

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

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences

Agronomiques

Spécialité : Phytopathologie

**BIOPROTECTION PAR INDUCTION D'UNE RESISTANCE
SYSTEMIQUE (ISR) VIS A VIS D'AGROBACTERIUM SPP.
AGENT DU CROWN GALL**

Présentée par : DJELLOUT Hafidha

Devant le jury composée de :

Pr. DJAZOULI Z.E.	U.S.D., Blida	Président
Pr. BOUREGHDA H.	E.N.S.A, El Harrach	Examinatrice
Pr. CHEMAT Z.	U.S.D., Blida	Examinatrice
Pr. MEFTI M.	E.N.S.A, El Harrach	Examineur
Dr. TAOUTAOU A.	E.N.S.A, El Harrach	Examineur
Pr. KRIMI Z.	U.S.D., Blida	Directrice de thèse

Année universitaire 2019-2020

BIOPROTECTION PAR INDUCTION D'UNE RESISTANCE SYSTEMIQUE (ISR) VIS-A-VIS D'AGROBACTERIUM SPP. AGENT DU CROWN GALL

Résumé.

Parmi les bactéries en interaction favorable avec les plantes, certaines contribuent à la gestion des maladies, en stimulant les défenses naturelles de l'hôte et/ou en assurant le biocontrôle direct des agents pathogènes. La présente étude a pour objectif en premier lieu, d'évaluer le pouvoir de bioprotection vis-à-vis d'*Agrobacterium* spp. et la suppression de l'effet nécrotique à l'égard d'*A. vitis*, par utilisation de quatre souches du microbiote endophyte, apparentées aux genres, *Bacillus* et *Pseudomonas*. L'élicitation des réactions de défense inductible ou la capacité à induire une réponse systémique (ISR) des souches a été analysée en second lieu.

Les souches de *Bacillus* et *Pseudomonas* se sont révélées très actives *in vitro*, des zones d'inhibition atteignant 40 mm de diamètre ont été enregistrées, conduisant à une réduction ou une suppression de l'effet nécrotique. La souche *P. brassicacearum* CR2 s'est montrée la plus efficace, elle a réduit de plus de 25 % la sévérité de l'effet nécrotique local causé par les souches d'*A. vitis* sur les sections des rameaux verts des variétés testées. Une diminution et un retard dans l'apparition des symptômes de la galle du collet *in planta*, ont été constatés chez les plantes hôtes trempées dans la suspension bactérienne des antagonistes testés. Un pourcentage de réduction de la taille de la tumeur estimé à 49,6 % pour les plants de tomate traités par la souche *P. brassicacearum* EPR3, ensuite infectés par *A. tumefaciens* C58 a été obtenu.

La bactérisation des semences par les souches antagonistes a stimulé les mécanismes de défense systémique, en améliorant les niveaux des marqueurs biochimiques, à savoir, les composés phénoliques, l'acide salicylique (SA), la peroxydase et la polyphénol-oxydase, en concordance avec la réduction des symptômes de la maladie induite par les souches pathogènes d'*A. tumefaciens*. La caractérisation des composés phénoliques a mis en évidence, en plus du SA, d'autres composés phénoliques, à savoir, l'acide gallique, le kaempférol, la quercétine et deux composés non phénoliques, l'antrone et l'acide oxalique.

Globalement, nos résultats suggèrent que 'le priming' par utilisation des bactéries citées et plus précisément les souches de *P. brassicacearum*, a permis d'améliorer la résistance de la tomate à *A. tumefaciens*. L'utilisation de ces souches comme biofertilisants au niveau de la rhizosphère, permettra de coloniser l'intérieur des plantes, de les protéger des actions biotiques et abiotiques et d'optimiser le rendement.

Mots clés. *Agrobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., composés phénoliques, acide salicylique, enzymes antioxydantes.

BIOPROTECTION BY INDUCTION OF SYSTEMIC RESISTANCE (ISR) TO AGROBACTERIUM SPP. AGENT OF CROWN GALL

Abstract.

Among bacteria in favorable interaction with plants, some contribute to the management of plant diseases by stimulating host's natural defenses and/or by providing direct biocontrol of pests. The present study aims firstly to evaluate the biocontrol capacity against *Agrobacterium* spp. and the suppression of necrotic effect against *A. vitis*, by using four strains from the endophytic microbiota, belonging to the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. Elicitation of inducible defense reactions or the capacity to induce a systemic response (ISR) of the strains was analyzed as a second objective.

Bacillus and *Pseudomonas* used strains were very active *in vitro*, inhibition zones were recorded up to 40 mm in diameter, with a reduction or suppression of the necrotic effects. *P. brassicacearum* CR2 strain was the most effective, reducing by more than 25 % the severity of the local necrotic effect caused by *A. vitis* strains on the green shoot sections of tested varieties. A delay of appearance and a significant reduction of crown gall symptoms *in planta*, were obtained by primed the seeds and stem inoculated with *Agrobacterium* spp. A percentage of reduction in tumor size estimated at 49.6 % of tomato plants treated with *P. brassicacearum* strain EPR3 and then infected with *A. tumefaciens* C58 was obtained.

Seed bacterization by antagonistic strains stimulated systemic defense mechanisms by improving the levels of biochemical markers of ISR, namely phenolic compounds, salicylic acid, peroxidase and polyphenol-oxidase, related to the reduction of disease symptoms induced by pathogenic strains of *A. tumefaciens*. Characterization of phenolic compounds revealed, in addition to salicylic acid, other compounds, such as, gallic acid, kaempferol, quercetin and two non-phenolic compounds, anthrone and oxalic acid.

In general, our results suggest that 'priming' by these antagonistic strains and more specifically *P. brassicacearum* strains, improved the resistance of tomato to *A. tumefaciens*. The use of these strains as biofertilizers in the rhizosphere will allow the colonization of plants, their protection from biotic and abiotic actions and the optimization of yields.

Keywords: *Agrobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., phenolic compounds, salicylic acid, antioxidant enzymes.

الحماية الحيوية عن طريق تحريض المقاومة الشاملة (ISR) تجاه بكتيريا *Agrobacterium* المسببة لمرض التدرن التاجي.

ملخص. من بين البكتيريا ذات التفاعل الإيجابي مع النباتات، بعضها يساهم في تسبير أمراض النباتات من خلال تحفيز الدفاعات الطبيعية للنبتة المضيفة و/أو من خلال توفير المكافحة الحيوية المباشرة للآفات.

تهدف الدراسة الحالية في الجزء الأول إلى تقييم قدرة المكافحة الحيوية ضد *Agrobacterium* وقمع تأثير النخر ضد الإصابة المسببة من طرف *Agrobacterium vitis*، وذلك باستخدام أربع (04) سلالات من الكائنات الحية الدقيقة الداخلية، تنتمي إلى أجناس *Bacillus* و *Pseudomonas*. ثم تحليل ردود الأفعال الدفاعية المحرصة أو القدرة على إحداث استجابة دفاعية (ISR) للسلالات كهدف ثاني.

أظهرت سلالات *Bacillus* و *Pseudomonas* المستخدمة نشاطا فعالا في المختبر، وذلك بتسجيل مناطق تثبيط يصل قطرها إلى 40 ملم، مع تقليل أو قمع التأثيرات النخرية. كانت السلالة *P. brassicacearum* CR2 أكثر فعالية، حيث قللت بأكثر من 25 % من شدة تأثير النخر الموضوعي الناجم عن سلالات *Agrobacterium vitis* على أقسام الفروع الخضراء للأصناف المختبرة.

انخفاض كبير وتأخر في ظهور أعراض مرض التدرن التاجي عند النباتات التي بذورها حفزت بيولوجيا بالبكتيريا *Bacillus* و *Pseudomonas* والساق الممرض بـ *Agrobacterium*. تم تسجيل نقص في حجم الورم بنسبة مقدرة بـ 49,6 % عند نباتات الطماطم المعالجة بسلالة *P. brassicacearum* EPR3 ثم إصابتها بـ *Agrobacterium tumefaciens* C58.

معالجة البذور بواسطة السلالات الضد بكتيريا حفز آليات دفاع المقاومة الشاملة وذلك بتحسين مستويات العلامات الكيميائية الحيوية، وهي المركبات الفينولية وحمض الساليسيليك والبيروكسيداز والبوليفينول-أوكسيداز، التي يمكن أن تكون سببا في تقليل أعراض مرض التدرن التاجي التي تسببها السلالات الممرضة *Agrobacterium*.

الكشف عن المركبات الفينولية، أظهر وجود حمض الساليسيليك، و مركبات فينولية أخرى، مثل حمض الجاليك، والكامفيرول، والكيرسيتين، واثنين من المركبات غير الفينولية، الأنثرون وحمض الأكساليك.

بشكل عام، النتائج المتحصل عليها تشير أن " التحضير أو التلقيح" باستخدام هذه السلالات الضد بكتيريا وتحديد سلالات *Pseudomonas brassicacearum* ، أدى إلى تحسين مقاومة الطماطم للبكتيريا السرطانية. استخدام هذه السلالات كأسمدة بيولوجية في منطقة جذور النباتات سيؤدي إلى حمايتها من العوامل الحيوية وغير الحيوية وتحسين المردودية.

الكلمات المفتاحية: *Agrobacterium* ، *Bacillus* ، *Pseudomonas* ، المركبات الفينولية، حمض الساليسيليك، الإنزيمات المضادة للأوكسدة.

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie **DIEU** de m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour réaliser ce travail.

Voici venu le moment de remercier l'ensemble des gens qui m'ont aidé un peu ou beaucoup, de loin ou de près, ponctuellement ou tout au long de la thèse. C'est avec joie que je voudrais tous vous remercier pour avoir participé à tous les niveaux à l'existence de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements et mes respects à tous les membres du jury d'avoir accepté d'honorer et d'enrichir mon travail. Pour cela, je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur **DJAZOULI** Zahr-Eddine Professeur à l'Université de Blida 1 pour avoir aimablement accepté la responsabilité de présider le jury de ma thèse. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt porté à mon travail.

Je remercie Madame **BOUREGHDA** Houda Professeure à l'ENSA, El Harrach, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je suis également honorée d'avoir eu comme examinateur de cette thèse Monsieur **MEFTI** Mohamed Professeur à l'ENSA, El Harrach. Je le remercie énormément.

Je voudrais remercier aussi Madame **CHEMAT** Zoubida Professeure à l'Université de Blida 1 d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie également Monsieur **TAOUTAOU** A. Maître de conférences A à l'ENSA, El Harrach, pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

Quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde gratitude pour Professeur **BOUTOUMI** H., grâce à vous j'ai beaucoup appris dans le vaste monde de la chimie. Vous m'avez donné des idées et conseils utiles. Malgré un emploi du temps plus que chargé, vous avez toujours eu du temps pour moi, Soyez remercié pour votre implication, sans vos orientations et vos conseils précieux, ce travail n'aurait pas été accompli. Mes discussions avec vous m'ont beaucoup apporté. C'est avec grand plaisir que je continuerai à travailler avec vous, même après cette thèse. Merci beaucoup professeur pour votre gentillesse aussi.

Un grand merci au Professeur **KRIMI** Zoulikha, ma directrice de thèse pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour avoir cru en moi, pour m'avoir appris à être

plus autonome dans ce travail et pour m'avoir fait profiter de ses connaissances. Vos encouragements, vos suggestions et votre aide précieuse m'ont beaucoup guidé à mener à terme ce travail de recherche. J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance sans cesse renouvelée dont elle a fait preuve en mon égard.

Honnêtement reconnaissante, j'exprime ma gratitude à Monsieur **AOUABED** le Doyen de la faculté de Technologie à l'Université de Blida 1 pour l'énorme aide qu'il m'a fournie, pour avoir intervenu personnellement pour soulever les contraintes auxquelles je me suis heurtée au cours de mon expérimentation.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur **CHEKNANE** le chef de département de Génie de procédés qui n'est jamais abstenus de me permettre d'accéder au dit département et au dit laboratoire. Qu'il puisse croire à mon grand respect.

Je ne saurais assez remercier Monsieur **CHEMAT** Smail, pour son aide technique précieuse et efficace dans mes premières analyses HPLC.

Je désire remercier également madame **TAOUTI** Souad, ma sœur de cœur, pour l'aide qu'elle m'a aimablement fournie au niveau du Centre de Recherche et Techniques en Analyses Physico-Chimiques (Bousmail) CRAPC.

Je n'oublierai jamais l'aide précieuse que Dr **BOUMERAH** Yacine et son épouse Mme **BOUANANI** Sabrina, qui m'ont offert au sein des laboratoires de service de toxicologie à l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie (Bouchaoui), qu'ils trouvent ici tous mes vifs remerciements.

Merci **AMMAM** Selma d'avoir été non seulement "notre ingénieure de labo", mais aussi et surtout une formidable amie. Merci pour tes sourires, ta spontanéité, ta gentillesse et tes encouragements.

Je ne saurais assez remercier Madame **DJAZOULI-ALIM** Zahra Professeure à l'Université de Blida 1, pour son aide, ses encouragements et ses conseils. Qu'elle trouve là, mon profond respect.

Je ne pourrais pas aussi remercier autant mon beau-frère **RAHMANI** Hakim, docteur en pharmacie qui m'a aider très souvent, surtout dans le tamisage et la stérilisation du sol, qui est une étape très fatigante, merci pour tes encouragements et les bonnes discussions au niveau du la serre.

Enfin, je ne pourrais terminer sans dire un grand merci à mes **parents (DJELLOUT Abdellah, AMAROUCHE Nadjia)** et ma **sœur (Nour el Houda)** pour leur soutien et leurs encouragements pendant toute la durée de mes études. Je vous remercie énormément de m'avoir conduite jusqu'ici avec amour, confiance, soutien,

tendresse et force. Je tiens à remercier également ma **belle-famille**. J'ai découvert une famille, certes différente de la mienne, mais toujours accueillante et aimante.

J'envoie quelques mots à mon **mari RAHMANI Mustapha**, tu as fait preuve de beaucoup de patience et de persévérance. Tu m'as donné du courage et une force que je ne me connaissais pas pour surmonter bien des obstacles. J'essaye de te remercier tous les jours de ma vie en te donnant toutes les choses que j'ai à t'offrir. Je t'aime tellement fort.

Et enfin, je reconnais qu'il n'est pas facile d'être maman et doctorante à la fois. Mais avec mes trois amours (**Abdenour, Wassim et Maria**), si calme et si patient, les choses ont été plus faciles. Pour vous qui avez supporté quelques moments d'angoisse, je vous adresse d'immenses remerciements. Vous êtes les plus beaux et les plus réussis de toutes mes expériences !

J'exprime ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail. Que ceux que j'ai oubliés me pardonnent !

DJELLOUT Hafidha

DÉDICACES

C'est avec plein d'amour et de fierté que je dédie ce travail, fruit de longues années d'études, à :

Mes très chers parents, auxquels je dois tout mon respect et que je ne remerciais jamais assez pour leurs sacrifices et à toute ma famille, à mes enfants ainsi à ma sœur qui m'ont toujours soutenue et encouragée à poursuivre dans cette voie.

Madame Professeur ALIM-DJAZOULI et Monsieur Professeur DJAZOULI : Votre aide et vos conseils constituaient les facteurs cruciaux de la réussite de ce travail. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon très grand respect. Que Dieu vous procure bonne santé et longue vie et que Dieu vous protège pour votre famille, pour vos étudiants et pour vos doctorants.

Je dois une profonde reconnaissance à mon époux MUSTAPHA. Je ne saurai lui témoigner assez ma gratitude, d'un soutien indéfectible, il a su trouver les mots pour m'aider et me soutenir.

La mémoire de Mon frère Ishak qui nous a quittés le 18 mars, en 2018, à l'âge de 15 ans... Que votre âme repose en paix cher frère.

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.

TABLE DES MATIERES

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Chapitre 1. Synthèse bibliographique sur les *Agrobacterium* spp. pathogènes, la maladie du crown gall et les mécanismes de l'induction systémique de la résistance

1. *Agrobacterium* spp. et la galle du collet..... 6

1.1 Vies tellurique et rhizosphérique d'*Agrobacterium* spp..... 6

1.2 Processus d'infection et de colonisation de la plante hôte..... 7

1.3 Interférence de la réponse phytochimique lors de l'infection par *Agrobacterium* 7

1.4 Conséquences de l'infection par les *Agrobacterium* spp. pathogènes, symptômes de la maladie..... 11

2. Mécanismes généraux de signalisation impliqués dans la défense des plantes contre les agents pathogènes..... 13

2.1 Rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la signalisation précoce associée à la défense des plantes..... 15

2.2 L'acide salicylique (SA) : une molécule clé dans la signalisation des réactions de défense chez les plantes..... 16

2.2.1 Rôles et mode d'action de l'acide salicylique dans la résistance systémique acquise (SAR)..... 16

2.3 L'induction de la résistance systémique (ISR) et la transmission du signal de l'immunité systémique des plantes..... 18

2.4 Stimulation du métabolisme secondaire : cas particulier du métabolisme phénolique..... 20

2.4.1 Rôle des composés phénoliques dans la défense constitutive et la défense induite..... 21

2.5 Protéines de défense, cas particulier des peroxydases et des polyphénol-oxydases..... 22

3. Connaissances sur les mécanismes de défense de la plante contre les agrobactéries pathogènes..... 24

3.1 Action des phytohormones (l'acide salicylique, l'éthylène et l'AIA).. 24

3.2 Implication des signaux PAMPs 25

3.3 Action des espèces réactives de l'oxygène (ROS's)..... 27

4. Les mesures et méthodes classiques de lutte contre la maladie de la galle de collet.....	28
4.1 Méthodes de lutte préventives, culturales et prophylactiques.....	29
4.2 La lutte biologique par utilisation d'agents microbiens.....	30
4.3 L'induction de la résistance systémique (ISR) ou priming, une voie de contrôle biologique.....	31
5. Microorganismes stimulateurs de défense naturelle (SDN), de défense des plantes ou éliciteurs, une solution de lutte durable.....	33

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Partie 1 : Evaluation du potentiel de souches antagonistes de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* dans le contrôle d'*Agrobacterium* spp. pathogènes, impliqués dans la maladie de la galle du collet

1. Souches bactériennes utilisées.....	36
1.1 Souches antagonistes.....	36
1.2 Souches pathogènes.....	37
2. Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	38
2.1. La confrontation déphasée.....	38
2.2. La confrontation simultanée.....	39
3. Essai de la suppression de l'effet nécrotique d' <i>A. vitis</i> par l'utilisation des souches antagonistes.....	40
4. Essai d'antagonisme <i>in planta</i>	43
4.1. Méthodologie.....	43
4.2. Techniques d'inoculation des plantules de tomate et de la vigne..	46
4.2.1. Confrontation déphasée <i>in planta</i>	46
4.2.2. Confrontation simultanée <i>in planta</i>	46
4.3. Evaluation <i>in planta</i> des bactéries antagonistes du biocontrôle de la maladie de la galle du collet.....	47
5. Analyse statistique.....	47

Partie 2 : Mise en évidence de la réaction de résistance systémique induite (ISR) par les souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* chez le pathosystème *Agrobacterium tumefaciens*/tomate

1. Les souches bactériennes utilisées.....	49
2. Activité antagoniste <i>in vitro</i>	49
3. Bactérisation des semences de tomates et inoculation de souches d' <i>A. tumefaciens</i>	50
3.1 Matériel végétal et condition expérimentales.....	50
3.2 Méthodes d'inoculation des bactéries antagonistes et des souches pathogènes.....	51

4. Analyse de l'ISR par évaluation de la teneur en phénols, en acide salicylique et de l'activité de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase chez les plants de tomate.....	53
4.1. Estimation de la teneur en composés phénoliques.....	53
4.2. Identification et quantification de l'acide salicylique (SA).....	54
4.2.1 Analyse qualitative de l'acide salicylique (SA) par GC-MS.....	55
4.3. Détermination de l'activité de la peroxydase (PO).....	56
4.4. Détermination de l'activité de la polyphénol-oxydase (PPO).....	57
5. Analyse statistique.....	57

Chapitre 3 : Résultats et interprétation

Partie 1 : Evaluation du potentiel des souches antagonistes de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* dans le contrôle d'*Agrobacterium* spp. pathogènes, impliqués dans la maladie de la galle du collet

1. Pouvoir antagoniste <i>in vitro</i> des souches de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> et de <i>Bacillus</i> spp.....	58
1.1. Confrontation déphasée <i>in vitro</i>	58
1.2. Confrontation simultanée <i>in vitro</i>	59
2. Résultats de l'essai de suppression de l'effet nécrotique d' <i>A. vitis</i> sous l'effet des souches antagonistes.....	61
3. Antagonisme <i>in planta</i> sur la tomate et la vigne.....	66
3.1. Confrontation déphasée <i>in planta</i> sur la tomate et la vigne.....	68
3.2. Confrontation simultanée <i>in planta</i> sur la tomate et la vigne.....	74

Partie 2 : Mise en évidence de la réaction de résistance systémique induite (ISR) par les souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* chez le pathosystème *Agrobacterium tumefaciens*/tomate

1. Inhibition d' <i>A. tumefaciens</i> par des bactéries antagonistes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	80
2. Résultats de l'analyse de l'ISR par évaluation de la teneur en phénols, en acide salicylique et de l'activité de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase chez les plants de tomate.....	83
2.1 Teneur en composés phénoliques des plants de tomate.....	83
2.2 Identification et quantification de l'acide salicylique endogène par HPLC dans les plants de tomate.....	86
2.2.1 Confirmation de l'acide salicylique par GC/MS.....	90
2.3 Activité des enzymes de défense chez les plants de tomate bactérisés par les souches antagonistes et inoculés par les souches pathogènes d' <i>A. tumefaciens</i>	91
2.3.1 Activité de la peroxydase.....	91
2.3.2 Activité de la polyphénol-oxydase.....	93

Chapitre 4 : Discussion générale	
1. Interaction <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> , réduction, arrêt, et/ou retard de l'action tumorigène d' <i>Agrobacterium</i> spp. pathogènes sous l'effet des antagonistes <i>Bacillus</i> spp. et <i>P. brassicacearum</i>	94
2. Suppression de l'effet nécrotique d' <i>A. vitis</i> sous l'effet des souches antagonistes.....	102
3. Elicitation de l'induction de la résistance systémique par les bactéries antagonistes chez le pathosystème <i>Agrobacterium tumefaciens</i> - tomate	104
Conclusion générale et perspectives	114
Références bibliographiques	119
Annexes	
Publication 1	
Publication 2	

ABREVIATIONS

AS ou SA	Acide salicylique
ANOVA	Analyse de variance (ANalysis Of Variance)
BSTFA	Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
DAMP	Damage Associated Motif Pattern
DO	Densité optique
ETI	Les effecteurs (<i>Effector-Trigered Immunity</i>)
EF-Tu	Elongation factor thermo unstable
flg22	22 amino acids peptide of the N-terminus of flagellin
FLS2	Flagellin sensing locus2
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Gaz Chromatography-Mass Spectrometry)
HR	Réponse hypersensible (Hypersensitive response)
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)
ISR	Résistance systémique induite (Induced Systemic Resistance)
kb	kilo base
MAMPs	microbe associated molecular patterns
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ROS	espèces chimiques oxygénées (Reactive oxygen species)
PO	Peroxidase
PAMP	Motif moléculaire associé aux pathogènes (Pathogen-associated molecular pattern)
PPO	Polyphénol-oxydase
PGPRs	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
PR	Pathogenesis-Related
spp.	espèces
SAR	Résistance systémique acquise (Systemic Acquired Resistance)
TMS	triméthylsilyl, triméthylsilylés
UFC	Unité formant une colonie (Cell Forming Unit)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de l'infection par <i>Agrobacterium</i> , résumant les principales étapes du processus d'infection [43].....	9
Figure2 : Réponses de la plante modèle <i>Arabidopsis thaliana</i> à <i>Agrobacterium tumefaciens</i> et développement de la galle du collet [44].....	10
Figure 3 : Fonctions des gènes portés par le T-DNA [61].....	14
Figure 4 : Schéma simplifié des principales étapes des réactions de défense induites dans les interactions plantes/ agents pathogènes [62].....	14
Figure 5 : Sources et fonctions des ROS chez les plantes suite à l'infection par des agents pathogènes [63].....	17
Figure 2.1 : Schéma des différents traitements appliqués sur les plantules de tomate.....	51
Figure 3.1 : Comparaison de l'inhibition <i>in vitro</i> pour les deux techniques de confrontation.....	60
Figure 3.3 : Résultats de l'échelle d'estimation de la sévérité de l'effet nécrotique.....	62
Figure 3.4 : Suppression ou réduction de l'effet nécrotique des souches pathogènes d' <i>A. vitis</i> par les souches antagonistes sur la variété Muscat 7 jours après incubation.....	62
Figure 3.5 : Relation entre l'indice de sévérité et le pouvoir nécrotique <i>in vivo</i> des souches d' <i>A. vitis</i> sur les quatre variétés de vigne testées.....	64
Figure 3.6 : Relation entre l'indice de sévérité et le pouvoir antagoniste <i>in vivo</i> des quatre antagonistes dans la réduction de l'effet nécrotique des souches d' <i>A. vitis</i> sur les quatre variétés de vigne testées.....	65
Figure 3.7 : Réponses des plantules de tomate (var. Saint Pierre) aux différents traitements du test d'antagonisme <i>in planta</i>	66
Figure 3.8 : Réponses des plantules de la vigne (var. gros noir) aux différents traitements du test d'antagonisme <i>in planta</i>	67
Figure 3.9 : Effet des souches antagonistes sur les souches pathogènes d' <i>A. vitis</i> et d' <i>A. tumefaciens</i> en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de tomate.....	71
Figure 3.10 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d' <i>A. vitis</i> en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantes de la vigne.....	72

Figure 3.11 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d' <i>A. tumefaciens</i> en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantes de la tomate.....	73
Figure 3.12 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d' <i>A. vitis</i> et d' <i>A. tumefaciens</i> en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de tomate.....	76
Figure 3.13 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d' <i>A. vitis</i> en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de la vigne.....	77
Figure 3.14 : Effet des souches antagonistes sur les souches pathogènes d' <i>A. tumefaciens</i> en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de la tomate.....	78
Figure 3.15 : réponses des plantules de tomate aux différents traitements...	82
Figure 3.16 : Teneur en composés phénoliques totaux mesurée à la fin de l'expérience (15 jour après l'inoculation), exprimée en acide gallique.....	84
Tableau 3.10 : Contenu des composés phénoliques totaux à la fin de l'expérience (15 jours après l'inoculation), exprimés en acide salicylique.....	85
Figure 3.17 : Chromatogramme d'HPLC montrant la teneur en acide salicylique.....	87
Figure3.18 : Chromatogramme des ions totaux obtenu par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.....	90
Figure 3.19 : Activité de la peroxydase chez les plants de tomate traités par des souches antagonistes et pathogènes.....	92
Figure 3.20 : Activité de la polyphénol-oxydase chez les plants de tomate des différents traitements à la fin de l'expérience.....	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Origines des souches antagonistes utilisées [22].....	37
Tableau 2.2 : Origine des souches d' <i>A. tumefaciens</i> utilisées.....	37
Tableau 2.3 : Les différents traitements de l'essai de suppression de l'effet nécrotique.....	42
Tableau 2.4 : Echelle d'estimation de la sévérité de l'effet nécrotique.....	43
Tableau 2.5 : Les différents traitements de l'essai d'antagonisme <i>in planta</i> sur la tomate et la vigne.....	45
Tableau 2.6 : Les différents traitements de l'expérimentation.....	52
Tableau 3.1 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation déphasée <i>in vitro</i> des quatre bactéries antagonistes envers les souches pathogènes d' <i>Agrobacterium</i>	59
Tableau 3.2 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation simultanée <i>in vitro</i> des quatre bactéries antagonistes envers les souches pathogènes d' <i>Agrobacterium</i>	59
Tableau 3.3 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d' <i>A. vitis</i> sur le développement des nécroses sur les sections des différentes variétés de la vigne.....	63
Tableau 3.4 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d' <i>A. tumefaciens</i> sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de tomate testées (Confrontation déphasée)....	68
Tableau 3.5 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d' <i>A. vitis</i> sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de vigne testées (confrontation déphasée).....	69
Tableau 3.6 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d' <i>A. tumefaciens</i> sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de la tomate testées (confrontation simultanée)...	74
Tableau 3.7 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d' <i>A. vitis</i> sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de la vigne testées (confrontation simultanée).....	75
Tableau 3.8 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) induites par les quatre antagonistes contre les souches d' <i>A. tumefaciens</i>	81
Tableau 3.9 : Taille moyenne des tumeurs (mm) et le pourcentage de réduction de la taille des tumeurs, induites par différentes souches d' <i>A. tumefaciens</i> pour les plants de tomates traitées par les différentes bactéries antagonistes.....	81

Tableau 3.11 : Concentration d'acide salicylique ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dans les plants de tomate traités par des souches de <i>Bacillus</i> spp. et de <i>P. brassicacearum</i> , six jours après inoculation d' <i>A. tumefaciens</i>	88
Tableau 3.12 : Composés identifiés par HPLC chez les plantes inoculées avec des souches d' <i>A. tumefaciens</i> et protégées par des bactéries antagonistes en comparaison avec des plantes non traitées (EDS).....	89

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies des plantes peuvent être causées par des conditions environnementales défavorables liées au climat, à la nutrition et à la pollution ou par des agents parasitaires. Ces derniers peuvent être des virus, des bactéries, des oomycètes, des champignons ou des nématodes [1]. L'ensemble de ces stress est responsable de lourdes pertes estimées dans le cas des maladies des plantes à 17% sur les cultures mondiales [2]. De nombreux travaux de recherche sont donc menés dans ce domaine afin d'approfondir les connaissances sur les maladies des plantes et de pouvoir développer de nouvelles stratégies de lutte [3].

Les agents pathogènes peuvent altérer plusieurs fonctions physiologiques des plantes en s'attaquant à leurs différents organes, ce qui réduit le rendement et la qualité des cultures [4]. Parmi les agents pathogènes responsables des pertes économiques importantes ; les bactéries phytopathogènes dont la plupart sont considérées comme des agents bioterroristes et classées dans la liste des organismes de quarantaine [5].

Ces bactéries phytopathogènes sont capables d'infecter les plantes et d'entraîner des maladies responsables de pertes importantes pour les récoltes. Parmi les maladies les plus connues pour être causées par les bactéries phytopathogènes, la galle du collet ou crown gall, qui engendre d'importantes pertes économiques au niveau des pépinières du fait que la commercialisation des plants malades n'est pas autorisée et les plants atteints doivent être impérativement incinérés [6].

La galle du collet ou crown gall est causée par les espèces ; *Agrobacterium tumefaciens* et *A. vitis* qui constituent les pathogènes majeurs, elles détiennent un spectre d'hôtes considérablement diversifié comprenant plusieurs arbres fruitiers, des plantes ornementales et des arbres forestiers [7].

Ces deux bactéries provoquent la maladie du crown gall qui se manifeste par des tumeurs au niveau des racines et du collet des plantes attaquées. Dans

le cas de la vigne, en plus des tumeurs sur les sarments et au collet, une nécrose racinaire apparente, constitue un symptôme supplémentaire aggravant l'infection [8].

En Algérie, cette maladie a été révélée présente sur de nombreuses espèces cultivées en pépinière, notamment sur des boutures de vigne en dormance [9 ; 10 ; 11]. Sur la vigne, *A. vitis* affecte la croissance et rend les plants très sensibles aux conditions environnementales comme le gel en période hivernale [12].

Le processus d'infection par cette bactérie est caractérisé par sa capacité d'introduire une partie de son matériel génétique dans le noyau de la cellule végétale infectée, ce qui le rend responsable de tumeurs à la base de la tige et au niveau des racines de nombreuses espèces [13]. Dans le cas de la vigne, la bactérie est systémique, elle survit au repos végétatif grâce à la présence dans la sève, d'acide tartrique [8]. Des travaux en Algérie ont confirmé la présence de cette bactérie et de ses gènes de pathogénicité, dans les sarments de vigne destinés à la multiplication [10].

A ce jour, aucun traitement efficace n'est disponible pour le contrôle de la maladie, ou pour éradiquer la bactérie une fois introduite dans la plante hôte [14]. La prophylaxie est le seul moyen pour prévenir l'installation de cette maladie. L'utilisation des agents microbiens de lutte biologique constitue une approche écologique très prometteuse, elle consiste en l'utilisation des microorganismes antagonistes.

Les microorganismes utilisés comme agents de lutte biologique colonisent les tissus de la plante, de plus, ils ont été décrits comme stimulateurs de la croissance de l'hôte [15]. Ces souches antagonistes peuvent être facilement appliquées dans les pratiques des pépinières par l'immersion des racines des jeunes plants et des boutures dans les inoculas bactériens avant la plantation [12].

Certaines souches bactériennes ont montré leurs effets protecteurs envers une large gamme de microorganismes phytopathogènes. Le cas le plus

largement rapporté est celui de la souche *Agrobacterium radiobacter* K84, qui agit en induisant une inhibition de la formation des tumeurs chez plusieurs végétaux infectés par des souches tumorigènes d'*Agrobacterium* par production de l'agrocine 84 [16]. La souche d'*A. radiobacter* K84 a été utilisée avec succès pour contrôler le crown gall sur plusieurs espèces végétales [17 ; 18]. Cependant, elle s'est révélée inefficace envers les souches d'*A. vitis* [19].

L'inefficacité de cette bactériocine vis-à-vis de plusieurs souches d'*Agrobacterium* a mené plusieurs études à rechercher de nouvelles souches antagonistes ayant le pouvoir de supprimer les dégâts causés par cette bactérie phytopathogène [20].

Plusieurs microorganismes du sol bénéfiques ont été évalués pour leur efficacité à prévenir la formation de tumeurs et qui sont déjà connus par leurs pouvoirs antagonistes contre d'autres microorganismes phytopathogènes [17]. Les bactéries endophytes appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* ont été exploitées pour la phytostimulation, l'induction de la résistance systémique chez les plantes et le biocontrôle face à différentes maladies [21 ; 22].

Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes *via* la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal [23].

Ce dernier mécanisme s'appelle la résistance systémique induite (ISR), il déclenche une série de signaux chimiques chez la plante et limite la propagation du pathogène. Les bactéries endophytes peuvent initier l'expression de mécanismes de défense s'établissant dans tous les organes de la plante, lui permettant de mieux se protéger vis-à-vis de toute agression ultérieure [24].

Cependant, les mécanismes de défense induits lors de l'ISR demeurent assez méconnus malgré les nombreux travaux réalisés cette dernière décennie. C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail de cette thèse qui vise en partie à améliorer nos connaissances sur les voies métaboliques stimulées par les

souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* et permettant d'expliquer l'effet protecteur conféré par ces souches contre la galle du collet.

Le présent travail tout d'abord, constitue une partie d'un ensemble de travaux réalisés au niveau du Laboratoire de Protection et de Valorisation de Ressources Agro-Biologiques de l'Université de Blida 1. Les objectifs cernent en particulier, l'exploitation des bactéries endophytes dans la réduction de la colonisation et de la sévérité des maladies bactériennes, dans l'étude de leur pouvoir antagoniste *in vitro* et *in vivo* sur d'autres bactéries phytopathogènes telles que ; *Erwinia amylovora* et *Pectobacterium carotovorum* et de les exploiter comme stimulateurs de la croissance végétale [25 ; 22 ; 26].

A cet effet, nous nous proposons d'étudier l'effet antagoniste de deux genres de bactéries endophytiques : des souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* envers des souches pathogènes d'*A. tumefaciens* et d'*A. vitis*, en étudiant leurs capacités à coloniser les tissus de la vigne et de la tomate, afin d'évaluer leurs potentiel en tant qu'agents de contrôle biologique induisant une résistance systémique.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons exploité des données recueillies dans le cadre de notre recherche bibliographique, à partir de laquelle nous avons émis des hypothèses et réalisé des expérimentations, dont les résultats obtenus nous ont permis de publier deux articles.

Dans la première partie de ce travail, une expérimentation préliminaire a été menée dans le but d'évaluer le pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta* et la suppression de l'effet nécrotique de quatre bactéries appartenant à deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* vis-à-vis des souches pathogènes d'*A. tumefaciens* et d'*A. vitis*. Il s'agit de mettre en évidence, à travers cette approche préliminaire, le pouvoir antagoniste des souches endophytes envers les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. avec inhibition de la croissance des pathogènes *in vitro* et la confirmation de la réduction *in planta* des effets nécrotiques et tumorigènes.

Dans la seconde partie du travail, nous avons évalué l'efficacité antagoniste de quatre souches bactériennes appartenant aux genres *Bacillus* et

Pseudomonas et leur impact sur la réponse de défense de l'hôte en analysant l'induction de la résistance systémique par l'accumulation des composés phénoliques et de l'acide salicylique et les activités enzymatiques de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase chez des plants de tomate inoculés avec trois souches pathogènes d'*A. tumefaciens*.

CHAPITRE I

SYNTHESES BIBLIOGRAPHIQUES

1. *Agrobacterium* spp. et la galle du collet

1.1 Vies tellurique et rhizosphérique d'*Agrobacterium* spp.

Le genre *Agrobacterium* regroupe des bactéries telluriques que nous appelons communément agrobactéries, résidentes naturellement dans les sols. Elles sont apparentées à la famille des *Rhizobiaceae*, classe des Alpha-Proteobacteria [27].

Parmi les espèces apparentées au genre *Agrobacterium*, nous retrouvons celles qui sont pathogènes et provoquent la maladie du crown gall comme ; *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rubi* et *Agrobacterium fici* [28].

La pathogénicité chez cette bactérie est portée par un plasmide tumorigène, le plasmide Ti (tumor inducing) [29]. Les souches non pathogènes sont regroupées dans l'espèce *A. radiobacter*, elles vivent comme saprophytes dans le sol et plus particulièrement dans la rhizosphère de différentes plantes où leur croissance est stimulée [30].

Le sol est considéré comme un environnement oligotrophe où règne un microbiome important. La plante exerce une action indirecte en modifiant l'environnement tellurique, par la structure, le régime hydrique et la teneur en éléments nutritifs, procurant ainsi une niche écologique à des microorganismes aux compétences rhizosphériques différentes [31].

Dans une étude sur la survie d'*Agrobacterium* spp. et de son plasmide Ti dans le sol à travers une période de 4 années, il a été montré que le plasmide Ti était absent en automne et en hiver, cependant, au printemps et en été des séquences du pTi (tumor inducing plasmid) ont pu être amplifiées [32]. Les résultats de cette étude suggèrent que le pTi constitue un fardeau génétique en conditions d'oligotrophie mais fournit une valeur adaptative en présence d'exsudats racinaires durant les périodes de reprise de la montée de la sève [32 ; 33].

1.2 Processus d'infection et de colonisation de la plante hôte

L'infection de la plante par *Agrobacterium* présente un caractère génétique, elle se traduit par le transfert d'un fragment du plasmide bactérien Ti, l'ADN-T, dans la cellule végétale et son incorporation dans le génome de la plante (figure 1). Ce transfert est contrôlé par des gènes de virulence (*vir*), qui sont situés sur le plasmide Ti [29]. L'expression des gènes de l'ADN-T, qui codent pour la synthèse de l'auxine et de la cytokinine, provoque une division cellulaire anormale et anarchique entraînant la formation de tumeurs [34].

L'infection des plantes par les *Agrobacterium* spp. pathogènes comprend trois étapes importantes : (figure 1)

- l'attraction et l'attachement de la bactérie à la cellule végétale
- l'étape de virulence déterminant l'excision et le transfert au génome végétal d'une portion du plasmide Ti (ADN-T ou T-DNA).
- et enfin, l'intégration puis l'expression des gènes du T-DNA par la cellule végétale.

1.3 Interférence de la réponse phytochimique lors de l'infection par *Agrobacterium*

Même si les plantes initient des mécanismes de défense contre *Agrobacterium* [35 ; 36], la bactérie à l'origine de la tumeur, est connue pour contourner ces défenses pour s'installer durablement dans les tumeurs [37]. Il convient de souligner qu'*Agrobacterium* est l'un des seuls phytopathogènes bactériens qui exploite son hôte pour la construction de niches au lieu de le tuer [38].

Ainsi, l'interaction entre la plante hôte et *Agrobacterium* repose en grande partie sur le dialogue croisé entre les phytohormones, qui assurent un équilibre entre la défense de l'agent pathogène par l'hôte et le développement de la galle du collet favorisé par *Agrobacterium* (Figure 2).

Les biotrophes tels que *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, ont développé des stratégies sophistiquées pour bloquer la signalisation de défense chez leurs hôtes à plusieurs étapes [39]. Les agrobactéries semblent être capables d'atténuer les réponses de l'hôte provoquées par le PAMP (Pathogen-associated molecular pattern ou motif moléculaire associé aux pathogènes). En outre, le signal peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) semble être supprimé au début de l'infection sous l'action de la catalase agrobactérienne qui semble dégrader l' H_2O_2 produit par la plante hôte [40]. De plus, il a été montré que plus tard, six jours après l'inoculation et l'infection, la transcription de plusieurs peroxydases et de Glutathion-S-Transferase (GST) pourrait empêcher l'accumulation d' H_2O_2 .

Les agrobactéries atténuent clairement les réponses de l'hôte. Cet amortissement n'est pas seulement limité au niveau de la transcription, mais, une analyse histologique à l'aide de diaminobenzidine a révélé que les agrobactéries réprimaient efficacement l'accumulation de l' H_2O_2 dans les tiges blessées pendant plusieurs jours après l'infection [41].

L'interférence agrobactérienne avec le mécanisme de régulation redox de l'hôte se reflète également dans l'expression différentielle de plusieurs gènes liés au stress oxydatif [41 ; 42]. En réprimant la production des H_2O_2 , les agrobactéries peuvent également éviter l'activation des gènes de défense dépendants des ROS (reactive oxygen species ou espèces chimiques oxygénées). Compte tenu de la sensibilité connue de toute cellule vivante aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), le blocage de l'accumulation apparaît comme une stratégie agrobactérienne pour se protéger et protéger sa source de nourriture vivante, c'est-à-dire l'hôte.

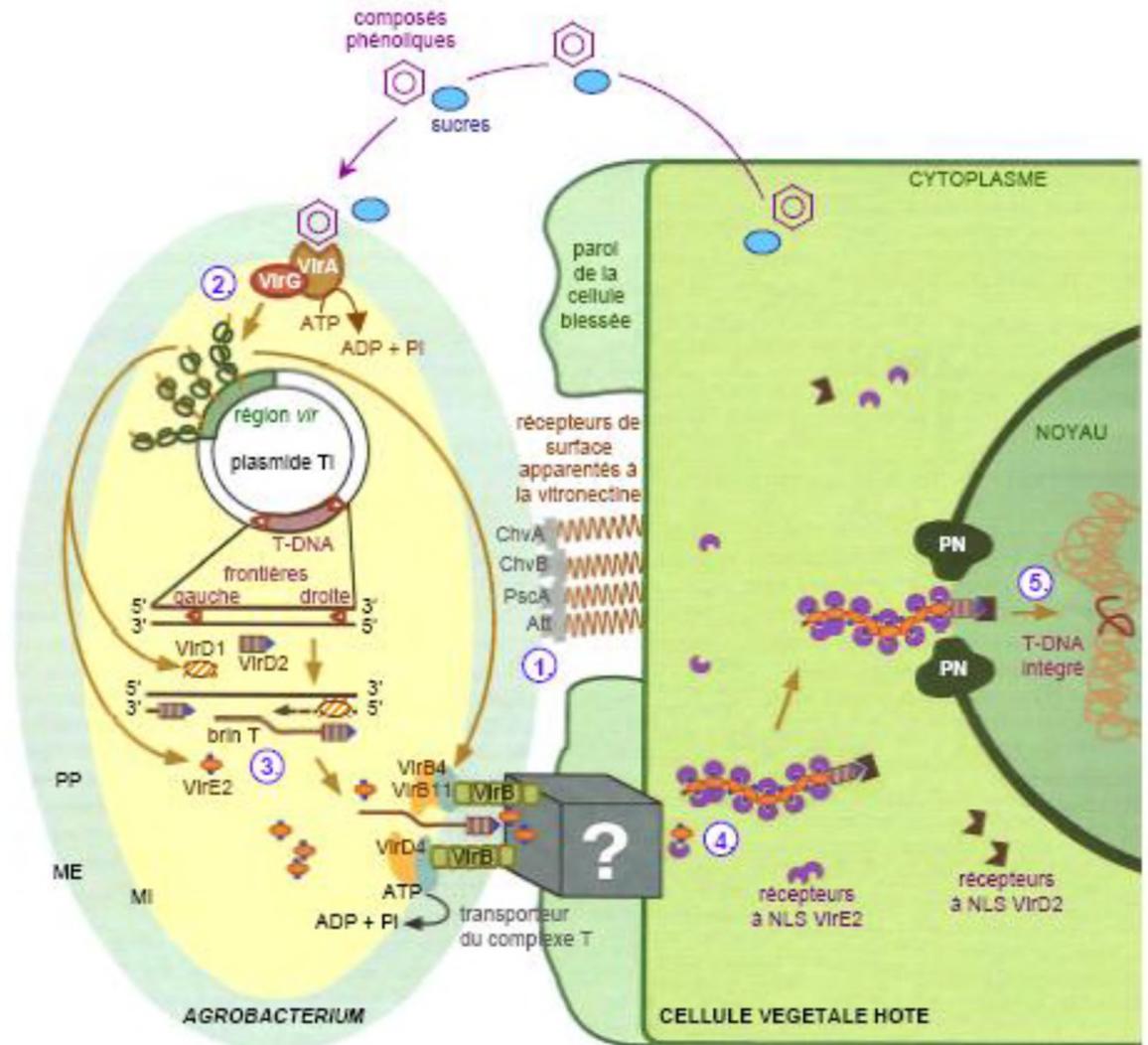


Figure 1 : Représentation schématique de l'infection par *Agrobacterium*, résumant les principales étapes du processus d'infection [43].

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 le chromosome de l'hôte.

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

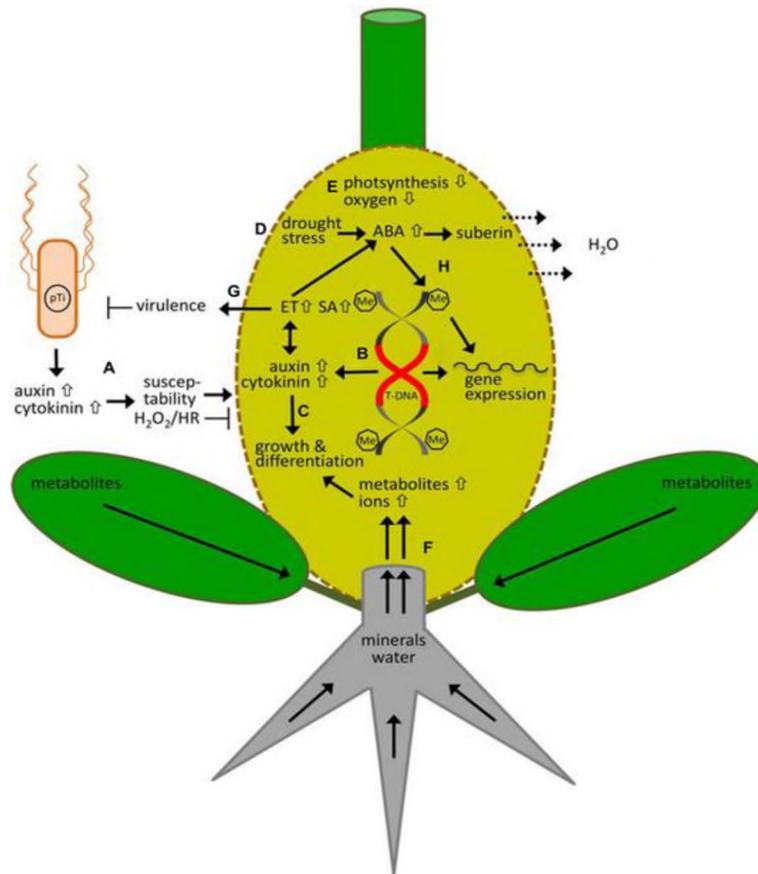


Figure 2 : Réponses de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* à *Agrobacterium tumefaciens* et développement de la galle du collet [44].

(A) Les cellules virulentes des agrobactéries avec pTi produisent et libèrent elles-mêmes de la cytokininine et de l'auxine, qui augmentent la sensibilité de l'hôte et inhibent la production du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et la réponse hypersensible (HR) au début de l'infection.

(B) Après intégration de l'ADN-T bactérien dans le génome de la plante, la cytokininine et l'auxine sont synthétisées par des enzymes codées par l'ADN-T et s'accumulent à l'intérieur de la tumeur.

(C) Des changements massifs dans le schéma d'expression des gènes sont produits, entraînant des adaptations métabolomiques et morphologiques qui sont nécessaires à la croissance et à la différenciation de la tumeur.

(D) La perte d'eau est minimisée par le mécanisme de protection contre le stress hydrique, qui provoque une augmentation des niveaux de l'hormone de stress ABA, et une subérisation des cellules dépendantes de l'ABA pour empêcher la perte d'eau. L'évaporation de l'eau (H₂O) de la surface perturbée entraîne le flux d'eau et de minéraux dans les tumeurs.

(E) Comme la photosynthèse est régulée à la baisse, les niveaux d'oxygène sont faibles, la tumeur produit des composés C et N de manière hétérotrophe et gagne de l'énergie principalement de manière anaérobie par fermentation alcoolique.

(F) Par conséquent, la tumeur en développement devient un puits métabolique pour la plante hôte, qui accumule les métabolites produits par les feuilles sources et les minéraux absorbés par les racines.

(G) L'auxine et la cytokininine provoquent également une augmentation de l'éthylène (ET) qui, avec l'acide salicylique (SA), inhibe la virulence des agrobactéries.

(H) L'ABA induit également une méthylation de l'ADN du génome de la plante, régulant ainsi l'expression des gènes de réponse au stress de la sécheresse. Dans l'ensemble, le génome de la galle du collet devient hyperméthylé (Me) après une infection par *Agrobacterium* et contribue peut-être aux fortes modifications de l'expression des gènes pendant la croissance de la tumeur. Les oncogènes de l'ADN-T ne sont pas affectés par la méthylation du génome de la plante.

De plus, *A. tumefaciens* peut détoxifier le peroxyde d'hydrogène, un composant primaire de l'explosion oxydative de la plante qui a à la fois une activité germicide directe et une fonction de signalisation dans la défense induite de la plante [45]. Dans ce même ordre d'idées, Xu et *al.* [45] ont montré que la catalase KatA d'*A. tumefaciens*, qui convertit le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, est nécessaire à la virulence du kalanchoe.

1.4 Conséquences de l'infection par les *Agrobacterium* spp. pathogènes, symptômes de la maladie

La pathogénicité des souches d'*Agrobacterium* spp. est due à la présence dans leur cytoplasme d'un plasmide d'environ 200 à 500 kb, le plasmide Ti responsable de la formation de galles ou de tumeurs sur le collet et/ou les racines. Après intégration du pTi dans le génome de la plante, les gènes portés s'expriment dans la cellule ainsi transformée [29].

Il existe deux types de gènes sur le T-DNA. Certains, sont appelés oncogènes, *aux* et *cyt*, ils déterminent une synthèse excessive de régulateurs de croissance par les cellules transformées. La surproduction de cytokinines et d'auxine déclenche l'apparition de la tumeur [46] (figure 3).

Le deuxième type de gènes présents sur le T-DNA, gènes *ops*, provoque chez la cellule transformée, la synthèse de nouveaux métabolites azotés ou phosphatés ; les opines. Les tissus tumoraux ont une caractéristique originale de présenter un métabolisme azoté qui conduit à la production d'opines, celles-ci pouvant être métabolisées par les agrobactéries pathogènes [47].

Synthétisées aux dépens des réserves de métabolites du végétal, les opines sont des substrats de croissance mais également des inducteurs de conjugaison pour *Agrobacterium* puisque leur présence dans l'environnement de la niche tumorale, permet l'établissement du transfert conjugatif du pTi des souches pathogènes aux souches non pathogènes [48].

Les agrobactéries pathogènes ont un très large spectre d'hôtes puisqu'au moins 634 plantes réparties dans 331 genres et 93 familles y sont sensibles [7]. La maladie est responsable de pertes économiques importantes dans la production en pépinière des arbres fruitiers, forestiers, des plantes ornementales et de la vigne dans de nombreux pays [12].

Le crown gall de la vigne se produit plus fréquemment par l'apparition des tumeurs sur les racines et les sarments, qui se développent aussi sur n'importe quelle partie du bois fraîchement blessé de la vigne [49]. *A. vitis* cause aussi des nécroses au niveau des racines sur les vignes infectées et peut induire des réponses hypersensibles (HR) sur des plantes non hôtes comme le tabac [50 ; 51].

A. vitis envahit toute la plante à partir des racines et des tumeurs *via* les vaisseaux. Les parties saines de la plante peuvent porter des infections latentes sans apparition des symptômes [8]. La propagation systémique des agrobactéries a été décrite plus extensivement sur la vigne [52].

Les tumeurs inhibent les fonctions physiologiques de la plante, telles que, le transport de l'eau et des nutriments, les plantes ainsi transformées présentent une croissance réduite ou retardée. Des tumeurs secondaires peuvent aussi se développer en différents points du système racinaire perturbant profondément la circulation de la sève [53].

La maladie tue rarement les plantes, mais elle peut provoquer un manque de vigueur. Les plantes infectées en pépinière, en particulier celles qui présentent des tumeurs sur les racines principales et le collet, deviennent impropres à la commercialisation et doivent être éliminées [54].

2. Mécanismes généraux de signalisation impliqués dans la défense des plantes contre les agents pathogènes

Dans toutes les interactions plantes-pathogènes, trois étapes sont à considérer (figure 4). La première étape est celle de la reconnaissance du parasite. Dans le cas d'une interaction incompatible, elle conduit le plus souvent à la mort programmée des cellules attaquées c'est la réaction hypersensible (HR). La deuxième étape appelée transduction du signal consiste en l'activation de cascades de signaux visant l'induction des réactions de défense. La troisième étape est caractérisée par l'activation des gènes de défense et la synthèse de plusieurs protéines et autres molécules de défense créant un environnement défavorable à l'invasion du parasite [55].

Les signaux émis lors de la deuxième étape peuvent s'étendre par la suite aux cellules adjacentes conduisant à une résistance locale acquise (LAR : local acquired resistance) puis gagner l'ensemble de la plante permettant une protection contre une large gamme d'agents pathogènes, c'est la résistance systémique acquise (SAR : Systemic acquired resistance) [56].

Suite à la perception de l'agent pathogène par la plante, de nombreux composants intervenant dans les cascades de signalisation sont activés [57]. Ils incluent les événements précoces impliqués dans la réaction hypersensible comme la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du monoxyde d'azote (NO), la modification des flux ioniques et l'activation des cascades des protéines kinases [58].

Tous ces événements sont nécessaires à l'expression des gènes de défense contrôlant la production des composés antimicrobiens [59]. L'intervention de phytohormones telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'acide abscissique (ABA) et l'éthylène, constitue aussi une des caractéristiques importantes des voies de signalisation de la résistance [60].

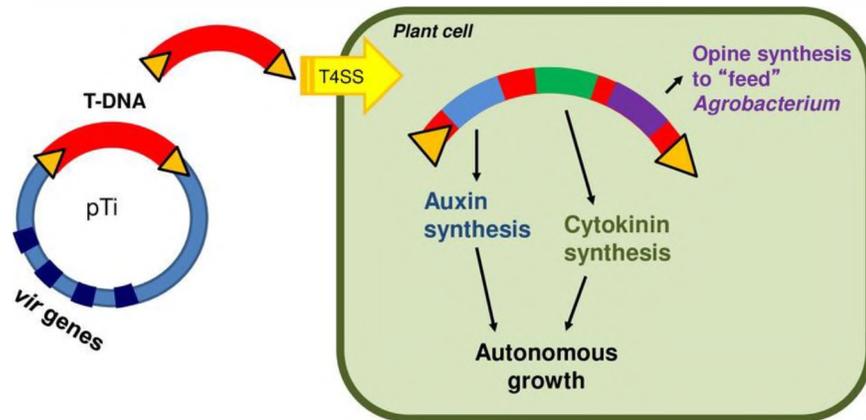


Figure 3 : Fonctions des gènes portés par le T-DNA [61].

