



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FES**



**DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

**PRESENTE EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME**

**DE**

**MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES**

**"BIOTECHNOLOGIE MICRO**

**Isolement et détection moléculaire et  
biochimique d'*Agrobacterium tumefaciens***

◆ **Présenté par : AZZAOUI Naziha**

◆ **Encadré par : Pr. TAHIRI Abdesslem**

**Pr. HAGGOUD Abdelattif**

**Soutenu le 19 juin 2019 devant le jury composé de :**

- **Pr. TAHIRI Abdesslem : ENA Mèknes**
- **Pr. HAGGOUD Abdelattif : FST Fès**
- **Pr. IRAQUI HOUSSAINI Mohamed : FST Fès**
- **Pr. GUISSI Sanae : FST Fès**

**Année universitaire : 2019/2020**

*Je dédie ce travail :*

*A mes Parents.*

*A mes Frères et Sœurs*

*A mes Amis*

*A tous ceux qui me sont chers.*

## *REMERCIEMENTS*

Je tiens tout d'abord à remercier Le Professeur **TAHIRI Abdessalem**, enseignant chercheur au Département de la Protection des Plantes et de l'Environnement à l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Vous avez rendu possible la réalisation de ce travail, ainsi que le temps que vous m'avez consacré, vos critiques pertinentes et votre esprit de synthèse ont été des éléments déterminants dans la valorisation de ce travail. Aussi, pour l'encadrement que vous m'avez prodigué, vos directives, votre disponibilité permanente, ainsi que vos encouragements continus qui m'ont poussé vers l'excellence au travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent au Professeur **HAGGOUD Abdelattif**, enseignant chercheur au Département de Biologie à la Faculté des Sciences et Technique de Fès, de m'avoir guidée avec délicatesse et rigueur tout au long de la rédaction de ce manuscrit. Je ne trouverai jamais les mots les plus appropriés pour exprimer la reconnaissance que je lui porte pour tous ses conseils, pour ses encouragements et pour toutes les fois qu'il a trouvé le temps nécessaire pour m'écouter.

Je suis reconnaissant aux membres de jury **Pr. IRAQUI HOUSSAINI Mohamed** et **Pr. GUISSI Sanae** qui m'ont honoré en acceptant d'examiner mon travail et l'enrichir par leur critique et conseils.

Mes sincères remerciements vont aussi aux doctorants à l'ENA de Meknès, leurs directives précieuses, leurs grandes sympathies et leur rigueur scientifique m'ont profondément marqué.

## **RÉSUMÉ**

Le Crown Gall est une maladie bactérienne causée par *Agrobacterium tumefaciens* et se manifeste par des tumeurs sur le collet des arbres fruitières, rosier et plantes ornementales. Dans cette étude, différents échantillons (pommier et amandier) porteurs des tumeurs au niveau du collet sont utilisés pour l'isolement de cette bactérie. Après l'isolement sur deux milieux spécifiques MG-Te et 1A-Te, les isolats ont montré le caractère cultural d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le K<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Te incorporé dans le milieu MG à une concentration de 200 mg/ml a amélioré la sélectivité de ce milieu. Par ailleurs, les tests biologiques de ces mêmes isolats, ont montré l'induction des nécroses sur les feuilles de tabac inoculées et formation des tumeurs sur les disques de carotte. La détection moléculaire d'*A. tumefaciens* a été faite par deux variantes de la PCR : La Bio-PCR qui consiste à la détection des bactéries à partir d'une culture pure et la PCR directe qui se base sur la détection des bactéries directement à partir d'une plante infectée sans passer par l'étape de l'isolement et de la purification de la bactérie sur un milieu de culture. Plusieurs protocoles d'extraction d'ADN faciles, fiables, moins coûteux et avec une sensibilité élevée sont évalués pour chaque variante, en utilisant le couple d'amorce A/E', permettant l'amplification du gène de virulence *virD2*. Cette amplification est matérialisée par une bande de 338pb après électrophorèse. Les protocoles de lyse cellulaire adoptés pour la Bio-PCR sont positifs pour la détection de la bactérie. Par ailleurs, parmi les différents protocoles de détection moléculaire directement des plantes infectées, le protocole d'extraction d'ADN par le tampon d'extraction contenant le polyvinylpyrrolidone (PVP) et la lyse cellulaire par le détergent Triton X100 ont abouti aux résultats escomptés.

La caractérisation biochimique des dix isolats obtenus a montré la capacité des huit isolats (I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7 et I8) de la production de 3-cétolactose, l'uréase et l'esculinase, ce qui confirme leurs appartenances au biovar 1 qui correspond à l'espèce *A. tumefaciens* selon la nomenclature actuelle.

**Mots clés :** Rosacés, Galle du collet, *Agrobacterium tumefaciens*, Bio-PCR, PCR directe, biovar.

# TABLE DES MATIERS

Dédicace	
Remerciements Résumé	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
<b>Partie I : Etude bibliographique</b>	
<b>I. Maladie de la galle de collet : Crown Gall.....</b>	<b>4</b>
1. Généralité.....	4
2. Plantes hôtes.....	4
3. Répartition de la maladie.....	5
4. Perte économique.....	6
5. Symptomatologie.....	7
6. Agent causal : <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	8
6.1. Le genre <i>Agrobacterium</i> .....	8
6.1.1. Caractéristiques cellulaires et métaboliques.....	8
6.1.2. Données taxonomiques.....	9
6.2. La structure du génome <i>d'A. tumefaciens C58</i> .....	9
7. Processus d'infection <i>d'Agrobacterium tumefaciens</i> .....	10
7.1. Reconnaissance bactérie / hôte.....	11
7.1.1. Fixation aux cellules hôtes.....	11
7.1.2. Activation des gènes de virulence.....	12
7.2. Transfert d'ADN-T.....	12.
7.2.1. Translocation du brin T dans la cellule végétale.....	12

7.2.2. Translocation du brin T dans la cellule végétale.....	13
7.2.3. Intégration dans le génome de l'hôte.....	13.
8. Tumorigenèse.....	13
8.1. Expression des gènes d'ADN-T associés au développement de la tumeur.	13
8.1.1. Synthèse d'hormones.....	13
8.1.2. Synthèse des opines.....	14
8.1.2.1. Synthèse.....	14
8.1.2.2. Rôles des opines.....	14
8.2. Structure de la tumeur.....	15
8.3. Source d'inoculum et condition favorable pour l'induction de tumeur.	15
9. Contrôle de la maladie .....	16
10. Moyens de lutte contre la maladie.....	16
10.1. Lutte préventive et culturale.....	16
10.2. La lutte génétique.....	16
10.3. La lutte physique.....	17
10.4. La lutte biologique.....	17
<b>II. Détection des bactéries phytopathogène .....</b>	<b>17</b>
1. Généralité .....	17
2. Détection.....	18
2.1 Détection d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	19

## Partie II : Matériel et méthodes

<b>I. Matériel biologique.....</b>	<b>23</b>
<b>II. Méthodes.....</b>	<b>23</b>
1. Isolement de la bactérie.....	23
2. Purification des souches.....	24

2.1. Sur milieu MG-Te .....	24
2.2. Sur milieu 1A-Te.....	24
2. Conservation des isolats.....	24
<b>III. Test du pouvoir pathogène .....</b>	<b>25</b>
1. Teste d'hypersensibilité sur tabac .....	25
2. Reproduction des symptômes.....	25
2.1 Sur carotte.....	25
<b>IV. Diagnostic moléculaire.....</b>	<b>26</b>
1. Détection par Bio-PCR.....	26
1.1 Protocoles d'extractions d'ADN .....	26
1.2 Amplification par PCR standard .....	27
1.2.1 Mélange réactionnel.....	28
1.2.2 Migration sur gel d'agarose. ....	28
2. Détection par PCR direct.....	29
2.1 Protocoles d'extractions d'ADN .....	29
2.2 Amplification par PCR standard .....	30
2.2.1 Mélange réactionnel.....	30
2.2.2 Migration sur gel d'agarose. ....	31
<b>VI. Identification des biovars.....</b>	<b>32</b>
1.Exemen microscopique.....	32
2. Test de 3-cétolactose.....	32
3. Test d'uréase.....	33
4. Test d'esculinase .....	33

## **Partie III : Résultats et discussion**

<b>I. Isolement d'<i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	36
1. Sur MG-Te.....	36
2. Sur 1A-Te.....	37
3. Comparaison entre les deux milieux.....	38
<b>II. Test du pouvoir pathogène</b> .....	40
1. Test d'hypersensibilité sur tabac.....	40
2. Reproduction des symptômes.....	41
2.1 Sur carotte.....	41
<b>III. Diagnostic moléculaire</b> .....	41
1. Evaluation des protocoles.....	41
1.1 Détection par Bio PCR.....	41
1.2 Détection par PCR direct.....	44
<b>IV. Caractérisation biochimique</b> .....	46
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	50
<b>Références bibliographiques</b> .....	52
<b>Annexes</b> .....	I

## LISTE DES FIGURES

N°	TITRE	PAGE
<b>1</b>	Distribution du crown- Gall dans le monde	<b>5</b>
<b>2</b>	Distribution du crown- Gall au Maroc	<b>6</b>
<b>3</b>	Symptômes causés par <i>A. tumefaciens</i> . (a) vieillissement de la tumeur au niveau du collet. (b) Développement des tumeurs : blanchâtres, jaunâtres et fraîches	<b>7</b>
<b>4</b>	Carte génétique du plasmide Ti et de ses différentes régions géniques	<b>10</b>
<b>5</b>	L'infection de la plante par <i>d'A. tumefaciens</i> induit le développement d'une galle	<b>11</b>
<b>6</b>	Aspect des colonies <i>d'A.tumefaciens</i> sur le milieu MG tellurite	<b>26</b>
<b>7</b>	Aspect des colonies <i>d'A.tumefaciens</i> sur le milieu LPGA (A). sur le milieu MG (B)	<b>27</b>
<b>8</b>	Aspect des colonies <i>d'A.tumefaciens</i> sur le milieu 1A-Te	<b>28</b>
<b>9</b>	Aspect des colonies <i>d'A.tumefaciens</i> sur le milieu YMA	<b>28</b>
<b>10</b>	Réaction d'hypersensibilité sur feuilles de tabac. (A) par <i>A.tumefaciens</i> . (B) témoin négatif par E.D.S.	<b>40</b>
<b>11</b>	Test de phytopathogénicité sur les disques de carotte. Croissance de la galle (tumeur) autour du système vasculaire central. (A) et(B)Contrôle positif, (C)témoin négatif : inoculation par EDS	<b>41</b>
<b>12</b>	Profil électrophorétique de l'ADN <i>d'A. tumefaciens</i> extrait par Bio PCR par usage de couple d'amorce A/E' selon le protocole 1	<b>42</b>
<b>13</b>	Profil électrophorétique de l'ADN <i>d'A. tumefaciens</i> extrait par Bio PCR par usage de couple d'amorce A/E' selon le protocole 2	<b>42</b>

<b>14</b>	Profil électrophorétique de l'ADN <i>d'A. tumefaciens</i> extrait par Bio PCR par usage de couple d'amorce A/E' selon le protocole 3	<b>42</b>
<b>15</b>	Profil électrophorétique de l'ADN <i>d'A. tumefaciens</i> extrait par Bio PCR par usage de couple d'amorce A/E' selon le protocole 4	<b>42</b>
<b>16</b>	Profil électrophorétique de l'ADN <i>d'A. tumefaciens</i> extrait à partir de la tumeur par usage de couple d'amorce A/E' selon le protocole 1	<b>44</b>
<b>17</b>	Profil électrophorétique de l'ADN <i>d'A. tumefaciens</i> extrait à partir de la tumeur par usage de couple d'amorce A/E' selon le protocole 2	<b>44</b>
<b>18</b>	Profil électrophorétique de l'ADN <i>d'A. tumefaciens</i> extrait à partir de la tumeur par usage de couple d'amorce A/E' selon le protocole 3	<b>44</b>
<b>19</b>	Profil électrophorétique de l'ADN <i>d'A. tumefaciens</i> extrait à partir de la tumeur par usage de couple d'amorce A/E' selon le protocole 4	<b>44</b>
<b>20</b>	Observation microscopique <i>d'A.tumefaciens</i> (G×1000)	<b>45</b>
<b>21</b>	Test de production de 3-cétolactose.A. réaction positive se traduit par la formation d'un halo jaune intense.B. réaction négative se traduit par l'absence du halo jaune.	<b>46</b>
<b>22</b>	Test de l'hydrolyse de l'urée.A. réaction positive se traduit par un changement de la coloration vers le rose-fuchsia.B. contrôle négatif.	<b>47</b>
<b>23</b>	Test de l'hydrolyse de l'esculine.A. réaction positive se traduit par un changement de la coloration de milieu de culture vers le noire..B. contrôle négatif.	<b>48</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>N°</b>	<b>TITRE</b>	<b>PAGE</b>
<b>1</b>	Nombre d'espèces végétales attaquées par le Crown-Gall	<b>5</b>
<b>2</b>	Protocoles basés sur la PCR pour la détection <i>d'A.tumefaciens</i>	<b>20</b>
<b>3</b>	Provenance des plants hôtes des isolats utilisés	<b>23</b>
<b>4</b>	Composition de mélange réactionnel utilisé pour la détection <i>d'A.tumefaciens</i>	<b>30</b>
<b>5</b>	Provenance des plants hôtes des isolats étudiés pour l'identification des biovars	<b>32</b>
<b>6</b>	Caractérisation biochimique des isolats	<b>49</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AND-T :</b>	AND de Transfert
<b>°C :</b>	Degré Celsius
<b>DO :</b>	Densité optique
<b>dNTP :</b>	Désoxyribonucléotide triphosphate
<b>EDS :</b>	Eau Distillée Stérile
<b>EDTA :</b>	Acide Ethylène diamine tetra acétique
<b>K<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Te :</b>	Tellurite de potassium
<b>MgCl<sub>2</sub> :</b>	Chlorure de magnésium
<b>min :</b>	Minute
<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> :</b>	Sélénite de sodium
<b>PBS :</b>	Tampon Phosphate Salin
<b>PCR :</b>	Polymérase Chaîne Reaction
<b>pb :</b>	Paire de bases
<b>PVP :</b>	Poly Vinyl Pyrolidone
<b>SDS :</b>	Sodium dedocyl sulfate
<b>TBE :</b>	Tris borate EDTA
<b>Te :</b>	Tellurite
<b>Tris :</b>	Tris (Hydroxyméthyle) aminoéthane
<b>UFC :</b>	Unité formatrice de colonie
<b>UV :</b>	Ultraviolet
<b>YMA :</b>	Yest Mannitol Agar



## ***INTRODUCTION***

Le verger arboricole national occupe actuellement une superficie de plus 63 300 ha dominé par l'amandier et le pommier (**MADRPM, 2002**). Le secteur des rosacées fruitières est caractérisé par une gamme diversifiée d'espèces, c'est un secteur important dans l'agriculture marocaine, grâce à sa production d'une part et en termes de création d'emploi d'autre part.

Comme toutes les cultures, les rosacées sont confrontées à plusieurs problèmes d'ordre entomologique, viral, cryptogamique et bactérien. Parmi les maladies bactériennes, c'est la galle du collet des rosacées qui constitue un sérieux problème phytosanitaire (**Lacroix., 2003**).

