bu20/95, **E 2 :** *Agrobacterium tumefaciens* souche E2.

#### 4. ESSAI DE BIOPROTECTION DE LA TOMATE CONTRE LA GALLE DU COLLET *IN PLANTA* PAR L'UTILISATION DES BACTERIES ANTAGONISTES ENDOPHYTES SELECTIONNEES

Le test d'antagonisme *in planta* s'est réalisé sur les plantules de tomate, variété Saint pierre, inoculé avec cinq souches d'endophytes bactériennes appartiennent toutes au deuxième groupe c'est à dire au groupe des souches antagonistes à forte activité antibactérienne contre toutes les souches d'*Agrobacterium* spp. testées.

##### 4.1. Pouvoir antagoniste des souches endophytes contre la galle du collet

Les résultats obtenus nous ont permis de constater une diminution et parfois même une absence totale de symptômes du crown gall au niveau des

plantules de tomate trempés au préalable, dans la suspension bactérienne d'endophyte antagoniste comparés aux témoins négatifs qui correspond aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium spp.* ou trempées dans l'eau distillée stérile (fig. 3.11 et 3.12).

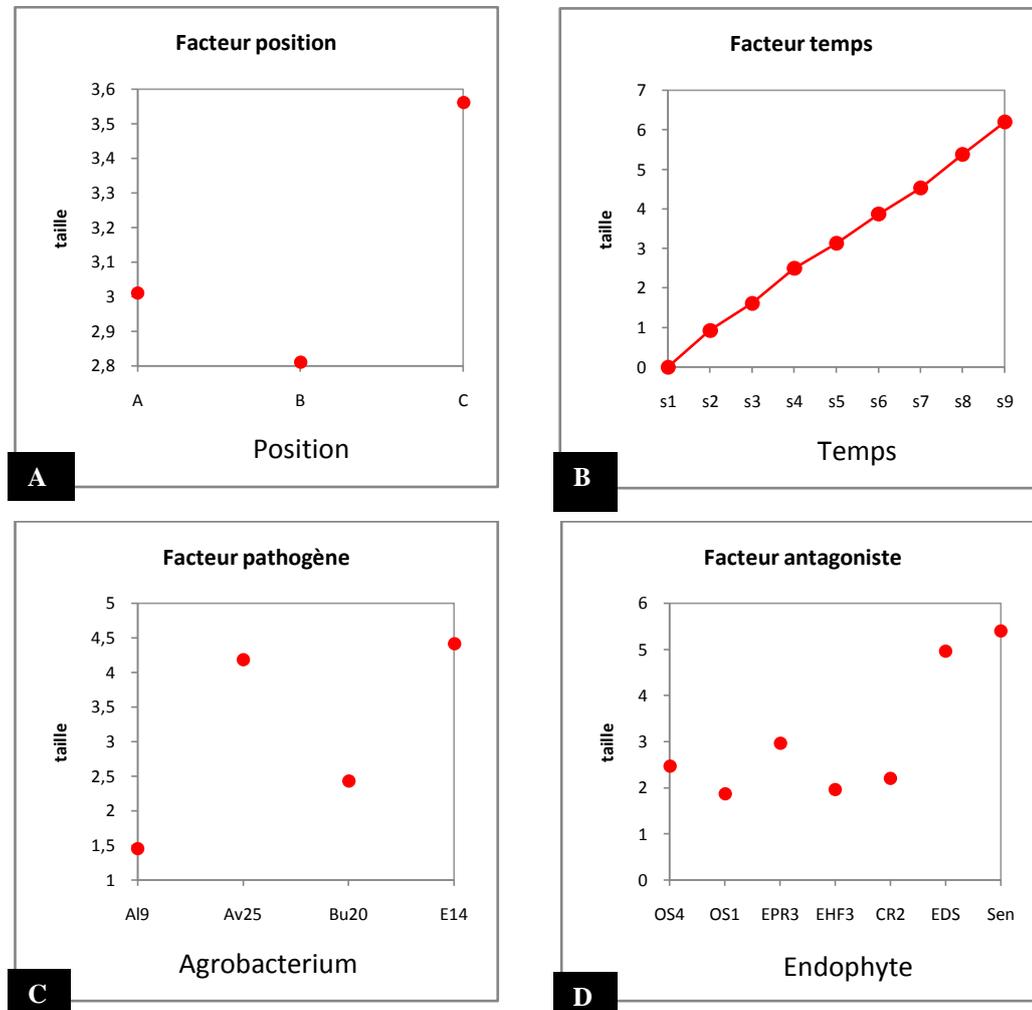
L'application du modèle ANOVA pour les 2268 données (tableau 3.6), a permis de déduire que les effets antagonistes des souches endophytes testées sont hautement significatifs selon les différentes souches d'*Agrobacterium spp.* choisies lors de cette étude, en fonction du temps et la position des blessures sur les tiges des plantules, la souche d'*Agrobacterium spp.* inoculée et enfin la souche endophyte testée (P=0,000).

**Tableau 3.6:** Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d'*Agrobacterium spp.* sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de tomates testées (en fonction du temps, position des blessures).

Source	Somme des carrés	d.d.l	Carrés moyens	F-ratio	P
Endophyte	<b>235.817</b>	<b>4</b>	<b>589.54</b>	<b>87.862</b>	<b>0.000</b>
Agrobacterium	<b>2779.266</b>	<b>3</b>	<b>926.422</b>	<b>1380.684</b>	<b>0.000</b>
Temps	<b>4197.667</b>	<b>8</b>	<b>524.708</b>	<b>781.994</b>	<b>0.000</b>
Position	<b>105.011</b>	<b>2</b>	<b>52.506</b>	<b>78.251</b>	<b>0.000</b>
Endophyte*Agrobacterium	<b>356.780</b>	<b>12</b>	<b>29.732</b>	<b>44.310</b>	<b>0.000</b>
Endophyte*Temps	<b>122.883</b>	<b>32</b>	<b>3.840</b>	<b>5.723</b>	<b>0.000</b>
Endophyte*Position	<b>125.668</b>	<b>8</b>	<b>15.708</b>	<b>23.411</b>	<b>0.000</b>
Agrobacterium*Temps	<b>1354.417</b>	<b>24</b>	<b>56.434</b>	<b>84.106</b>	<b>0.000</b>
Agrobacterium*Position	<b>390.051</b>	<b>6</b>	<b>65.008</b>	<b>96.885</b>	<b>0.000</b>
Temps*Position	<b>57.033</b>	<b>16</b>	<b>3.565</b>	<b>5.312</b>	<b>0.000</b>

Le tableau 3.6 indique que les souches antagonistes testées ont un effet inhibiteur très important sur l'apparition des symptômes du crown gall causés par les souches pathogènes d'*Agrobacterium spp.* testées, vu qu'elles présentent des valeurs très hautement significatives (P= 0,000).

À travers les résultats obtenus, nous avons aussi constaté que les interactions entre les bactéries antagonistes et les pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées en fonction du temps et de la position de la blessure, se présentent comme hautement significatives (tableau 3.5).



**Figure 3.11:** Effets des souches antagonistes en fonction du temps et de la position des blessures, sur les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées.

**A** ; taille des tumeurs en fonction de la position de la blessure (Position A : au niveau de la partie supérieure de la tige, position B : au milieu de la tige et position C : au niveau du collet),

**B** ; taille des tumeurs en fonction du temps,

**C** ; taille des tumeurs en fonction des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées (AL9/95, AV25/95, Bu20/95 et E14),

**D** ; taille des tumeurs en fonction des souches antagonistes testées (Les bactéries antagonistes : OS4, EPR3, EHF3, CR2, EDS : eau distillée stérile, Sen : plantules non inoculées ni par l'eau distillée stérile ni par les bactéries antagonistes, sont alors les plantules sans endophytes et inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium* spp).

Le choix de la souche antagoniste à tester influence d'une façon prépondérante sur sa prédisposition à l'installation des symptômes de la galle du collet, où chaque plantules répond de manière différente aux traitements subis ( $P=0,000$ ).

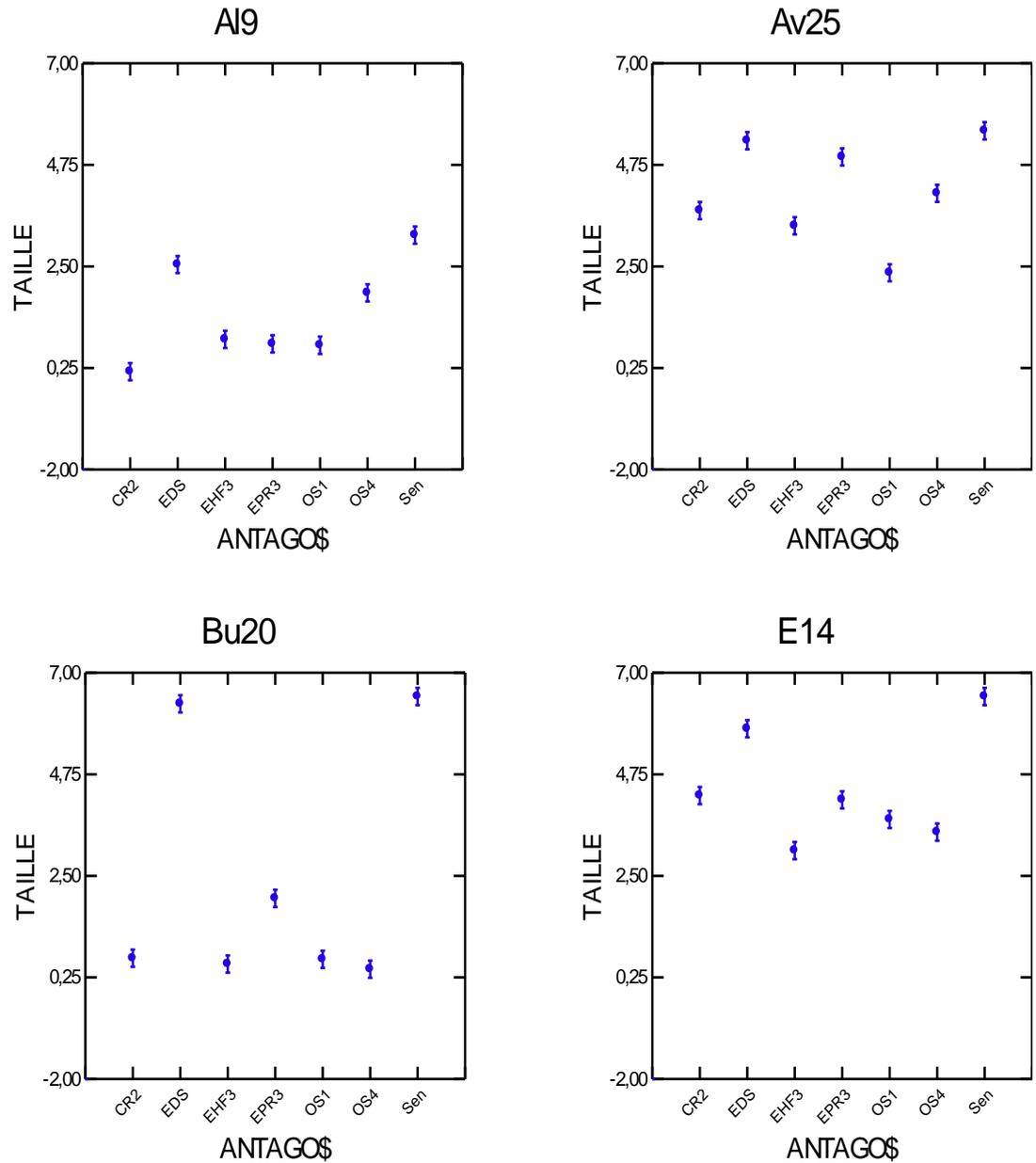


**Figure 3.12:** Réponses des plantules de tomate aux différents traitements (plante inoculée avec l'eau distillée stérile, plante trempée dans la souche antagoniste, plante trempée dans les souche antagonistes puis inoculée par les souches d'*Agrobacterium* spp., et plante inoculée directement par les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp).

Les cinq (05) souches antagonistes à savoir : OS1, OS4, EPR3, EHF3 et CR2, choisies pour confirmer si l'effet antagoniste prometteur présenté par ces souches bactériennes contre les souches phytopathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées *in vitro*, pourraient nous servir dans la bioprotection de la tomate contre le crown gall *in situ*. En effet, les cinq souches antagonistes ont réussi à produire le même effet que celui produit *in vivo* (figure 3.11.D).

Cet effet antagoniste confirmé *in planta* est très important, il s'est traduit soit par l'absence de tumeurs aux points d'inoculation ou par la formation des tumeurs de faible taille. L'ensemble des souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. inoculées sur les plantules de tomate après trempage dans les souches antagonistes, ont développé des tumeurs qui ne dépassent pas les 3 mm de taille comparées aux plantules qui n'étaient pas traitées par les souches antagonistes ou bien les plantules qui ont été traitées par l'eau distillée stérile. Ces dernières ont développé des tumeurs de taille qui dépassent en moyenne 5,5 mm de diamètre.

Les souches antagonistes OS1, EHF3 et CR2 se sont révélés les plus efficaces où la taille des tumeurs n'a pas dépassé les 2 mm de diamètre. Cependant, à travers les résultats obtenus, nous avons remarqué que les plantules de tomate traitées au préalable par les souches antagonistes OS4 et EPR3 étaient les moins efficaces par rapport aux autres antagonistes utilisées au cours de cette étude. Les deux souches antagonistes (OS4 et EPR3) étaient les plus actives du fait qu'elles ont pu enregistrer lors du test d'antagonisme *in vitro* des pics maximum des zones d'inhibition dépassant les 40 mm après 24 h, contrairement aux résultats du test d'antagonisme *in planta* dont ces deux souches étaient les moins efficaces car la taille des tumeurs a dépassé les 2 mm de largeur (Figure 3.12). Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs intrinsèques à la plante ont manifesté un effet négatif lors de l'essai *in vivo*.

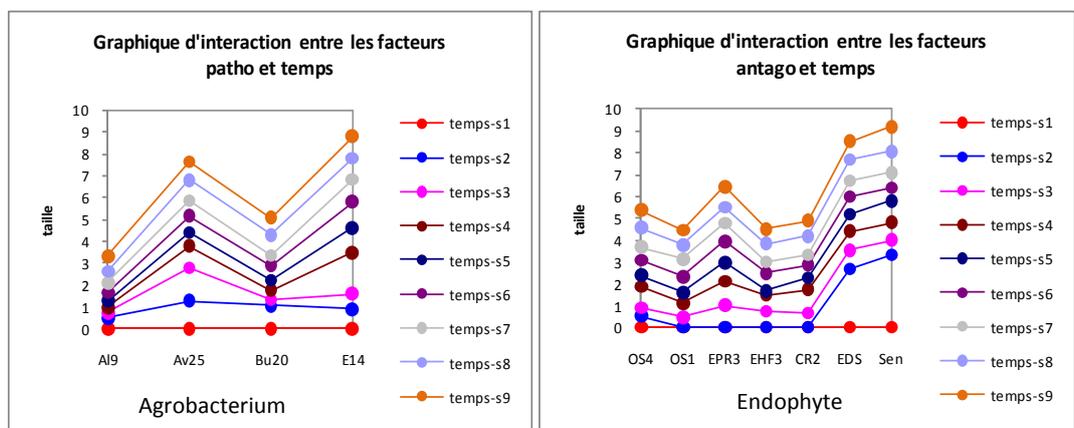


**Figure 3.13** : Effet du trempage des plantules de tomate dans la suspension bactérienne antagoniste sur l'expression de la virulence des souches d'*Agrobacterium* spp. testées (taille des tumeurs).

**Al** : souche AL9/95 d'*Agrobacterium vitis*,  
**Av** : souche AV25/95 d'*Agrobacterium vitis*,  
**Bu** : souche BU20/95 d'*Agrobacterium vitis*,  
**E14** : souche E14 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Il est important de signaler que toutes les souches antagonistes utilisées au cours de l'étude de l'antagonisme *in planta* ont montré un effet antagoniste révélé par la diminution et parfois même une absence totale des symptômes du crown gall. Parallèlement, nous avons pu également constater que ces souches antagonistes, ont retardé la formation et l'induction des tumeurs au niveau des plantules de tomate trempées au préalable, dans la suspension bactérienne d'endophyte, comparés aux témoins positifs qui correspondent aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium* spp. ou bien aux témoins négatifs, pour lesquels les plantules sont trempées dans l'eau distillée stérile.

La formation des tumeurs a été induite à la deuxième semaine après l'inoculation par rapport aux plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'endophyte, qui ont parfois développé des tumeurs à partir de la 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> semaine. Un effet retardé s'est manifesté et a permis d'influencer la virulence des souches d'*Agrobacterium* spp. L'exemple typique concernant cet effet est généré par la souche E14 d'*Agrobacterium tumefaciens*, qui est la plus sévère, ou l'induction des tumeurs a été observée à la 2<sup>ème</sup> semaine pour les plantules inoculées directement avec la souche E14 et à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine pour les plantules trempées dans la suspension bactérienne d'antagonisme : OS4, OS1, EPR3 et EHF3 et à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine pour les plantules trempées dans la suspension bactérienne d'antagonisme CR2 (figure 3.14).