- Le T-DNA porte trois types de gènes : les gènes *aux*, responsables de la synthèse de l'auxine, les gènes *cyt*, responsables de la synthèse de la cytokinine à l'origine de la croissance anarchique des cellules tumorales et les gènes *ops*, permettant la synthèse des opines par la cellule végétale transformée, une source de C, d'N et d'énergie pour la bactérie
- Transfert du T-DNA à la cellule végétale via un système de sécrétion de type IV
- La région *vir* du pTi est non transférable.

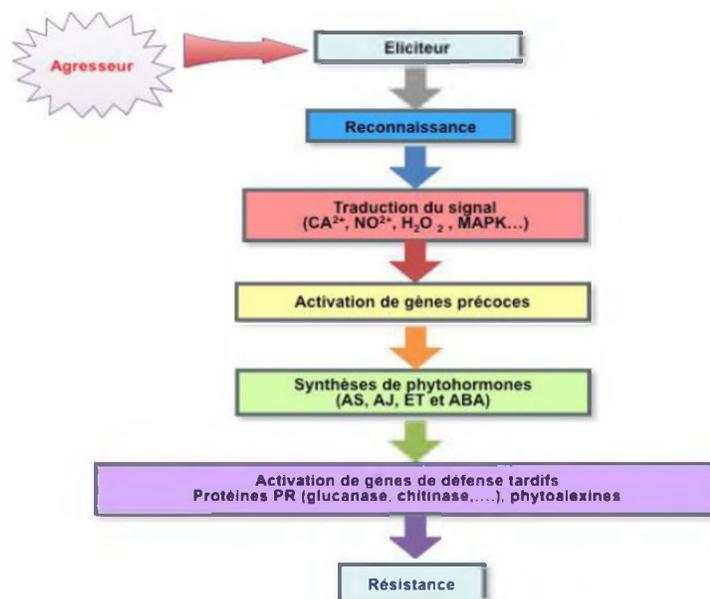


Figure 4 : Schéma simplifié des principales étapes des réactions de défense induites dans les interactions plantes/ agents pathogènes [62].

2.1 Rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la signalisation précoce associée à la défense des plantes

Les espèces réactives de l'oxygène sont constituées essentiellement du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'ion superoxyde (O_2^-) et du radical hydroxyle (OH) [63]. Ces espèces sont générées par la chaîne de transport d'électrons au niveau des mitochondries et des chloroplastes mais aussi par des oxydases membranaires [64]. Une augmentation rapide et localisée de leur production, phénomène communément appelé «burst oxydatif», est souvent détectée suite à l'attaque par des agents pathogènes [65].

Différents rôles ont été attribués aux ROS, ils participent au renforcement de la paroi des cellules végétales comme ils peuvent constituer des composés antimicrobiens. Ils peuvent également intervenir comme des messagers dans les voies de signalisation en relation avec la défense des plantes contre les phytopathogènes [66] (figure 5).

Dans la majorité des interactions plantes-pathogènes, le «burst oxydatif» est biphasique. Le premier pic de H_2O_2 est précoce et transitoire, il est non spécifique de la réponse à un agent pathogène. La deuxième phase est tardive et plus durable, elle est observée uniquement au cours d'une interaction incompatible suite à la reconnaissance spécifique des protéines Avr par les protéines R. Cette phase engendre la mort des cellules en raison de la forte toxicité engendrée par les molécules produites [63].

La NADPH oxydase, enzyme des membranes des chloroplastes, des mitochondries et des peroxysomes, est l'une des premières sources de production des ROS. Cependant, d'autres enzymes ont été décrites associées à cette production, notamment les oxalates oxydases, les peroxydases pariétales, les amines oxydases et les lipooxygénase [67].

2.2 L'acide salicylique (SA) : une molécule clé dans la signalisation des réactions de défense chez les plantes

Depuis la découverte en 1990 de la production de l'acide salicylique lors de l'établissement de la résistance systémique chez le concombre et le tabac contre des agents phytopathogènes, beaucoup d'efforts ont été déployés pour élucider le rôle de cette molécule dans cette résistance [68]. L'acide salicylique a été reconnu comme molécule de signalisation dans la défense des plantes contre divers agents pathogènes [69 ; 70].

Chimiquement, le SA appartient à un groupe de composés phénoliques qui possèdent un anneau aromatique et un groupe hydroxyle. C'est une petite molécule de 138,1g de poids moléculaire, peu soluble dans l'eau, soluble dans des solvants organiques. Le SA est synthétisé à partir de l'acide benzoïque dans les minutes qui suivent la reconnaissance du parasite, par l'intermédiaire de l'enzyme BA2H (Benzoïc Acide2 Hydroxylase) [71].

2.2.1 Rôle et mode d'action de l'acide salicylique dans la résistance systémique acquise (SAR)

Après la formation d'une lésion nécrotique constituant aussi bien un signal de la réaction hypersensible qu'un symptôme de la maladie, la voie de la résistance systémique acquise (SAR) est activée. Cette activation permet une résistance systémique contre une large gamme de pathogènes [72].

La transmission du signal émis suite à la perception de l'agent infectieux repose sur différentes voies dans lesquelles l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène jouent un rôle crucial [73]. L'établissement de la SAR est généralement accompagné par une augmentation de l'acide salicylique endogène [74]. En plus, l'application exogène de l'acide salicylique est susceptible d'induire la SAR [75].

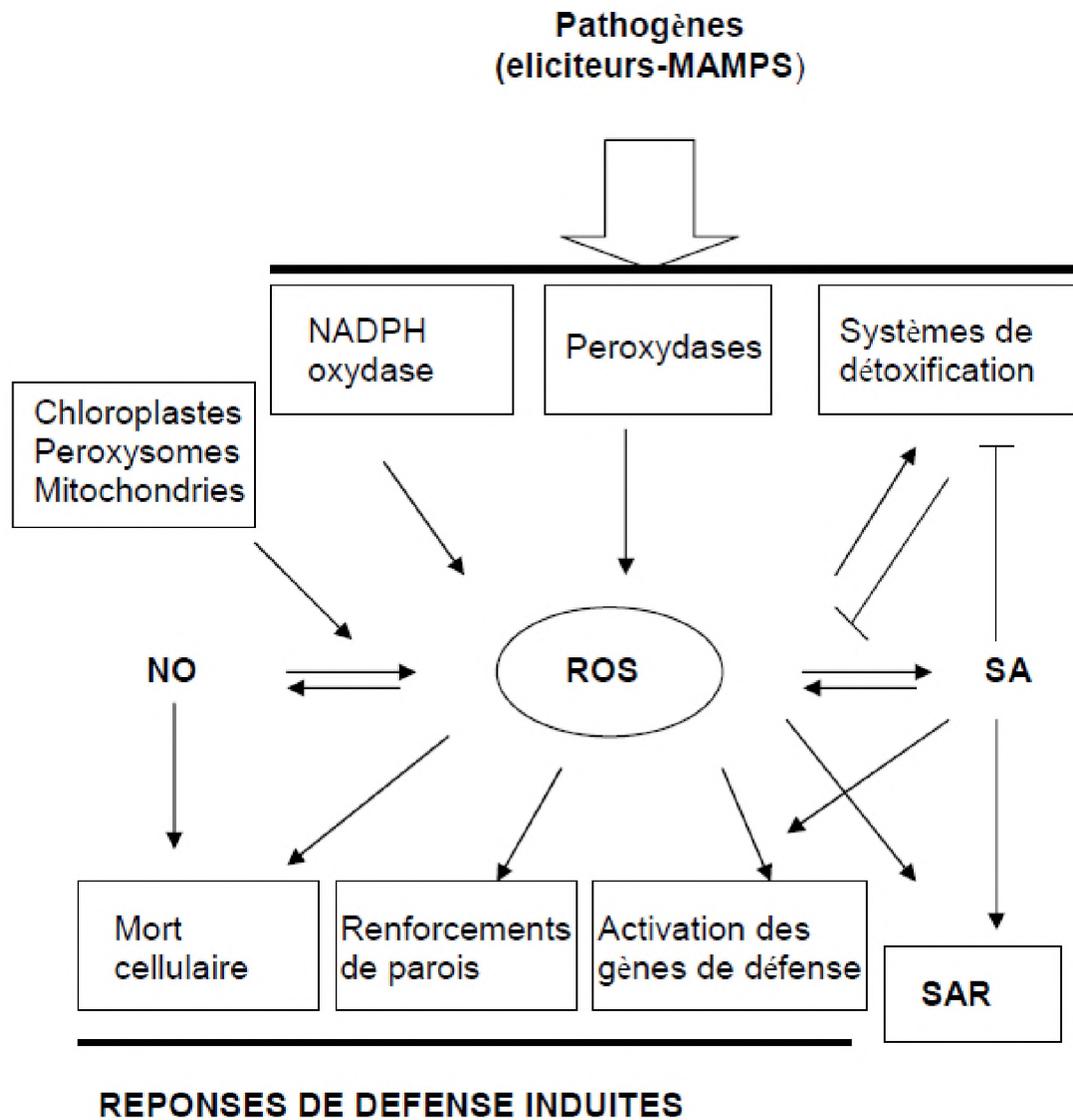


Figure 5 : Sources et fonctions des ROS chez les plantes suite à l'infection par des agents pathogènes [63].

ROS, formes actives de l'oxygène ; NO, monoxyde de l'azote ; SAR, résistance systémique acquise ; SA, acide salicylique.

Différents niveaux d'intervention du SA ont été décrits [76]:

- Le SA affecte une variété d'événements biochimiques et moléculaires associés à l'induction de la résistance aux maladies. Il a été démontré que le SA joue un rôle important dans l'expression à la fois de la résistance locale contrôlée par des gènes majeurs et de la résistance systémique induite développée après une attaque initiale du pathogène [77].

- Plusieurs protéines PR (pathogens related proteins) induites par le SA ont des activités antimicrobiennes, c'est le cas des chitinases et de la β 1-3 glucanase [78]. D'autres appartiennent à la famille des PR-1, elles ont une activité inhibitrice de la croissance mycélienne et pourraient avoir un rôle dans l'établissement de la SAR [79].

- Le SA a aussi la capacité de lier des enzymes comme les catalases, les ascorbates peroxydases et les aconitases [80]. La capacité du SA d'inhiber la catalase (enzyme qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène) pourrait prolonger la demi vie du H_2O_2 et conduirait à l'amplification du stress oxydatif à l'origine du déclenchement des réactions de la défense locale [70].

- Le SA interviendrait aussi comme molécule de signalisation susceptible de migrer dans les vaisseaux et conférer une immunité à distance aux tissus de la plante dans la SAR [81]. D'autres molécules notamment l'acide jasmonique et l'éthylène interviendraient dans la signalisation aboutissant aux réactions de défense. Ces molécules agiraient indépendamment ou en synergie avec la voie de le SA [82].

2.3 L'induction de la résistance systémique (ISR) et la transmission du signal de l'immunité systémique des plantes

La résistance systémique induite est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise [24], tout comme dans le cas de la SAR, les réactions de défense de l'ISR permettent de mieux se défendre vis-à-vis d'une agression ultérieure. L'activation simultanée de la SAR et de l'ISR offre une capacité défensive

renforcée en comparaison à chaque type de résistance unique [83]. Ces deux types de résistances induites sont efficaces contre un large spectre d'agents pathogènes [84].

L'expression phénotypique de l'ISR peut être divisée en quatre étapes principales [24].

- La perception par la plante des molécules bactériennes responsables de l'élicitation de l'ISR ;
- La transmission du signal nécessaire à la systémisation du phénomène chez la plante ;
- La mise en alerte (priming) de la plante au niveau systémique, qui dans la plupart des cas n'est pas accompagnée de grandes modifications de l'activité transcriptionnelle avant l'attaque du pathogène ;
- Lors de l'agression par l'agent pathogène, l'expression du ou des mécanisme (s) de défense, permettant de limiter voir d'inhiber la pénétration du pathogène dans les tissus de l'hôte végétal.

Trois molécules sont actuellement reconnues pour leur implication dans la transduction de la signalisation en relation avec l'ISR, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). Même si le SA est généralement associé à l'établissement de la SAR, son implication dans l'ISR a été aussi montrée dans certaines interactions plantes-pathogènes. C'est le cas du tabac et de la tomate chez qui, une accumulation de SA suite au traitement par *Pseudomonas aeruginosa*, a été notée [85].

Ryu et *al.*, [86] ont rapporté que la souche *Bacillus pumilus* SE34 était susceptible d'assurer chez *Arabidopsis*, une protection contre *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* utilisant une voie de signalisation dépendante du SA. Cependant, dans nombreuses interactions plante-pathogène, la signalisation de

l'ISR est indépendante du SA mais dépend plutôt de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Quelques études ont rapporté que la signalisation par JA et par ET opèrent souvent de façon synergique pour activer l'expression de gènes de défense suite à une inoculation avec un agent pathogène [87].

2.4 Stimulation du métabolisme secondaire : cas particulier du métabolisme phénolique

2.4.1 Métabolites phénoliques et la résistance des plantes aux maladies

Les plantes ont acquis la capacité de synthétiser et d'accumuler un nombre élevé de petites molécules de structure variée, connues sous le nom de métabolites secondaires. Ce sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt, interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction. Ils proviennent habituellement d'acides aminés ou d'autres produits du métabolisme primaire. Certains de ces composés possèdent une activité antimicrobienne et sont de véritables outils de la défense des plantes contre les agents pathogènes [88 ; 89].

En fonction de leur origine biosynthétique, les métabolites secondaires des plantes sont divisés en trois groupes : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés soufrés, et les flavonoïdes et les composés phénoliques et polyphénoliques [90].

Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques comportant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils sont classés selon le nombre de carbones par molécule et selon la structure du squelette de base [91].

Les terpénoïdes contribuent au métabolisme primaire en tant que pigments [92]. En outre, ils ont des fonctions importantes en tant que composés à activité antimicrobienne et servent également à stimuler les réactions de défense chez les

plantes. Les terpénoïdes volatiles libérés par les plantes endommagées induisent une défense chez les plantes voisines [93].

Les alcaloïdes sont des composés contenant de l'azote dont la principale fonction est la défense contre les herbivores et les pathogènes par la toxicité [94].

Les flavonoïdes sont les composés phénoliques les plus nombreux, ils s'accumulent dans l'épiderme et participent à la protection contre les UV [95]. Ils peuvent jouer divers rôles dans les domaines suivants la défense des plantes contre les agents pathogènes et activateurs pour les gènes de défense des plantes [96].

Les acides phénoliques tels que les tanins, réduisent l'appétence des plantes en raison de leur saveur. En outre, les tanins se lient aux protéines, ce qui affecte l'absorption des nutriments par les herbivores et ils peuvent inactiver les enzymes digestives qui entravent la digestion [97].

2.4.1 Rôle des composés phénoliques dans la défense constitutive et la défense induite

Les premiers travaux qui ont mis en évidence le rôle des composés phénoliques constitutifs dans la défense des plantes reviennent à Walkers [98]. Ils ont montré que la résistance de l'oignon à la maladie causée par *Colletotrichum circinans* est corrélée avec la pigmentation du bulbe. Les extraits aqueux de ces bulbes inhibent la croissance de ce pathogène et déforment son tube germinatif. Les analyses de ces extraits ont révélé que l'activité antimicrobienne de ces extraits est due à deux composés phénoliques simples, le catéchol et l'acide procatéchique.

La plupart des plantes possèdent des composés phénoliques préformés ayant une activité antimicrobienne et pouvant jouer un rôle dans la résistance aux maladies [96]. Le 3-hydroxyacétophénone et le triglycoside du kaempferides sont des composés phénoliques qui ont été associés à la résistance de l'oeillet au *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* [99]. La résistance à la pourriture brune a été corrélée avec la production des acides chlorogénique et caféique chez le pêcher.

Ces composés phénoliques interviendraient en inhibant les enzymes nécessaires à la pénétration du pathogène à travers la cuticule des fruits [100].

Dans la plupart des interactions plantes-pathogènes, les réactions de défense sont induites après l'infection par des pathogènes [101]. Les phytoalexines phénoliques s'accumulent au cours des interactions incompatibles ou en réponse à l'application d'éliciteurs dans de nombreux systèmes végétaux [102].

Chez les Brassicacées (dont fait partie *arabidopsis*) 44 phytoalexines ont été identifiées. La plupart de ces phytoalexines sont des alcaloïdes dérivés d'acides aminés aromatiques et du tryptophane et contenant des sulfures [103]. Parmi les plus connus se trouvent les isoflavonoïdes des légumineuses notamment avec la phaséoline chez le haricot et la pisatine chez le pois, les coumarines (scopolétine ou le capsidiol chez le tabac), les sesquiterpénoïdes des Solanacées (rishitine chez le tabac) ou les stilbènes dérivés de la phénylalanine, tel que le resvératrol chez la vigne [101].

2.5 Protéines de défense, cas particulier des peroxydases et des polyphénol-oxydases

L'arsenal défensif des plantes comprend de nombreuses protéines de défense induites après l'infection par des agents pathogènes [104]. Les premières protéines de défense découvertes sont les PR-protéines (Pathogenesis Related proteins), détectées dans des feuilles de tabac à la suite de leur infection par le virus de la mosaïque du tabac (TMV) [105].

Les protéines de défense peuvent agir directement sur l'agent pathogène ou indirectement en générant des éliciteurs susceptibles de stimuler la défense de la plante hôte [106].

Plusieurs familles de protéines de défense peuvent être considérées, les plus étudiées sont des enzymes du métabolisme secondaire (phénylpropanoïdes, lignines), des enzymes de détoxification (peroxydases, catalases), des enzymes

hydrolytiques (chitinases, glucanases) et les protéines PR. Les protéines PR sont des protéines de défense induites dans les plantes hôtes en réponse à une infection pathologique, elles sont susceptibles de s'accumuler localement au niveau du site de pénétration de l'agent pathogène, mais aussi de manière systémique dans des organes loin du site de l'infection [107].

Le terme de protéines PR regroupe toutes les protéines induites par des microorganismes, mais aussi leurs homologues enzymatiques tels que la phénylalanine ammonia-lyase, les peroxydases et les polyphénol-oxydases, qui sont présentes dans les plantes constitutivement mais augmentent pendant les infections par les pathogènes [104].

Par ailleurs, les peroxydases sont largement connues pour leur rôle central dans la défense des plantes hôte contre les pathogènes nécrotrophes ou biotrophes [104]. Ce sont des enzymes à hème susceptibles de catalyser des réactions d'oxydation de divers substrats en utilisant le H₂O₂ :



Certaines peroxydases appartiennent à la sous-famille des PR-protéines 9 [104]. Elles interviennent aussi dans la synthèse des phytoalexines et des formes actives de l'oxygène, créant ainsi un environnement toxique aux agents pathogènes [108].

L'activité peroxydase est induite par des champignons, des bactéries et des virus [109]. Les peroxydases interviennent dans la réticulation des constituants de la paroi cellulaire, dans la synthèse de phytoalexines et dans le métabolisme des ROS. Elles sont souvent induites en réponse aux molécules de signalisation impliquées dans la défense des plantes comme le SA, le JA ou l'ET [110].

La polyphénol-oxydase comme la peroxydase, font partie des enzymes de défense induites dans les racines et le feuillage lors de la lutte contre les pathogènes

[111]. Ces enzymes participent à la défense de l'hôte associée à la paroi cellulaire, la première ligne de défense contre l'invasion des pathogènes [112 ; 113].

La polyphénol-oxydase facilite la réaction d'oxydoréduction qui transforme le polyphénol en composés antimicrobiens de type quinone [114].

3. Connaissances sur les mécanismes de défense de la plante contre les agrobactéries pathogènes

Il a été démontré que les plantes peuvent moduler leur expression génétique en réponse à une infection par *Agrobacterium* et que ce dernier peut en fait déclencher les mécanismes de défense de la plante [115]. La transformation des plantes par *Agrobacterium* est un processus complexe qui implique de multiples étapes et l'action concertée de facteurs liés à la bactérie et ceux de l'hôte.

Des travaux rapportent des interactions plantes-protéines et *Agrobacterium* lors du processus de reconnaissance. Les principaux progrès récents incluent la caractérisation des protéines interagissant avec Vir *in vivo*, la fonction des histones dans une intégration stable et l'élucidation de stratégies étonnamment intelligentes utilisées par *Agrobacterium* pour contourner voir abuser du système de défense des plantes [116].

L'étude approfondie et l'analyse moléculaire de l'interaction plante-*Agrobacterium* ont mis en évidence un certain nombre de réponses de défense pour contourner les stratégies pathogènes d'*Agrobacterium*, résumées dans l'action des phytohormones, les PAMPs et des ROS.

3.1 Action des phytohormones (l'acide salicylique, l'éthylène et l'AIA)

Une étude récente suggère que le SA est la principale phytohormone régulant les réponses des plantes à l'infection par *A. tumefaciens* [117]. Le SA est un régulateur majeur des réponses des plantes à la pathogénicité et à la virulence d'*Agrobacterium* [118]. Il a été rapporté que des taux élevés d'acide salicylique

agissent directement sur les agrobactéries oncogènes en inhibant l'expression des gènes *vir*, les principaux acteurs de la pathogénicité [119].

Il a été montré aussi, que des plantes présentant une déficience dans l'accumulation d'acide salicylique étaient plus sensibles à l'infection par *Agrobacterium*, tandis que les plantes surproduisant de l'acide salicylique étaient résistantes à l'infection par *Agrobacterium* et à la formation de tumeurs [119]. Ainsi, le SA semble contrecarrer l'invasion agrobactérienne à plusieurs niveaux, en particulier par son action sur les réponses auxiniques et comme agent antimicrobien [120 ; 121].

Outre l'inhibition de la virulence d'*Agrobacterium* par l'acide salicylique, le SA active l'opéron AttKLM, tout comme le GABA (acide gamma-aminobutyrique), pour réguler à la baisse le quorum sensing chez *Agrobacterium* [122]. Ainsi, l'activation de l'extinction du quorum par l'auxine, le SA et le GABA, font partie du programme de défense des plantes contre *Agrobacterium* dans la galle du collet en développement.

Il a déjà été signalé qu'*Agrobacterium* n'induit pas de réaction d'hypersensibilité (HR) chez les plantes cibles, même si la bactérie introduit plusieurs protéines dans la cellule hôte [123]. Cette inhibition des HR dépend en fait de la synthèse de l'auxine d'*A. tumefaciens* [123]. De plus, le SA, l'ET et l'IAA (Indole Acetic Acid) inhibent également le regulon *vir* et le transfert d'ADN-T dans les cellules végétales [124].

3.2 Implication des signaux PAMPs

D'une manière générale, la plante a mis en place un système de défense « immunitaire » qui agit aux différentes étapes de l'infection par *A. tumefaciens*. Le mécanisme le plus étudié est basé sur l'induction d'une cascade de signalisation de type MAP kinase (Mitogen- Activated Protein kinase) lorsque la plante perçoit des signaux du pathogène au niveau de certains récepteurs membranaires. Ces signaux

sont appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns ou molécules associées aux pathogènes).

Ils peuvent être aussi bien des éléments du pathogène que des composés produits par la plante en réponse à la présence du pathogène [39]. Cette réponse entraîne une défense locale comme la réponse hypersensitive et/ou la réponse systématique acquise [125]. Les peptides Elf26 (l'effecteur agrobactérien elf26) induisent des réponses d'immunité innée déclenchées par le PAMP, associées à la résistance aux maladies chez *arabidopsis* [126]. En effet, les plantes attaquées par *Agrobacterium* ne se contentent pas d'accepter leur sort. Semblable à d'autres pathogènes, *Agrobacterium* est détecté comme un envahisseur et déclenche la «réponse immunitaire innée», caractérisée par l'expression de gènes de défense et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène [127]. Cette réaction est obtenue grâce à la perception des modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) par des récepteurs spécifiques.

Semblable à de nombreux autres microorganismes, *Agrobacterium* déclenche l'activation des MAPK (Mitogen activated protein kinases), principalement MPK3, MPK4 et MPK6 [128]. Des interactions *in vivo* et des dosages de kinases ont montré que VIP1, la protéine 1 qui interagit avec VirE2, interagit avec et devient spécifiquement phosphorylée par MPK3 [128].

Bien que plusieurs PAMPs aient été isolés, seuls quelques récepteurs sont encore identifiés. Les récepteurs végétaux d'*Agrobacterium* comprennent une protéine de type vitronectine, une protéine de liaison à la rhicadhésine et plusieurs protéines interagissant avec VirB2 [129 ; 130].

Le PAMP le plus étudié est la flagelline, une protéine bactérienne hautement conservée. Chez *arabidopsis*, il est perçu par le récepteur de la protéine FLS2, un récepteur de répétition riche en leucine tel que la kinase (LRR-RLK). Lors de la perception de la flagelline ou de son peptide dérivé hautement conservé de 22 acides aminés, flg22, FLS2 devient activé et initie une transduction de signal basée sur le

phospho-relais *via* la cascade MAPK MEKK1-MKK1 / 2-MPK4 [39]. Par la suite, le facteur de transcription WRKY33 activé par MPK4 contribue à la reprogrammation transcriptionnelle liée à la défense [131].

Les protéines flagellines d'*Agrobacterium* en ce qu'elles ne sont pas reconnues et ne déclenchent pas de réponse de défense, ce qui implique que d'autres paires de récepteurs PAMPs sont responsables de la reconnaissance de cet organisme. En effet, un important *Agrobacterium* PAMP, le facteur d'élongation EF-Tu, a été identifié. Bien que hautement conservé chez tous les procaryotes, *Agrobacterium* EF-Tu est pleinement active en tant qu'éliciteur [132]. Fait intéressant, malgré leur dissemblance chimique, flg22 et EF-Tu partagent plusieurs caractéristiques. Les deux PAMP activent un ensemble commun d'événements de signalisation et de réponses de défense, tout en agissant sans synergie apparente. Ces réponses comprennent l'activation de MAPK, l'alcalinisation du milieu et une explosion oxydative [133].

3.3 Action des espèces réactives de l'oxygène (ROS's)

Il a déjà été signalé qu'*Agrobacterium* n'induit pas de réaction d'hypersensibilité (HR) chez les plantes cibles, même si la bactérie introduit plusieurs protéines dans la cellule hôte [123]. Cette inhibition des HR dépend de la synthèse de l'auxine d'*A. tumefaciens* [134].

Cela suggère que lors de l'interaction *Agrobacterium*-plante, les plantes produisent de l' H_2O_2 et *A. tumefaciens* produit des catalases pour détoxifier l' H_2O_2 . La production d' H_2O_2 est une réponse de défense des plantes à l'infection par *A. tumefaciens* [45].

La non-sensibilité des cellules végétales à la colonisation par un pathogène est due à la reconnaissance réussie du pathogène envahissant par la cellule végétale, qui génère un signal interne déclenchant des réponses de défense précoces dans les cellules végétales [135]. Cela peut également expliquer la non

sensibilité des cellules végétales de certains génotypes à l'infection par une souche particulière d'*Agrobacterium* [136]. En effet, la première réaction de défense observée dans les cellules végétales non sensibles à la suite d'une attaque par un pathogène est l'éclatement oxydatif [137].

Le rôle antimicrobien des espèces réactives de l'oxygène (ROS), y compris H_2O_2 , est reconnu depuis longtemps [45]. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites lors de l'explosion oxydative induite par l'agent pathogène pourraient être suffisamment toxiques pour tuer directement l'agrobactérie attaquante [138].

Mehdy [137] a montré que les ROS peuvent également conduire à l'induction de protéines liées à la pathogenèse (PR), qui peuvent inhiber le potentiel d'*Agrobacterium* à coloniser et à transférer l'ADN-T aux cellules végétales. L'inactivation du transgène a été signalée comme une réponse de défense des plantes pour l'expression d'ADN étranger et les ROS peuvent jouer un rôle dans une telle réponse de défense [139]. Cet effet a été expliqué par le fait que les fragments d'hydrates de carbone et de bases de l'ADN sont susceptibles d'être oxydés par le radical hydroxyle, ce qui entraîne la dégradation des bases, la rupture d'un seul brin et la réticulation de l'ADN en protéines [140].

4. Les mesures et méthodes classiques de lutte contre la maladie de la galle de collet

Compte tenu du processus génétique d'infection par les agrobactéries pathogènes, les moyens de lutte sont réduits. La maladie cause des dégâts au niveau des pépinières et des vergers et engendre des pertes financières importantes estimées à des millions de dollars par an [141]. Les mesures de lutte se résument en la prévention contre l'attaque, puisqu'une fois la plante contaminée, la tumeur demeure dans les tissus de la plante hôte et empêche la conduction de la sève.

4.1 Méthodes de lutte préventives, culturales et prophylactiques

Différentes méthodes de lutte préventives, culturales et prophylactiques ont été déployées afin de limiter les infections par *Agrobacterium* et réduire le taux de plantes attaquées par le crown gall.

La lutte contre la maladie de la galle du collet a longtemps préoccupé les agriculteurs et les chercheurs dans le monde entier. Ils ont tenté, en vain, différentes méthodes traditionnelles allant jusqu'à brûler les arbres infectés. La meilleure solution consistait à protéger les champs sains en empêchant leur contamination par la bactérie.

Cependant, cette méthode ne peut pas constituer une solution à long terme et elle devient inefficace une fois le champ est infecté. Les techniques culturales et notamment les plantations alternant une rotation avec une plante non sensible pour une période de 2 à 3 ans, sont susceptibles de limiter la progression de l'infection par *Agrobacterium* mais ne permettent pas de la stopper.

De plus, la bactérie persiste dans le sol pendant de longues périodes et son plasmide passe des souches tumorigènes aux souches non tumorigènes d'*Agrobacterium* par transfert horizontal comme montré dans de nombreuses recherches [48 ; 32].

La thermothérapie est l'un des premiers moyens de traitement des sarments de vigne en dormance dans l'eau à 50 °C pendant 30 min avant de les planter ce qui permet d'éliminer partiellement les *A. vitis* [142]. Si ce traitement semble efficace sur les *A. vitis*, vu sa systémicité, il semble toutefois ne pas l'être sur *A. tumefaciens*. En fonction des variétés de vigne, du climat de la région, de l'âge et de la vigueur de la plante avant mise en dormance, il peut avoir un impact négatif sur la physiologie de la plante [143].

Le contrôle chimique est un procédé onéreux qui s'est souvent révélé inefficace contre *A. tumefaciens* et *A. vitis*. Malheureusement, les essais effectués

jusqu'à nos jours ont donné des résultats très décevants qui ne valent même pas la peine de prendre le risque de disperser des substances délétères dans l'environnement. Ces moyens chimiques tels que l'hypochlorite de sodium à 0,5%, le cuivre et les antibiotiques n'ont pas donnée l'efficacité voulue du fait qu'ils ne tuent les bactéries qu'à la surface du matériel végétal. Les antibiotiques quant à eux, sont utilisés dans la thérapie humaine et ne sont pas tolérés comme produits phytosanitaires [144].

4.2 La lutte biologique par utilisation d'agents microbiens

Depuis plus d'une décennie, l'accent a été mis sur la lutte biologique contre la galle du collet à l'aide de la souche d'*A. radiobacter* K84 et de son dérivé génétiquement modifié K1026, car jusqu'à présent, aucune autre stratégie de gestion ne s'est avérée aussi efficace [54].

En Algérie, une expérimentation menée en plein champ a montré que l'incidence du crown gall sur pêcher cv Missouri est réduite de 94 % lorsque ces plants sont initialement trempés dans une suspension d'*A. radiobacter* K84 avant d'être inoculés avec une souche tumorigène sensible et/ou résistante à l'agrocine 84 [18]. Par ailleurs, la protection par K84 des plants inoculés avec une souche résistante à l'agrocine 84 suggère l'existence en plus de la production d'agrocine, d'autres mécanismes favorisant la performance de cet antagoniste. Ces résultats ont montré que K84 pourrait être utilisée en Algérie et ce, en dépit de la présence de souches résistantes à l'agrocine 84 [18 ; 9].

Cependant, la souche K84 n'est pas efficace vis-à-vis de toutes les souches d'*Agrobacterium* spp. et elle n'empêche pas les infections par *A. vitis*, ce qui a conduit les chercheurs à focaliser leurs études pour identifier de nouvelles souches bactériennes ayant la capacité de contrôler le crown gall [145].

Plusieurs souches cultivables de *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Pantoea* sont des agents de biocontrôle efficaces [146 ; 147] ou ont un potentiel de contrôle biologique élevé contre la maladie de la galle du collet [148].

Des bactéries endophytes telles que *Pseudomonas aureofaciens* B-4117, *P. fluorescens* CR330D et 1100-6, *Bacillus subtilis* EN63-1, *Bacillus* sp. EN71-1, ainsi que *Rahnella aquatilis* HX2, peuvent inhiber le développement de plusieurs agents phytopathogènes y compris *A. vitis* [149].

Pseudomonas fluorescens 1100-6 qui réduit l'incidence du crown gall peut aussi survivre au niveau du rhizoplan de la vigne pour une période de 6 mois après avoir colonisé les tissus du xylème et de l'épiderme en montrant une compétence rhizo- et endosphérique [150].

Avec *Rahnella aquatilis* HX2, il a été montré que le trempage des extrémités basales des boutures de vigne dans une suspension de cette souche a inhibé ou a complètement empêché la formation des galles après l'inoculation par *A. vitis* K308. La souche HX2 a été détectée dans la rhizosphère de vigne cultivée sous des conditions de plein champ de plus de 90 jours après l'inoculation et elle n'a pas influencé les populations microbiennes présentes en petites densités [151].

4.3 L'induction de la résistance systémique (ISR) ou priming, une voie de contrôle biologique

L'emploi de microorganismes du sol, non pathogènes, en tant qu'agents de biocontrôle des maladies des plantes est une alternative prometteuse aux pesticides chimiques. Cette technologie permet de protéger les plantes contre les pathogènes sans pour autant nuire aux équilibres écologiques des écosystèmes.

Les agents de biocontrôle peuvent agir directement sur les phytopathogènes (compétition, antagonisme) ou indirectement en stimulant la défense des plantes hôtes. L'expression de cette défense est communément appelée résistance

systemique induite (ISR), elle se fait de manière systemique dans tous les organes de la plante contre divers pathogenes.

Certains agents de biocontrôle sont susceptibles de stimuler la croissance des plantes, ils sont designés sous le nom de PGPRs (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) [152]. Les PGPRs stimulent l'ISR induite aussi bien chez les dicotyledones que chez certaines monocotyledones. Les microorganismes susceptibles d'induire l'ISR sont divers, nous citons par exemple parmi les champignons, les ascomycetes (*Trichoderma*), les bacteries du genre *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) et les bacteries du genre *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *Burkholderia cepacia* et *P. brassicacearum*) [153 ; 154].

Les mecanismes de resistance des plantes aux agents pathogenes, durant les dernieres decennies, ont permis l'introduction des concepts de resistance induite et de priming ou « priming » des plantes. Le priming permet à la plante de repondre plus rapidement et plus efficacement quand elle est soumise à un stress, la rendant ainsi plus resistente ou tolerante [155].

Plusieurs microorganismes antagonistes ont été utilisés dans le contrôle des maladies phytopathogenes via la resistance induite [156]. Parmi les bacteries les plus utilisées, nous pouvons citer notamment le genre *Pseudomonas* et *Bacillus* [157].

Les agents de lutte biologique à base de bacilles jouent un rôle fondamental dans le domaine des biopesticides. De nombreuses especes de *Bacillus* ont prouvé leur efficacite contre un large éventail de pathogenes vegetaux. Ils ont été signalés comme promoteurs de croissance des plantes, inducteurs de resistance systemique et utilisés pour la production d'une large gamme de composés antimicrobiens (lipopeptides, antibiotiques et enzymes) et comme concurrents par colonisation des facteurs de croissance (espace et nutriments) avec d'autres microorganismes pathogenes [23].

5. Microorganismes stimulateurs de défense naturelle (SDN), de défense des plantes ou éliciteurs, une solution de lutte durable contre les organismes phytopathogènes

Depuis un certain nombre d'années, une nouvelle stratégie alternative se développe. Elle vise non plus à détruire les agresseurs biotiques pour protéger les cultures mais à admettre un certain niveau d'agression en stimulant les défenses "naturelles" des plantes dans le cadre d'une stratégie de gestion des maladies et des ravageurs authentiquement durable, celle d'utiliser des stimulateurs de défense des plantes [158].

Un stimulateur de défense des plantes (SDP) désigné aussi par les termes d'éliciteur, d'activateur, d'inducteur ou encore de stimulateur de défense naturelle (SDN) est par définition toute molécule pouvant mimer l'attaque d'un pathogène et induire chez la plante des métabolites capables d'assurer sa défense face à une agression biotique causée par un agent pathogène ou face à un stress abiotique [159].

Le PGPR et les agents pathogènes avirulents induisent une résistance en libérant des éliciteurs aux plantes. Ces éliciteurs peuvent être biotiques ou abiotiques, ils comprennent les protéines, les polypeptides, les lipides et les oligosaccharides [160]. Ce sont des molécules capables d'imiter la perception d'un agent pathogène par une plante, déclenchant ainsi une réponse de défense sophistiquée chez les plantes [161].

Les protéines éliciteurs telles que, les harpines et les élicitines sont généralement dérivées d'organismes pathogènes comme les bactéries Gram-négatives et les oomycètes, seules quelques-unes d'entre elles sont isolées de PGPR [162].

Un grand nombre de microorganismes inducteurs d'ISR identifiés jusqu'à présent, sont des bactéries à Gram-négatif et plus particulièrement des espèces appartenant aux *Pseudomonas*. Cependant, le nombre de *Bacillus* spp. signalés

comme inducteurs d'ISR a rapidement augmenté au cours de la dernière décennie et comprend *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* et *B. sphaericus* [163]. Ces espèces peuvent entraîner une réduction significative de la gravité des maladies pour un large éventail d'agents pathogènes chez une diversité d'hôtes.

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* connues pour leur pouvoir métabolique important, agissent par utilisation d'un biofilm, où différentes activités biologiques sont assurées à l'échelle communautaire, parmi lesquelles ; la stimulation de la croissance, l'induction de l'ISR, l'acquisition du fer et la production de sidérophores intervenant à la compétition, la production d'antibiotiques, la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques et la compétition avec d'autres microorganismes [163 ; 164 ; 23].

Le disulfure de diméthyle (DMDS), produit par une souche de *Bacillus cereus*, a une activité d'induction d'ISR et entraîne une résistance aux maladies fongiques des plantes [165]. Les substances chimiques volatiles produites par les souches de PGPR *B. subtilis* GB03 et *B. amyloliquefaciens* IN937a déclencheraient des réactions de défense des plantes [166]. Les fengycines et les surfactines dérivées de *B. subtilis* peuvent également induire des réponses de défense des plantes [167].

L'éliciteur peut induire le métabolisme phénolique et la synthèse de la lignine. Les composés phénoliques, notamment la scopoletine, les acides phénoliques et l'acide férulique lié à la paroi cellulaire, peuvent conférer une résistance mécanique à la paroi cellulaire pour la protéger contre l'infection par des bactéries ou des champignons pathogènes. La réticulation des esters de phénylpropanoïdes par l'acide férulique conduit à la formation de polymères de type lignine [168].

L'utilisation des microorganismes capables d'un comportement antagoniste contre les agents pathogènes pour l'induction d'une résistance systémique dans les plantes est une méthode prometteuse de gestion des maladies des cultures. En pratique, l'application d'éliciteurs sous forme d'arrosage ou de pulvérisation foliaire

sur les plantes est utilisée chez de nombreuses plantes cultivées à l'égard de pathogènes économiquement importants.

L'acibenzolar-S-méthyl est un analogue fonctionnel de le SA, inducteur de la SAR [169]. En application préventive, il assure un niveau de protection contre le feu bactérien d'environ 50% [170]. Ce produit et une large gamme d'autres produits SDN sur le commerce, sont autorisés pour la lutte préventive contre le feu bactérien des Maloidées.

Les éliciteurs sont capables d'induire l'inactivation de gènes liés à la pathogénèse et d'améliorer l'immunité de la plante traitée pour une lutte efficace contre les envahisseurs [171]. Cette pratique a donné des résultats très prometteurs concernant les bactéries phytopathogènes dans une étude menée au laboratoire parallèlement à celle-ci. En effet, à l'égard du feu bactérien des Pomoidées une maladie dévastatrice dans les vergers algériens, des espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas brassicacearum* ont prouvé une efficacité de plus de 90% sur des souches d'*Erwinia amylovora in vitro et in planta*, inoculées à des poires immatures [26]. Une analyse plus fine de ces souches a montré leur capacité de production de sidérophores de type hydroxamates et catécholates et de biosurfactants, molécules requises dans la performance des agents microbiens de biocontrôle.

Une protection maximale de la plante contre les agents pathogènes constitue une approche intégrée de gestion et de contrôle des maladies. Elle impliquera l'utilisation de microorganismes, de leurs métabolites, et de formulation d'extraits de plantes qui seront appliqués simultanément à la plante permettra aux agriculteurs de gagner la guerre contre les phytopathogènes, d'augmenter le rendement des cultures et d'obtenir une pratique agricole durable en assurant la sécurité alimentaire [172].

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Partie 1 :

Evaluation du potentiel des souches antagonistes de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* dans le contrôle d'*Agrobacterium* spp. pathogènes, impliqués dans la maladie de la galle du collet

Les essais de cette expérimentation ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Protection et de Valorisation de Ressources Agro-Biologiques (Faculté SNV, Université Saad Dahleb, Blida1).

L'objectif de cette étude consiste à évaluer le pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta* et la suppression de l'effet nécrotique de quatre bactéries appartenant à deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, initialement isolées de plantes spontanées [22], vis-à-vis des souches pathogènes d'*A. vitis* et des souches d'*A. tumefaciens*.

1. Souches bactériennes utilisées

1.1 Souches antagonistes

Deux souches de *Pseudomonas brassicacearum* (CR2 et EPR3), *Bacillus cereus* OS1 et *Bacillus methylotrophicus* OS4 ont été isolées initialement à partir des plantes spontanées et identifiées par séquençage de l'ADN ribosomal 16S [22] (tableau 2.1). Ces souches ont été sélectionnées sur la base de leur pouvoir antagoniste *in vitro* et de leur activité de stimulation de la croissance des plantes [22].

Ces souches antagonistes ont été cultivées sur milieu LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) [173] (annexe 1), puis incubées à 28°C. Pour l'étape de bactérisation, nous avons préparé des suspensions bactériennes à une densité cellulaire équivalente à la concentration de 10^7 UFC /ml.

Tableau 2.1 : Origines des souches antagonistes utilisées [22].

Code de la souche	Nom scientifique	Origine végétale	Année d'isolement
OS1	<i>B. cereus</i>	<i>Urtica dioica</i>	2010
OS4	<i>B. methylophilus</i>	<i>Urtica dioica</i>	
CR2	<i>P. brassicacearum</i>	<i>Calendula arvensis</i>	
EPR3	<i>P. brassicacearum</i>	<i>Euphorbia peplus</i>	

1.2 Souches pathogènes

Les souches pathogènes d'*A. tumefaciens* dont ; une de référence C58 (ATCC33970) et une souche locale E2 isolée d'eucalyptus [11], ont servi pour les tests *in vitro* et *in planta*. Deux autres souches d'*A. vitis* (AV25/95 et Bu20/95) gracieusement fournies par Marilyn L. Canfield, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, ont subi les mêmes tests que les précédentes. Toutes les souches d'*Agrobacterium* appartiennent à la collection de bactéries phytopathogènes de l'Université de Blida1 et ont fait l'objet de tests préliminaires de vérification de leur pathogénicité sur *Kalanchoë daigremantiana* et *Lycopersicum esculentum* [174] (tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Origine des souches d'*A. tumefaciens* utilisées.

Souche	Origine végétale	Origine géographique	Année d'isolement	Source
C58	<i>Prunus cerasus</i>	New York (U.S.A)	1955	Dickey R.S. Cornell university, Ithaca, N. Y.
E 2	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	Tlemcen (Algérie)	2003	Krimi Z. Université Blida 1

Ces souches ont été conservées dans des tubes contenant l'eau distillée stérile à une température de 4°C. Leur pureté a été vérifiée par étalement sectoriel et purifications successives sur le milieu MG [174] (annexe 2).

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 UFC /ml.

En effet, pour notre expérimentation, nous avons utilisé la densité d'inoculum de 10^6 UFC/ml, indiquée par plusieurs travaux effectués sur *A. tumefaciens*.

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats antagonistes contre les souches d'*A. tumefaciens*, nous avons considéré le ratio de 10 : 1 c'est-à-dire, pour l'antagoniste une concentration de 10^7 UFC/ml, 10 fois supérieure à celle de la souche pathogène 10^6 UFC/ml [175].

2. Test d'antagonisme *in vitro*

Le pouvoir antagoniste des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas brassicacearum* à l'égard des souches d'*Agrobacterium* pathogènes a été testé *in vitro* par deux techniques de confrontation : la première consiste à laisser un laps de temps (24 h), qui permet à la souche antagoniste de diffuser les molécules antimicrobiennes dans le milieu de culture avant le dépôt de la souche pathogène : c'est la confrontation déphasée. La deuxième technique de confrontation simultanée, consiste à déposer les deux souches, antagoniste et pathogène en même temps sur le milieu de culture.

2.1. La confrontation déphasée

La confrontation déphasée *in vitro* a été réalisée suivant la méthode décrite par Stonier [176] et modifiée par Moore et al. [174].

Les bactéries de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* à tester, ont été cultivées sur le milieu LPGA pendant 48 h à 28 °C. Chaque souche bactérienne purifiée a été raclée des boîtes de Petri contenant le milieu LPGA et mise en suspension dans l'eau distillée stérile (EDS) à une concentration connue (10^7 UFC/mL), déterminée par spectrophotométrie en comparant la DO de chaque suspension à sa propre courbe de croissance de référence à $\lambda = 600$ nm. Un volume de 20 μ L de chaque suspension bactérienne a été ensemencé sous

forme d'un spot central sur la surface des boîtes de Petri puis incubées par la suite pendant 24 h à 28 °C.

Parallèlement, les bactéries pathogènes ont été ensemencées sur le milieu LPGA et cultivées dans les mêmes conditions décrites que les antagonistes. Après incubation, les suspensions de bactéries pathogènes (10^6 UFC/mL) préparées comme décrit ci-dessus, sont pulvérisées à l'aide d'un aérosol stérile sur la surface des boîtes de Petri contenant les souches bactériennes ensemencées en spots.

Les boîtes de Petri ont été incubées de nouveau pendant 48 h à 28 °C et l'apparition d'une zone d'inhibition entourant la macro-colonie a été considérée comme une activité antagoniste positive. L'efficacité d'inhibition des différentes souches a été évaluée par la mesure du diamètre de chaque colonie en plus de la zone d'inhibition. L'expérience a été réalisée avec trois répétitions pour chaque souche.

2.2. La confrontation simultanée

La confrontation simultanée consiste à déposer les deux souches, antagoniste et pathogène en même temps. Pour réaliser cette opération, nous avons suivi le principe de la méthode des puits à double couche décrite par Rhouma et *al.* [20].

Des boîtes de Petri sont coulées avec une couche solide de milieu LPGA, juste après la solidification de cette couche, une autre couche semi-solide du même milieu est coulée de nouveau sur la première. À l'aide d'un emporte-pièce stérile, trois puits de 0.8 mm de diamètre sont creusés sur la couche semi-solide, ils correspondent par conséquent, à 3 répétitions par boîte et par souche.

Les boîtes de Petri sont pulvérisées par la suspension de chaque souche pathogène d'*Agrobacterium* à une densité cellulaire de concentration 10^6 UFC /mL. Après pulvérisation, un volume de 20 μ L de la suspension de la bactérie supposée antagoniste est déposé dans chaque puits. Enfin, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48 h. Pour le témoin négatif, nous avons pulvérisé le pathogène ensuite déposé l'EDS dans les trois puits.

L'apparition d'une zone d'inhibition claire entourant des puits a été considérée comme une activité antagoniste positive. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant le diamètre en mm des zones d'inhibition.

3. Essai de suppression de l'effet nécrotique d'*Agrobacterium vitis* par utilisation des souches antagonistes

En conditions naturelles, l'infection par les souches pathogènes d'*A. vitis* se manifeste principalement par la formation d'une tumeur au niveau des parties aériennes et des nécroses localisées sur les racines de la vigne [177 ; 178].

Les quatre souches antagonistes sont testées pour examiner leurs capacités ou non à supprimer l'effet nécrotique des souches pathogènes d'*A. vitis* (AV20/95 et Bu25/95), cet essai a été réalisé en suivant la méthode décrite par Burr et Zheng [179].

Le matériel végétal est constitué de rameaux verts de vigne (*Vitis vinifera*) fraîchement cueillis présentant un diamètre entre 5 et 10 mm. Quatre variétés de vigne ont été testées : Gros noir, Cinsault, Muscat et la variété Ahmer Bouamer.

Dans des conditions d'asepsie, la désinfection superficielle des rameaux verts des différentes variétés de vigne avant leur découpe est dans de l'éthanol à 70 % pendant 2 mn et dans l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0,5 % pendant 10 mn, cette étape est suivie de trois rinçages successifs à l'EDS. Les rameaux séchés sur du papier Whatman stérile sont découpés en sections cylindriques de 1 cm de longueur.

Dans des microplaques de culture cellulaire à 12 alvéoles contenant une couche d'eau gélosée à 2 %, nous avons placé les sections de chaque variété en tenant l'extrémité basale de chaque section vers le haut. Après fixation des sections sur le milieu gélosé, un volume de 10 µL de la suspension de la souche antagoniste et/ou de la souche d'*A. vitis* (selon le traitement) est déposé (tableau 2.3).

L'essai de suppression de l'effet nécrotique a été réalisé sur des microplaques de culture à 12 alvéoles selon un dispositif expérimental qui

comporte plusieurs traitements. Une section cylindrique des rameaux verts de chaque variété avec trois répétitions pour chaque traitement, soit un total de 48 sections. Au total, pour tous les traitements de l'essai, nous avons utilisé 192 sections de rameaux.

Pour la concentration cellulaire, nous avons appliqué le ratio 10:1 où la concentration de l'antagoniste est 10 fois supérieure à celle de la souche pathogène [180]. La DO de la suspension de l'antagoniste équivaut à une concentration de 10^7 UFC /mL et celle de la souche pathogène à 10^6 UFC /mL.

Les microplaques sont ensuite recouvertes avec du papier aluminium et placées à la température ambiante du laboratoire pendant sept jours. Si la souche antagoniste possède une action inhibitrice de l'effet nécrotique vis-à-vis des souches pathogènes d'*A. vitis*, les sections des rameaux verts de la vigne vont garder leur couleur verte par rapport aux témoins positifs inoculés par la souche pathogène qui noircissent et se nécrosent.

La sévérité de l'effet nécrotique au niveau des sections des rameaux verts est évaluée selon l'échelle de classe de 0 à 5 décrit par Oslane et al. [181] (tableau 2.4). Les sections des rameaux verts de chaque variété testée ont été classées selon 5 classes de sévérité, puis l'indice de sévérité (IS %) a été calculé selon la formule suivante [182] (Cooke, 1998) :

$$IS \% = (\sum (N_i \times S_i) / (N_t \times 5)) \times 100$$

N_i : nombre de sections de rameaux dans la classe de sévérité i ,

i : allant de 1 à 5.

S_i : numéro de classe de sévérité.

N_t : nombre total de sections observées par traitement.

Tableau 2.3 : Les différents traitements de l'essai de suppression de l'effet nécrotique.

Traitements	
T1	Témoin négatif qui consiste à déposer l'EDS sur les sections de la vigne de chaque variété.
T2	Témoin positif représenté par les sections de chaque variété de vigne inoculée par la suspension de la souche pathogène d' <i>A. vitis</i> (soit AV25/95 ou Bu20/95).
T3	Les sections de chaque variété de vigne inoculées directement avec la suspension de souches antagonistes : EPR3, CR2, OS1 ou OS4.
T4	Le traitement consiste à interagir le pathogène avec l'antagoniste en laissant un laps de temps de 20 min entre le dépôt de l'antagoniste et l'inoculation du pathogène. Les traitements sont : <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>EPR3 - AV25/95</p> <p>EPR3 - Bu20/95</p> <p>CR2 - AV25/95</p> <p>CR2 - Bu20/95</p> <p>OS1 - AV25/95</p> <p>OS1 - Bu20/95</p> <p>OS4 - AV25/95</p> <p>OS4 - Bu20/95</p> </div> <div style="font-size: 3em; line-height: 1;">}</div> <div style="margin-left: 20px;"> <p>Sur les sections de chaque variété de vigne</p> </div> </div>

Tableau 2.4 : Echelle d'estimation de la sévérité de l'effet nécrotique.

Classe de sévérité	Degré d'infection des sections des rameaux verts de la vigne
0	Pas d'effet nécrotique
1	Passage de l'anneau vasculaire du vert au brun
2	Brunissement de l'anneau vasculaire et du cylindre central (centre des sections)
3	Nécrose partielle de la section
4	Nécrose totale de la section
5	La section de la vigne est totalement nécrosée + pourriture.

4. Essai d'antagonisme *in planta* sur la tomate et la vigne

Le test d'antagonisme *in planta* a été mené sur des plants de tomate (var. Saint Pierre) et de vigne (var. Gros noir). Le choix de tester l'activité antagoniste sur la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), est justifié par le fait qu'elle constitue une plante hôte utilisée lors des expérimentations pour les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium*, car en cas de réponse positive, elle développe des tumeurs en un temps très court [183]. La vigne (*Vitis vinifera*), constitue la principale plante hôte d'*A. vitis* [8], pour les besoins de l'expérimentations, ses graines ont été récupérées à partir de grappes d'un vignoble situé à Bouchrahil (W. Médéa).

4.1. Méthodologie

Les semences de tomate et les graines de raisin ont été désinfectées dans une solution constituée de NaOCl à 2 % pendant 5 min, puis rincées à l'EDS. Les graines de raisin désinfectées, ont subi une pré-germination dans des boîtes de Petri contenant une couche d'eau gélosée à 7 % et mises dans un incubateur à 28 °C afin d'accélérer leur germination.

Les plants de tomate et de vigne issus de l'étape de pré-germination ont été transplantés pour être cultivés sur un substrat composé d'un mélange de 2/3

de terre végétale et 1/3 de tourbe, soigneusement homogénéisés et autoclavés deux fois pendant 60 min à 120 °C, avec un intervalle de 24 h entre chaque autoclavage [184].

Le semis des graines de tomate et de la vigne pré-germées, a été réalisé dans des pots (10 cm × 6,5 cm) en mini serre, avec une photopériode quotidienne de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité à une température de 25 ± 1 °C. Au cours de l'expérience, un niveau adéquat d'humidité du substrat a été maintenu par une irrigation régulière.

La sélection des plantules germées est faite après la germination des semences de tomate et de la vigne et avant leur inoculation par les bactéries antagonistes. Les plantes de tomates ont été choisies au stade de deux vraies feuilles pour que l'ensemble des plantes soit homogène et de même stade phénologique. Alors que pour les plants de la vigne, le choix des individus avait porté sur les plants ayant un diamètre des tiges qui oscille entre 5 et 10 mm avant l'inoculation et ce, dans l'objectif d'avoir une moindre hétérogénéité entre les plants testés.

L'essai d'antagonisme *in planta* a été réalisé sous serre selon un dispositif expérimental, en blocs complets avec plusieurs traitements (tableau 2.5). Pour la tomate, six répétitions pour chaque traitement. Au total, pour tous les traitements de l'essai d'antagonisme sur la tomate, 90 plants ont été utilisés pour l'analyse pour chaque technique de confrontation (déphasée et simultanée).

Pour la vigne, nous avons appliqué le même type de dispositif avec quatre répétitions pour chaque traitement ; soit un total de 60 plants pour chaque type de confrontation.

Tableau 2.5 : Les différents traitements de l'essai d'antagonisme *in planta* sur la tomate et la vigne.

Traitements	
T1	Témoin négatif représenté par les plants inoculés avec l'EDS.
T2	Témoin positif correspond à l'inoculation par blessure des plantules avec les suspensions des souches tumorigènes d' <i>Agrobacterium</i> (C58, E2, Bu20/95 ou AV25/95).
T3	Trempage des plants directement dans la suspension des souches antagonistes : EPR3, CR2, OS1 ou OS4.
T4	<p>Le traitement par trempage des plants dans la suspension bactérienne d'antagoniste puis inoculation par blessure par les souches tumorigènes d'<i>Agrobacterium</i> (C58, E2, Bu20/95 ou AV25/95).</p> <p>EPR3 - AV25/95 EPR3 - Bu20/95 EPR3 - C58 EPR3 - E2 CR2 - AV25/95 CR2 - Bu20/95 CR2 - C58 CR2 - E2 OS1 - AV25/95 OS1 - Bu20/95 OS1 - C58 OS1 - E2 OS4 - AV25/95 OS4 - Bu20/95 OS4 - C58 OS4 - E2</p>

Pour les plantules de la tomate et de la vigne.