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, l'agent étiologique de la galle du collet (tumeur végétale), est l'une des bactéries phytopathogènes les plus destructives causant d'importantes pertes au niveau des pépinières où le greffage des plantes facilite le développement de la maladie, ainsi qu'au niveau du verger. Cette bactérie engendre des pertes financières importantes estimées à des millions de dollars par an (**El bakkal.,2017**). Par ailleurs, la tumeur du collet est une maladie qu'il faut prévenir, puisqu'une fois la plante contaminée, la tumeur demeure dans les vaisseaux de la plante hôte et empêche la conduction de la sève jusqu'à la fin de sa vie (**El bakkal.,2017**).

Actuellement, la détection des souches pathogènes d'*Agrobacterium tumefaciens* se fait principalement en utilisant l'isolement microbiologique traditionnel sur des milieux sélectifs suivi d'une inoculation dans des plantes herbacées. Cette méthode prend beaucoup de place et de temps, elle est moins appropriée pour le diagnostic des infections latentes (**Savoie.,2011**).

Par conséquent, l'établissement d'un diagnostic précoce, fiable et rapide est alors une nécessité préalable à l'exécution des mesures phytosanitaires adéquates. Il apparaît également être un moyen indispensable dans le processus de lutte contre cette maladie.

Ainsi, plusieurs techniques de diagnostic sont perfectionnées dans le cadre de la détection de cette bactérie. La PCR conventionnelle basée sur la mise en évidence de séquences d'ADN hautement spécifiques, se révèle être parmi les meilleurs moyens de réaliser une détection très fiable, précoce des bactéries phytopathogènes.

La classification taxonomique des agrobactéries reste difficile à étudier, et reste en discussion et en évolution. Cette imprécision de la classification a conduit **Kerr & Brisbane (1983)** à

proposer de parler du biovar pour dénommer les agrobactéries. Pour cela une classification du genre *Agrobacterium* a été effectuée en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et biochimiques, qui les séparant en trois groupes taxonomiques (biovars) (**Kesters et De Ley, 1984**).

La présente étude a donc fixé comme objectif d'une part, l'isolement de la bactérie *A. tumefaciens* sur deux milieux de culture spécifiques et l'optimisation des protocoles de diagnostic qui se basent sur l'utilisation d'outils moléculaires (PCR), afin de détecter de manière précoce et fiable la présence de cette bactérie au niveau des plantes symptomatiques. Ceci contribuera à la prise de mesures adéquates pour une meilleure protection des ressources agricoles. D'autre part, cette étude vise la caractérisation des souches d'*Agrobacterium* isolées en biovars par des tests biochimiques afin de les identifier.

# **PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# I- Maladie de la galle de collet : Crown Gall

## 1. Généralités

Le Crown-Gall est une maladie bactérienne répandue dans le monde entier et causée par une bactérie *A. tumefaciens*, qui attaque environ 600 espèces végétales (Vigouroux., 2016). Elle provoque des tumeurs bactériennes sur le collet et racines des arbres fruitiers, du rosier et des plantes ornementales (El Arbi et al.,2011) particulièrement en pépinières où elle cause beaucoup de dégât (Benjama et al., 2002). La maladie provoque d'importantes pertes économiques dans la production des fruits et dans l'arbre de la vigne (Pulawska., 2010). Cette bactérie a été isolée pour la première fois en 1907 dans un fragment de galle par Smith et Townsend sous le nom de *Bacterium tumefaciens* (Smith et Townsend., 1907).

Cette maladie affecte le développement et la productivité de nombreuses plantes dont un certain nombre sont d'intérêt agronomique comme les pommiers, les poiriers, les rosiers, etc. ... Les dégâts les plus importants sont observés en serre où les conditions environnementales sont très favorables aux agro bactéries ou en pépinières où le greffage des plantes facilite le développement de la maladie (Pionnat et al., 1999). La conséquence directe est une non commercialisation des plants infectés entraînant un manque à gagner pouvant être considérable pour les pépiniéristes (Benjama et al., 2002).

## 2- Plantes hôtes

Le Crown-Gall attaque plusieurs plantes hôtes de familles des Rosacées : environ 640 espèces réparties dans 93 familles (Labarre.,2006). La maladie entraîne également des pertes économiques au champ dans les zones de cultures d'arbres fruitiers ou hors-sol en serres de production de fleurs coupées ou de concombres où c'est la production elle-même qui est affectée (El Arbi et al.,2011). En contrepartie les céréales et le maïs ne sont pas affectés par *Agrobacterium* (Benjama et al., 2002).

Les dicotylédones, les angiospermes et les gymnospermes sont les principales plantes hôtes d'*Agrobacterium*. Certains membres des monocotylédones comme les Liliales et les Arales peuvent être aussi attaqués (El Arbi et al.,2011).

La gamme de plantes sensibles au Crown-Gall est très importante à connaître pour éviter leur importation d'une région connue atteinte et leur plantation en champs déjà contaminé (Decleen et Deley.,1976).

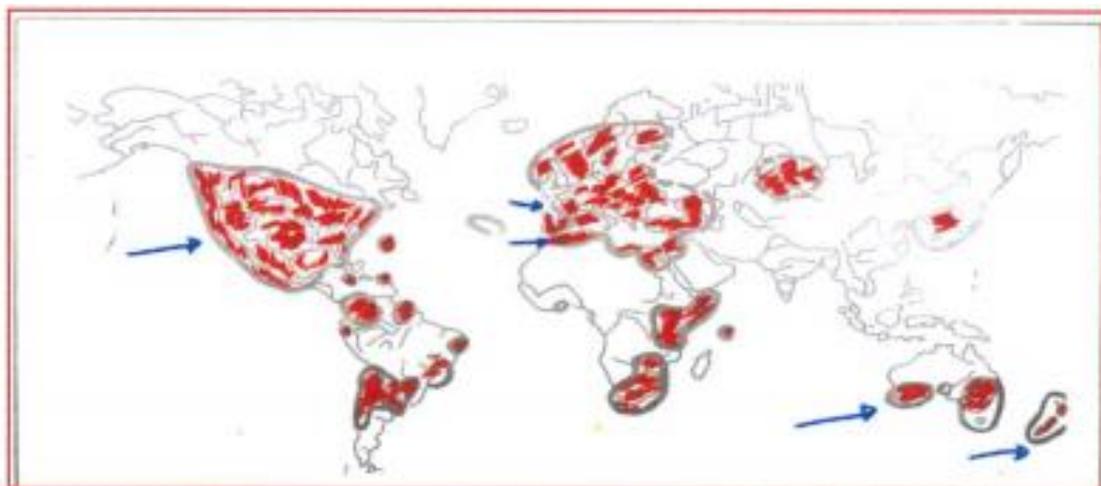
**Tableau 1 :** Nombre d'espèces végétales attaquées par le Crown-Gall (**El Arbi et al.,2011**).

	Sensibles au Crown- Gall
Dicotylédones	596 espèces
	320 genres
	84 familles
Monocotylédones	5 espèces
	5 genres
	3 familles

### 3. Répartition de la maladie

#### a. Au niveau mondial

Depuis le début du 20 -ème siècle, la maladie de Crown Gall était connue dans le monde (maladie connue depuis 1907 aux Etats-Unis). Il s'étend dans la plupart des pays du monde et provoque des dégâts principalement dans les bassins méditerranéens. Il existe en Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie, et Egypte), Europe (Autriche, Espagne, France, Italie, Grèce, Bulgarie, Hongarie, Roumanie, Tchécoslovaque, Allemagne) ; Asie (Russie, Iran, Turquie, Syrie, Jordanie), Amérique latine (Chili, Argentine), Amérique du nord (USA, Canada), Australie, Nouvelle Zélande (**Benjama., 2017**).



**Figure1 :** Distribution du crown- Gall dans le monde (**Benjama., 2017**).

## b. Au niveau du Maroc

Au Maroc, les foyers sont décelés dans le Sais et le Moyen Atlas (Azrou, Immouzer, Shlihat, Meknès, Fès et régions) ; dans le Gharb à savoir Sidi Kacem, Béni Mellal, ainsi que dans le Haouz-Tensift : Marrakech, Midelt. Les pépinières peuvent être atteintes à plus de 80% de pieds malades. Les principales espèces attaquées sont l'amandier, pêcher, prunier, cerisier, pommier et le poirier (Benjama., 2017).



Figure2 : Distribution du crown- Gall au Maroc (Benjama., 2017).

## 4. Perte économique

*A. tumefaciens* affecte le développement et la productivité de plusieurs plantes dont un certain nombre sont d'intérêt agronomique, et notamment les cultures ornementales, fruitières et forestières. La famille des *Rosacée* est particulièrement sensible mais ces bactéries infectent de nombreuses plantes ligneuses et certains groupes des plantes herbacées (140 genres dans plus de 90 familles), et cela dans plusieurs pays du monde. Elle est notamment considérée la principale maladie d'origine bactérienne des arbres fruitiers à noyaux des pays de la zone Méditerranéenne (Włodarczyk., 2010).

Les dégâts les plus importants sont observés en serre où les conditions environnementales sont très favorables aux agrobactéries ainsi que dans les pépinières où le greffage des plantes facilite le développement de la maladie (Pionnat et al., 1999). La conséquence directe est une non

commercialisation des plants infectés entraînant un manque à gagner pouvant être considérable pour les pépiniéristes (Poncet et al., 1996 ; Benjama et al., 2002).

Au Maroc, cette maladie est particulièrement grave en pépinières dont la plupart sont atteintes à plus de 20 %, certaines à plus de 80 %. Les principales espèces attaquées sont l'amandier, le pêcher, le prunier, le pommier et le poirier (Benjama et al., 1996).

## 5. Symptomatologie

*A. tumefaciens* causé des symptômes ont une apparence caractéristique en se manifestant par l'apparition d'excroissances végétales au niveau du collet (partie de la plante située à la jonction tige-racine), des tiges et plus rarement sur les feuilles. Les galls sont toujours plus ou moins circulaires avec une surface irrégulièrement rugueuse. Leur taille peut atteindre parfois 30 cm de diamètre. Au début de leur développement, ces tumeurs sont blanchâtres et jaunâtres, fraîches et huileuses au toucher. En vieillissant, elles prennent une teinte noirâtre, se lignifient et se craquèlent (Lacroix., 2003).

La croissance anarchique des cellules tumorales aboutit à une disposition des éléments anatomiques. Ceci provoque une désorganisation des tissus conducteurs qui restent partiellement en liaisons avec la partie saine de la plante. Les cellules malades deviennent alors mal alimentées et se nécrosent en surface. Ce qui caractérise le vieillissement de la tumeur (Odile., 2006).

Le crown Gall ne tue pas nécessairement la plante mais affecte sa croissance, en inhibant les fonctions physiologiques de la plante telles que le transport d'eau et de nutriments. Les tumeurs sont responsables d'une baisse importante de la quantité et de la qualité des productions végétales, donc les arbres deviennent chétifs dans plusieurs cas et avec une longévité réduite. De plus les tumeurs sont souvent des points d'entrée faciles pour d'autres pathogènes de la plante (Kersters et De Ley., 1984).



**Figure 3 :** Symptômes causés par *A. tumefaciens*. (A) vieillissement de la tumeur au niveau du collet. (B) Développement des tumeurs: blanchâtres, jaunâtres et fraîches (Lang., 2013).

## **6- Agent causal : *A. tumefaciens***

### **6.1. Le genre *Agrobacterium***

Les bactéries du genre *Agrobacterium* (Conn., 1942) sont naturellement retrouvées dans les sols et sont plus particulièrement présentées dans les sols rhizosphériques. Elles appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* dans la classe des alpha-protéobactéries.

La famille *Rhizobiaceae* possède la capacité d'induire la formation de nodosités sur les plantes légumineuses, qui permettent la fixation de l'azote atmosphérique chez ces plantes. Le genre *Agrobacterium* constitue d'une douzaine d'espèces distribuées en différents groupes taxonomiques (Lang.,2014). Ces bactéries vivent en mode saprophytes, grâce à la décomposition de la matière organique. Cependant de nombreuses espèces d'*Agrobacterium* sont des phytopathogènes de la plante. En effet, en présence d'éléments génétiques particuliers certaines espèces dont *A. tumefaciens*, peuvent induire des maladies néoplastiques.

Le caractère pathogène d'*Agrobacterium* dépend de deux éléments : l'insertion de l'ADN Ti (tumor inducing) dans le génome de la plante et la modification du métabolisme cellulaire de celle-ci induisent une prolifération cellulaire et la synthèse de composés nutritifs pour *Agrobacterium* (Van Larebeke et al, 1974). Ce mécanisme d'infection par un phénomène de transgène naturelle est le seul cas de transfert d'information génétique décrit entre le règne bactérien et les eucaryotes (Vigouroux., 2016).

#### **6.1.1. Caractéristiques cellulaires et métaboliques**

*A. tumefaciens* est une bactérie bacille à Gram négatif, en forme de bâtonnet et ne produisant pas de spores, mobile disposant de 1 à 4 flagelles polaires dont la taille varie entre 0,6 à 1 µm sur 1 à 3 µm. Ces bactéries sont pour la plupart des aérobies strictes. Elles sont chimioorganotrophes parce qu'elles utilisent comme source de carbone une grande variété de composés organiques. La température optimale de leur croissance est située entre 24 et 28 °C. Sur milieu de culture favorable les colonies apparaissent blanchâtres, lisses, arrondies, parfois muqueuses, non pigmentées, opaques ou translucides, et de diamètre variable pour les colonies d'une même souche bactérienne. Dans ces conditions, leur temps de génération avoisine 120 minutes. Cependant, dans des milieux pauvres, elles résistent bien aux carences et peuvent croître et survivre pendant plusieurs semaines. Elles résistent aussi aux sels de tellure, et à de nombreux antibiotiques de type bêta-lactame (Ogawa et Mii., 2005).

### 6.1.2. Données taxonomiques

La classification taxonomique des agrobactéries reste difficile à étudier, et reste en discussion et en évolution. La première classification du genre *Agrobacterium* a été effectuée en fonction de la pathogénicité de ces bactéries. En fonction des symptômes causés chez les plantes, six espèces de ce genre ont été définies : *A. tumefaciens* (**Smith et Townsend., 1907**), agent causal de la galle de collet ; *A. rhizogenes* (**Riker et al., 1930**), responsable de la prolifération incontrôlée des racines au site d'infection nommée « hairy root » ; *A. vitis* (**Ophel et Kerr., 1990**), responsable de la galle de la vigne ; *A. rubi* (**Hildebrand et al., 1940**), à l'origine de l'induction des tumeurs sur des tiges des plantes du genre *Rubus* ; *A. larrymorrei* (**Bouzar et Jones., 2001**), se développant sur les tiges de *Ficus benjamina* , et la dernière espèce de ce genre est *A. radiobacter* (**Beijerinck et Delden., 1902**), c'est une espèce non pathogène.

La deuxième classification a été réalisée en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et biochimiques, qui les séparant en trois groupes taxonomiques (biovars) (**Kesters et De Ley., 1984**). Le biovar 1 comprend *A. tumefaciens* et *A. radiobacter*, le biovar 2 *A. rhizogenes*, et le biovar 3 *A. vitis*. En plus l'espèce *A. rubi* qui n'est pas classée dans aucun biovar ; Des expériences d'hybridation ADN-ADN ont montré que le biovar 1 est le groupe le plus hétérogène (10 espèces génomiques) (**Popoff et al., 1984**), groupe dans lequel les souches *A. tumefaciens* C58 et B6 sont répertoriées (**Costechareyre et al., 2010**).