**Figure 3.14:** Des graphes représentant l'effet du trempage des plantules de tomate dans la suspension des bactéries antagoniste sur l'expression des

souches d'*Agrobacterium* spp. en fonction du temps (**S1** : correspond à la première semaine, **S9** : correspond à la neuvième semaine).

4.2. Effet du trempage des plantules de tomate dans la suspension bactériennes d'antagonisme sur l'expression de la virulence des souches d'*Agrobacterium* spp. testées (par rapport au poids des tumeurs)

Les résultats obtenus nous ont permis de constater une diminution du poids et parfois une absence totale des tumeurs au niveau des plantules de tomate trempées au préalable, dans la suspension bactérienne d'endophyte, comparés aux témoins positifs qui correspondent aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium* spp. ou aux témoins négatifs trempées dans l'eau distillée stérile.

L'application du modèle ANOVA pour les 253 données (tableau 3.7), a permis de déduire que les effets antagonistes des souches endophytes testées sont hautement significatifs selon les différentes souches d'*Agrobacterium* spp. choisies en considérant le poids des tumeurs comme un facteur de la virulence.

Le pouvoir antagoniste des souches endophytes est statistiquement significatif en fonction du la position des blessures sur les tiges des plantules, la souche d'*Agrobacterium* spp. inoculée et enfin la souche endophyte testée (P=0,000).

**Tableau 3.7:** Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d'*Agrobacterium* spp. sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de tomates testées par rapport au poids des tumeurs et en fonction de la position des blessures.

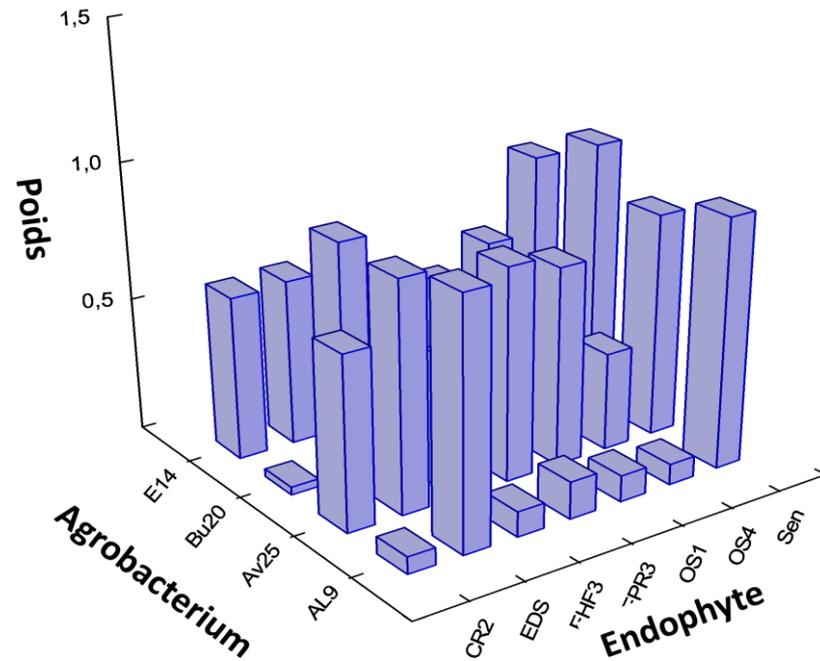
Source	Somme des carrés	d.d.l	Carrés moyens	F-ratio	P
Endophyte	<b>58.17</b>	<b>6</b>	<b>2.531</b>	<b>109.239</b>	<b>0.000</b>
Agrobacterium	<b>2779.266</b>	<b>3</b>	<b>2.018</b>	<b>87.128</b>	<b>0.000</b>
Position	<b>105.011</b>	<b>2</b>	<b>52.506</b>	<b>78.251</b>	<b>0.000</b>
Endophyte*Agrobacterium	<b>356.780</b>	<b>12</b>	<b>29.732</b>	<b>44.310</b>	<b>0.000</b>

Endophyte*Position	<b>125.668</b>	<b>8</b>	<b>15.708</b>	<b>23.411</b>	<b>0.000</b>
Agrobacterium*Position	<b>390.051</b>	<b>6</b>	<b>65.008</b>	<b>96.885</b>	<b>0.000</b>
Temps*Position	<b>57.033</b>	<b>16</b>	<b>3.565</b>	<b>5.312</b>	<b>0.000</b>

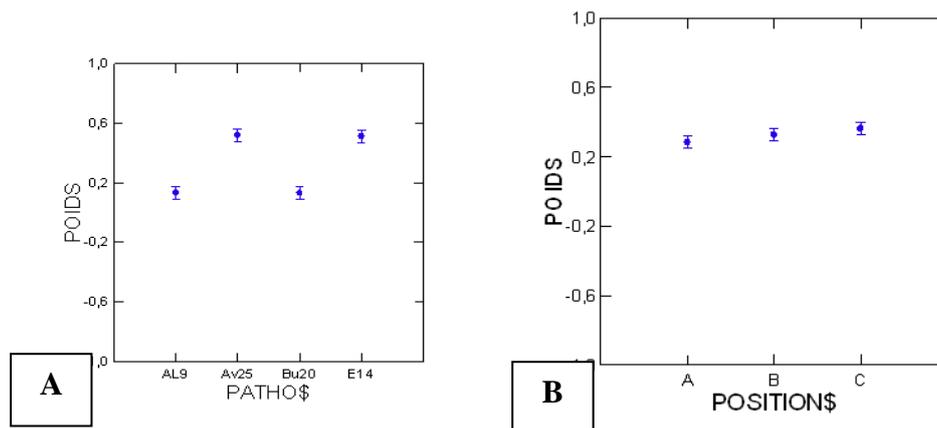
D'après la figure 3.15, nous constatons que les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées, réagissent différemment à l'égard d'une souche antagoniste à une autre. Les résultats révèlent une activité antagoniste importante des souches endophytes vis-à-vis des souches d'*Agrobacterium* spp. testées.

L'ensemble des souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. inoculées sur les plantules de tomate après trempage dans les souches antagonistes, ont développé des tumeurs qui ne dépassent pas les 0,5g de poids comparées aux plantules qui n'étaient pas traitées par les souches antagonistes ou bien les plantules qui ont été traitées par l'eau distillée stérile. Ces dernières ont développé des tumeurs de taille qui dépasse en moyenne 1g.

La formation des tumeurs a été induite à la deuxième semaine après l'inoculation par rapport aux plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'endophyte, qui ont parfois développé des tumeurs à partir de la 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> semaine. Un effet retardé s'est manifesté et a permis d'influencer la virulence des souches d'*Agrobacterium* spp. L'exemple typique concernant cet effet est généré par la souche E14 d'*Agrobacterium tumefaciens*, qui est la plus sévère, où l'induction des tumeurs a été observé à la 2<sup>ème</sup> semaine pour les plantules inoculées directement avec la souche E14 et à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine pour les plantules trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste : OS4, OS1, EPR3 et EHF3 et à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine pour les plantules trempées dans la suspension bactérienne d'antagonisme CR2.



**Figure 3.15:** Effet antagoniste des souches endophytes utilisées sur les souches d'*Agrobacterium* spp.



**Figure 3.16:** Effets des souches antagonistes, en fonction de la position des blessures, sur l'expression des souches d'*Agrobacterium* spp. testées (poids des tumeurs).

**A** ; poids des tumeurs en fonction des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées (AL9/95, Av25/95, Bu20/95 et E14, **B** ; taille des tumeurs en fonction de la position de la blessure (Position A : au niveau de la partie supérieur de la tige, position B : au milieu de la tige et position C : au niveau du collet).

Le prétraitement des plantules de tomate avec les bactéries antagonistes OS1, OS4, EPR3, EHF3 et CR2 a fourni un effet protecteur qui a empêché et/ou diminué le développement de la maladie provoquée par les pathogènes *A. tumefaciens* et *A. vitis*.

L'effet protecteur des souches antagonistes (OS1, OS4, EPR3, EHF3 et CR2) a été évalué en terme de développement et /ou la suppression d'induction des tumeurs, qui ont été clairement absentes ou légèrement développées sur les sites de blessure infectés par le pathogène. Nous observons à travers les expériences d'antagonismes *in planta* une réduction de la maladie du crown gall statistiquement significative chez les plants traités par les bactéries antagonistes par rapport aux plants témoins, et on suppose que cette réduction est due à une induction d'une résistance systémique par les bactéries antagonistes.

## Chapitre 4: **DISCUSSION**

Au cours de ce travail de mémoire, nous avons abordé une contribution à l'étude du pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta* d'une collection de bactéries endophytes à l'égard des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. Deux objectifs conjoints ont été menés tout au long de ce travail. Le premier concernait l'identification biochimique et moléculaire et la sélection de souches endophytes antagonistes envers des souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. Le second, a été de tenter de trouver un éventuel pouvoir antagoniste *in vitro* d'une collection de souches endophytes à l'égard de souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp, confirmé par la suite *in planta*. Ces objectifs ont été conduits dans le but ultime de rechercher des agents de lutte induisant une résistance systémique chez les végétaux atteints de maladies bactériennes.

### **1- DIVERSITE DES ENDOPHYTES ANTAGONISTES IDENTIFIES**

Au cours de l'étude préliminaire, nous avons choisi d'analyser trente-neuf (39) isolats de bactéries endophytes, isolées initialement de cinq plantes spontanées au laboratoire de phytobactériologie [77]. Ces isolats ont subi une identification préliminaire biochimique puis moléculaire. La sélection de ces organismes s'est faite sur la base de leur antagonisme *in vitro* à l'égard d'une collection de souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Agrobacterium vitis*. Les isolats endophytes sélectionnés pour le pouvoir antagoniste sont ceux ayant produit des zones d'inhibition supérieures à 20 mm envers la souche de référence C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* [77]. Aussi, la nécessité de trouver des organismes de lutte biologique non pathogènes efficaces sur le crown gall, nous a menés à l'étude de leur pouvoir pathogène sur le tabac.

L'identification de ces isolats endophytes a été faite en premier par leur caractérisation morphologique, en se basant sur les traits cultureux; taille (diamètre de la colonie), couleur, forme, le taux de croissance et la régularité ou

l'irrégularité du contour. Cette dernière étude a montré une grande variation dans la morphologie, la couleur, la forme et la taille des colonies des isolats endophytes. Il est important de rappeler que ces traits culturels sont insuffisants pour l'identification mais nous ont permis de regrouper et d'identifier ces isolats sur la base de caractères morphologiques macroscopiques. La caractérisation morphologique est une étape qui reste nécessaire pour différencier ces organismes, car elle donne une indication sur la variation entre les isolats des bactéries endophytes [59].

L'observation microscopique de la coloration de Gram, met en évidence une caractéristique structurale des parois bactériennes. La coloration de Gram effectuée sur les trente neuf (39) isolats endophytes, a permis en premier lieu de les répartir en deux groupes, dix-sept (17) étaient des bactéries à Gram positif alors que les vingt-deux (22) isolats sont affiliés aux Gram négatif. Les bactéries à Gram négatif ont été légèrement dominantes, ce qui présente 56, 41% du total des isolats.

Nos résultats sont en concordance avec plusieurs travaux, qui ont rapporté une légère prédominance endophytique des bactéries à Gram négatif dans les tissus de diverses plantes [82]. Toutefois, Zinniel et *al.* (2002) indiquent une présence égale entre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif [105].

En complément à cette étude morphologique, il était nécessaire de procéder à l'étude biochimique et aussi à l'étude moléculaire pour ces bactéries endophytes, d'autant plus que l'identification de tous les microorganismes devrait faire appel à la caractérisation moléculaire [106 ; 107]. La caractérisation biochimique des trente neuf isolats endophytes antagonistes a révélé la présence de 12 profils, ce qui révèle la variabilité phénotypique et une diversité métabolique de ces organismes endophytes.

Les dix-sept isolats des bactéries à Gram positif, comportent neufs profils biochimiques, dont, le profils 3, 4 et 9 ont été ultérieurement caractérisés en tant que membres du genre *Bacillus* sp., du fait qu'ils possèdent les caractéristiques morphologiques des colonies et les caractéristiques biochimiques du genre

*Bacillus* sp (grand bacilles, catalase positive, dégradation du glucose). Cependant, les vingt-deux isolats restants, sont des bactéries à Gram négatif, avec sept souches classés comme membres du genre *Pseudomonas* sp., sur la base des caractéristiques générales, comme la production de pigments fluorescents sur KB, la production d'oxydase et la présence de catalase.

Les résultats de l'étude moléculaire basés sur l'analyse de la séquence de l'ADN ribosomal 16S, nous ont permis de dégager deux genres majeurs, à savoir le *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp et l'espèce *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.*beticola*.

Le premier genre *Bacillus* spp. est représenté par les espèces endophytes identifiées comme *Bacillus cereus* regroupant OR1, OS1 et EHR1, *Bacillus amyloliquefaciens* représenté par OR2 et OS4, *Bacillus pumilus* pour la souche OS2 et *Bacillus subtilis* pour EHF5. Les souches CR1 et PF3 ont été aussi définies en tant que membres de ce dernier genre.

Cependant les souches EPR3, PS1 et CR2 ont été identifiées comme des membres du second genre en l'occurrence, *Pseudomonas* spp. Alors que la souche EHF3 est une *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.*beticola*. Cette dernière bactérie a été décrite pour la première fois par Yong-Fang Chen and Yan-Ni Yin (2007) [181], causant la maladie des taches foliaires sur la betterave sucrière, cette maladie a été découverte en 1995 en Chine. L'agent pathogène est une bactérie à Gram-positive, présentant les caractéristiques de type ; petits bâtonnets irréguliers, à flagelles latéraux, aérobies, et catalase positive [181].

D'une manière générale, nous pouvons avancer que les caractérisations aussi bien morphologiques, chimiques que moléculaires, sont donc complémentaires et en se basant sur nos propres constatations, il est mis à l'évidence que l'une n'exclut pas l'autre. L'étude moléculaire nous a permis d'identifier deux genres majeurs très importants à savoir le genre *Bacillus* sp. et le genre *Pseudomonas* sp. Nos résultats corroborent avec maintes données bibliographiques qui rapportent ces deux genres comme des organismes endophytes d'un certain nombre d'espèces végétales. En effet, les microorganismes du genre *Pseudomonas* et *Bacillus*, sont généralement des

bactéries telluriques, et peuvent même coloniser les tissus des plantes [182], connues pour leur effet antagoniste et leur pouvoir protecteur sur un grand nombre de cultures [4 ; 61].

Parmi les rhizobactéries, les *Pseudomonas* ont suscité un grand intérêt. Elles sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro* [108]. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores [109].

Les espèces du genre *Bacillus* ont été également choisies pour leur pouvoir antagoniste envers plusieurs bactérioses. Leur capacité à produire un grand nombre d'antibiotiques et de métabolites antifongiques les a placées parmi les rhizobactéries les plus utilisées en lutte biologique [110; 61]. Dans le sol, les *Pseudomonas* spp. représentent une fraction non négligeable de la communauté microbienne, partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique [90 ; 111].

Cependant, les bactéries du genre *Curtobacterium* ont été déjà isolées comme des endophytes de nombreuses cultures, notamment du trèfle rouge [112], du riz, de la pomme de terre, d'igname [62], des plantes spontanées de prairie [105], et d'agrumes [113]. Plusieurs rapports ont indiqué que les espèces ; *Curtobacterium luteum* et *Curtobacterium flaccumfaciens* peuvent être utilisées comme des agents de lutte biologique contre de nombreux pathogènes et peuvent opérer soit par le déclenchement de la résistance systémique induite ou par antibiose [114].

Ces données bibliographiques ainsi que nos résultats de l'étude moléculaire, nous ont encouragés à exploiter ces espèces d'endophytes identifiées du fait qu'elles figurent parmi les genres les plus utilisés en lutte

biologique. Parallèlement, pour remédier à la difficulté de lutter contre certaines agrobactéries tumorigènes, nous avons essayé de vérifier si l'antagonisme des espèces de *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Curtobacterium* pourrait nous servir dans la bioprotection de la tomate contre la galle du collet causée par les espèces d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*A. vitis*.

## **2-POUVOIR PATHOGENE CRYPTIQUE DE QUELQUES ENDOPHYTES ANTAGONISTES**

La réalisation du test de la réaction d'hypersensibilité sur tabac était nécessaire pour les souches endophytes, avant toute utilisation pour les tests d'antagonisme *in planta* et leur exploitation en tant qu'agents de lutte biologique. En effet, si la réaction d'hypersensibilité sur le tabac se révèle positive; le microorganisme endophyte se doit d'être écarté, car son exploitation devient impossible tenant compte de son pouvoir pathogène.

Le test de la réaction d'hypersensibilité effectué sur le tabac a permis d'écarter 9 souches endophytes causant des symptômes de nécrose sur un total de 39 souches, indiquant ainsi leur pouvoir pathogène. Par conséquent, les 30 souches retenues ont été incapables d'induire la nécrose sur les feuilles de tabac [86].