4.2. Techniques d'inoculation des plantules de tomate et de la vigne

4.2.1. Confrontation déphasée *in planta*

Les plantules de tomate et de vigne sont dépotées, rincées pour éliminer l'excès du sol puis trempées pendant 24 h dans la suspension de la bactérie antagoniste sélectionnée à une densité cellulaire de 10^7 UFC /mL [185]. Les plantules de tomate et de vigne traitées par l'antagoniste seront par la suite séparément inoculées par les souches pathogènes d'*Agrobacterium* (C58, E2, Bu20/95 ou AV25/95) à une concentration cellulaire de 10^6 UFC /mL.

Le témoin négatif correspond aux plantes trempées dans l'EDS. Après 24 h, les plantes trempées sont re-transplantées en pots.

A l'aide d'un scalpel stérile, trois blessures sur la tige de chaque plantule de tomate, à intervalle de 1 cm à partir de l'extrémité en croissance, sont réalisées. Pour les plantules de la vigne, nous avons réalisé deux blessures sur le rameau, la première au niveau du collet et la seconde située au niveau du premier entre-nœud. Un volume de 0.5 mL d'EDS ou de la suspension bactérienne de l'agent pathogène (selon le traitement) est introduit au niveau des blessures.

La tige inoculée est ensuite enveloppée avec du papier aluminium stérile afin d'éviter la dessiccation de l'inoculum. Les plantules sont maintenues en serre à une température de 25 à 28 °C, puis inspectées pour le développement des tumeurs.

4.2.2. Confrontation simultanée *in planta*

Le même protocole est suivi lors de la réalisation de la confrontation simultanée *in planta*. Les plantules de tomate et de vigne sont trempées pour quelques secondes dans l'EDS ou dans la suspension de l'antagoniste (selon le traitement) puis immédiatement inoculées avec l'agent pathogène.

4.3. Evaluation *in planta* des bactéries antagonistes (*Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp.) du biocontrôle de la maladie de la galle du collet

L'infection par les bactéries tumorigènes d'*Agrobacterium* se manifeste principalement par la formation d'une tumeur au niveau du point d'inoculation [8 ; 186]. L'efficacité des antagonistes bactériens dans la réduction du développement tumoral a été évaluée en enregistrant la taille des tumeurs, sept semaines après inoculation par le pathogène pour les plantules de vigne et neuf semaines pour les plantules de tomate.

5. Analyse statistique

L'activité antagoniste *in vitro* des souches antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium* est indiquée par des zones d'inhibition de croissance autour des spots des bactéries antagonistes. Un calcul de la moyenne des diamètres de la zone d'inhibition a été effectué.

Les résultats obtenus pour le test de suppression de l'effet nécrotique d'*A. vitis* par l'utilisation des souches antagonistes et le test d'antagonisme *in planta*, ont été analysés par le logiciel statistique Systat (vers. 12). Nous avons analysé les conditions paramétriques considérées : les souches antagonistes, les souches d'*A. vitis* et l'indice de sévérité de l'effet nécrotique (IS %). Le test ANOVA est effectué et la distribution de la variable quantitative a été vérifiée pour sa normalité.

Les résultats du test d'antagonisme *in planta* des souches antagonistes envers les souches d'*Agrobacterium*, ont été aussi analysés en tenant compte de toutes les conditions paramétriques qui sont : les souches antagonistes, les souches d'*Agrobacterium*, la variation dans le temps, la variation de la position des tumeurs et la taille des tumeurs. Le test ANOVA est effectué et parallèlement, la distribution de la variable quantitative à analyser a été vérifiée.

Partie 2 :

Mise en évidence de la réaction de résistance systémique induite (ISR) par les souches de *Bacillus spp.* et de *Pseudomonas brassicacearum* chez le pathosystème *Agrobacterium tumefaciens*/tomate

Les essais de cette expérimentation ont été réalisés au niveau du laboratoire de Protection et de Valorisation de Ressources Agro-Biologiques et aussi au niveau du laboratoire de Génie-chimique (Université Saad Dahleb, Blida 1). Les analyses HPLC ont été faites au niveau du Centre de Recherche et Techniques en Analyses Physico-Chimiques (Bousmail) CRAPC, ainsi qu'au niveau de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie (Bouchaoui).

Ce travail a été accompli dans le but d'étudier l'effet de bactérisation des semences par les souches de *Bacillus spp.* et de *Pseudomonas brassicacearum*, sur la protection de la tomate et d'évaluer la capacité de ces souches antagonistes à induire une réponse systémique contre *Agrobacterium tumefaciens*.

L'objectif était d'évaluer aussi les changements métaboliques induits par l'activation des réactions de défense chez la tomate. Nous avons essayé de comprendre l'impact des souches antagonistes sur la réponse de défense des plantes, en analysant l'accumulation des composés phénoliques, l'acide salicylique et l'activité enzymatique de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase dans les tissus des plants de tomate. Ces composés sont les principaux indicateurs chimiques d'analyse de la réaction de résistance systémique chez les organismes phytopathogènes.

1. Souches bactériennes utilisées

Les bactéries étudiées sont ; *Pseudomonas brassicacearum* CR2 et EPR3, *Bacillus cereus* OS1 et *Bacillus methylotrophicus* OS4 [22]. L'origine et les caractéristiques de ces quatre souches ont été décrites dans la partie précédente.

Trois souches d'*A. tumefaciens*, la souche C58 (ATCC33970) et deux souches algériennes E17 et E14 isolées d'eucalyptus [11], ont été utilisées dans cette étude comme agents pathogènes cibles pour effectuer des tests *in vitro* et *in vivo*. Toutes les souches font partie de la collection de bactéries phytopathogènes du laboratoire de l'université de Blida 1 et ont fait l'objet d'une vérification préliminaire de leur pathogénicité sur *Kalanchoë daigremontiana* et *Lycopersicum esculentum* [174].

2. Activité antagoniste *in vitro*

Quatre souches endophytes précédemment isolées d'espèces végétales spontanées [22], ont été testées *in vitro* pour leur activité antagoniste contre trois souches d'*A. tumefaciens* (C58, E14 et E17).

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Stonier [176] et modifiée par Moore et al. [174]. Les bactéries antagonistes présumées ont été cultivées sur des boîtes de Petri contenant le milieu LPGA pendant 48 heures à 28 °C. Les cellules bactériennes ont été raclées des boîtes de Petri contenant le milieu LPGA et mises en suspension dans l'EDS.

La concentration finale de la suspension était de 10^7 UFC mL⁻¹, elle a été déterminée par spectrophotométrie en comparant la DO de chaque suspension à sa propre courbe de croissance de référence à $\lambda = 600$ nm. Un volume de 20 μ L de chaque suspension bactérienne a été placé sous forme de spots sur la surface des boîtes LPGA, incubées par la suite pendant 48 h à 28 °C. Parallèlement, les bactéries pathogènes ont étéensemencées sur d'autres boîtes de Petri du milieu LPGA et cultivées pendant 48 h à 28 °C.

Après incubation, les suspensions de bactéries pathogènes (10^6 UFC mL⁻¹), préparées comme décrit ci-dessus pour les antagonistes, ont été pulvérisées sur la surface des boîtes de Petriensemencées avec les bactéries antagonistes. Les boîtes de Petri ainsi traitées, sont incubées de nouveau pendant 24 à 48 h à 28 °C et l'apparition de halos d'inhibition entourant la macro-colonie est considérée comme une activité antagoniste positive.

L'activité d'inhibition des différentes souches a été évaluée en comparant la taille de la zone d'inhibition. Trois répétitions pour chaque combinaison antagoniste/ pathogène ont été effectuées et l'expérience a été répétée deux fois.

3. Bactérisation des semences et inoculation des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sur les plantules de tomate

3.1 Matériel végétal et conditions expérimentales

Ce test a été réalisé sur des plants de tomate variété St. Pierre. La tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) est considérée comme un hôte universel à la fois pour *A. tumefaciens* et *A. vitis* puisque cette espèce végétale donne des résultats rapides et reproductibles [187].

La tomate est considérée aussi, comme un modèle, largement utilisé dans des études relatives à l'induction de la résistance systémique et le biocontrôle par les PGPR [188].

Les plants de tomate sont cultivés en pots, dans un mélange de sol composé de 2/3 de sol de champ et 1/3 de tourbe parfaitement homogénéisés. Le sol a été autoclavé deux fois pendant 60 mn à 120 °C, avec un intervalle de 24 h entre chaque autoclavage, afin d'assurer la désinfection totale [184].

Le substrat de sol a ensuite été distribué dans des pots en plastique (10 x 6,5 cm). Les graines de tomate ont été stérilisées en surface avec de l'hypochlorite de sodium à 2 % pendant 5 mn, rincées abondamment avec du l'EDS, puis placées sur des disques stériles de papier filtre Whatman à l'intérieur de boîtes de Petri.

3.2 Méthodes d'inoculation des bactéries antagonistes et des souches pathogènes

Les graines de tomate ont été trempées pendant 24 h dans les suspensions des bactéries *Pseudomonas* ou *Bacillus* sélectionnées pour ce test, ou dans de l'EDS (témoin), puis ont été incubées à 25 °C pendant 5 jours à l'obscurité afin de favoriser la germination.

Une semaine après la germination, les semis ont été sélectionnés et transplantés dans des pots en plastique contenant le sol désinfecté.

Pour chaque souche antagoniste, 12 plantules ont été traitées avec l'antagoniste et inoculées avec le pathogène, 12 ont été traitées avec l'antagoniste seul, 9 ont été inoculées avec chaque souche d'*A. tumefaciens* et 3 plantes témoins ont été traitées avec l'EDS (figure 2.1 ; tableau 2.6). L'expérience a été planifiée selon un plan randomisé complet avec trois blocs pour chaque groupe de traitements.

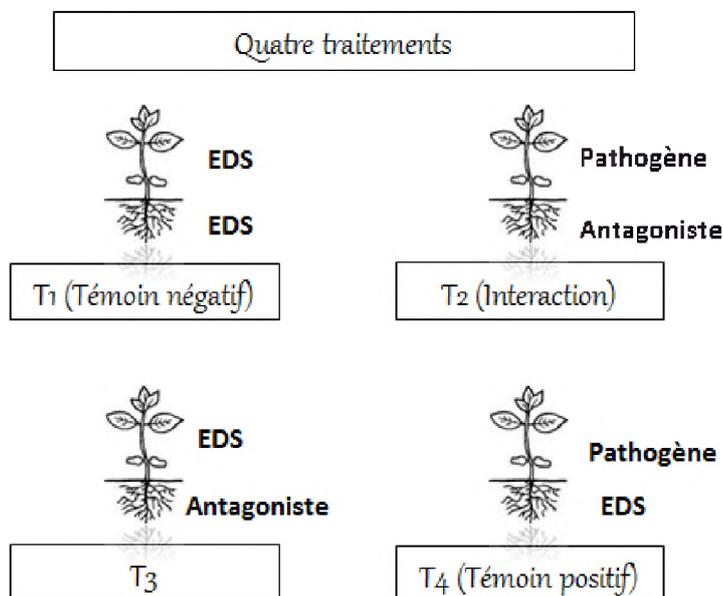


Figure 2.1 : Schéma des différents traitements appliqués sur les plantules de tomate.

Tableau 2.6 : Les différents traitements de l'expérimentation.

Traitements	Nombre de plants de tomates (répétitions)	
T1 : EDS (≠ Temps : 0 jour, 2 jours, 6 jours et 15 jours)		12 plants
T2 : souches antagonistes/ souches pathogènes (≠ Temps : 0 jour, 2 jours, 6 jours et 15 jours)	OS1-C58	12
	OS1-E14	12
	OS1-E171	12
	OS4-C58	12
	OS4-E14	12
	OS4-E171	12
	EPR3-C58	12
	EPR3-E14	12
	EPR3-E171	12
	CR2-C58	12
	CR2-E14	12
	CR2-E171	12
		144 plants
T3 : souches antagonistes (≠ Temps : 0 jour, 2 jours, 6 jours et 15 jours)	OS1	12
	OS4	12
	EPR3	12
	CR2	12
		48 plants
T4 : souches pathogènes (≠ Temps : 0 jour, 2 jours, 6 jours et 15 jours)	C58	12
	E14	12
	E171	12
		36 plants

EDS : plante de tomate traitée avec de l'eau distillée stérile.

≠ Temps : différents intervalles de temps : 0 j, 2 j, 6 j et 15 jours après l'inoculation par *A. tumefaciens*.

Souches antagonistes : bactéries antagonistes ; souches de *P. brassicacearum*, CR2 et EPR3, souche de *B. cereus* OS1 et souche de *B. methylotrophicus* OS4.

Bactéries pathogènes : *A. tumefaciens* souches C58, E14 et E171.

Au stade quatre feuilles, les tiges des plantes ont été blessées au niveau du collet avec un scalpel stérile et un volume de 50 µl des suspensions de chaque souche d'*Agrobacterium tumefaciens* à 10^6 UFC mL⁻¹ a été déposé sur les plaies. Le même volume d'EDS a été utilisé pour traiter les plantes témoins. Les tiges inoculées ont été enveloppées dans du papier aluminium pour éviter une dessiccation rapide de l'inoculum.

Pendant l'expérience, un niveau adéquat d'humidité du sol a été maintenu par une irrigation régulière. L'expérience a été réalisée dans une serre avec une photopériode quotidienne de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité à une température de 25-30 °C.

L'efficacité des antagonistes bactériens pour réduire le développement des tumeurs a été évaluée en enregistrant la taille de la tumeur, neuf semaines après l'inoculation de l'agent pathogène.

4. Analyse de l'ISR par évaluation de la teneur en phénols, en acide salicylique et de l'activité de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase chez les plants de tomate

La teneur en phénols, en acide salicylique (SA) et l'activité des enzymes : peroxydase (PO) et polyphénol-oxydase (PPO) ont été analysées pour les différents traitements (plantes traitées et les témoins). Les plants de tomate ont été soigneusement déracinés à différents intervalles de temps, 0 h, 48 h et 6 et 15 jours après l'inoculation par *A. tumefaciens* et traités selon les différents protocoles décrits ci-dessous. Trois plants ont été prélevés sur chaque réplique de chaque traitement et traités séparément.

4.1. Estimation de la teneur en phénols

La teneur en phénols a été estimée selon la procédure Folin-Ciocalteu [189]. Un gramme d'échantillon de plante fraîche (racines et feuilles) a été broyé dans un mortier avec 10 ml de méthanol à 80 % et centrifugé à 10 000 g pendant 15 mn [190]. Un volume d'un ml de l'extrait méthanolique a été ajouté à 5 ml d'EDS et à 250 µL de réactif Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Allemagne).

La solution a été maintenue à 25 °C pendant 5 mn, après ce temps d'incubation, un ml de 20 % de carbonate de sodium a été ajouté. La solution a été laissée à température ambiante pendant 2 h, puis l'absorbance de la couleur bleue a été mesurée à 765 nm et 731 nm à l'aide du spectrophotomètre SHIMADZU 1800 UV.

Des solutions d'acide gallique (GA) et d'acide salicylique ont été utilisées comme étalons. Deux courbes d'étalonnage ont été préalablement conçues pour l'acide gallique (GA) et l'acide salicylique à différentes concentrations et pratiquées dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons (annexe 3). Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g mL}^{-1}$ d'acide gallique ou d'acide salicylique. Toutes les analyses ont été effectuées en trois répétitions.

4.2 Identification et quantification de l'acide salicylique (SA)

Les échantillons de plantes ont été analysés selon la méthode de Seskar, Shulaev et Raskin [191]. Les plants de tomate entiers (racines et feuilles) échantillonnés à différents moments, ont été congelés dans de l'azote liquide et broyés en une fine poudre. Pour chaque échantillon 0,5 g ont été extraits avec du méthanol à 90 % et 100 %, puis agités pendant 1 mn et ensuite soniqués pendant 10 mn.

Les extraits ont ensuite été centrifugés à 10 000 g et séchés sous vide. Le culot sec a été remis en suspension dans 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 5 % et centrifugé, le surnageant a été divisé en utilisant une solution d'acétate d'éthyle, de cyclopentane et d'isopropanol (rapport 100:99:1, v/v). La couche organique supérieure contenant l'acide salicylique libre a été transférée dans un flacon de 4 ml et séchée avec de l'azote gazeux. L'acide salicylique sec a de nouveau été mis en suspension dans 1 ml de méthanol à 100 % (HPLC Grade-Sigma).

Les analyses par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ont été effectuées sur un YL 9100 HPLC (logiciel : YL-CLARITY) avec un détecteur UV (excitation et émission, 254 nm et 280 nm, respectivement) équipé d'une colonne HPLC en phase inverse C18 (RESTEK, diamètre 4,6 mm, longueur 150 mm et taille des pores 5 μm). Le débit était de 1,0 ml mn⁻¹. Les solvants utilisés

étaient l'acide acétique à 1 % (solvant A) et du méthanol de qualité HPLC (solvant B). La concentration d'acide salicylique ($\mu\text{g mL}^{-1}$) a été calculée en tenant compte d'une courbe d'étalonnage conçue précédemment en utilisant de l'acide salicylique standard (annexe 4).

Les composés phénoliques ont été identifiés par comparaison avec le temps de rétention des étalons (Sigma) et les concentrations ont été calculées en comparant les surfaces des pics des échantillons avec les composés de référence utilisés dans les mêmes conditions d'élution.

4.2.1 Analyse qualitative de l'acide salicylique (SA) par GC-MS

Le SA a été extrait et quantifié comme décrit par Malamy et Klessig [192]. Les tissus végétaux entiers (0,5 g) ont été extraits avec du méthanol à 90 % et 100 %. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 10 000 tours/mn, l'extrait de méthanol a été séché sous vide, puis le résidu a été remis en suspension dans 50 μL d'acide trichloracétique à 5 % et 1 ml de méthanol à 100 %. Le volume de l'extrait a été ajusté à 5 ml avec H_2O et centrifugé à 3 000 tours/mn pendant 10 mn.

Le surnageant a été mélangé avec une quantité égale de N-Méthyl-N-(Triméthylsilyl) Trifluoroacétamide (MSTFA), (Fluka, Steinheim, Allemagne) et maintenu à 70 °C pendant 30 mn. Le solvant a été à nouveau évaporé sous azote et l'extrait a été dissous dans du méthanol (100 μL). La dérivation des MSTFA pour la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) a été effectuée en ajoutant 50 μL de réactif MSTFA aux résidus de granulé sec évaporé, puis le granulé a été remis en suspension dans 100 μL de solutions d'échantillons, légèrement agité par vortex, puis transféré dans des micro fioles contenant des inserts de 250 μL pour l'analyse GC-MS.

L'analyse qualitative a été effectuée par GC-MS. L'étude a été réalisée à l'aide d'un système de chromatographie en phase gazeuse HP 5890 série II couplé à un détecteur sélectif de masse (MSD) HP 5971A, fabriqué par Agilent (États-Unis), qui est un analyseur de masse quadripolaire.

Un μl de chaque échantillon a été injecté automatiquement en mode splitless. La séparation chromatographique des substances testées a été effectuée sur une colonne capillaire HP-5MS (30m \times 0,25mm \times 0,25m) avec un gradient de température qui consistait en cinq segments. La température initiale de la colonne (90 °C) a été maintenue pendant 0,5 mn, puis a augmenté linéairement à la vitesse de 20 C/mn jusqu'à 200 °C, puis à 280 °C à 15 °C/mn et enfin à 320 C à 20 C/mn, maintenue à cette température pendant 3,67 mn.

L'hélium à un débit constant de 1 ml/mn a été utilisé comme gaz vecteur. Le spectromètre fonctionnait en mode d'ionisation électronique (EI) et l'énergie du faisceau d'électrons était de 70 eV. Les ions positifs ont été analysés. L'acquisition a été effectuée en mode balayage, et toute la masse allant de 38 à 650 amu (unité de masse atomique unifiée) a été collectée. Le SA et d'autres composés ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec des étalons purs disponibles dans le commerce. Une identification plus poussée a été réalisée en sélectionnant des échantillons pour l'analyse GC-MS en mode d'ionisation par impact électronique, suivie de la comparaison de la fragmentation et du temps de rétention avec des composés purs.

4.3 Détermination de l'activité de la peroxydase (PO)

L'activité de la peroxydase a été dosée par la méthode de Hammerschmidt et al. [193]. Les plantes déracinées ont été lavées à l'eau courante, homogénéisées avec de l'azote liquide dans un mortier pré-refroidi et broyées.

Les tissus homogénéisés ont été stockés dans un congélateur (-70 °C) jusqu'à leur utilisation pour des analyses biochimiques. Un gramme de chaque échantillon de plante congelé a été homogénéisé dans 2 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0 à 4 °C. L'homogénat a été centrifugé à 16.000 g à 4 °C pendant 15 mn et le surnageant a été utilisé pour l'analyse de la teneur en PO.

Le mélange réactionnel, composé de 1,5 ml de pyrogallol 0,05 M (MERCK), de 0,5 ml de l'extrait et de 0,5 ml de H₂O₂ à 1 %, a été incubé à température ambiante (28 \pm 2 °C). Le mélange réactionnel sans extrait enzymatique a servi de témoin. Les changements d'absorbance à 420 nm ont été enregistrés à des intervalles de 30 s pendant 3 mn. L'activité enzymatique a été

exprimée sous forme de changements dans l'absorbance en $\text{mn}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de tissu frais.

4.4 Détermination de l'activité de la polyphénol-oxydase (PPO)

L'activité de la polyphénol-oxydase a été déterminée selon la procédure de Mayer et al. [194]. Des échantillons congelés de plantes entières (1g) préparés comme décrit précédemment, ont été homogénéisés dans 2 ml de tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH 6,5) et centrifugés à 16 000 g pendant 15 mn à 4 °C pour recueillir le surnageant.

Le mélange réactionnel était constitué de 200 μL de surnageant et de 1,5 ml de tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH 6,5). Pour démarrer la réaction enzymatique, 200 μl de catéchol 0,01 M ont été ajoutés et l'activité a été exprimée comme le changement d'absorbance à 495 nm jusqu'à 15 mn, après l'ajout du catéchol.

5. Analyse statistique

Les analyses ont été effectuées avec le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Science) (version 23.0). Tous les paramètres étudiés : antagoniste *in vitro* et *in planta*, l'accumulation des phénols, l'acide salicylique et l'analyse biochimique des enzymes : l'activité de la peroxydase et de la polyphénol oxydase ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA). Les données ont été analysées par analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA), et les moyennes ont été comparées au test de Fisher de la différence la moins significative (LSD) ($P \leq 0.05$).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Partie 1 :

Evaluation du potentiel des souches antagonistes de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* dans le contrôle d'*Agrobacterium* spp. pathogènes, impliqués dans la maladie de la galle du collet

1. Pouvoir antagoniste *in vitro* des souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum*

Les bactéries de genres *Bacillus* et *Pseudomonas* utilisées, ont montré une activité antagoniste vis-à-vis des souches d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens*. Les différentes souches antagonistes présentent un effet inhibiteur variable selon la souche pathogène d'*Agrobacterium* et selon le temps entre le dépôt de l'antagoniste et celui du pathogène (selon la technique de confrontation : simultanée ou déphasée).

1.1. Confrontation déphasée *in vitro*

Les quatre souches testées ont montré un effet antagoniste envers les quatre souches pathogènes d'*Agrobacterium* utilisés, les diamètres des zones d'inhibition varient de 21 à 50 mm. La souche d'*A. vitis* Bu20/95 a été la moins sensible avec des zones d'inhibition ne dépassant pas 22 mm sous l'effet des trois souches CR2, OS1 et OS4 par rapport à la souche AV25/95 et les autres souches d'*A. tumefaciens*. La souche CR2 a montré un effet antagoniste très important envers la souche AV25/95 avec un diamètre de la zone d'inhibition de 39,33 mm, suivie par *B. methylotrophicus* OS4 avec 37.67 mm. La souche de *P. brassicacearum* EPR3 a généré des zones d'inhibition de 50 mm à l'égard d'*A. tumefaciens* C58 (tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation déphasée *in vitro* des quatre bactéries antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium*.

Souches antagonistes	AV25/95	Bu20/95	C58	E2
<i>P. brassicacearum</i> CR2	39.33	22.33	27,67	35,00
<i>P. brassicacearum</i> EPR3	30.67	31.33	51.00	35.67
<i>B. cereus</i> OS1	25.33	21.00	31.00	30.67
<i>B. methylotrophicus</i> OS4	37.67	20.67	36.00	30.00

1.2. Confrontation simultanée *in vitro*

Pour la confrontation simultanée, le dépôt de l'antagoniste en même temps que le pathogène n'a pas empêché certaines souches à exprimer leur pouvoir inhibiteur. La souche *P. brassicacearum* EPR3 a enregistré une zone d'inhibition de 40 mm envers la souche d'*A. tumefaciens* C58, suivie par la souche de *B. methylotrophicus* OS4 qui a aussi montré une moyenne de zone d'inhibition de 34 mm avec la souche d'*A. vitis* AV25/95. Cependant, les deux souches CR2 et OS1 n'ont montré aucun effet antagoniste envers la souche d'*A. vitis* Bu20/95 avec absence totale de la zone d'inhibition (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation simultanée *in vitro* des quatre bactéries antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium*.

Souches antagonistes	AV25/95	Bu20/95	C58	E2
<i>P. brassicacearum</i> CR2	28.00	00.00	24.00	31.33
<i>P. brassicacearum</i> EPR3	28.00	20.67	40.00	20.00
<i>B. cereus</i> OS1	20,67	00.00	22.00	20.33
<i>B. methylotrophicus</i> OS4	34.00	21.00	23.00	26.00

D'une manière générale, la confrontation déphasée (24 h) a montré une activité antagoniste plus importante des souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* comparée à la confrontation de type simultanée (0 h) (figure 3.1).

Les résultats obtenus pour les deux techniques de confrontation déphasée et simultanée montrent que l'écartement de temps attribué aux souches de *Bacillus* spp. et *P. brassicacearum* a influencé la capacité de ces souches à inhiber la croissance des pathogènes *in vitro* (figure 3.2).

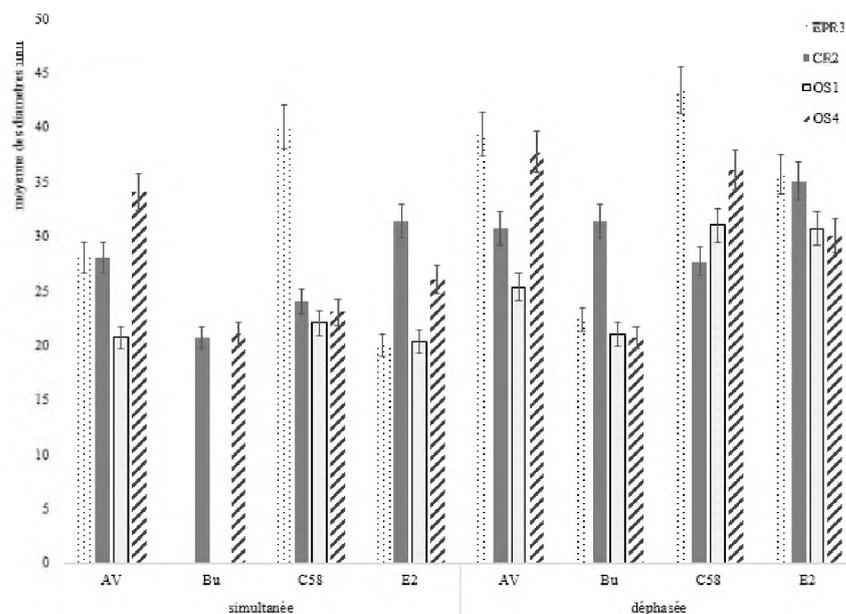


Figure 3.1 : Comparaison de l'inhibition *in vitro* pour les deux techniques de confrontation.

(AV ; Bu ; E2 ; C58 : les bactéries pathogènes)
(EPR3 ; CR2 ; OS1 ; OS4 : les bactéries antagonistes).

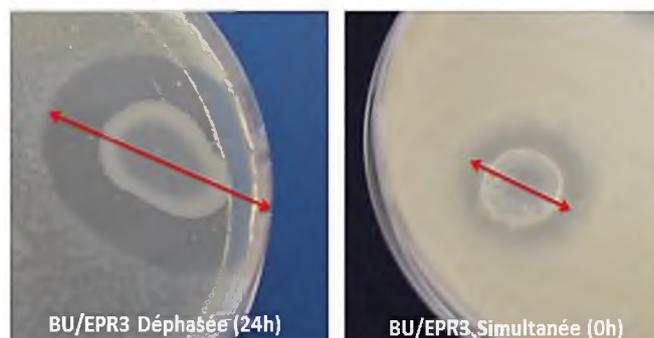


Figure 3.2 : Pouvoir antagoniste de *P. brassicacearum* EPR3 pour les deux techniques de confrontation *in vitro*.



Diamètre de la zone d'inhibition. Bu : la souche *A. vitis* Bu20/95.

2. Résultats de l'essai de suppression de l'effet nécrotique d'*Agrobacterium vitis* sous l'effet des souches antagonistes

Sept jours après incubation, des nécroses de teinte variables se sont développées sur les sections des rameaux verts des quatre variétés de vigne (figure 3.3). Les variétés Gros noir et Ahmer Bouamer semblent plus sensibles à l'effet nécrotique des deux souches d'*A. vitis* tandis que les variétés Muscat et Cinsault montrent des nécroses moins évidentes. Les nécroses sont apparues sur la partie basale des sections des rameaux verts de la vigne en manifestant une couleur variant du brun clair au noir (figure 3.4).

L'application du modèle ANOVA (tableau 3.3) aux effets des souches de *Bacillus* spp. et *P. brassicacearum* en fonction des variétés de vigne utilisées, en fonction des souches d'*A. vitis* et en fonction de la souche antagoniste, nous a permis de constater que ces souches ont présenté un pouvoir très important de supprimer et/ou de réduire l'effet nécrotique des deux souches pathogènes d'*A. vitis*, les résultats ont été hautement significatifs ($p = 0,000$).

La souche *A. vitis* AV25/95 s'est montrée plus virulente que la souche Bu20/95 en exprimant un indice de sévérité de l'effet nécrotique plus important sur les sections de la vigne. Les sections des tiges inoculées par cette souche ont développé des nécroses plus sévères que celles développées sur les sections inoculées par la souche Bu20/95, ce résultat a été observé pour les quatre variétés (figure 3.5).

Nous avons remarqué une variabilité dans l'apparition des nécroses causées par les pathogènes sur les quatre variétés (figure 3.5). La variété Gros noir s'est révélée la plus sensible à l'effet nécrotique suivie par la variété Ahmer Bouamer.

L'indice de sévérité de l'effet nécrotique le plus accentué apparaît évident sur les sections des rameaux. Les variétés Cinsault et Muscat sont apparues moins sensibles en montrant un indice de sévérité de l'effet nécrotique moins développé par rapport aux deux autres variétés et en comparaison avec les témoins positifs inoculés directement avec les suspensions des souches d'*A. vitis*.

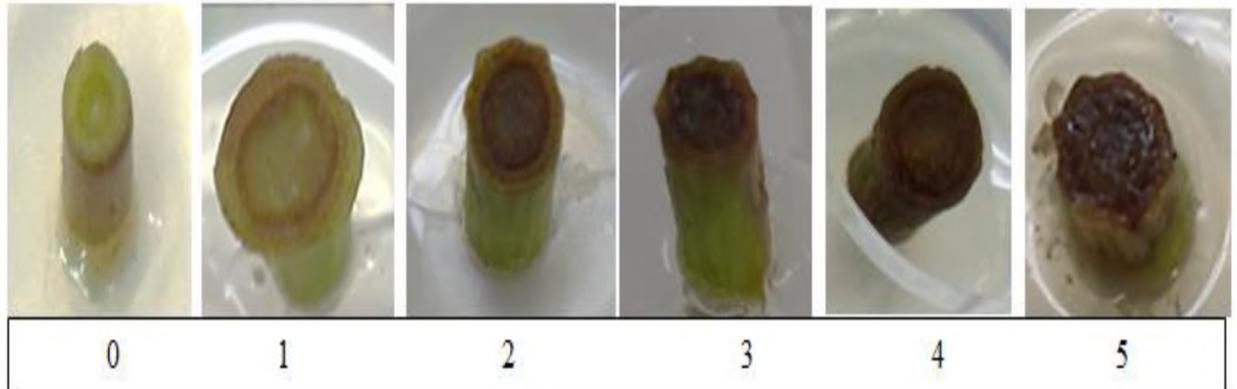


Figure 3.3 : Résultats de l'échelle d'estimation de la sévérité de l'effet nécrotique.

0 : Pas d'effet nécrotique, 1 : Passage de l'anneau vasculaire du vert au brun, 2 : Brunissement de l'anneau vasculaire et du cylindre central (centre des sections), 3 : Nécrose partielle de la section, 4 : Nécrose totale de la section, 5 : La section de la vigne est totalement nécrosée + pourriture.

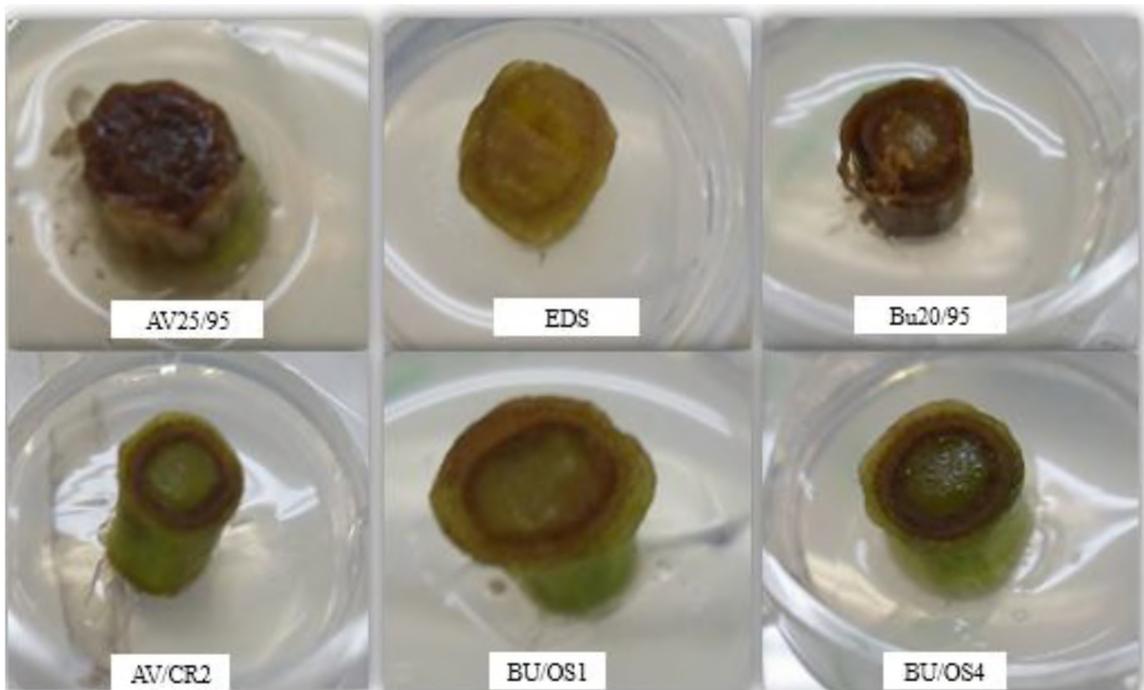


Figure 3.4 : Suppression ou réduction de l'effet nécrotique des souches pathogènes d'*A. vitis* par les souches antagonistes sur la variété Muscat 7 jours après incubation.

(AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d'*A. vitis*)

(EDS : eau distillé stérile ; OS4 ; CR2 : les bactéries antagonistes).

Tableau 3.3 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d'*A. vitis* sur le développement des nécroses sur les sections des différentes variétés de la vigne.

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
Pathogène	6,075	1	6,075	2,324E+016	0,000
Antagoniste	134,700	4	33,675	1,288E+017	0,000
Variété	9,825	3	3,275	1,253E+016	0,000
Pathogène*Antagoniste	3,300	4	0,825	3,157E+015	0,000
Pathogène*Variété	0,825	3	2,275	1,052E+015	0,000
Antagoniste*Variété	30,300	12	2,525	9,661E+015	0,000

Les souches antagonistes ont montré un effet protecteur très important en supprimant ou/et en réduisant la sévérité de la nécrose en comparaison avec le témoin positif traité directement par la souche pathogène. Le traitement avec les souches antagonistes a montré un effet supprimeur de l'effet nécrotique causé par le pathogène (figure 3.6).

La souche *P. brassicacearum* CR2 a été la plus efficace en supprimant l'effet nécrotique des deux souches pathogènes sur les sections traitées des variétés Cinsault, Gros noir et Ahmer Bouamer.

Sur la variété Muscat, la souche la plus efficace était *B. cereus* OS1 où une inhibition totale a empêché les deux souches d'*A. vitis* à exprimer leur pouvoir nécrotique sur les sections des rameaux qui sont restées vertes.

Les sections de la vigne inoculées directement par les souches antagonistes de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* ont causé un brunissement en comparaison avec les sections traitées avec l'EDS. L'indice de sévérité de

l'effet nécrotique n'a pas dépassé 40%. Ce changement de couleur est dû probablement à l'oxydation des tissus sous l'effet des souches inoculées.

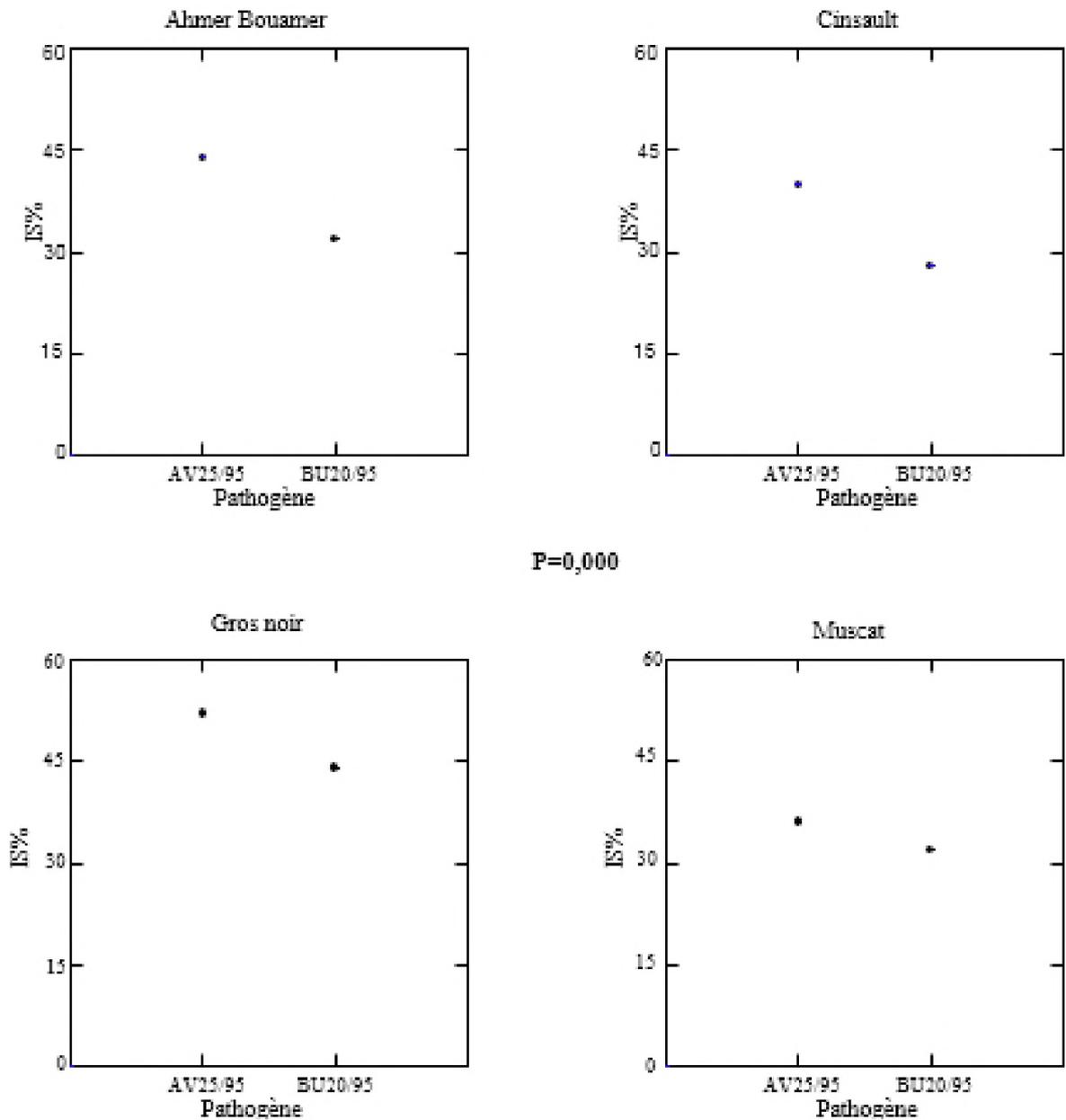


Figure 3.5 : Relation entre l'indice de sévérité et le pouvoir nécrotique *in vivo* des souches d'*A. vitis* sur les quatre variétés de vigne testées.

(IS% : indice de sévérité ; AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d'*A. vitis*)

(CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes)

(Gros noir ; Cinsault ; Muscat ; Ahmer Bouamer : les variétés de vigne utilisées).

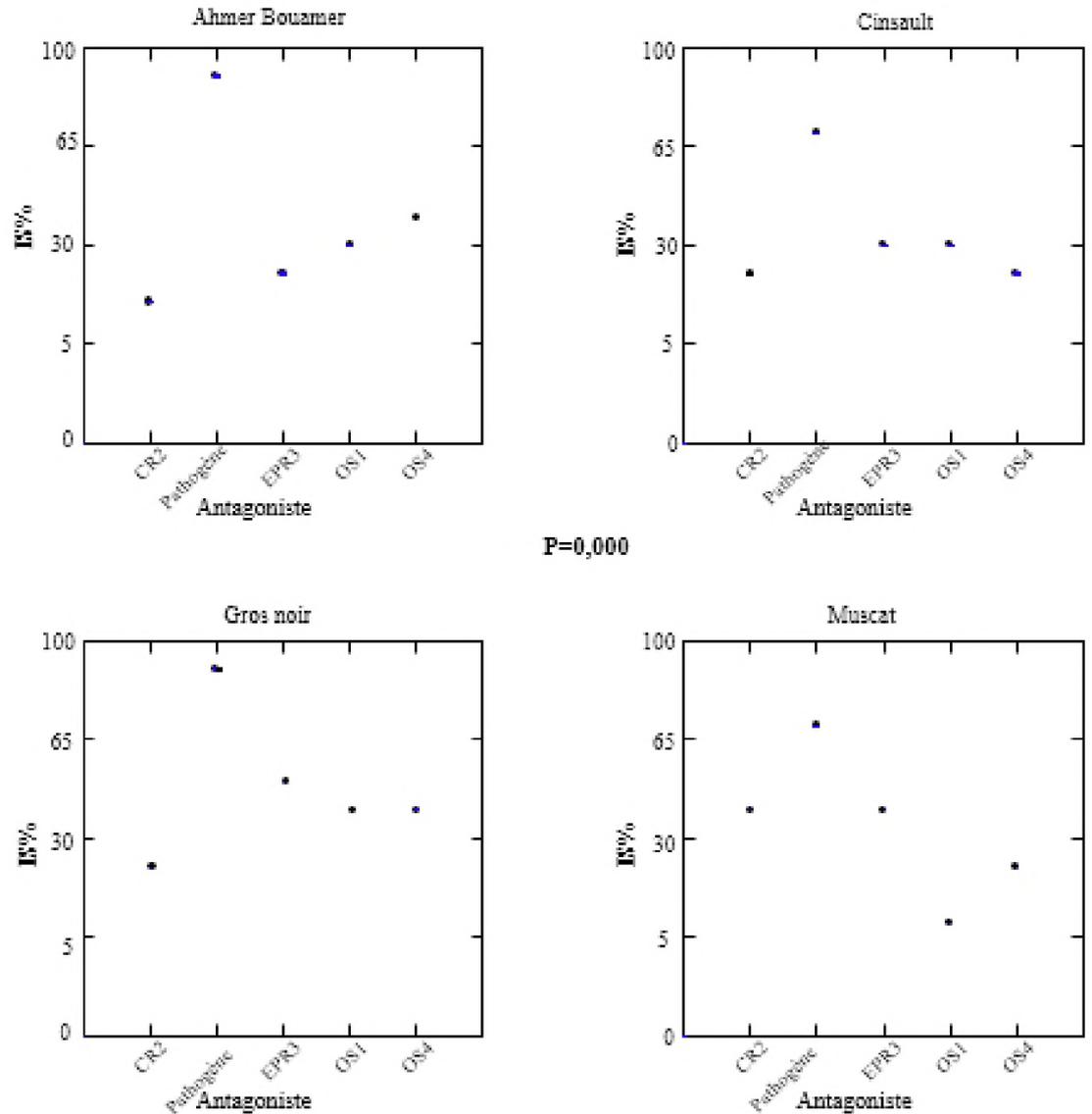


Figure 3.6 : Relation entre l'indice de sévérité et le pouvoir antagoniste *in vivo* des quatre antagonistes dans la réduction de l'effet nécrotique des souches d'*A. vitis* sur les quatre variétés de vigne testées.

(IS% : indice de sévérité ; Pathogène : les souches AV25/95, Bu20/95 d'*A. vitis*), (CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes), (Gros noir ; Cinsault ; Muscat ; Ahmer Bouamer : les variétés de vigne utilisées).

3. Résultats du test d'antagonisme *in planta* sur la tomate et la vigne

Les résultats obtenus nous ont permis de constater une diminution de la sévérité des symptômes du crown gall sur les plantules de tomate (figure 3.7) et de la vigne (figure 3.8) préalablement trempées dans des suspensions bactériennes des antagonistes, comparées aux témoins qui correspondent aux plantules inoculées directement avec les souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp.



Figure 3.7 : Réponses des plantules de tomate (var. Saint Pierre) aux différents traitements du test d'antagonisme *in planta*.

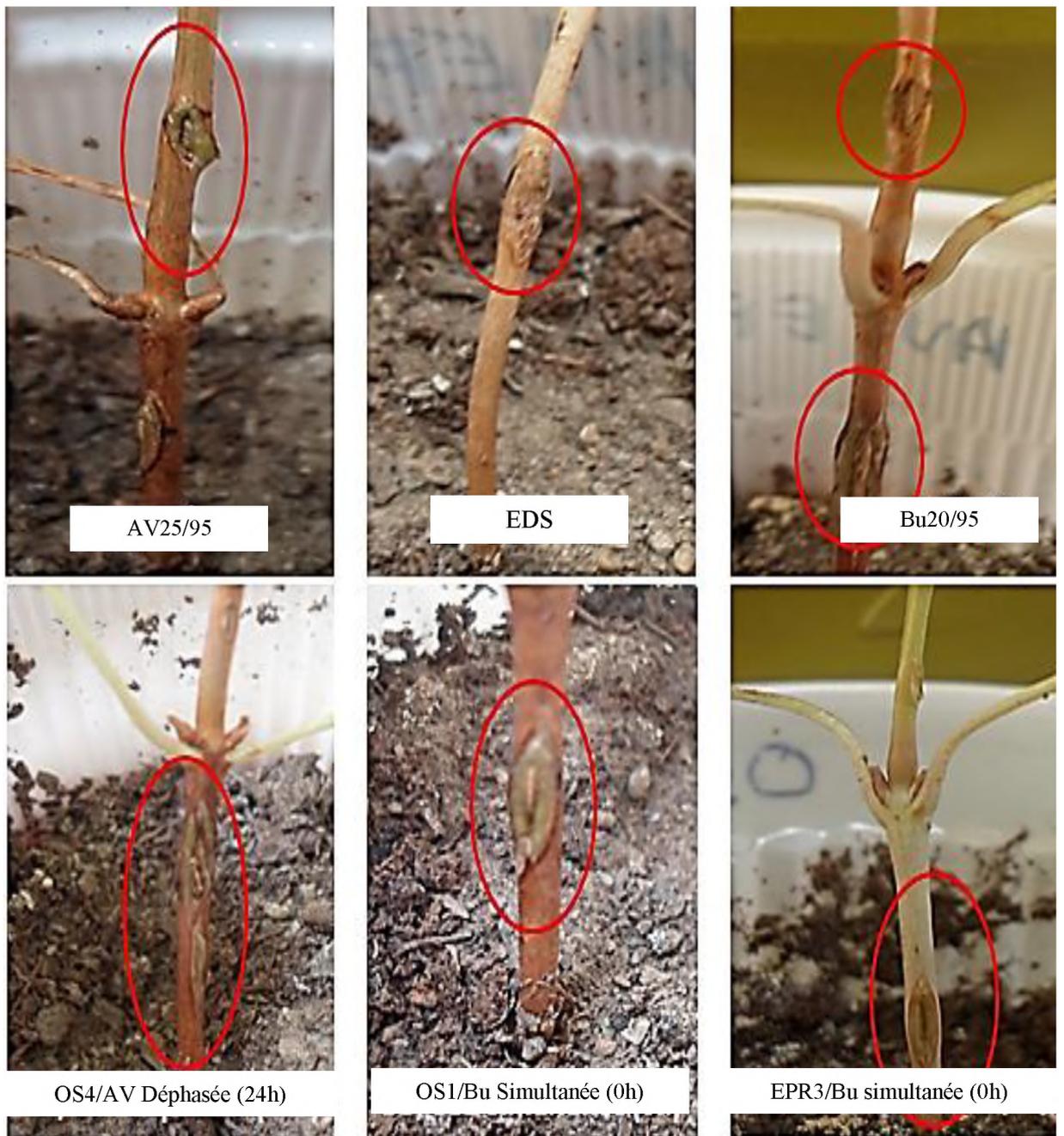


Figure 3.8 : Réponses des plantules de la vigne (var. gros noir) aux différents traitements du test d'antagonisme *in planta*.

(AV ; Bu ; E2 ; C58 : les bactéries pathogènes)
(EPR3 ; CR2 ; OS1 ; OS4 : les bactéries antagonistes).
(EDS : eau distillé stérile).

3.1. Résultats de la confrontation déphasée *in planta* sur la tomate et la vigne

L'analyse statistique des résultats d'antagonisme de la confrontation déphasée *in planta* des plantules de la tomate et de la vigne a pour but de révéler le niveau de la protection des plantes contre le crown gall en utilisant les souches antagonistes de *Bacillus* (OS1 et OS4) et de *P. brassicacearum* (EPR3 et CR2). L'analyse a été menée en tenant compte de toutes les conditions paramétriques qui sont : les souches antagonistes, les souches d'*Agrobacterium* spp., la variation dans le temps, la variation de la position des tumeurs et la taille des tumeurs (tableau 3.4 et 3.5).

Tableau 3.4 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d'*A. tumefaciens* sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de tomate testées (en fonction du temps et de la position des blessures) (Confrontation déphasée).

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ration	Valeur p
Antagoniste	1 477,046	4	369,262	59,077	0,000
Pathogène (<i>A. tumefaciens</i>)	5,677	1	5,677	2,464	0,000
Temps	7 871,314	8	983,914	428,370	0,000
Position	134,351	2	67,176	9,497	0,000
Antagoniste*Pathogène	1 526,506	9	169,612	27,185	0,000
Antagoniste*Temps	9 807,748	44	222,903	199,039	0,000
Antagoniste*Position	1 652,815	14	118,058	19,104	0,000
Pathogène*Temps	4,251	8	0,531	0,231	0,000
Pathogène*Position	2,773	2	1,386	0,196	0,000
Temps*Position	44,890	16	2,806	1,269	0,000

Tableau 3.5 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d'*A. vitis* sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de vigne testées (en fonction du temps et de la position des blessures) (confrontation déphasée).

Facteurs	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
Antagoniste	52,629	4	13,157	87,262	0,000
Pathogène (<i>A. vitis</i>)	0,088	1	0,088	0,358	0,000
Temps	19,944	6	3,324	15,796	0,000
Position	0,002	1	0,002	0,007	0,000
Antagoniste*Pathogène	52,875	9	5,875	38,727	0,000
Antagoniste*Temps	117,625	34	3,460	97,192	0,000
Antagoniste*Position	53,054	9	5,895	38,941	0,000
Pathogène*Temps	0,531	6	0,089	0,418	0,000
Pathogène*Position	0,045	1	0,045	0,182	0,000
Temps*Position	0,279	6	0,047	0,219	0,000

Les résultats obtenus dans le test d'antagonisme *in planta* ont confirmé le pouvoir antagoniste *in vitro* des souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* en réduisant la taille des galles formées sur les plantules de tomate et de la vigne préalablement trempées dans des suspensions des bactéries antagonistes à une concentration cellulaire 10 fois supérieure à celle des souches pathogènes et pendant un délai de 24h (figure 3.9 et 3.10).

La taille des tumeurs développées sur les plantules de tomate traitées par les souches antagonistes n'a pas dépassée les 6 mm alors que les plantules inoculées directement avec le pathogène ont présenté des galles de 9 mm de largeur. Concernant la vigne, les galles formées sur les plantules trempées dans les suspensions des antagonistes n'ont pas dépassé 0.5 mm de diamètre. Cependant, les témoins positifs représentés par les plantules inoculées directement par le pathogène ont montré des galles dépassant les 2 mm de taille.

La souche *B. methylotrophicus* OS4 a été la plus efficace sur les deux plantes testées (la tomate et la vigne), suivie par la souche *P. brassicacearum* CR2 alors que les deux autres souches EPR3 et OS1 ont montré une réduction de la formation des galles moins importante (figures 3.10 A et 3.11 A). Ces résultats confirment l'efficacité de ces deux souches lors de l'essai de l'antagonisme *in vitro* où elles ont présenté un diamètre de zone d'inhibition plus grand que les deux autres souches (37.67 mm pour OS4 et de 39,33 mm pour CR2).

Sur quelques plantules de la vigne préalablement trempées dans les suspensions des souches de *Bacillus* spp. (OS1 et OS4) et de *P. brassicacearum* (EPR3 et CR2) pendant 24 h, nous avons remarqué une absence totale des tumeurs au niveau des blessures. Contrairement, dans le cas de la tomate, la réaction était différente, la suppression de la maladie du crown gall n'a pas été totale.

Nous avons remarqué aussi que la souche *B. methylotrophicus* OS4 a retardé la formation des galles sur quelques plantules de tomate. Cette souche a pu retarder la formation des galles trois semaines après la première apparition des galles sur les témoins positifs représentés par les plantules inoculées directement avec les souches pathogènes d'*A. vitis*.

Sur les plantules de la vigne trempées dans les suspensions des souches antagonistes, les galles sont apparues à partir de la sixième semaine alors que les témoins positifs inoculés directement avec les souches pathogènes ont montré des galles dès la troisième semaine.

Nous avons constaté que la blessure située au voisinage du collet (position C) a représenté une taille plus importante des galles formées par rapport aux autres positions (A et B) (figure 3.11 D). Sur la vigne, nous n'avons pas remarqué une différence significative entre les deux positions des blessures réalisées au niveau de la tige (Figure 3.10 D).