### 6.2. Organisation du génome d'*A. tumefaciens*

La souche modèle du biovar 1, *A. tumefaciens* C58 a été complètement séquencée deux fois (**Wood et al., 2001 ; Goodner et al, 2001**). Le génome de 5,67 Mpb comprend : un chromosome circulaire (CcC58, 2,8Mbp) comportant la plupart des gènes impliqués dans les processus biologiques essentiels à la survie de la bactérie (synthèse d'acides nucléiques, traduction, métabolisme des acides aminés ...), un chromosome linéaire de (LcC58, 2Mb), un méga-plasmide pATC58 de 542 kpb de 214 kpb et un deuxième méga plasmide de 542 kpb pTiC58 (Ti pour « tumor inducing »). Ce dernier plasmide porte le fragment d'ADN qui est transféré dans la cellule végétale, appelé ADN-T (« Transferred-DNA ») (**Chilton et al., 1977**) et les gènes de virulence *vir* qui régissent l'intégration de l'ADN-T dans la cellule hôte. L'analyse du génome d'*Agrobacterium* identifie 5419 gènes codant pour des protéines dont plus de 60% représentent une fonction putative attribuée par homologie de séquences. Les familles les plus représentatives sont les adénosines triphosphates (ATPases) et les transporteurs de type ABC (ATP binding cassette).

## 7. Processus d'infection d'*A. tumefaciens*

Le processus de transgénése est mis en place par *A. tumefaciens* grâce à sa capacité d'altérer le génome de la cellule végétale infectée par l'insertion d'une portion de son plasmide Ti (pTi) qui est l'ADN-T (Chilton et al., 1977). Le pTi, déterminant essentiel de la pathogénicité des *Agrobacterium*, est constitué d'un nombre de régions fonctionnelles (Ouartsii., 2004).

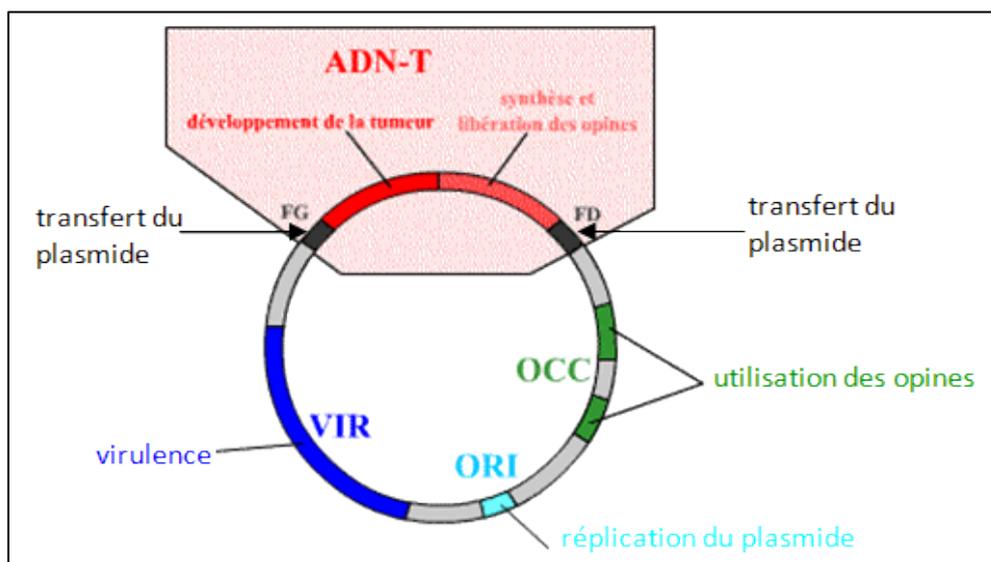
Ce mécanisme de transgénése fait intervenir deux groupes de gènes localisés à des endroits différents et régulés de façon distincte :

- **La région T (ADN-T) :** Il s'agit du segment transféré à la plante. Elle se compose de deux groupes de gènes fonctionnels, le premier groupe est constitué des gènes codant pour la synthèse des phytohormones (auxines et cytokinines) et le deuxième groupe correspond aux gènes responsables de la synthèse des opines qui sont des molécules utilisées comme source de carbone, d'azote et d'énergie par la bactérie.

- **La région Vir :** Elle comporte 20 gènes essentiels à l'induction de tumeurs chez la plante hôte, puisqu'ils permettent le transfert de l'ADN-T vers la plante.

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

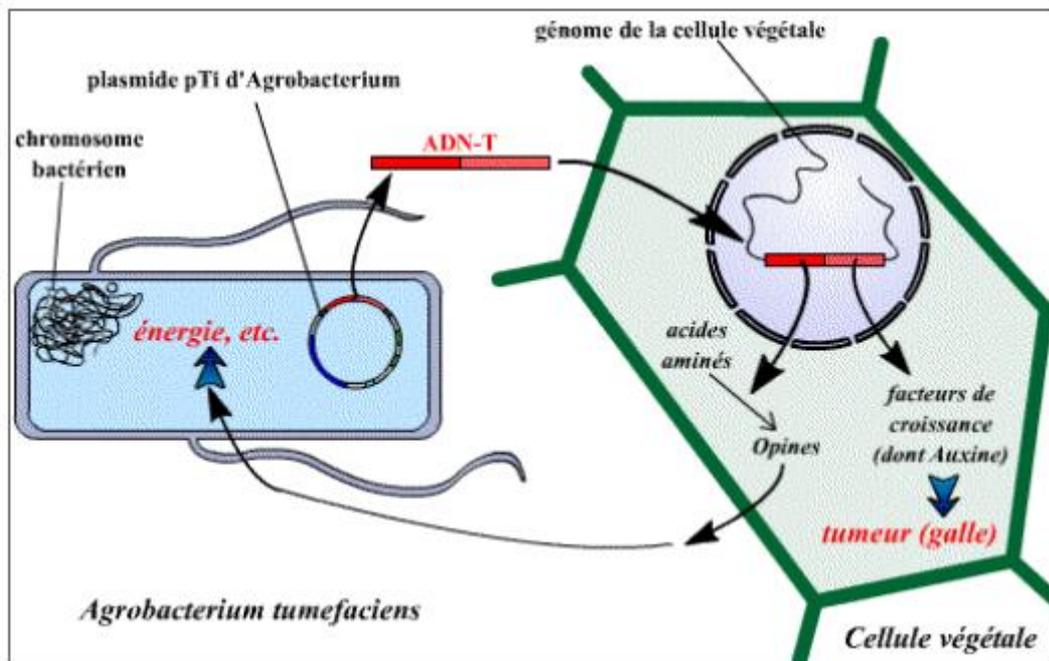
- **La région Rep :** Les trois gènes de cette région permettent une répllication stable du plasmide et sont impliqués dans les fonctions d'incompatibilité.



**Figure 4 :** Carte génétique du plasmide Ti et de ses différentes régions géniques (Beijersbergen et Hooykaas., 1993).

Plus schématiquement, le cycle d'infection d'*A. tumefaciens* (figure 5) se décompose en trois étapes :

- la reconnaissance bactérie / hôte,
- le transfert de l'ADN-T,
- l'expression des gènes de l'ADN-T qui induisent le développement de la tumeur.



**Figure 5 :** Le transfert de l'ADN-T d'*A.tumefaciens* vers la cellule végétale et formation de la tumeur (Beijersbergen et Hooykaas., 1993).

## 7.1. Reconnaissance bactérie / hôte

### 7.1.1. Fixation aux cellules hôtes

Toutes les bactéries phytopathogènes nécessitent une blessure sur la plante hôte qui est une condition indispensable pour l'établissement de l'infection et par la suite produire les symptômes. L'*A. tumefaciens* pathogène n'échappe pas à cette règle. Lors d'une blessure, la plante libère des molécules chimio-attractantes telles que les sucres et les composés phénoliques qui attirent la bactérie et se déplace vers la blessure grâce à ses flagelles en suivant le gradient de concentration (Ashby et al., 1988). Afin de créer un contact physique avec son hôte, *A. tumefaciens* reconnaît des protéines localisées sur la paroi végétale et apparentées à la vitronectine, protéine impliquée dans le maintien de la structure et dans la cohésion des cellules végétales (Wagner et Matthyse., 1992). Des polysaccharides acylés de type 1-2 glucane qui sont synthétisés par les gènes du chromosome bactérien tels que *exoC*, *chvA* et *chvB* (Cangelosi et al., 1987) reconnaissent ces protéines de la paroi végétale. L'interaction du polysaccharide avec

la protéine de type vitronectine entraîne la formation de filaments de type cellulose qui stabilisent et renforcent l'attachement de la bactérie sur la cellule hôte.

### 7.1.2. Activation des gènes de virulence

La transgénèse nécessite l'activation des gènes de virulence *vir* qui est une étape indispensable pour ce processus. L'induction et l'expression des gènes *vir* présents sur la partie non transférable du plasmide Ti se fait par l'exsudat des cellules blessées. La protéine VirA (récepteur présent dans la membrane interne de la bactérie) reconnaît les composés phénoliques synthétisés par la plante. Après l'interaction de ces composés, la protéine VirA s'auto-phosphoryle puis phosphoryle la protéine régulatrice cytoplasmique VirG qui se fixe sur la boîte *vir* qui active la transcription des promoteurs des gènes *vir*. Cette dernière étape permet la stabilisation et le contact avec l'hôte ainsi qu'elle permet d'engager le processus de transfert du ADN-T.

## 7.2. Transfert T-DNA

### 7.2.1. Production du brin T

La synthèse d'un brin d'ADN-T nécessite l'expression des gènes *vir*. Pour cela, afin de couper un fragment de plasmide Ti, des endonucléases VirD1 et VirD2 vont agir spécifiquement pour effectuer cette coupure de fragment (**Filichkin et Gelvin., 1993**). La protéine VirD1 sépare les deux brins d'ADN-T grâce à son activité hélicase. La protéine VirD2 se fixe à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T (**Gelvin., 2003**) et clive l'ADN-T au niveau des séquences répétées de 25 nucléotides, spécifiques des régions flanquantes de ce fragment. Le complexe VirD2/ADN-T se sépare du reste du plasmide, et le brin T formé va être transféré dans la cellule hôte, où il s'insère dans l'un des chromosomes végétaux pendant que le plasmide Ti est régénéré à l'aide de la machinerie de réparation de l'ADN de la bactérie.

### 7.2.2. Translocation du brin T

Le complexe brin T/ VirD2 ainsi que quatre autres protéines effectrices bactériennes (VirE2, VirE3, VirF et VirD5) sont transférées dans la cellule végétale. Ce transfert nécessite une machinerie protéique particulière qui établit un canal entre la bactérie et la cellule hôte (**Vergunst et al., 2000**). Cette structure composée d'un assemblage de 12 protéines (**Christie et Cascales., 2005**) : 11 protéines VirB et de la protéine VirD4 (**Hwang et al., 2004**). Le peptidoglycane de la membrane bactérienne est hydrolysé localement par la protéine, ensuite les autres protéines s'assemblent autour de VirD4 pour synthétiser le transporteur T.

### 7.2.3. Intégration de l'ADN-T dans le génome végétal

L'insertion de l'ADN-T dans le génome de la plante hôte se fait de façon aléatoire, avec une préférence pour les régions transcriptionnellement actives de la chromatine (**Brunaud et al., 2002 ; Szabados et al., 2002 ; Li et al., 2006**). Actuellement, deux modèles sont proposés (**Tzfira et al., 2004**). Le premier se base sur le principe d'une recombinaison entre l'ADN-T simple brin T et la séquence d'ADN de la plante dans des régions où il y aurait une « micro-homologie ». La coupure de l'ADN végétal et ainsi l'intégration du brin d'ADN-T se fait grâce à la fixation de VirD2 sur la partie 5' du brin T. Au moment de l'intégration du brin d'ADN-T, VirD2 et VirE2 synthétisent le brin complémentaire de l'ADN-T et une copie double brin va être incorporé dans le génome de la plante (**Tinland et Hohn., 1995**). Le deuxième modèle se base sur une recombinaison non homologue (NHEJ : non homologous endjoining) suite à des cassures de l'ADN végétal (**Chilton et Que., 2003**). Ceci suppose qu'il y a une répllication du brin d'ADN-T pour synthétiser un double brin T qui s'insère au niveau d'une cassure dans le génome de la cellule végétale. Cette répllication non homologue montre la présence de copies répétées d'ADN-T et la présence fréquente de plusieurs ADN-T d'*Agrobacterium* de souches différentes dans un même génome de cellule végétale (**Vigouroux., 2016**).

## 8. Tumorigenèse

### 8.1. Expression des gènes d'ADN-T associés au développement de la tumeur

La transcription et la traduction des gènes portés par l'ADN-T se fait grâce à la machinerie cellulaire de la plante et puisque les promoteurs bactériens ressemblent aux promoteurs eucaryotes (**Vigouroux., 2016**). Leur régulation se fait via leurs propres promoteurs.

#### 8.1.1. Synthèse d'hormones

La synthèse des hormones dans la cellule végétale de la plante se fait grâce à des gènes codés par l'ADN-T d'*Agrobacterium*. Parmi ces gènes, *iaaM*, *iaaH* et *ipt* qui participent à la synthèse des hormones végétales de la famille des auxines ou cytokinine (le 3-indole-acétamide (IAM), le 3-indole-acétate (AIA), l'isopentényladénosine 5'-monophosphate), qui permettent la régulation de la prolifération, l'élongation et la différenciation des cellules végétales (**Zambryski et al., 1989 ; Veselov et al., 2003**). L'expression de ces oncogènes de l'ADN-T conduit à l'accumulation des phytohormones, entraînant une dérégulation hormonale qui induit la prolifération anarchique des cellules et la formation de tumeurs (**Veselov et al., 2003**).

## 8.1.2. Synthèse des opines

### 8.1.2.1. Synthèse

Les opines sont des petites molécules synthétisées dans la cellule tumorale en réponse à un stimulus de la bactérie (**Petit et Tempe., 1984**).

Dans la nature, il existe une vingtaine d'opines résultant de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre ou d'un acide cétonique. Elles sont séparées en deux classes, les opines qui proviennent de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre comme l'agropine, et celles qui sont dérivées de la condensation d'un acide aminé et d'un acide, comme les deux opines d'intérêt, l'octopine et la nopaline, qui résultent respectivement de la condensation d'une arginine avec un pyruvate ou un cétooglutarate. Les protéines nécessaires qui interviennent dans leur biosynthèse sont codées sur la partie non transférable du plasmide Ti. Les bactéries profitent des métabolites présents dans la cellule hôte pour générer les opines. Les gènes de dégradation des opines sont portés par les plasmides Ti, et seul *Agrobacterium* est capable de métaboliser ces molécules. Ainsi pour produire les opines, les agrobactéries détournent l'activité métabolique de la plante à son profit (**Dessaux et al., 1988**).

### 8.1.2.2. Rôles des opines

Les opines sont des petites molécules dont la production dans les tumeurs est déclenchée par *A. tumefaciens* pour subvenir à sa multiplication et pour promouvoir la dissémination de ses traits de virulence (**Dessaux et al., 1992**).

Les opines servent de source de carbone et d'azote aux bactéries capables de les cataboliser. Les *Agrobacterium* utilisent que les opines dont ils ont le gène sur le plasmide Ti, ceci confère une spécificité de substrat par rapport aux autres bactéries présentes dans la tumeur, et favorise leur propagation (**Tempe et al., 1979**). Un transfère conjugatif du plasmide Ti est induit de façon indirecte par certaines opines comme l'agrocinopine et l'octopine en stimulant l'induction des gènes *vir* (**Veluthambi et al., 1989**). Ce phénomène est appelé le « concept d'opine » (**Guyon et al., 1980**). D'autre part, les opines jouent un rôle majeur dans la propagation et la dissémination d'*A. tumefaciens* et créent un environnement écologique favorable à la croissance et au développement du pouvoir pathogène d'*A. tumefaciens* (riche en métabolites et opine).