Dans le cas des bactéries phytopathogènes, l'apparition de la maladie résulte de l'infection par le pathogène d'une plante dite hôte au cours d'une réaction dite compatible. Par contre, si une bactérie pathogène attaque une plante non hôte au cours d'une réaction incompatible, celle-ci met en place un système de résistance très efficace dite réaction hypersensible (RH).

Il est à noter que la souche EHF3, identifiée comme une *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola*, cette dernière est responsable de la maladie des taches foliaires de la betterave sucrière. Cet agent pathogène a révélé une réponse négative lors du test d'hypersensibilité sur tabac. Cette réponse négative est due au fait que le tabac constitue une plante non-hôte pour cette bactérie. En effet, la classification et la nomenclature pathovar sont basées sur la capacité de

ces bactéries phytopathogènes à causer des symptômes distinctifs ou par référence à leur gamme d'hôtes prouvées [63].

### **3- LES BACTERIES ENDOPHYTES DES PLANTES SPONTANÉES SÉLECTIONNÉES, SONT EFFICACES *IN VITRO* ET *IN PLANTA* CONTRE LE CROWN GALL CAUSE PAR LES *AGROBACTERIUM* SPP.**

A la lumière des données discutées plus haut, nous avons choisi de traiter dans la deuxième partie de ce travail l'aspect antagonisme *in vitro* et *in vivo* par utilisation des isolats endophytes vis-à-vis de trois espèces d'*Agrobacterium tumefaciens* (C58, E14 et E2) et trois autres espèces d'*Agrobacterium vitis* (AL9/95, Bu20/95 et AV25/95). Les agrobactéries virulentes du genre *Agrobacterium* sont de redoutables parasites pour un grand nombre de végétaux, ces agrobactéries tumorigènes sont difficiles à contrôler une fois la plante transformée, car la tumeur se développe même si la bactérie n'est plus présente [64].

La gravité de ces dégâts a incité le déploiement de grands efforts pour trouver des moyens de lutte adéquats et efficaces. La chimiothérapie dispose d'un arsenal varié de matières actives, souvent efficaces si elles sont employées à bon escient [108]. Toutefois, ce traitement rencontre rapidement des limites en raison de nombreux désavantages liés aux phénomènes de pollution, à la phytotoxicité, au déséquilibre biologique et surtout au risque de sélection de souches résistantes aux fongicides. Ces entraves ont mené les chercheurs à s'intéresser aux mécanismes de lutte naturelle. Les techniques de lutte microbiologique par utilisation de pesticides d'origine microbienne, font appel à deux principes; la réduction de l'inoculum infectieux pendant la phase de conservation ou de survie du pathogène et/ou l'interférence avec le processus d'infection de la plante hôte. Le contrôle biologique des agents pathogènes s'exerce en détruisant l'inoculum infectieux, en l'inactivant ou en réduisant sa virulence [116].

Dans la présente étude, l'activité antagoniste de nos souches endophytes isolées à partir de cinq espèces végétales : *Urtica dioica*, *Calendula arvensis*, *Plantago lanceolata*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus* a été démontrée sur les six souches d'agrobactéries phytopathogènes; Les premiers résultats

révélés par cette analyse, sont très intéressants d'une part, du fait que l'efficacité des endophytes sélectionnés sur les *Agrobacterium tumefaciens* et les *Agrobacterium vitis* se montre similaire car dans de nombreux travaux, ces espèces ne réagissent pas de la même manière à l'égard des agents de contrôle biologique. Cette idée est soutenue par le fait que la souche K84 utilisée largement dans le monde pour lutter contre le crown gall n'est efficace que sur les agrobactéries ayant un plasmide Ti de type nopaline, plasmide le plus abondant dans le sol et la rhizosphère des plantes [117 ; 179]. Dans notre cas, nous avons utilisé trois souches à nopaline (*A. tumefaciens* C58, E2 et E14) et trois autres souches de plasmide Ti de type autre que nopaline, à savoir les *A. vitis* (AV25/95, Bu20/95 et AL9/95) [118].

A titre d'exemple, *A. tumefaciens* souche C58-CFBP1903, de biovar 1, qui est de type opinique Nopaline, provient de la collection française de bactéries Phytopathogènes (INRA, Angers, France) a montré une forte sensibilité envers la souche PF3, identifiée par voie moléculaire en tant que membre du genre *Bacillus* sp. Cette sensibilité s'est traduite par une zone d'inhibition de 37,30 mm, contrairement, *A. vitis* souche AV25/95, qui est d'un autre type opinique et qui a été isolée par Marilyn L. Canfield, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, n'a pas montré une sensibilité envers le même bacille.

D'autre part, les résultats de recherche menés au laboratoire par utilisation des plantes spontanées (extraits végétaux) et leurs organismes endophytes révèlent des résultats probants. En effet, dans la présente étude, nos souches endophytes sont issues de cinq plantes spontanées, et les extraits bruts aqueux de ces mêmes plantes ont déjà montré un pouvoir antibactérien très intéressant envers sept souches de bactéries phytopathogènes de référence qui sont : *Agrobacterium tumefaciens* (C58), *Agrobacterium vitis* (CFBP 5523), *Erwinia carotovora* pv *carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* pv *citri*, *Ralstonia solanacearum*, et *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* [53]. Ces mêmes extraits bruts de ces plantes ont aussi révélé un pouvoir antifongique envers dix champignons dont 9 sont phytopathogènes (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Alternaria chlamydosporia*, *Rhizoctonia*

*solani*, *Gaeumannomyces graminis var tritici*, *Aspergillus fumigatus*, *Phomopsis vaccinii*, *Paecilomyces sp.*) et un effet nématocide contre les nématodes à galles appartenant au genre *Meloidogyne* [53]. Les résultats révélés par cette étude rejoignent par conséquent les précédents et constituent encore une recherche originale sur l'importance de ces plantes spontanées, qui sont souvent méconnues, mais en vérité peuvent constituer une source efficace de biomolécules pouvant intervenir dans la lutte contre les redoutables bactéries phytopathogènes.

D'autres travaux ultérieurs sur l'évaluation du pouvoir antibactérien *in vitro* de *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens*, ont montré que ces deux bactéries étaient efficaces contre les souches à Nopaline (C58 et AR125) et la souche à Octopine B6, alors qu'aucune zone d'inhibition n'a été induite par les souches antagonistes de référence K84 et K1026 contre la souche à Octopine B6. Ces résultats indiquent que les composés antibactériens de *B. subtilis* et *P. fluorescens* peuvent être différentes de celles des K84 et K1026. Ces bactéries antagonistes ont été efficaces seulement contre les agents pathogènes d'*Agrobacterium spp.* qui portent des plasmides de type nopaline-agrocinopine [119].

Ces dernières années, plusieurs recherches tendant vers l'utilisation des agents de lutte biologique pour combattre la maladie de la galle du collet chez la vigne, tels les travaux menés par Herlache et Triplett en 2002 [52]. Ces derniers, ont porté sur l'expression d'un phénotype du crown gall chez une souche avirulente d'*Agrobacterium vitis* par addition des gènes de production du trifolitoxin et de la résistance de quelques génotypes de la vigne à l'égard de cette maladie. D'autres travaux de recherche ont cependant visé la caractérisation des potentiels des agents bactériens de la lutte biologique pour la suppression d'*Agrobacterium vitis*; agent de la maladie de la galle du collet chez la vigne [102] notamment par utilisation d'une bactérie nommée *Rahnella aquatilis* HX2 [120]. Par ailleurs, Hammami et *al.*, (2009) ont étudié la caractérisation biochimique et l'optimisation d'une bactériocine à partir de la souche B14 de *Bacillus subtilis*, nouvellement isolée et qui s'est avérée efficace pour lutter biologiquement contre les souches d'*Agrobacterium spp.*[121].

La technique utilisée dite 'technique des spots, a montré une forte activité antagoniste entre les différentes souches d'endophytes et semble dépendre étroitement des souches antagonistes et des souches d'*Agrobacterium* spp. testées. Le pouvoir antagoniste des souches endophytes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. s'est traduit par des zones d'inhibition de tailles variables. Ces dernières ont montré que certaines souches antagonistes affichent un large spectre et une forte action antagoniste contre ces agents pathogènes testés. Les spectres d'activité des souches endophytes ont été très différents selon les souches, ce qui suggère que plusieurs substances antibactériennes ont participé à leur activité (impliqués dans la formation des zones d'inhibition). Nos résultats ne concordent pas avec ceux de Chen et *al.*, 2007, qui ont signalé que la manifestation de l'activité inhibitrice de la souche HX2 de *Rahnella aqualis* contre 11 isolats d'*Agrobacterium tumefaciens*, 5 isolats d'*Agrobacterium rhizogenes*, et 5 souches d'*Agrobacterium vitis* K308 est démontrée avec des diamètres des zones d'inhibition ne dépassent pas les 43mm [122]. En revanche, nos souches pathogènes affrontées aux antagonistes ont révélé des diamètres des zones d'inhibition supérieurs aux leurs et dépassant les 45 mm.

L'inhibition *in vitro* de la croissance des souches d'*Agrobacterium* spp. a été attribuée à la production de métabolites secondaires antimicrobiens dont, des antibiotiques [123]. Nos résultats sont en concordance avec de nombreux travaux ayant mis en évidence le pouvoir antibactérien des bactéries endophytes. L'étude menée par Long et ses collaborateurs (2003), a démontré que les isolats endophytes bactériens isolés à partir de *Solanum* spp. ont une action antibactérienne sur une gamme de bactéries phytopathogènes [78]. La variation des diamètres des zones d'inhibition à l'issue des tests d'antagonisme pourrait être expliquée par la diversité des souches endophytes qui proviennent des espèces de familles botaniques très diverses. Nous pouvons expliquer ces derniers résultats par le fait que la diversité des souches endophytes a été démontrée par leur diversité biochimique, qui a révélé la présence de plusieurs groupes biochimiques. Par conséquent, ces souches endophytes produisent des métabolites secondaires variés ce qui explique l'action antagoniste variable sur les souches testées.

L'analyse en composante principale (ACP) ainsi que la classification ascendante hiérarchique des résultats obtenus, a révélé la présence de deux groupes distincts classés selon leur homologie. Ces derniers sont la conséquence d'une interaction entre les deux paramètres étudiés, à savoir les souches endophytes et les pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testés. Il est à noter que le premier groupe inclut des souches endophytes représentant les cas d'absence de l'activité inhibitrice *in vitro*, un résultat similaire a été trouvé par Herlache et Triplett en 2002 avec quelques souches lors des travaux de la lutte biologique en utilisant la souche F2/5 [124]. Des travaux ultérieurs ont montré la possibilité d'obtenir des zones d'inhibition dépendant de l'agent de biocontrôle testé tels que : la K84 avec un diamètre variant de 2 à 12 mm et de 15 à 22 mm pour la souche non tumorigène VAR03-1 [125].

Nos résultats montrent que les souches qui appartiennent au deuxième groupe, se présentent comme étant les plus actifs envers toutes les souches d'*Agrobacterium* spp. testées. Il est important de signaler que ce groupe renferme les souches qui ont été identifiées par voie moléculaire. Ce groupe comporte notamment, les souches EPR3, PS1 et CR2 appartenant au genre *Pseudomonas*, les souches CR1 et PF3 qui appartiennent au genre *Bacillus*, les souches OR1, OS1 et EHR1 appartenant à l'espèce *Bacillus cereus*, les souches OR2 et OS4 appartenant à l'espèce *B. amyloliquefaciens*, la souche OS2 et EHF5 identifiées respectivement *B. pumilis* et *B. subtilis* et la souche EHF3 qui est *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola*.

Nos résultats indiquent aussi que parmi les souches les plus actives, certaines font partie des Gram positif dont celles qui appartiennent au genre *Bacillus*, à l'exemple des souches OS4 et OS1 qui ont montré un fort pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta*. Le genre *Bacillus* spp. présente un large éventail de mécanismes qui peuvent stimuler le développement des plantes [126]. Tout d'abord, *Bacillus* sp. produit une large gamme de métabolites secondaires tels que les antibiotiques, non volatiles et des composés volatiles [127], et des enzymes lytiques [65].

Nos résultats ont mis en évidence aussi la présence d'une souche de *B. subtilis* (EHF5) qui a montré son activité antagoniste envers toutes les souches

d'*Agrobacterium* spp. testées lors de cette étude. En effet, cette bactérie est l'un des agents de lutte biologique le plus efficace et qui présente une activité biologique contre plusieurs bactéries et champignons phytopathogènes. Cet antagonisme a été attribué à la production de peptides antibiotiques [67] et à la capacité de colonisation de la plante [128].

Les souches de *Bacillus subtilis* ont été efficaces dans la réduction de la formation de galles sur la vigne [129]. La souche bactérienne 14B de *Bacillus subtilis* a été désignée comme un agent de lutte biologique producteur d'une bactériocine efficace pour un biocontrôle des souches d'*Agrobacterium* spp [121]. La souche E26 produit un composé antibactérien, Ar26 ; ce composé a été impliqué dans le processus de lutte biologique et a inhibé la maladie causée par la souche pathogène d'*Agrobacterium vitis in vitro* et il a été suggéré que Ar26 inhibe la synthèse des protéines ADN et de l'ARN chez les *Agrobacterium vitis* tumorigènes. L'action antagoniste de notre souche de *Bacillus subtilis* sur les souches d'agrobactéries aurait probablement le même mécanisme d'action que celles citées ci dessus, une analyse plus fine nous permettrait de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition.

De même, *Bacillus cereus* représentée par; OR1, OS1 et EHR1 est l'une des espèces qui a été identifiée parmi nos souches endophytes. Cette bactérie a été déjà isolée comme bactérie endophyte de nombreuses cultures, notamment du Cotton (*Gossypium hirsutum* L), du Maïs doux (*Zea mays* L), et des agrumes (*Citrus* spp.) [130]. C'est une Gram positif, très commune dans les sols et les plantes [131]. Pour le contrôle des maladies des plantes, la souche *B. cereus* UW85 a été montrée capable de produire deux antibiotiques responsables de la suppression de quelques maladies bactériennes et fongiques [132]. Cette bactérie s'est révélé être un agent de lutte biologique fiable de *Phytophthora* agent de la fonte des semis et la pourriture racinaire de soja [69]. La souche de *B. cereus* 65, produit une chitobiosidase, une enzyme chitinolytique qui a également prouvé son efficacité contre *Rhizoctonia solani* chez le coton [133]. La souche de *B. cereus* produit aussi différentes chitinases, qui sont actives contre plusieurs agents phytopathogènes, tels que *Fusarium sambucinum* [134], *Helminthosporium solani* Dur. & Mont. et *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp [135].

Les souches de *B. amyloliquefaciens* identifiées et représentées par OR2 et OS4 constituent également des endophytes des espèces végétales étudiées et de redoutables antagonistes d'*Agrobacterium* spp lors de cette étude. C'est une bactérie qui permet de promouvoir la croissance des plantes, isolée à l'origine de la plante de soja à la station de recherche agricole du centre de la Thaïlande [136]. La souche KPS46 de *B. amyloliquefaciens* a été identifiée comme un promoteur potentiel de croissance des végétaux et un agent de lutte biologique en induisant la résistance systémique [70]. Elle agit par sécrétion d'éliciteurs et de métabolites antimicrobiens pour inhiber la croissance des agents phytopathogènes du sol [72].

Nos résultats indiquent aussi la présence des souches antagonistes avec un pouvoir antibactérien très intéressant et qui font partie des Gram négatif, représentées par le genre *Pseudomonas*. Les *Pseudomonas* spp. possèdent de nombreux traits qui les rendent bien adaptés comme agents de lutte biologique en améliorant la croissance [111] par la production de métabolites qui comprennent des enzymes lytiques, des auxines, des sidérophores, et des antibiotiques [137 ; 156]. En effet, chez les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, est connue depuis longtemps pour son aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro* [111].

La souche *Pseudomonas fluorescens* F113 est l'une des nombreuses bactéries promotrices de la croissance de la plante (PGPB) qui présente une activité antagoniste significative contre les bactéries [55]. Une partie de l'activité antagoniste de la F113 résulte de la synthèse du 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG). Ce composé et ses dérivés semblent être impliqués dans la suppression de nombreux agents pathogènes du sol. Un autre isolat de *Pseudomonas fluorescens* montre sa capacité à supprimer la formation de galles causées par des espèces d'*Agrobacterium* spp. chez plusieurs cultures pérennes [138]. Ce pouvoir antagoniste est également dû aussi aux sidérophores qui peuvent supprimer la brûlure bactérienne causée par *P.syringae* pv. *glycinea*, en améliorant l'aptitude de la compétitivité de l'antagoniste.

D'une manière générale, cette capacité d'inhibition chez les *Pseudomonas* spp. peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers, permettent la compétition pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie [111]. On note également pour certaines souches de ce groupe de bactéries, une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante [125]. Mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène [139].