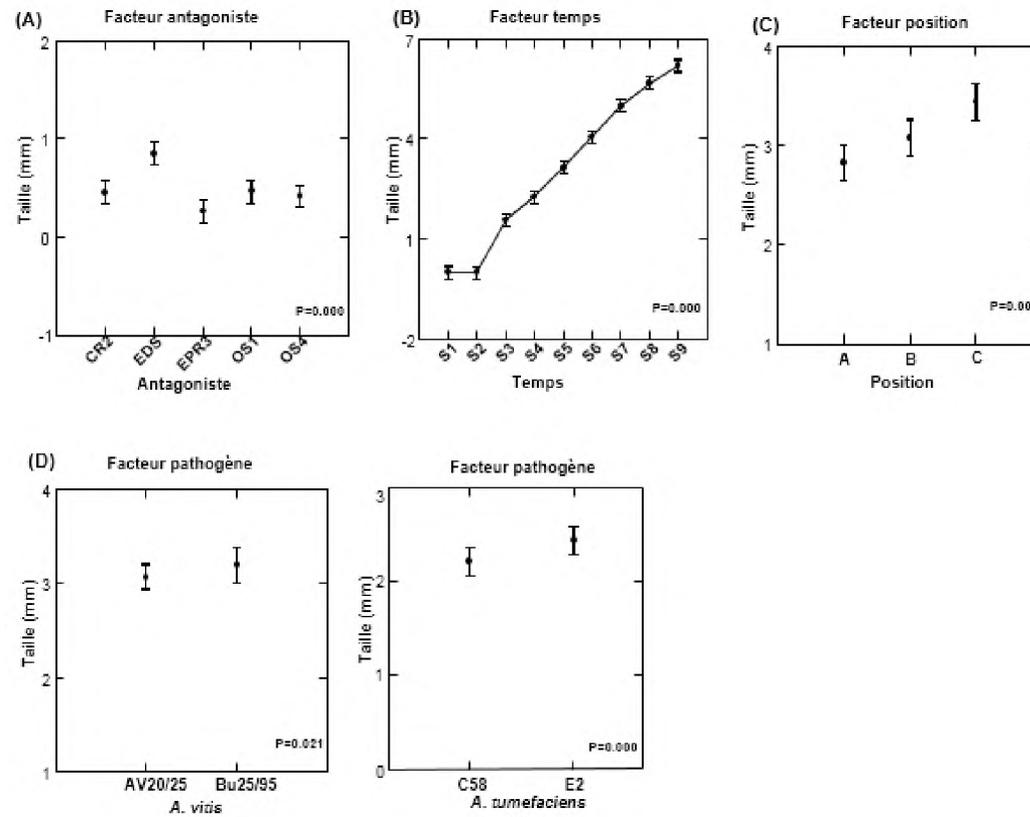


Figure 3.9 : Effet des souches antagonistes sur les souches pathogènes d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de tomate (confrontation déphasée), représenté par la taille des tumeurs.

(A) Selon la souche antagoniste. (B) Selon le temps. (C) Selon la position de la blessure (D) Selon la souche pathogène.

(Souches *A. vitis* : AV25/95, Bu20/95 ; souches d'*A. tumefaciens* : C58 et E2)- (les bactéries antagonistes testées : CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1, EDS : eau distillée stérile).

(S1 ; S2, S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S9 : semaines de suivi après l'inoculation par le pathogène). (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).

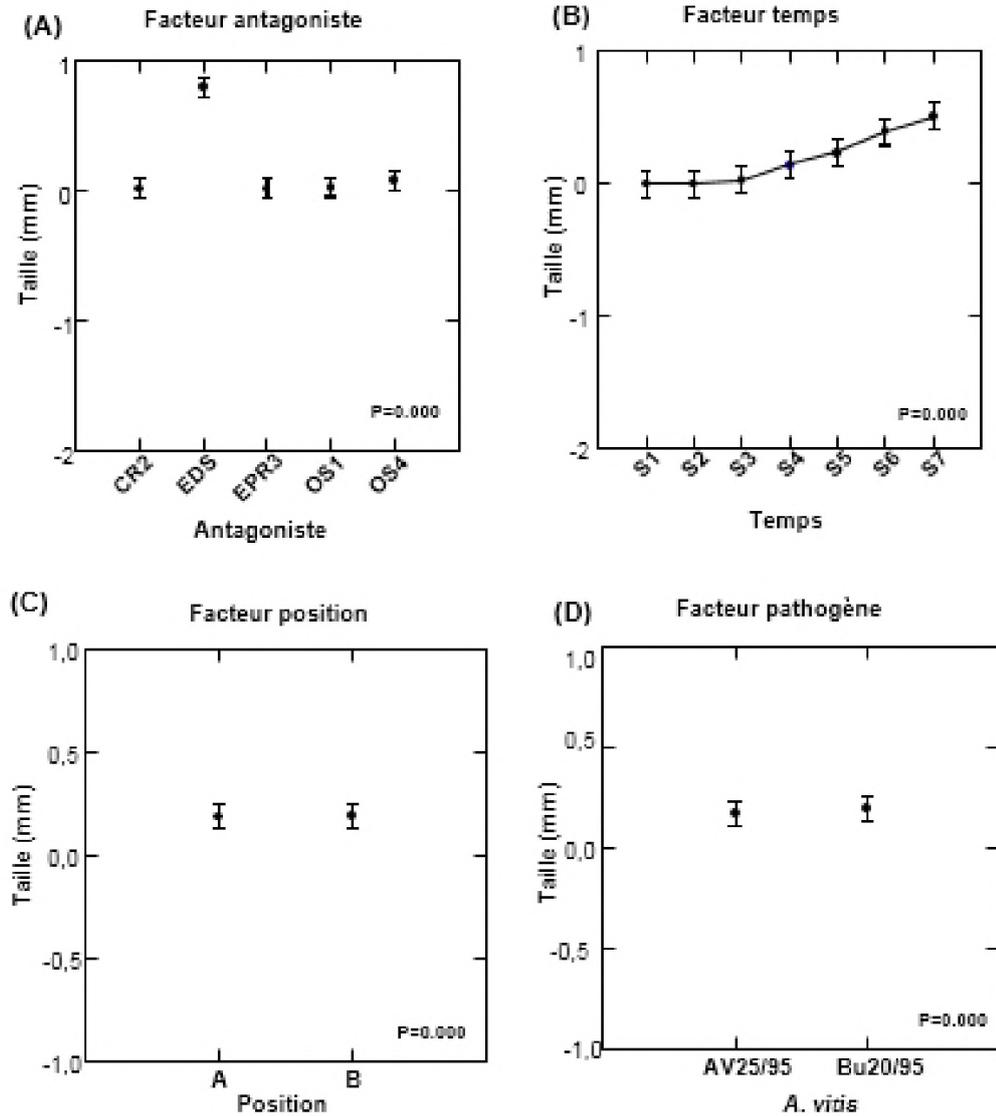


Figure 3.10 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d'*A. vitis* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantes de la vigne (confrontation déphasée), représenté par la taille des tumeurs.

(A) Selon la souche antagoniste. (B) Selon le temps. (C) Selon la position de la blessure.

(D) Selon la souche pathogène.

(Les souches pathogènes d'*A. vitis* AV25/95 et Bu20/95)- (les souches antagonistes : CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1).

(S1 ; S2; S3; S4; S5; S6; S7: semaines de suivi après l'inoculation par le pathogène).

(Position A: au niveau de la partie supérieure de la tige; position B: au niveau du collet).

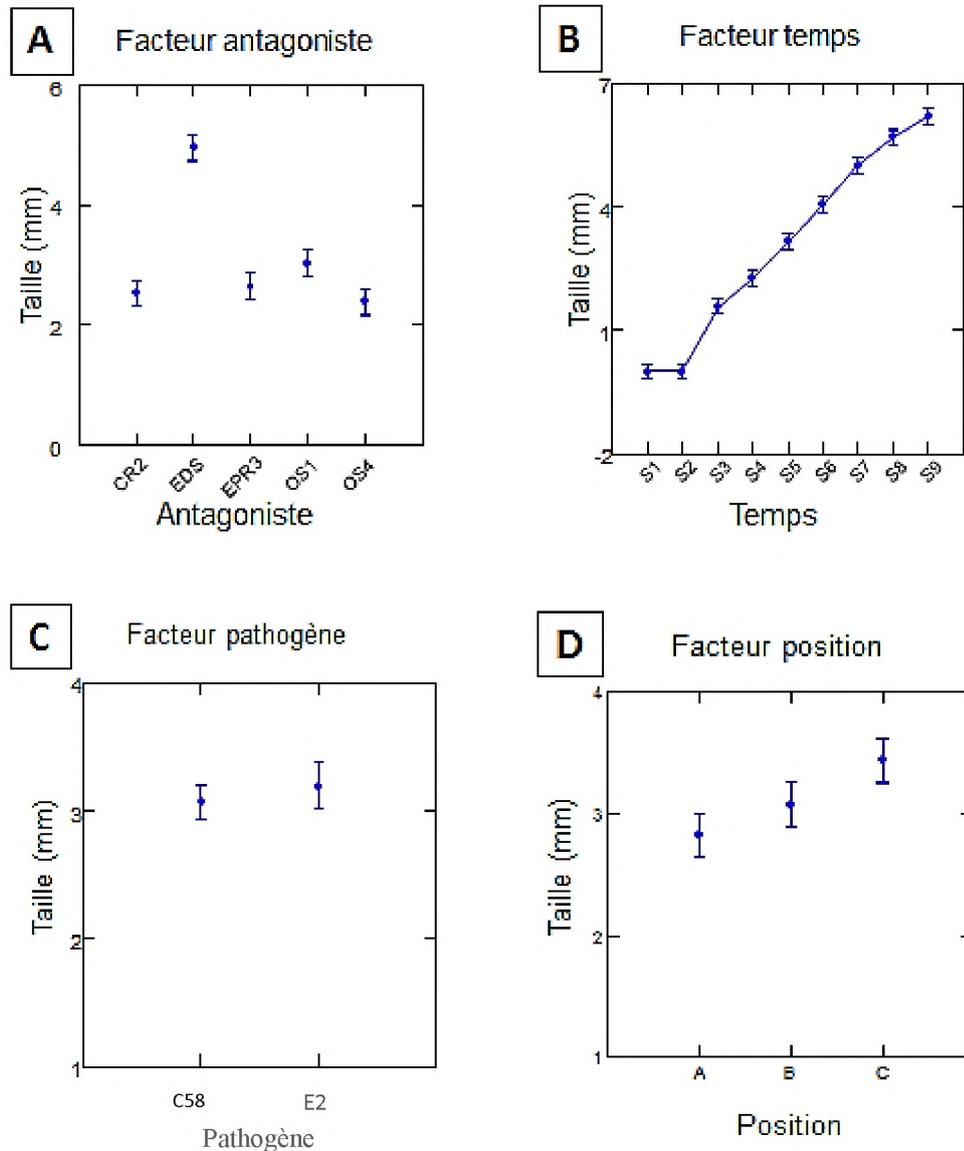


Figure 3.11 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d'*A. tumefaciens* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantes de la tomate (confrontation déphasée) représenté par la taille des tumeurs.

(A) Selon la souche antagoniste. (B) Selon le temps. (C) Selon la position de la blessure.

(D) Selon la souche pathogène.

(Les souches pathogènes d'*A. tumefaciens* C58 et E2)

(les souches antagonistes : CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1).

(S1 ; S2; S3; S4; S5; S6; S7: semaines de suivi après l'inoculation par le pathogène).

(Position A: au niveau de la partie supérieure de la tige; position B: au niveau du collet).

3.2. Résultats de la confrontation simultanée *in planta* sur la tomate et la vigne

L'analyse statistique réalisée sur les résultats obtenus du test d'antagonisme de la confrontation simultanée *in planta* sur les plantules de tomate et de la vigne a pour but de révéler le niveau de la protection des plantes contre le crown gall en utilisant les souches de *Bacillus* (OS1 et OS4) et de *P. brassicacearum* (EPR3 et CR2). L'analyse a été menée en tenant compte de toutes les conditions paramétriques qui sont : les souches antagonistes, les souches d'*Agrobacterium* spp., la variation dans le temps, la variation de la position des tumeurs et la taille des tumeurs (Tableau 3.6 et 3.7).

Tableau 3.6 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d'*A. tumefaciens* sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de la tomate testées (en fonction du temps et de la position des blessures) (confrontation simultanée).

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
Antagoniste	109,884	4	27,471	2,676	0,003
Pathogène (<i>A. tumefaciens</i>)	0,158	1	0,158	0,127	0,000
Temps	14 698,195	8	1 837,274	1 478,082	0,000
Position	119,135	2	59,567	51,814	0,000
Antagoniste*Pathogène	133,827	9	14,870	1,446	0,000
Antagoniste*Temps	14 858,134	44	337,685	290,025	0,000
Antagoniste*Position	278,504	14	19,893	1,945	0,009
Pathogène*Temps	2,295	8	0,287	0,231	0,000
Pathogène*Position	3,098	2	1,549	0,151	0,000
Temps*Position	43,257	16	2,704	2,352	0,002

Tableau 3.7 : Modèle ANOVA appliqué aux effets des souches antagonistes et les souches d'*A. vitis* sur le développement des symptômes du crown gall sur les plantules de la vigne testées (en fonction du temps et de la position des blessures) (confrontation simultanée).

Facteur	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F-ratio	Valeur p
Antagoniste	21,295	4	5,324	14,437	0,000
Pathogène (<i>A. vitis</i>)	0,145	1	0,145	1,088	0,000
Temps	152,987	6	25,498	193,237	0,000
Position	1,945	1	1,945	15,461	0,000
Antagoniste*Pathogène	21,616	9	2,402	6,465	0,000
Antagoniste*Temps	187,987	34	5,529	76,451	0,000
Antagoniste*Position	23,384	9	2,598	7,054	0,000
Pathogène*Temps	0,262	6	0,044	0,328	0,000
Pathogène*Position	0,402	1	0,402	1,000	0,000
Temps*Position	2,349	6	0,392	3,113	0,005

Pour la confrontation simultanée *in planta*, l'inoculation du pathogène juste après le trempage des plantules dans les suspensions des souches antagonistes a permis à ces dernières d'exprimer leur pouvoir antagoniste mais d'une façon très réduite. La durée de temps entre le trempage des plantules dans l'antagoniste et l'inoculation par le pathogène a influencé d'une manière hautement significative l'effet antagoniste des souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* (figure 3.12 et 3.13).

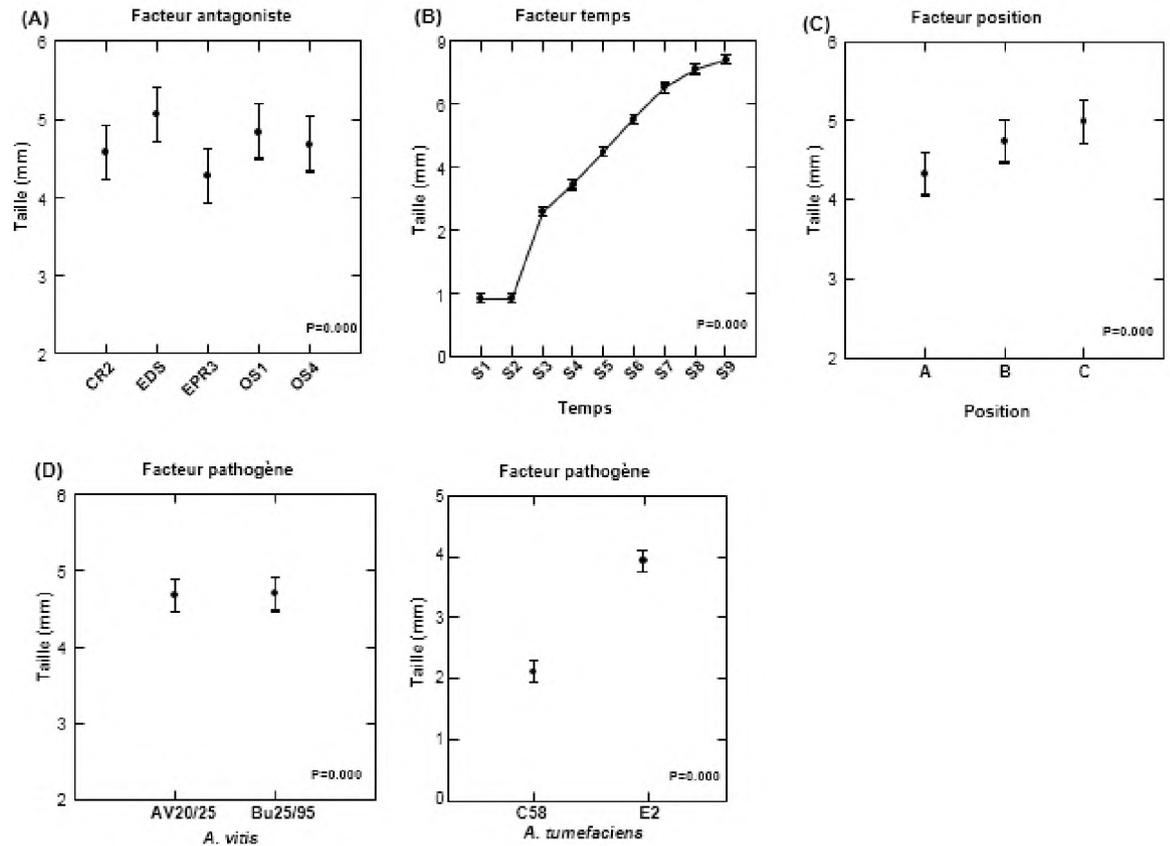


Figure 3.12 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de tomate (confrontation simultanée) représenté par la taille des tumeurs.

(A) Selon la souche antagoniste. (B) Selon le temps. (C) Selon la position de la blessure (D) Selon la souche pathogène.

(AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d'*A. vitis* ; C58 et E2 : les souches d'*A. tumefaciens*)- (CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes).

(S1 ; S2, S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S9 : semaines de suivi après l'inoculation par le pathogène).

(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).

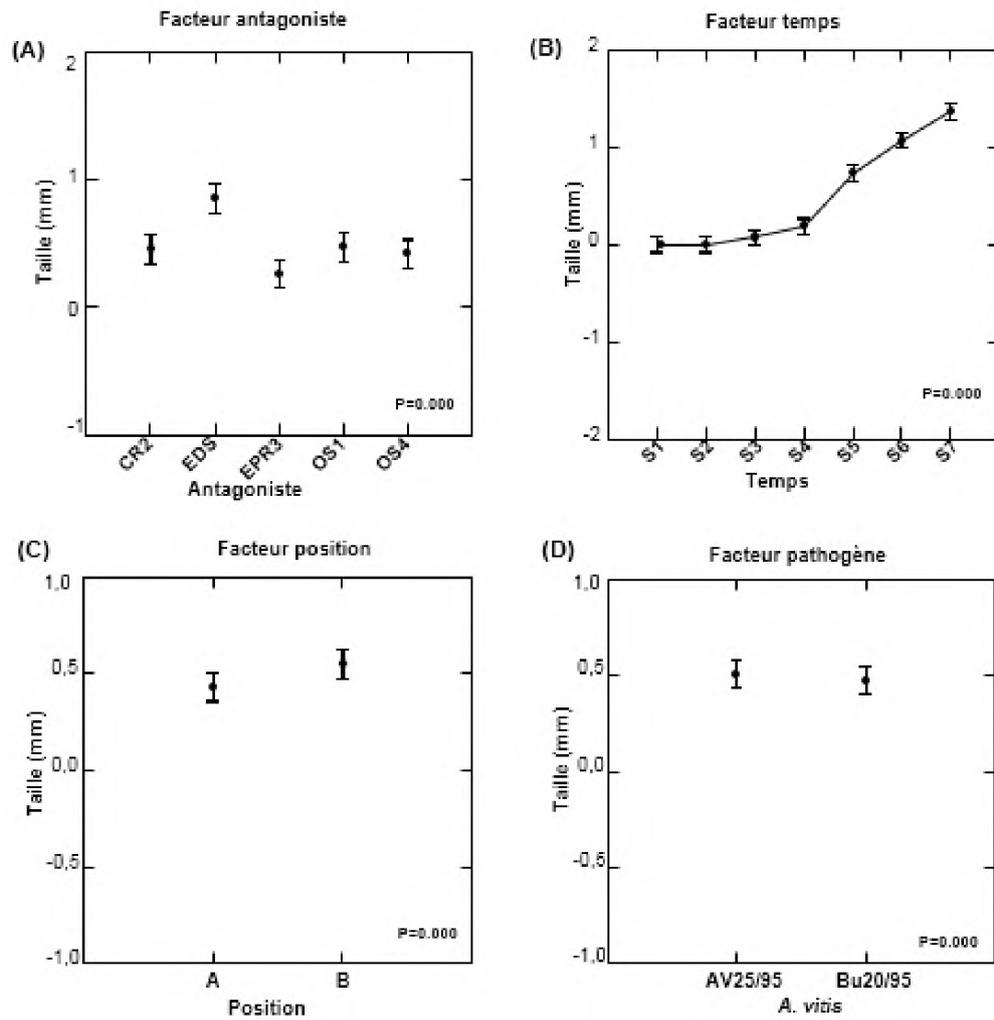


Figure 3.13 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d'*A. vitis* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de la vigne (confrontation simultanée) représenté par la taille des tumeurs.

(A) Selon la souche antagoniste. (B) Selon le temps. (C) Selon la position de la blessure.

(D) Selon la souche pathogène.

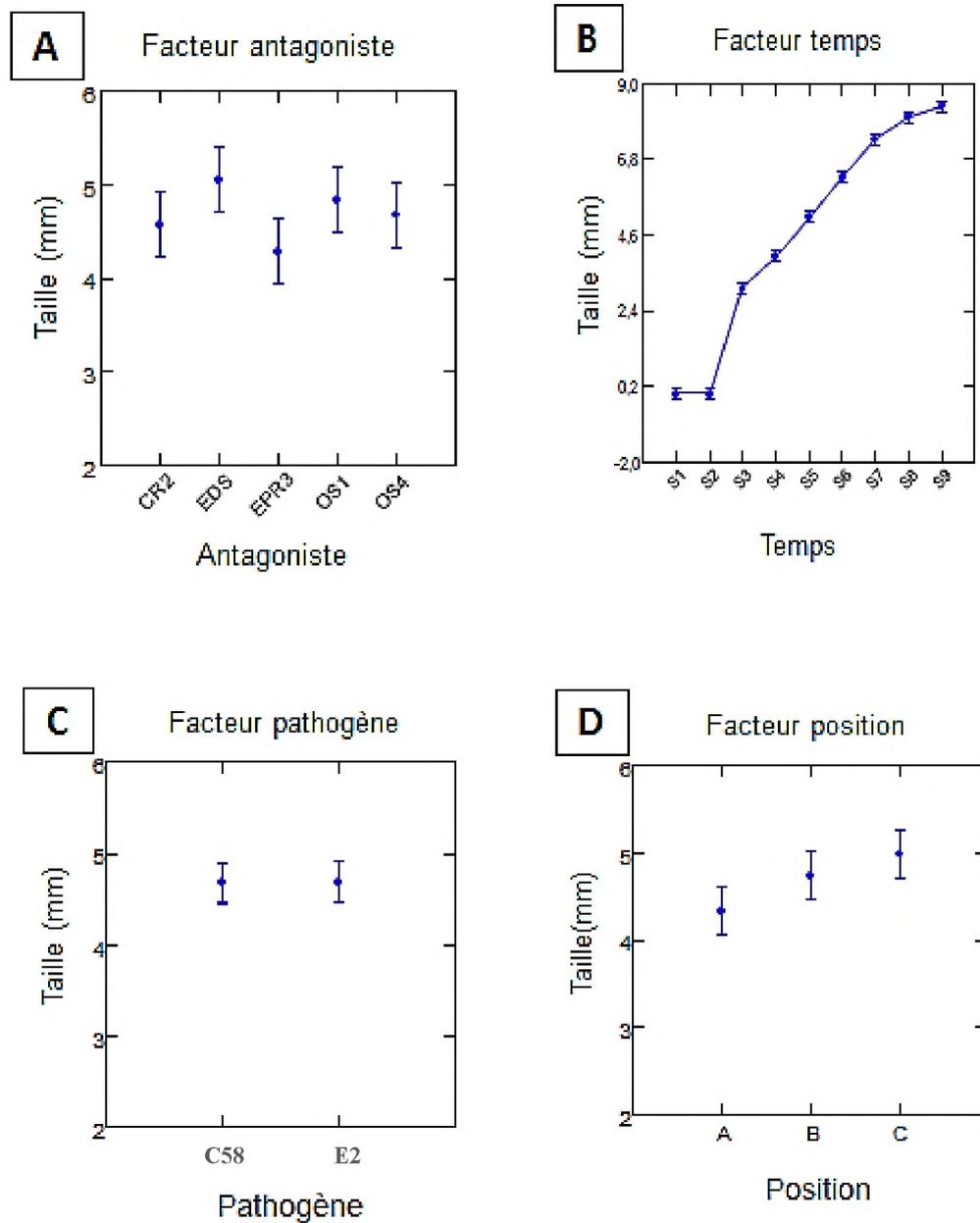


Figure 3.14 : Effet des souches antagonistes sur les souches pathogènes d'*A. tumefaciens* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de la tomate (confrontation simultanée) représenté par la taille des tumeurs.

- (A) Selon la souche antagoniste. (B) Selon le temps. (C) Selon la souche pathogène.
- (D) Selon la position de la blessure.

Les souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* ont pu réduire la taille des galles formées sur la tige de la tomate et de la vigne, mais nous n'avons pas observé une différence apparente entre le témoin positif inoculé directement avec le pathogène et les plantules traitées par les souches antagonistes.

Pour ce type de confrontation, la souche antagoniste qui se révèle la plus efficace est *P. brassicacearum* CR2, commenté sur les plantules de la tomate et de la vigne (figures 3.13 A et 3.14 A). Cette même souche a montré un effet inhibiteur *in vitro* envers les souches pathogènes d'*A. vitis* lors de la confrontation simultanée, avec un diamètre de la zone d'inhibition de 28 mm.

Un retard d'une semaine de l'apparition des galles a été remarqué sur quelques plantules de tomate traitées avec les antagonistes (EPR3, OS1 et OS4) mais nous n'avons observé aucune suppression totale des galles ni sur les plantules de la tomate ni sur les plantules de la vigne (annexe 5).

En comparant entre les trois positions des blessures causées sur la tomate, nous pouvons constater que la position C représentée par la blessure la plus proche au collet, a montré une taille plus importante des galles par rapport aux deux autres positions (figure 3.14 D). Cependant, les deux positions de la blessure sur la vigne indiquent une différence de sorte que, la position B (près du collet) a exhibé des galles de taille plus importantes que la position A (figure 3.13 D).

Partie 2 :

Mise en évidence de la réaction de résistance systémique induite (ISR) par les souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* chez le pathosystème *Agrobacterium tumefaciens*/tomate

1. Inhibition *in vitro* et *in vivo* d'*Agrobacterium tumefaciens* par des bactéries antagonistes *Bacillus* spp. et *Pseudomonas brassicacearum*

Les bactéries antagonistes testées ont été capables d'inhiber efficacement la croissance des trois souches d'*A. tumefaciens* sur milieu LPGA. Le tableau 3.8 présente l'activité antagoniste des quatre souches étudiées vis-à-vis des souches d'*A. tumefaciens* utilisées. Le diamètre moyen de la zone d'inhibition se situe entre 20 et 43,60 mm et la valeur la plus élevée de la zone d'inhibition a été observée pour les souches de *B. methylotrophicus* OS4. Cependant, la souche *B. methylotrophicus* OS4 et la souche *P. brassicacearum* CR2, étaient les plus efficaces contre les trois souches d'*A. tumefaciens* (tableau 3.8).

La taille des tumeurs a été considérablement réduite chez les plants de tomate traités par bactérisation des semences (tableau 3.9 ; figure 3.15). La souche *P. brassicacearum* EPR3 et la souche *B. methylotrophicus* OS4, ont été les souches les plus efficaces pour réduire la taille des tumeurs sur les plants de tomate, contre toutes les souches d'agrobactéries pathogènes testées (tableau 3.9). De plus, les souches OS1, OS4 et EPR3 ont retardé d'une semaine le développement des tumeurs induites par C58 et E17 et de deux semaines celles induites par E14 (annexe 5).

Tableau 3.8 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) induites par les quatre antagonistes contre les souches d'*A. tumefaciens* C58, E14 et E17.

Antagonistes	C58	E14	E17
<i>P. brassicacearum</i> CR2	30.00 b	38.33 b	32.33 b
<i>P. brassicacearum</i> EPR3	25.60 cd	24.00 d	37.60 b
<i>B. cereus</i> OS1	20.00 e	25.67 cd	21.33 c
<i>B. methylotrophicus</i> OS4	30.30 b	43.33 a	43.60 a

Les valeurs représentent la taille moyenne de la zone d'inhibition (mm) calculée sur trois répétitions. Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas statistiquement au test LSD ($P \leq 0,05$).

Tableau 3.9 : Taille moyenne des tumeurs (mm) et le pourcentage de réduction de la taille des tumeurs, induites par différentes souches d'*A. tumefaciens* pour les plants de tomate traitées par les différentes bactéries antagonistes.

Traitements	C58	(%)*	E14	(%)*	E17	(%)*
EDS	5.95a		5.33a		5.50a	
<i>P. brassicacearum</i> EPR3	3.00c	49,6	3.75cd	29,6	3.21d	41,6
<i>P. brassicacearum</i> CR2	3.45b	42,1	4.20 b	21,2	3.50 cd	36,3
<i>B. methylotrophicus</i> OS4	3.37 b	43,4	3.30d	38,1	3.70c	32,7
<i>B. cereus</i> OS1	3.32 b	44,2	3.80c	28,7	4.75 b	13,6

Les valeurs suivies d'une même lettre ne différaient pas statistiquement selon le test LSD ($P \leq 0, 05$).

* Pourcentage de réduction de la taille de la tumeur déterminé par les souches antagonistes.

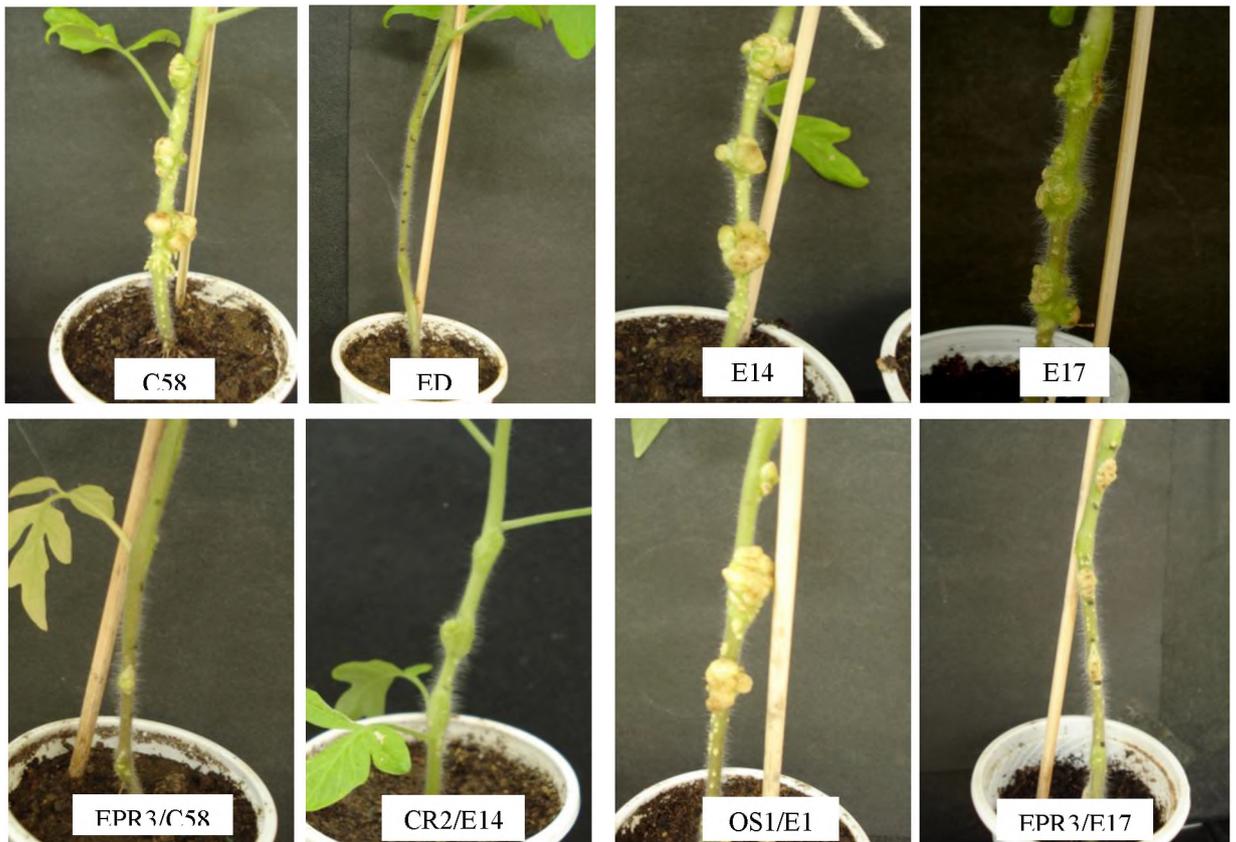


Figure 3.15 : réponses des plantules de tomate aux différents traitements (tumeurs induits par des souches d'*A. tumefaciens* et des plantules de tomate dont les semences ont été traitées par les souches de *Bacillus* spp. ou par les souches de *P. brassicacearum* (EPR3 ou CR2) puis infectées par les souches d'*A. tumefaciens*).

C58 : Plantule de tomate traitée par l'eau distillée stérile puis inoculée par la souche d'*A. tumefaciens* C58.

EDS : Plantule de tomate traitée par l'eau distillée stérile.

E14 : Plantule de tomate traitée par l'eau distillée stérile puis inoculée par la souche d'*A. tumefaciens* E14.

E17 : Plantule de tomate traitée par l'eau distillée stérile puis inoculée par la souche d'*A. tumefaciens* E17.

EPR3/C58 : Plantule de tomate traitée par la souche de *P. brassicacearum* EPR3 puis inoculée par la souche d'*A. tumefaciens* C58.

CR2/E14 : Plantule de tomate traitée par la souche de *P. brassicacearum* CR2 puis inoculée par la souche d'*A. tumefaciens* E14.

OS1/E14 : Plantule de tomate traitée par la souche de *B. cereus* OS1 puis inoculée par la souche d'*A. tumefaciens* E14.

EPR3/E17 : Plantule de tomate traitée par la souche de *P. brassicacearum* EPR3 puis inoculée par la souche d'*A. tumefaciens* E17.

2. Résultats de l'analyse de l'ISR par évaluation de la teneur en phénols, en acide salicylique et de l'activité de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase chez les plants de tomate

2.1 Teneur en composés phénoliques des plants de tomate traités par les bactéries antagonistes ensuite infectés par *Agrobacterium tumefaciens*

L'accumulation des phénols chez les plantes traitées avec les quatre bactéries antagonistes à l'égard d'*A. tumefaciens* a varié de manière significative ($P \leq 0,05$). L'accumulation des phénols a augmenté à partir du deuxième jour jusqu'au 15ème jour après l'inoculation (figure 3.16).

Tous les antagonistes ont montré une augmentation significative de la teneur en phénols des plants de tomate confrontés à des souches pathogènes (figure 3.16).

La teneur en composés phénoliques variait en fonction de la combinaison antagoniste / pathogène : La souche *P. brassicacearum* CR2 a permis l'accumulation de phénols uniquement chez les plantes inoculées avec C58. La souche *P. brassicacearum* EPR3 a montré un effet positif sur l'accumulation de composés phénoliques dans les plantes inoculées avec C58 et E17 (figure 3.16 B). La souche *B. cereus* OS1 a permis l'accumulation de phénols chez les plantes inoculées avec C58 et E14 (figure 3.16 C), tandis que la souche *B. methylotrophicus* OS4 a augmenté la teneur en phénols dans les plantes inoculées avec E14 (figure 3.16 D).

La valeur la plus élevée et la plus significative ($P \leq 0,05$) de la teneur en composés phénoliques exprimée en acide salicylique était de $4,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ et a été détectée chez les plantes protégées par la souche antagoniste *Bacillus cereus* OS1 et inoculées avec la souche E14 d'*A. tumefaciens*. La combinaison des quatre antagonistes avec la souche pathogène E17 et de CR2 avec E14, ont montré une réduction significative des composés phénoliques exprimés en acide salicylique ($P \leq 0.05$) (Tableau 3.10).

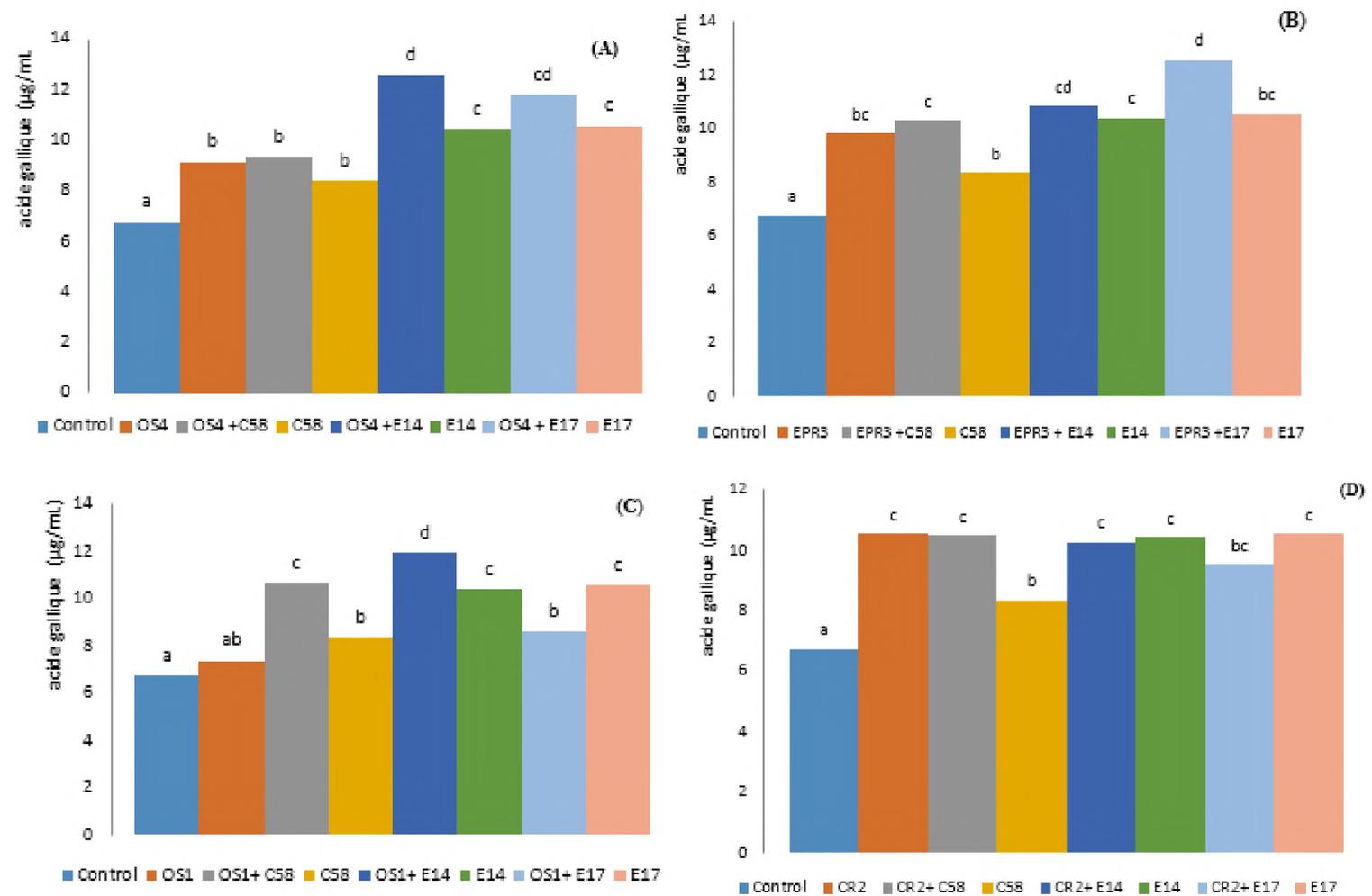


Figure 3.16 : Teneur en composés phénoliques totaux mesurée à la fin de l'expérience (15 jour après l'inoculation), exprimée en acide gallique, chez des plants de tomate inoculés avec des souches d'*A. tumefaciens* et traités avec de l'EDS (témoin) et des souches antagonistes CR2 (A), EPR3 (B), OS1 (C) et OS4 (D). Les différentes lettres sur les barres indiquent des différences significatives à $P \leq 0$.

Tableau 3.10 : Contenu des composés phénoliques totaux à la fin de l'expérience (15 jours après l'inoculation), exprimés en acide salicylique, dans des plants de tomate inoculés avec des souches d'*A. tumefaciens* et traités avec de l'eau distillée stérile et des souches antagonistes CR2, EPR3, OS1 et OS4.

Teneur en composés phénoliques totaux exprimée en acide salicylique ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	EDS	CR2	EPR3	OS1	OS4
EDS	2.43	3.63*	2.20	2.31	3.21
C58	3.55	3.22	3.65	3.12	3.02
E14	3.74	2.88*	3.60	4.78*	3.60
E17	4.24	2.75*	3.31*	3.23*	3.35*

Les valeurs suivies par les étoiles étaient significativement différentes de celles du témoin (agent pathogène seul) au test LSD ($P \leq 0, 05$).

EDS : Plantule de tomate traitée avec de l'eau distillée stérile.

C58, E14, E17 : Plantule de tomate traitée avec de l'eau distillée stérile puis inoculée avec la souche d'*A. tumefaciens* C58 ou E14 ou E17.

CR2, EPR3, OS1, OS4 : Plantule de tomate traitée avec la souche de *P. brassicacearum* CR2 ou EPR3 ou *Bacillus* spp. OS1 ou OS4.

EPR3/C58 : Plantule de tomate traitée avec la souche de *P. brassicacearum* EPR3 puis inoculée avec la souche d'*A. tumefaciens* C58.

2.2 Identification et quantification de l'acide salicylique endogène par HPLC dans les plants de tomate

Le temps de rétention de l'acide salicylique standard mesuré par HPLC était d'environ 29,5 min. La teneur en acide salicylique des plantes traitées avec les bactéries antagonistes et inoculées avec *A. tumefaciens*, était généralement plus élevée que celle des plantes traitées avec les bactéries antagonistes ou pathogènes seules.

Les valeurs en acide salicylique les plus élevées ont été détectées au 6^e jour après l'inoculation pour tous les traitements analysés. La combinaison de l'antagoniste EPR3 avec E17 a déterminé le plus haut niveau d'accumulation d'acide salicylique chez les plants de tomate (figure 3.17 et tableau 3.11).

En plus de l'acide salicylique, d'autres composés phénoliques ont été identifiés par HPLC. Dans des semences de plants de tomate traités par *P. brassicacearum* EPR3 et des tiges inoculées avec *A. tumefaciens*, de grandes quantités d'acide gallique et de kaempférol ont été détectées dans les plantes uniquement inoculées avec E17. La quercétine, et les deux composés non phénoliques anthrone et acide oxalique, étaient par contre plus élevés chez les plantes inoculée par la souche E17 (tableau 3.12).

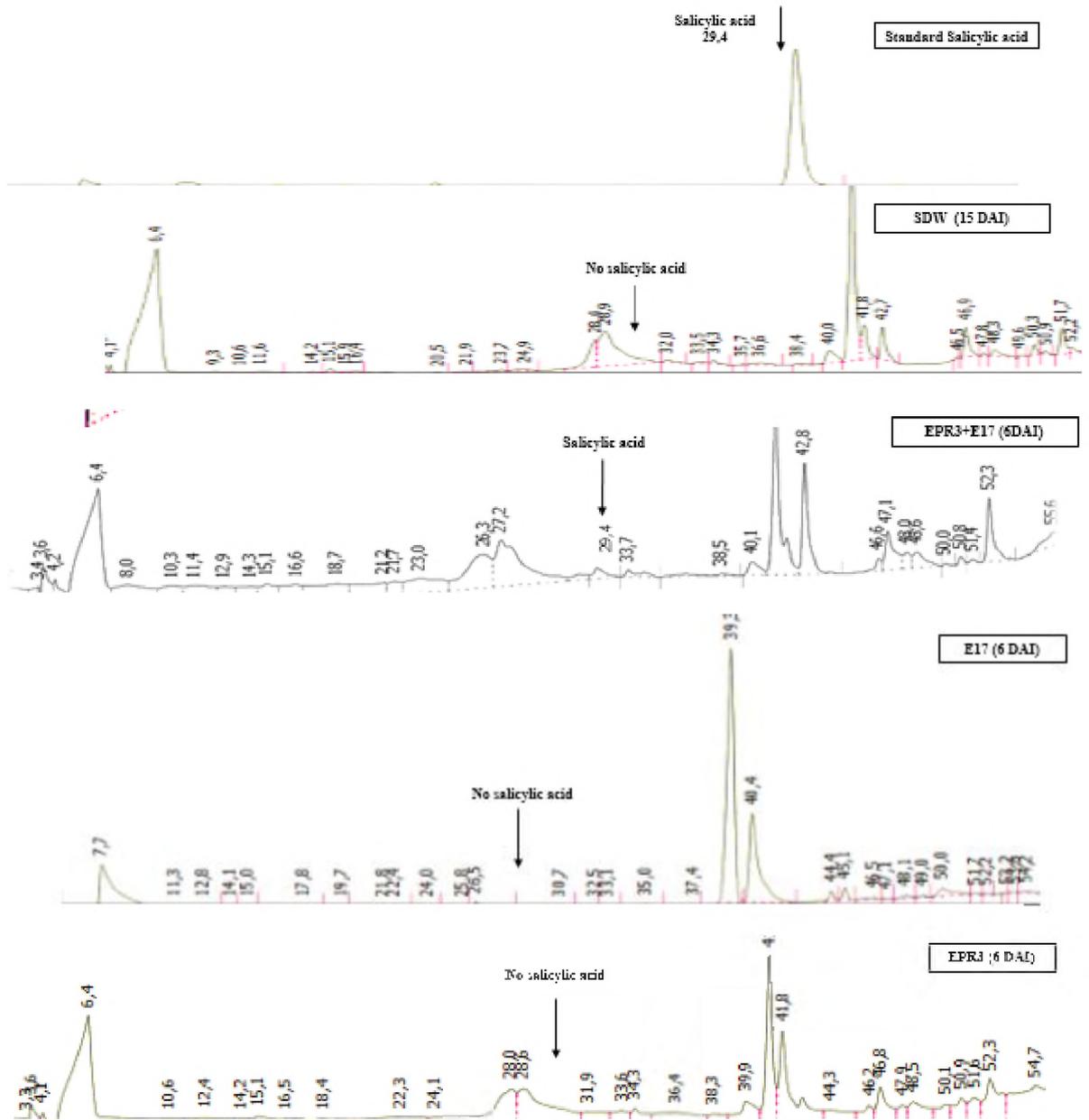


Figure 3.17 : Chromatogramme d’HPLC montrant la teneur en acide salicylique de plants de tomate protégés par l’antagoniste EPR3 et inoculés avec *A. tumefaciens* E17.

Tableau 3.11 : Concentration d'acide salicylique ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dans les plants de tomate traités par des souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum*, six jours après inoculation d'*A. tumefaciens*. (- : aucun acide salicylique détecté).

Traitements	Ret. Time	Aire (%)	SA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Standard SA	29.5	6572.802	
Extraits végétaux non traités (EDS	29.9	0019.022	0003.164
<i>A. tumefaciens</i> E17	-	-	-
<i>P. brassicacearum</i> EPR3	-	-	-
<i>P. brassicacearum</i> EPR3 + <i>A. tumefaciens</i> E17	29.6	0206.454	0033.680
<i>P. brassicacearum</i> EPR3+ <i>A. tumefaciens</i> C58	29.5	0465.740	000.0748
<i>B. methylotrophicus</i> OS4+ <i>A. tumefaciens</i> C58	29.3	0100.730	000.0161
<i>B. methylotrophicus</i> OS4+ <i>A. tumefaciens</i> C58	29.6	0693.410	000.111
<i>B. cereus</i> OS1+ <i>A. tumefaciens</i> E17	-	-	-
<i>P. brassicacearum</i> CR2+ <i>A. tumefaciens</i> E14	29.9	0013.121	00.0021
<i>B. methylotrophicus</i> OS4+ <i>A. tumefaciens</i> E14	-	-	-
<i>P. brassicacearum</i> EPR3 + <i>A. tumefaciens</i> E14	29.7	158.299	0.0245
<i>P. brassicacearum</i> EPR3+ <i>A. tumefaciens</i> E14	29.3	10.672	0.00171

Tableau 3.12 : Composés identifiés par HPLC chez les plantes inoculées avec des souches d'*A. tumefaciens* et protégées par des bactéries antagonistes en comparaison avec des plantes non traitées (EDS).

	Acide gallique		Quercetine		Kaempferol		Anthrone		Acide oxalique	
	Ret.Time	Area (%)	Ret.Time	Area	Ret.Time	Area	Ret.Time	Area	Ret.Time	Area
	(Min)		(Min)	(%)	(Min)	(%)	(Min)	(%)	(Min)	(%)
Standard	7.02	40.6	36.85	100	41.1	100	48.40	100	50.24	100
EPR3+E17	7.08	02.5	36.85	2.5	41.73	01.9	49.06	02.7	50.16	01.6
OS1+E17	7.19	04.4	36.20	17.9	41.74	00.2	48.75	00.6	51.4	00.1
EPR3+E14	7.54	00.1	36.40	16.7	41.02	00.1	48.83	00.7	49.91	00.5
EPR3	6.43	13.4	37.57	02.9	41.10	04	48.45	01.4	50.85	00.9
E17	7.65	14.3	36.35	00.2	40.40	18.8	48.90	00.2	51.67	00.2
CR2+E14	7.50	47	37.42	00.2	41.23	00.6	47.93	00.9	50.72	00.8
OS4+E14	6.44	11.3	36.82	02.2	41.11	04.5	48.32	02.3	50.91	01.3
OS4+C58	6.47	30.8	36.21	00.4	41.10	07.8	49.02	00.2	50.47	00.1
EDS	6.42	42.7	36.67	00.3	41.73	00.1	49.02	00.1	50.32	00.5

2.2.1 Confirmation de l'acide salicylique par GC/MS

La dérivation par la MSTFA a été utilisée dans notre étude, pour une meilleure séparation et pour améliorer la sensibilité de la méthode. L'utilisation de la GC-MS après dérivation par MSTFA nous a permis de confirmer les résultats obtenus par HPLC pour l'identification de l'acide salicylique. La figure 3.18 montre un exemple d'identification de SA sur un échantillon de plant de tomate prétraité avec la souche *B. methylotrophicus* OS4 et inoculé avec la souche *A. tumefaciens* C58.

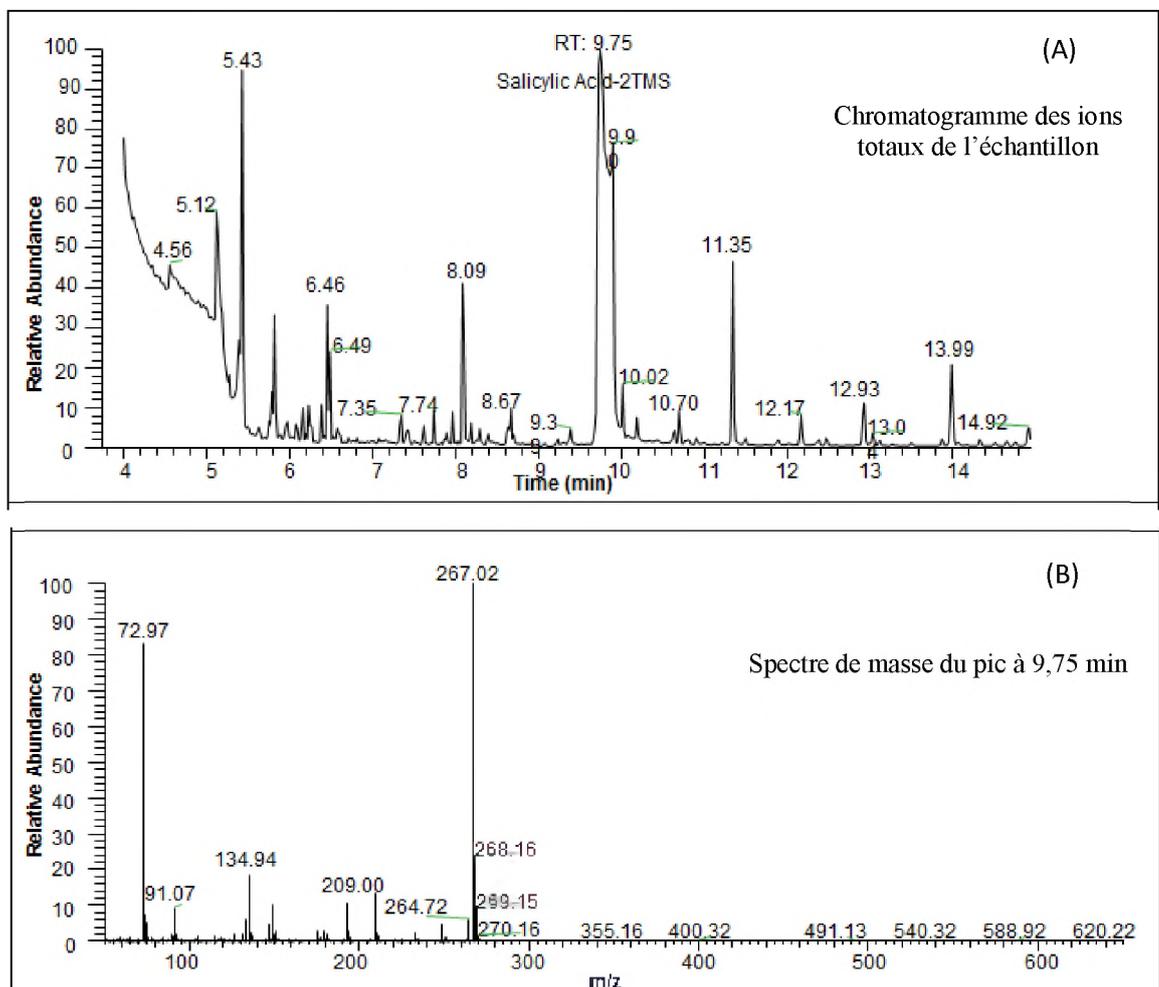


Figure 3.18 : Chromatogramme des ions totaux obtenu par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (A). (B) Spectre de masse du pic à 9,75 min. L'acide salicylique (SA) a été extrait au 2ème jour après l'inoculation à partir de 0,5 g de plants de tomates traités avec *B. methylotrophicus* OS4 et inoculés avec la souche *A. tumefaciens* C58.

2.3 Activité des enzymes de défense chez les plants de tomate bactérisés par les souches antagonistes et inoculés par les souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens*

2.3.1 Activité de la peroxydase

Les plants de tomate traités par les souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* et inoculés avec *A. tumefaciens* ont exprimé une activité de la peroxydase plus élevée que les plants traités avec des bactéries antagonistes ou pathogènes seules (figure 3.19).

L'activité de la peroxydase la plus élevée abs =1,38 a été observée pour les souches CR2/E14 combinées, quinze jours après l'inoculation d'*A. tumefaciens*, mesurée à la fin de l'expérience (figure 3.19 C).