## 8.2. Structure de la tumeur

Le développement des tumeurs végétales induites par *A. tumefaciens* est associé à la néovascularisation des tissus. Le système circulatoire de la plante est connecté au réseau vasculaire des tumeurs, ceci permet l'apport d'eau et de nutriments nécessaires à la multiplication des bactéries et donc à la prolifération des cellules tumorales (Ullrich et al., 2000). La mise en place du réseau vasculaire et la prolifération des cellules tumorales sont liées à une concentration élevée en auxine et à un déficit en oxygène dans la tumeur. Ces deux phénomènes favorisent la stimulation de l'activité de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) qui joue un rôle important dans la synthèse d'une hormone de la plante, l'éthylène. Cette hormone participe à la vascularisation par la restructuration du xylème (Wachter et al., 2003) et stimule la synthèse de l'acide abscissique (ABA), la phytohormone ABA ayant un rôle dans la protection de la tumeur contre la déshydratation (Efetova et al., 2007).

## 8.3. Source d'inoculum et condition favorable pour l'induction de tumeur

La principale source de la maladie semble être la propagation des plantes malades (Burr., 2004). La bactérie tumorigène peut survivre systématiquement à l'intérieur de la plante jusqu'à ce qu'il y ait une blessure au tronc où elle pénètre la partie externe et provoque la maladie. Les lésions qui mènent à l'expression de la tumeur du collet peuvent résulter de la baisse de température, de l'élagage, de la transplantation, et du matériel mécanique utilisé pour la gestion de la culture. Les éclosions majeures sont généralement limitées aux variétés les plus sensibles aux blessures durant l'hiver (Diana et Dejeu., 2011).

Les bactéries du genre *Agrobacterium* occupent différents habitats ; elles peuvent vivre librement dans le sol, dans l'environnement racinaire (rhizosphère) ou comme pathogène des plantes. Le développement optimum des tumeurs nécessite une température de 22 °C et une humidité de 60-80%. La température de transformation cellulaire se situe bien dans la fourchette 25 °C-27°C Leur température optimale de croissance est située entre 24 et 28 °C (Ogawa et Mii., 2005). Mais on peut noter une diminution progressive des néoformations à partir de 27,5°C et 28,8°C alors que la tumeur n'est plus initiée au-dessus 29°C (Riker., 1924).

Dans d'autres travaux, il a été montré que l'irradiation et des chocs thermiques de 39-48 °C ne tuent pas la bactérie alors que si on les soumet à une température de 36°C, il aurait une conversion des souches virulentes en avirulentes qui n'initient pas de tumeurs (Stonier et al., 1966).

## 9. Contrôle de la maladie

Une fois la plante transformée, la tumeur se développe même si la bactérie n'est plus présente. Le contrôle de la maladie se fait donc surtout par des techniques préventives qui se passe par un contrôle de l'état sanitaire des plantes et du sol, ce dernier qui peut être désinfecté par la vapeur ou par solarisation (en effet *Agrobacterium* ne pousse plus au-delà de 38°C). La désinfection des par la thérapie (traitement à l'eau chaude) peut être réaliser, notamment pour la vigne. La rotation des cultures, en alternance avec des plantes insensibles ou résistantes à *Agrobacterium*, permet aussi de limiter les épidémies. (Megateli., 2012)

Au Maroc, la lutte contre le crown-gall se limite actuellement à un contrôle visuel des plants par les Services de la protection des végétaux appliqué selon la réglementation en vigueur (Arrêté du Ministre no. 468/84 du 19/3/1984), qui stipule que toute matériel de pépinière atteint à plus de 20% doit être interdit à la vente et incinéré. Si le taux est inférieur à 20%, un triage systématique et sévère des plants atteints s'impose. La meilleure période de contrôle se situe entre décembre et mars de chaque année qui coïncide avec la période des arrachages et la vente. Les points de vente sont considérés comme le baromètre de la fréquence du Crown-Gall dans la région. En Europe, seuls 2% à 10% de plants atteints sont autorisés à la vente (décret Européen 92/33 de 1993) (Nesme., 1995).

## 10. Moyens de lutte contre la maladie

### 10.1. Lutte préventive et culturale

Une diminution importante de la maladie est assurée par lutte culturale et les mesures préventives. Une inspection minutieuse des plants est essentielle pour détecter la moindre tumeur, et il est préconisé d'utiliser des plants exempts de tumeur. Dans un tel cas, il faut éliminer et détruire toute plante présentant de tels symptômes.

Le matériel de plantation et de greffage doit être obtenu à partir de plantes indemnes ainsi que l'utilisation des variétés ou d'espèces résistantes ou peu sensibles au Crown Gall (Lacoix., 2003).

### 10.2. La lutte génétique

Une méthode prometteuse a été développée pour parvenir à une meilleure protection contre la Galle du collet. Elle consiste à la modification des plantes sensibles aux souches pathogènes d'*Agrobacterium* pour reconnaître la transformation génétique causée par les bactéries et s'elles sont ainsi capables de réagir. La répression de la prolifération des gènes bactériens provoquant la

tumeur de manière active (**Escobar et al., 2001**), et ainsi que les plantes deviennent résistantes. La technique a déjà été testée expérimentalement avec succès sur les plants de pommier et promet des résultats positifs avec d'autres espèces (**Viss et al., 2003**).

### **10.3. La lutte physique**

Afin de lutter contre les microorganismes phytopathogènes, une technique de solarisation est adoptée, qui consiste à couvrir le sol durant la période chaude de l'année par une bâche en plastique transparent (**Katan et al., 1976**). Les modifications chimiques, physiques et biologiques se produisent sous le plastique en raison de la température élevée du sol, ont entraîné dans plusieurs essais une importante réduction de ces microorganismes et surtout l'*Agrobacterium tumefaciens* qui ne résiste plus à cette température (**Katan et De Vay, 1991**).

### **10.4. La lutte biologique**

Pour le contrôle biologique du Crown Gall, la souche K84 d'*Agrobacterium radiobacter* est largement utilisée. Cette souche K84, empêche les souches sensibles d'*A. tumefaciens* d'initier la maladie quand la population de la souche K84 dans les sites d'attachement au niveau des blessures est égale ou préférentiellement supérieure à celle du pathogène. L'antagoniste K84 doit être utilisé en tant que méthode préventive plutôt qu'une mesure d'éradication (**Benjama et al., 2002**).

## **II. Détection des bactéries phytopathogènes**

### **1. Généralité**

Les méthodes conventionnelles de diagnostic des bactéries phytopathogènes sont les techniques microbiologiques qui reposent sur l'isolement des bactéries tant qu'à partir des plantes asymptomatiques, symptomatiques, qu'à partir des semences, sur des milieux de culture sélectifs ou semi sélectifs, et aussi bien que sur des milieux d'enrichissement (**Moore et al., 1988**).

Bien qu'étant relativement fiables et moins chers, les techniques microbiologiques revêtent certaines contraintes et insuffisances. Les méthodes conventionnelles d'identification sont consommatrices du temps et révèlent une spécificité vis-à-vis du germe à identifier relativement faible malgré l'utilisation des milieux de culture sélectifs.

D'autres méthodes qui se basent sur l'aspect sérologique ou biochimique de la bactérie sont également utilisées. Bien que ces tests constituent une approche classique pour l'identification

des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces des bactéries phytopathogènes (**Benjama., 2000**).

Ainsi, les méthodes moléculaires basées sur la connaissance du génome constituent une réponse à ces besoins de spécificité et de rapidité. Les méthodes renferment en fait toute une gamme de techniques de détection avec des buts allant de la simple identification du germe à l'étude de la variabilité génétique d'une population de ce germe (**Benjama., 2000**).

Il y a actuellement un manque de protocoles standardisés pour le diagnostic et la détection de ces pathogènes. Le diagnostic de la maladie peut échouer s'il se fonde uniquement sur l'isolement de colonies de type *Agrobacterium* sur des milieux sélectifs ou non sélectifs, suivi de l'identification et de la confirmation de la pathogénicité. Cela peut arriver en raison des faibles populations de cellules pathogènes dans les tumeurs (**Cubero et al., 1999**).

Pour les échantillons asymptomatiques, l'enrichissement de l'agent pathogène dans un milieu liquide ou solide est nécessaire pour augmenter sa population avant le traitement de la PCR (**López et al., 2003**). Lorsque l'échantillon est d'abord cultivé sur un milieu solide, et par la suite les micro-colonies sont récupérées et amplifiées, la méthode a été nommée BIO-PCR (**Schaad et al., 2001**). En général, ces méthodes d'enrichissement facilitent la détection de l'agent recherché en augmentant leur nombre et en diminuant la concentration des inhibiteurs contenus dans les extraits végétaux.

## 1. Détection moléculaire

La technique PCR, brillamment imaginée par Kary Mullis a été développée par Henri Herlich et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA) en 1985. Cette technique est utilisée pour amplifier une séquence de nucléotides connue et située entre deux régions d'ADN en utilisant une paire d'amorces Oligo nucléotidiques ; chacune complète chaque extrémité de la séquence cible de l'ADN. Celles-ci sont allongées l'une vers l'autre par une ADN polymérase thermostable dans un cycle de réaction à trois étapes : la dénaturation, l'hybridation des amorces et l'élongation (**Turner et al., 2000**).

\***Dénaturation** du matériel génétique, généralement aux alentours de 94°C, Cette étape permet de séparer complètement les chaînes antiparallèles de la double hélice d'ADN et libérer les molécules d'ADN simple brin servant de matrice à l'ADN polymérase.

\*Fixation des amorces suite à une baisse de température. Cette étape est d'ailleurs décisive pour la réussite de la manipulation. Cette température dite d'annealing ou d'**hybridation** est spécifique à l'amorce utilisée.

\* Pour l'**élongation**, la synthèse de l'ADN se déroule à la température optimum de l'enzyme, à partir de l'extrémité 3' de chacune des amorces. Cette étape d'élongation se termine lorsque la température est à nouveau amenée au-dessus du point de fusion des molécules d'ADN bicaténaires, soit à l'étape de dénaturation du deuxième cycle de PCR (**Lepoivre., 2003**). Après le premier cycle, le produit d'amplification correspond à un segment d'ADN double brin dont les extrémités 5' sont constituées par les amorces. Ces produits d'amplification néosynthétisés vont à leur tour, après dénaturation, devenir des matrices et fixés des amorces qui seront étendues par l'ADN polymérase, générant ainsi de nouvelles molécules. Le cycle de dénaturation, d'hybridation des amorces et d'élongation est répété de trente à quarante fois et se traduit par une accumulation exponentielle du fragment d'ADN cible (**Larzul., 1993**).

L'analyse des produits amplifiés peut être réalisée par électrophorèse sur gel polyacrylamide ou gel d'agarose, dans un tampon salin adéquat de migration (**Nolasco et al., 1993**). Le champ électrique appliqué permet la migration et la séparation des fragments d'ADN chargés électriquement le long du gel en fonction de leur taille, c'est à dire de leur poids moléculaire. Un marqueur de poids moléculaires migre simultanément avec les échantillons et sert de référence pour évaluer la taille des bandes d'ADN. Les bandes sont généralement révélées au bromure d'éthidium pour les gels d'agarose observées et photographiées sous ultra-violet, ou au nitrate d'argent pour les gels de polyacrylamide (**Paradies., 1999**).

Le test PCR est utilisé pour la détection de plusieurs bactéries phytopathogènes, et dans la majorité des cas, ces microorganismes sont difficilement ou non isolables sur milieux de culture gélosés et le test PCR permet de contourner cette étape. En plus, cette technique et celle offrant le plus haut niveau de spécificité et de sensibilité (**Nolasco et al., 2002**).

## **1.2. Détection d'*A. tumefaciens***

Les *A. tumefaciens* pathogènes peuvent habiter les sols pendant des années avant de provoquer la maladie (**Bouzar et al., 1993**). Par conséquent, il est important de développer des outils sensibles et fiables pour les détecter dans les sols et dans les matières végétales. Il est également important de différencier les tumeurs causées par *A. tumefaciens* et de celles causés par d'autres bactéries telles que les *Agrobacterium vitis* ou bien par les facteurs abiotiques ou physiologiques (**Cubero et Lopez., 2005**).

Plusieurs protocoles, essentiellement basés sur la technologie PCR, ont été décrits pour détecter et caractériser les *Allorhizobiums* pathogènes et non pathogènes (Tableau 2)

**Tableau 2** : Protocoles basés sur la PCR pour la détection d'*A. tumefaciens*

Taxon amplifié	Couple d'amorce	ADN ciblé	Taille des amplicons	Référence
<i>Allorhizobium</i> <i>spp.</i>	F8360 /F8361	RecA	453 pb	<b>Shams et al., 2013</b>
	VCF3/ VCR3	VirC	414 pb	<b>Sawada et Tsuchiya 2003 Sawada, 2004</b>
	tms2F1/tm2 R2	<i>tms2</i>	617 pb	<b>Pulawska et Sobiczewski, 2005</b>
	tms2F1 / tms2B	<i>tms2</i>	458 pb	
	iaaH-F2/ iaaH-R1	<i>tms1</i>	620 pb	<b>Bini et al., 2008</b>
	iaaH-F10/iaaH-R10		420 pb	
	S4iaaM5/S4iaaM3		424 pb	
<i>A.tumefaciens</i> <i>et A.vitis</i>	F14/F749	<i>virB</i> / <i>virG</i>	432 pb	<b>Nesme et al.,1989</b>
	A / C'	<i>VirD</i> 2	242 pb	<b>Haas et al.,1995</b>
	A/ E'		338 bp	
	VCF/VCR	<i>virC</i>	730 pb	<b>Sawada et al.,1995</b>

<i>A.tumefaciens</i>	Wide1/Wid2	ADNT	180pb	<b>Dong et al.,1992</b>
	FGPtmr530/ FGPtmr701	ADNT	172 bp	<b>Cubero., 1999</b>
	FGPvirB11/ FGPvirB15	<i>virB/ virG</i>	246 bp	
	RBF/RBR	<i>Nopaline</i>	206 pb	<b>Tan et al., 2003</b>

## **PARTIE II : MATERIEL ET METHODES**

## I. Matériel biologique

Des échantillons de pommier et d'amandier manifestants des symptômes de tumeurs au niveau du collet ont été reçus au niveau du laboratoire de phytopathologie en provenance de différents endroits de la région de Fès-Meknès.

**Tableau 3 :** Provenance des plants hôtes des isolats utilisés

	<b>Plante hôte</b>	<b>Variété</b>	<b>Origine</b>
<b>Ech 1</b>	Amandier	Inconnu	<b>Meknès</b>
<b>Ech 2</b>	Pommier	<i>GALA</i>	<b>Azrou</b>
<b>Ech 3</b>	Pommier	<i>Red-delecious</i>	<b>Azrou</b>
<b>Ech 4</b>	Pommier	<i>Fuji</i>	<b>Azrou</b>

## II. Méthodes

### 1. Isolement de la bactérie

*A. tumefaciens* se trouve fixer sur les tissus tumoraux pour profiter des opines sécrétées par la plante, donc son isolement doit être réalisé directement à partir de leurs niches écologiques végétales.