Au cours de cette étude, l'espèce EHF3 identifiée comme *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* a montré un pouvoir antagoniste envers toutes les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp., les zones d'inhibition varient de 20 à 34 mm. Plusieurs rapports ont indiqué que *Curtobacterium luteum* et *Curtobacterium flaccumfaciens* peuvent être utilisées comme des agents de lutte biologique contre de nombreux pathogènes, et peuvent opérer soit par le déclenchement de la résistance systémique induite ou par antibiose [122]. La poursuite de nos travaux est nécessaire pour mieux comprendre le mécanisme d'action antagoniste de la souche de *Curtobacterium* spp. isolée et identifiée. Un autre point fort concernant cet aspect, c'est le fait que d'autres travaux menés au laboratoire ont montré que parmi la collection de bactéries endophytes isolées et identifiées, certaines agissent amplement dans la promotion de la croissance d'espèces végétales testées et parmi elles, cette dernière souche bactérienne (Krimi, communication personnelle).

La confrontation *in vitro* d'*Agrobacterium tumefaciens* souche E14 et d'*Agrobacterium vitis* souche AL9/95, AV25/95 et BU20/95 avec chacune des cinq bactéries testées *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* (EHF3), *Pseudomonas* spp. (EPR3 et CR2) a montré une activité antagoniste très prometteuse. En effet, ces bactéries antagonistes ont provoqué une inhibition élevée de la croissance bactérienne de ces pathogènes sur le milieu LPGA en utilisant la technique des spots. Cette

réduction de la croissance est un critère largement utilisé pour évaluer l'antagonisme microbien [140 ; 160].

L'activité antagoniste de ces souches antagonistes *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Curtobacterium* obtenue dans cette étude concorde avec les observations de plusieurs auteurs [111; 140]. En effet, ces derniers ont mis en évidence la capacité de plusieurs *Pseudomonas* et *Bacillus* à réprimer la croissance bactérienne des *Agrobacterium* spp. lors des tests *in vitro*. A la lumière de l'étude effectuée *in vitro*, nous pouvons conclure que ces cinq bactéries testées sur *Agrobacterium tumefaciens* souche E14 et d'*Agrobacterium vitis* les souches AL9/95, AV25/95 et Bu20/95 sont parmi les souches antagonistes les plus prometteuses et qui pourront probablement protéger les plantes contre la galle du collet.

Ceci dit, plusieurs travaux ont montré que certains microorganismes manifestant un important antagonisme *in vitro* réussissent à produire le même effet *in vivo* [96], d'autres par contre, ont montré que le succès de l'antagonisme *in vitro* ne l'est pas nécessairement *in vivo* [141].

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

Ces résultats suggèrent que les souches inoculées aux plantules de tomate, se sont multipliées au niveau de la rhizosphère, ont probablement pénétré à travers le système racinaire, se sont introduits par voie systémique et se sont installés dans les tissus de la tomate comme des hôtes normaux. Le succès de cette colonisation rhizosphérique et endophytique et d'une telle réponse antagoniste est certainement dû au fait que c'est déjà des bactéries isolées de tissus des plantes et qu'elles se sont adaptées facilement à ce milieu. Cependant, il aurait été intéressant de suivre leur parcours dans les tissus de la plante mais nous ne disposons pas de moyens nous permettant ce type d'analyses.

#### 4- ENDOPHYTISME ET ANTAGONISME DE *BACILLUS* SPP. ET *PSEUDOMONAS* SPP. ET POTENTIEL D'INDUCTION D'UNE RESISTANCE SYSTEMIQUE

Dans cette même optique, il nous a été nécessaire de tester *in vivo* l'effet antagoniste des souches de *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* (EHF3) et *Pseudomonas* spp. (EPR3 et CR2). L'effet manifesté *in vitro* pourrait servir dans la bioprotection de la tomate contre la galle du collet causée par les souches d'*Agrobacterium* spp. Ainsi, nous nous sommes proposé d'étudier l'antagonisme bactérien à l'encontre des souches virulentes d'*Agrobacterium* sur la tomate qui répond efficacement à ces organismes pathogènes.

Un effet protecteur a été observé pour les plantules de tomate vis-à-vis des souches tumorigènes d'*Agrobacterium vitis* AL9/95, AV25/95 et Bu20/95 et d'*Agrobacterium tumefaciens* E14. Les souches OS1, EHF3 et CR2 ont donné les meilleurs résultats où la taille des tumeurs n'a pas dépassé les 2 mm de diamètre.

La bibliographie rapporte que les espèces de *Bacillus* sp. colonisent rapidement les racines des plantes et ont la capacité de se multiplier sur les racines [142]. Elles induisent une résistance systémique par la production de composés organiques volatils [143] et favorisent la croissance des plantes et des racines à travers la production de phytohormones et d'enzymes extracellulaires [144 ; 126]. Ce qui rend les espèces de ce genre efficaces dans la lutte contre une gamme de maladies fongiques et bactériennes [143] et sur les insectes [146].

La bactérisation des plants de tomate avec *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* (EHF3), *Pseudomonas* spp. (EPR3 et CR2) a limité l'installation et l'expression des *Agrobacterium* tumorigènes. Cela est expliqué par la présence d'une situation d'incompatibilité entre la souche bactérienne et l'espèce végétale inoculée [73 ; 147]. Le trempage des plants de tomate avec *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* (EHF3), *Pseudomonas* spp. (EPR3 et CR2) a permis leur protection contre l'action

agressive d'*Agrobacterium tumefaciens* souche E14 et d'*Agrobacterium vitis* pour les souches AL9/95, AV25/95 et Bu20/95.

Le succès de cette protection dépend du moment de l'application de l'antagoniste. Ainsi, l'inoculation des plants de tomate avec les cinq agents protecteurs bien avant les agrobactéries virulentes leur confère une protection intéressante. Ce délai, dans nos conditions expérimentales, est de 24 heures. Les plantes sont ainsi mises en alerte 'priming' suite à la reconnaissance de la bactérie pour réagir de manière systémique et plus rapidement vis-à-vis de l'expression des gènes de défense et de l'accumulation de produits inhibiteurs pour le pathogène après la perception d'un agent pathogène. Il apparaît clairement que ce phénomène de «priming» fasse partie intégrante des deux types de réactions de défense systémiques, SAR et ISR [148]. Cela avait déjà été rapporté chez plusieurs espèces végétales suite à la perception d'éliciteurs biotiques ou abiotiques [149]. Nos résultats renforcent ce concept dans le contexte spécifique de l'ISR.

Ce délai a permis d'obtenir une protection, qui n'était pas maximale, et qui a été traduite soit par l'absence des tumeurs ou par la formation des tumeurs de faible taille. L'ensemble des plantules de tomate qui sont été trempés dans les souches antagonistes, ont développé des tumeurs qui ne dépassent pas les 3 mm de taille comparées aux plantules qui n'étaient pas traitées par les souches antagonistes ou bien les plantules qui sont été traités par l'eau distillée stérile, ces dernières ont développé des tumeurs de taille qui dépasse les 5,5 mm de largeur du la tumeur.

La production d'antibiotiques pourrait jouer un rôle important dans la suppression de la maladie, cela a été déjà constaté qu'il y a une relation entre le niveau de l'antibiose *in vitro* et *in vivo* dans le cas de la suppression de la flétrissure bactérienne [150].

Dans cette présente étude, les souches OS4 et EPR3 étaient les plus actives, elles ont pu enregistré, lors du test d'antagonisme *in vitro* des pics maximum des zones d'inhibition dépassant les 40 mm après 24 h, contrairement aux résultats du test d'antagonisme *in vivo* dont ces deux souches étaient les

moins efficaces où la taille des tumeurs a dépassé les 2 mm de largeur. Ces résultats concordent avec les travaux menés avec la souche KuTox708 de *Pseudomonas* qui a montré une absence d'activité antagoniste contre *R. solanacearum in vitro* (n'a pas produit une zone d'inhibition claire autour de pathogène), par contre ce même isolat a pu protéger les plants de tabac *in vivo* contre le flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* [150].

D'autres travaux ont indiqué que *P. fluorescens* a prouvé son efficacité *in vitro* mais n'a pas réduit de façon significative le pourcentage des galles provoquées par *A. tumefaciens* au niveau des plantes *in vivo* [119]. Toutefois, des microorganismes ne montrant aucune activité antagoniste *in vitro* peuvent afficher une capacité de lutte biologique *in vivo* [151]. La suppression de la formation des tumeurs est plus efficace quand la souche E26 a été inoculée, soit avant la souche pathogène *Agrobacterium vitis* K308 ou à une concentration plus élevée sur le tournesol (*Annus Helianthus*). E26 a montré un fort effet pour réduire les tumeurs sur *Vitis vinifera* Cv Muscat Humbueg. Un complexe de processus avec un certain nombre de facteurs jouent un rôle marquant dans ce control, comme la production d'agrocine, la colonisation efficace des racines et des sites de blessures, et la concurrence pour les sites et les éléments nutritifs sont un de ces facteurs [152].

Les travaux de Reddy et al. En 1994, ont montré que l'inoculation des semences avec *Pseudomonas* spp. ont conduit à une réduction significative de la maladie des semis de conifères infectées par *Fusarium oxysporum*. Certaines souches de *Pseudomonas* peuvent également réduire l'apparition de la maladie causée par *F. oxysporum* ou *Pythium ultimum* dans une pépinière de conifères [153].

Le délai de 24h dans nos conditions expérimentales *in planta*, a permis aussi de retarder la formation et l'induction des tumeurs au niveau des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'endophyte, comparés aux témoins négatifs qui correspondent aux plantules de tomate inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium* spp.. Ces dernières ont induit la formation des tumeurs à la deuxième semaine après l'inoculation par rapport aux plantules de tomate trempés dans la suspension bactérienne d'antagonisme, qui ont parfois

développé des tumeurs à partir de la 4 ou la 5 semaine, et cela été influencé par la sévérité de la souche d'*Agrobacterium* spp., par exemple la souche E14 d'*Agrobacterium tumefaciens*, qui est la plus sévère, où l'induction des tumeurs a été observée à la 2<sup>ème</sup> semaine pour les plantules inoculées directement avec la souche E14 et à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine pour les plantules trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste : *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* spp. et *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* (OS4, OS1, EPR3 et EHF3) et à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine pour les plantules trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste *Pseudomonas* spp. (CR2).

Cette protection n'était pas durable car elle a juste retardé l'induction des tumeurs, et elle n'était pas maximale, car il y a eu quand même formation des tumeurs pour quelques plantules même si ces tumeurs étaient de petite taille et faible poids. La grande différence observée entre l'effet protecteur de la bactérie avec et sans délai de pré-inoculation n'est pas mise en évidence « *in vitro* ». En effet, les confrontations déphasées de 24h des deux microorganismes (antagoniste/pathogène) se sont traduites par des pourcentages d'inhibition de la croissance du pathogène similaires. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'*in vitro* l'antagoniste agit directement sur le pathogène grâce à sa grande capacité de colonisation de l'espace et au phénomène d'antibiose [154]. Alors qu'*in vivo* la présence de la plante hôte fait que l'agent protecteur exige d'autres facteurs pour exercer son antagonisme, notamment une période suffisante pour induire la résistance des plantes à l'attaque par le pathogène.

En effet, Compant *et al.* [2005] ont rapporté dans un article de synthèse que la résistance systémique induite (RSI) des plantes est l'un des plus importants mécanismes de biocontrôle par les bactéries protectrices. Ce phénomène consiste en l'activation d'un certain nombre de gènes qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance de la plante entière contre le pathogène [155].

Dans plusieurs études, ce mécanisme de défense résulte d'une multitude de changements physiologiques et biochimiques des plantes hôtes incluant l'induction de l'accumulation des métabolites de défense tels que les protéines PR (pathogenesis-related protéines), les peroxidases, les phenylalanine ammonialyases, les polyphenol oxidases, les chalcone synthases et les

phytoalexines [156]. En effet, il a été démontré que la tomate synthétise des phytoalexines de type tomatine suite à sa pré-inoculation par la bactérie *Pseudomonas fluorescens* et induit une résistance contre le champignon *Fusarium oxysporium* f.sp. *radicis-lycopersici* [157].

Ce changement dans le métabolisme de la plante hôte exige un délai entre l'application de l'agent protecteur et celle du pathogène. Ce délai dépend du trio plante hôte, agent protecteur et agent pathogène [158]. Il est de 0 minute lors de la bioprotection contre la verticilliose de la luzerne par *Gliocladium roseum* [159] et de 48h lorsque la bioprotection est faite par *Sinorhizobium meliloti* [160]. Dans notre étude, la pré-inoculation avec la bactérie antagoniste 24h avant l'infection par le pathogène semble induire la production par la tomate d'une teneur seuil des métabolites impliqués dans sa résistance envers *Agrobacterium* spp. testées lors de cette étude. Le (s) composé (s) inhibiteur (s) produit par les bactéries antagonistes est bactériostatique plutôt que bactéricide [161].

Les souches antagonistes EPR3 et CR2 utilisées pendant les études d'antagonisme *in vivo* sont des espèces du genre *Pseudomonas*. Les espèces de ce genre sont connues pour leur capacité à induire une résistance systémique chez la plante, ce qui engendre une protection contre un grand nombre d'agents pathogènes fongiques et bactériens. Parmi les facteurs déterminants pour l'induction de la résistance systémique par les *Pseudomonas*, on remarque les lipopolysaccharides, les sidérophores et l'acide salicilique [162]. Dans le cas des lipopolysaccharides (LPS) de *P. fluorescens*, tant les cellules mortes que les LPS purifiés sont en mesure d'induire les réactions de défense permettant de protéger les plants d'œillet du flétrissement fusarien [162]. Les sidérophores, semblent être surtout importants dans des conditions limitantes en fer. Également, une souche productrice d'antibiotiques (*P. fluorescens* CHA0) s'est avérée capable d'induire une résistance systémique envers *Peronospora parasitica* chez *Arabidopsis thaliana* [163].

Plus encore, la production de DAPG par *P. fluorescens* CHA0 semble être impliquée dans l'induction de cette résistance systémique. En effet, lors de la confrontation entre *P. parasitica* et *A. thaliana* colonisée par différents mutants de CHA0, chacun déficient dans la production soit de HCN, DAPG, pyolutéorine,

exoprothéases et sidérophores, seulement les mutations interférant dans la production de DAPG menaient à une baisse significative de la résistance systémique induite [163]. D'autres groupes de composés fréquemment rapportés à être sécrétés par *Bacillus* spp. comprennent le lipopeptide familles, iturine et surfactine qui sont bien connus pour leur forte activité antibiotique [164 ; 165]. L'origine végétale de la plupart de ces composés suggère qu'ils pourraient participer aux systèmes de défense naturels des plantes ; leur présence pourrait être recherchée chez la tomate et intégrée dans des processus d'amélioration et de création variétale.

Des travaux ultérieurs ont montré que *Serratia liquefaciens* et *Pseudomonas putida* qui colonisent les racines de tomate produisent des AHSLs dans la rhizosphère qui a augmenté la résistance systémique des plants de tomates contre le pathogène fongique *Alternaria suppléant* [166].

Pour plus de 20 ans, la galle du collet causée par *A.tumefaciens* a été contrôlée biologiquement par trempage du matériel de plantation dans une suspension cellulaire de la souche K84 d'*A.radiobacter*. Cet effet est dû à un antibiotique 'agrocine84' [86]. Ce traitement conduit à un niveau assez élevé de contrôle de la maladie, mais l'utilisation de cette souche avait beaucoup de difficultés. Plus tard, Jones et Kerr (1989) construisent une souche bactérienne semblable à K84, qui est K1026 et qui était plus efficace. Les efforts de lutte biologique à l'aide d'*Erwinia herbicola* et récemment par *Pseudomonas fluorescens* et des souches non virulentes de *Pseudomonas syringae* a gagné la plus grande attention à la fois scientifique et d'un point de vue pratique, comme agent de lutte biologique efficace [167].

La présente étude a porté sur l'évaluation de l'activité antagoniste *in vitro* et *in vivo* d'une collection de souches endophytes envers les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. Les résultats ont révélés un fort pouvoir antagoniste de ces souches endophytes *in vitro* et *in planta*. Ces résultats sont très prometteurs et suggèrent des études plus approfondies afin de mettre en place une formulation permettant leur homologation et par la suite leur utilisation.

A travers cette étude, nous avons pu sélectionner quelques agents de lutte biologique et que ce modeste travail sera un modèle pour d'autres expériences à l'avenir sur la sélection d'autres agents de lutte biologique candidats de bactéries présentes naturellement dans les différentes plantes. Sur le long terme, la perspective de ces agents de lutte biologique peut fournir une protection de la nature de l'utilisation excessive de produits chimiques toxiques qui menacent la vie humaine.

En comparaison avec les méthodes de lutte conventionnelles, le contrôle biologique présente plusieurs avantages qui répondent mieux aux interrogations de l'homme concernant les enjeux économiques ainsi que l'équilibre biologique et environnemental. Ces dernières années, plusieurs phytopathologistes se sont orientés vers les microorganismes de la rhizosphère et les microorganismes endophytes, dans le but d'isoler un grand nombre d'antagonistes aux bactéries phytopathogènes très redoutables dont les *Agrobacterium* font partie.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La galle du collet ou crown gall est une maladie causée par les agrobactéries tumorigènes. Cette maladie est responsable d'épidémies dans plusieurs régions du monde [168]. Elle présente jusqu'à nos jours, une grande importance économique pour les pépinières et les vergers. Les produits de pépinière atteints sont invendables et la présence de cette maladie dans un verger entraîne une réduction de la durée de vie des arbres qui survivent rarement une fois touchés. Les pertes financières ont été estimées à des millions de dollars par an [169].