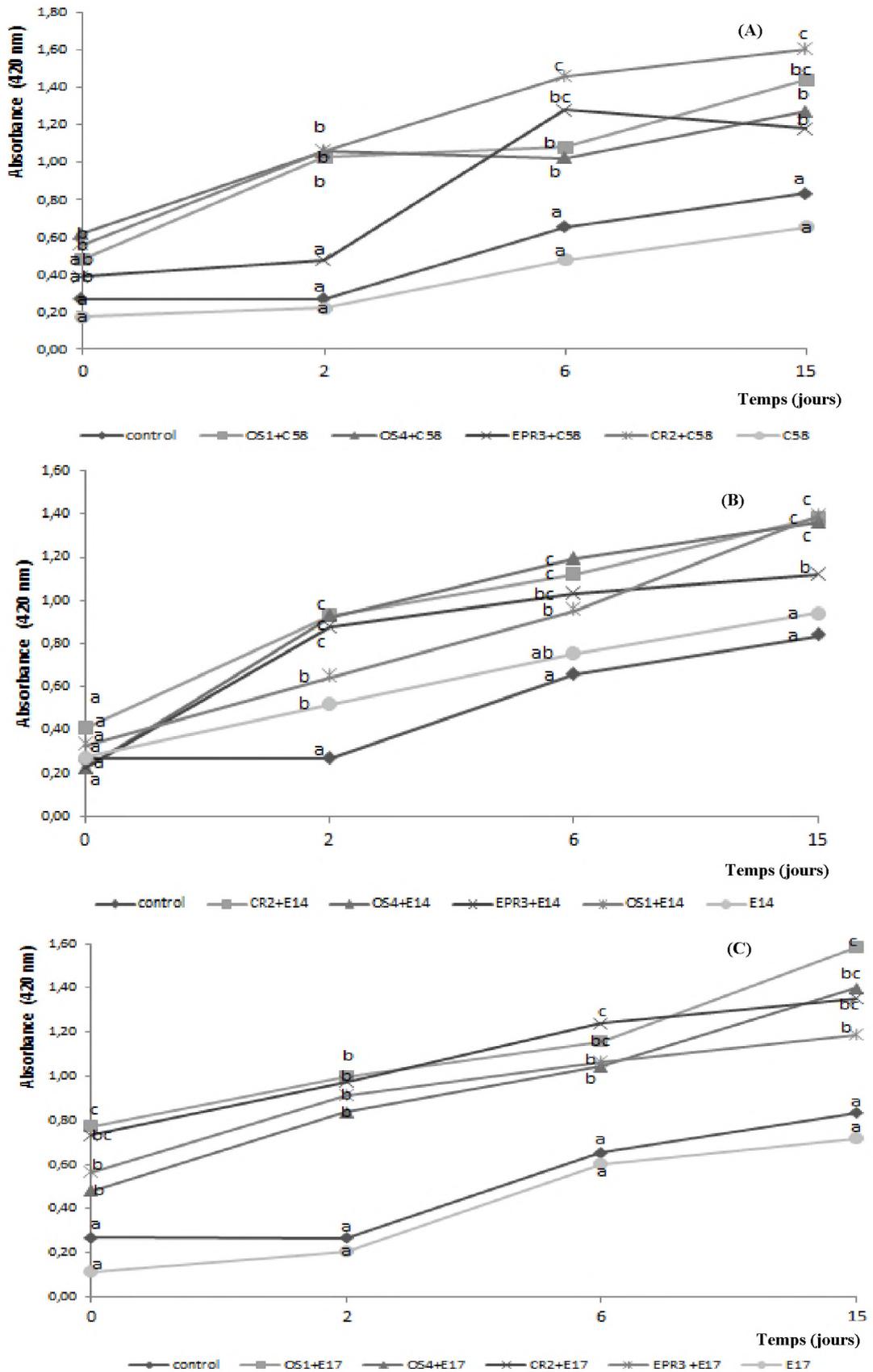


Figure 3.19 : Activité de la peroxydase chez les plants de tomate traités par des souches antagonistes (CR2, EPR3, OS4 ou OS1) et pathogènes C58 (A), E14 (B), E17(C). La même lettre sur les courbes indique que les valeurs ne différaient pas statistiquement au test LSD ($P \leq 0.05$).

2.3.2 Activité de la polyphénol-oxydase

Les antagonistes *P. brassicacearum* EPR3, CR2 et *B. cereus* OS1 ont augmenté de manière significative l'activité de la polyphénol-oxydase dans les plants de tomate inoculés avec C58, tandis que la souche *B. methylotrophicus* OS4 n'a pas déterminé de variation (figure 3.20).

Les souches de *Bacillus* OS1 et OS4, en combinaison avec la souche pathogène E14, ont augmenté de manière significative la polyphénol-oxydase chez les plants de tomate, tandis que les souches de *P. brassicacearum* n'ont eu aucun effet (EPR3/E14) ou un effet négatif (CR2/E14) sur l'activité de la polyphénol-oxydase (figure 3.20).

L'inoculation des plants de tomate avec la souche E17 seule a induit la plus forte activité de la polyphénol-oxydase, au contraire, chez les plants traités par les quatre antagonistes, cette valeur s'est montrée la plus faible (figure 3.20).

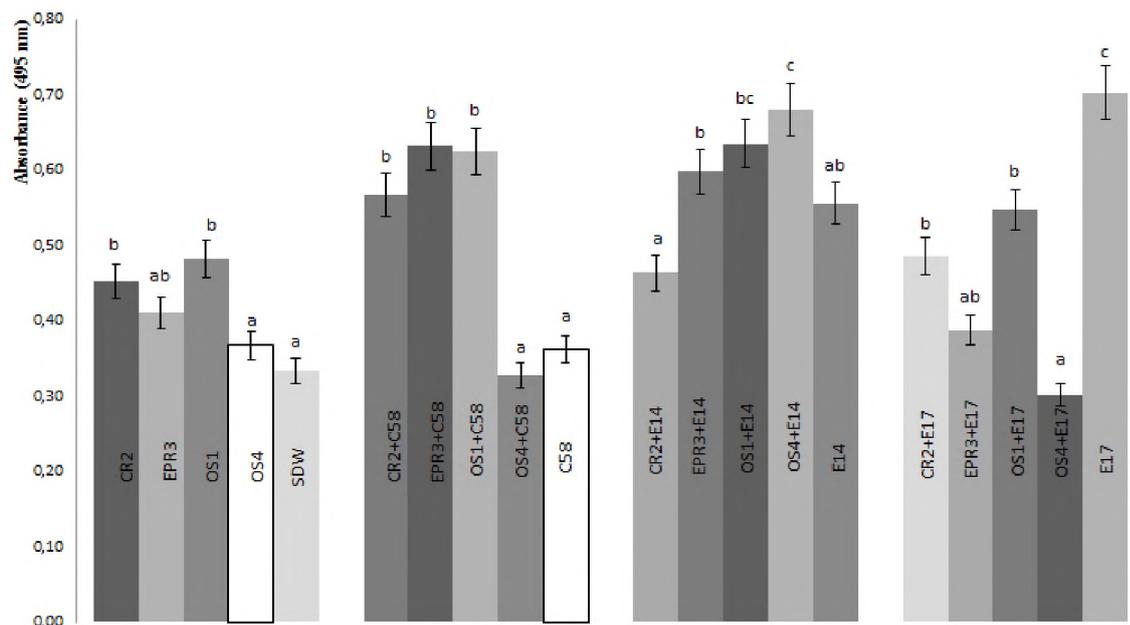


Figure 3.20 : Activité de la polyphénol-oxydase chez les plants de tomate des différents traitements à la fin de l'expérience (quinze jours après l'inoculation du pathogène).

La même lettre en haut des barres indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes au test LSD ($P \leq 0,05$) dans chaque groupe de traitements.

Les barres d'erreur représentent l'erreur standard calculée sur trois répétitions.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de ce travail de thèse, nous avons abordé l'étude de la capacité de quatre bactéries appartenant à deux genres : *Bacillus* et *Pseudomonas*, isolées de plantes spontanées par Krimi et *al.* [22], à prévenir le développement des tumeurs causées par des souches pathogènes d'*A. tumefaciens* et d'*A. vitis* sur la tomate et la vigne. Deux objectifs conjoints ont été menés tout au long de ce travail. Le premier c'est celui d'étudier le potentiel des souches antagonistes envers les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. dans l'inhibition de la croissance des pathogènes *in vitro* et la réduction des effets nécrotiques et tumorigènes *in planta*. Le second, consiste à améliorer nos connaissances sur la capacité des espèces de *Bacillus* spp. et *P. brassicacearum*, à induire une résistance systémique en étudiant leur effet stimulateur sur le changement du métabolisme secondaire (cas des composés phénoliques), et en analysant l'induction de l'acide salicylique et les activités enzymatiques de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase chez des plants de tomate inoculés avec trois souches pathogènes d'*A. tumefaciens*.

1. Interaction *in vitro* et *in planta*, réduction, arrêt, et/ou retard de l'action tumorigène d'*Agrobacterium* spp. pathogènes sous l'effet des antagonistes *Bacillus* spp. et *P. brassicacearum*

Les résultats d'antagonisme *in vitro* de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* ont révélé l'efficacité des souches étudiées à inhiber la croissance des agrobactéries pathogènes lors des deux techniques de confrontation et avec un ratio de concentration cellulaire (antagoniste : pathogène) de 10:1. Les bactéries antagonistes testées ont permis une inhibition élevée de la croissance bactérienne des pathogènes où des diamètres variant de 20 à 50 mm ont été enregistrés. Cette réduction de la croissance est un critère largement utilisé pour évaluer l'antagonisme microbien [195]. L'activité antagoniste a été différente selon les souches, ce fait suggère que plusieurs substances antibactériennes impliquées dans l'inhibition ont été mises en jeu. Nos résultats concordent avec ceux de Frikha-Gargouri et *al.* [148] qui ont montré que 32 souches de *Bacillus* isolées à partir d'échantillons environnementaux ont

présenté une activité antibactérienne *in vitro* très importante contre la souche *A. tumefaciens* C58. Aussi, les travaux menés par Habbadi et al. [196] qui ont sélectionné 12 souches antagonistes appartenant aux genres *Bacillus*, *Pantoea* et *Acinetobacter*, avec une forte activité antibactérienne *in vitro* contre *A. vitis*.

Ces résultats peuvent être expliqués par le pouvoir compétiteur très élevé présenté par les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* et qui leur permet de produire les métabolites antimicrobiens nécessaires pour réprimer la croissance du pathogène [197]. Une étude menée *in vitro* sur une souche de *Bacillus cereus* a montré que cette dernière a la capacité de modifier la composition ionique du milieu de culture en rendant le pH plus élevé, ce qui peut influencer la croissance du pathogène [198]. D'autre part, il est cité que la plupart des souches de *Pseudomonas* utilisées dans le biocontrôle des maladies des plantes, sont capable d'inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro* [199]. Cette inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme d'antibiotiques tels que, l'acide phenazine-1-carboxylique et les sidérophores, se traduisant par la même, par une capacité d'induction des mécanismes de défense chez la plante hôte [23].

Nos résultats indiquent aussi que parmi les bactéries les plus actives du genre *Bacillus*, la souche *B. methylotrophicus* OS4 a montré un fort pouvoir antagoniste *in vitro*. Le genre *Bacillus* est connu pour produire une large gamme de métabolites secondaires, tels que les antibiotiques, les composés non volatiles, les composés volatiles et les enzymes lytiques [200 ; 23]. Cette même souche a montré à la fois des effets antagonistes *in vitro* sur d'autres bactéries phytopathogènes, tels que *Erwinia amylovora* et *Pectobacterium carotovorum* et stimulateurs de la croissance de plants de tomate [22 ; 26].

Les quatre antagonistes ont été capables d'inhiber la croissance des souches d'*A. tumefaciens in vitro*, montrant une efficacité différente par rapport à la souche d'*Agrobacterium* testée. En général, la souche *A. tumefaciens* C58 a été inhibée par tous les antagonistes, la souche E14 était plus sensible à l'activité antagoniste des *Bacillus*, tandis que la souche E17 a été efficacement inhibée par *B. methylotrophicus* OS4 et *P. brassicacearum* EPR3.

De nombreux antagonistes bactériens produisent différents types de bactériocines ou de composés antibactériens qui inhibent les *Agrobacterium* spp. pathogènes [201]. Certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* de la rhizosphère, produisant des antibiotiques à large spectre d'action, ont permis une réduction de manière significative, le développement de la galle du collet sur les plantes infectées par des souches pathogènes d'*A. tumefaciens* [187]. Il est également connu que la compétition microbienne pour l'espace et les nutriments, réduit les chances à l'agent pathogène, de coloniser les sites d'infection, comme cela a été décrit pour la souche *A. radiobacter* K84, l'agent de biocontrôle de la galle du collet [202]. Nous ne pouvons négliger aussi le fait que de nombreuses espèces bactériennes sont connues pour produire des composés organiques volatils, sont impliqués dans l'induction d'une résistance systémique [203].

Cette variabilité de l'action antagoniste dépend aussi des souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. testées lors de cette étude. En effet, les souches testées, présentent des différences au niveau de leur type opinique et de leur origine végétale et géographique, ce qui explique que les souches virulentes d'*A. tumefaciens* et celles d'*A. vitis* ne répondent pas de la même manière aux différentes souches antagonistes. Par exemple, *A. tumefaciens* souche C58-CFBP1903 et *A. tumefaciens* E14, toutes deux de biovar 1 et de type opinique nopaline, ont montré une forte sensibilité envers les différentes souches antagonistes testées.

Le genre *Bacillus* sp. présente un large éventail de mécanismes qui peuvent stimuler le développement des plantes. Les espèces de ce genre, colonisent rapidement les racines des plantes et ont la capacité de se multiplier sur les racines [204]. En général, les espèces apparentées au genre *Bacillus* sp. produisent une large gamme de métabolites secondaires, tels que, les antibiotiques, les composés volatils et les enzymes lytiques [23]. Elles synthétisent de nombreux lipopeptides amphiphiles et tensioactifs puissants comprenant des bacillomycines, des iturines et de la mycosubtiline ; avec la modification des conditions de culture. C'est le cas notamment des souches de *B. methylotrophicus* qui manifestent d'excellentes propriétés de promotion de la croissance des plantes et de production de composés biologiquement actifs

(surfactines, iturines et fengycines), agissant dans le contrôle efficace des maladies des plantes causées par les bactéries et les champignons [205 ; 206]. Dans un travail à compléter, il serait intéressant de rechercher la présence de tels composés chez les souches testées.

Les espèces de *Bacillus* sp. induisent une résistance systémique par la production de composés organiques volatils et favorisent la croissance des plantes à travers la production de phytohormones et des enzymes extracellulaires [204]. Il a été également rapporté que les espèces de ce genre, diminuent le taux d'éthylène dans les plantes par désamination de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), qui est le précurseur immédiat de l'éthylène. La réduction de la production d'éthylène est connue pour affecter la maturation des fruits, la sénescence des feuilles, l'abscission des fleurs, la germination, l'élongation cellulaire et la prolifération, la nodulation et la réponse à une attaque pathogène [207].

Pour étayer encore plus l'action des *Bacillus* spp. sur le contrôle des maladies et plus spécifiquement contre le crown gall, des souches de l'espèce *B. subtilis* ont été citées pour être efficaces dans la réduction de la formation de galles sur la vigne [150]. Comme exemple, la souche bactérienne 14B de *B. subtilis* a été désignée comme un agent de lutte biologique producteur de la bactériocine impliquée dans le biocontrôle des souches d'*Agrobacterium* spp. [208]. Ainsi, il a été montré que l'inoculation des racines avec la souche *B. subtilis* BSCH14 avant la plantation sur le terrain a entraîné une inhibition significative de l'incidence de la maladie de la galle du collet [20].

Nos résultats indiquent aussi que les souches antagonistes de *P. brassicacearum* ont été efficaces contre le crown gall. Au vu des résultats obtenus lors de cette étude, il est possible d'affirmer que *P. brassicacearum* pourrait être considéré comme un agent de lutte biologique potentiel à exploiter. Cette espèce a déjà été signalée comme un agent de lutte biologique efficace contre *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae* et également *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [209 ; 210]. Dans le même contexte, il est rapporté dans plusieurs travaux que les *Pseudomonas* spp.

possèdent de nombreux traits qui les rendent bien adaptés comme agents de lutte biologique et comme stimulateurs de la croissance végétale [211]. Les actions précédentes sont induites notamment par la production de métabolites qui comprennent des enzymes lytiques, des auxines, des sidérophores et des antibiotiques [212]. Il est à signaler que chez le genre *Pseudomonas*, les souches de l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro* [211]. Ainsi, la souche *P. putida* UW4, qui produit l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACCD), antagonise le développement de la maladie de la galle du collet sur les plants de tomate hôtes à *A. tumefaciens* Sh-1 et *A. vitis* S4 [213]. A titre d'exemple, la souche *P. fluorescens* F113 est l'une des nombreuses PGPB, bactéries promotrices de la croissance des plantes qui a montré une activité significative contre les bactéries phytopathogènes [214]. Au moins une partie de l'activité 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 *P. fluorescens* a montré sa capacité à supprimer la formation de galles causées par des espèces d'*Agrobacterium* spp. chez plusieurs cultures pérennes [215]. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. En effet, une étude de ces mêmes souches de *P. brassicacearum* menée parallèlement au laboratoire, a montré leur capacité de production de sidérophores de type hydroxamates et catécholates, molécules requises dans la performance des agents microbiens de biocontrôle [26]. Il est connu que les sidérophores 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 des maladies [211].

Tout comme les *Bacillus* spp., les *Pseudomonas* ont la capacité de coloniser les racines des plantes et à y maintenir une densité de population très remarquable [216]. Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux

de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires [217]. L'activité antagoniste de ces souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* démontrée dans cette étude concorde avec les observations de plusieurs auteurs ; Siddiqui [218], Bardin *et al.* [195], Allaire [211], Habbadi *et al.* [196] et Frikha-Gargouri *et al.* [148]. En effet, ces derniers ont mis en évidence la capacité de plusieurs espèces de *Pseudomonas* et *Bacillus* à empêcher la croissance bactérienne des *Agrobacterium* spp. lors de tests *in vitro*.

Compte tenu de ce qui précède, le test d'antagonisme *in vitro* est souvent utilisé comme indicateur dans la sélection des souches bénéfiques, même si les potentialités antagonistes ne peuvent pas être déterminées avec précision à travers cet essai. Les résultats obtenus ne sont pas en équivalence en pratique avec les potentialités réelles des agents antagonistes. Ce test reste comme un critère orientatif dans le criblage préliminaire des souches qui peuvent renfermer des potentialités bioactives. Cela dit, plusieurs travaux ont montré que certains microorganismes manifestant un important antagonisme *in vitro* réussissent à produire le même effet *in vivo* tel que signalé par Bardin *et al.* [195]. D'autres par contre, ont montré que le succès de l'antagonisme *in vitro* ne l'est pas nécessairement *in vivo* [219].

Dans cette optique, il était nécessaire de tester *in planta* l'effet antagoniste des souches de *B. cereus* OS1, *B. methylotrophicus* OS4, *P. brassicacearum* EPR3 et CR2, sélectionnées d'après leur efficacité *in vitro*. Les résultats obtenus à travers l'étude d'antagonisme *in planta*, nous ont permis de constater une diminution et même un retard dans l'apparition des symptômes de la galle du collet au niveau des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne des antagonistes testées, comparés aux témoins. Les résultats du test d'antagonisme *in planta*, révèlent l'efficacité des souches de *Bacillus* et de *P. brassicacearum* à l'égard des bactéries tumorigènes. L'efficacité *in planta* s'est traduite par une réduction considérable de la taille des tumeurs chez les deux espèces végétales testées. La bactérisation avec chacune des souches antagonistes séparément : *B. cereus* OS1, *B. methylotrophicus* OS4 et *P. brassicacearum* EPR3 et CR2 a limité l'expression des souches d'*Agrobacterium*,

qui s'est traduite par une réduction importante de la taille des galles formées sur la tige des plantules de tomate et de la vigne.

Ainsi, les résultats de notre étude d'antagonisme *in planta* concordent avec plusieurs recherches qui ont montré que les souches de *P. aureofaciens* B-4117, *P. fluorescens* CR330D et la souche de *B. subtilis* EN63- ont réduit significativement la taille des tumeurs sur des boutures de vigne en dormance et sur d'autres plantes modèles [150].

Un pourcentage de réduction de la taille de la tumeur estimé à 49,6% pour les plants de tomate traités par la souche *P. brassicacearum* EPR3, ensuite infectés par *A. tumefaciens* C58 a été obtenu. Nos résultats sont en corrélation avec ceux de Walters et al. [220] et de Pierterse et al. (2014), qui estiment que la plupart des agents inducteurs réduisent la taille et / ou le nombre de lésions en diminuant la maladie entre 20 et 85%.

L'utilisation de la tomate et de la vigne comme plantes hôtes nous a permis de suggérer une nette dissemblance entre les réponses de ces deux plantes à l'inoculation par l'antagoniste puis par le pathogène. Toutes les plantes de la tomate ont développé des galles de tailles différentes (selon la souche antagoniste en interaction avec la souche pathogène), tandis que certains plants de la vigne n'ont développé aucune galle. Cette constatation est expliquée par la spécificité des voies métaboliques activées dans le cadre de l'ISR et qui varient en fonction de l'espèce végétale même si le microorganisme inducteur est identique [222].

Concernant la position des blessures causées sur les tiges pour favoriser la formation des galles, nous avons constaté que la blessure située auprès du collet s'est avérée la plus sensible à l'infection en présentant des galles de grande taille par rapport aux autres positions, ce qui peut être dû à la dissemblance entre les tissus de la même plante dans les différentes positions [223].

La réalisation des deux techniques de confrontation pour l'interaction antagoniste/pathogène (déphasée et simultanée) *in planta* sur la tomate et la vigne, a confirmé l'influence de la durée du délai de 24 h sur l'efficacité des

souches de *Bacillus* et de *P. brassicacearum*. Une réduction de la taille des galles développées sur les plantules de tomate et de la vigne lors de la confrontation de type déphasée a été notée (24 h) alors que ces mêmes souches ne l'ont pas permis lors de la confrontation simultanée (0 h). Le trempage des plants de tomate avec *B. cereus* OS1, *B. methylotrophicus* OS4, *P. brassicacearum* EPR3 et CR2 a permis leur protection contre l'action agressive d'*Agrobacterium* spp. Le succès de cette protection dépend du moment de l'application de l'antagoniste. Ainsi, l'inoculation des plants de tomate et de vigne avec les quatre agents protecteurs 24 h avant les agrobactéries virulentes, leur confère une protection intéressante. En effet, même si le délai entre l'application de l'antagoniste et celui du pathogène n'a pas permis une protection maximale, la réduction de la taille des tumeurs a été significative. L'ensemble des plants trempés dans les souches antagonistes ensuite infectés par les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. testées, ont développé des tumeurs dont la taille ne dépasse pas les 3 mm. Cependant, les plantules non traitées par les souches antagonistes et celles trempées dans l'eau distillée stérile, ont développé des tumeurs de taille supérieure à 5,5 mm. De ce fait, ce délai a permis aussi de retarder la formation et l'induction des tumeurs au niveau des plantules de tomate traitées par les suspensions bactériennes des antagonistes, comparées aux témoins. Ces dernières ont induit la formation des tumeurs à la deuxième semaine après l'inoculation par rapport aux plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste, qui ont parfois développé des tumeurs à partir de la 3^{ème} à la 4^{ème} semaine, influencées par la sévérité de la souche d'*Agrobacterium* spp. Comme exemple, la souche *A. tumefaciens* E14, considérée comme la plus sévère, a permis l'induction des tumeurs à la 2^{ème} semaine pour les plantules inoculées directement par cette souche. Chez cette même souche, l'apparition de la tumeur est survenue à partir de la 4^{ème} semaine pour les plantules trempées dans la suspension bactérienne des antagonistes : *B. methylotrophicus* OS4, *B. cereus* OS1, *P. brassicacearum* EPR3 et à partir de la 3^{ème} semaine pour les plantules trempées dans la suspension de *P. brassicacearum* CR2. Nous pouvons avancer et conclure que la protection n'était pas durable car elle a juste retardé l'induction des tumeurs et qu'elle n'était pas maximale, du fait qu'il y a eu quand même formation des tumeurs même si ces tumeurs étaient de petite taille.

Dans la présente étude, la souche *B. methylotrophicus* OS4 et la souche *P. brassicacearum* EPR3 étaient les plus actives *in vitro* avec des zones d'inhibition dépassant les 40 mm après 24 h. Contrairement, pour l'antagonisme *in planta*, elles étaient les moins efficaces, la taille des tumeurs a dépassé 3 mm. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait qu'il n'y a pas toujours une corrélation entre l'activité *in vitro* et *in planta* dans le cas de l'action d'antagonisme par antibiose [223]. Ce dernier exemple est soutenu par les travaux menés avec la souche KuTox708 de *P. fluorescens* qui a montré une absence d'activité antagoniste contre *Ralstonia solanacearum in vitro*, par contre, ce même isolat a pu protéger les plants de tabac *in vivo* contre le flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* [223].

2. Suppression de l'effet nécrotique d'*A. vitis* sous l'effet des souches antagonistes

La seconde partie de ce travail consacrée à l'évaluation des souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* dans la suppression de l'effet nécrotique d'*A. vitis* a montré une action efficace des antagonistes testés. Les résultats de cette étude ont confirmé le pouvoir antagoniste des quatre souches testées (EPR3, CR2, OS1 et OS4) envers les souches tumorigènes d'*A. vitis*. avec réduction des effets nécrotiques *in planta*.

Les nécroses sont dues au fait que les souches d'*A. vitis* sont capables de sécréter la polygalacturonase responsable de la dégradation de la paroi de la cellule végétale chez la vigne [224]. La capacité de ce pathogène à infecter deux organes de la plante hôte était la raison pour laquelle les sections détachées ont été testées comme système modèle pour étudier les interactions d'*A. vitis* – vigne, pour leur utilisation dans des essais *in vivo*. *A. vitis* a été inoculé artificiellement sur la surface blessée de la section pour permettre ainsi la pénétration directe du pathogène dans les tissus végétaux, et par conséquent, une colonisation immédiate de l'hôte et le développement de l'infection. Sur la plante entière, la nécrose de l'infection progresse plus lentement et progressivement, le résultat aurait été moins évident. Sur la base de ces résultats, les tests sur sections de tiges détachées pourraient être une option intéressante pour réaliser des études

d'interaction *A. vitis*-vigne au lieu de tests sur plante entière, non seulement parce qu'ils permettent une observation plus cohérente des niveaux intermédiaires d'infection que d'autres organes détachés, mais aussi parce qu'ils peuvent être réalisés rapidement et que les résultats peuvent être mesurés dans un laps de temps plus court ; de sept jours dans notre cas.

La méthode d'inoculation des sections détachées s'est avérée efficace pour évaluer l'activité de lutte biologique des souches bactériennes contre *A. vitis* et elle a permis de sélectionner des souches, qui réduisaient la nécrose de plus de 25%, exprimé par la souche CR2 envers la variété Gros noir, par rapport aux sections témoins non traitées par les suspensions bactériennes antagonistes. Il ressort de ce test que la souche *P. brassicacearum* CR2 s'est montrée la plus efficace, elle a permis la suppression de l'effet nécrotique local causé par les deux souches d'*A. vitis* sur les sections des rameaux verts des quatre variétés testées (Gros noir, Cinsault, Muscat et Ahmer Bouamer).

D'une manière générale, il est connu que les antibiotiques synthétisés par les souches antagonistes peuvent être impliqués dans l'inhibition de la croissance d'*A. vitis* et par conséquent la réduction ou la suppression de son effet nécrotique [225]. Plusieurs souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* sont connues pour la fonction de synthèse d'enzymes lytiques, impliquées dans la dégradation de différents métabolites du pathogène entre autres, la polygalacturonase et d'autres enzymes comme la chitinase [226]. Une analyse de la présence de ces composés chez les souches d'*A. vitis* étudiées, pourrait nous éclairer encore plus sur leur mécanisme d'action.

Les différentes variétés de vigne utilisées au cours de cette expérimentation ont répondu à l'inoculation des souches d'*A. vitis* d'une façon hétérogène. Rappelons que la variété Gros noir s'est révélée la plus sensible à l'effet nécrotique, suivie par la variété Ahmer Bouamer. Les variétés, Gros noir et Ahmer Bouamer se présentent comme plus sensibles à l'effet nécrotique des deux souches d'*A. vitis* tandis que les variétés Muscat et Cinsault montrent des nécroses moins évidentes. Cette différence de réaction peut être expliquée par la sensibilité des variétés de vigne envers les souches pathogènes, même si elles

sont toutes des cépages de *Vitis vinifera*, qui est une espèce connue comme susceptible à l'infection par *A. vitis* [227]. Cette sensibilité est due probablement à l'accumulation de composés chimiques structuraux chez les variétés résistantes, comme la déposition de papilles ou de structures épidermiques empêchant le processus d'infection par *Agrobacterium*. Cette inhibition peut se manifester au cours des premières étapes comme, l'attachement entre la cellule végétale et *Agrobacterium* spp. et/ou le transfert du pTi vers le noyau de la cellule hôte.

Par ailleurs, l'inoculation des sections de tiges de la vigne avec les souches antagonistes a conduit à l'apparition des brunissements sur les surfaces de ces sections (nécroses légères), expliquée par la sécrétion de molécules de défense telles que, les composés phénoliques à l'égard de la paroi cellulaire des microorganismes en général pathogènes et non pathogènes [159]. Ce résultat a été confirmé par la suite dans la partie dédiée aux molécules de défense du métabolisme secondaire des bactéries antagonistes, impliquées dans la résistance systémique.

3. Elicitation de l'induction de la résistance systémique par les bactéries antagonistes chez le pathosystème *Agrobacterium tumefaciens* - tomate

Les résultats obtenus à travers l'étude d'antagonisme *in planta*, nous ont permis de constater une diminution du symptôme de la galle du collet au niveau des plantules de tomate trempées dans la suspension bactérienne d'antagoniste, comparés aux témoins. En effet, la réduction de la taille des tumeurs induite par les *Agrobacterium* sur les tiges des plants de tomate, ne peut être due à un effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* contre l'agent pathogène, puisque les antagonistes et les bactéries pathogènes ont été inoculés à des moments et des sites différents. En fait, les antagonistes ont été utilisés pour stimuler les semences avant le semis, tandis que les agrobactéries ont été inoculées plus tard, sur la tige des plantules. Une réaction antagoniste se produit lorsqu'il y'a une interaction directe entre le microorganisme pathogène et antagoniste, et nous avons supposé dans notre cas que dans notre expérience,

les souches antagonistes et les agrobactéries tumorigènes n'interagissaient pas directement et simultanément.

La séparation spatiale, entre l'agent pathogène inoculé au niveau de la tige (*Agrobacterium* spp.) et les antagonistes (les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas*) appliqués au niveau racinaire, confirme que la réduction du symptôme de la galle du collet est une conséquence de l'induction de la résistance systémique chez la plante. Des résultats similaires ont été décrits chez différents pathosystèmes : *P. fluorescens* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceri* sur le pois chiche, *P. putida* BTP1 chez le haricot et *P. fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate [228 ; 229 ; 230 ; 231].

D'une manière générale, les bactéries PGPR, lorsqu'elles restent confinées au système racinaire des plantes sont toujours protectrices, quand le pathogène est inoculé dans la tige [232]. Puisque dans notre cas les antagonistes et les agrobactéries pathogènes ne se sont jamais trouvés en contact les uns avec les autres sur la plante, l'effet protecteur a dû être médié par la plante. Des observations similaires ont été rapportées lorsque plusieurs souches de PGPR ont été appliquées sur des racines de concombre, dont les feuilles ont ensuite été inoculées avec l'agent de l'antracnose fongique *Colletotrichum orbiculare* [233]. Le phénomène a été appelé résistance systémique induite (ISR). Apparemment, lors de la présente étude, les souches antagonistes utilisées ont déclenché une réaction dans les racines des plantes qui ont donné lieu à un signal qui se propage systématiquement dans toute la plante et renforce la capacité défensive des tissus éloignés à une infection ultérieure par l'agent pathogène *Agrobacterium* spp.

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 24 h des deux microorganismes (antagoniste/pathogène) se sont traduites par des moyennes 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 [234]. Contrairement, *in planta*, 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.

Le 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 [235]. Il est de 0 minute lors de la bioprotection contre la verticilliose de la luzerne par *Gliocladium roseum* comme rapporté par Millar *et al.*, [236] et de 48 h lorsque la bioprotection est faite par *Sinorhizobium meliloti* [237]. Le succès de cette protection dépend du moment de l'application de l'antagoniste. Ainsi, l'inoculation des plants de tomate avec les quatre bactéries (EPR3, CR2, OS1, OS4) bien avant les agrobactéries virulentes leur confère une protection intéressante. Ce délai, dans nos conditions expérimentales est de 24 h. Les plantes sont ainsi mises en alerte ou 'priming' suite à la reconnaissance de la bactérie, pour agir de manière systémique et plus rapidement par l'expression des gènes de défense et l'accumulation de produits inhibiteurs à l'égard du pathogène après sa perception.

Dans la présente étude, la pré-inoculation avec la bactérie antagoniste 24 h avant l'infection par le pathogène, semble induire par priming la production par la tomate et la vigne, d'une teneur seuil des métabolites impliqués dans sa résistance envers les *Agrobacterium* spp. testés. Il est possible que les composés inhibiteurs produits par les bactéries antagonistes sont bactériostatiques plutôt que bactéricides, puisque dans certains cas, la tumeur même si réduite de taille, était toujours là.

4. Chez *Bacillus* spp. et *P. brassicacearum*, des composés naturels induisent une résistance par un mécanisme de priming dans le pathosystème *Agrobacterium tumefaciens*-tomate

Dans plusieurs études, le mécanisme de défense résulte d'une multitude de changements physiologiques et biochimiques des plantes hôtes, incluant la production d'acide salicylique, des antibiotiques et l'induction de protéines apparentées à la pathogenèse ; la peroxydase, la polyphénol-oxydase et autres composés phénoliques [238]. Dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction antagoniste tomate- *A. tumefaciens*, des analyses

supplémentaires concernant la détection dans les tissus végétaux de différents composés impliqués dans l'ISR ont été effectuées. En général, les quatre antagonistes utilisés (CR2, EPR3, OS1, OS4) ont été capables d'induire certains mécanismes de défense dans la plante hôte, dont l'intensité dépendait de la combinaison de l'antagoniste unique avec les différentes souches d'*A. tumefaciens*. La synthèse des composés phénoliques dans les plants de tomate a été stimulée par la bactérisation des semences et aussi par l'infection des plantes par l'agent pathogène.

Nos résultats n'ont pas montré qu'il y avait une relation directe entre la réduction des symptômes et la teneur en composés phénoliques des tissus végétaux. En fait, toutes les souches antagonistes ont déterminé une réduction de la taille des galles sur les plants de tomate obtenus à partir des semences bactérisées, alors que la teneur en composés phénoliques dans les tissus végétaux dépendait des différentes combinaisons de souches antagonistes/pathogènes. Le développement de la tumeur était très probablement dû à de multiples interactions entre la plante, l'antagoniste et le pathogène et n'était pas strictement lié à la seule teneur en composés phénoliques des tissus végétaux. Par ailleurs, lors de cette étude, toutes les souches pathogènes ont induit une accumulation de composés phénoliques dans la tomate, mais dans certains cas, le niveau était significativement plus élevé chez les plantes obtenues par les semences bactérisées. Les résultats étaient différents selon la méthodologie utilisée pour détecter les composés phénoliques. En fait, les interactions OS4/E14 et EPR3/E17 ont déterminé le niveau le plus élevé de composés phénoliques exprimé en acide gallique, tandis que pour OS1/E14, il s'agissait de l'acide salicylique. L'acide gallique présente un potentiel d'oxydation plus faible que l'acide salicylique et les résultats du réactif Folin-Ciocalteu sont donc plus significatifs pour l'acide gallique que pour l'acide salicylique. Si les calculs sont effectués en utilisant l'acide gallique comme étalon standard comme préconisé par Everette et *al.* [239], il y aurait une dévaluation par défaut de la quantité des composés phénoliques analysés, alors que si l'acide salicylique a été utilisé, l'estimation serait plus reproductible et la quantification plus précise [239]. C'est pour ces raisons que l'estimation des composés phénoliques a été faite par rapport à deux étalons.

Les composés phénoliques sont connus pour jouer un rôle majeur dans les mécanismes de défense des plantes contre divers agents infectieux externes [240]. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'ISR sont différents de ceux de la résistance systémique acquise (SAR), qui est induite chez les plantes par une attaque de pathogènes [221]. Cela pourrait expliquer pourquoi la résistance systémique induite chez la tomate inoculée et traitée par la souche antagoniste EPR3, a conduit à un schéma de composés phénoliques différent de celui induit par *A. tumefaciens*.

De grandes quantités de composés phénoliques, de l'acide gallique et du kaempférol ont été détectées chez les plantes uniquement inoculées avec *A. tumefaciens* E17. Parallèlement, chez les plantes traitées par la souche *P. brassicacearum* EPR3 et inoculées avec *A. tumefaciens* E17, la quantité de ces deux composés phénoliques était nettement inférieure, tandis que la quercétine, l'antrone et l'acide oxalique augmentaient. La détection des anthrones chez les plantes a été décrite par Viljoen et al. [241] et par Vasil [242], elle a été trouvée dans les tissus végétaux d'*Aloe harlana* et son activité antimicrobienne et antioxydante a été évaluée *in vitro* contre 23 souches bactériennes et 4 souches fongiques [243]. Dans le cas de notre étude, les composés phénoliques ont été identifiés par comparaison avec le temps de rétention des étalons et les concentrations ont été calculées en comparant les surfaces des pics des échantillons avec les composés de référence utilisés dans les mêmes conditions d'élution. Nous avons trouvé de l'acide p-coumarique, mais nous n'avons pas trouvé l'étalon d'acide chlorogénique pour le détecter dans nos extraits. Nous avons comparé nos extraits avec les standards disponibles et récupérés.

Les composés phénoliques comme constituant principal des métabolites secondaires des plantes, représentent l'un des mécanismes de défense les plus importants contre les attaques des phytopathogènes [244]. Dans la présente étude, une accumulation des composés phénoliques a été observée dans les plantes traitées par les bactéries antagonistes ensuite infectées par les souches *A. tumefaciens*. Ces résultats concordent avec ceux de Benhamou et al. [245] qui ont rapporté qu'une bactérie endophyte *Serratia polymuthica* avait provoqué l'accumulation de composés phénoliques dans les racines de concombre et offert

une résistance à l'infection par le pathogène *Pseudomonas ultimum*. De même, Singh et al. [246] ont mentionné que l'application du *Trichoderma viride* augmentait la concentration de composés phénoliques chez les pois chiche qui induisait une résistance à *Macrophomina phaseolina*.

Dans un autre volet de ce travail de thèse, le traitement avec les bactéries antagonistes *Bacillus* spp. et *P. brassicacearum* a considérablement augmenté l'accumulation d'acide salicylique endogène chez les plantes attaquées par *A. tumefaciens*. L'acide salicylique est une phytohormone qui active les réponses de défense des plantes dans des interactions incompatibles [247]. En fait, son niveau dans les plantes saines est normalement faible, mais augmente rapidement lors de l'infection par des pathogènes. Par exemple, les plants de pêcher présentant une résistance accrue à *A. tumefaciens* ont montré des niveaux élevés d'acide salicylique après l'inoculation de l'agent pathogène. Une fois l'agent pathogène détecté, la plante amplifie la production d'acide salicylique et l'expression des gènes codant pour la sécrétion de protéines PR, ce qui conduit à l'établissement de la SAR [247]. Au cours de cette recherche, les résultats obtenus montrent que la teneur en acide salicylique était plus faible chez les plants de tomate sains par rapport à ceux traités avec des bactéries antagonistes et infectés par *A. tumefaciens*. Un tel phénomène a été décrit dans de nombreuses interactions plantes-microorganismes. A titre d'exemple, *P. fluorescens* était un puissant inducteur de résistance systémique chez de nombreuses espèces de plantes, mais l'ampleur de l'augmentation de l'acide salicylique différait selon l'espèce de pathogène et la méthode d'inoculation utilisée [248]. Il est possible que l'accumulation d'acide salicylique dans les plants de tomate par les souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* ait été impliquée dans le processus d'atténuation des symptômes induits par *A. tumefaciens*, comme rapporté par plusieurs études qui ont démontré que l'acide salicylique a un effet inhibiteur sur la virulence des agrobactéries [249 ; 119].

Pour affiner encore plus l'étude des métabolites impliqués, il était question également de montrer l'influence de l'interaction antagoniste-pathogène sur les mécanismes de défense chez les plants de tomate *via* l'étude de l'activité de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase. Nous avons opté pour l'analyse de la

polyphénol-oxydase et de la peroxydase comme marqueurs des réponses induites avec les composés phénoliques. Il est rapporté que la polyphénol-oxydase et la peroxydase sont des enzymes libérées par les plantes en réponse à des dommages cellulaires comme décrit par Michalak [250] et par Ashry et Mohamed [251] et sont impliquées dans plusieurs processus associés à la défense des plantes contre les agents pathogènes [108]. Ces deux enzymes sont capables d'oxyder les polyphénols en quinones, toxiques pour *Agrobacterium* et leur activité antimicrobienne, détermine un brunissement important des tissus végétaux et une mort cellulaire partielle qui empêchent le processus d'infection par *Agrobacterium* [252].

Dans la présente étude, l'activité accrue de la peroxydase dans les plants de tomate dont les semences ont été stimulées, peut être liée à une protection médiée par les souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum*. Nos résultats sont en concordance avec plusieurs travaux, qui ont rapporté que les *Pseudomonas* spp. augmentent le taux de la peroxydase et la polyphénol-oxydase, la β -1,3-glucanase et les composés phénoliques chez le pois chiche inoculé par le *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* comme montré par Dutta et al. [253] et la tomate infectée par l'*Alternaria solani* [254].

Les résultats de cette étude montrent également que l'activation de la peroxydase a été corrélée avec l'augmentation du taux de composés phénoliques chez les plantes traitées par les bactéries antagonistes. Une élévation de l'activité de la peroxydase chez les plants de tomate, traitées avec des souches de *P. fluorescens* et des espèces de *Bacillus*, a également été observée chez le coton contre le ver des capsules [255]. Diverses études ont rapporté que *P. fluorescens* induit la production de l'enzyme peroxydase en réponse à l'attaque de l'agent pathogène [256]. Il est à noter que, la stimulation de l'activité peroxydase indique la tolérance au stress et l'intensité du stress auquel les plantes traitées sont exposées. Dans ce même contexte, il est cité que des niveaux plus élevés de peroxydase ont été corrélés à une augmentation de l'ISR chez de nombreuses espèces végétales [257].

D'autre part, l'activité de la polyphénol-oxydase lors de cette étude était sensiblement variable en fonction de la souche d'*A. tumefaciens*. En fait, trois des quatre souches antagonistes utilisées, ont augmenté l'activité de la polyphénol-oxydase chez les plantes inoculées avec les souches d'*A. tumefaciens* C58 et E14, plus que les deux souches pathogènes seules. L'inoculation de la souche *A. tumefaciens* E17 sur des plantes non traitées a fortement stimulé l'activité de la polyphénol-oxydase, qui a été considérablement réduite chez les plantes traitées par les souches antagonistes. Ces résultats concordent avec Boukerma et al. [231], dont la souche antagoniste *P. fluorescens* N21.4 n'a pas stimulé l'activité de la PPO, ces mêmes auteurs ont noté une forte activité de la PPO chez les plantes de tomate prétraitées avec l'agent pathogène.

Nos résultats indiquent une augmentation graduelle de l'activité de la polyphénol-oxydase et les valeurs les plus élevées ont été obtenues 15 jours après l'inoculation. Comme pour la peroxydase, une activité accrue de la polyphénol-oxydase a été observée chez les plantes traitées avec des espèces de *P. brassicearum* et de *Bacillus* lors d'une inoculation avec la bactérie pathogène *A. tumefaciens*. Nos résultats corroborent avec ceux de Rajendran et Samiyappan [258] qui ont montré que les enzymes de défense antioxydantes sont fortement induites et exprimées chez les plantes bactérisées, en réponse aux infections pathogènes.

La polyphénol-oxydase est impliquée dans la cicatrisation des plaies issues de l'attaque par l'agent pathogène et plusieurs autres processus cellulaires, tels que le contrôle des niveaux d'oxygène dans les chloroplastes [259]. Dans d'autres études, le rôle critique de la polyphénol-oxydase a été mentionné dans la résistance aux maladies du fait que sa suppression engendre la susceptibilité à *P. syringae* [260]. En outre, la polyphénol-oxydase est impliquée dans les réactions secondaires de quinones qui conduisent à la formation de pigments bruns ou noirs, qui sont responsables d'une perte importante de produits post récolte [261].

Les plantes sont capables de se protéger contre les agents phytopathogènes en produisant une large gamme de composés antimicrobiens

parmi lesquels les enzymes telles que la peroxydase et la polyphénol-oxydase. La biosynthèse de ces enzymes joue un rôle crucial dans la détermination du degré de résistance de l'hôte chez les plantes stimulées [262]. Nos résultats montrent que l'accumulation plus précoce et plus importante des composés phénoliques et d'enzymes de défense, à savoir la peroxydase et la polyphénol-oxydase chez les plants de tomate dont les semences ont été traités par les endophytes bactériens, sont fortement liées aux caractéristiques des antagonistes (espèce, souche), des agents pathogènes (origine, virulence) et à l'interaction de ces facteurs.

La présente étude montre l'induction de la résistance systémique (ISR) par les bactéries antagonistes chez le pathosystème *A. tumefaciens*-tomate. Le traitement des plantes avec les souches de *Bacillus* spp. et *P. brassicearum* a considérablement amélioré les niveaux des marqueurs biochimiques, à savoir les composés phénoliques, la peroxydase et la polyphénol-oxydase chez la tomate, ce qui a entraîné une réduction significative de l'infection par les agents tumorigènes d'*A. tumefaciens*.

L'induction de la résistance peut offrir des perspectives d'une gestion durable pour protéger les cultures en utilisant un phénomène existant dans la plante, sa propre résistance. Induire et renforcer les mécanismes de défense propres d'une plante (ISR) en appliquant les microorganismes phytobénéfiques, est une nouvelle stratégie en matière de gestion des bioagresseurs. 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.

CONCLUSION GÉNÉRALE
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans l'objectif de répondre à des préoccupations d'ordre pratique concernant la lutte contre le crown gall, nous avons étudié lors de cette présente recherche en premier lieu, l'efficacité *in vitro* et *in planta* des souches antagonistes de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas brassicacearum* dans le contrôle d'*Agrobacterium* spp. pathogènes impliqués dans la maladie de la galle du collet. En second lieu, nous avons montré le rôle de ces antagonistes bactériens en tant que protecteurs potentiels contre des souches pathogènes d'*A. tumefaciens*. Leur efficacité comme stimulateurs de la défense naturelle avec preuve d'accumulation des composés phénoliques et en particulier, l'acide salicylique et leurs capacités à améliorer la biosynthèse des enzymes antioxydantes chez des plants de tomate, ont également été démontrées.

Les résultats d'antagonisme *in vitro* de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* ont révélé l'efficacité des souches étudiées à inhiber la croissance des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp. testées lors de cette recherche. En effet, leur grande capacité à réprimer la croissance bactérienne d'*Agrobacterium* a été mise en évidence selon les deux techniques de confrontation étudiées. Les zones d'inhibition allant jusqu'à 40 mm ont été enregistrées suggérant que plusieurs substances antibactériennes ont participé à leur activité. Une analyse fine des substances actives des antagonistes et la caractérisation des gènes responsables de la synthèse de ces composés, constituent la finalité de cette recherche afin d'aboutir à une analyse quasi complète de la propriété antagoniste. En outre, nos résultats indiquent aussi, que parmi les bactéries les plus actives du genre *Bacillus*, la souche *B. methylotrophicus* OS4 a montré un fort pouvoir antagoniste *in vitro* vis-à-vis des souches pathogènes d'*Agrobacterium* testées.

Les résultats obtenus à travers l'étude d'antagonisme *in planta*, nous ont permis de constater une diminution et même un retard dans l'apparition des symptômes de la galle du collet au niveau des plantes hôtes trempées dans la suspension bactérienne des antagonistes testées, comparés aux témoins. La bactérisation avec chacune des souches antagonistes séparément : *B. cereus* OS1, *B. methylotrophicus* OS4 et *P. brassicacearum* (EPR3, CR2) a limité l'expression des souches d'*Agrobacterium*, qui s'est traduite par une réduction

importante de la taille des galles formées sur la tige des plantules de la tomate et de la vigne.

La seconde partie de ce travail consacrée à l'évaluation des souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* dans la suppression de l'effet nécrotique d'*A. vitis* a montré une action efficace des antagonistes testés. Les résultats de cette étude ont confirmé le pouvoir antagoniste des quatre souches testées envers les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* spp. avec inhibition de la croissance des pathogènes *in vitro* et réduction des effets nécrotiques et tumorigènes *in planta*. La souche CR2 de *P. brassicacearum* s'est montrée la plus efficace, elle a permis la suppression de l'effet nécrotique local causé par les deux souches d'*A. vitis* sur les sections des rameaux verts des quatre variétés testées (Gros noir, Cinsault, Muscat et Ahmer Bouamer). Une analyse de la présence des composés chez les souches étudiées pourrait nous éclairer encore plus sur les molécules qui répriment l'effet nécrotique d'*A. vitis*. Par ailleurs, la méthode d'inoculation des sections détachées s'est avérée efficace et rapide pour évaluer l'activité de lutte biologique des souches bactériennes contre *A. vitis* et pourrait être une option intéressante pour réaliser des études d'interaction *A. vitis*-vigne au lieu de tests sur plante entière.

Pour conclure les résultats obtenus de la première partie de ce travail, nous pouvons avancer que la séparation spatiale entre les agents pathogènes (*Agrobacterium* spp.) inoculés au niveau de la tige et les bactéries endophytes étudiées (CR2, EPR3, OS1, OS4) appliquées au niveau racinaire, confirme que la réduction de la maladie est une conséquence de l'induction de la résistance systémique chez la plante.

Dans le but de mieux comprendre les réponses de défense de l'hôte (tomate) et en complément à cette étude, nous avons procédé à l'analyse de la production des composés phénoliques et de l'acide salicylique. La recherche des activités enzymatiques de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase, suite à la bactérisation des plantules de tomate par les souches antagonistes et/ou à l'inoculation des souches pathogènes a été également entreprise.

En général, les traitements par les souches antagonistes ont montré une augmentation du simple au double, des valeurs des paramètres de défense comparés aux témoins non traités. Les quatre antagonistes utilisés ont été capables d'induire des mécanismes de défense dans la plante hôte dont l'intensité

était variable et dépendait de la combinaison de l'antagoniste unique avec les différentes souches d'*A. tumefaciens*.

La synthèse des composés phénoliques chez les plants de tomate a été stimulée par la bactérisation des semences et aussi par l'infection des plantes par l'agent pathogène. Toutes les souches pathogènes ont induit une accumulation de composés phénoliques, mais dans certains cas, le niveau était significativement plus élevé chez les plantes dont les semences ont été bactérisées.

Par ailleurs, la caractérisation des composés phénoliques a permis de mettre en évidence, en plus de l'acide salicylique, d'autres composés phénoliques, à savoir, l'acide gallique, le kaempférol, la quercétine et deux composés non phénoliques à savoir, l'antrone et l'acide oxalique. Selon les valeurs de réponse, des quantités importantes de composés phénoliques de l'acide gallique et du kaempférol ont été détectées chez les plantes inoculées avec la souche *A. tumefaciens* E17 seule. Chez les plantes traitées par la souche *P. brassicacearum* EPR3 et inoculées avec *A. tumefaciens* E17, la quantité de ces deux composés phénoliques était inférieure, tandis que la quercétine, l'antrone et l'acide oxalique augmentaient.

Les résultats obtenus suite à l'analyse de l'acide salicylique, ont démontré que le traitement avec les bactéries *Bacillus* spp. et *P. brassicacearum*, a considérablement augmenté l'accumulation d'acide salicylique endogène chez les plantes attaquées par *A. tumefaciens*. Les valeurs en SA les plus élevées ont été détectées au 6^e jour après l'inoculation pour tous les traitements analysés. La combinaison de l'antagoniste EPR3 avec E17 a déterminé le plus haut niveau d'accumulation d'acide salicylique chez les plants de tomate. De ce fait, le travail réalisé au cours de cette thèse, a permis de démontrer que l'acide salicylique a une part d'implication dans le processus d'atténuation des symptômes induits par *A. tumefaciens*, comme rapporté par plusieurs études, qui ont démontré que l'acide salicylique a un effet inhibiteur sur la virulence des agrobactéries.

D'autre part, nos résultats ont indiqué une augmentation graduelle des enzymes antioxydantes. Les activités de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase ont été les plus marquées chez les plantes traitées avec les espèces de *P. brassicacearum* et de *Bacillus*, 15 jours après inoculation avec la bactérie pathogène d'*A. tumefaciens*. Il ressort de cette étude que le traitement des plants

de tomate avec les souches antagonistes, a considérablement amélioré les niveaux de marqueurs biochimiques, à savoir les composés phénoliques, la peroxydase et la polyphénol-oxydase, impliqués dans l'ISR du pathosystème *Agrobacterium tumefaciens*-tomate. Cet apport nous permet de conclure que les souches de *Bacillus* spp et de *P. brassicacearum* ont montré leur potentiel en biocontrôle selon deux schémas ; lorsque l'interaction entre l'antagoniste et le pathogène est rapprochée ou bien lorsqu'ils sont distants l'un de l'autre.

La stimulation des réactions de défense chez la tomate a été associée à un déclenchement impliquant les composés phénoliques, l'acide salicylique et les activités des enzymes antioxydantes. D'autres molécules intéressantes à identifier, seraient également médiées dans la réponse de défense.

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que les souches de *Bacillus* spp. et de *P. brassicacearum* étudiées ont les mêmes propriétés que les PGPR, du moment qu'ils couvrent les mécanismes d'action de ces organismes. Ils intègrent à la fois des mécanismes de biocontrôle par activation de ISR, l'inhibition de l'agent pathogène et la biostimulation de la croissance végétale (décrite dans d'autres travaux parallèles). Ils constituent des candidats potentiels pour la bioprotection contre la maladie de la galle du collet, tout en intégrant d'autres mesures de lutte. 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.

Ce modeste travail constitue un modèle pour d'autres recherches à l'avenir, pour la sélection d'autres agents candidats de lutte biologique. Enfin, bien que cette étude a contribué à éclaircir quelques aspects phytopathologiques et de biocontrôle des bactéries antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes d'*Agrobacterium* spp., elle n'a fait qu'entamer une série de recherches envisageables, qu'il serait nécessaire de mener à l'avenir.

Pour une meilleure exploitation des résultats obtenus, il est intéressant de poursuivre ce travail dans une optique plus fine en abordant les objectifs suivants :

- La recherche et le séquençage de gènes de défense et l'identification des éliciteurs pourraient dévoiler les aspects sous-jacents de biocontrôle des souches étudiées.

- Des études sont également nécessaires pour déterminer les formulations efficaces, la densité d'inoculum des antagonistes à appliquer et la meilleure forme d'introduction dans l'hôte.
- Des études sur le terrain doivent être menées, pour analyser le potentiel réel de ces bactéries antagonistes dans les conditions du champ.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Shao H. Guo Q., Chu L. Zhao, X. Su, Z. Hu Y. and Cheng J. (2007).** Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids surf B Biointerfaces*, 54, 37-45.
- [2] **Savary Serge Laetitia Willocquet ,Sarah Jane Pethybridge, Paul Esker , Neil McRoberts , Andy Nelson (2019).** The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology et Evolution* vol 3 (3):430-439. doi: 10.1038/s41559-018-0793-y.
- [3] **Agrios G. (2005).** *Plant Pathology. Fifth Edition*
- [4] **Poueymiro M. (2009).** Caractérisation fonctionnelle des effecteurs de type III de *Ralstonia solanacearum* AvrA et PopP1, délimitant le spectre d'hôte et RipTPS, synthétisant une molécule signal chez les plantes. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse.
- [5] **Yong J. M., Allen C., Coutinho T., Denny T., Elphinston J., Fegan M., Gillings M., Gottwald T. R., Graham J. H., Iacobellis N. S., Janse J. D., Jacques M.-A., Lopez M. M., Morris C. E., Parkinson N., Prior P., Pruvost O., Rodrigues Neto J., Scortichini M., Takikawa Y., And Upper C. D. (2008).** Plant-Pathogenic Bacteria as Biological Weapons –Real Threats? *The American Phytopathological Society*. Vol. 98, No. 10, 2008, PP: 1060-1065.
- [6] **Zoina, A., Raio, A. (1999).** Susceptibility of some peach rootstocks to crown gall. *J.Plant. Pathol.* 81, pp: 181-157
- [7] **Kado, C. I. (2014).** Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00340>
- [8] **Burr T.J., Bazzi C., Süle S. and Otten L. (1998).** Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies; *Plant Disease* 82: 1288–1297.
- [9] **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. *Plant Pathol.*, 11, 901–908.
- [10] **Krimi, Z., Benkacimi, A. (2009).** Detection of *Agrobacterium vitis* in Algerien grapevine propagation material Laboratoire de Phyto-bacteriologie, Département

des Sciences Agronomiques, Université Saad Dahlab, Blida, 09000, Algeria. Microbiol. 68:3358-3365.

[11] **Krimi Z., Raio A., Petit A., Nesme X., and Dessaux Y. (2006).** *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. European Journal of Plant Pathology. vol. 116. pp: 237-246.

[12] **Limanska N. (2012).** Prevention of grape crown gall. Microbiology and Biotechnology 1 (17): 6-21.

[13] **Blancard D. (2013).** *Agrobacterium tumefaciens* (Tumeur bactérienne du collet). ephytia. INRA.