Dans ce procédé, les échantillons végétaux ont été lavés à l'eau courante afin d'enlever les particules de sol adhérentes aux galles, puis les galles ont été désinfectées en surface avec l'alcool (70%) et lavées à l'eau distillée stérile. La couche superficielle de la tumeur a été éliminée à l'aide d'un scalpel stérile afin d'éliminer préalablement des bactéries saprophytes.

Ensuite, à partir de chaque échantillon, nous avons prélevé 0.2 g des fragments de tumeurs qui sont coupés aseptiquement et broyés dans des sachets de broyage avec 4.5ml du phosphate buffer saline (PBS). La suspension obtenue a été laissée à la température ambiante sous agitation pendant une nuit. La macération permet en effet, la diffusion des bactéries dans le liquide (Belaski., 2006).

De chaque broyat obtenu, nous avons préparé des dilutions de 1/10,1/100,1/1000 dans l'EDS dont 100 µl ont été étalé sur les milieux semi-sélectifs MG-Te et 1A-Te (trois répétitions pour chaque dilution), sur lesquels la croissance de la bactérie nécessite une incubation à 28°C pendant six à huit jours sur le milieu MG-Te et pendant 48h sur le milieu 1A-Te.

## **2. Purification des isolats**

Après le temps d'incubation, les colonies bactériennes isolées des tissus végétaux présentent les caractéristiques d'*A. tumefaciens* :

### **2.1. Sur milieu MG -Te :**

Les colonies marquées au tellurite de couleur noire au centre, avec un liseré blanc, circulaires, lisse, muqueuses, bien bombées et brillantes. Ensuite, les colonies ont été transférées sur le milieu MG sans tellurite, puis ont été transférées à nouveau sur le milieu d'enrichissement LPGA. La pureté est considérée comme suffisamment assurée après trois isolements successifs sur le milieu d'enrichissement LPGA (incubation à 28°C pendant 48 h).

### **2.2. Sur milieu 1A-Te :**

Les colonies ont une morphologie luisante, de couleur noire caractéristique avec brillance métallique due à l'incorporation de tellurite, muqueuses, bombées. Ces les colonies ont été transférées sur le milieu 1A sans tellurite, puis ont été transférées à nouveau sur le milieu d'enrichissement YMA. (Incubation à 28°C pendant 48 h).

## **3. Conservation des isolats**

Après purification, les isolats ont été conservés par deux méthodes jusqu'au moment de leur utilisation :

**Pour la conservation des isolats à courte durée**, l'isolat a été placé à 4°C sur le milieu YMA (annexe) additionné de 1 à 3g/l de CaCO<sub>3</sub> comme agent neutralisant de l'acidité. Le milieu est réparti dans des tubes inclinés. Après l'ensemencement des tubes avec des cultures bactérienne en phase de croissance exponentielle. Les souches sont incubées à 30°C pendant 3jours puis conservées au réfrigérateur à 4°C.Cette méthode permet une conservation de 6 à 12 mois (Vincent ,1970).

**Pour la conservation à longue durée**, la culture bactérienne a été conservée sur YMA additionné 30% (v/v) de glycérol. Les souches bactériennes sont cultivées dans des tubes

d'Eppendorf un temps de 24 à 48h d'incubation à 30°C, puis mises e conservation une longue durée dans un congélateur à -80°C.

### **III. Pouvoir pathogène sur les plantes indicatrices**

#### **1. Test d'hypersensibilité sur Tabac**

Ce test met en évidence le pouvoir pathogène de la bactérie suite au dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*) ayant atteint le stade de 5 à 6 feuilles.

Dans cet objectif, une suspension bactérienne est préparée dans l'eau distillée stérile à partir d'une crème bactérienne fraîche de 24h d'*A. tumefaciens* avec une concentration de  $10^8$  bactéries/ml. L'inoculation de la suspension se fait sur la plante de tabac à l'aide d'une seringue stérile. Celle-ci permet l'injection du pathogène au niveau du limbe des feuilles dans l'espace entre deux nervures secondaires. Un témoin négatif est réalisé par l'injection de l'eau distillé stérile. La vérification de la surface de l'injection devrait montrer une nécrose dans le cas d'un agent phytopathogène.

#### **2. Reproduction des symptômes**

Le choix de la plante indicatrice est très important dans le test du pouvoir pathogène vue le temps de croissance de la plante, la méthode d'inoculations et le temps d'apparition des symptômes. Dans ce procédé nous avons testé les disques de carotte.

##### **1.1. Sur carotte**

Les échantillons de carottes (*Daucus carota*) ont été nettoyés avec de l'eau du robinet courante, et un rinçage vigoureux a été répété trois fois. Les échantillons ont été ensuite stérilisés sous la hotte à flux laminaire en utilisant 10% d'eau de Javel commerciale pendant 10 minutes. Les disques de carotte ont été rincés par la suite avec de l'EDS et séchés sur papier absorbant, puis ces échantillons ont été découpés en disques de hauteur et de largeur uniformes. Chaque disque était correctement étiqueté et placé dans des boites de pétrie stérile. Ensuite, un coton imbibé par la suspension bactérienne de  $10^8$  UFC /ml est déposé au niveau des vaisseaux de la racine des carottes. Un témoin négatif a été imbibé par l'eau distillé stérile. Enfin tout a été placé dans une chambre culture avec une température de 25°C, et une humidité relative de 80%.

## IV. Diagnostic moléculaire

Afin de détecter *A. tumefaciens*, plusieurs protocoles basés sur l'utilisation de la PCR conventionnelle ont été évalués afin de développer et d'optimiser les méthodes de détection de cette bactérie.

### 1. Détection par Bio-PCR

La Bio-PCR est une variante de la PCR qui consiste à l'isolement microbiologique du pathogène à partir d'une plante infectée sur milieu de culture gélosé puis la détection de la bactérie par la technique de PCR.

Dans le but de valider la détection par Bio-PCR pour cette bactérie, chaque test est répété au moins trois fois.

Les extraits d'ADN ont été effectués à partir de colonies bactériennes d'*A.tumefaciens* qui ont été cultivées sur milieu LPGA.

#### 1.1. Protocoles d'extraction d'ADN

- **Protocole 1**

Il se base sur la lyse alcaline des cellules, il consiste au dépôt d'une colonie dans 20 µl d'une solution de NaOH à 20 mM (240 mg de NaOH dans 300 ml d'EDS) puis homogénéisation et incubation à 37°C pendant 10 min (**Shams et al., 2013**).

- **Protocole 2**

Il est fondé sur la lyse des cellules par un choc thermique en chauffant la suspension bactérienne pendant 15 min à 100°C puis le refroidissement dans la glace pendant 5 min et la centrifugation à 10000 g pendant 1 min. Le surnageant résultant a été utilisé pour la PCR (**Pastrick et Rainay., 1999 ; Ameer et al., 2014**).

- **Protocole 3**

Des suspensions bactériennes ont été préparées à partir de cultures pures d'*A. tumefaciens*. Les suspensions ont été centrifugées à 12 000 g pendant 5 min et les liquides surnageants ont été éliminés. Le culot a été remis dans l'EDS et chauffées à 95 ° C pendant 5 min. Les échantillons ont été centrifugés à nouveau à 12 000 g pendant 2 min et les liquides surnageants ont été recueillis pour être utilisés pour les amplifications par PCR (**Cubero et al.,2001**).

- **Protocole 4**

Les bactéries sont cultivées à 28°C, pendant 24 à 48 heures en milieu LB sans sel liquide (composition de milieu en Annexe). Après l'incubation, 500 µl du milieu enrichi est placé dans un tube Eppendorf et centrifugé à 10 000g pendant 10 min, puis le culot est suspendu dans 500 µl du tampon d'extraction composé de 200 mM Tris HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 2% PVP. L'ensemble est mélangé par le vortex puis le tube est laissé pendant 1h à température ambiante sous agitation. Une deuxième centrifugation à 5 000g pendant 5 min est réalisée, puis 450 µl du surnageant est pipeté et ajouté à 450 µl d'isopropanol. Après incubation pendant 1 h à température ambiante, une troisième centrifugation à 13 000g pendant 10 min est effectuée. Enfin le surnageant est éliminé et le culot est séché à 60°C pendant 15min et suspendu dans 100 µl de l'eau ultra pure (Llop et al.,1999).

### **1.1 Amplification par PCR Standard**

Dans le but de détecter *Agrobacterium tumefaciens*, on a opté pour travailler avec le couple d'amorces A/E' (Haas et al., 1995) qui ciblent le gène plasmidique de virulence *virD2*. Ce couple d'amorce amplifie un amplicon de 338 pb et possède une température de fusion de l'ordre de 52°C. Les séquences d'amorces sont les suivantes :

-Primer A : 5'-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT-3'

-Primer E' :5'-CCT GAC CCA AAC ATC TCG GCT GCC CA-3'

#### **1.1.1. Mélange réactionnel**

Le mélange réactionnel correspond au protocole 1 d'extraction d'ADN :

L'amplification par PCR des séquences cibles a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant : 13.5 µl d'eau ultra pure (EUP), 5µl de 5× Reaction buffer (Bioline) qui contient 5mM dNTP et 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de chaque amorce d'une concentration de 10 µmol/µl, 0.2 µl de Taq polymérase 5U/µl (Bioline) et 2,5 µl de la matrice d'ADN préparée.

Alors que, le mélange réactionnel des protocoles 2,3 et 4 est le suivant :

L'amplification par PCR des séquences cibles a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 µl contenant : 13.8 µl d'eau ultra pure (EUP), 4µl de 5× Reaction buffer (Bioline) qui contient 5mM dNTP et 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de chaque amorce d'une concentration initiale de 10 µmol/µl, 0.2 µl de Taq polymérase 5U/µl (Bioline) et 1µl de la matrice d'ADN préparée selon les différents protocoles d'extraction d'ADN.

### 1.1.2. Programme du thermocycleur

L'expérience de PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Prime), selon les conditions suivantes :

- Etape 1 : Dénaturation initiale de l'ADN  
95°C pendant 5 minutes.
- Etape 2 : Une répétition de 40 cycles comprenant :  
95°C pendant 60 secondes ;  
52°C pendant 60 secondes ;  
72°C pendant 60 secondes.
- Etape 3 : Une extension finale :  
72°C pendant 5 minutes.

### 1.1.3. Migration sur gel d'agarose

Les multiples applications scientifiques et technologiques impliquant l'étude de l'ADN font appel à différentes techniques. Parmi elles, l'électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide est une des plus communément utilisées car elle permet de séparer des molécules en fonction de leur taille.

Le gel d'agarose est préparé selon la procédure suivante :

Un gel à 1,5% a été mélangé avec du TBE (100 mM trizma base, 100 mM acide borique, 2 mM EDTA). Le mélange préparé est coulé sur un support pour le solidifier.

La cuve d'électrophorèse, est remplie avec le tampon TBE (0,5 %) jusqu'à immersion totale du gel. Une quantité de 10 µl de chaque produit de PCR est mélangé avec 3µl de solution de tampon de charge (Tampon 6X) et déposé dans un puits du gel d'agarose, et la migration électrophorétique est faite à 100 volts pendant 30 min.

Chaque test d'électrophorèse est réalisé avec un marqueur de taille 1kb plus ou 50 pb (Annexe) et un témoin négatif. Ce dernier correspond à un mélange réactionnel sans ADN de la bactérie, qu'est amplifié dans les mêmes conditions que les autres tests pour confirmer l'absence d'une contamination.

#### 1.1.4. Coloration au bromure d'éthidium

Le bromure d'éthidium (BET) est un marqueur d'acides nucléiques, et son utilisation permet de révéler les bandes présentes sur le gel d'agarose. Le gel est submergé dans une solution de BET d'une concentration finale de 0.5µg/ml pendant 30 min. La coloration au BET est révélée sous une lumière ultra violette (UV), le gel est photographié à l'aide d'un appareil photo numérique. La distance parcourue par le fragment d'ADN amplifié est comparée à l'échelle de poids moléculaires.

## 2. Détection par PCR directe

Cette méthode consiste à la détection par PCR des bactéries phytopathogènes directement d'une plante infectée sans avoir la nécessité d'isoler et de purifier le pathogène sur un milieu de culture. Dans ce précédé des fragments de tumeur ont été utilisées comme matrice pour l'application des protocoles de détection par PCR directe

Le fait que nous avons trouvé, dans la littérature scientifique, beaucoup de rapport faisant allusion à un protocole d'extraction d'ADN adapté à l'espèce d'*A. tumefaciens*, nous étions dans l'obligation de tester voire modifier et améliorer certains protocoles déjà adapté à d'autres espèces.

Pour confirmer la reproductibilité des protocoles évalués, chacun d'eux est répété au moins trois fois.

### 2.1. Protocoles d'extraction de l'ADN

- **Protocole 1**

D'abord 500 µl du macérât (dans l'EDS) est placé dans un tube Eppendorf et centrifugé à 10 000g pour 10 min, puis le culot est suspendu dans 500 µl du tampon d'extraction composé de 200 mM Tris HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 2% PVP. L'ensemble est mélangé par le vortex puis le tube est laissé pendant 1h à température ambiante sous agitation. Une deuxième centrifugation à 5 000 pour 5 min est réalisée, puis 450 µl du surnageant est pipeté et ajouté à 450 µl d'isopropanol. Après incubation pendant 1 h à température ambiante, une troisième centrifugation à 13 000g pendant 10 min est effectuée. Enfin le surnageant est éliminé et le culot est séché et suspendu dans 100 µl de l'eau ultra pure (Llop et al.,1999).

- **Protocole 2**

1 ml du macérat est placé dans un tube Eppendorf et centrifugé à 18 000 x g à 4 ° C pendant 15 min, puis le culot est suspendu dans 100 µl d'eau distillée stérile avec 1% Triton X-100 et chauffé pendant 10 min à 95 ° C. Ce protocole a été modifié en éliminant l'étape de purification d'ADN sur colonne (Szegedi et Bottka., 2002).

- **Protocole 3**

Ce protocole suit les mêmes étapes que celui qui précède, sauf que la solution du Triton X-100 est remplacée par le Tween 20 à 0,1% (Bini et al.,2008).

- **Protocole 4**

Dans ce protocole 0.2 g de chaque échantillon a été pris et placés dans des flacons contenant 0,5% de NaClO, ensuite agité à température ambiante pendant 5 min, puis lavé trois fois dans de l'eau distillée stérile puis séché sous le flux laminaire. Les échantillons étaient alors placés dans des tubes Falcon de 50 ml contenant 9 ml de solution saline solution et homogénéisé pendant 3 min.

Les aliquote de 1 ml ont été centrifugés 10 000 rpm pendant 10 min, puis le culot est resuspendu dans 500 µl du tampon d'extraction. L'ensemble est incubé pendant 1h à température ambiante. Puis une deuxième centrifugation à 5000 rpm, pendant 5 min. Le surnageant est repris dans un nouveau tube Eppendorf et portés à ébullition pendant 5 minutes, puis transférés dans de la glace pendant 3 minutes, ensuite les tubes ont été centrifugés à 10 000 rpm pendant 3 minutes. Le surnageant (450µl) est repris dans un nouveau tube Eppendorf auquel un volume équivalent en isopropanol est ajouté. Après incubation pendant 1 h à température ambiante. Le surnageant a été retiré après une troisième centrifugation à 13.000 rpm pendant 5 min, et resuspendre le culot dans 900µL d'éthanol 70° (Puopolo et al., 2007).