Les espèces d'agrobactéries telles que ; *Agrobacterium tumefaciens* et *A. vitis* constituent les pathogènes majeurs, elles détiennent un spectre d'hôtes considérablement diversifié comprenant plusieurs arbres fruitiers, des plantes ornementales et des arbres forestiers [5]. Elles peuvent causer des dommages considérables pouvant atteindre 80 à 100% de la culture [170].

Comme il a été rapporté auparavant, plusieurs espèces d'*Agrobacterium* sont de dangereux parasites des végétaux et des cultures [171]. Il nous a été donc nécessaire de chercher un remède aux problèmes des *Agrobacterium* spp. sur les plantes, d'autant plus en raison du caractère génétique de cette maladie, aucune méthode de lutte curative n'est envisageable à l'heure actuelle. Une action préventive pour maîtriser l'installation et la dissémination de l'agent pathogène est indispensable. Il existe plusieurs stratégies de lutte, mais elles présentent des limites.

Ces dernières années, l'intérêt porté à l'exploitation des microorganismes en lutte biologique s'est accru du fait qu'ils constituent une réelle source de produits naturels qui peuvent avoir un large spectre d'action, agissant sur plusieurs pathogènes des végétaux et même des pathogènes de l'homme [172].

En phytoprotection, les recherches et l'application des agents de lutte biologique ou leurs dérivés au contrôle des maladies des plantes par les métabolites secondaires synthétisés par ces agents constituent une voie prometteuse. Cette méthode de lutte permet de limiter l'utilisation des pesticides organiques de synthèse dans le cadre de la lutte chimique, qui a montré beaucoup d'inconvénients sur les divers systèmes écologiques et sur la santé humaine [173].

Ceci dit, les recherches portant sur les endophytes des plantes ont été interrompues quelques temps à cause d'un certain nombre de problèmes dont, la toxicité et la non spécificité de certains composés antimicrobiens issus des endophytes et l'ignorance des mécanismes de biosynthèse et de régulation des métabolites secondaires synthétisés par cette microflore [174].

Dans l'objectif d'établir une stratégie de lutte contre la galle du collet causée par les souches virulentes d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Agrobacterium vitis*, par un moyen non polluant et sans inconvénients pour l'environnement, nous avons étudié lors de cette présente recherche, l'antagonisme *in vitro* et *in planta* d'une collection de bactéries endophytes vis à vis six souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp.

En premier lieu, nous avons cherché à identifier cette collection de souches endophytes isolées initialement de cinq plantes spontanées : *Urtica dioïca*, *Plantago lanceolata*, *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus* [77]. L'identification a été faite en premier par leur caractérisation morphologique, en se basant sur l'observation microscopique de la coloration de Gram, qui met en évidence une caractéristique structurale des parois bactériennes, et elle a permis de répartir les souches endophytes en deux groupes, dix-sept étaient des bactéries à Gram positif. Alors que les vingt-deux isolats restant étaient des bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram négatif ont été légèrement dominantes, ce qui présente 56, 41% du total des isolats.

En complément à cette étude morphologique, il était nécessaire de procéder à la caractérisation biochimique et l'étude moléculaire de ces bactéries endophytes, d'autant plus que récemment l'identification de tous les

microorganismes fait appel à la caractérisation moléculaire [107]. La caractérisation biochimique et physiologique des isolats de bactéries endophytes, révèle une douzaine de profils, ce qui confirme une variabilité phénotypique et une diversité métabolique. Dix-sept isolats sont des bactéries à Gram positif, avec neuf profils biochimiques, dont les profils 3, 4 et 9 ont été préalablement caractérisés en tant que membres du genre *Bacillus* sp., du fait qu'ils possèdent les caractéristiques morphologiques des colonies et les caractéristiques biochimiques du genre *Bacillus* sp. Alors que les vingt-deux isolats qui restent, sont des bactéries à Gram négatif, dont sept souches endophytes ont été classés en tant que membres du genre *Pseudomonas* sp., sur la base des caractéristiques de ce genre. L'analyse de la séquence 16S des amplicons des bactéries endophytes a permis de les apparenter à deux principaux genres de bactéries à savoir: le genre *Bacillus* sp. représenté par les espèces *B.cereux*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* et *B. subtilis* et le genre *Pseudomonas* sp.

La biodiversité révélée, lors de ces études, par les outils moléculaires et phénotypiques et la forte ressemblance phénotypique de ces souches aux *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp, témoigne solidement que ces espèces végétales ; *Urtica dioïca*, *Plantago lanceolata*, *Calendula arvensis*, *Euphorbia helioscopia* et *Euphorbia peplus*, abritent dans leurs organes végétatifs des bactéries endophytes associatives de genres divers.

La confrontation *in vitro* des souches tumorigènes d'*A. tumefaciens* et d'*A. vitis* avec chacune des bactéries endophytes a montré une importante activité antagoniste chez tous les endophytes à l'égard des souches tumorigènes testées lors de cette recherche. En effet, leur grande capacité à réprimer la croissance bactérienne d'*Agrobacterium* a été mise en évidence dans le milieu LPGA en utilisant la technique des spots [175]. Ces résultats sont très intéressants et concordent avec ceux de Long (2003). Nous avons enregistré des diamètres de zones d'inhibition allant jusqu'à 45 mm lors du test d'antagonisme *in vitro*, ce qui suggère que plusieurs substances antibactériennes ont participé à cette activité inhibitrice. Une analyse fine des substances actives des endophytes et la caractérisation des gènes responsables de la synthèse de ces composés, ainsi

qu'un séquençage constituent la finalité de cette recherche afin d'aboutir à une analyse quasi complète de la propriété antagoniste.

Les résultats d'antagonisme *in vitro* sont importants à exploiter dans la mesure où la plupart des méthodes de lutte conventionnelles sont inefficaces face aux maladies bactériennes. Ce qui serait également souhaitable c'est de tester ces souches antagonistes sur d'autres gammes de bactéries ou de champignons pathogènes et même sur les nématodes et les insectes, car beaucoup de recherches ont abouti à l'isolement d'une microflore endophyte à partir des plantes spontanées qui présente plusieurs actions, ou elle produit des composés qui agissent sur plusieurs organismes nuisibles. Il est à rappeler cependant que les dégâts sur les cultures peuvent se trouver sous forme de complexes où plusieurs maladies et agents déprédateurs peuvent s'y trouver associés.

En outre, parmi nos souches nous avons noté une activité antibactérienne très intense des souches endophytes issues d'*Urtica dioïca* vis-à-vis de toutes les souches pathogènes testées où les zones d'inhibition étaient de l'ordre de 45 mm. Néanmoins, il existe d'autres souches endophytes qui ont aussi donné de bons résultats également lors des tests d'antagonisme.

A la lumière de l'étude effectuée *in vitro* nous avons conclu que cinq bactéries qui sont *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *beticola* (EHF3), *Pseudomonas* spp. (EPR3 et CR2) testées sur *Agrobacterium tumefaciens* souche E14 et d'*Agrobacterium vitis* les souches AL9/95, AV25/95 et BU20/95 sont parmi les souches antagonistes les plus prometteuses et qui pourront probablement protéger les plantes contre la galle du collet. Cela dit, plusieurs travaux ont montré que certains microorganismes manifestant un important antagonisme *in vitro* réussissent à produire le même effet *in vivo* [96]

Toujours dans le sens de déterminer le pouvoir antagoniste des ces bactéries endophytes vis-à-vis des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp., nous avons effectué un deuxième test mais cette fois-ci sur des plantules de tomate. Les résultats obtenus à travers l'étude d'antagonisme *in planta*, nous ont permis de constater une diminution et parfois même une absence totale de

symptôme de la galle du collet au niveau des plantules de tomate trempées préalablement dans la suspension bactérienne d'endophyte.

L'effet protecteur pour les plantules de tomate vis-à-vis des souches tumorigènes d'*Agrobacterium vitis* AL9/95, AV25/95 et BU20/95 et d'*Agrobacterium tumefaciens* E14, par les souches OS1, EHF3 et CR2 a généré les meilleurs résultats, où la taille des tumeurs n'a pas dépassé les 2 mm de largeur. Cette faible taille de la tumeur pourrait être même confondue ou assimilée à la présence d'un cal de cicatrisation de la blessure.

La production d'antibiotiques pourrait jouer un rôle important dans la suppression de la maladie de la galle du collet, cela a été déjà constaté qu'il y a une relation entre le niveau d'antibiose *in vitro* et *in vivo* dans la suppression du flétrissement bactérien [150]. En effet, Compant *et al.* [2005] ont rapporté que la résistance systémique induite (ISR) des plantes est l'un des plus importants mécanismes de biocontrôle par les bactéries protectrices. Ce phénomène consiste en l'activation d'un certain nombre de gènes qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance [177].

Dans plusieurs études, ce mécanisme de défense résulte d'une multitude de changements physiologiques et biochimiques des plantes hôtes incluant l'induction de l'accumulation des métabolites de défense tel que les protéines PR (pathogenesis-related protéines), les peroxidases, les phenylalanine ammonialyases, les polyphenol oxidases, les chalcone synthases et les phytoalexines ce de la plante entière contre le pathogène [178].

Malgré tous les avantages du phénomène, la protection conférée aux plantes *via* l'ISR n'est que partielle dans la plupart des cas. Elle doit donc plutôt être considérée comme une approche complémentaire et en aucun cas en tant que stratégie unique pour la gestion des maladies des récoltes.

Des études sur terrains doivent être menées pour analyser le potentiel réel de ces bactéries endophytes dans des conditions du champ. Des études sont également nécessaires pour déterminer les modes d'action de ces bactéries, la

densité de population des endophytes appliquées, et la meilleure forme d'introduction dans l'hôte.

L'évaluation des effets des produits agrochimiques sur les bactéries endophytes sont aussi à prendre en considération, car ceux-ci peuvent non seulement stimuler les isolats qui sont bénéfiques pour contrôler les maladies, mais aussi sélectionner ceux qui augmentent les mécanismes de défense des plantes et stimulent leurs croissances.

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

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

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **VINCENT CHARLES ET PANNETON BERNARD, 2001.** Les méthodes de lutte physiques comme alternatives aux pesticides. *VertigO La revue en sciences de l'environnement*, Vol 2, N° 2, Octobre 2001. P 24.
  
- 2- **YOUNG J. M., ALLEN C., COUTINHO T., DENNY T., ELPHINSTONE J., FEGAN M., GILLINGS M., GOTTWALD T. R., GRAHAM J.H., IACOBELLIS N. S., JANSE J. D., JACQUES M. A., LOPEZ M. M., MORRIS C. E., PARKINSON N., PRIOR P., PRUVOST O., RODRIGUES NETO J., SCORTICHINI M., TAKIKAWA Y., AND UPPER C. D., 2008.** Plant pathogenic bacteria as biological weapons- Real threats? *The american phytopathological Society*. Vol. 98, No. 10,2008,PP:1060-1065.
  
- 3- **ELMHIRST, J., 2007.** Profile des Cultures au Champs. P 15.
  
- 4- **CONN H.J., 1942.** Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bact.* 44: 353-360.
  
- 5- **DE CLEENE M, DE LEY J., 1976.** The host range of of Crown Gall. *Botanical Review* 42:389-466.
  
- 6- **FRAVEL, D.R., 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 337-359.
  
- 7-**MUSETTI R., POLIZZOTTO R., GRISAN S., MARTINI M., BORSELLI S., CARRARO L., OSLER R., 2007.** Effects induced by fungal endophytes in *Catharanthus roseus* tissues infected by phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, 60 : 293-294.
  
- 8-**BAILEY, K.L., MUPONDWA, E.K., 2006.** Developing microbial weed control products: commercialization, biological, and technological considerations. In: Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (Eds.),

Handbook of Sustainable Weed Management. The Haworth Press Inc., Binghamton, NY, USA, PP 431–473

- 9- **KANG, S.H., CHO, H.-S., CHEONG, H., RYU, C.-M., KIM, J.F., PARK, S.-H., 2007.** Two bacterial endophytes eliciting boot plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 96–103.
- 10- **SENTHILKUMAR, M., GOVINDASAMY, V., ANNAPURNA, K., 2007.** Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Current Microbiology* 55, 25–29.
- 11- **BAKKER, P.A.H.M., PIERTERSE, C.M.J., VAN LOON, L.C., 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp.. *Phytopathology* 97, 239–243.
- 12- **TILAK K. V. B. R., RANGANAYAKI N., PAL K. K., DE R., SAXENA A. K., NAUTIYAL C. S., MITTAL S., TRIPATHI A. K. AND JOHRI B. N. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89: 136- 150.
- 13- **FARRAND S.K., VAN BERKUM P.B. OGER P., 2003.** *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *I.J.S.E.M.* 53: 1681-1687.
- 14- **YOUNG J.M., KUYKENDALL L.D., MARTINEZ-ROMERO E., KERR A. SAWADA H., 2001.** A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* conn 1942 and *Allorhizobium undicola* De Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *IJSEM.* 51: 89-103
- 15- **TOURTE Y., 2001.** Les OGM - La Transgenèse Chez Les Plantes. Dunod - 05/10/2001. 144p.
- 16- **MOORE, L.W., BOUZAR, H., BURR, T., 2001.** *Agrobacterium*. In: Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (Eds.), *Laboratory Guide for Identification*

of Plant Pathogenic Bacteria, Third edition. APS Press, St. Paul, MI, pp. 17–35.

- 17-**JUMAS-BILAK E., S. MICHAUX-CHARACHON, G. BOURG, D. O'CALLAGHAN, AND M. RAMUZ, 1998.** Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 27:99-106.
- 18-**ALLARDET-SERVENT A., MICHAUX-CHARACHON S., JUMAS-BILAK E., KARAYAN L., RAMUZ M., 1993.** Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Journal of Bacteriology* 175: 7869-7874.
- 19-**BINNS A. N. AND COSTANTINO P., 1998.** The *Agrobacterium* onogogenes. In: The Rhizobiaceae (Spaink, H. P., Kondorosi A. and Hooykaas, P. J.J., eds), pp. 251-266. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- 20-**BOUZAR H. AND JONES J.B., 2001.** *Agrobacterium larrymoorei* sp. Nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1023-1026.
- 21-**KEANE P.J., KERR A., NEW P.B., 1970.** Crown-gall of stone fruit II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust.J.Biol.Sci.* 23:585-595.
- 22-**SAWADA H., AND H. IEKI. 1992.** Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Soc. Japan.* 58, 37-45.
- 23-**BUNDOCK P., HOOYKAAS P., 1998.** Interaction between *Agrobacterium tumefaciens* and plant cells, p. 207-229. *in* : Romeo, J.T., Downum K. R. and Verpoort, R. (ed), *Phytochemical signals and plant-microbe interactions* Plenum Press, New York, (N. Y).
- 24- **KERSTERS K., DE LEY J., 1984.** Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. N.R. Krieg and Holt, J.G. 244-254. 1. Baltimore /London: Williams and Wilkins.

- 25-KERSTERS K., DE LEY J., 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *Journal of General Microbiology* 87: 333-342.
- 26-COSTECHAREYRE D., RHOUMA A., LAVIRE C., PORTIER P., CHAPULLIOT D., BERTOLLA F., BOUBAKER A., DESSAUX Y., NESME X., 2010. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. *Microbial Ecology* (in press).
- 27-WLODARCZYK ALEKSANDRA, 2010. Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). Thèse de doctorat. Spécialité : Microbiologie environnementale. L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.p26.
- 28-BAZZI C., ROSCIGLIONE B., 1982. *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3, causal agent of crown gall on *Chrysanthemum* in Italy. *Phytopathology* 103: 280-284.
- 29-TEYSSIER-CUVELLE S., MOUGEL C., NESME X., 1999. Direct conjugal transfers of Ti plasmid to soil microflora. *Molecular Ecology* 8: 1273-1284.
- 30-HOOYKAAS, P. J. J. AND R. A. SCHILPEROORT, 1992. "Agrobacterium and plant genetic engineering." *Plant Molecular Biology* 19: 15-38.
- 31-KONCZ C., SCHELL J., 1986. The promotorn of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vecton.*Molecular and General Genetics* 204: 383-396.
- 32-AGRIOS N.G., 1988. Bacterial galls. In *Plant Pathology*. Third edition.éd. San Diego Academic press: 558-565.
- 33-HERLACHE, T. C., H. S. ZHANG, C. L. REID, S. CARLE, D. ZHENG, P. BASARAN, M. THAKER, A. T. BURR, AND T. J. BUR. 2001.

Mutations that affect *Agrobacterium vitis*-induced grape necrosis also alter its ability to cause a hypersensitive response on tobacco. *Phytopathology* 91:966-972.