[14] **Achbani E. Habbadi K. (2017).** La lutte biologique contre *Allorhizobium Vitis*, agent causal du crown gall de la vigne est-elle possible ? INRA.

[15] **Bazzi C., Alexandrova M., Stefani E., Anaclerio F., Burr T.J. (1999).** Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic agrobacteria // *Vitis*. – Vol. 38, № 1. – P. 31–35

[16] **Kerr A. (1972).** Biological control of crown gall: Seed inoculation. Journal of Applied Bacteriology. 35: 493-497.

[17] **Moore, L.M. (1979).** Practical use success of *Agrobacterium radiobacter* strain 84 of crown gall control. in : Soil-Borne Plant Pathogens (Schippers, B . , and Grams, W. eds.) Academic Press, NY, pp : 553-568

[18] **Krimi Z. (1990).** La lutte biologique contre le crown gall en Algérie : Efficacité de la souche bacteriocinogène K84 et isolement de nouveaux antagonistes bactériens. Mémoire de magister. I.N.A. Alger. 97p.

[19] **Kawaguchi A., Inoue K. and Ichinose Y. (2008).** Biological control of crown gall of grapevine, rose and tomato by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. Phytopathology 98 (11): 1218- 1225.

[20] **Rhouma A., Bouri M., Boubaker A. and 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 (3): 517-526

[21] **Choudhary D.K., Prakash A., Wray V., and Johri B.N. (2009).** Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. Current Science, 97, (2), pp170-179.

[22] **Krimi Z., Alim D., Djellout H., Tafifet L., Mohamed-Mahmoud Raio A. (2016).** Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of

Agrobacterium spp., *Pectobacterium spp.*, and promote growth of tomato plants. *Phytopathologia Mediterranea* 55, 2, 184–196.

[23] **Shafi Jamil, Hui Tian & Mingshan Ji. (2017).** *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review ; agriculture and environmental biotechnology. *Biotechnology & biotechnological equipment*, 2017 Vol. 31, NO. 3, 446–459 <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>

[24] **Jourdan E., Ongena M. et Thonart P. (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*. 12(4): 437-449.

[25] **Djellout H. (2011).** Identification et sélection d'antagonistes bactériens induisant une résistance systémique vis-à-vis *Agrobacterium spp.* l'agent du crown gall des arbres fruitiers et de la vigne. Mémoire de magister phytopathologie. Université de Blida.

[26] **Tafifet, L., Raio, A., Holeva, M.C. et al. (2020).** Molecular characterization of Algerian *Erwinia amylovora* strains by VNTR analysis and biocontrol efficacy of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum* antagonists. *Eur J Plant Pathol* **156**, 867-883 <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01938-6>

[27] **Mousavi S. A., Willems A., Nesme X., de lajudie P., Lindstrom K. (2015).** Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.0>

[28] **Young JM. (2008).** *Agrobacterium*-Taxonomy of Plant-Pathogenic Rhizobium Species. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. New York, NY: Springer New York, 183–220.

[29] **Nester E. W. (2014).** *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front. Plant Sci.* 5:730. [10.3389/fpls.2014.00730](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730), PMID

[30] **Bouzar, H., Moore, L.W. (1987).** Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tall grass prairie. *Appl Environm Microbiol.* 53: 717- 721 from other chromosomal groups by differential acid production. *Letters in Applied Microbiology*.

[31] **Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., and Vivanco, J.M. (2003).** Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* **132**: 44–51.

- [32] **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. *Applied and Environmental Microbiology*.68:3358–3365.
- [33] **Krimi Z. (2001).** Crown gall on *Eucalyptus occidentalis* seedlings. New and unusual records. *OEPP/EPPO bulletin* 31, 111-117.
- [34] **Zhu, J. et al. (2000).** The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182, 3885–3895
- [35] **Pitzschke A. (2013).** *Agrobacterium* infection and plant defense-transformation success hangs by a thread. *Frontiers in Plant Science- Plant Microbe Interaction*. V. 4 - Article 519 p 1-12.
- [36] **Shih P., Chou S., Muller C., Halkier B., Deeken R. and Lai E. (2018).** Differential roles of glucosinolates and camalexin at different stages of *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular plant pathology*. 19(8), 1956–1970.
- [37] **Nonaka S., Someya T., Zhou S., Takayama M., Nakamura K., Ezura H. (2017).** An *Agrobacterium tumefaciens* strain with gamma-aminobutyric acid transaminase activity shows an enhanced genetic transformation ability in plants. *Sci. Rep.* 7:42649. 10.1038/srep42649,
- [38] **Leonard S., Hommais F., Nasser W., Reverchon S. (2017).** Plant-phytopathogen interactions: bacterial responses to environmental and plant stimuli. *Environ. Microbiol.* 19, 1689–1716.
- [39] **Pitzschke A. and Hirt H. (2009).** Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiol.* 149, 606–615. doi:10.1104/pp.108.131557
- [40] **Xu, X.Q., and Pan, S.Q. (2000).** An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis. *Mol. Microbiol.* 35: 407–414.
- [41] **Lee Chil-Woo, Efetova Marina, Engelmann Julia, Kramell Robert, Wasternack Claus, Ludwig-Muller Jutta, Hedrich Rainer and Deeken Rosalia (2009).** *Agrobacterium tumefaciens* Promotes Tumor Induction by Modulating Pathogen Defense in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, Vol. 21: 2948–2962.
- [42] **Veena, Jiang, H., Doerge, R.W., and Gelvin, S.B. (2003).** Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces

expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J.* 35: 219–236.

[43] **Zupan, J. et al. (2000)**. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23,11–28.

[44] **Gohlke Jochen and Deeken Rosalia (2014)**. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science|Plant-Microbe Interaction*. April 2014|Volume 5|Article 155|2

[45] **Xiu Q. Xu and Shen Q. Pan (2000)**. An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis. *Molecular Microbiology* 35(2), 407±414

[46] **Binns A.N. and Costantino P. (1998)**. The *Agrobacterium* oncogenes, in *The Rhizobiaceae*, eds H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J.Hooykaas (Netherlands: Springer),251–266.

[47] **Dessaux Y, Petit A, Farrand SK, Murphy PJ. (1998)**.Opines and opine-like molecules involved in plant-*Rhizobiaceae* interactions. In: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ, editors. *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;. pp. 173–197.

[48] **Oger P, Petit A, Dessaux Y (1997)**. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nat Biotechnol* 15: 369-372

[49] **Vizitiu B.D. and Dejeu L. (2011)**. Crown gall (*Agrobacterium* spp.) and grapevine. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 15 (1): 130- 138.

[50] **Rodriguez-Palenzuela P., Burr T.J. and Collmer A. (1991)**. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* Biovar-3. *Journal of Bacteriology* 173: 6547–6552

[51] **Herlache T.C., Zhang H.S., Reid C.L., Carle S., Zheng D., Basaran P., et al. (2001)**. Mutations that affect *Agrobacterium vitis*-induced grape necrosis also alter its ability to cause a hypersensitive response on tobacco. *Phytopathology* 91: 966–72.

[52] **Burr TJ, Katz BH. (1984)**. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Disease* 68: 976-978

[53] **Vigouroux A. (2013)**. Etude structurale de protéines périplasmiques d'*Agrobacterium tumefaciens* impliquées dans la virulence chez les plantes. Thèse de doctorat pour l'École Pratique des Hautes Études. P 9.

- [54] **Sharma A., Gupta A.K., Khosla K. and Mahajan R. (2017).** Antagonistic potential of native agrocin-producing non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* strain UHFBA-218 to control crown gall in peach. *Phytoprotection-Quebec- 97* (1):1-53. DOI: 10.7202/1040509ar
- [55] **Nürnberg T, Lipka V. (2005).** Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol*, 6: 335–345.
- [56] **DURRANT, W. AND DONG, X. (2004).** Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopahtol.* 42:185-209.
- [57] **Miranda M, Ralph SG, Mellway R, White R, Heath MC, Bohlmann J, Constabel CP. (2007).** The transcriptional response of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to infection by *Melampsora medusae* leaf rust involves induction of flavonoid pathway genes leading to the accumulation of proanthocyanidins. *Mol. Plant Microbe Interact*, 20: 816-831.
- [58] **Heath MC. (2000).** Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol*, 44: 321-334.
- [59] **Jones JDG, Dangl JL. (2006).** The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- [60] **Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez EP, et al. (2007).** *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J*, 26:1434–43.
- [61] **Charline M. and C. Baron. (2018).** Bases moléculaires de l'infection de plantes par *Agrobacterium tumefaciens* via un système de sécrétion de type IV. *Biochemistry and Cell Biology*. 33p
- [62] **Nürnberg T, Lipka V. (2005).** Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol*, 6: 335–345
- [63] **Torres MA, Jones JDG, and Dangl JL. (2006).** Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141: 373-378.
- [64] **Apel K, Hirt H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55:373–99.
- [65] **Lee SC, Hwang BK. (2005).** Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. *Planta*, 221: 790-800.

- [66] **Gechev TS, Hille J. (2005)**. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *Cell Biol*, 168 : 17-20.
- [67] **Cona A, Rea G, Botta M, Corelli F, Federico R, Angelini R. (2006)**. Flavin-containing polyamine oxidase is a hydrogen peroxide source in the oxidative response to the protein phosphatase inhibitor cantharidin in *Zea mays* L. *J Exp Bot*, 57: 2277-2289.
- [68] **Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gutrella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J. (1994)**. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266: 1247-1250.
- [69] **Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J. (1993)**. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- [70] **Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF (2009)**. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177-206
- [71] **Vidhyasekaran P. (2015)**. *Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity*. Springer Netherlands.
- [72] **Hunt MD, Ryals JA. (1996)**. Systemic acquired resistance signal transduction. *Crit Rev Plant Sci*, 15: 583-606.
- [73] **Walters Dale R., Jaan Ratsep and Neil D. Havis. (2013)**. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*. 1-18 doi:10.1093/jxb/ert026.
- [74] **Loake G, Grant M. (2007)**. Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 466-472.
- [75] **Fu ZQ, Dong X. (2013)**. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu Rev Plant Biol* 64: 839-863.
- [76] **Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL. (2007)**. Induced Plant Resistance and Salicylic Acid: A Review. *App. Biochem. Microbiol*, 43: 367-373.
- [77] **Hammerschmidt, R., Smith-Becker, J. A. (2000)**. The role of salicylic acid in disease resistance. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* (Eds: Slusarenko, A., Fraser, R. S. S., Van Loon, L. C.), Pp. 37-53, Kluwer Academic Publisher.
- [78] **Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA. (1998)**. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a

developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol*, 117:465-472.

[79] **Cameron RK, Paiva NL, Lamb CJ, Dixon RA. (1999).** Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 55: 121–130.

[80] **Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G, et al. (2000).** Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cell. *Plant Cell*, 12: 165–178.

[81] **Chen Z, Silva H, Klessig DF. (1993).** Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886

[82] **Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP. (2001).** The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol*, 13: 63-68.

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

[84] **Yan Z, Reddy MS, Ryu C-M, McInroy JA, Wilson M, Kloepper JW. (2002).** Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growthpromoting rhizobacteria. *Phytopathol*, 92: 1329–1333.

[85] **Höfte M, Bakker PAHM. (2007).** Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. In *Soil biology: Microbial siderophores*. Varma, A., and Chincholkar, S.B. (ed.) Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin, pp. 121-133.

[86] **Ryu CM, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW. (2003).** Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phyto*, 160: 413-420.

[87] **Glazebrook J. (2005).** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 43: 205–227.

[88] **Mansfield JW. (2000).** Antimicrobial compounds and resistance: the role of phytoalexins and phytoanticipins. In *Mechanisms of Resistance to Plant*

Diseases, A. Slusarenko, R.S.S. Fraser and L.C. van Loon, eds (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands), pp. 325–370.

[89] **Dixon RA. (2001)**. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411: 843–847.

[90] **Crozier A, Clifford MN, Ashihara H (2006a)**. Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet (eds Crozier A, Clifford MN, Ashihara H). Blackwell Publishing Ltd., 353 pp.

[91] **ROYER M. (2013)**. Etude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs en Sciences Agronomiques. Thèse, doc, Université de Lorraine – INRA.

[92] **Blande JD, Glinwood R. (2016)**. Deciphering Chemical Language of Plant Communication (eds Blande JD, Glinwood R). Springer, 326 pp.

[93] **Schrader J, Bohlmann J. (2015)**. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants., Vol. 148 (eds Schrader J, Bohlmann J). Springer, 470 pp.

[94] **Matsuura H., Fett-Neto A.G. (1996)**. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. In: Plant Toxins (eds Gopalakrishnakone P, Carlini CR, Ligabue-Braum R), pp. 1–15. Springer.

[95] **Ferrat L, Pergent-Martini C, Roméo M (2003)**. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology*, **65**, 187–204.

[96] **Treutter D. (2006)**. Significance of flavonoids in plant resistance, a review. *Env. Chemistry Letters*, 4:147–157.

[97] **Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2006b)**. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet (eds Crozier A, Clifford MN, Ashihara H), p. 372. Blackwell Publishing Ltd.

[98] **Walker JC, Link PK, Angell HR. (1929)**. Chemical aspects of disease resistance in the onion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 15: 845–850.

[99] **Curir P, Dolci M, Lanzotti V, Taglialatela-Scafati O. (2001)**. Kaempferide triglycoside, a possible factor of resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus*) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytochemistry*, 56: 717–721.

- [100] **Bostock, RM, Wilcox SM, Wang G, Adaskaveg JE. (1999).** Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 54: 37–50.
- [101] **Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A. and Schulze-Lefert, P. (2009).** A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, 323, 101–106.
- [102] **Smith C.J. (1996).** Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *New Phytologist* 132: 1-45
- [103] **Bednarek, P. (2012).** Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with function in plant immunity. *Chembiochem*, 13, 1846–1859.
- [104] **Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. (2006).** Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Ann. Rev. Phytopathol*, 44:135-162.
- [105] **Van Loon LC, Van Kammen A. (1970).** Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 199-211.
- [106] **Kombrink E, Somssich IE. (1997).** Pathogenesis-related proteins and plant defense. *Plant relationships*, 107-128.
- [107] **Scherer NM, Thompson CE, Freitas LB, Bonatto SL, Salzano FM. (2005).** Patterns of molecular evolution in pathogenesis related proteins. *Genetics and Molecular Biology*, 28: 645–653.
- [108] **Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barcelo A, Pedrenô MA. (2009).** Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 60: 377-390
- [109] **Diaz-Vivancos P, Rubio M, Mesonero V, Periago PM, Ros Barcelo A, Martinez-Gomez P, Hernandez JA. (2006).** The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *J. Exp. Bot*, 57: 3813–3824.

- [110] **El-Sayed M, Verpoorte R. (2004)**. Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, 44:53–58.
- [111] **Dunwell J. M., Gibbings J. G., Mahmood T., Saqlan Naqvi S. M. (2008)**. Germin and germin-like proteins: evolution, structure and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 27 342–375 10.1080/07352680802333938
- [112] **Laugesen S., Bak-Jensen K. S., Hägglund P., Henriksen A., Finnie C., Svensson B., et al. (2007)**. Barley peroxidase isozymes expression and post-translational modification in mature seeds as identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 268 244–253 10.1016/j.ijms.2007.06.003
- [113] **Beecher B. S., Carter A. H., See D. R. (2012)**. Genetic mapping of new seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 124 1463-1473. 10.1007/s00122-012-1801-2
- [114] **Gong C, Liu Y, S-y L, M-z C, Zhang Y, Wang R-h, H-y C, Li J-f, X-l C, A-xW(2017)**. Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to grey mould disease and identification of the key proteins induced in tomato fruit. *Postharvest Biol Technol* 123:83–93
- [115] **Ditt RF, Nester EW, Comai L (2001)**. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA*: 10954-10959
- [116] **Pitzschke A. and H. Hirt. (2010)**. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO J* 29:1021-1032
- [117] **Park Yong-Soon and Ryu Choong-Min (2015)**. Inter-organ defense networking: Leaf whitefly sucking elicits plant immunity to crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Signaling & Behavior*, 10:11, e1081325, DOI: 10.1080/15592324.2015.1081325
- [118] **Song GC, Lee S, Hong J, Choi HK, Hong GH, Bae DW, Mysore KS, Park YS, Ryu CM. (2015)**. Aboveground insect infestation attenuated belowground *Agrobacterium* -mediated genetic transformation. *New Phytol*; 207:148-58; PMID:25676198; <http://dx.doi.org/10.1111/nph.13324>
- [119] **Anand A, Uppalapati SR, Ryu CM, Allen SN, Kang L, Tang Y, Mysore KS. (2008)**. Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in

attenuating crown gall disease caused by *A. tumefaciens*. *Plant Physiol* 146: 703-715

[120] **Gershon, H., and Parmegiani, R. (1962)**. Antimicrobial activity of 8-quinolinols, salicylic acids, hydroxynaphthoic acids, and salts of selected quinolinols with selected hydroxy-acids. *Appl. Microbiol.* 10, 348–353.

[121] **Wang, D., Pajerowska Mukhtar, K., Culler, A.H., and Dong, X. (2007)**. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr. Biol.* 17, 1784–1790. doi:10.1016/j.cub.2007.09.025

[122] **Yuan ZC, Haudecoeur E, Faure D, Kerr KF, Nester EW. (2008)**. Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and γ -amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. *Cellular Microbiology.* 10:2339–2354.

[123] **Robinette, D. and Matthyse, A.G. (1990)**. Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 172, 5742 – 5749

[124] **Nonaka, S., Yuhashi, K., Takada, K., Sugawara, M., Minamisawa, K., and Ezura, H. (2008)**. Ethylene production in plants during transformation suppresses vir gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *New Phytol.* 178: 647–656.

[125] **Shah, J., and Zeier, J. (2013)**. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 4:30. doi: 10.3389/fpls.2013.00030

[126] **Schwessinger B, Zipfel C. (2008)**. News from the frontline: recent insights into PAMP triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 389-395

[127] **Pitzschke, A., Djamei, A., Bitton, F., and Hirt, H. (2009a)**. A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signaling. *Mol. Plant* 2, 120 - 137. doi: 10.1093/mp/ssn079

[128] **Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I., and Hirt, H. (2007)**. Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* 318, 453–456. doi:10.1126/science.1148110

- [129] **Hwang, H.H. and Gelvin, S.B. (2004).** Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell*, 16, 3148–3167.
- [130] **Citovsky, V., Kozlovsky, S.V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., et al. (2007).** Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell. Microbiol.* 9, 9–20.doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00830.x
- [131] **Petersen K., Fiil B. K., Mundy J. and Petersen M. (2008).** Downstream targets of WRKY33. *Plant Signal Behav.* 3 (11): 1033-1034. Doi: 10.4161/psb.6878
- [132] **Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. and Felix, G. (2004).** The N terminus of bacterial elongation factor Tu Elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* 16, 3496–3507.
- [133] **Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. and Felix, G. (2004).** The N terminus of bacterial elongation factor Tu Elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* 16, 3496–3507.
- [134] **Deng W, Pu X-A, Goodman RN, Gordon MP, Nester EW (1995).** TDNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 538--548.
- [135] **Somssich IE, Hahlbrock K (1998).** Pathogen defense in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3, 86--90.
- [136] **Hobbs, S.L.A., Jackson, J.A., Mahon, J.D. (1989).** Specificity of strain and genotype in the susceptibility of pea to *Agrobacterium tumefaciens*. - *Plant Cell Rep.* 8: 274-277.
- [137] **Mehdy MC. (1994).** Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, 105: 467–472.
- [138] **Wojtaszek P. (1997).** Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 322:681- 692.
- [139] **Finnegan J, McElroy D (1994).** Transgene inactivation: plants fight back! *Biotechnology* 12: 883--888.
- [140] **McKersie B. D. (1996).** Oxidative stress. <http://www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm>.

- [141] **Achbani El. H and Habbadi K. (2017)**. La lutte biologique contre *Allorhizobium vitis*, agent causal du crown gall de la vigne, est-elle possible ? Agriculture du Maghreb N°103- Avril 2017. p132-133
- [142] **Burr, T.J. and Otten, L. (1999)**. Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 53–80
- [143] **Waite H., Morton L. (2007)**. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathol.Mediterr.*46, 5-17.
- [144] **Tolba I.H. and Soliman M.A. (2013)**. Efficacy of native antagonistic bacterial isolates in biological control of crown gall disease in Egypt. *Annals of Agricultural Sciences* 48: 43-49.
- [145] **Kawaguchi A., K. Inoue and H. Nasu (2007)**. Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *Journal of General Plant Pathology* 73, 133–138.
- [146] **New PB, Kerr A. (1972)**. Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *Journal of Application Bacteriology* 35:279 –287. doi.org/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03699.x.
- [147] **Jones DA, Ryder MH, Clare BG, Farrand SK, Kerr A. (1988)**. Construction of a Tra deletion mutant pfpAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. *Mol Genet Genomics* 212:207–214. <https://doi.org/10.1007/BF00334686>.
- [148] (Frikha-Gargouri et al., 2017). **Frikha-Gargouri O, Ben Abdallah D, Ghorbel I, Charfeddine I, Jlaiei L, Triki MA, Tounsi S. (2017)**. Lipopeptides from a novel *Bacillus methylophilicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumors on tomato plants. *Pest Manag Sci* 73:568 –574. <https://doi.org/10.1002/ps.4331>.
- [149] **Khmel I.A., Sorokina T.A., Lemanova N.B., Lipasova V.A., Metlitski O.Z., Burdeinaya T.V. and Chernin L.S. (1998)**. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. *Biocontrol Science and Technology* 8: 45-57.
- [150] **Eastwell K.C., Sholberg P.L. and Saylor R.J. (2006)**. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Protection* 25:1191-1200.

- [151] **Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J., and Kunkel, B.N. (2007).** *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 20131–20136.
- [152] **Mercado-Blanco J, Bakker PAHM. (2007).** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92: 367-389.
- [153] **Bakker PAHM, Pieterse CMJ, Van Loon LC. (2007).** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97: 239-243.
- [154] **Djellout, H., Raio, A., Boutoumi, H. et Krimi Z. (2020).** *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. strains induce a response in phenolic profile and enhance biosynthesis of antioxidant enzymes in *Agrobacterium tumefaciens* infected tomato plants. *Eur J Plant Pathol* 157, 269–280. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01975-1>
- [155] **Mauch-Mani B., Baccelli I. (2016).** Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones. *plant Molecular Biology* 91 (6): 703-711. DOI: 10.1007/s11103-015-0406-y
- [156] **Errakhi R. (2008).** Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
- [157] **Roopa B., Maya C. and Makar H.K. (2012).** Effect of different PGPR strains along with *Rhizobium* on nodulation and chickpea productivity. *Asian Journal of Biological Sciences* 3: 424-426
- [158] **Osorio, N.W. (2007).** A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Revista Facultad Nacional de Agronomia, Medellín*, 60(1), 3621-3643
- [159] **Benhamou N, Rey P (2012).** Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. Principes de la résistance induite. *phyto* 92:1–23. Doi: 10.7202/1012399ar

- [160] **Ellis JG, Rafiqi M, Gan P, et al. (2009).** Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* 12: 399-405.
- [161] **Acharya K, Chakraborty N, Dutta A K, et al. (2011).** Signaling role of nitric oxide in the induction of plant defense by exogenous application of abiotic inducers. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 44: 1501-1511.
- [162] **Amelot N, Carrouche A, Danoun S, et al. (2011).** Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner. *Plant Cell Environ.* 34: 149-161.
- [163] **Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Ait Barka E. (2005).** Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Env. Microbiol.* 71: 4951–4959.
- [164] **Francis I, Holsters M, Vereecke D. (2010).** The Gram-positive side of plant–microbe interactions. *Environ Microbiol.* 12 (1) :1–12.
- [165] **Huang CJ, Tsay JF, Chang SY. et al. (2012).** Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest Manag Sci.*; 68: 1306-1310.
- [166] **Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Pare PW. (2004).** Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1017–1026.
- [167] **Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. (2007).** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol.* 9: 1084-1090
- [168] **Chaerle L, Lenk S, Hagenbeek D, et al. (2007).** Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *J Plant Physiol.* 164: 253-262.
- [169] **Brisset M-N., Cesbron S., Thomson S.V., Paulin J-P. (2000).** Acibenzolar-S-methyl Induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European journal of plant pathology* 106(6): 529-536. DOI: 10.1023/A: 1008728119087
- [170] **Maxson-Stein K., He S.Y., Hammerschmidt R. and Jones A. L. (2002).** Effet of treating apple trees with Acibenzolar- S Methyl on fire blight and

- expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Disease* 86(7): 785-790.
 Doi: 10.1094/PDIS.2002.86.7.785
- [171] **Babalola O.O. (2010)**. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32(11):1559–1570
- [172] **Enebe1 M. C. and Babalola O. O. (2019)**. The impact of microbes in the orchestration of plants' resistance to biotic stress: a disease management approach. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:9–25
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9433-3>
- [173] **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, 158 p.
- [174] **Moore L.W., Kado C.I. and Bouzar H. (1988)**. *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. New York, APS, Minnesota, USA. 158 p.
- [175] **Cabrefiga J. Bonaterra A. Montesinos E. (2007)**. Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Int Microbiol* 10:123–132
- [176] **Stonier L. (1960)**. *Agrobacterium tumefaciens* (Conn II). Production of antibiotic substance. *Journal of Bacteriology* 79: 880-898.
- [177] **Burr T.J., Katz B.H. and Bishop A.L. (1987)**. Populations of *Agrobacterium* in vineyard and non vineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Disease* 71: 617-620.
- [178] **Stewart E.L. and Wenner N.G. (2004)**. Grapevine decline in Pennsylvania and New York. *Wine East*, 32(2): 12-21, 51.
- [179] **Burr T.J. and Zheng D. (2012)**. Grape crown gall biological control by necrosis-minus mutants of non-tumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. Cornell University, New York, USA. College of Agriculture and Life Sciences.
- [180] **Belák Á. and Maráz A. (2015)**. Antagonistic Effect of *Pseudomonas* sp. CMI-1 on Foodborne Pathogenic *Listeria monocytogenes*. *Food Technol Biotechnol*. 53(2) : 223–230. doi: 10.17113/ftb.53.02.15.3731.
- [181] **Oslane I. El yousfi B. Ouabbou H. El younsi A. Et tellal R. (2014)**. Evaluation de la sévérité et de la tolérance d'une collection marocaine du blé dur

aux pourritures racinaires. Revue Marocaine de Protection des Plantes, 2014, N° 5: 17-30

[182] **Cooke B.M. (1998)**. Disease assessment and yield loss. In DG Jones (Ed.), the Epidemiology of plant disease. Kluwer Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 42-71.

[183] **Szegedi E. (1985)**. Host range and specific L(+) tartrate utilization of biotype 3 of *Agrobacterium tumefaciens*. Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae 20, 17–22.

[184] **Rapilly F. (1986)**. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Annales des épiphytes 19 (No. H.S). p 1-102.

[185] **Snatiago T. R., Grabowski C., Rossata M. and Romeiro R. S. (2015)**. Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. Biological control 80 (2015) 14-22.

[186] **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.

[187] **Dandurishvili, N., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Eliashvili, P., Giorgobiani, N. et al. (2010)**. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumors on tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*. 110 : 341-351.

[188] **Siddiqui I.A., Shahid Shaukat S., Imtiaz hussain S., Khan A. (2006)**. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. World journal of microbiology & biotechnology, 22 (6): 641-650.

[189] **Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965)**. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*.16:144-158.

[190] **Zieslin, N., Ben Zaken, R. (1993)**. Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol 31, Num 3, pp 333-339.

- [191] **Seskar, M., Shulaev, V., and Raskin, I. (1998).** Endogenous Methyl Salicylate in Pathogen-Inoculated Tobacco Plants. *Plant Physiology*. 116 (1): 387–392.
- [192] **Malamy J., Henning J. and Klessig Daniel F. (1992).** Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *The plant cell*. Vol 4, 359-366.
- [193] **Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M. and Kuc, J. (1982).** Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber of *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, 20: 73-82.
- [194] **Mayer, A. M., Harel, E. and Shaul, R. B. (1965).** Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5, 783-789.
- [195] **Bardin S.D., Huang H.C., Liu L. and Yanke L.J. (2003).** Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, sunflower, dry pea and sugar beet. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25 (3).
- [196] **Habbadi Kh., Benkirane R., Benbouazza A., Bouaichi, A., Maafa I., Chapulliot D., Achbani. E. (2015).** Biological Control of Grapevine Crown Gall Caused by *Allorhizobium vitis* using Bacterial Antagonists. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. Volume 6 Issue 6, June 2017. DOI: 10.21275/ART20174478
- [197] **Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M.I., Chulze, S. and Etcheverry, M. (2005).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* 156 (5-6):748-754.
- [198] **Emmert E.A.B. and Handelsman J., 1999.** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171: 1-9.
- [199] **Ongena, M. and Thonart, P. (2006).** Resistance Induced in Plants by Non-pathogenic Microorganisms: Elicitation and Defense Responses. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues*, edited by A. Jaime and T. d. Silva. Japan: GlobalScience Books.
- [200] **Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S.A. (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94 (11):1259-1266.

- [201] **Otten, L. Burr, T. Szegedi, E. (2008).** *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. In: Tzfira T, Citovsky V, eds. *Agrobacterium*: From Biology to Biotechnology. New York, USA: Springer, 1–46.
- [202] **Penyalver, R., and López, M. M. (1999).** Co-colonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and nonpathogenic strains K84 and K1026, used for crown gall biocontrol. 65:1936-1940
- [203] **Backert, S., Meyer, T.F. (2006)** Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 9(2), 207-217.
- [204] **Chowdappa P., Mohan Kumar S. P., Jyothi Lakshmi M. and Upreti K. K. (2013).** Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control* 65(1): 109-117. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.11.009
- [205] **Ge B., Liu B., Nwet T.T., Zhao W., Shi L., Zhang K. (2016).** *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, Has Potential Applications as a Biofertilizer or Biocontrol Agent. *PLoS ONE* 11(11) : e0166079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166079>
- [206] **Frikha-Gargouri O, Ben Abdallah D, Ghorbel I, Charfeddine I, Jlaiel L, Ali Triki M, et al. (2017b).** Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Pest Manag Sci.*73:568–74. 10.1002/ps.4331
- [207] **Nain, M. L., Yadav, R. C., and Saxena, J. (2012).** Characterization of Multifaceted *Bacillus* spp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semiarid deserts. *Appl. Soil Ecol.* 59, 124–135. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.08.001
- [208] **Hammami, I., A. Rhouma, B. Jaouadi, A. Rebai, and N. Xavier (2009).** Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:253-260.
- [209] **Peter C. Loewen, Jack Switala, W.G. Dilantha Fernando and Teri de Kievit (2014).** Genome Sequence of *Pseudomonas brassicacearum* DF41. *Genome Announc.* ; 2(3):e00390-14. Doi: 1.1128/genomeA.00390-14.
- [210] **Novinscak Amy, Vijay J. Gadkar, David L. Joly and Filion Martin (2016).** Complete Genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* LBUM30, a

disease-suppressive bacterium with antagonistic activity toward fungal, Oomycete and bacterial plant pathogens. *Genome Announc.* ; 4(1) : e01623-15. doi:10.1128/genomeA.01623-15

[211] **Allaire M. (2005)**. Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. pp 5-10.

[212] **Nemutanzhela, M.E, Roers, Y., Gardiner, N., Laloo, R. (2014)**. The use and benefits of bacillus based biological agents in aquaculture. In: Hernandez Vergara, M. (Ed.), Sustainable Aquaculture Techniques, Murcia, Spain.

[213] **Toklikishvili N, Dandurishvili N, Vainstein A, Tediashvili M, Giorgobiani N, Lurie S, Szegedi E, Glick BR, Chernin L. (2010)**. Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis*. *Plant Pathol* 59:1023–1030

[214] **Abbas A., Morrissey J.P., Marquez P.C., Scheehan M.M., Delany I.R., O’Gara F. (2002)**. Characterization of interaction between the transcriptional PhIF and its binding site at the PhIF promoter in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* 184, 3008-3016.

[215] **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.

[216] **Haas, D. and Keel, C. (2003)**. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*41:117-153.

[217] **Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. J. (2003)**. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, 157 (3):503-523. DOI:10.1046/j.1469-8137.2003.00686.x

[218] **Siddiqui I.A. (2001)**. Effect of microbial antagonists on *in vitro* growth of *Phytium aphanidermatum*. *Online Journal of Biological Sciences* 1 (4); 224-226.

[219] **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.

- [220] **Walters DR, Havis ND, Paterson L, Taylor J, Walsh DJ. (2011).** Cultivar effects on the expression of induced resistance in spring barley. *Plant Disease*, 95:595–600.
- [221] **Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, VanWees SCM and Bakker PAHM (2014).** Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347–375.
- [222] **Adam A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de doctorat. Université de Liège, France. 166 p.
- [223] **Creasap J. E., Reid C. L., Goffinet M. C., Aloni R., Ullrich C., and Burr T. J. (2004).** Effect of Wound Position, Auxin, and *Agrobacterium vitis* Strain F2/5 on Wound Healing and Crown Gall in Grapevine. *Phytopathology* 95(4): 362-367.
- [223] **Trigalet A., Frey P. and Trigalet-Demery D. (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.
- [224] **McGuire R.G. et al. (1991).** Polygalacturonase production by *Agrobacterium tumefaciens* Biovar-3. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 660–664.
- [225] **Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M. and Lelie, D.V. (2002).** Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21:586–606.
- [226] **Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J. and Moe" nne-Loccoz Y. (2009).** *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent *Pseudomonads* as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* 48: 505–512.
- [227] **Roh J.H., Yun H.K., Park K.S., Lee C.H. and Jeong S.B. (2003).** *In vivo* evaluation of resistance of grape varieties to crown Gall disease. *Plant Pathology Journal* 19(5) : 235-238.

- [228] **Benchabane M., Bakour R., Toua D., Boutekrabt A. (2000).** Mise en évidence de l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de la fusariose vasculaire de la tomate. EPPO Bulletin, 30, (2): 243-246.
- [229] **Ongena M., Giger A., Jacques P., Dommès J. and Thonart P. (2002).** Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. Eur. J. Plant Pathol, 108: 187-196.
- [230] **Saikia R., Singha T., Kumara R., Srivastavaa J., Srivastavab A.K., Singhc K. and Arora D.K. (2003).** Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. Microbiological Research, 158, (3): 203-213.
- [231] **Boukerma L., Benchabane M., Charif A., Khélifi L. (2017).** Activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in the biocontrol of tomato Fusarium wilt. Plant Protect. Sci. 53: 78–84.
- [232] **van Peer, R., Niemann, G.J. and Schippers, B. (1991).** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. Phytopathology. 81(9):728-734.
- [233] **Wei, G., Kloepper, J.W. and Tuzun, S. (1991).** Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology. 81(12):1508-1512.
- [234] **Haas D, Defago G (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307-319
- [235] **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.
- [236] **Millar R.L., Kalb D.W. & Keinath A.P. (1984).** Biological and chemical control of *verticillium* wilt of alfalfa. *Phytopathology* 74 (7): 805.
- [237] **El Aissami A. (1999).** Impact de l'adaptation de *Verticillium albu-atrum* d'origine tomate à la luzerne sur les mécanismes d'action du parasite et bioprotection des plantes fourragères contre la verticilliose. Thèse de Doctorat Es-Sciences. Université Mohamed V, Rabat, 254p.
- [238] **Kumari P, Khanna V (2016).** Allelopathic effects of native *Bacillus* sp. against *Fusarium oxysporum* causing chickpea wilt. *Allelopathy Journal* 38 (1):77–90.

- [239] **Everette Jace D., Bryant Quinton M., Green Ashlee M., Abbey yvonne A., Wangila grant W. and Walker Richard B. (2010).** Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139–8144.
- [240] **Aksoy, HM., Kaya, Y., Ozturk, M., Secgin, Z., Onder, H., Okumus, A. (2017).** *Pseudomonas putida*-induced response in phenolic profile of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) infected by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Biological Control*, 105: 6-12.
- [241] **Viljoen AM, van Wyk B, Newton LE (2001).** The occurrence and taxonomic distribution of the anthrones aloin, aloinoside and microdontin in Aloe. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 53–67.
- [242] **Vasil Indra K. (2012).** Phytochemicals in Plant Cell Cultures. Elsevier Science, book 646 p.
- [243] **Asamenew G., Bisrat D. Mazumder A. Asres K. (2011).** *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of anthrone and chromone from the latex of *Aloe harlana* Reynolds. *Phytotherapy research*: 25 (12): 1756-1760.
- [244] **Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., & Cardinal, A. (2006).** Role of phenolics in the resistance mechanism of plant against fungal pathogens and insects. In F. Imperato (Ed.), *Phytochemistry: Advances in research* (pp. 23–67). Trivandrum: Research Signpost.
- [245] **Benhamou, N., Gagne, S., Quere, D. L., & Dehbi, L. (2000).** Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90, 45–56.
- [246] **Singh, R., Sindhan, G. S., Parashar, R. D., & Hooda, I. (1998).** Application of antagonist in relation to dry root rot and biochemical status of chickpea plants. *Plant Disease Research*, 13, 35–37.
- [247] **Hao, F., Wang, L., Cao, K., Wang, X., Fang, W., Zhu, G., Chen, C. (2015).** Systemic acquired resistance induced by *Agrobacterium tumefaciens* in peach and differential expression of PR1 genes. *HortScience* 50 :666-672.
- [248] **Caihong, H., and Qian, Y. (2007).** Advances in biocontrol mechanism and application of *Trichoderma* spp. for plant diseases. *J. Northeast Agricultural University*, 14 (2): 161-167.

- [249] **Yuan, Z.C., Edlind, M.P., Liu, P., Saenkham, P., Banta, L.M., Wise, A.A., Ronzone, E., Binns, A.N., Kerr, K., and Nester, E.W. (2007).** The plant signal salicylic acid shuts down expression of the Vir regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:11790–11795.
- [250] **Michalak A. (2006).** Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* 15: 523 – 530.
- [251] **Ashry N. A., Mohamed H. I. (2011).** Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to Powdery Mildew. *World J. Agric. Sci.* 7: 78 – 85.
- [252] **Yuying J., Xingdong Y., Mingzhe Z., Qiang Z. (2015).** Comparison of Soybean Transformation Efficiency and plant Factors Affecting transpormation during the *Agrobacterium* infection process. *International Journal of molecular Sciences* 16 (8): 18522-43. DOI: 10.3390/ijms160818522.
- [253] **Dutta S., Mishra A.K., Dileep Kumar B.S. (2008).** Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 452–461.
- [254] **Latha P., Anand T., Ragupathi N., Prakasam V., Samiyappan R. (2009).** Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control*, 50: 85-93.
- [255] **Rajendran, L., Samiyappan,R., Raguchander, T. and Saravanakumar, D. (2007).** Endophytic bacteria mediate plant resistance against cotton bollworm. *Journal of Plant Interactions*, 2: 1-10.
- [256] **Chen, C., Bélanger, R., Benhamou, N. and Paulitz, T. (2000).** Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*56(1):13-23.
- [257] **Ramamoorthy V., T. Raguchander and R. Samiyappan (2002b).** Induction of defense related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant and Soil* 239, 55–68.

- [258] **Rajendran, L., & Samiyappan, R. (2008).** Endophytic *Bacillus* species confer increased resistance in cotton against damping off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology Journal*, 7, 1–12
- [259] **Mayer A.M. (2006).** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67:2318-2331.
- [260] **Li L. and Steffens John C. (2002).** Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215: 239-247.
- [261] **Bachem, C. W. B., Speckmann, G. J., Van der Linde Piet, C. G., Verheggen, F. T. M., Hunt, M. D., Steffens, J. C., et al. (1994).** Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Bio/Technology* 12, 1101–1105. doi: 10.1038/nbt1194-1101
- [262] **Babu AN., Jogaiah S., Ito S., Nagaraj AK. Tran, LP. (2015).** Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*, 231:62–73.

ANNEXES

Annexe 1

Composition du milieu de culture : Milieu LPGA : Extrait de levure-peptone bactériologique-glucose-agar (Hildebrand et *al.*, 1988)

Milieu LPGA Solide

Extrait de levure	5g
Peptone bactériologique	5g
Glucose	10g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1l
pH	7-7,2

Milieu LPGA semi-solide

Extrait de levure	5g
Peptone bactériologique	5g
Glucose	10g
Agar-agar	7,5g
Eau distillée	1l
pH	7-7,2

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 2

Milieu MG (Mannitol-Glutamate) non sélectif (Moore et *al.*, 1988)

Mannitol	10g
L(-) acide glutamique	2g
KH ₂ PO ₄	0,5g
Nacl	0,2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2g
Extrait de levure	0,5g
Agar	15g

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

- Pour la préparation du milieu en boîte ; le milieu est stérilisé en autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes, puis coulé en boîtes de pétries.
- Pour la préparation du milieu en tube ; le milieu est dissout à chaud, puis réparti en tubes à essai, à raison de 3 à 5 ml par tube. Les tubes sont ensuite stérilisés par autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 3

Deux courbes d'étalonnage ont été préalablement conçues pour l'acide gallique (GA) et l'acide salicylique à différentes concentrations et pratiquées dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

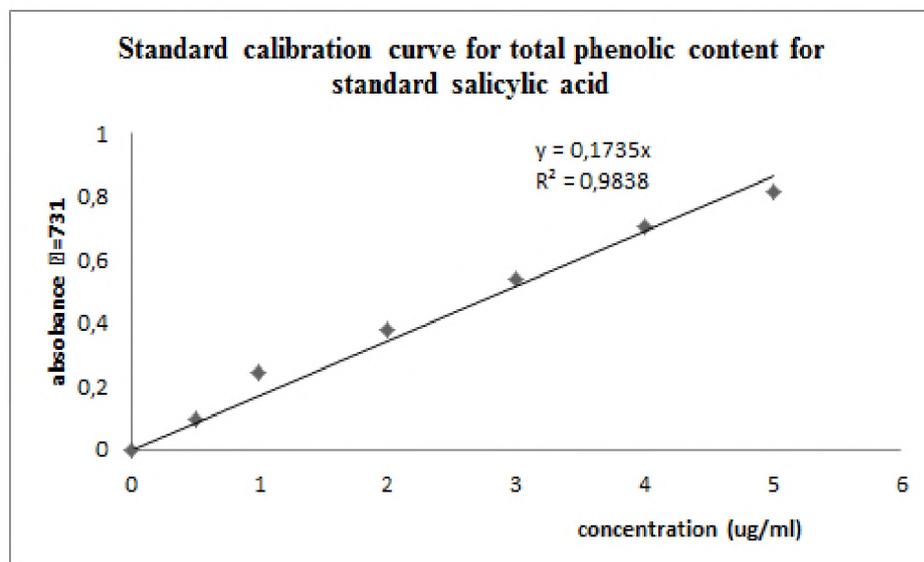
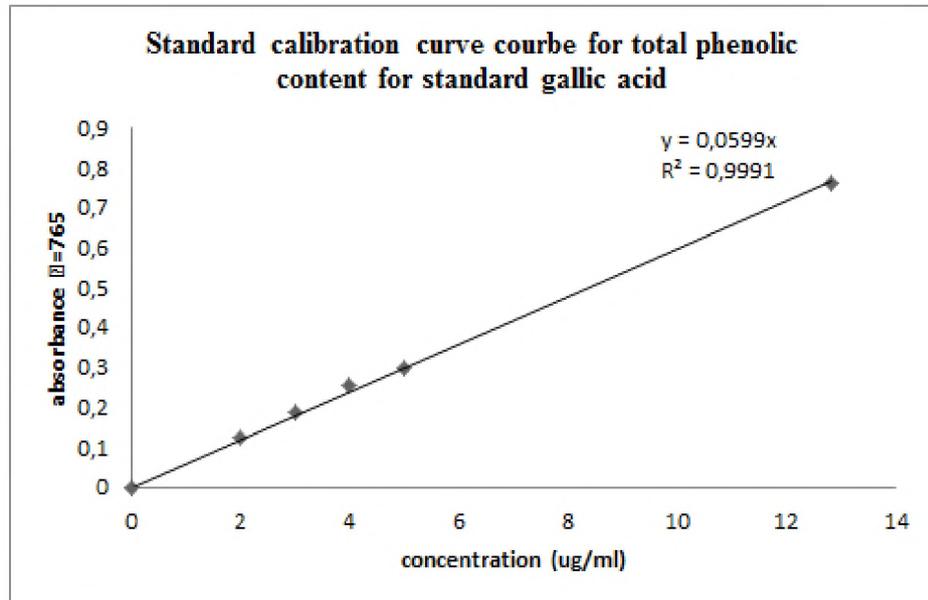


Figure : Courbe d'étalonnage du contenu phénolique total pour les concentrations standard d'acide gallique et d'acide salicylique.

Annexe 4

La courbe d'étalonnage conçue précédemment en utilisant de l'acide salicylique standard.

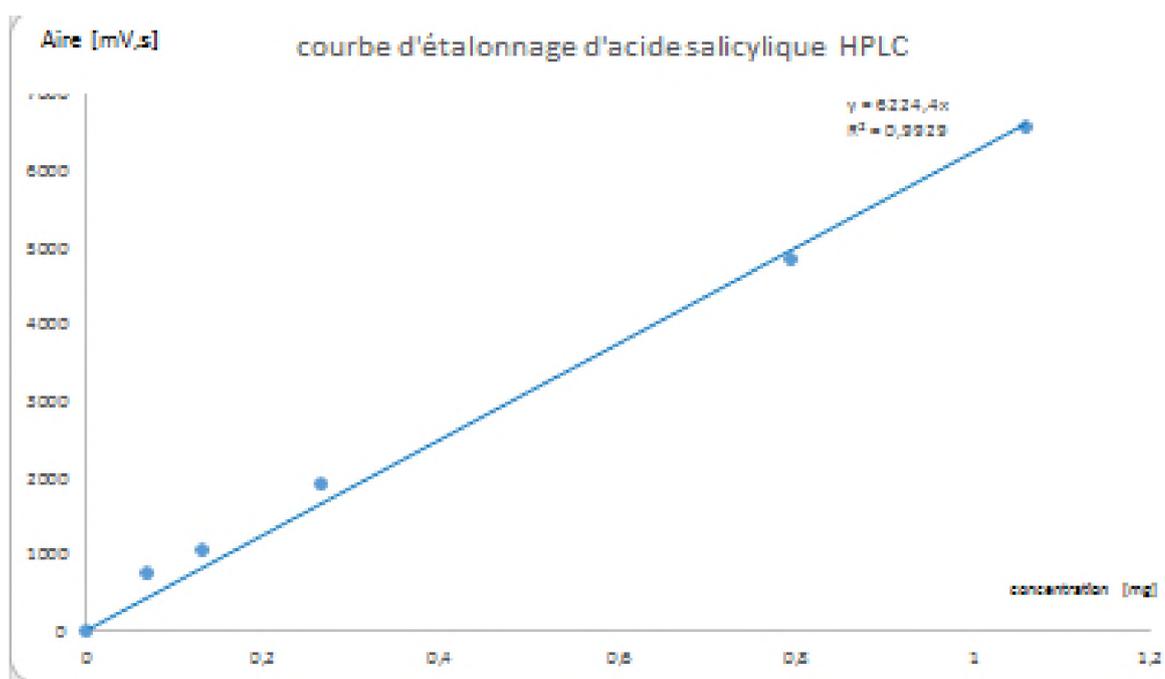


Figure : Courbe d'étalonnage de l'acide salicylique.

Annexe 5

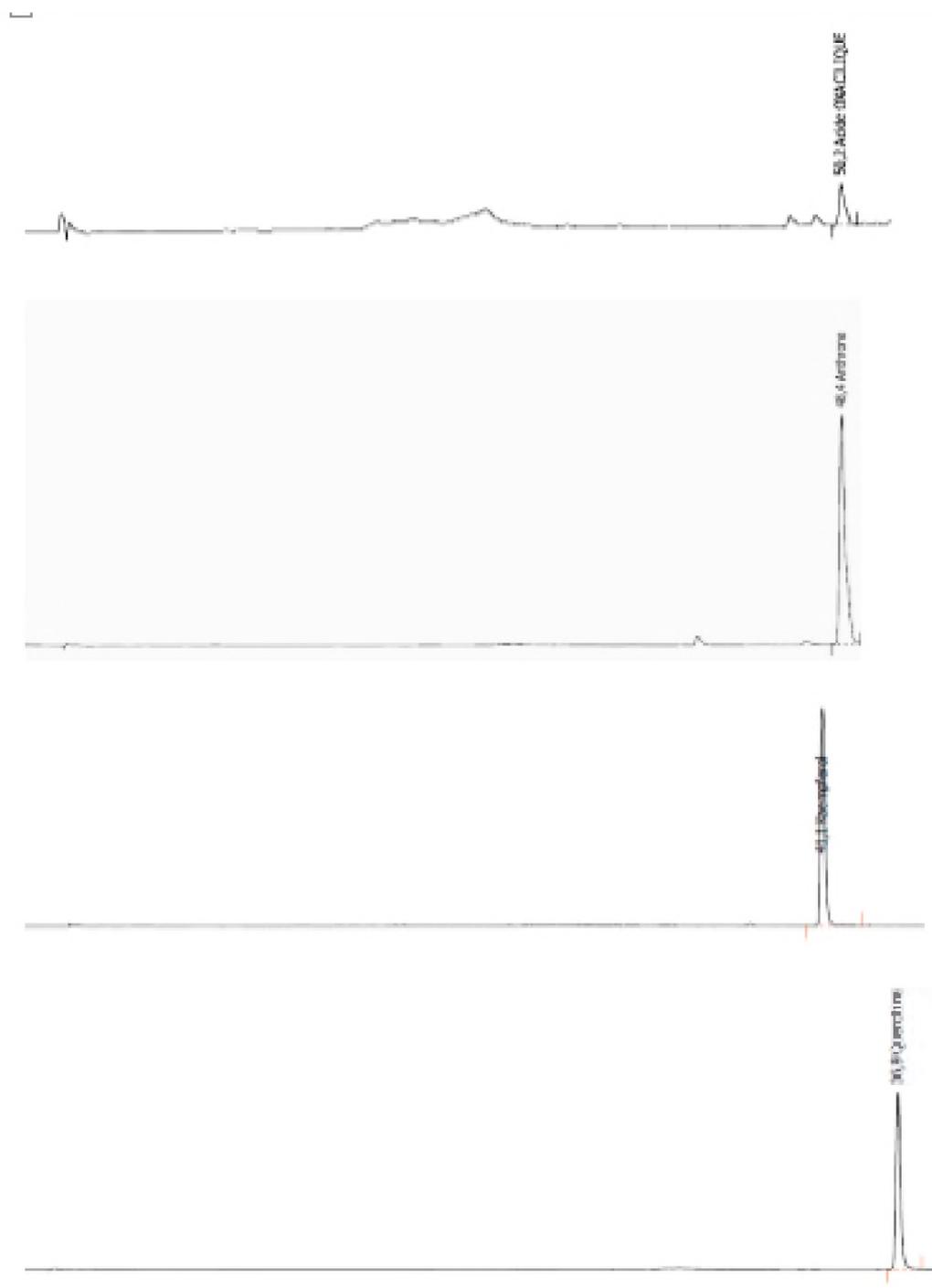
Les souches antagonistes ont retardé le développement des tumeurs induites par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Tableau; Effect of bacterial antagonists on the time of tumor appearance and the relative mean size of tumors calculated on three replications (mm).

Traitements	temps (semaine)			
	1	2	3	4
CR2	0	0	0	0
CR2+C58	0	0	1.32	1.50
CR2+E14	0	0	1.23	1.30
CR2+E17	0	0	1.60	1.70
EPR3	0	0	0	0
EPR3+C58	0	0	0	1.00
EPR3+E14	0	0	0	1.08
EPR3+E17	0	0	0	1.05
OS1	0	0	0	0
OS1+C58	0	0	0	1.20
OS1+E14	0	0	0	1.00
OS1+E17	0	0	0	1.20
OS4	0	0	0	0
OS4+C58	0	0	0	1.20
OS4+E14	0	0	0	1.08
OS4+E17	0	0	0	1.00
C58	0	0	1.57	2.55
E14	0	1.48	1.80	2.04
E17	0	0	1.70	2.43
EDS	0	0	0	0

Annexe 6

Les chromatogrammes des différents standards : acide oxalique, anthrone, kampferol et quercetine



PUBLICATION I

Bacillus and Pseudomonas spp. strains induce a response in phenolic profile and enhance biosynthesis of antioxidant enzymes in Agrobacterium tumefaciens infected tomato plants

H. Djellout, A. Raio, H. Boutoumi & Z. Krimi

European Journal of Plant Pathology

Published in cooperation with the
European Foundation for Plant
Pathology

ISSN 0929-1873

Volume 157

Number 2

Eur J Plant Pathol (2020) 157:269-280

DOI 10.1007/s10658-020-01975-1

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Bacillus and *Pseudomonas* spp. strains induce a response in phenolic profile and enhance biosynthesis of antioxidant enzymes in *Agrobacterium tumefaciens* infected tomato plants

H. Djellout · A. Raio · H. Boutoumi · Z. Krimi

Accepted: 6 April 2020 / Published online: 12 May 2020
© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2020

Abstract Some antagonistic bacteria contribute to the management of plant diseases by stimulating the host natural defense and/or by providing direct biocontrol of pathogens. The objective of this study was to evaluate the biocontrol performances and the ability to induce a systemic response to crown gall of four strains belonging to *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. Evaluation of *in vitro* antagonistic ability showed that the four bacteria had a different spectrum of activity against the three tested strains of *Agrobacterium tumefaciens*. A delay in time of appearance and a significant reduction of the tumor size were observed in tomato plants obtained by bio-primed seeds and stem inoculated with *A. tumefaciens*. Seed priming with antagonistic strains stimulated some systemic defense mechanisms in tomato plants that can be related to the reduction of disease symptoms induced by *A. tumefaciens*. Both antagonists

and *A. tumefaciens* strains induced variations in phenol content and peroxidase activity while polyphenol oxidase activity was mainly affected by the single *A. tumefaciens* strain. The response was different in relation to the various combinations of antagonist/pathogen, however *Pseudomonas brassicacearum* EPR3 strain was the most effective strain.

Keywords Bio-priming · *Agrobacterium tumefaciens* · Phenolic compounds · Peroxidase · Polyphenol oxidase

Introduction

Crown gall is caused by the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* and is considered an economically important disease, determining severe losses on a broad range of plant species (Pulawska 2010; Păcurar et al. 2011). *A. tumefaciens* is considered a quality pathogen in the European continent and a quarantine pathogen in many North African countries including Algeria (Krimi et al. 2002; Rhouma et al. 2004; Raio et al. 2009; Ben Abdallah et al. 2015). Biological control of crown gall has been successfully applied for almost forty years, using the non-pathogenic *Agrobacterium radiobacter* strain K84. K84 strain is effective against biovar 2 agrobacteria that infect many plant species in different countries all over the world (Rhouma et al. 2008), but it does not effectively control all agrobacteria biovars or species (Raio et al. 2009). Consequently, the need to

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10658-020-01975-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. Djellout (✉) · Z. Krimi
Laboratoire de Valorisation des Ressources Agrobiologiques,
Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie, Université Saad Dahlab, Blida1 09000, Algeria
e-mail: rahmdjellout-hafidha@outlook.fr

A. Raio
Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante CNR, Via
Madonna del Piano, 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

H. Boutoumi
Laboratoire de Génie chimique, Département de chimie
industrielle, Université Saad Dahlab, Blida1, Algeria

search for new biocontrol agents of *A. tumefaciens* has become greater than ever (Kahla et al. 2017). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), including non-pathogenic fluorescent *Pseudomonas* and various species of antagonistic bacteria, as well as several bacterial endophytes, effectively control plant pathogens (Altin and Bora 2001) and may enhance the growth and improve the plant health (Smith et al. 2003; Kavino et al. 2007). Various nonpathogenic *Agrobacterium* and *Pseudomonas*, as well as *Bacillus subtilis* and *Serratia plymuthica* strains have been used as biocontrol candidates against *A. tumefaciens* or *A. vitis* strains (Dandurishvili et al. 2010; Kawaguchi 2013).

Microbial pathogens may induce a systemic resistance in plant tissues distant from the infection site, named systemic acquired resistance (SAR), which confers stable and broad-spectrum resistance against subsequent attackers. The plant amplifies the production of salicylic acid (SA) and induces the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes (Hao et al. 2015).