## **2.2. Amplification par PCR**

### **2.2.1. Mélange réactionnel**

Les extraits d'ADN de chaque protocole ont été amplifiés par PCR dans un mélange réactionnel variable selon le protocole à évaluer, en utilisant le couple d'amorces A/E' pour la détection d'*A.tumefaciens* d'une concentration initiale de 10 µmol/µl. la composition de chaque mélange réactionnel est citée dans le tableau suivant

**Tableau 4 :** Composition des mélanges réactionnels des différents protocoles utilisés

Protocole	Volume final ( $\mu$ l)	Mélange réactionnel
1	25	- 15,30 $\mu$ l d'E.U.P, - 5 $\mu$ l PCR buffer $\times$ 5 (Bioline), - 2,5 $\mu$ l d'extrait d'ADN, - 0.5 $\mu$ l de chaque amorce (10 $\mu$ mol/ $\mu$ l), - 0.2 $\mu$ l de Taq polymerase (5 U),
2	20	- 9,8 $\mu$ l d'E.U.P, - 4 $\mu$ l PCR buffer $\times$ 5 (Bioline), - 5 $\mu$ l d'extrait d'ADN, - 0.5 $\mu$ l de chaque amorce (10 $\mu$ mol/ $\mu$ l), - 0.2 $\mu$ l de Taq polymerase (5 U),
3 et 4	50	- 29.76 $\mu$ l d'E.U.P - 10 $\mu$ l PCR buffer $\times$ 5 (Bioline), - 5 $\mu$ l d'extrait d'ADN - 2 $\mu$ l Formamide - 1.32 $\mu$ l de chaque amorce (10 $\mu$ mol/ $\mu$ l), - 0.6 $\mu$ l de Taq polymerase (5 U),

### 2.2.2. Programme du thermocycleur

Les séquences cibles sont amplifiées suivant les mêmes programmes de la détection par BioPCR.

### 2.2.3. Révélation par électrophorèse

La visualisation des produits d'amplification des différents tests est faite par électrophorèse sur gel d'agarose et la coloration au bromure d'éthidium suivant la même procédure de la partie de la détection par Bio-PCR.

## VI. Identification des biovars

Les isolats étudiés (tableau 5) ayant la forme et la consistance des agrobactéries ont subi les tests biochimiques décrits par **Moore et al., (1988)**. Ces tests regroupent la coloration Gram, la production d'uréase, l'hydrolyse de l'esculine et la production de 3-cétolactose. L'observation microscopique d'*A.tumefaciens* révèle des bactéries en bâtonnet à Gram négatif.

Le virage de l'indicateur coloré au rose suite à l'alcalinisation du milieu d'urée traduit un test d'uréase positif, un test positif d'hydrolyse de l'esculine se manifeste par une coloration noire du milieu de culture et la production du 3-cétolactose se traduit par l'apparition d'un halo jaunâtre autour des colonies d'*Agrobacterium*. Si les trois précédents tests biochimiques sont positifs, la souche isolée fait alors partie du biovar 1 (i.e. complexe *A. tumefaciens*) (**El Arbi et al.,2011**).

**Tableau 5 :** Provenance des plants hôtes des isolats utilisés pour l'identification des biovars

<b>Isolats</b>	<b>Plante hôte</b>	<b>Variété</b>	<b>Origine</b>
<b>I 1</b>	Amandier	Inconnu	Meknès
<b>I 2</b>	Pommier	<i>GALA</i>	Azrou
<b>I 3</b>	Pommier	<i>Red-deleicious</i>	Azrou
<b>I 4</b>	Pommier	<i>Fuji</i>	Azrou
<b>I 5</b>	Pêcher	<i>Prunus persica</i>	Chlihat
<b>I 6</b>	Poirier	<i>Pyrus communis</i>	Azrou
<b>I 7</b>	Prunier	<i>Malus domestica</i>	Meknès
<b>I 8</b>	Pommier	Inconnu	Meknès
<b>I 9</b>	Amandier	Inconnu	Meknès
<b>I 10</b>	Amandier	Inconnu	Chlihat

\*les isolats (I) 1,2,3 et 4 qui ont été isolés sur les deux milieux de culture afin d'évaluer les différents protocoles précédents de la Bio-PCR ; les isolats 4,5,6 et 7 ont été isolés au sein du laboratoire en 2018 ; les isolats 9 et 10 se sont des nouveaux isolats.

## 1. Examen microscopique

Avec des cure-dents stérilisés, une colonie fraîche âgée de 24 heures a été placée sur une lame propre et mélangée soigneusement avec une goutte de H<sub>2</sub>O stérile. Une fois qu'un mince film a été formé, la lame a été maintenue au-dessus du Bunsen pour le processus de fixation à chaud. Tout d'abord, le frottis a été inondé avec une solution de colorant cristal violet pendant 1 minute, puis rincé avec du H<sub>2</sub>O stérile pour éliminer l'excès de colorant. Ensuite, le frottis a été recouvert d'une solution d'iode pendant 1 minute, suivi par un lavage avec l'EDS. Le processus de décoloration a été effectué en faisant tomber goutte à goutte une solution d'éthanol à 95% sur le frottis pendant 10 secondes. Enfin, le frottis a été rincé avec l'EDS après contre-coloration avec la solution de colorant Safranin pendant 1 minute. La couleur et la morphologie des cellules ont été observées sous un grossissement de 100x en utilisant un microscope optique.

## 2. Production de 3-cétolactose

Ce test basé sur l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides (**Bernaerts et De Ley., 1963**). Seules les souches d'*A.tumefaciens* produisent l'enzyme 3-cétoglucosidase (**El Arbi et al.,2011**).

Les souches ont étéensemencées sur le milieu suivant :

Lactose	10g
Extrait de levure	1g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml
pH 6.8	
Autoclavage	120°C pendant 20 minutes

Les boites ont été incubées pendant 2 jours à 28°C.

Pour révéler les résultats il est nécessaire d'inonder les boites avec le réactif de Benedict qui se compose de :

Citrate de sodium	173g
-------------------	------

Carbonate de sodium anhydre	100g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	17.3g
Eau distillée	1000ml

Les souches appartenant à *A. tumefaciens* produisent l'enzyme 3-Cétolactose qui se manifeste par la formation d'un halo jaune autour des colonies.

### 3. Hydrolyse de l'urée

C'est un milieu qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens, notamment les agrobactéries.

Les souches bactériennes ont été ensemencées par piqueur central dans le milieu (annexe), contenant 2% d'urée et 0.012g/l de rouge de phénol (indicateur de pH). La solution d'urée est stérilisée par filtration (filtre 0.2µm) et rajoutée au milieu stérile maintenu à 45°C sous la hotte à flux laminaire puis incubation à 30°C pendant 48h.

L'hydrolyse de l'urée par l'uréase libère de l'ammoniaque qui alcalinise le milieu et fait virer l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

### 4. Hydrolyse de l'esculine

L'esculine est un hétéroside (molécule composée d'un ose associée à une structure non osidique). L'hydrolyse de l'esculine, catalysée par une b-glucosidase : l'esculinase, est un des critères usuels utilisé dans l'identification différentielle au sein de nombreux genres bactériens, notamment les agrobactéries.

Les souches bactériennes ont été ensemencées par piqueur central dans le culot de milieu gélosé à l'esculine qui se présente en tubes, qui ont été incubés à 37°C pendant 48h.

La présence de l'esculinase se traduit par la libération de glucose et de l'esculétine (El Arbi et al., 2011). Ce dernier, réagit avec les ions de fer III pour une forte coloration noire.

## **PARTIE III : RESULTAS ET DISCUSSION**

## I. Isolement d'*Agrobacterium tumefaciens*

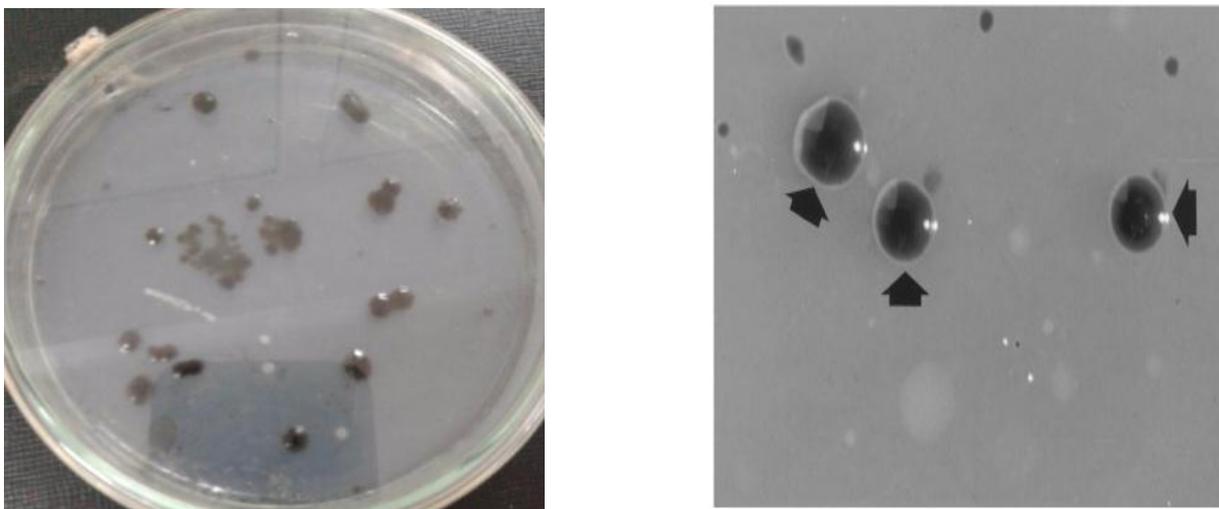
De nombreux milieux ont été focalisés sur l'isolement d'*Agrobacterium*, mais cet isolement est difficile, en raison de la faible concentration de la population bactérienne pathogènes dans les tumeurs des plantes hôtes, ainsi que le développement des colonies dans différents milieux semi-sélectifs prene de temps.

Dans ce travail nous avons examiné les échantillons de galle. Ensuite nous avons effectué l'isolement à partir de ces échantillons sur les milieux de culture spécifique MG-Te et sur le milieu 1A-Te.

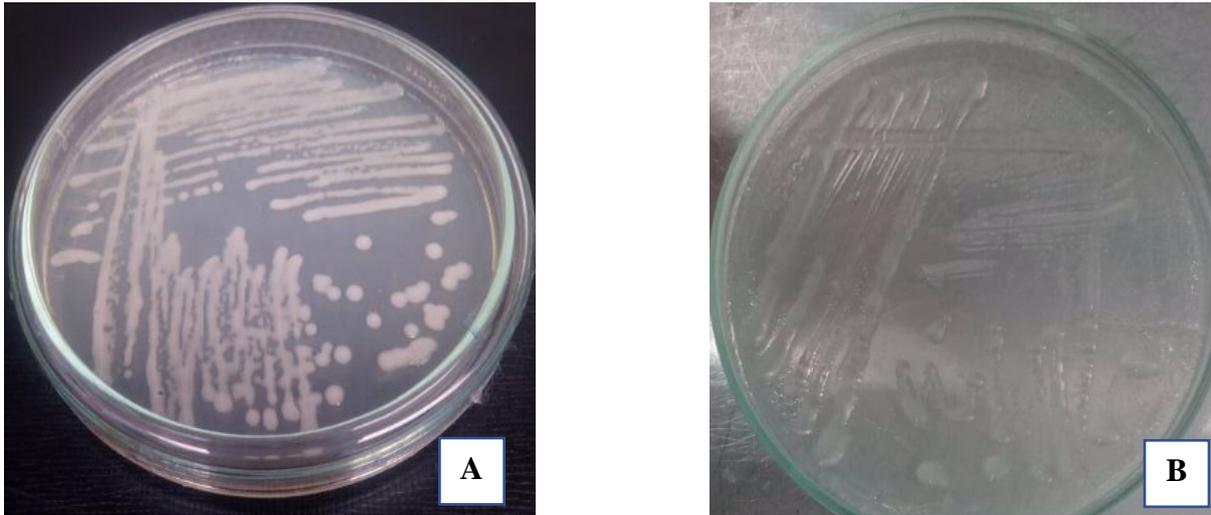
### 1. Isolement sur le milieu MG-Te

Des colonies bactériennes présentant les caractéristiques morphologiques spécifiques d'*A.tumefaciens* citées dans la littérature (**Moore et al., 2001**), ont été observées après 8 jours d'incubation. Ces colonies sont caractérisées par une couleur noire au centre probablement due à l'intracellulaire qui accumule des cristaux noirs de tellurite métallique, circulaires, lisses, muqueuses, bien bombées et brillantes (figure 6).

La purification a été faite par repiquage sur un milieu d'enrichissement LPGA et MG, qui ont permis d'observer des colonies bactériennes présentant les caractéristiques morphologiques d'*Agrobacterium tumefaciens* citées dans la littérature (**Moore et al., 1988**) : de couleur blanchâtres, lisses, arrondies, parfois muqueuses. Ces colonies présentent un contour régulier ou irrégulier avec un diamètre de 0,5 à 1,0  $\mu\text{m}$  sur 1,5 à 5,0  $\mu\text{m}$  (ou plus) de longueur selon le milieu de culture (figure 7).



**Figure 6** : Aspect des colonies d'*A.tumefaciens* sur le milieu MG tellurite



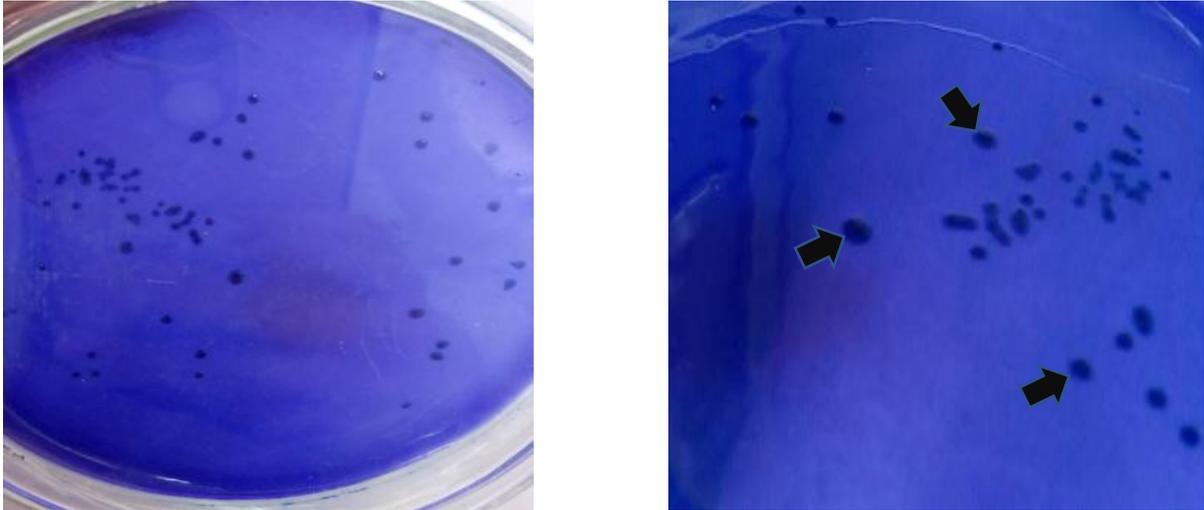
**Figure 7** : Aspect des colonies d'*A.tumefaciens* sur le milieu LPGA. (A). Sur le milieu MG (B).