- 34-HOOYKAAS VAN SKLOGTEREN G. P. HOOYKAAS AND SCHILPEROORT, R.A., 1984. Expression of Ti-plasmid genes into monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens* *Nature* 311: 763-764.
- 35-SHENG, J., AND CITOVSKY, V., 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8, 1699-1710.
- 36-OOMS, G., TWELL, D., BOSSEN, M.E., HOGE, J.H.C., AND BURRELL, M.M., 1986. Developmental regulation of Ri TL-DNA gene expression in roots, shoots and tubers of transformed potato (*Solanum tuberosum* cv. Desiree). *Plant Mol. Biol.* 6, 321-330.
- 37-KRIMI Z., PETIT A., MOUGEL C., DESSAUX Y. NESME X., 2002. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. In soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3358-3365
- 38-ZOINA A., AND RAI0 A., 1999. Susceptibility of some peach rootstocks to crown gall. *J. Plant Pathol.* 81: 181-187.
- 39-KENNEDY B.W., ALCORN S.M., 1980. Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease* 64: 674-676.
- 40-RHOUMA A., BORUI M., BOUBAKER A., NESME X., 2008. Potential effect of rhizobacteria in the management of crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1. *Journal of Plant Pathology* 90: 517-526.
- 41-BOUZAR H., DAOUZLI N., KRIMI Z., ALIM A. AND KHEMICI E., 1991. Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie* 11 : 901-908.

- 42-**SCHROTH M.N., MCCAIN A.H., FOOTT J.H., HUISMAN O.C., 1988.**  
Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease.  
Plant Disease 72: 241- 246.
- 43-**ESCOBAR, M.A. ET AL., 2003.** Characterization of oncogene-silenced transgenic plants: implications for *Agrobacterium* biology and posttranscriptional gene silencing. Mol. Plant Pathol. 4, 57–65
- 44-**RAIO A., ZOINA A., MOORE L.W., 1997.** The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria. Plant Pathol. 46:320-328.
- 45-**UTKHED R.S., AND SMITH E.M., 1990.** Effect of fumigants and *Agrobacterium radiobacter* strain 84 in controlling crown gall of apple seedlings. phytopathologischeZeitschrift. 128 : 256-270.
- 46-**BENJAMA P.A., EL GADDA M., EL BOUSTANI E., EL MODAFAR C., NESME X., ET CUBERO J., 2004.** Détection moléculaire spécifique de la région vir du plasmide pTi d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les sols et plants au Maroc. Bull. OEPP. 34 : 403-406.
- 47-**VISS W., HUMANN J.L., COOK M., DRIVER J., AND REAM W., 2003.**” Crown gall resistant transgenic apples trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes”, Molecular Breeding 12: 283-295.
- 48-**KRIMI Z., 1990.** La lutte biologique contre le crown gall en Algérie: Efficacité de la souche Bacteriocinogène K84 et isolement de nouveaux anatgonistes bacteriens. Thèse de Magister. I.N.A. Alger. 97p.
- 49-**FARRAND S.K., RYDER M.H., HAYMAN G.T., O'MORCHOE S.B., SHIM J.S. AND KERR A., 1987.** Genetics and molecular biology of agrocine production and sensitivity in *Agrobacterium*. Curr. Plant. Sci. Biotechnol. Agric. 4: 42-55.
- 50-**RYDER M.H., JONES D. A., 1991.** Biological control of crown gall using *Agrobacterium* strains K84 and K1026. Aust. J. Plant Physiol. 19: 571-579.

- 51-**JODI E. CREASAP AND THOMAS J. BURR, 2006.** Grape Crown Gall *Agrobacterium vitis* (Ophel & Kerr 1990). Department of Plant Pathology, Cornell University, NYSAES, Geneva, NY [nysipm.cornell.edu/factsheets/grapes/diseases/crown\\_gall.pdf](http://nysipm.cornell.edu/factsheets/grapes/diseases/crown_gall.pdf) 2006.
- 52-**HERLACHE TC, TRIPLETT EW., 2002.** Expression of a crown gall biological control phenotype in an avirulent strain of *Agrobacterium vitis* by addition of the trifolitoxin production and resistance genes. Department of Agronomy, University of Wisconsin-Madison, 1575 Linden Drive, Madison, WI 53706, USA. [tcherlache@facstaff.wisc.edu](mailto:tcherlache@facstaff.wisc.edu). BMC Biotechnol. 2002; 2:2. Epub 2002 Mar 6.
- 53-**GRAY E.J. AND SMITH D.L. (2005)** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 395-412.
- 54-**WELBAUM G., STURZ A.V., DONG Z. AND NOWAK J. (2004)** Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Review in Plant Science* 23: 175-193.
- 55-**JAMES E.K., GYANESHWAR P., MANTHAN N., BARRAQUIO W.L., REDDY P.M., IANETTA P.P.M., OLIVARES F.L. AND LADHA J.K. (2002)** Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 894-906.
- 56-**CHAUBE, H.S. & SINGH, U.S. 1991.** Plant Disease Management: Principles and Practices. CRC Press inc, Boca Raton. 319 pages.
- 57-**WHIPPS, J.M. 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.
- 58-**KENNEDY, A.C. & KREMER, R.J. 1996.** Microorganisms in weed control strategies. *J. Prod. Agric.* 9: 480-484.

- 59-**BECKER, J. O., MESSENS, E., ET R. W. HEDDOES (1985)**. The influence of agrobactin on the uptake of fenic iron by plant.. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 171-175.
- 60-**KIM, B.S., MOON, S.S. ET HWANG, B.K. (1999)** Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Canadian Journal of Botany* 77 : 850-858.
- 61-**LIGON, J. M., HILL, D. S., HAMMER, P. E., TORKEWITZ, N. R. ET HOFMANN, D. (2000)** Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* 56 : 688-695.
- 62- **JOSHI S.R., 2006**. Biopesticides, a biotechnological approach. 74-76.
- 63-**BERGSMA-VLAMI, M., PRINS, M. E. AND RAAIJMAKERS, J.M. (2005)**. Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52(1):59-69.
- 64- **PUNJA, Z.K. ET UTKHEDE, R.S. (2003)** Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* 21 : 400-407.
- 65- **IAVICOLI, A., BOUTET, E., BUCHALA, A. AND MÉTRAUX, J.P. (2003)** Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 851- 858.
- 66- **HINSINGER P. AND MARSCHNER P. (2006)** Rhizosphere—perspectives and challenges—a tribute to Lorenz Hiltner 12–17 September 2004- Munich, Germany. *Plant and Soil* 283: vii–viii.
- 67- **WELLER, D.M., VAN PELT, J.A., MAVRODI, D.V., PIETERSE, C.M.J., BAKKER, P.A.H.M. AND VAN LOON, L.C. (2004)**. Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv.

tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. 94(S108).

- 68- **ROMEIRO R. S., LANNA FILHO R., VIEIRA JUNIOR J. R., SILVA H.S. A., 2005.** Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. *Journal of phytopathology* 153: 120-123.
- 69- **WEBSTER G., GOUGH C., VASSE J., BATCHELOR C. A., O'CALLAGHAN K. J., KOTHARI S. L., DAVEY M. R., DÉNARIÉ J., AND COCKING E. C. (1997).** Interaction of rhizobia with rice and wheat. *Plant Soil*. 194: 115- 122.
- 70- **LODEWYCKX C., VANGRONSVELD J., PORTEOUS F., MOORE E.R.B., TAGHAVI S., MEZGEAY M. AND VAN DER LELIE D. (2002).** Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Review in Plant Science* 21: 583-606.
- 71- **ROSENBLUETH M. AND MARTÍNEZ-ROMERO E. (2006).** Bacterial endophytes and their interaction with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 827-837.
- 72- **GYANESHWAR P., JAMES E. K., MATHAN N., REDDY P. M., REINHOLD-HUREK B. AND LAQHA J. K. (2001).** Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia macescens*. *J. Bacteriol.* 183:2634-2645.
- 73- **BODDEY R. M. AND DÖBEREINER J. (1982).** Association *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical gramineae. In: *International Congress of Soil Science, 12, New Delhi, India*. Non-symbiotic nitrogen fixation and organic matter in the tropics, p. 28- 47.
- 74- **STURZ A.V., CHRISTIE B.R., MATHESON B.G., ARSENAULT W.J. AND BUCHANAN N.A. (1999).** Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology*, 48, 360-369.

- 75- **COMPANT S., DUFFY B., NOWAK J., CLÉMENT C. AND BARKA E.A. (2005A)** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- 76- **GAUR R., SHANI N., KAWALJEET, JOHRI B. N., ROSSI P. AND ARAGNO M. (2004)**. Diacety phlorogluconol-producing *Pseudomonas* do not influence AM fungi in wheat rhizosphere. *Curr. Sci.* 86: 543- 557.
- 77- **SMAIN KH., KHOFDJA R., 2010**. Pouvoir antagoniste d'isolats bactériens endophytes de diverses plantes adventices à l'égard d'une gamme de bactéries phytopathogènes. Thèse d'ingénieur phytopathologie. Université de Blida.
- 78- **LONG H.H., FURUYA N., KUROSE D., TAKESHITA M., TAKANAMI Y., 2003**. Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their Antibacterial Activity against Plant Pathogenic Bacteria. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 48: 21-28.
- 79- **HILDEBRAND D.C., SCHROTH M.N., SAND D. C., 1988**. In plant pathogenic bacteria, laboratory guide for identification, in Schaad (Ed) N.W.APS. Minnesotc. USA, 158p.
- 80- RYU, E., 1938. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *J Jpn Soc Vet Sci* 17, 31.**
- 81- **KING E. O., WARD M. K., RANEY D.E., 1954**. Two simple media for the demonstration of pyocynin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44, 301-307.
- 82- **DICKEY R .S. KELMAN A., 1988**. In plant pathogenic bacteria, laboratory guide for identification, Schaad (Ed) N.W.APS. Minnesotc.USA, 158p.
- 83- **HUGH R., LEIFSON E., 1953**. The taxonomic significance of fermentation versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacterial.* 66, 24-26p.

- 84- **SCHAAD, N.W. 1988.** Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd Edition. Pp. 44-81.
- 85- **LELLIOTT R.A., DICKEY R.S., 1984.** Genus VII. *Erwinia* . In : Bergey's manual of systematic bacteriology, 469-476 p. Williams and Wilkins, Baltimore, Etats-Unis.
- 86- **KLEMENT, Z., FARKAS, G.L., LOVREKOVICH, L., 1964.** Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. *Phytopathology* 54, 474–477.
- 87- **YABUUCHI E., SMITH J., 1999:** la lutte contre *Ralstonia solanacearum*, 1-34 p.
- 88- **AMANN, R. I., W. LUDWIG, AND K. H. SCHLEIFER. 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143–169.
- 89- **PIOUS T. ET AL., 2008.** *Plant cell Tiss. Organ. Cult.* 93 : 55-63.
- 90- **HAUBEN, L., MOORE, E. R. B., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT, J., VERDONCK, L. & SWINGS, J. 1998.** Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol* 21, 384–397.
- 91- **MOORE L.W., KADO C.I., BOUZAR H., 1988.** *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 158.2<sup>nd</sup> ed., Vol.
- 92- **KOCH A. L., 1981.** Growth measurement. In. Gerhardt, P. et al., eds. *Manual of Methods of general Bacteriology*. A. Z. M., pp 179-207.
- 93- **XU, X.Q., PAN, S.Q., 2000.** An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis. *Molecular Microbiology*. 35, 407-414.
- 94- **PORTIER P., 2004.** Sélection d'écotypes bactériens pathogènes et non pathogènes par la plante en relation avec la différenciation en espèces génomiques chez *Agrobacterium spp.* L'Université Claude Bernard –Lyon

1. thèse de doctorat. Laboratoire d'Ecologie Microbienne- Université Claude Bernard- UMR CNRS 5557 – USC INRA 1193 Bat. Gregor Mendel -43, Bd du 11 novembre 1918- 69622 Villeurbanne Cedex. 123p.
- 95- **DJELLOUT H., 2009-** Evaluation du pouvoir antibactérien de quatre plantes spontanées. *thes ing phytopathol* . Univ Blida. 60 p.
- 96-**BARDIN S.D., HUANG H.C., LIU L. & YANKE L.J., 2003** – Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, safflower, dry pea, and sugar beet. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25 (3).
- 97- **RAPILLY F., 1968.** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des épiphytes* 19 (No. H.S). 1-102p
- 98- **BOUZAR H., DAOUZLI N., KRIMI Z., ALIM A. AND KHEMICI E., 1991.** Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie* 11 : 901-908.
- 99- **VICEDO, B., R. PENˆALVER, M. J. ASINS, AND M. M. LO´PEZ. 1993.** Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra2 mutant strain K1026. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:309–315.
- 100- **GUESSAS B. HADADJI M., 2009.** Promouvoir la croissance et rendement de certaines plantes maraichères par bactérisation des graines. Cas des *Pseudomonas fluorescens*. Université Es-senia Oran El menaouer, Oran, Algérie. *Congrès international : "Biotechnologie microbienne au service du développement". The International Congress : "Microbial Biotechnology for Development"*. (MICROBIOD 2009). 02-05 Novembre 2009, Marrakech – MAROC.p146
- 101- **POLYMNIA P. ANTONIOU, SPYROS M. CHRISTOGLU, ELEFThERIOS C. TJAMOS, 2004.** Glasshouse and field evaluation of the antagonistic rhizosphere bacteria *Bacillus subtilis* 5-127 and *Paenibacillus alvei* K-165 in

controlling *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* of tomatoes. Working groups: biological control of fungal and bacterial plant pathogens integrated control in protected crops, temperate climate. S. Michele all'Adige, Trentino, Italy 9-13 June 2004. Abstract, p. 126.

- 102- **KENNETH C. EASTWELL, PETER L. SHOLBERG, RONALD J. SAYLER, 2006.** Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. Crop Protection. p3.
- 103- **HAMMER O., HARPER D.A.T., ET RYAN P. D., 2001-** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- 104- **PHILIPPEAU G., 1986.** Comment interpréter les résultats d'analyse en composantes principales (ACP). Institut technique des céréales et fourrages (ITCF), Paris.
- 105- **ZINNIEL DK, P LAMBRECHT, NB HARRIS, Z FENG, D KUCZMARSKI, P HIGLEY, CA ISHIMARU, A ARUNAKUMARI, RG BARLETTA AND AK VIDAVER. 2002.** Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Appl. Environ. Microbiol. 68:2198- 2208.
- 106- **LÉVESQUE C.A. & DE COCK A.W.A.M., 2004** – Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. Mycological Research 108(12): 1363-1383.
- 107- **RIVIERRE C., LAPRIE C., GUIARD-MARIGNY O., BERGEAUD P., BERTHELEMY M.& GUILLOT J., 2005** – Pythiosis in Africa. Emerging infectious diseases 11(3): 479- 481.
- 108- **DORRANCE A.E., BERRY S.A., BOWEN P.& LIPPS P.E., 2004** – Characterization of *Pythium* spp. From three Ohio fields for pathogenicity on corn and soybean and metalaxyl sensitivity. Plant Health Progress.

- 109- **SUNISH KUMAR R., AYYADURAI N., PANDIARAJA P., REDDY A.V., VENKATESWARLU Y., PRAKASH O. & SAKTHIVEL N., 2005** – Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of Applied Microbiology* 98 (1): 145-154.
- 110- **LOU B.G., HARVEY P.R., WARREN R.O., ZHANG B.X. & RYDER M.H., 2000** – Biological control of damping-off caused by ridomil-resistant *Pythium*. Proceedings of 5th International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Auburn University, Cordora, Argentina.
- 111- **ALLAIRE M., 2005**. Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. pp 5-10.
- 112- **STURZ, A.V., B.R. CHRISTIE, AND B.G. MATHESON. 1998**. Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Can. J. Microbiol.* 44, 162-167.
- 113- **ARAÚJO, W.L., W. MACCHERONI, JR., C.I. AGUILAR-VILDOSO, P.A.V. BARROSO, H.O. SARIDAKIS, AND J.L. AZEVEDO. 2001**. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47, 229-236.
- 114- **RAUPACH, G.S. AND J.W. KLOEPPER. 1998**. Mixtures of plant growthpromoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88, 1158-1164.
- 115- **SCHROTH, M.N. ET AL. (1988)**. Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant Dis.* 72, 241–246
- 116- **LEPOIVRE P. & SEMAL J., 1989** – La lutte biologique en Phytopathologie. In Semal J. Ed. *Traité de Pathologie végétale* Gembloux. Press Agronomique : 465-487.

- 117- **JAMES T.Y., PORTER D., LEANDER C.A., VILGALYS R. & LONGCORE J.E., 2000** –Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany* 78: 336-350.
- 118- **BURR, T. J., AND L. OTTEN. 1999.** Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:58-80.
- 119- **HAYMAN G.T., FARRAND S.K., 1988.** Characterization and mapping of the agrocinopine-agrocin 84 locus on the Nopaline Ti plasmid pTiC58. *Journal of Bacteriology* 170: 1759-1767.
- 120- **CHEN F., GUO Y. B., WANG J. H., LI J. Y., WANG H. M., 2007.** Biological Control of Grape Crown Gall by *Rahnella aquatilis* HX2. Department of plant pathology. University, Beijing 100094, PR. China.7p
- 121- **HAMMAMI I., RHOUMA A., JAOUADI B., REBAI A., NESME X., 2009.** Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. *Strains*.253-260.
- 122- **CHEN, C. 1999.** Induced systemic resistance against *Pythium aphanidermatum* by plant Growth Rhizobacteria (PGPR) on Cucumber (*Cucumis sativus* L.), PhD thesis, McGill University, Montreal, Canada.
- 123- **WELLER D. M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379- 407.
- 124- **RAIO A., ZOINA A., MOORE L.W., 1997.** The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria. *Plant Pathol.* 46:320-328.
- 125- **KAWAGUCHI A., SAWADA H., ICHINOSE Y., 2008.** Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. *Plant pathol.* 57: 747-753.