Several species of PGPR and endophytic bacteria, not only promote the growth, but are able to induce systemic resistance (ISR) in plants. Application of beneficial microbes to seeds (bio-priming) creates ideal conditions for microbial colonization of seed tissues and is a successful method to induce systemic resistance to plant pathogens (Mahmood et al. 2016). Although ISR by beneficial microbes is often regulated through SA-independent mechanisms, several PGPR have been reported to trigger a SA-dependent type of ISR that resembles pathogen induced SAR (Pieterse et al. 2014). ISR is associated with the synthesis of defense-related enzymes, such as pathogenesis-related (PR) proteins, and to the accumulation of peroxidase (PO), polyphenol oxidase (PPO) and phenols as plant response to biotic or abiotic stresses (Magnin-Robert et al. 2007). The induced resistance mechanism is often maintained for the lifetime of the plant and is effective against a broad spectrum of pathogens (Maffei et al. 2007).

The aim of this study was to evaluate the ability of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains to induce a systemic response against *A. tumefaciens* in seed-primed tomato plants. The impact of antagonists on plant defense response was investigated by analyzing the accumulation of phenolic compounds and the PO and PPO enzymatic activity in tomato plant tissues.

Material and methods

Bacterial strains used in this study

Pseudomonas brassicacearum CR2 and EPR3, *Bacillus cereus* OS1 and *Bacillus methylotrophicus* OS4 are endophytic strains that were previously isolated from spontaneous herbaceous plants and selected on the basis of *in vitro* antagonistic and plant growth promotion activities (Krimi et al. 2016).

Tumorigenic *A. tumefaciens* C58 (ATCC33970) and two Algerian strains (E17 and E14) (Krimi et al. 2006) were used in this study as target pathogens to perform *in vitro* and *in vivo* tests. All strains belonged to the collection of phytopathogenic bacteria of the University of Blida 1 and were preliminarily checked for pathogenicity on *Kalanchoë daigremontiana* and *Lycopersicum esculentum* (Moore et al. 1988).

In vitro antagonistic activity

Thirty-nine endophytic strains previously isolated from native plant species (Krimi et al. 2016), were tested *in vitro* for their antagonistic activity against three strains of *A. tumefaciens*. The test was performed according to the method described by Stonier (1960) and modified by Moore et al. (1988). The putative antagonistic bacteria were grown on YPGA plates for 48 h at 28 °C. Bacterial cells were scraped from the agar surface and suspended in sterile distilled water (SDW). The final concentration of the suspension was 10^7 CFU mL⁻¹, that was determined spectrophotometrically by comparing the OD at $\lambda = 600$ nm of the suspensions with the reference growth curves. A volume of 20 μ L of each bacterial suspension was placed on the surface of YPGA plates that were incubated for 48 h at 28 °C. At the same time, pathogenic bacteria were streaked on YPGA medium and grown for 48 h at 28 °C. After incubation, the suspensions of pathogenic bacteria (10^6 CFU mL⁻¹), prepared as described above for the antagonists, were sprayed onto the surface of the plates inoculated with antagonistic bacteria. Plates were incubated again for 24–48 h at 28 °C and the appearance of inhibition haloes surrounding the macro-colony was considered as positive antagonistic activity. The relative inhibition activity of the different strains was evaluated

by comparing the size of the inhibition zone. Three replicates for each antagonist/pathogen combination were performed and the experiment was repeated twice.

Tomato seed bio-priming and inoculation with *A. tumefaciens* strains

This test was conducted on tomato plants cv. St. Pierre. Tomato is considered a universal host both for *A. tumefaciens* and *A. vitis* (Dandurishvili et al. 2010) since this plant species gives fast and reproducible results. Soil mixture was composed of 2/3 field soil and 1/3 of peat thoroughly homogenized. Soil was autoclaved for 60 min at 120 °C two times, with 24 h interval between each autoclaving, in order to ensure disinfection. The soil substrate was then distributed in plastic pots (10 × 6.5 cm). Tomato seeds were surface sterilized with 2% sodium hypochlorite for 5 min, rinsed thoroughly with SDW and then placed on sterile discs of Whatman filter paper inside Petri dishes. Seeds were soaked for 24 h in the *Pseudomonas* or *Bacillus* bacterial suspensions or in SDW (control), then were incubated at 25 °C for 5 days in the dark in order to promote germination.

One-week after germination, seedlings were selected and transplanted into the plastic pots containing the disinfected soil. For each antagonistic strain, 12 plants were protected with the antagonist and inoculated with the pathogen, 12 were protected with the antagonist alone, nine were inoculated with each *Agrobacterium* strain and three plants were treated with SDW. The experiment was planned according to a complete randomized design with three blocks per each group of treatments. At the four-leaf stage, plant stems were wounded at the crown with a sterile scalpel and 50 µL of 10⁶ CFU mL⁻¹ suspensions of *A. tumefaciens* strains were placed on the wounds. The same volume of SDW was used to treat control plants. Inoculated stems were wrapped with aluminum foil to prevent fast desiccation of the inoculum.

During the experiment, an adequate level of soil moisture was maintained by regular irrigation. The experiment was carried out in a greenhouse with a daily photoperiod of 16 h light and 8 h of darkness at a temperature of 25–30 °C. Efficacy of

bacterial antagonists in reducing tumor development was evaluated by recording the tumor size, nine weeks after the pathogen inoculation.

Evaluation of phenol content, peroxidase and polyphenol oxidase activity in tomato plants

The content of phenols, salicylic acid (SA) and the activity of peroxidase (PO) and polyphenol oxidase (PPO) enzymes were analyzed in seed-treated and control plants. Tomato plants were carefully uprooted, at different time intervals (0 h, 48 h, 6 and 15 days after *A. tumefaciens* inoculation) and processed according to the different protocols described below. Three plants were sampled from each replicate of each treatment and processed separately.

Estimation of phenol content

The phenol content was estimated according to Folin-Ciocalteu procedure (Singleton and Rossi 1965). One gram of freshly plant sample (roots and leaves) was grinded in mortar with 10 mL of 80% methanol and centrifuged at 10.000 g for 15 min (Zieslin and Ben-Zaken 1993). One mL of the methanolic extract was added to 5 mL of SDW and 250 µL of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, Germany). The solution was kept at 25 °C for 5 min after that 1 mL of 20% of sodium carbonate was added. The solution was let at room temperature for 2 h, then the absorbance of blue color was measured at 765 nm and 731 nm using the spectrophotometer SHIMADZU 1800 UV. Gallic acid (GA) and SA solutions were used as standards. Two calibration curves were previously designed for GA and SA under the same laboratory conditions applied for tomato plant analysis (Fig. S12 and S13). Results were expressed in µg mL⁻¹ of GA or SA. All analyses were performed in triplicate.

Identification and quantification of salicylic acid (SA)

Plant samples were analyzed according to the method of Seskar et al. (1998). The whole tomato plants (roots and leaves) sampled at various times, were frozen in liquid nitrogen and grinded to a fine powder. 0.5 g of each sample were extracted with 90% and 100% methanol, then stirred for 1 min and then sonicated for 10 min. The extracts were then centrifuged at 10.000×g and vacuum-dried. Dry pellet was resuspended in 2.5 mL of 5%

trichloroacetic acid and centrifuged, the supernatant was partitioned by using ethyl acetate, cyclopentane and isopropanol (ratio of 100:99:1, v/v) solution. The top organic layer containing free SA was transferred to a 4 mL vial and dried with nitrogen gas. The dry SA was again suspended in 1 mL of 100% methanol (HPLC Grade-Sigma). High performance liquid chromatography (HPLC) analyses was carried out on a YL 9100 HPLC (software: YL-CLARITY) with a UV detector (excitation and emission, 254 nm and 280 nm, respectively) fitted with a C18 reverse phase HPLC column (RESTEK, diameter 4.6 mm, length 150 mm and pore size 5 μm). The flow rate was 1.0 mL min^{-1} . The solvents used were 1% acetic acid (solvent A) and methanol Grade HPLC (solvent B). The concentration of SA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) was calculated considering a calibration curve previously designed using standard SA (Fig. S11). Phenolic compounds were identified by comparison with the retention time of standards (Sigma) and concentrations were calculated by comparing peak areas of the samples with reference compounds run under the same elution conditions.

Determination of peroxidase (PO) activity

PO activity was assayed by the method of Hammerschmidt et al. (1982). Uprooted plants were washed under running tap water, homogenized with liquid nitrogen in a pre-chilled mortar and grinded. The homogenized tissues were stored in a freezer ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) until use for biochemical analysis. One gram of each frozen plant sample was homogenized in 2 mL of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The homogenate was centrifuged at $16,000\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min and the supernatant was used for PO content analysis. The reaction mixture consisting of 1.5 mL of 0.05 M pyrogallol (MERCK), 0.5 mL of the extract and 0.5 mL of 1% H_2O_2 , was incubated at room temperature ($28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Reaction mixture without enzyme extract served as control. The changes in absorbance at 420 nm were recorded at 30s intervals for 3 min. The enzyme activity was expressed as changes in the absorbance $\text{min}^{-1}\text{ g}^{-1}$ of fresh tissue.

Determination of polyphenol oxidase (PPO) activity

PPO activity was determined using the procedure of Mayer et al. (1965). Frozen samples of the whole plants (1 g) prepared as described previously, were

homogenized in 2 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) and centrifuged at $16,000\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to collect the supernatant. The reaction mixture consisted of 200 μL of the supernatant and 1.5 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5). To start the enzymatic reaction, 200 μL of 0.01 M catechol was added and the activity was expressed as the change in absorbance at 495 nm up to 15 min, after the addition of catechol.

Statistical analysis

Analyses were performed with the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software (Version 23.0). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and the means were compared with Fisher's least significant difference (LSD) test ($P \leq 0.05$).

Results

Inhibition of *A. tumefaciens* by antagonistic bacteria in vitro and in vivo

Some of the tested antagonistic bacteria were able to effectively inhibit the growth of the three strains of *A. tumefaciens* on YPGA medium. Table 1 reports the antagonistic activity of eleven strains considered the most effective among the thirty-nine tested. The mean diameter of the inhibition zone ranged between 0 to 43.60 mm and the highest value of inhibition zone was observed for *B. methylotrophicus* OS4, *B. amyloliquefaciens* EHF5 and *B. pumilus* OS2 strains. However, *B. methylotrophicus* strain OS4 and *P. brassicacearum* CR2 were the most effective against all three *A. tumefaciens* strains (Table 1). The next assays were performed using *B. cereus* OS1, *B. methylotrophicus* OS4 and *P. brassicacearum* CR2 and EPR3 strains.

The size of tumors was significantly reduced in tomato plants obtained by bio-primed seeds (Table 2; Fig. 1). *P. brassicacearum* strain EPR3 and *B. methylotrophicus* strain OS4 were the most effective strains in reducing the size of tumors on tomato plants against all the pathogenic agrobacteria strains tested (Table 2). Moreover, OS1, OS4 and EPR3 strains delayed of one week the development of the tumor induced by C58 and E17, and of two weeks those induced by E14 (Table S11).

Table 1 Inhibition zone (mm) induced by the most effective bacterial antagonists against *A. tumefaciens* strains C58, E14 and E17

Antagonists		C58	E14	E17
CR1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	36.60 a	18.33 e	00.00 d
CR2	<i>P. brassicacearum</i>	30.00 b	38.33 b	32.33 b
EHR1	<i>B. cereus</i>	21.00 e	19.33 e	21.33 c
EHA2	<i>Bacillus spp.</i>	24.30 d	19.33 e	00.00 d
EPR3	<i>P. brassicacearum</i>	25.60 cd	24.00 d	37.60 b
OS1	<i>B. cereus</i>	20.00 e	25.67 cd	21.33 c
OS4	<i>B. methylotrophicus</i>	30.30 b	43.33 a	43.60 a
PS1	<i>P. brassicacearum</i>	27.00 c	00.00 g	00.00 d
PR1	<i>Bacillus spp.</i>	27.30 c	06.67 f	00.00 d
PF3	<i>B. methylotrophicus</i>	37.30 a	26.00 c	21.67 c
PA2	<i>Bacillus spp.</i>	35.30 ab	20.00 e	00.00 d

Values represent the average size of inhibition zone (mm) calculated on three replications. Values followed by the same letter did not differ statistically at LSD test ($P \leq 0.05$)

Content of phenolic compounds of *A. tumefaciens* infected tomato plants seed- treated with antagonistic bacteria.

Phenol accumulation in plants treated with the four antagonistic bacteria and challenged with *A. tumefaciens* varied significantly ($P \leq 0.05$). Phenol accumulation increased from the second day (data not shown) until the 15th day after inoculation (DAI) when the experiment ended (Fig. 2). All antagonists determined a significant increase in phenol content of tomato plants challenged with pathogenic strains (Fig. 2). The phenol content varied with the various combination antagonist/pathogen: CR2 strain enhanced phenol accumulation only in plants inoculated with C58; EPR3 showed a positive effect on phenol accumulation in

plants inoculated with C58 and E17 (Fig. 2b); OS1 increased phenol accumulation in plants inoculated with C58 and E14 (Fig. 2c), while OS4 increased phenol content in plants inoculated with E14 (Fig. 2d).

The highest and significant value ($P \leq 0.05$) of phenolic compound content expressed as SA was $4.78 \mu\text{g mL}^{-1}$ and was detected in plants protected with antagonistic strain OS1 and inoculated with *A. tumefaciens* strain E14. The combination of the four antagonists with the pathogenic strain E17 and of CR2 with E14, determined instead a reduction in phenolic compounds expressed as SA ($P \leq 0.05$) (Table 3).

Endogenous SA identification and quantification by HPLC in tomato plants

The retention time of standard SA measured by HPLC was approximately 29.5 min. SA content of plants treated with the antagonistic bacteria and inoculated with *A. tumefaciens*, generally were higher than those of plants treated with antagonistic or pathogenic bacteria alone (data not shown). The highest SA values were detected at the 6th DAI for all the treatments analyzed. The combination of the antagonist EPR3 with E17 determined the highest level of SA accumulation in tomato plants (Fig. 3 and Table 4).

In addition to SA, other phenolic compounds were identified by HPLC. In tomato plants seed-treated with *P. brassicacearum* EPR3 and stem inoculated with *A. tumefaciens* high amount of GA and kaempferol were detected in plants only inoculated with E17. Quercetin, and the two non-phenolic compounds anthrone and oxalic acid, were instead higher in seed-primed plants triggered with E17 (Table 5).

Table 2 Mean size of tumors (mm) and percentage of reduction of tumor size, induced by different strains of *A. tumefaciens* on tomato stems seed-treated with different antagonistic bacteria

Treatments		C58	(%)*	E14	(%)*	E17	(%)*
SDW		5.95a		5.33a		5.50a	
EPR3	<i>P. brassicacearum</i>	3.00c	49,6	3.75 cd	29,6	3.21d	41,6
CR2	<i>P. brassicacearum</i>	3.45b	42,1	4.20 b	21,2	3.50 cd	36,3
OS4	<i>B. methylotrophicus</i>	3.37 b	43,4	3.30d	38,1	3.70c	32,7
OS1	<i>B. cereus</i>	3.32 b	44,2	3.80c	28,7	4.75 b	13,6

Values followed by the same letter did not differ statistically based on LSD test ($P \leq 0, 05$)

* Reduction percentage of tumor size determined by the antagonistic strains

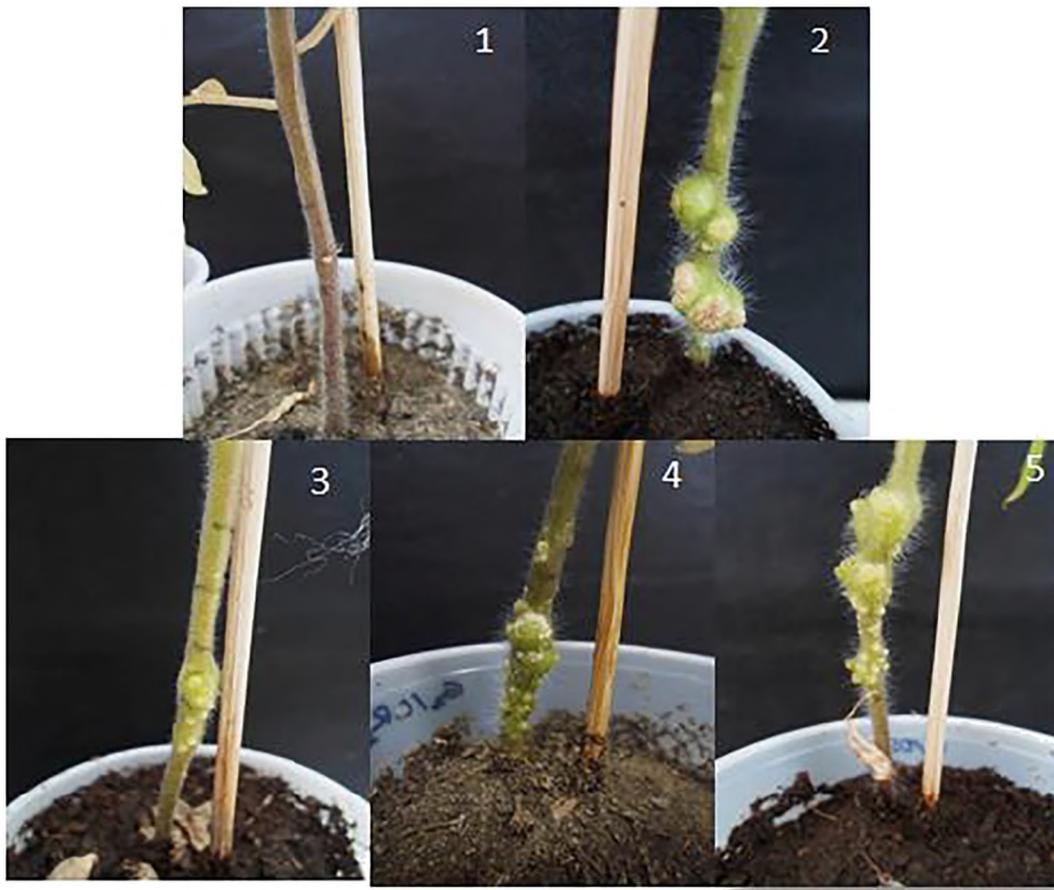


Fig. 1 Symptoms induced by *A. tumefaciens* strains inoculated on tomato plants (Fig. 1.2 and 1.5), and on tomato plants seed-primed with *P. brassicacearum* strains (Fig. 1.3 and 1.4). **1:** Tomato seedling treated with SDW, **2:** Tomato seedling treated with SDW then inoculated with *A. tumefaciens* strain C58. **3:** Tomato

seedling treated with *P. brassicacearum* strain EPR3 then inoculated with *A. tumefaciens* strain C58. **4:** Tomato seedling treated with *P. brassicacearum* strain CR2 then inoculated with *A. tumefaciens* strain E17, **5:** Tomato seedling treated with SDW then inoculated with *A. tumefaciens* strain E17

Activity of defense enzymes in tomato plants

Peroxidase activity

Tomato plants treated with *P. brassicacearum* and *Bacillus* strains and inoculated with *A. tumefaciens* expressed higher activity of PO compared to plants treated with antagonistic or pathogenic bacteria alone (Fig. 4). The highest peroxidase activity $\Delta\text{abs} = 1.38$ was observed for the combination CR2/E14 strains, fifteen days after *A. tumefaciens* inoculation, when the experiment ended (Fig. 4c).

Polyphenol oxidase activity

Antagonists EPR3, CR2 and OS1 significantly increased PPO in tomato plants inoculated with C58,

while OS4 did not determine any variation (Fig. 5). *Bacillus* OS1 and OS4 in combination with E14 pathogenic strain, increased the PPO in tomato plants in a significant way, while the *P. brassicacearum* strains had no (EPR3/E14) or negative effect (CR2/E14) on PPO activity (Fig. 5). Inoculation of E17 strain alone, induced the highest PPO activity in tomato plants, that was instead lower in plants seed-primed with the four antagonists (Fig. 5).

Discussion

Four bacterial antagonistic strains, previously isolated in Algeria (Krimi et al. 2016), were tested for their ability to induce a systemic response in seed-primed tomato plants. The effect of the induced response on tumor

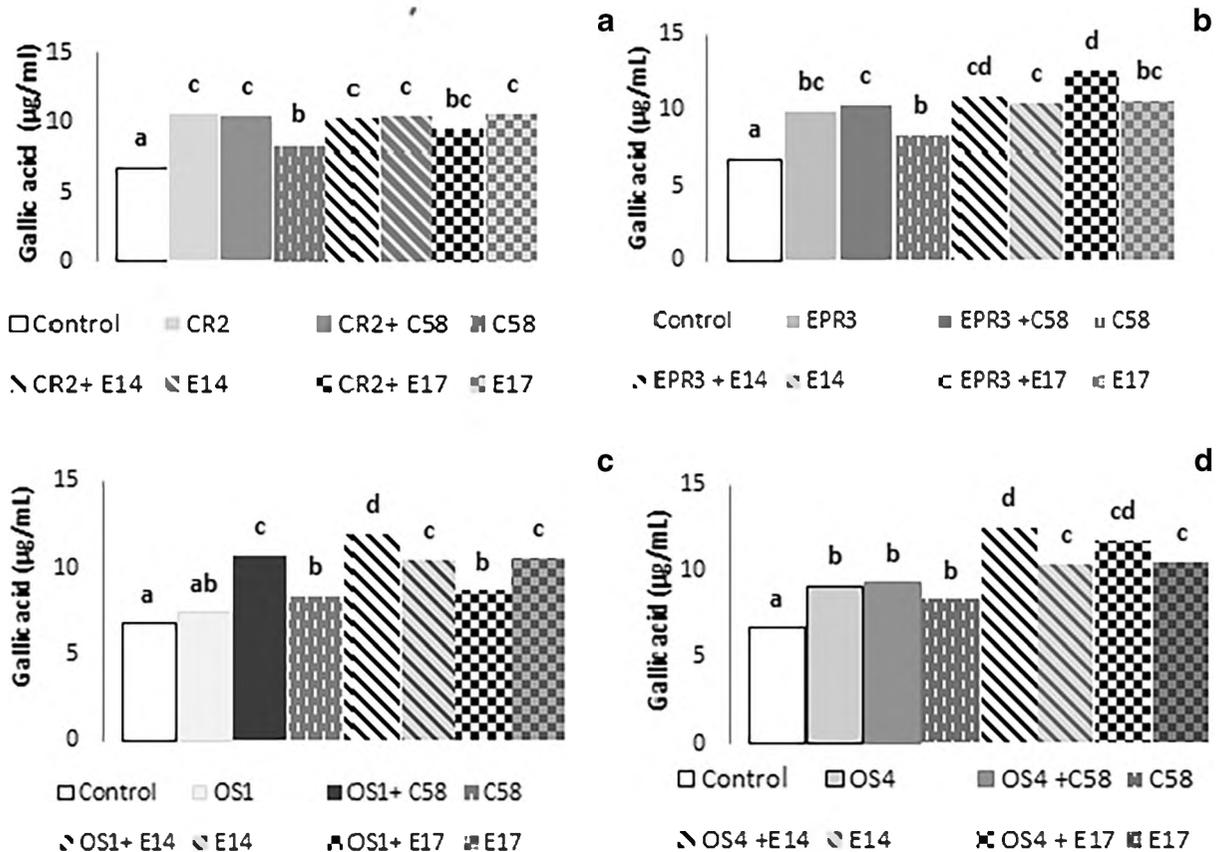


Fig. 2 Contents of total phenolic compounds measured at the end of the experiment (15 DAI), expressed as gallic acid, in tomato plants inoculated with *A. tumefaciens* strains and treated with

SDW (control) and antagonistic strains CR2 (a), EPR3 (b), OS1 (c) and OS4 (d). Different letters on the bars indicate significant differences at $P \leq 0.05$

induction by *A. tumefaciens* was evaluated. Strains were previously assayed in vitro to determine their inhibition efficacy against three strains of *A. tumefaciens*. All four antagonists were able to inhibit the growth of the three

strains of *A. tumefaciens* in vitro, showing a different efficacy in relation to the *Agrobacterium* strain tested. In general *A. tumefaciens* C58 strain was inhibited by all antagonists, strain E14 was more susceptible to the antagonistic activity of *Bacillus* spp. strains, while strain E17 resulted totally insensitive to the activity of some of the antagonists tested but was effectively inhibited by *B. methylotrophicus* OS4 and *P. brassicacearum* EPR3 strains. Many bacterial antagonists produce different types of agrocins or antibacterial compounds that inhibit specific pathogenic *Agrobacterium* spp. (Otten et al. 2008). Some rhizosphere strains of *P. fluorescens*, producing broad spectrum antibiotics, significantly reduced the development of crown gall on plants infected with pathogenic *A. tumefaciens* strains (Dandurishvili et al. 2010). It is also known that microbial competition for space and nutrients reduces the pathogen chances to colonize infection sites, as described for *A. radiobacter* K84 strain, the most effective biocontrol agent of crown

Table 3 Contents of total phenolic compounds at the end of the experiment (15 DAI), expressed as SA, in tomato plants inoculated with *A. tumefaciens* strains and treated with SDW and antagonistic strains CR2, EPR3, OS1 and OS4. Values followed by stars were significantly different from the control (pathogen alone) at LSD Test ($P \leq 0, 05$)

Contents of total phenolic compounds expressed as SA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	SDW	CR2	EPR3	OS1	OS4
SDW	2.43	3.63*	2.20	2.31	3.21
C58	3.55	3.22	3.65	3.12	3.02
E14	3.74	2.88*	3.60	4.78*	3.60
E17	4.24	2.75*	3.31*	3.23*	3.35*

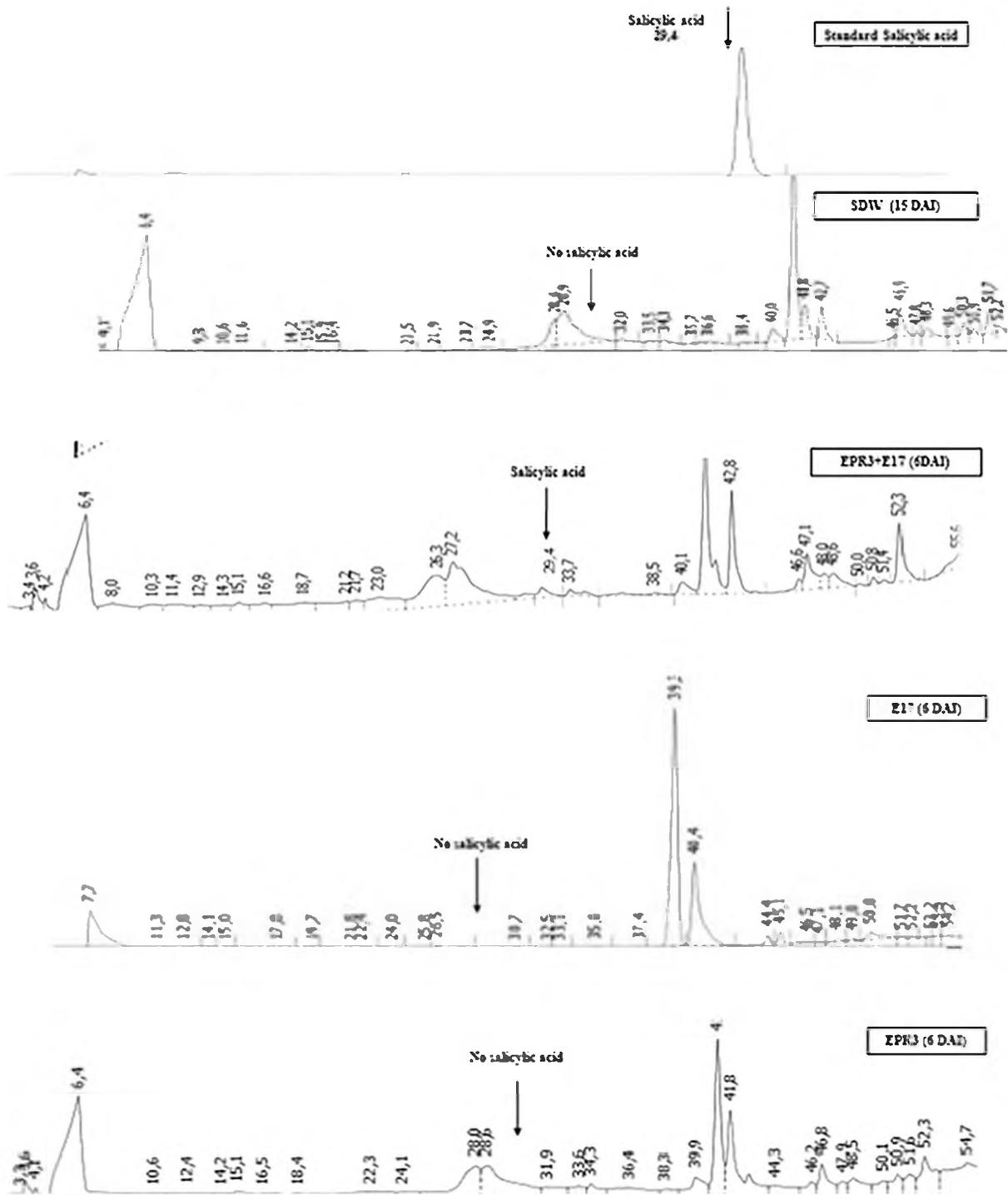


Fig. 3 HPLC chromatograms showing SA content of tomato plants protected with EPR3 antagonist and inoculated with *A. tumefaciens* E17

gall (Penyalver and López 1999). Moreover, many bacterial species are able to produce volatile organic compounds that are involved in the induction of systemic resistance (Backert and Meyer 2006).

Induction of systemic resistance in host plants by beneficial bacteria has been studied extensively (Ryu et al. 2004). Seed priming is seen as an ideal delivery method for inducing resistance in plants that is related to

Table 4 Concentration of SA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in tomato plants seed-primed with *P. brassicacearum* EPR3 strain, six days after *A. tumefaciens* inoculation (–: no SA detected)

Treatments	Ret. Time	Area (%)	SA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Standard SA	29.5	6572.802	
Untreated plant (SDW)	29.9	0019.022	0003.164
<i>A. tumefaciens</i> E17	–	–	–
<i>P.brassicacearum</i> EPR3 strain	–	–	–
<i>P.brassicacearum</i> EPR3 + <i>A. tumefaciens</i> E17	29.6	0206.454	0033.680

mobilization, activation and enhancement of various cellular defense response (Beckers and Conrath 2007). Our experiments showed that the treatment of seeds with *Bacillus* and *Pseudomonas* antagonists determined a delay in the time of appearance and a reduction in size of tumors in tomato plants stem inoculated with *A. tumefaciens*. Plant response was different in relation to the different antagonist/pathogen combinations. With the aim to understand the mechanisms involved in the interaction antagonist-tomato plant-*A. tumefaciens*, further analyses regarding the detection in plant tissues of different compounds involved in ISR, were performed. In general, the four selected antagonists were able to induce some defense mechanisms in the host plants whose intensity depended on the combination of the single antagonist with the different strains of *A. tumefaciens*. The synthesis of total phenols in tomato plants was stimulated by seed-priming and also by triggering the plants with the pathogen. All pathogenic strains induced phenolic compounds accumulation in tomato, however in some cases, the level was significantly higher in plants obtained by bio-primed seeds. Results were different according to the different methodology used to detect the phenolics, in fact OS4/E14 and EPR3/E17 determined the highest level of phenolic

compounds expressed as GA, while for OS1/E14, as SA. Large amounts of GA and kaempferol phenolic compounds were detected in plants only inoculated with *A. tumefaciens* E17. In EPR3 seed-primed plants inoculated with E17, the amount of these two phenolics was markedly lower, while quercetin, anthrone and oxalic acid increased. Phenolic compounds are known to play a major role in plant defense mechanisms against various external infectious agents (Aksoy et al. 2017), however, mechanisms involved in ISR are different from those of systemic acquired resistance (SAR) that is induced in plants by a pathogen attack (Pieterse et al. 2014). This could explain why systemic resistance induced in tomato by the beneficial EPR3 strain led to a phenolic compound pattern different from that induced by *A. tumefaciens*.

The treatment with the antagonistic bacteria *Bacillus* spp. and *P. brassicacearum* significantly increased the accumulation of endogenous SA in plants challenged with *A. tumefaciens*. SA is a phytohormone that activates plant defense responses in incompatible interactions (Hao et al. 2015), in fact its level in healthy plants are normally low, but rapidly increase upon infection by pathogens. For example, peach plants with enhanced resistance to *A. tumefaciens* showed elevated levels of

Table 5 Compounds identified by HPLC in plants inoculated with *A. tumefaciens* E17 strain and protected with *P. brassicacearum* EPR3 strain

	Gallic acid		Quercetin		Kaempferol		Anthrone		Oxalic acid	
	Ret.Time	Area	Ret.Time	Area	Ret.Time	Area	Ret.Time	Area	Ret.Time	Area
Standard	7.02	40.6	36.85	100	41.1	100	48.40	100	50.24	100
EPR3 + E17	7.08	02.5	36.85	2.5	41.73	01.9	49.06	02.7	50.16	01.6
EPR3	–	–	37.57	02.9	41.10	04	48.45	01.4	50.85	00.9
E17	7.65	14.3	36.35	00.2	40.40	18.8	48.90	00.2	51.67	00.2
SDW	–	–	36.67	00.3	41.73	00.1	49.02	00.1	50.32	00.5

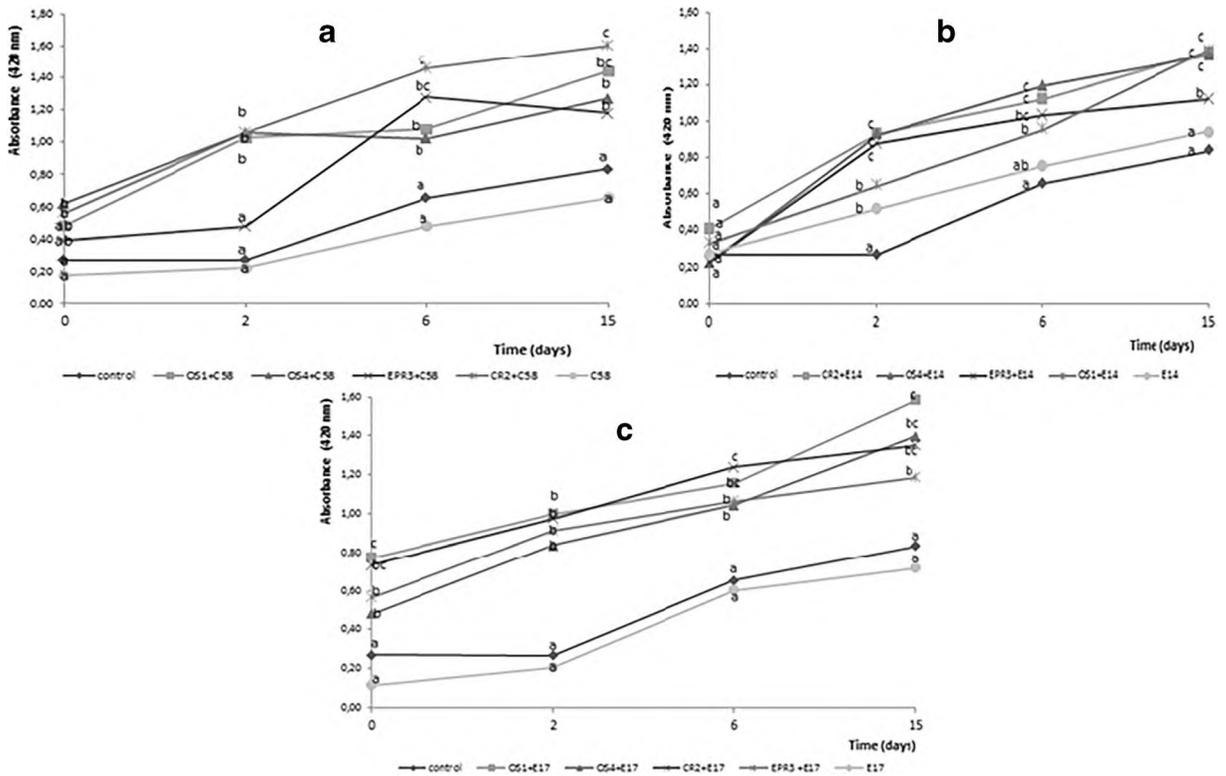


Fig. 4 Peroxidase activity in tomato plants treated with antagonistic (CR2, EPR3, OS4 and OS1) and pathogenic C58 (a), E14 (b), E17(c) strains. The same letter on the curves indicates that values did not differ statistically at LSD test ($P \leq 0.05$)

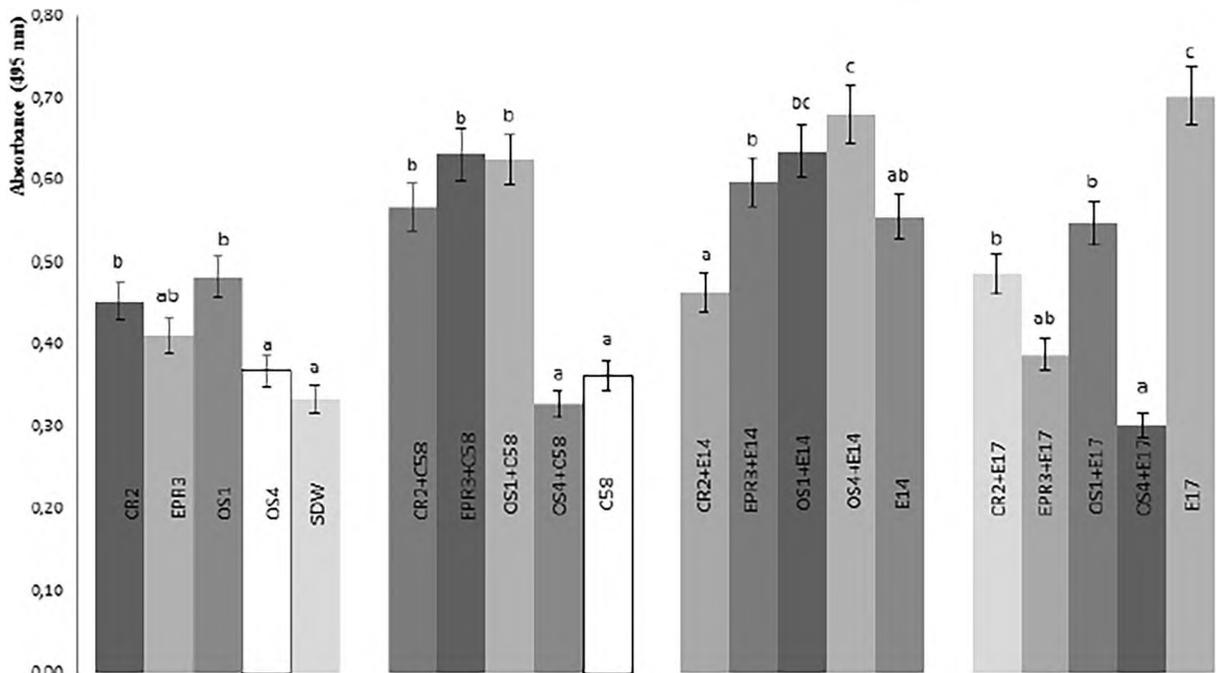


Fig. 5 Polyphenol oxidase activity in tomato plants at the end of the experiment (fifteen days after plant inoculation with the pathogen). The same letter on the top of the bars indicate that values are

not significantly different at LSD test ($P \leq 0.05$) within each group of treatments. Error bars represent standard error calculated on three repetitions

SA after pathogen inoculation. Once the pathogen is detected, the plant amplifies the production of SA and the expression of PR protein genes, which leads to the establishment of SAR (Hao et al. 2015). In this study, SA content was lower in healthy tomato plants in comparison to those treated with antagonistic bacteria and infected with *A. tumefaciens*. Such phenomenon has been described in many plant-microorganism interactions. *P. fluorescens* was a potent inducer of systemic resistance in many plant species (Saikia et al. 2006; Caihong and Qian 2007), however the magnitude of SA increase, differed according to the pathogen species and the inoculation method used. It is possible that SA accumulation in tomato plants by *Bacillus* and *Pseudomonas* strains was involved in the process of symptom mitigation induced by *A. tumefaciens*.

Similarly, the increased activity of PO in seed-primed tomato plants may be related to a mediated protection by *Bacillus* and *Pseudomonas* strains. PPO activity significantly differed in relation to the *A. tumefaciens* strain used to inoculate tomato plants. In fact, three of the four strains enhanced PPO activity in plants inoculated with strains C58 and E14 of *A. tumefaciens*, more than the two pathogenic strains alone. The inoculation of *A. tumefaciens* strain E17 on non-primed plants strongly stimulated PPO activity that instead was significantly reduced in seed-primed plants. Increased activity of PO, PPO and phenolic compounds has been observed as response to plant treatment with several bacterial species: tomato plants treated with *P. fluorescens* and *P. putida* showed a marked increase in defense related proteins active against *Ralstonia solanacearum* (Seleim et al. 2014; Murthy et al. 2014).

Plants are able to protect themselves against phytopathogenic agents by producing a wide range of antimicrobial compounds among which PO and PPO enzymes. The biosynthesis of these enzymes plays a crucial role in determining the degree of host-resistance in primed plants (Babu et al. 2015). Our results show that phenol compounds accumulation, PO and PPO activity in seed-primed tomato plants were strongly related to the characteristics of the antagonists (species, strain), of the pathogens (origin, virulence) and to the interaction of these factors. Among the beneficial strains tested, *P. brassicacearum* EPR3 was the most active in delaying the appearance and reducing the tumor size in tomato plants. The enhanced synthesis of phenolic compounds and the increased activity of

oxido-reductive enzymes may be involved in the mechanism of systemic resistance induced by this strain in tomato plants.

Acknowledgements The authors are grateful to Dr. Chemate Smail and Ms. Touati Souad for their valuable assistance in HPLC analyses.

Compliance with ethical standards

The research does not involve any human participants and/or animals. The materials in the article have not been published in whole or in part elsewhere and not currently being considered for publication in another journal.

Conflict of interest The authors declare that no known conflicts of interests exists.

References

- Aksoy, H. M., Kaya, Y., Ozturk, M., Secgin, Z., Onder, H., & Okumus, A. (2017). *Pseudomonas putida*-induced response in phenolic profile of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) infected by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Biological Control*, 105, 6–12.
- Altin, N., Bora, T. (2001). Biological control studies by *Fluorescent Pseudomonads* against to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Jones. *Bergey et al. Caused Soft Rot on Potato. Ninth Turkish Phytopathology Congress*, 3–8 Sept 2001, Tekirdag, Turkey, pp. 104–110.
- Babu, A. N., Jogaiah, S., Ito, S., Nagaraj, A. K., & Tran, L. P. (2015). Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*, 231, 62–73.
- Backert, S., & Meyer, T. F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 207–217.
- Beckers, G. J. M., & Conrath, U. (2007). Priming for stress resistance: From the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 425–431.
- Ben Abdallah, D., Frikha-Gargouri, O., & Tounsi, S. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 196–207.
- Caihong, H., Qian, Y. (2007). Advances in biocontrol mechanism and application of *Trichoderma* spp. for plant diseases. *Journal of Northeast Agricultural University*, v. 14, p.161–167.
- Dandurishvili, N., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Eliashvili, P., Giorgobiani, N., et al. (2010). Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumors on

- tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 341–351.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E. M., & Kuc, J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber of *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, 20, 73–82.
- Hao, F., Wang, L., Cao, K., Wang, X., Fang, W., Zhu, G., & Chen, C. (2015). Systemic acquired resistance induced by *Agrobacterium tumefaciens* in peach and differential expression of PR1 genes. *HortScience*, 50, 666–672.
- Kahla, Y., Zouari-Bouassida, K., Rezgui, F., Trigui, M. and Tounsi, S. (2017). Efficacy of *Eucalyptus cinerea* as a source of bioactive compounds for curative biocontrol of crown gall caused by *Agrobacterium tumefaciens* strain B6. *BioMed Research International*, 10 p.
- Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., Damodaran, T., Soorianathasundaram, K., & Samiyappan, R. (2007). Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. *Soil Biology Biochemistry*, 39, 1087–1098.
- Kawaguchi, A. (2013). Biological control of crown gall on grapevine and root colonization by nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain ARK-1. *Microbes Environments*, 28(3), 306–311.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3358–3365.
- Krimi, Z., Raio, A., Petit, A., Nesme, X., & Dressaux, Y. (2006). *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European journal of plant pathology*, 116, 237–246.
- Krimi, Z., Alim, D., Djellout, H., Tafifet L., Mohamed mahmoud F. et Raio A. (2016). Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp. and promote growth of tomato plants. *Phytopathologia mediterranea* 55, 2, 184–196.
- Maffei, M. E., Mithöfer, A., & Boland, W. (2007). Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68(22), 2946–2959.
- Magnin-Robert, M., Tritel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagiatti, S., & Aziz, A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 43–57.
- Mahmood, A., Turgay, O., Farooq, M., and Hayat, R. (2016). Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiology Ecology*, 92.
- Mayer, A. M., Harel, E., & Shaul, R. B. (1965). Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5, 783–789.
- Moore, L.W., Kado, C.I. and Bouzar, H. (1988). *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nded. New York, APS, Minnesota, USA. 158p.
- Murthy, K. N., Uzma, F., Chitreshree, & Srinivas, C. (2014). Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 1799–1811.
- Otten, L. Burr, T. Szegedi, E. (2008). *Agrobacterium*: A disease-causing bacterium. In: Tzifira T, Citovsky V, eds. *Agrobacterium: From biology to biotechnology*. New York, USA: Springer, 1–46.
- Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., and Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. V 76, Issue 2, P 76–81.
- Penyalver, R., and López, M. M. (1999). Co-colonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and non-pathogenic strains K84 and K1026, used for crown gall biocontrol. 65:1936-1940.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375.
- Pulawska, J. (2010). Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: Tumorigenic *Agrobacterium* spp. *Journal Plant Pathology*, 92, S87–S98.
- Raio, A., Peluso, R., Puopolo, G., & Zoina, A. (2009). Evidence of pAgK84 transfer from *Agrobacterium rhizogenes* K84 to natural pathogenic *Agrobacterium* spp. In an Italian peach nursery. *Plant pathology*, 58, 754–753.
- Rhouma, A., Ferchichi, A., Hafsa, M., & Boubaker, A. (2004). Efficacy of the non pathogenic *Agrobacterium* strains K84 and K1026 against crown gall in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 167–176.
- Rhouma, A., Bouri, 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. <https://doi.org/10.4454/jpp.v90i3.696>.
- Ryu, C. M., Murphy, J. F., Mysore, K. S., & Kloepper, J. W. (2004). Plant growth-promoting rhizobacterial systemically protect *Arabidopsis thaliana* against cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *The Plant Journal*, 39, 381–392.
- Saikia, R., Kumar, R., Arora, D. K., Gogoi, D. K., & Pzad, P. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* inducing rice resistance against *Rhizoctinia solani* production of salicylic acid and peroxidase. *Folia Microbiologica*, 51(5), 375–380.
- Seleim, M. A., Abo-Elyousr, K. A., Mohamed, A. A. A., & Al-Marzoky, H. A. (2014). Peroxidase and polyphenoloxidase activities as biochemical markers for biocontrol efficacy in the control of tomato bacterial wilt. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 2, 1.
- Seskar, M., Shulaev, V., & Raskin, I. (1998). Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiology*, 116(1), 387–392.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-58.
- Smith, L., Keefe, D. O., Smith, M., & Hamill, S. (2003). The benefits of applying rhizobacteria to tissue cultured bananas. *Banana Topics Newsletter*, 33, 1–4.
- Stonier, L. (1960). *Agrobacterium tumefaciens* (Conn II) – Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology*, 79, 880–898.
- Zieslin, N., & Ben-Zaken, R. (1993). Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31(3), 333–339.

PUBLICATION II

ÉVALUATION DU POTENTIEL DE SOUCHES ANTAGONISTES DE *BACILLUS* SPP. ET DE *PSEUDOMONAS* SPP. DANS LE CONTRÔLE D'*AGROBACTERIUM* SPP. PATHOGÈNES IMPLIQUÉS DANS LA MALADIE DE LA GALLE DU COLLET

DJELLOUT Hafidha^{1*}, MEKHELDI Delel¹, BELKACEM KOUMRI Khayra¹, RAIO Aida² et KRIMI Zoulikha¹

1. Université Saad Dahlab Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Biotechnologies, Laboratoire de Valorisation des Ressources Agrobiologiques, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie

2. Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante CNR, Via Madonna del Piano, 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI) Italy.

Reçu le 22/05/2019, Révisé le 08/06/2019, Accepté le 25/06/2019

Résumé

Description du sujet : Les bactéries antagonistes contribuent à la gestion des maladies des plantes en stimulant les défenses naturelles chez l'hôte et/ou en assurant le biocontrôle direct des bioagresseurs.

Objectifs : Étude du pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta* et la suppression de l'effet nécrotique *in vivo* de quatre souches préalablement identifiées appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* à l'égard de deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et deux souches d'*Agrobacterium vitis*.

Méthodes : Le pouvoir antagoniste *in vitro* a été évalué par la technique de spots, en utilisant deux techniques de confrontation. La suppression *in vivo* de l'effet nécrotique des souches d'*A. vitis* a été effectuée sur les rameaux verts de quatre variétés de vigne. L'antagonisme *in planta* a été réalisé sur des plantules de tomate et de vigne cultivées en serre.

Résultats : Les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* utilisées se sont montrées très actives *in vitro*, conduisant à une réduction ou une suppression des effets nécrotiques des souches pathogènes d'*A. vitis* et une diminution du développement des symptômes de la galle du collet *in planta*.

Conclusion : Ces résultats sont intéressants et suggèrent une utilisation prometteuse de ces souches antagonistes dans le biocontrôle de la galle du collet.

Mots clés : Antagonisme ; *Agrobacterium* ; pathogène, biocontrôle ; nécrose ; tumeur.

POTENTIAL EVALUATION OF ANTAGONISTIC *BACILLUS* SPP. AND *PSEUDOMONAS* SPP. TO CONTROL PATHOGENIC *AGROBACTERIUM* SPP. INVOLVED IN CROWN GALL DISEASES

Abstract

Description of the subject: Antagonistic bacteria contribute to the management of plant diseases by stimulating the host's natural defenses and/or by providing direct biocontrol of pests.

Objective: Study of *in vitro* and *in planta* antagonistic capacity and *in vivo* suppression of necrotic effects by using four strains belonging to the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* against two strains of *Agrobacterium tumefaciens* and two strains of *Agrobacterium vitis*.

Methods: *In vitro* antagonistic capacity was evaluated by the spot technique using two confrontation techniques. *In vivo* suppression of the necrotic effect of *A. vitis* strains was carried out on green shoots of four grapevine varieties and *in planta* antagonism test was performed on tomato and grapevine seedlings.

Results: *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. strains were very active *in vitro*, leading to a reduction and suppression of the necrotic effects of *A. vitis* strains and a decrease in the development of symptoms of the disease *in planta*.

Conclusion: These results are interesting and suggest a promising use of these antagonistic strains in biocontrol of crown gall.

Keywords: Antagonism; *Agrobacterium*; pathogenic; biocontrol; necrosis; tumor.

* Auteur correspondant : DJELLOUT Hafidha, E-mail:rahmdjellout-hafidha@outlook.fr

INTRODUCTION

La galle du collet constitue une grave maladie bactérienne qui peut engendrer des pertes économiques considérables pouvant aller jusqu'à 70% de la totalité de la production [1]. Elle est causée par plusieurs espèces d'*Agrobacterium* spp., qui constituent de dangereux parasites des végétaux et des cultures, car, une fois les plantes infectées, aucune pratique de lutte n'est efficace. Les bactéries responsables de cette maladie sont principalement ; *Agrobacterium vitis* et *Agrobacterium tumefaciens*. Ces deux bactéries provoquent la maladie du crown gall qui se manifeste par des tumeurs au niveau des racines et du collet des plantes. Dans le cas de la vigne, en plus des tumeurs sur les sarments et au collet, une nécrose racinaire apparente, constitue un symptôme supplémentaire aggravant l'infection. En Algérie, cette maladie a été révélée présente sur de nombreuses espèces cultivées en pépinière [2 ; 3], notamment sur des boutures de vigne en dormance. Sur la vigne, *Agrobacterium vitis* affecte la croissance et rend les plants très sensibles aux conditions environnementales comme le gel en période hivernale [1].

La prophylaxie est le seul moyen pour prévenir l'installation de cette maladie. L'utilisation des agents microbiens de lutte biologique constitue une approche écologique très prometteuse. Les microorganismes antagonistes colonisent les tissus de la plante et ont été décrits par ailleurs, comme stimulateurs de croissance sur l'hôte [4]. Ces souches antagonistes peuvent être facilement appliqués dans les pratiques des pépinières par l'immersion des racines des jeunes plants et boutures dans les inoculas bactériens avant la plantation [1].

Certaines souches bactériennes ont montré leurs effets protecteurs envers une large gamme de microorganismes phytopathogènes. Le cas le plus largement rapporté est celui de la souche *Agrobacterium radiobacter* K84 qui agit en induisant une inhibition de la formation des tumeurs chez plusieurs végétaux infectés par des souches tumorigènes d'*Agrobacterium* par production de l'agrocine 84 [5]. L'inefficacité de cette bactériocine vis-à-vis de plusieurs souches d'*Agrobacterium* a mené plusieurs études à rechercher de nouvelles souches antagonistes ayant le pouvoir de supprimer les dégâts causés par cette bactérie phytopathogène [6].

Deux genres bactériens telluriques et endophytiques *Bacillus* et *Pseudomonas* comprennent la majorité des bactéries utilisées comme antagonistes [7]. Ils sont connus par leur diversité de mécanismes d'action et de métabolites impliqués dans la protection des végétaux face aux différentes maladies [8]. De plus, les *Bacillus* offrent un avantage par rapport aux autres bactéries, en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu offrant ainsi un avantage pour la formulation du produit [9, 10].

L'objectif de cette étude consiste à évaluer le pouvoir antagoniste *in vitro* et *in planta* et la suppression de l'effet nécrotique *in vivo* de quatre bactéries appartenant à deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, initialement isolées de plantes spontanées [11], vis-à-vis de deux souches pathogènes d'*A. vitis* et de deux souches d'*A. tumefaciens*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes utilisées

Deux souches de *Pseudomonas brassicacearum* (CR2 et EPR3), la souche OS1 de *Bacillus cereus* et la souche OS4 de *Bacillus methylotrophicus* ont été isolées initialement à partir des plantes spontanées et identifiées par séquençage de l'ADN ribosomal 16S Krimi *et al.* [11]. Ces souches ont été sélectionnées sur la base de leur pouvoir antagoniste *in vitro* et de leur activité de stimulation de la croissance des plantes [11]. Les souches pathogènes d'*A. tumefaciens* dont ; une de référence C58 et une locale E2 isolée d'eucalyptus [3] ont servi pour les tests *in vitro* et *in planta*. Deux autres souches d'*A. vitis* (AV25/95 et Bu20/95) gracieusement fournies par Marilyn L. Canfield, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, Oregon, ont subi les mêmes tests que les précédentes. Toutes les souches d'*Agrobacterium* appartiennent à la collection de bactéries phytopathogènes de l'Université de Blida1 et ont fait l'objet de tests préliminaires de pathogénicité sur *Kalanchoë daigremantiana* et *Lycopersicum esculentum* [12].

2. Test d'antagonisme *in vitro*

Le pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* à l'égard des souches d'*Agrobacterium* pathogènes a été testé *in vitro* par deux techniques de confrontations :

- la première consiste à laisser un laps de temps (24 h) qui permet à la souche antagoniste de diffuser les molécules antimicrobiennes dans le milieu de culture avant le dépôt de la souche pathogène ; c'est la confrontation déphasée.
- La deuxième technique de confrontation simultanée, consiste à déposer les deux souches, antagoniste et pathogène en même temps.

2.1. La confrontation déphasée

La confrontation déphasée *in vitro* a été réalisée suivant la méthode décrite par Stonier [13] et modifiée par Moore *et al.* [12]. Les bactéries de *Pseudomonas* spp. et de *Bacillus* spp. à tester, ont été cultivées sur le milieu LPGA pendant 48 h à 28°C. Chaque souche bactérienne purifiée a été raclée des boîtes de Pétri contenant le milieu LPGA et mise en suspension dans l'eau distillée stérile (EDS) à une concentration connue (10^6 UFC/mL), déterminée par spectrophotométrie en comparant la DO de chaque suspension à sa propre courbe de croissance de référence à $\lambda=600$ nm. Un volume de 20 μ L de chaque suspension bactérienne a été ensemencé sous forme d'un spot central sur la surface des boîtes du milieu LPGA qui ont été incubées par la suite pendant 24 h à 28°C. En même temps, les bactéries pathogènes ont été ensemencées sur le milieu LPGA et cultivées dans les mêmes conditions décrites que les antagonistes. Après incubation, les suspensions de bactéries pathogènes (10^6 UFC/mL) préparées comme décrit ci-dessus, sont pulvérisées à l'aide d'un aérosol sur la surface des boîtes de Pétri contenant les souches bactériennes ensemencées auparavant en spot. Les boîtes de Pétri ont été incubées de nouveau pendant 48 h à 28°C et l'apparition d'une zone d'inhibition entourant la macro-colonie a été considérée comme une activité antagoniste positive. L'efficacité d'inhibition relative des différentes souches a été évaluée par la mesure du diamètre de chaque colonie en plus de la zone d'inhibition. L'expérience a été réalisée avec trois répétitions pour chaque souche.