## 2. Isolement sur le milieu 1A-Te

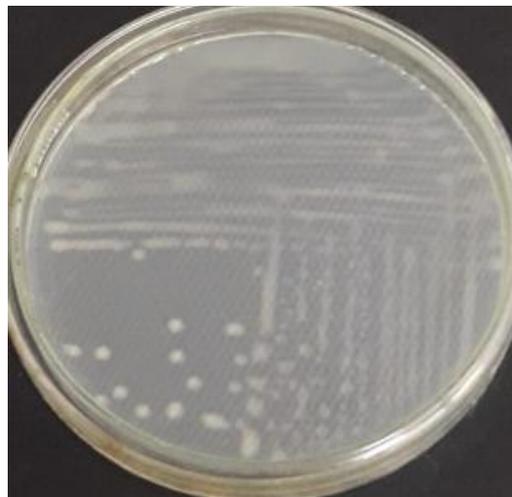
Des colonies bactériennes présentant les caractéristiques morphologiques spécifiques d'*A. tumefaciens* citées dans la littérature (Oh, P. M., 2014), ont été observées après 48h d'incubation, une morphologie luisante, de couleur noire caractéristique avec brillance métallique due à l'incorporation de tellurite, muqueuses, bombées (Oh, P. M., 2014). (Figure 8).

Sur la gélose solidifiée telle que le milieu d'enrichissement YMA, les colonies d'*A. tumefaciens* ont été repiquées et purifiées. Sur ce milieu les caractéristiques morphologiques de la bactérie citées dans la littérature (Campillo et al., 2012) ont été observées : des colonies blanches de consistance crémeuse, lisses, convexes, luisantes, et circulaires avec des bords régulier et irrégulier (figure 9).

La croissance de la bactérie sur ces milieux contenant des glucides, des couches de polysaccharides sont souvent sécrétées, laissant aux colonies un aspect volumineux et une apparence visqueuse (Murugesan., 2010).



**Figure 8 :** Aspect des colonies d'*A.tumefaciens* sur le milieu 1A-Te



**Figure 9 :** Aspect des colonies d'*A.tumefaciens* sur le milieu YMA

### 3. Comparaison entre les milieux de culture

Le dénombrement direct des populations d'agrobactéries et l'étude de la structure génétique des souches isolées nécessite de nouvelles méthodes sélectives, par des milieux qui assurent la récupération des populations recherchées sans produire de différences significatives entre les génotypes d'agrobactéries (Mougel *et al.*, 2001).

Comme proposé par Brisbane et Kerr (1983), des supports spécifiques aux biovars d'*Agrobacterium*, et spécialement, les représentants de biovar 1 et biovar 2, parce que ces agrobactéries sont les organismes les plus fréquemment isolés des tumeurs de la galle du collet chez les arbres fruitiers et pépinières (Mougel *et al.*, 2001) tels que le MG-Te qui contient du

K<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Te qui est utile pour isoler et identifier les agrobactéries. Ce dernier composé a été utilisé pour améliorer la sélectivité des milieux, et il est très utilisé pour les isolements des agrobacteries directement à partir du sol (Oh, P. M., 2014).

Une étude faite par Mougel et al., (2001) a montré pour la première fois que presque tous les agrobactéries sont résistantes au tellurite. D'autres membres de la sous-division alpha des protéobactéries, tels que *Rhodobacter spp.*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium spp* et *Rhizobium spp.* ont également été trouvés résistants aux K<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Te (Moore et al., 1992).

La résistance à la tellurite a été étudiée en déterminant les CMI de K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub> pour les souches sélectionnées pour représenter la diversité actuellement connue dans le genre *Agrobacterium* (Mougel et al., 2001) et presque toutes les agrobacteries sont capables de tolérer la toxicité de tellurite métallique à une concentration d'ordre de 200 mg / L (Oh, P. M., 2014), il est donc fortement recommandé de compléter les ions de tellurite qui possèdent un avantage sélectif important (Oh, P. M., 2014) car ils permettent d'inhiber les espèces du genre *Pseudomonas* fréquemment associées aux agrobactéries dans les tumeurs (El Arbi et al., 2014).

Et le 1A-Te qui contient du sélénite toxique est adopté pour isoler et identifier les agrobactéries (Oh, P. M., 2014). Mougel et al. (2001) ont conclu que la concentration de sélénite toxique doit être prédéterminée, en particulier lorsque les échantillons traités contenant une faible densité d'*Agrobacterium*, car l'excès de sélénite peut être toxique et délétère pour ces bactéries, mais la faible concentration est insuffisante pour freiner la croissance des espèces concurrentes (Mougel et al., 2001).

La concentration originale Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> dans le milieu 1A est 0,1 g/l (Mougel et al., 2001) qui n'était pas assez élevé pour contrôler efficacement la microflore concurrente, et surtout que la densité d'agrobactéries dans les tumeurs est faible. La concentration en sélénite dans le milieu ne pouvait pas être augmentée parce que les études de CMI, ont montré que la résistance des souches d'agrobactéries à Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> varie considérablement (les CMI varient de 2 à 14 g/l), alors que le contrôle complet de la concurrence la microflore nécessite au moins 10 g/l. La réduction de sélénite était donc utilisée pour améliorer la sélectivité moyenne de milieu (Mougel et al., 2001).

## II. Test du pouvoir pathogène

### 1. Test d'hypersensibilité sur Tabac

Les plantes de tabac sont utilisées pour leur faculté de présenter des zones de collapsus et de nécrose, au niveau du limbe des feuilles lorsqu'elles sont en présence de la plupart des bactéries phytopathogènes. Ces collapsus et nécroses témoignent d'une réaction hypersensible, permettant de limiter la propagation de l'agent pathogène introduit. Alors, ce test permet de démontrer la capacité d'une bactérie à entraîner une maladie.

Après 3 jours, la souche d'*A.tumefaciens* testée a provoqué des réactions d'hypersensibilité positives sur les feuilles de tabac. Ce résultat (figure 10) confirme le caractère phytopathogène de cet isolat.

**De Pinto et al. (2003)** rapportent que le développement d'une réaction hypersensible sur feuilles de tabac est étroitement lié à la synthèse de certains exopolysaccharides (EPS) par *A. tumefaciens* et d'autres bactéries pathogènes. Ces molécules sont en effet les déterminants de leur virulence. Elles agissent pour contrecarrer les mécanismes de défenses des plantes. Plusieurs EPS réduisent la production de la phénylalanine ammonialyase, l'enzyme marqueur de la réponse des plantes au stress. En plus, ces EPS peuvent aussi altérer le métabolisme de l'ascorbate, un autre paramètre indicatif des conditions de stress.

Par contre, la réaction d'hypersensibilité engendrée par *A tumefaciens* est due probablement à sa capacité de produire des enzymes spécifiques qui dégradent l'épiderme des tissus polygalacturonase, endoglucunase (**Fokar et al., 1998**). Ces enzymes sont ainsi responsables des nécroses des racines.



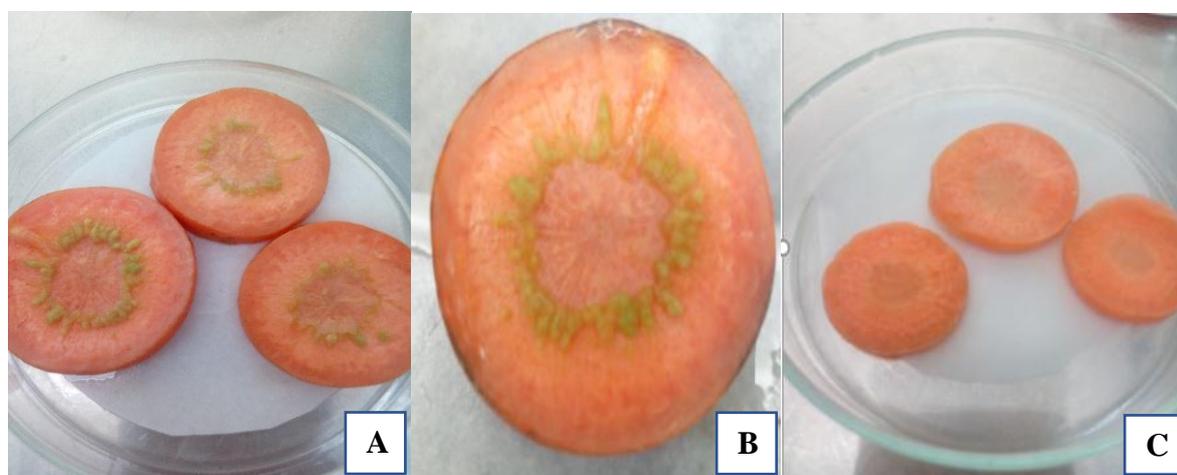
**Figure 10** : Réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac. (A) par *A.tumefaciens*(B).témoin négatif par E.D.S.

## 2. Reproduction des symptômes

Le test du pouvoir pathogène de la souche *d'Agrobacterium tumefaciens* nécessite au moins une espèce végétale indicatrice pour vérifier le pouvoir tumorigène, et les disques de carotte ont été donnés des réponses positives.

### 2.1 Sur carotte

Pour le test du pouvoir pathogène sur carotte nous avons inoculé les disques de carotte et après 14 jours d'incubation, nous avons observé le développement des jeunes galles au niveau du tissu méristématique autour du système vasculaire central de la face inférieure des tranches de carotte (figure 11). Nos résultats sont similaires à celle obtenus par **Marja et al en 2004**.



**Figure 11** : Test de phytopathogénicité sur les disques de carotte. Croissance des tumeurs autour du système vasculaire central. (A) et (B) Contrôle positif, (C) témoin négatif : inoculation par EDS.

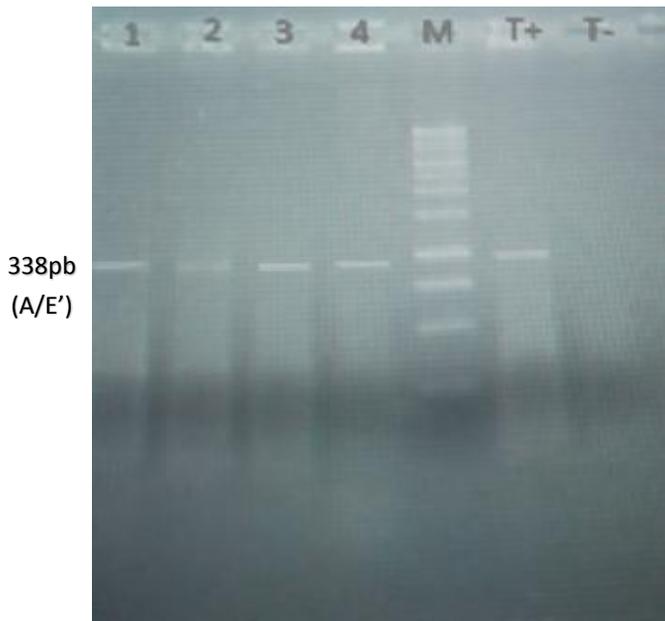
## III. Diagnostic moléculaire

Dans cette étude, nous avons analysé par le test PCR des échantillons représentatifs des souches, qui ont été identifiés comme étant *A. tumefaciens*. Le couple d'amorce A/E' a été utilisé dans ce test et permet l'amplification d'une région de 338 pb du gène de la virulence *virD2*.

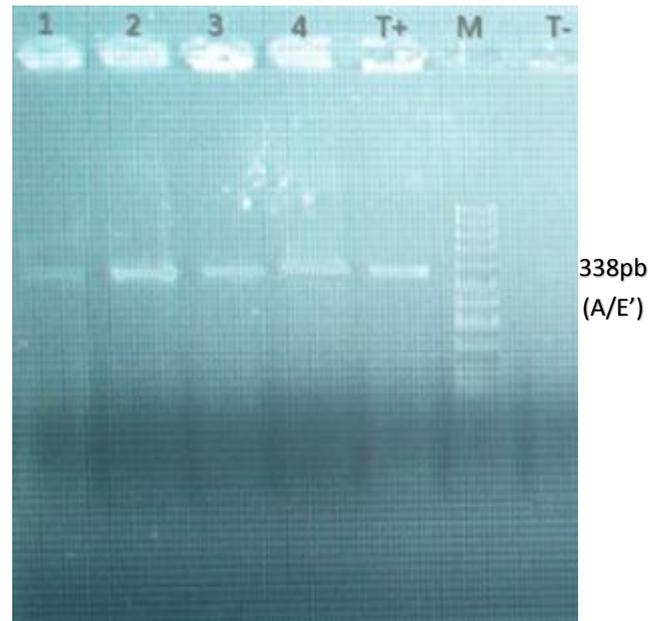
### 1. Evaluation des protocoles

#### 1.1. Détection par Bio-PCR

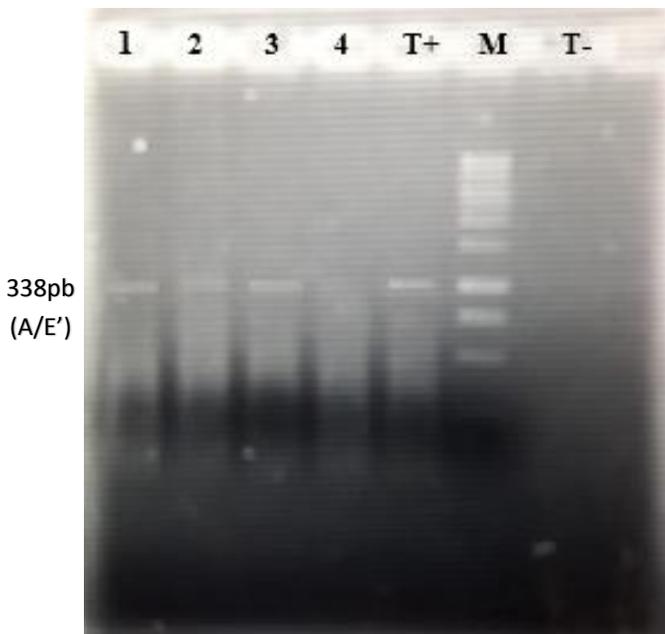
L'investigation par l'outil moléculaire, en utilisant comme matrice d'ADN les extraits résultant des trois protocoles de lyse cellulaire (1,2 et 3), ainsi que l'enrichissement sur milieu LB liquide, permet l'obtention des profils présentés par les figures 12, 13,14 et 15.