- 126- **SWAIN, M.R., RAY, R.C., 2009.** Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiol. Res.* 164, 121–130.
- 127- **PARKE J.L., GURIAN-SHERMAN D., 2001.** Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology* 39: 225-258.
- 128- **LOEFFLER, W., TSCHEN, S.M., VAMITTANAKOON, N., KUGLER, M., KNORPP, E., HSIEH, T.F., AND WU, T.G., 1986.** Antifungal Effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A Comparison With Activities of Other *Bacillus* Antibiotics, *Journal of Phytopathology*, 115, 204- 213 (1986).
- 129- **EASTWELL K.C., SHOLBERG P.L. ET SAYLER R.J., 2006.** Characterizing potential bacterial biocontrôle agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Prot.* 25, 1191-1200.
- 130- **DI FIORE, S. DEL GALLO, M., 1995.** Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.;vVANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. (Ed.) *Azospirillum* VI and related microorganisms. Berlin: Springer-Verlag, p.169-187.
- 131- **MARTINEZ, C., MICHAUD, M., BELANGER, R. R. AND TWEDDELL, R. J. (2002)** Identification of soils suppressive against *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1861-1868.
- 132- **SILO-SUH, L. A., LETHBRIDGE, B. J., RAFFEL, S. J., HE, H., CLARDY, J. AND HANDELSMAN, J. (1994)** Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2023-2030.
- 133- **PLEBAN, S., CHERNIN, L. AND CHET, I. (1997)** Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 284-288.

- 134- **SADFI, N.; CHERIF, M.; FLISS, I.; BOUDABBOUS, A.; ANTOUN, H, 2001.**  
Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, v.83, p.101-118.
- 135- **MARTINEZ, C. MICHAUD, M. BELANGER, R.R. TWEDDELL, R.J., 2002.**  
Identification of soils suppressive against *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Soil Biology and Biochemistry*, v.34, p.1861-1868
- 136- **PRATHUANGWONG, S. AND S. KASEM. 2003.** Potential of new antagonists for controlling bacterial pustule increasing soybean yield and reducing bactericide application. pp. 29-3.26. *In Proc. of the Summary of the 8th Internat. Con. of Plant Pathology*. Christchurch.
- 137- **RAN L.X., LIU C.Y., WU G.J., VAN LOON L.C., BAKKER P.A.H.M., 2005.**  
Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biological Control* 32: 111-120.
- 138- **KHEMEL I.A., SOROKINA T.A., LEMMANOVA N.B., LIPASOVA V.A., METLITSKI O.Z., BURDEINAYA T. V., CHERNIN L.S., 1998.** Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. *Biocontrôle Sci. technol.* 8: 45-57.
- 139- **BRISBANE, P. G. AND A. D. ROVIRA, 1988.** Mechanisms of inhibition of *Gaeumomyces graminis* var. *tritici* by fluorescent pseudomonads. *Plant Pathol.*, 37: 104-111
- 140- **SIDDIQUI I.A., 2001** - Effect of Microbial Antagonists on *in vitro* Growth of *Pythium aphanidermatum*. *OnLine Journal of Biological Sciences* 1 (4): 224-226
- 141- **LINDOW S.E., 1988** – Lack of correlation of *in vitro* antibiosis with antagonism of ice nucleation active bacteria on leaf surfaces by non-ice nucleation active bacteria. *Phytopathology* 78 : 444-450.

- 142- **COMMARE R.R., NANDAKUMAR R., KANDAN A., SURESH S., BHARTHI M., RAGUCHANGER T., SAMIYAPPAN R., 2002.** *Pseudomonas fluorescens* based formulation for the management of sheath blight disease and leaf folder insect in rice. *Crop Protection* 21: 671-677.
- 143- **KIM H.S, PARK J., CHOI S.W., CHOI K.H., LEE G.P., BAN S.J., LEE H.L., KIM C.S., 2003.** Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *The Journal of Microbiology* 41: 196-201.
- 144- **YAO J, ALLEN C (2006).** Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol* 188: 3697–3708
- 145- **KIM H.S, PARK J., CHOI S.W., CHOI K.H., LEE G.P., BAN S.J., LEE H.L., KIM C.S., 2003.** Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *The Journal of Microbiology* 41: 196-201.
- 146- **ARANDA E., SANCHEZ J., PEFEROEN M., GUERECA L., BRAVO A., 1996.** Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* *frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Invertebr pathol* 68, 203-212
- 147- **DE BOER, S.H. 2003.** Characterization of pectolytic *erwinias* as highly sophisticated pathogens of plants. *Eur J Plant Pathology* 109: 893-899.
- 148- **TON J., VAN DER ENT S., VAN HULTEN M., POZO M., VAN OOSTEN V., VAN LOON L.C., MAUCH- MANI B., TURLINGS T.C.J. AND PIETERSE C.M.J. (2007).** Priming as a mechanism behind induced resistance against pathogens, insects and abiotic stress. In: *Breeding for Inducible Resistance Against Pests and Diseases* (Mauch-Mani B., Dicke M. and Schmidt A., eds), *IOBC/WPRS Bulletin*, in press.
- 149- **BRUCE, T.J.A., MATTHES, M.C., NAPIER, J.A. AND PICKETT, J.A. (2007).** Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* 173(6):603-608.

- 150- **TRIGALET, A., P. FREY AND D. TRIGALET-DEMERY 1994.** Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: State of the art and understanding. In "Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*" ed. by A. C. Hayward and G. L. Hartman. CABI, pp. 225-231.
- 151- **KNUDSEN, I.M.B., HOCKENHULL, J., FUNCK JENSEN, D., GERHARDSON, B., HÔKEBERG, M., TAHVONEN, R., TEPERI, E., SUNDHEIM, L. & HENRIKSEN, B. 1997.** Sélection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 775-784.
- 152- **ANONYME, 1989.** Food Production and Inspection Branch. *In : Agrobacterium Radiobacter* (Beijerinck and Van Delden) Conn. Direction des pesticides Agriculture Canada. Ottawa (Ontario). 21p.
- 153- **REDDY M.S., AXELROOD P.E., RADLEY R., RENNIE R.J., 1994:** Evaluation of bacterial strains for pathogen suppression and enhancement of survival and growth of conifer seedlings. In: Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Proceedings of the 3rd International Workshop PGPR. Eds M.H. Ryder, P.M. Stephens, G.D. Bowen. CSIRO Div. Soils, Adelaide, Australia: 75–76.
- 154- **HAAS D. & DEFAGO G., 2005 –** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology* | Advance Online Publication, publié online 10 March 2005; doi:10.1038/nrmicro1129.
- 155- **KLEOPPER J. W. AND BEAUCHAMP C. J. (1992).** A review of issues related to measuring colonization of plant root by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38:1219-1232.
- 156- **RAMAMOORTHY V., SAMIYAPPAN R., 2001.** Induction of defense related genes in *Pseudomonas fluorescens* treated chilli plants in response to infection by *Colletotrichum capsici*. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 31: 146-155.

- 157- **MPIGA P. BÉLANGER RR. PAULITZ TC AND BENHAMOU N (1997).** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Radicis-Lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium. *Pseudomonas fluorescens*, strain 63-28. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50, 301-320.
- 158- **RYAN A.D., KINKEL L.L., SCHOTTEL J.L., 2004.** Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. *Biocontrol Science and Technology* 14: 301-311.
- 159- **MILLAR R.L., KALB D.W. & KEINATH A.P., 1984** – Biological and chemical control of *verticillium* wilt of alfalfa. *Phytopathology* 74 (7): 805.
- 160- **MUHAMMAD S. & AMUSA N.A., 2003** – In-vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost-inhabiting microbes. *African Journal of Biotechnology* 2 (6): 161-164.
- 161- **BECHARD, J., 1993.** Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus subtilis*. M.Sc. Thesis, Department of Food Science, University of British Columbia, Vancouver, BC.
- 162- **VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A., AND C.M., PIETERSE. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 1998;36:453-483.
- 163- **WELLER, D.M., VAN PELT, J.A., MAVRODI, D.V., PIETERSE, C.M.J., BAKKER, P.A.H.M. AND VAN LOON, L.C., 2004.** Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology.* 94(S)108.
- 164- **BUENSANTEAI, N., D. ATHINUWAT, AND S. PRATHUANGWONG. 2007.** *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* caused agent soybean bacterial pustule with increased phenolic compounds and phenylalanine ammonia lyase. Proc of the 45th Kasetsart University Annual Conference. Thailand.

- 165- **ONGENA, M., E. JOURDAN, A. ADAM, M. PAQUOT, A. BRANS, B. JORIS, J.L. ARPIGNY AND P. THONART. 2007.** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084-1090.
- 166- **SCHUEGGER, R., IHRING, A., GANTNER, S., BAHNWEIG, G., KNAPPE, C., VOGG, G., ET AL (2006)** Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29: 909-918.
- 167- **RIGGLE, J. H. AND KLOS, E.J., 1970.** Inhibition of *Erwinia amylovora* by *Erwinia herbicola* .(Abstract) *Phytopathology.* 60: 1310.
- 168- **PELUSO R, RAI0 A, MORRA F, ZOINA A, 2003.** Physiological, biochemical and molecular analyses of an Italian collection of agrobacterium strains. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 291–300.
- 169- **KENNEDY B.W., ALCORN S.M., 1980.** Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease* 64: 674-676.
- 170- **BENJAMA A. ET DAOUD S., 1989.** Caractérisation en biovar d'isolats marocains d'Agrobacterium issus de tumeurs racinaires des rosacées fruitières. *Agronomie* 9 : 897-902.
- 171- **PIONNAT S., 1992.** Recrudescence du crown gall du rosier : caractérisation biochimique et moléculaire d'une population d'*Agrobacterium tumefaciens* et implication de la systémie de la bacterie dans l'épidémiologie de la maladie. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon1.
- 172- **ZHAO J.L., CAI X.Y., LI J., ZHANG Y.,PENG Y., ZHOU L.G., 2008.** Endophytic fungi from rhizomes of *Paris polyphylla* var.yunnanensis and their antibacterial activity. *Journal of Biotechnology*; 136S:S60 7–19.
- 173- **ROSENBLUETH M. AND MARTÍNEZ-ROMERO E. (2006).** Bacterial endophytes and their interaction with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 827-837.

- 174- **HONGSHENG Y., LEI Z., LIN L., CHENGJIAN Z., LEI G., WENCHAO L., PEIXIN S., LUPING Q., 2009.** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*. 1-13
- 175- **MOORE L.W., KADO C.I., BOUZAR H., 1988.** *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 158.2<sup>nd</sup> ed., Vol.
- 176- **TRIGALET, A., P. FREY AND D. TRIGALET-DEMERY 1994.** Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: State of the art and understanding. In "Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*" ed. by A. C. Hayward and G. L. Hartman. CABI, pp. 225-231
- 177- **COMPANT S., DUFFY B., NOWAK J., CLÉMENT C. AND BARKA E.A. (2005A)** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- 178- **JEUN Y. C., PARK K. S., KIM C. H., FOWLER W. D. & KLOEPPER J. W., 2004** – Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biol. Control* 29:34–42.R
- 179- **KRIMI Z., RAIQ A., PETIT A., NESME X., DESSAUX Y., 2006.** Eucalyptus (*E. occidentalis*) plantlets may be naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *Eur. J. Plant Pathol.* 116:237-246.
- 180- **STONIER L., 1960.** *Agrobacterium tumefaciens* (Conn II) – Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology* 79 : 880-898.
- 181- **YONG-FANG CHEN AND YAN-NI YIN. 2007.** *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola*, A New Pathovar of Pathogens in Sugar Beet. *Plant Disease*. Vol. 91 No. 6.

- 182- **BOSSIS, E., LEMANCEAU, P., LATOUR, X., AND L. GARDAN. 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20, 51-53.

## ANNEXE 1

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

CFU	unité de colonie formée
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Log	fonction logarithmique
%	pourcentage
ml	millilitre
µl	microlitre
g	gramme
mm	millimètre
cm	centimètre
al.	collaborateurs
D.O	Densité optique
°C	Degré Celsius
pH	potentiel Hydrogène
QS	Quorum Sensing
AHL	N-acyl-homoserine lactone
TTSS	Type Three Secretion System
LPS	Lipopolysaccharides
<i>hrp</i>	hypersensitive response and pathogenicity genes
PCR	reaction de polymerisation en chaine
RFLP	polymorphisme en longueur des fragments de restriction
LB	bouillon de Luria Bertani
HR	réaction d'hypersensibilité
ISR	résistance systémique induite
PGPR	plant growth promoting rhizobacteria
Taq	Thermophilus aquaticus
protéine PR	protéine "pathogenesis related"
SAR	résistance systémique acquise
var.	variété

## ANNEXE 2

### Compositions des milieux de cultures utilisés

(Données pour un litre de milieu)

#### 1. Milieu LPGA (levure peptone glucose agar)

Bactopeptone                    5g

Extrait de levure    5g

Glucose                    10g

Agar                        15g

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

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

#### 2. Milieu pour le test d'hydrolyse de l'amidon (Bien et *al.*, 1990)

Extrait de levure    2,5g

Amidon                    10g

Agar                        9g

Ajuster le pH 7,2. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

#### 3. Milieu pour le test d'hydrolyse de la gélatine (Gardan et Luisetti, 1981)

Extrait de levure    3g

Bactopeptone                    5g

Gelatine                    12g

pH =7,2. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

#### 4. Milieu Arginine (Gardan et Luisetti, 1981)

Arginine mono Hcl   10g

Bactopeptone                    1g

NaCl                        5g

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3g
Rouge de phénol	0,01g
Gélose	3g
Eau distillée	1000ml

pH= 7,2, autoclaver pendant 20mn à 120°C

#### **5. Milieu de levane (Hilbedrand et al., 1988)**

Extrait de levure	2g
Bactopeptone	5g
NaCl	5g
Saccharose	50g
Eau distillée	1000ml

pH =7, autoclaver pendant 20mn à 120°C.

#### **6. Milieu B de king (King et al., 1954)**

Peptone	20g
Glycerol	15ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5g
MgSO <sub>4</sub>	1, 5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH =7, autoclaver pendant 20mn à 120°C.

#### **7. Milieu liquide d'indole (Lelliott et Dickey, 1984)**

Peptone	20g
NaCl	5g
Eau distillée	1000ml

pH =7,2, stérilisé pendant 20minutes à 120°C.

**8. Sucrose peptone agar :**

Sucrose	20.0 g/l
Peptone	5.0 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g/l
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25g/l
Agar	12g/l
H <sub>2</sub> O distillée	1l

pH =7,2, stérilisé pendant 20minutes à 120°C.

**9. Milieu High et Leifson :**

Bacto tryptone	2g/l
Nacl	5g/l
PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> H	0,3g/l
Bleu de Bromothymol	0,03g/l
H <sub>2</sub> O distillée	1000ml

pH =7,2, stérilisé pendant 20minutes à 120°C.

## ANNEXE 3

La liste des isolats de bactéries antagonistes avec leurs zones d'inhibition *in vitro* envers *Agrobacterium tumefaciens* C58 [28].