2.2. La confrontation simultanée

La confrontation simultanée consiste à déposer les deux souches, antagoniste et pathogène en même temps. Pour réaliser ce type de confrontation, nous avons suivi le principe de la méthode des puits à double couche décrite par Rhouma *et al.* [14].

Des boîtes de Pétri sont coulées avec une couche solide du milieu LPGA, juste après la solidification de cette couche, une autre couche semi-solide du même milieu est coulée de nouveau sur la première. A l'aide d'un emporte-pièce stérile, trois puits de 0.8 mm de diamètre sont creusés sur la couche semi-solide ; ils correspondent par conséquent, à 3 répétitions par boîte et par souche. Ces boîtes de Pétri sont pulvérisées par la suspension de la souche pathogène d'*Agrobacterium* à une DO de 10^6 CFU/mL. Après pulvérisation, un volume de 20 μ L de la suspension de la bactérie supposée antagoniste est déposé dans chaque puits. Enfin, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48 h. Pour les témoins, nous avons pulvérisé le pathogène puis déposé de l'EDS dans les trois puits. L'apparition d'une zone d'inhibition claire entourant des puits a été considérée comme une activité antagoniste positive. Les résultats obtenus ont été enregistrés en mesurant le diamètre en mm des zones d'inhibition.

3. Essai *in vivo* de la suppression de l'effet nécrotique d'*Agrobacterium vitis* par l'utilisation des souches antagonistes

L'infection par les souches pathogènes d'*A. vitis* se manifeste principalement par la formation d'une tumeur au niveau du point d'inoculation et des nécroses au niveau des racines sur la vigne infectée [15,16]. Les quatre souches antagonistes sont testées pour examiner leurs capacités ou non à supprimer l'effet nécrotique des souches pathogènes d'*A. vitis* (AV20/95 et Bu25/95), cet essai a été réalisé en suivant la méthode décrite par Burr et Zheng [17]. Le matériel végétal est constitué de rameaux verts de vigne (*Vitis vinifera*) fraîchement cueillis présentant un diamètre entre 5 et 10 mm. Quatre variétés de vigne ont été testées : Gros noir, Cinsault, Muscat et la variété Ahmer Bouamer. Dans des conditions d'asepsie, la désinfection superficielle des rameaux verts des différentes variétés de vigne avant leur découpe a été faite dans de l'éthanol à 70 % pendant 2 min et dans l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0,5% pendant 10 min suivie de trois rinçages successifs à l'EDS. Les rameaux séchés sur du papier Wattman stérile sont découpés en sections cylindriques de 1 cm de longueur. Dans des microplaques de culture cellulaire à 12 alvéoles contenant une couche d'eau gélosée à 2 %, nous avons placé les sections de chaque variété en tenant l'extrémité basale de chaque section vers le haut.

Après fixation des sections sur le milieu gélosé, un volume de 10 µL de la suspension de la souche antagoniste et/ou de la souche

d'*A. vitis* (selon le traitement – tableau 1) est déposé.

Tableau 1 : Les différents traitements de l'essai *in vivo*.

Traitements	
T1	témoin négatif qui consiste à déposer de l'eau distillée stérile sur les sections de la vigne de chaque variété.
T2	témoin positif représenté par les sections de la vigne de chaque variété inoculée par la suspension de la souche pathogène d' <i>A. vitis</i> (soit AV25/95 ou Bu20/95).
T3	les sections de la vigne de chaque variété inoculées directement avec la suspension de souches antagonistes: EPR3, CR2, OS1 et OS4.
T4	Le traitement consiste à interagir le pathogène avec l'antagoniste en laissant un laps de temps de 20 min entre le dépôt de l'antagoniste et l'inoculation du pathogène.

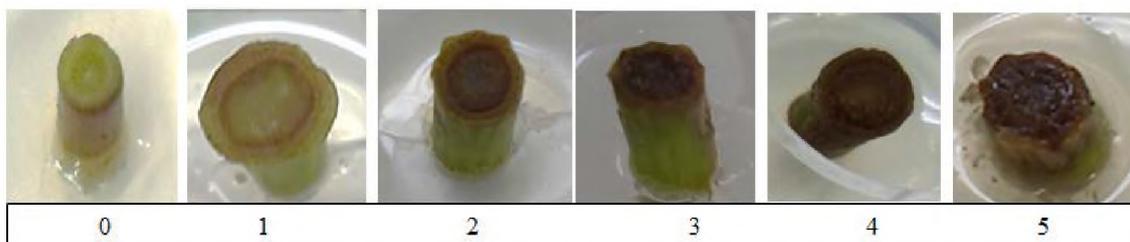
L'essai de suppression de l'effet nécrotique *in vivo* a été réalisé sur des microplaques de culture à 12 alvéoles selon un dispositif expérimental qui comporte plusieurs traitements. Une section cylindrique des rameaux verts de chaque variété avec trois répétitions pour chaque traitement, soit un total de 48 sections. Au total, pour tous les traitements de l'essai *in vivo*, nous avons utilisé 192 sections de rameaux. Pour la concentration cellulaire, nous avons appliqué le ratio 10:1 où la concentration de l'antagoniste est 10 fois supérieure à la concentration de la souche pathogène. La DO de la suspension de l'antagoniste a été ajustée à 0,22, elle correspond à une concentration de 10⁷ CFU/mL. La concentration de la souche pathogène correspond à 10⁶ CFU/mL (DO= 0,12). Les microplaques sont ensuite recouvertes avec du papier aluminium et placées à la température ambiante du

laboratoire pendant sept jours. Si la souche antagoniste possède une action inhibitrice de l'effet nécrotique vis-à-vis des souches pathogènes d'*A. vitis*, les sections des rameaux verts de la vigne vont garder une couleur plus ou moins verte par rapport aux témoins positifs inoculés par la souche pathogène qui noircisse. La sévérité de l'effet nécrotique au niveau des sections des rameaux verts est évaluée selon l'échelle de classe de 0 à 5 décrit par Oslane *et al.* [18] suivant le tableau 2. Les sections de rameaux verts de chaque variété testée ont été classées selon 5 classes de sévérité, puis l'indice de sévérité (IS%) a été calculé selon la formule suivante [19] :

IS% = $(\sum (Ni \times Si) / (Nt \times 5)) \times 100$. Ni : Nombre de sections de rameaux dans la classe de sévérité i, i allant de 1 à 5. Si : Numéro de classe de sévérité. Nt : Nombre total de sections observées par traitement.

Tableau 2 : Echelle d'estimation de la sévérité de l'effet nécrotique.

Classe de sévérité	Degré d'infection des sections des rameaux verts de la vigne
0	Pas d'effet nécrotique
1	Très peu nécrosé (passage du vert à une couleur sombre)
2	Peu nécrosé (brunissement)
3	Nécrosé (noircissement)
4	Plus nécrosé
5	La section de la vigne est totalement nécrosée (pourriture).



4. Essai d'antagonisme in planta

Le test d'antagonisme *in planta* a été mené sur des plants de tomate et de vigne. Le choix de tester l'activité antagoniste sur la tomate (*Lycopersicon esculentum*), est dû au fait qu'elle constitue une plante hôte utilisée lors des expérimentations pour les bactéries pathogènes d'*Agrobacterium*, car en cas de réponse positive, elle développe des tumeurs en un temps très court [20]. La variété testée est Saint Pierre (var. fixe). Pour la vigne (*Vitis vinifera*), elle constitue la principale plante hôte d'*A. vitis* [21]. La variété utilisée dans ce test d'antagonisme *in planta* est le Gros noir, les graines ont été récupérées en décembre 2012 à partir de grappes d'un vignoble situé à Bouchrahil (W. Médéa).

4.1. Méthodologie

Les semences de tomate et les graines de raisin ont été désinfectées dans une solution constituée de NaOCl à 2 % pendant 5 min, puis rincées à l'EDS. Les graines de raisin désinfectées, ont subi une pré-germination dans des boîtes de Pétri contenant une couche d'eau gélosée à 7% et mises dans un incubateur à 28 °C afin d'accélérer leur germination. Les plants de tomate et de vigne ont été cultivés sur un substrat composé d'un mélange de 2/3 de terre végétale et 1/3 de tourbe, soigneusement homogénéisés et autoclavés deux fois pendant 60 min à 120 °C,

avec un intervalle de 24 h entre chaque autoclavage. Le semis des graines de tomate et de la vigne pré-germées a été réalisé dans des pots (10 cm × 6,5 cm) en mini-serre, avec une photopériode quotidienne de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité à une température de 25±1°C. Au cours de l'expérience, un niveau adéquat d'humidité du substrat a été maintenu par une irrigation régulière. La sélection des plantules germées est faite après la germination des semences de tomate et de la vigne et avant leur inoculation par les bactéries antagonistes. Les plantes de tomates ont été choisies au stade de deux vraies feuilles pour que l'ensemble des plantes soit homogène et de même stade phénologique. Alors que pour les plants de la vigne, le choix des individus avait porté sur les plants ayant un diamètre qui oscille entre 5 et 10 mm avant l'inoculation et ce, dans l'objectif d'avoir une moindre hétérogénéité entre les plants testés. L'essai de l'antagonisme *in planta* a été réalisé sous serre selon un dispositif expérimental, en blocs complets avec plusieurs traitements (Tableau 3). Pour la tomate, six répétitions pour chaque traitement. Au total, pour tous les traitements de l'essai d'antagonisme sur la tomate, 90 plants ont été utilisés pour l'analyse pour chaque technique de confrontation (déphasée et simultanée). Pour la vigne, nous avons appliqué le même type de dispositif avec quatre répétitions pour chaque traitement, soit un total de 60 plants (pour chaque type de confrontation).

Tableau 3 : Les différents traitements de l'essai *in planta*.

Traitements	
T1	témoin négatif représenté par les plants inoculés avec l'eau distillée stérile.
T2	témoin positif représenté par le trempage des plants dans la suspension bactérienne d'antagoniste puis inoculation par blessure par les souches tumorigènes d' <i>Agrobacterium</i> (C58, E2, Bu20/95 et AV25/95).
T3	trempage des plants directement dans la suspension des souches antagonistes: EPR3, CR2, OS1 et OS4.
T4	inoculation par blessure des plantules avec les suspensions des souches tumorigènes d' <i>Agrobacterium</i> (C58, E2, Bu20/95 et AV25/95).

4.2. Techniques d'inoculation des plantules de tomate et de la vigne

4.2.1. Confrontation déphasée in planta

Les plantules de tomate et de vigne sont dépotées, rincées pour éliminer l'excès du sol puis trempées pendant 24 h dans la suspension de la bactérie sélectionnée à une densité cellulaire de 10⁶ CFU/mL [22]. Les plantules de tomate et de vigne traitées par l'antagoniste

seront par la suite inoculées par les souches pathogènes d'*Agrobacterium* (C58, E2, Bu20/95 et AV25/95) à une concentration cellulaire de 10⁶ CFU/mL. Le témoin négatif correspond à des plantes trempées dans l'EDS. Après 24 h, les plantes trempées sont re-transplantées dans leurs pots. Avec un scalpel stérile, on réalise trois blessures sur la tige de chaque plantule de tomate, à intervalle de 1 cm à partir de l'extrémité en croissance. Pour les

plantules de la vigne, nous avons réalisé deux blessures sur le rameau, la première au niveau du collet et la seconde située au niveau du premier entre-nœud. Un volume de 0,5 mL d'EDS ou de la suspension bactérienne de l'agent pathogène (selon le traitement) est introduit au niveau des blessures. La tige inoculée est ensuite enveloppée avec du papier aluminium stérile afin d'éviter la dessiccation de l'inoculum. Les plantules sont maintenues en serre à une température de 25 à 28°C, puis inspectées pour le développement des tumeurs.

4.2.2. Confrontation simultanée *in planta*

Le même protocole est suivi lors de la réalisation de la confrontation simultanée *in planta*, les plantules de tomate et de vigne sont trempées pour quelques secondes dans l'EDS ou dans la suspension de l'antagoniste (selon le traitement) puis immédiatement inoculées avec l'agent pathogène.

4.3. Evaluation du potentiel de biocontrôle de la maladie de la galle du collet pour l'essai d'antagonisme *in planta*

L'infection par les bactéries tumorigènes d'*Agrobacterium* se manifeste principalement par la formation d'une tumeur au niveau du point d'inoculation [21, 23]. L'efficacité des antagonistes bactériens dans la réduction du développement tumoral a été évaluée en enregistrant la taille des tumeurs, sept semaines après inoculation par le pathogène pour les plantules de vigne et neuf semaines pour les plantules de tomate.

5. Analyse statistique

L'activité antagoniste *in vitro* des souches antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium* est indiquée par des zones d'inhibition de croissance autour des spots et des puits des bactéries antagonistes. Un calcul de la moyenne des diamètres de la zone d'inhibition a été effectué. Les résultats obtenus pour le test *in vivo* de suppression de l'effet nécrotique d'*A. vitis* par l'utilisation des souches antagonistes et le test d'antagonisme *in planta*, ont été analysés par le logiciel statistique Systat (vers. 12). Nous avons analysé les conditions paramétriques considérées : les souches antagonistes, les souches d'*A. vitis*, et l'indice de sévérité de l'effet nécrotique (IS%). Le test ANOVA est effectué et la distribution de la variable quantitative doit être normale. Les résultats du test d'antagonisme *in planta* des souches antagonistes envers les souches d'*Agrobacterium*, ont été aussi analysés en

tenant compte de toutes les conditions paramétriques qui sont : les souches antagonistes, les souches d'*Agrobacterium*, la variation dans le temps, la variation de la position des tumeurs et la taille des tumeurs. Le test ANOVA est effectué et parallèlement, distribution de la variable quantitative à analyser doit être normale.

RESULTATS

1. Pouvoir antagoniste *in vitro* des souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus*

Les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* utilisées, ont montré une activité antagoniste vis-à-vis des souches d'*A. vitis* et d'*A. tumefaciens*. Les différentes souches antagonistes présentent un effet inhibiteur variable selon la souche pathogène d'*Agrobacterium* et selon le temps entre le dépôt de l'antagoniste et celui du pathogène (selon la technique de confrontation : simultanée ou déphasée).

Les quatre souches testées ont montré un effet antagoniste envers les quatre souches pathogènes d'*Agrobacterium* utilisés, les diamètres des zones d'inhibition varient de 21 à 50 mm. La souche d'*A. vitis* Bu20/95 a été la moins sensible avec des zones d'inhibition ne dépassant pas 22 mm sous l'effet des trois souches CR2, OS1 et OS4 par rapport à la souche AV25/95 et les autres souches d'*A. tumefaciens*. La souche CR2 a montré un effet antagoniste très important envers la souche AV25/95 avec un diamètre de zone d'inhibition de 39,33 mm, suivie par *B. methylotrophicus* OS4 avec 37,67 mm. La souche de *Pseudomonas* EPR3 a généré des zones d'inhibition de 50 mm à l'égard d'*A. tumefaciens* C58 (Tableau 4).

Tableau 4 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation déphasée *in vitro* des quatre bactéries antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium*.

Souches antagonistes	AV25/95	Bu20/95	C58	E2
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> CR2	39,33	22,33	27,6 7	35,0 0
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> EPR3	30,67	31,33	51,0 0	35,6 7
<i>Bacillus cereus</i> souche OS1	25,33	21,00	31,0 0	30,6 7
<i>Bacillus methylotrophicus</i> OS4	37,67	20,67	36,0 0	30,0 0

Pour la confrontation simultanée, le dépôt de l'antagoniste en même temps que le pathogène n'a pas empêché certaines souches à exprimer leur pouvoir inhibiteur.

La souche EPR3 de *P. brassicacearum* a enregistré une zone d'inhibition de 40 mm envers la souche d'*A. tumefaciens* C58, suivie par la souche de *B. methylotrophicus* OS4 qui a aussi montré une moyenne de zone d'inhibition de 34 mm avec la souche d'*A. vitis* AV25/95. Cependant, les deux souches CR2 et OS1 n'ont montré aucun effet antagoniste envers Bu20/95 avec absence totale de la zone d'inhibition (Tableau 5).

Tableau 5 : Moyenne des zones d'inhibition (mm) pour la confrontation simultanée *in vitro* des quatre bactéries antagonistes envers les souches pathogènes d'*Agrobacterium*.

Souches antagonistes	AV25/95	Bu20/95	C58	E2
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> CR2	28,00	00,00	24,00	31,33
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> EPR3	28,00	20,67	40,00	20,00
<i>Bacillus cereus</i> OS1	20,67	00,00	22,00	20,33
<i>Bacillus methylotrophicus</i> OS4	34,00	21,00	23,00	26,00

En général, la confrontation déphasée (24 h) a montré une activité antagoniste plus importante des souches de *Pseudomonas* et de *Bacillus* comparée à la confrontation de type simultanée (0 h) (Fig. 1).

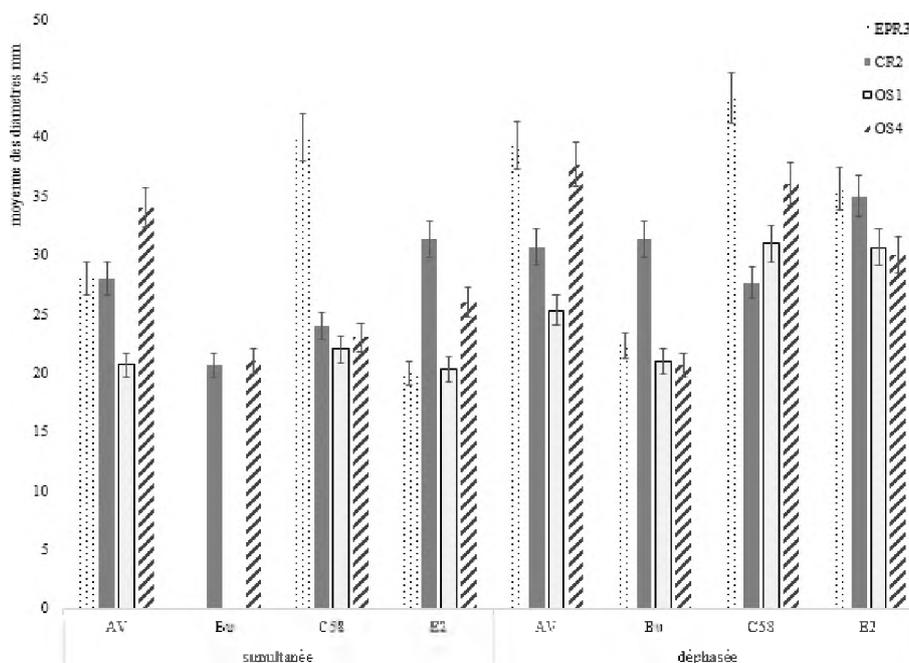


Figure 1 : Comparaison de l'inhibition *in vitro* pour les deux techniques de confrontation. (AV ; Bu ; E2 ; C58 : les bactéries pathogènes) (EPR3 ; CR2 ; OS1 ; OS4 : les bactéries antagonistes)

Les résultats obtenus pour les deux techniques de confrontation déphasée et simultanée montrent que l'écartement de temps attribué aux souches de *Bacillus* et *Pseudomonas* a influencé la capacité de ces souches à inhiber la croissance des pathogènes *in vitro* (Fig. 2).

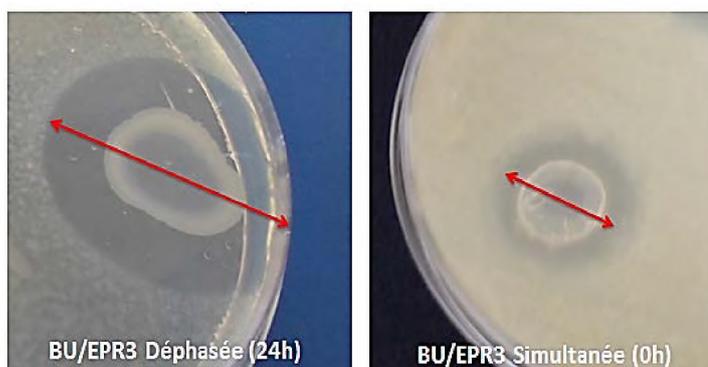


Figure 2 : Pouvoir antagoniste de *P. brassicacearum* souche EPR3 pour les deux techniques de confrontation *in vitro*.

↔ Diamètre de la zone d'inhibition. Bu : la souche Bu20/95 d'*A. vitis*.

2. Test *in vivo* de la suppression de l'effet nécrotique des souches d'*A. vitis* sous l'effet des souches antagonistes

Sept jours après l'incubation, des nécroses de teinte variables se sont développées sur les sections des rameaux verts des quatre variétés de vigne. Les variétés Gros noir et Ahmer

Bouamer semblent plus sensibles à l'effet nécrotique des deux souches d'*A. vitis* tandis que les variétés Muscat et Cinsault montrent des nécroses moins évidentes. Les nécroses sont apparues sur la partie basale des sections des rameaux verts de la vigne en manifestant une couleur variant du brun au noir (Fig. 3).

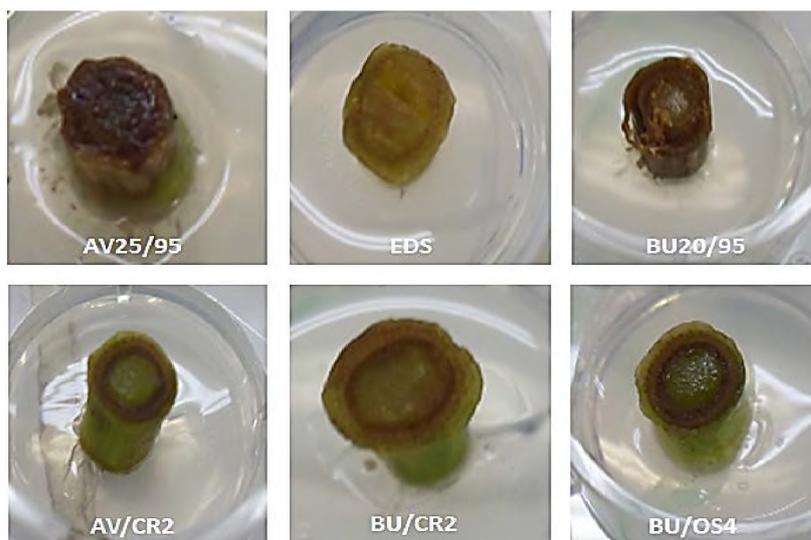


Figure 3 : Suppression ou réduction de l'effet nécrotique des souches pathogènes d'*A. vitis* par les souches antagonistes sur la variété Muscat 7 jours après incubation.

(AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d'*A. vitis*) (EDS : eau distillé stérile ; OS4 ; CR2 : les bactéries antagonistes)

La souche AV25/95 d'*A. vitis* s'est montrée plus virulente que la souche Bu20/95 en exprimant un indice de sévérité de l'effet nécrotique plus important sur les sections de la vigne. Les sections inoculées par cette souche ont développé des nécroses plus sévères que celles développées sur les sections inoculées par la souche Bu20/95, ce résultat a été observé sur toutes les variétés (Fig. 4).

Nous avons remarqué une variabilité dans l'apparition des nécroses causées par les pathogènes sur les quatre variétés (Fig. 4). La variété Gros noir s'est révélée la plus

sensible à l'effet nécrotique suivie par Ahmer Bouamer, l'indice de sévérité de l'effet nécrotique plus accentuées apparaît évident sur les sections des rameaux verts. Les variétés Cinsault et Muscat sont apparues moins sensibles en montrant un indice de sévérité de l'effet nécrotique moins développé par rapport aux deux autres variétés et en comparaison avec les témoins positifs inoculés directement avec les suspensions des souches d'*A. vitis*.

Les souches antagonistes ont montré un effet protecteur très important en supprimant ou/et en réduisant la sévérité de la nécrose en comparaison avec le témoin positif traité directement par la souche pathogène. Le traitement avec les souches antagonistes a montré un effet suppresseur de l'effet nécrotique causé par le pathogène (Fig. 5). La souche CR2 de *P. brassicacearum* a été la plus efficace en supprimant l'effet nécrotique des deux souches pathogènes sur les sections traitées des variétés Cinsault, Gros noir et Ahmer Bouamer. Sur la variété Muscat, la

souche la plus efficace était OS1 de *B. cereus* où une inhibition totale a empêché les deux souches d'*A. vitis* à exprimer leur pouvoir nécrotique sur les sections des rameaux qui sont restées vertes. Les sections de la vigne inoculées directement par les souches antagonistes de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas* spp. ont causé des nécroses très légères (brunissement) en comparaison avec les sections traitées avec l'EDS. L'indice de sévérité de l'effet nécrotique n'a pas dépassé 40%.

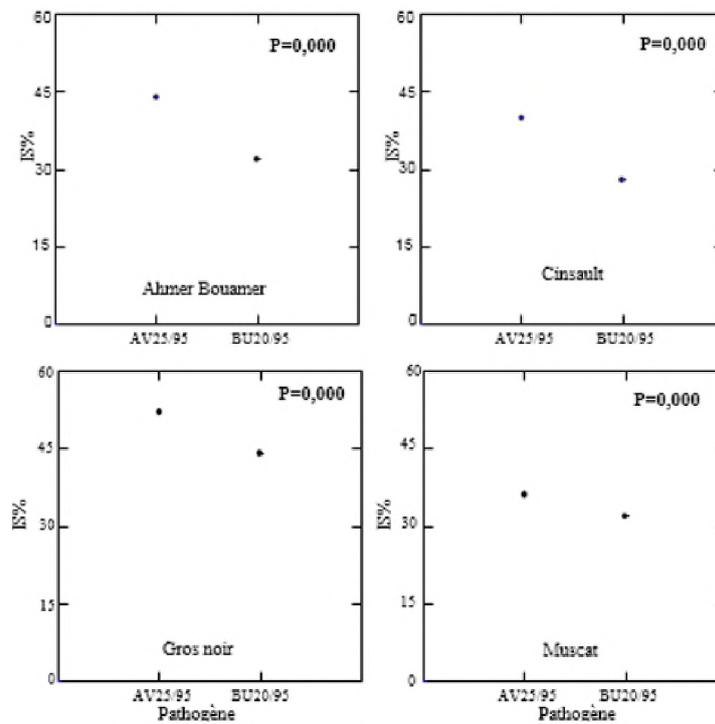


Figure 4 : Relation entre l'indice de sévérité et le pouvoir nécrotique *in vivo* des souches d'*A. vitis* sur les quatre variétés de vigne testées.

(IS% : indice de sévérité ; AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d'*A. vitis*) (CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes) (Gros noir ; Cinsault ; Muscat ; Ahmer Bouamer : les variétés de vigne utilisées)

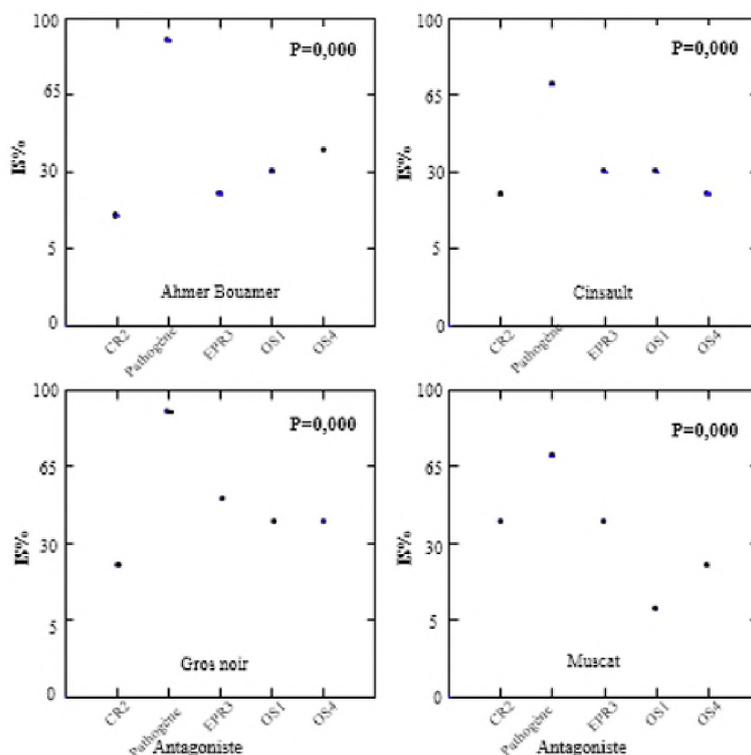


Figure 5 : Relation entre l'indice de sévérité et le pouvoir antagoniste *in vivo* des quatre antagonistes envers l'effet nécrotique des souches d'*A. vitis* sur les quatre variétés de vigne testées.

(IS% : indice de sévérité ; Pathogène : les souches AV25/95, Bu20/95 d'*A. vitis*) (CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes) (Gros noir ; Cinsault ; Muscat ; Ahmer Bouamer : les variétés de vigne utilisées)

3. Test d'antagonisme *in planta*

Les résultats obtenus nous ont permis de constater une diminution de la sévérité des symptômes du crown gall sur les plantules de tomate et de vigne préalablement trempées dans des suspensions bactériennes des antagonistes, comparées aux témoins qui correspondent aux plantules inoculées directement avec les souches d'*Agrobacterium*.

3.1. Confrontation déphasée *in planta*

Une réduction de la taille des galls formées sur les plantules de tomate et de la vigne préalablement trempées dans des suspensions des bactéries antagonistes ayant une concentration cellulaire égale à celle des souches pathogènes (10^6 CFU/mL) et pendant un délai de 24 h a été notée (Fig. 6 et 7).

3.2. Confrontation simultanée *in planta*

Pour la confrontation simultanée *in planta*, l'inoculation du pathogène juste après le trempage des plantules dans les suspensions des souches antagonistes a permis à ces dernières d'exprimer leur pouvoir antagoniste mais d'une façon très réduite. La durée de temps entre le trempage des plantules dans l'antagoniste et l'inoculation par le pathogène a influencé d'une manière hautement significative l'effet antagoniste des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* (Fig. 8 et 9).

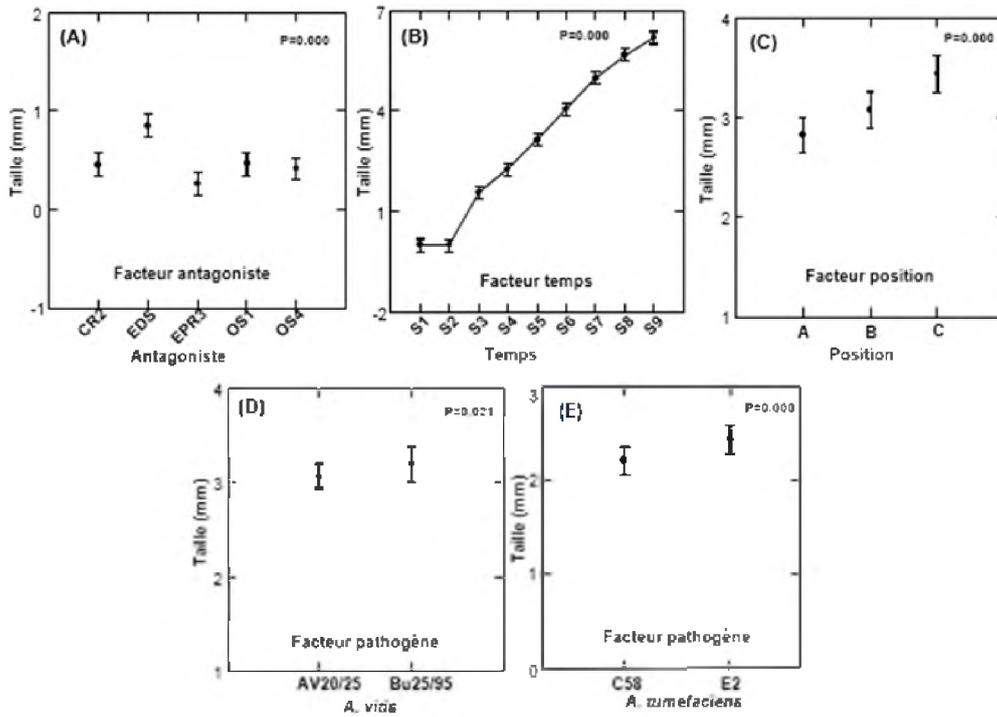


Figure 6 : Effet des souches antagonistes sur les souches pathogènes d’*A. vitis* et d’*A. tumefaciens* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de tomate (confrontation déphasée) représenté par la taille des tumeurs.

(Souches *A. vitis* : AV25/95, Bu20/95; souches d’*A. tumefaciens* : C58 et E2)- (les bactéries antagonistes testées : CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1, EDS : eau distillée stérile).(S1 ; S2, S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S9 : semaines de suivi après l’inoculation par le pathogène). (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).

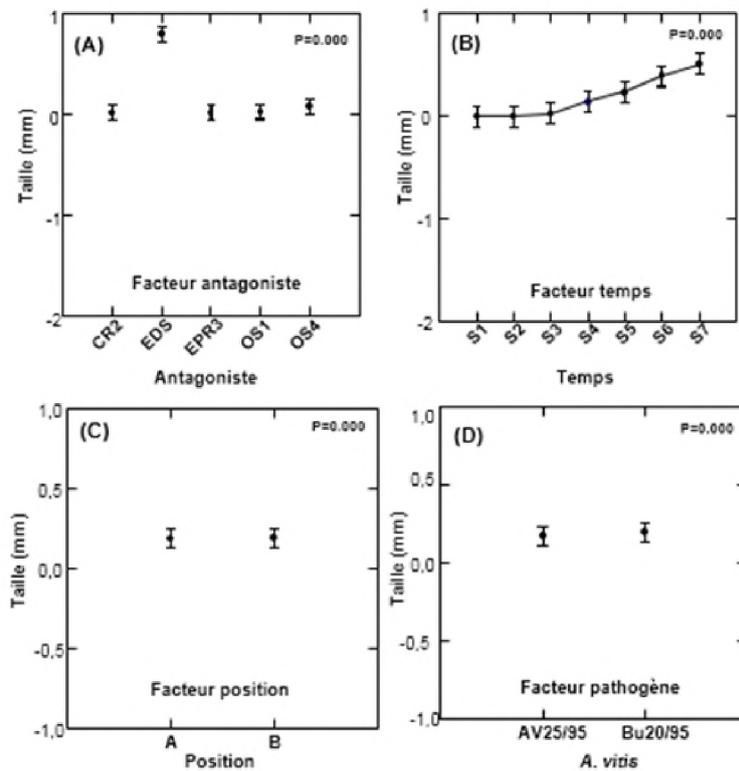


Figure 7 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d’*A. vitis* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantes de la vigne (confrontation déphasée) représenté par la taille des tumeurs.

(Les souches pathogènes d’*A. vitis* AV25/95 ; Bu20/95)- (les souches antagonistes : CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1).(S1 ; S2, S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 : semaines de suivi après l’inoculation par le pathogène).(Position A : au niveau de la partie supérieure de la tige ; position B : au niveau du collet).

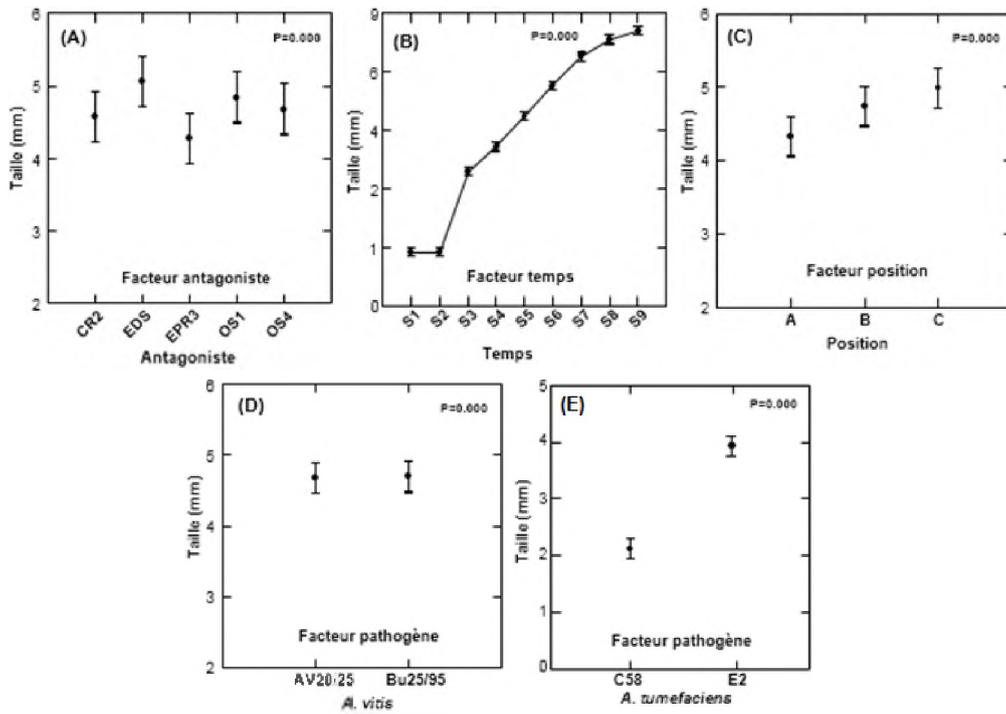


Figure 8 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d’*A. vitis* et d’*A. tumefaciens* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantules de la tomate (confrontation simultanée) représenté par la taille des tumeurs.

(AV25/95 ; Bu20/95 : les bactéries pathogènes d’*A. vitis* ; C58 et E2 : les souches d’*A. tumefaciens*)- (CR2 ; EPR3 ; OS4 ; OS1 : les bactéries antagonistes). (S1 ; S2, S3 ; S4 ; S5 ; S6 ; S7 ; S8 ; S9 : semaines de suivi après l’inoculation par le pathogène). (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).

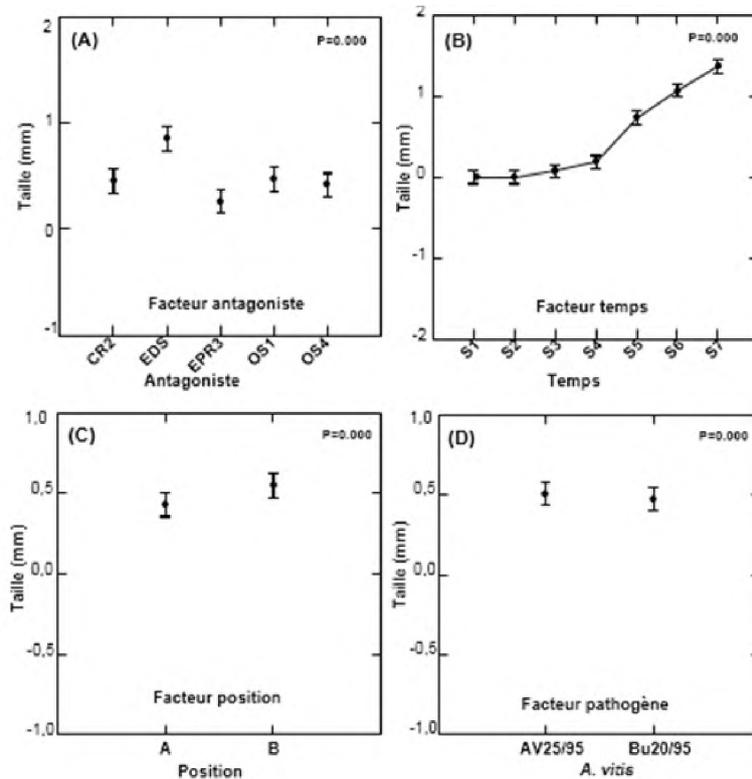


Figure 9 : Effet des antagonistes sur les souches pathogènes d’*A. vitis* en fonction du temps et de la position des blessures sur les plantes de la vigne (confrontation simultanée) représenté par la taille des tumeurs.

DISCUSSION

La présente étude a été menée dans le but de démontrer la capacité des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* isolées initialement des plantes spontanées [11], à prévenir le développement des tumeurs causées par des souches pathogènes d'*A. tumefaciens* et d'*A. vitis* sur la tomate et la vigne. Les résultats d'antagonisme *in vitro* de *Bacillus* et de *Pseudomonas* ont révélé l'efficacité de ces souches à inhiber la croissance des agrobactéries pathogènes lors des deux techniques de confrontation avec un ratio de concentration cellulaire 1:1.

Les bactéries antagonistes testées ont permis une inhibition élevée de la croissance bactérienne des pathogènes où des diamètres de 0 à 50 mm ont été enregistrés. Cette réduction de la croissance est un critère largement utilisé pour évaluer l'antagonisme microbien [24, 25]. L'activité antagoniste a été différente selon les souches, ce fait suggère que plusieurs substances antibactériennes impliquées dans l'inhibition ont été mises en jeu. Nos résultats concordent avec ceux de Frikha-Gargour *et al.* [26], qui ont montré que 32 souches de *Bacillus* isolées à partir d'échantillons environnementaux ont présenté une activité antibactérienne *in vitro* très importante contre la souche C58 d'*A. tumefaciens* [26].

Aussi, les travaux menés par Habbadi *et al.* [27], qui ont sélectionné 12 souches antagonistes appartenant aux genres *Bacillus*, *Pantoea* et *Acinetobacter*, ont montré une forte activité antibactérienne *in vitro* contre *A. vitis*. Ces résultats peuvent être expliqués par le pouvoir compétiteur très élevé présenté par les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* et qui leur permet de produire les métabolites antimicrobiens nécessaire pour empêcher la croissance du pathogène [8]. Une étude menée *in vitro* sur une souche de *Bacillus cereus* a montré que cette dernière a la capacité de modifier la composition ionique du milieu de culture en rendant le pH plus élevé, ce qui peut influencer la croissance normale du pathogène [28].

La plupart des souches de *Pseudomonas* utilisées dans le biocontrôle des maladies des plantes, sont capable d'inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro* [29].

Cette inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme d'antibiotiques tels que l'acide phenazine-1-carboxylique et les sidérophores [30, 31], se traduisant par la même par une capacité d'induction des mécanismes de défense chez la plante hôte [32].

Nos résultats indiquent aussi, que parmi les bactéries les plus actives du genre *Bacillus*, la souche OS4 a montré un fort pouvoir antagoniste *in vitro*. Le genre *Bacillus* produit une large gamme de métabolites secondaires tels que les antibiotiques, des composés non volatiles, des composés volatiles et des enzymes lytiques [33]. Cette même souche a montré à la fois des effets antagonistes *in vitro* sur d'autres bactéries phytopathogènes tels que *Erwinia amylovora* et *Pectobacterium carotovorum* et stimulateurs de la croissance sur des plants de tomate [11].

La seconde partie de ce travail consacrée à la suppression *in vivo* de l'effet nécrotique d'*A. vitis* par les souches de *Bacillus* spp. et de *Pseudomonas* spp. utilisées, a montré une action efficace des antagonistes testés. Les nécroses sont dues au fait que ces souches pathogènes d'*A. vitis* sont capables de sécréter la polygalacturonase responsable de la dégradation de la paroi de la cellule végétale chez la vigne [34]. La souche CR2 de *Pseudomonas brassicacearum* est la plus efficace, elle a permis la suppression de l'effet nécrotique des deux souches d'*A. vitis* sur les sections des rameaux verts des quatre variétés testées (Gros noir, Cinsault, Muscat et Ahmer Bouamer). Les antibiotiques synthétisés par les souches antagonistes peuvent être impliqués dans l'inhibition de la croissance d'*A. vitis* et par conséquent la réduction ou la suppression de son effet nécrotique [8]. Plusieurs souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* sont connues pour la fonction de synthèse d'enzymes lytiques, impliquées dans la dégradation de différents métabolites du pathogène entre autres, la polygalacturonase et d'autres enzymes comme la chitinase [35].

Les différentes variétés de vigne utilisées au cours de cette expérimentation ont répondu à l'inoculation des souches d'*A. vitis* d'une façon hétérogène. Cette différence de réaction peut être expliquée par la sensibilité des variétés de vigne envers les souches pathogènes même si elles sont toutes des cépages de *Vitis vinifera*, qui est une espèce connue comme susceptible à l'infection par *A. vitis* [21, 36].

Par ailleurs, l'inoculation des sections de tiges de vigne avec les souches antagonistes a conduit à l'apparition des brunissements sur les surfaces de ces sections (nécroses légères), expliquée par la sécrétion de molécules de défense tels que les composés phénoliques à l'égard de la paroi cellulaire des microorganismes en général pathogènes et non pathogènes [37].

Les résultats du test d'antagonisme *in planta*, révèlent l'efficacité des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* à l'égard des bactéries tumorigènes. L'efficacité *in vitro* s'est traduite par une réduction considérable de la taille des tumeurs chez les deux espèces végétales testées. La bactérisation avec chacune des souches antagonistes : *Bacillus cereus* (OS1), *Bacillus amyloliquefaciens* (OS4), et *Pseudomonas brassicacearum* (EPR3 et CR2) a limité l'installation et l'expression des souches d'*Agrobacterium*, qui s'est traduite par une réduction importante de la taille des galles formées sur la tige des plantules de tomate et de la vigne.

Les résultats de notre étude d'antagonisme *in planta* concordent avec plusieurs recherches qui ont montré que les souches *Pseudomonas aureofaciens* B-4117, *P. fluorescens* CR330D et la souche *Bacillus subtilis* EN63- ont réduit significativement la taille des tumeurs sur des boutures de vigne en dormance et sur d'autres plantes modèles [38,39].

La réalisation des deux techniques de confrontation pour l'interaction antagoniste/pathogène (déphasée et simultanée) *in planta* sur la tomate et la vigne, a confirmé l'influence de la durée du délai de 24 h sur l'efficacité des souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas*.

Une réduction de la taille des galles développées sur les plantules de tomate et de la vigne lors de la confrontation de type déphasée a été notée (24 h) alors que ces mêmes souches ne l'ont pas permis lors de la confrontation simultanée (0h).

La protection conférée aux plantules de tomate et de la vigne inoculées par les souches d'*Agrobacterium* pathogènes au niveau des blessures induites sur la tige alors que la bactérisation par les souches antagonistes a été faite au niveau racinaire, ce qui suggère un effet d'induction systémique de la résistance (ISR), du fait que ces dernières (les bactéries antagonistes) ne sont pas en contact avec l'agent phytopathogène (résultats de travaux en cours d'exploitation).

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 de la tomate et de la vigne [32, 40]. L'élicitation de l'ISR peut être induite par des molécules synthétisées par les souches antagonistes testées. Parmi les molécules élicitrices de défense chez l'hôte végétal les pyoverdines produites par les espèces fluorescentes de *Pseudomonas*. Ce sont des molécules chélatrices du fer (sidérophores) ayant une forte affinité pour les ions Fe^{3+} qui ont inféré une ISR chez *Arabidopsis thaliana*, le haricot, la tomate et l'eucalyptus [41]. Certains composés volatiles semblent aussi avoir une activité élicitrice de l'ISR. Dans ce même contexte, Ryu et ses collaborateurs ont observé que le butanediol, produit par *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a et *B. subtilis* GB03 diminuait significativement l'impact de certains microorganismes phytopathogènes [42]. L'analyse des molécules à l'origine de cet effet serait d'une grande importance afin de compléter ces résultats.

L'utilisation de la tomate et de la vigne comme plantes hôtes nous a permis de suggérer une nette dissemblance entre les réponses de ces deux plantes à l'inoculation par l'antagoniste puis par le pathogène. Toutes les plantes de la tomate ont développé des galles de taille différente (selon la souche antagoniste en interaction avec la souche pathogène) tandis que certaines plantes de la vigne n'ont développé aucune galle. Des études ont montré que les voies métaboliques activées dans le cadre de l'ISR varient en fonction de l'espèce végétale même si le microorganisme inducteur est identique [43].

Concernant la position des blessures causées sur les tiges pour favoriser la formation des galles, nous avons constaté que la blessure située auprès du collet s'est avérée la plus sensible à l'infection en présentant des galles de grande taille par rapport aux autres positions, ce qui peut être dû à la dissemblance entre les tissus de la même plante dans les différentes positions [44].

Notre étude a confirmé le pouvoir antagoniste des quatre souches initialement endophytes (EPR3, CR2, OS1 et OS4) envers les souches tumorigènes d'*Agrobacterium* avec inhibition de la croissance des pathogènes *in vitro* et réduction des effets nécrotiques et tumorigènes *in vivo* et *in planta*.

La concentration cellulaire des antagonistes utilisée s'est avérée efficace *in vitro* mais elle n'a pas montré la même efficacité *in planta*.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que les souches de *Bacillus* et de *Pseudomonas* étudiées peuvent être utilisées comme une source importante de réduction des dégâts de la maladie de la galle du collet tout en intégrant d'autres mesures de lutte. Notre étude de la bioprotection de la tomate et de la vigne par utilisation de ces mêmes bactéries se poursuit par l'étude des mécanismes de défense biochimiques impliqués dans l'induction de la résistance à *A. vitis* et à *A. tumefaciens* afin de révéler les changements sur les composés essentiels qui répriment l'effet nécrotique d'*A. vitis*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Limanska N. (2012). Prevention of grape crown gall. *Microbiology and Biotechnology*, 1 (17): 6-21.
- [2]. 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
- [3]. Krimi Z., Raio A., Petit A., Nesme X. and Dessaux Y. (2006). *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 237-246.
- [4]. Bazzi C., Alexandrova M., Stefani E., Anaclerio F. and Burr T.J. (1999). Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic agrobacteria. *Vitis*, 38(1) :31-35.
- [5]. Kerr A. (1972). Biological control of crown gall: Seed inoculation. *Journal of Applied Bacteriology*, 35: 493-497.
- [6]. Rhouma A., Bouri M., Boubaker A. and 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.
- [7]. Roopa B., Maya C. and Makar H.K. (2012). Effect of different PGPR strains along with *Rhizobium* on nodulation and chickpea productivity. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 3: 424-426.
- [8]. Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M. and Lelie D.V. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21:586-606.
- [9]. Raaijmakers J.M., Vlami M. and De Souza J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antony Leeuwenhook*, 81:537-547.
- [10]. Cavaglieri L., Orlando J., Rodriguez M.L., Chulze S. and Etcheverry M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research Journal of Microbiology*, 156 (5-6) :748-754.
- [11]. Krimi Z., Alim D., Djellout H., Tafifet L., Mohamed Mahmoud F. and Raio A. (2016). Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., and promote growth of tomato plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(2): 184-196.
- [12]. Moore L.W., Kado C.I. and Bouzar H. (1988). *Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. New York, APS, Minnesota, USA. 158 p.
- [13]. Stonier L. (1960). *Agrobacterium tumefaciens* (Conn II). Production of antibiotic substance. *Journal of Bacteriology*, 79: 880-898.
- [14]. Rhouma A., Bouri M., Boubaker A. and 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(3): 517-526
- [15]. Burr T.J., Katz B.H. and Bishop A.L. (1987). Populations of *Agrobacterium* in vineyard and non vineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Disease*, 71: 617-620.
- [16]. Stewart E.L. and Wenner N.G. (2004). Grapevine decline in Pennsylvania and New York. *Wine East July*, 32(2): 12-21.
- [17]. Burr T.J. and Zheng D. (2012). Grape crown gall biological control by necrosis-minus mutants of non-tumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. Cornell University, New York, USA. College of Agriculture and Life Sciences.
- [18]. Oslane I., El yousfi B. Ouabbou H. , El younsi A. et tellal R. (2014). Evaluation de la sévérité et de la tolérance d'une collection marocaine du blé dur aux pourritures racinaires. *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, 5: 17-30
- [19]. Cooke B.M. (1998). *Disease assessment and yield loss*. In DG Jones (Ed.), the Epidemiology of plant disease. Kluwer Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 42-71.
- [20]. Szegedi E. (1985). Host range and specific L(+) tartrate utilization of biotype 3 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 20:17-22.

- [21]. Burr T.J., Bazzi C., Süle S. and Otten L. (1998). Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease*, 82: 1288–1297.
- [22]. Snatiago T. R., Grabowski C., Rossata M. and Romeiro R. S. (2015). Biological control of eucalypt bacterial wilt with rhizobacteria. *Biological control*, 80 : 14-22.
- [23]. Eastwell K.C., Sholberg P.L. and Sayler R.J. (2006). Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Protection*, 25 (11):1191-1200.
- [24]. Siddiqui I.A. (2001). Effect of microbial antagonists on *in vitro* growth of *Phytophthora aphanidermatum*. *Online Journal of Biological Sciences*, 1(4): 224-226.
- [25]. Bardin S.D., Huang H.C., Liu L. and Yanke L.J. (2003). Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, sunflower, dry pea and sugar beet. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25(3):268-275.
- [26]. Frikha-Gargouri O., Ben Abdallah D., Bhar Land Tounsi S. (2017). Antibiosis and *bmyB* Gene Presence As Prevalent Traits for the Selection of Efficient *Bacillus* Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. *Frontiers in Plant Science*, 14 August 2017, Volume 8, Article 1363 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01363>
- [27]. Habbadi Kh., Benkirane R., Benbouazza A., Bouaichi, A., Maafa I., Chapulliot D. and Achbani. E. (2015). Biological Control of Grapevine Crown Gall Caused by *Allorhizobium vitis* using Bacterial Antagonists. *International Journal of Science and Research*, Volume 6 Issue 6, June 2017. DOI: 10.21275/ART20174478
- [28]. Emmert E.A.B. and Handelsman J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171: 1-9.
- [29]. Ongena M. and Thonart P. (2006). *Resistance induced in plants by non-pathogenic microorganisms: elicitation and defense responses*. In: Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. 1st ed. Japan: Global Science Books, 447-463.
- [30]. Weller D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97 (2): 250-256.
- [31]. Sunich Kumar R., Ayyadurai N., Pandiaraja P., Reddy A. V., Venkateswarlu Y., Prakash O. and Sakathivel 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.
- [32]. Jourdan E., Ongena M. et Thonart P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 12(4): 437-449.
- [33]. Kloepper J.W., Ryu C.M. and Zhang S.A. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259-1266.
- [34]. McGuire R.G. et al. (1991). Polygalacturonase production by *Agrobacterium tumefaciens* Biovar-3. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 660–664.
- [35]. Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J. and Moe" nne-Loccoz Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent *Pseudomonads* as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 505–512
- [36]. Roh J.H., Yun H.K., Park K.S., Lee C.H. and Jeong S.B. (2003). *In vivo* evaluation of resistance of grape varieties to crown Gall disease. *Plant Pathology Journal*, 19(5): 235-238
- [37]. Benhamou N. and Rey P. (2012). Elicitors of natural plant defense mechanisms : a new management strategy in the context of sustainable production. Review Article. *Journal Phytoprotection*, 92(1): 1–23.
- [38]. Khmel I.A., Sorokina T.A., Lemanova N.B., Lipasova V.A., Metlitski O.Z., Burdeinaya T.V. and Chernin L.S. (1998). Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 45-57.
- [39]. Eastwell K.C., Sholberg P.L. and Sayler R.J. (2006). Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Protection*, 25:1191-1200.

- [40]. **Van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M. (2005).** *Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria.* In: Siddiqui Z.A., ed. *PGPR: Biocontrol and biofertilization.* Dordrecht, The Netherlands: Springer, 39-66.
- [41]. **Höfte M. and Bakker P.A.H.M. (2007).** *Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria.* In: *Soil biology: Microbial siderophores.* Heidelberg, Germany: Springer- Verlag Berlin, 121-133.
- [42]. **Ryu C.M. et al. (2004).** Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134 : 1017- 1026.
- [43]. **Adam A. (2008).** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de doctorat. Université de Liège, France. 166 p
- [44]. **Creasap J. E., Reid C. L., Goffinet M. C., Aloni R., Ullrich C., and Burr T. J. (2004).** Effect of Wound Position, Auxin, and *Agrobacterium vitis* Strain F2/5 on Wound Healing and Crown Gall in Grapevine. *Phytopathology*, 95(4): 362-367.