Plantes spontanées	Isolats de bactéries antagonistes avec leur code	Diamètre de zone d'inhibition <i>A.tumefaciens</i> C58
<i>Plantago lanceolata</i>	Pa2	35,3 mm
	PR1	27,3 mm
	PR2	33,6 mm
	PS1	27 mm
	PF3	37,3 mm
<i>Calendula arvensis</i>	CR1	36,6 mm
	CR2	30 mm
	CR3	21,6 mm
	CS1	29,3 mm
	CF1	30,6 mm
	CF2	28,3 mm
<i>Urtica dioica</i>	OR1	mm
	OR2	40 mm
	OR3	21,6 mm
	OF1	30 mm
	OS1	20 mm
	OS2	35 mm
	OS3	20,3 mm
	OS4	30,3 mm
	OS5	21,3 mm
	OS6	30,6 mm
	Oa1	23,6 mm
	Oa2	21,3 mm
	Oa3	32,3 mm
<i>Euphorbia helioscopia</i>	EHF2	20,6 mm
	EHF3	20 mm
	EHF4	20,3 mm
	EHF5	33 mm
	EHA1	24,3 mm
	EHA1	24,3 mm
	EHR1	21 mm
	EHR2	31,6 mm
<i>Euphorbia peplus</i>	EPA4	24 mm
	EPR3	25,6 mm
	EPS1	30 mm
	EPS2	33,3 mm
	EPS3	27,3 mm
	EPS4	32 mm
	EPF1	35,6 mm
	EPF4	37,6 mm

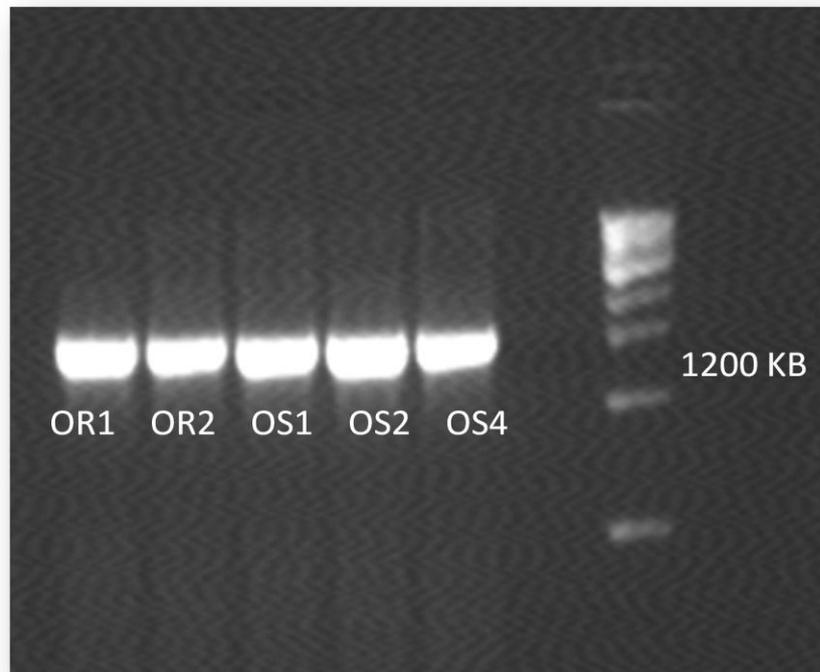
## ANNEXE 4

### Les caractères cultureux des trente-neuf isolats endophytes cultivés sur milieu LPGa pendant 24h à 28°C.

Listes	Couleur de la colonie	diamètre	croissance	Forme de relief	aspect	Allure de contour
Pa2	jaune	0,5 mm	24h moyenne	non élevé	collant	irrégulier
PR1	jaune claire	3 mm	24h rapide	non élevé	farineux	régulier
PR2	jaune	1 mm	24h rapide	élevé	crèmeux	régulier
CR1	blanche	4 mm	24h rapide	Légèrement surélevé	collant	régulier
CR2	jaune	0,5 mm	24 rapide	élevé	collant	régulier
CR3	jaune	1 mm	24h moyenne	élevé	collant	régulier
Oa1	beige	1 mm	24h rapide	non élevé	collant	irrégulier
Oa2	jaune	0,5-1 mm	24h rapide	surélevé	lisse	régulier
Oa3	jaune	1 mm	24h rapide	surélevé	lisse	régulier
OR1	Blanc crème	1 mm	24h rapide	surélevé	lisse	régulier
OR2	Blanc crème	4 mm	24h rapide	surélevé	lisse	régulier
OR3	jaune	0,5 mm	24h rapide	non élevé	collant	irrégulier
OS1	blanc crème	2 mm	24h rapide	élevé	collant	régulier
OS2	Jaune crème	2 mm	24h rapide	élevé	lisse	régulier
OS3	jaune	1 mm	24h rapide	élevé	lisse	
OS4	Blanc crème	3 mm	24h rapide	élevé	lisse	irrégulier
OS5	jaune foncé	3 mm	24h rapide	élevé	collante	irrégulier
OS6	jaune	1 mm	24h rapide	élevé	crèmeux	régulier
PF3	Blanc crème	2 mm	24h rapide	surélevé	collant	irrégulier
PS1	jaune claire	2 mm	24h rapide	élevé	collant	irrégulier
CF1	jaune claire	3 mm	24h rapide	non élevé	lisse	irrégulier
CF2	blanc crème	0,5 mm	24h rapide	non élevé	crèmeux	régulier
Cs1	jaune claire	2 mm	24h rapide	élevé	collant	régulier
OF1	beige	1 mm	24h rapide	non élevé	crèmeux	régulier
EHF2	blanc clair	2 mm	24h rapide	non élevé	crème	irrégulier
EHF3	jaune	2 mm	24 rapide	élevé	collant	irrégulier
EHF4	blanc cassé	3 mm	24h rapide	élevé	collant	régulier
EHF5	jaune claire	3 mm	24h rapide	non élevé	collant	irrégulier
EPF1	blanche	3 mm	24h rapide	non élevé	lisse	régulier
EPF4	jaune	1 mm	24h rapide	non élevé	lisse	régulier
EHA1	jaune claire	2 mm	24h rapide	élevé	crèmeux	régulier
EHR1	beige	2 mm	24h rapide	non élevé	lisse	régulier
EHR2	Blanc crème	3- 5 mm	24h rapide	élevé	collant	irrégulier
EPA4	jaune	3 mm	24h rapide	non élevé	collant	irrégulier
EPR3	jaune luisante	1-2 mm	24h rapide	non élevé	lisse	régulier
EPS1	jaune claire	1 mm	24h rapide	non élevé	lisse	régulier
EPS2	jaune	1 mm	24h rapide	non élevé, plat	lisse	régulier
EPS3	Blanc crème	4 mm	24h rapide	surélevé	lisse	irrégulier
EPS4	jaune claire	0,5 mm	24h rapide	non élevé	collant	régulier

## ANNEXE 5

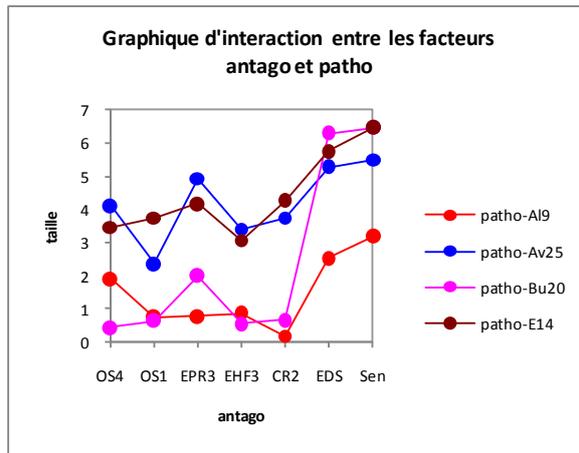
Identification moléculaire par utilisation du marqueur moléculaire l'ADNr 16S



**Figure :** Migration sur gel d'agarose (2%) des produits d'amplification du 16S des souches OR1, OR2, OS1, OS2, OS4.

## ANNEXE 6

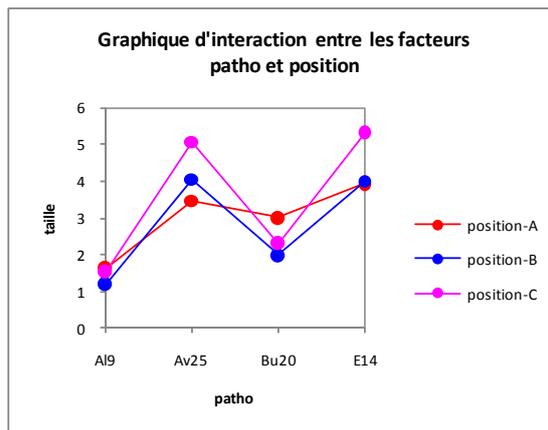
## Pouvoir antagoniste des souches endophytes contre la galle du collet



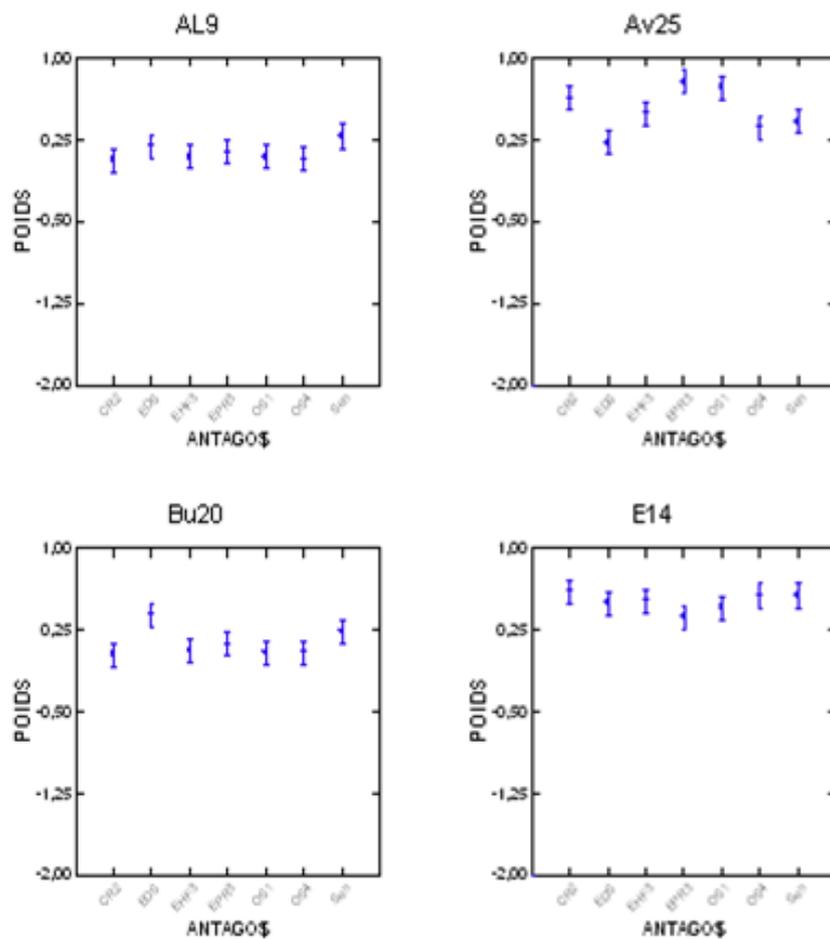
**Figure :** Effet des souches antagonistes sur le développement de la galle du collet.

**OS4, OS1, EPR3, EHF3, CR2 :** plants trempés par les souches antagonistes et inoculés par les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium* sp. : **AL9/95, Bu20/95, Av25/95 et E14.**

**EDS :** plants trempés eau distillée stérile antagonistes et inoculés par les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium* sp., **Sen :** plants inoculés directement par les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium* sp.

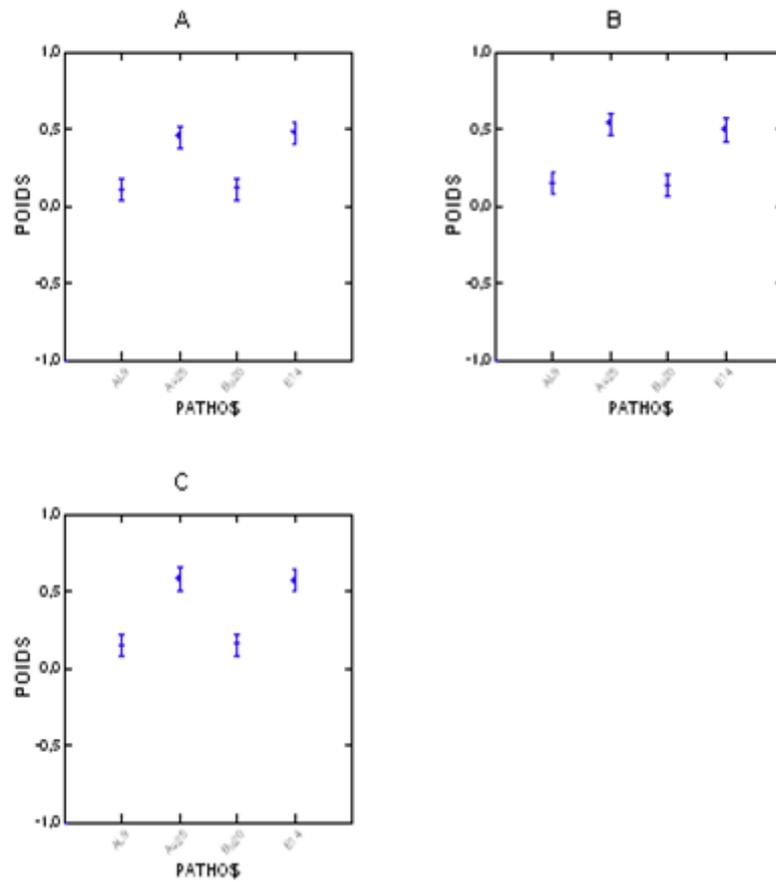


**Figure :** Effet du trempage des plantules de tomate dans la suspension des bactéries antagonistes sur l'expression des souches d'*Agrobacterium* spp. en fonction de la position de la blessure sur la tige (Position A : au niveau de la partie supérieur de la tige, position B : au milieu de la tige et position C : au niveau du collet).



**Figure :** Effet des souches antagonistes sur le poids des tumeurs causées par les souches d'*Agrobacterium* spp.

**Al :** souche AL9/95 d'*Agrobacterium vitis*,  
**Av:** souche AV25/95 d'*Agrobacterium vitis*,  
**Bu :** souche BU20/95 d'*Agrobacterium vitis*,  
**E14 :** souche E14 d'*Agrobacterium tumefaciens*.



**Figure :** Effet du trempage des plantules de tomate dans la suspension bactérienne d'antagonisme sur l'expression des souches d'*Agrobacterium spp.* testées (poids des tumeurs) en fonction des position des blessures sur la tiges.

## ANNEXE 7

### Test d'antagonisme *in vivo*: souche antagoniste EPR3 envers la souche AI9/95 d'*A.vitis* (taille des tumeurs)

antago	patho	temps	position	taille
EPR3	AI9	s1	A	0,00
EPR3	AI9	s1	A	0,00
EPR3	AI9	s1	A	0,00
EPR3	AI9	s1	B	0,00
EPR3	AI9	s1	B	0,00
EPR3	AI9	s1	B	0,00
EPR3	AI9	s1	C	0,00
EPR3	AI9	s1	C	0,00
EPR3	AI9	s1	C	0,00
EPR3	AI9	s2	A	0,00
EPR3	AI9	s2	A	0,00
EPR3	AI9	s2	A	0,00
EPR3	AI9	s2	B	0,00
EPR3	AI9	s2	B	0,00
EPR3	AI9	s2	B	0,00
EPR3	AI9	s2	C	0,00
EPR3	AI9	s2	C	0,00
EPR3	AI9	s2	C	0,00
EPR3	AI9	s3	A	0,00
EPR3	AI9	s3	A	0,00
EPR3	AI9	s3	A	0,00
EPR3	AI9	s3	B	0,00
EPR3	AI9	s3	B	0,00
EPR3	AI9	s3	B	0,00
EPR3	AI9	s3	C	0,00
EPR3	AI9	s3	C	0,00
EPR3	AI9	s3	C	0,00
EPR3	AI9	s4	A	0,00
EPR3	AI9	s4	A	0,00
EPR3	AI9	s4	A	0,00
EPR3	AI9	s4	B	0,00
EPR3	AI9	s4	B	0,00
EPR3	AI9	s4	B	0,00
EPR3	AI9	s4	C	0,00
EPR3	AI9	s4	C	0,00
EPR3	AI9	s4	C	0,00

<b>antago</b>	<b>patho</b>	<b>temps</b>	<b>position</b>	<b>taille</b>
EPR3	Al9	s5	A	1,81
EPR3	Al9	s5	A	2,26
EPR3	Al9	s5	A	2,35
EPR3	Al9	s5	B	0,00
EPR3	Al9	s5	B	0,00
EPR3	Al9	s5	B	0,00
EPR3	Al9	s5	C	0,00
EPR3	Al9	s5	C	0,00
EPR3	Al9	s5	C	0,00
EPR3	Al9	s6	A	2,03
EPR3	Al9	s6	A	3,18
EPR3	Al9	s6	A	3,88
EPR3	Al9	s6	B	0,00
EPR3	Al9	s6	B	0,00
EPR3	Al9	s6	B	0,00
EPR3	Al9	s6	C	0,00
EPR3	Al9	s6	C	0,00
EPR3	Al9	s6	C	0,00
EPR3	Al9	s7	A	2,76
EPR3	Al9	s7	A	3,85
EPR3	Al9	s7	A	4,10
EPR3	Al9	s7	B	0,00
EPR3	Al9	s7	B	0,00
EPR3	Al9	s7	B	0,00
EPR3	Al9	s7	C	0,00
EPR3	Al9	s7	C	0,00
EPR3	Al9	s7	C	0,00
EPR3	Al9	s8	A	3,00
EPR3	Al9	s8	A	4,20
EPR3	Al9	s8	A	6,26
EPR3	Al9	s8	B	1,51
EPR3	Al9	s8	B	0,00
EPR3	Al9	s8	B	0,00
EPR3	Al9	s8	C	0,00
EPR3	Al9	s8	C	0,00
EPR3	Al9	s8	C	0,00
EPR3	Al9	s9	A	4,20
EPR3	Al9	s9	A	5,00
EPR3	Al9	s9	A	7,88
EPR3	Al9	s9	B	3,45
EPR3	Al9	s9	B	0,00
EPR3	Al9	s9	B	0,00
EPR3	Al9	s9	C	1,65
EPR3	Al9	s9	C	0,00
EPR3	Al9	s9	C	0,00