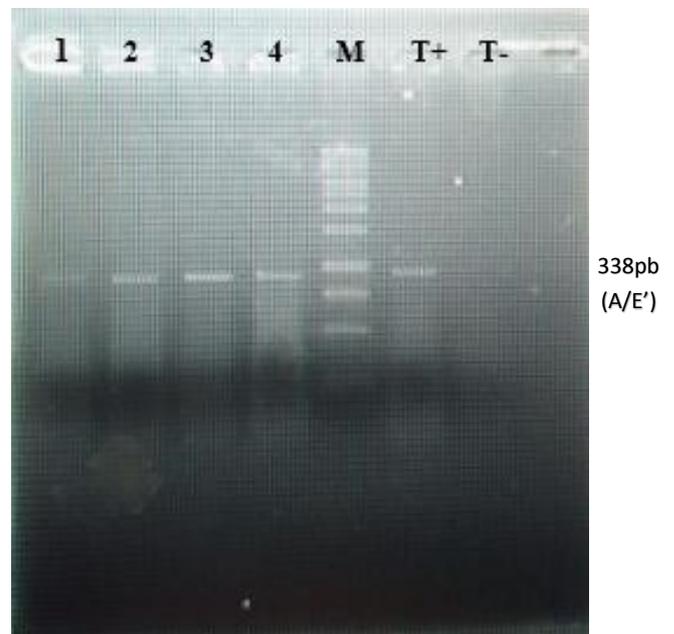
**Figure 12 :** Profil d'amplification de l'ADN d'*A. tumefaciens* par usage de couple d'amorce A/E' (1, 2, 3 et 4 : extrait d'ADN selon le **Protocole 1** ; M : Marqueur du poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif)



**Figure 13 :** Profil d'amplification de l'ADN d'*A. tumefaciens* par usage de couple d'amorce A/E' (1, 2, 3 et 4 : extrait d'ADN selon le **Protocole 2** ; M : Marqueur du poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif)



**Figure 14 :** Profil d'amplification de l'ADN d'*A. tumefaciens* par usage de couple d'amorce A/E' (1, 2, 3 et 4 : extrait d'ADN selon le **Protocole 3** ; M : Marqueur du poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif)



**Figure 15 :** Profil d'amplification de l'ADN d'*A. tumefaciens* par usage de couple d'amorce A/E' (1, 2, 3 et 4 : extrait d'ADN selon le **Protocole 4** ; M : Marqueur du poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif)

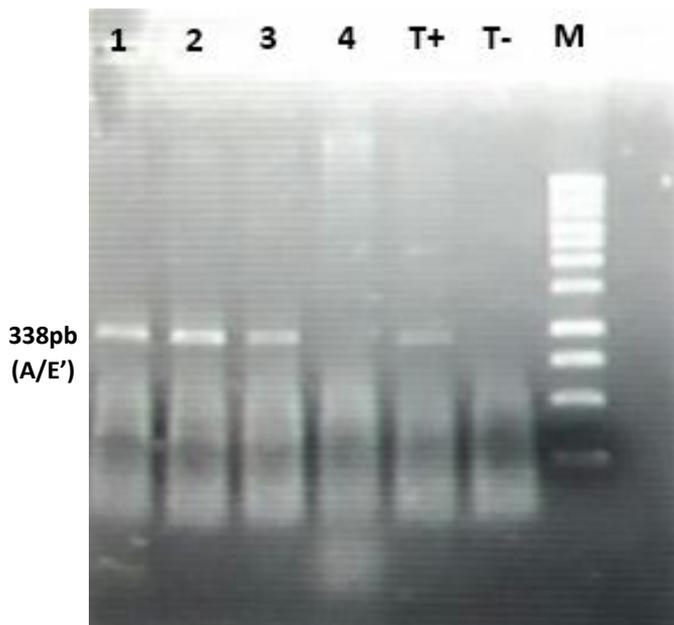
La réalisation de la Bio-PCR pour l'*A. tumefaciens* révèle des résultats positifs pour les différents tests d'amplification ce qui montre un résultat positif pour l'ensemble des préparations des matrices d'ADN testés. Par conséquent, L'amplification par PCR en utilisant le couple d'amorce A/E' montre la formation d'un seul amplicon de 338 pb pour les quatres tests.

Ces résultats assurent que les quatre protocoles de lyse cellulaire (par lyse alcaline, par chauffage et par choc thermique) sont valables pour la détection de la bactérie phytopathogène *A. tumefaciens*. Les bandes obtenues lors de l'utilisation du couple d'amorce A/E' témoignent l'amplification spécifique du gène plasmidique de virulence *virD2* responsable du l'intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante chez les souches pathogènes d'*Agrobacterium spp.* Cette amplification fut obtenue par **Sawada et Tsuchiya., (2003)** et par **Sawada., (2004)** et elle permet la discrimination entre les souches pathogènes et non pathogènes. De plus, une étude a été faite par **Haas et al., (1995)** indique que le couple A/E' et A/C'sont les plus spécifiques pour la détection du gène de virulence des souches pathogènes d'*A. tumefaciens*, les plus reproductible et ne donne aucune amplification à partir d'une souche non pathogène.

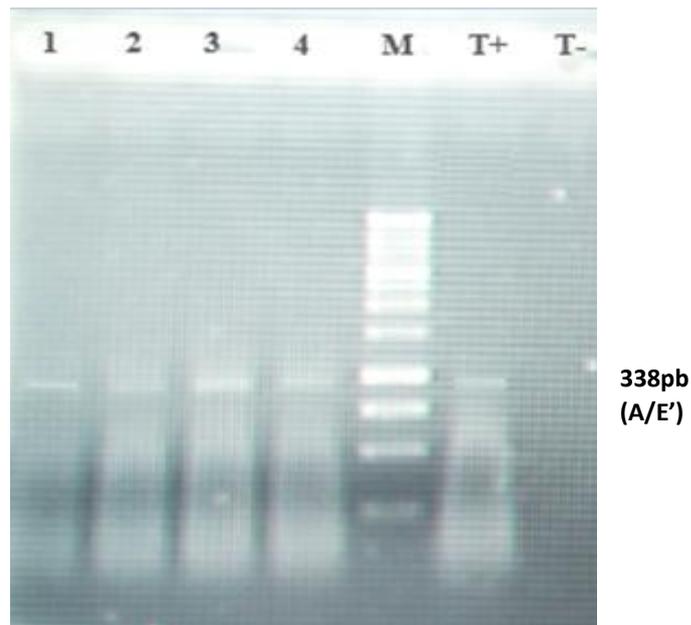
Enfin, la réalisation de la Bio-PCR après l'enrichissement sur un milieu LB liquide a donné des résultats positifs pour les différents extrais d'ADN testés. Ces amplifications sont intenses et bien visibles. **López et al.,(2003)** rapportent que l'enrichissement de la bactérie sur un liquide permet d'augmenter la population avant le traitement par le test PCR. En général, cette méthode d'enrichissement facilite la détection des agents ciblés en augmentant leur nombre et en diminuant les inhibiteurs. Cette technique permet également de détecter les bactéries dans les graines, les échantillons de sol et les tissus végétaux asymptomatiques (**Schaad et al., 1995**). Ce protocole est applicable aux bactéries cultivables et à croissance rapide et peuvent également détecter des cellules viables mais non cultivables (**Roszak et Colwell., 1987**).

## 1.2. Détection par PCR directe

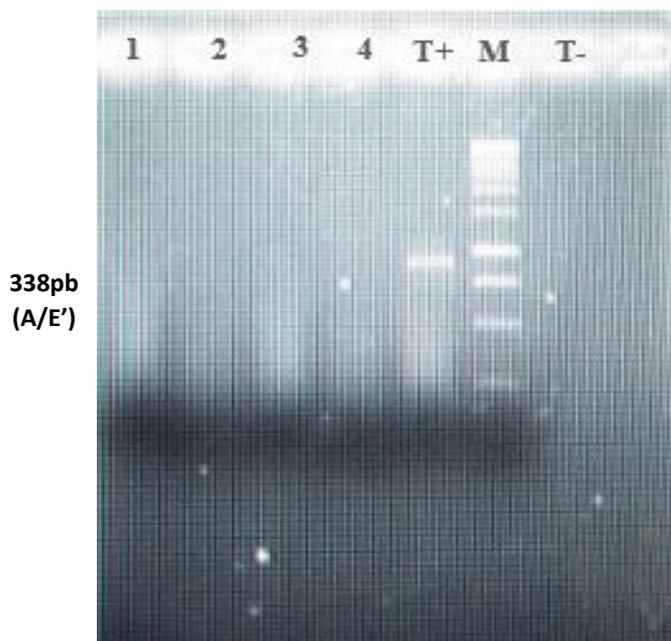
La réalisation de la PCR directement à partir des plantes infectées représente un objectif d'importance majeur dans ce travail, ainsi quatre protocoles d'extraction d'ADN à partir des tumeurs développées sur des plantes, acheminées au laboratoire, ont été utilisés. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 16, 17, 18 et 19.



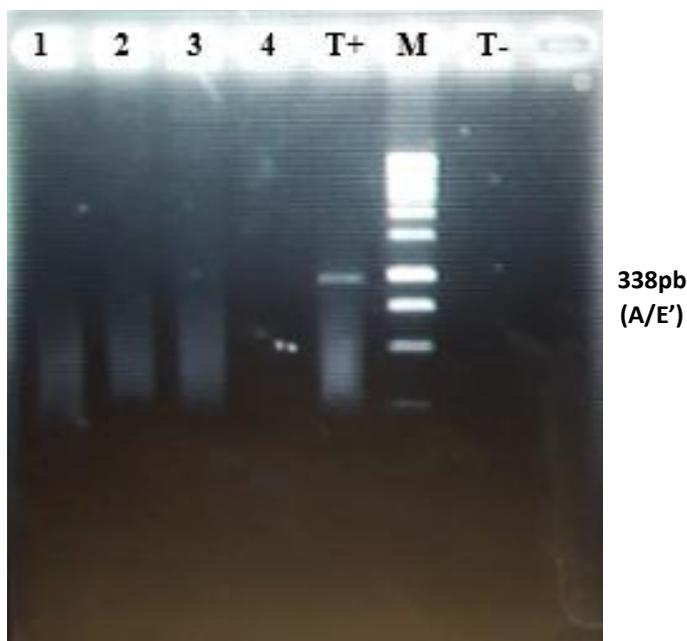
**Figure 16 :** Profil d'amplification de l'ADN d'*A. tumefaciens* par usage de couple d'amorce A/E' (1, 2, 3 et 4 : extrait d'ADN selon le **Protocole 1** ; M : Marqueur du poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif)



**Figure 17 :** Profil d'amplification de l'ADN d'*A. tumefaciens* par usage de couple d'amorce A/E' (1, 2, 3 et 4 : extrait d'ADN selon le **Protocole 2** ; M : Marqueur du poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif)



**Figure 18 :** Profil d'amplification de l'ADN d'*A. tumefaciens* par usage de couple d'amorce A/E' (1, 2, 3 et 4 : extrait d'ADN selon le **Protocole 3** ; M : Marqueur du poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif)



**Figure 19 :** Profil d'amplification de l'ADN d'*A. tumefaciens* par usage de couple d'amorce A/E' (1, 2, 3 et 4 : extrait d'ADN selon le **Protocole 4** ; M : Marqueur du poids moléculaire ; T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif)

Les résultats de la PCR sans isolement préalable des bactéries sur un milieu de culture montrent que l'amplification du gène de virulence *virD2* a bien eu lieu par amplification pour les protocoles 1 et 2 (figure 16 et 17). Par contre, l'amplification PCR à partir des extraits d'ADN réalisés selon les protocoles 3 et 4 n'a donné aucun résultat.

L'amplification des acides nucléiques extraits directement du matériel végétal, en contournant les longues procédures d'isolement et de purification des bactéries sur milieux de culture, peut être limitée par la présence des composés végétaux inhibant l'ADN polymérase, en particulier les polyphénols et les polysaccharides (De Boer *et al.*, 1995). En raison de la présence de ces composés dans les plantes, plusieurs auteurs ont déclaré que l'ADN doit être purifié en utilisant du 2-mercaptoéthanol ou de la polyvinylpyrrolidone, avec une colonne échangeuse d'ions ou des Kits commerciaux (Bereswill *et al.*, 1992 ; Eastwell *et al.*, 1995 ; Cubero *et al.*, 1999 ; Taylor *et al.*, 2001).

Dans ce travail, les protocoles 1 et 4 sont basés sur l'utilisation d'un tampon qui contient PVP (PolyVinyl Pyrrolidone) ou bien des détergents seulement (le Triton X-100 et le Tween 20) pour les protocoles 2 et 3. Ces composés peuvent à la fois éliminer les inhibiteurs de la PCR directe ainsi que provoquer la lyse des cellules bactériennes. Ceci augmente la pureté des ADN à amplifier (John *et al.*, 1992 ; Pitch et schrabert., 1993). Les protocoles 2 et 3 diffèrent des autres protocoles par l'ajout d'un choc thermique qui permet la lyse cellulaire afin d'obtenir une quantité plus importante de l'ADN extrait. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus (Puopolo *et al.*, 2007).

#### IV. Tests biochimiques

##### 1. Examen microscopique

L'observation microscopique d'*A.tumefaciens* révèle des bactéries en bâtonnet à Gram négatif.

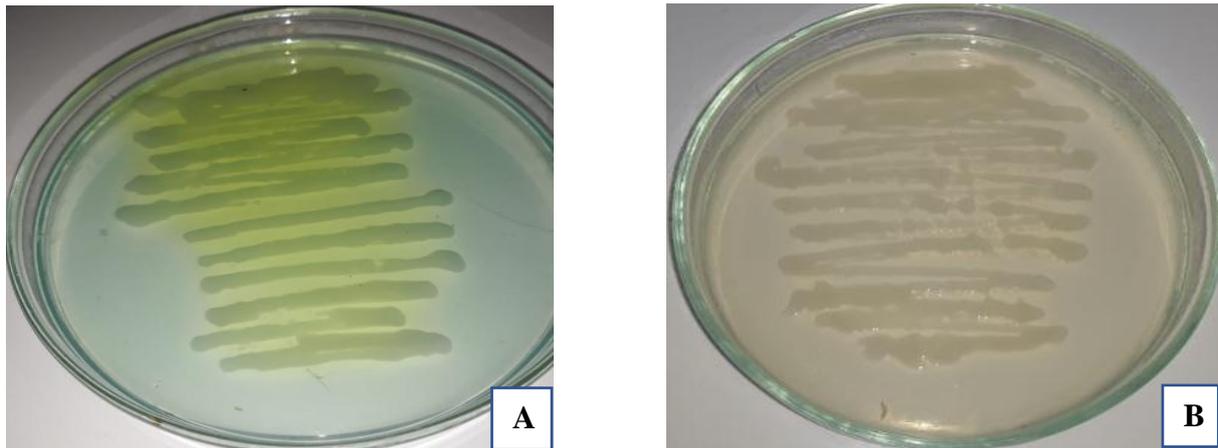


**Figure 20** : observation microscopique d'*A.tumefaciens* ( $G \times 1000$ )

Pour confirmer l'appartenance des isolats au biovar *A. tumefaciens* nous avons effectué une identification par les tests biochimiques concernés pour la caractérisation des biovars : la production de 3-cétolactose, l'hydrolyse de l'uréase et l'hydrolyse de l'esculine.

## 2. Production de 3-cétolactose

Après l'inondation des boîtes avec le réactif de Benedict, un halo jaune est formé autour des colonies (figure 21).



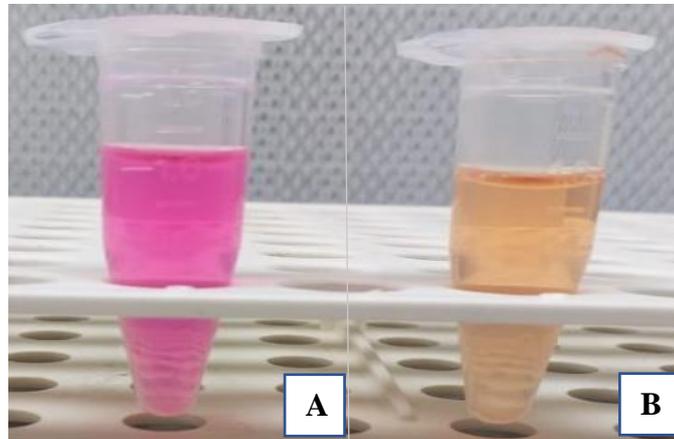
**Figure 21** : Test de production de 3-cétolactose.**A.** réaction positive se traduit par la formation d'un halo jaune intense.**B.** réaction négative se traduit par l'absence du halo jaune.

Sur gélose au lactose, les huit premiers isolats (tableau 6) montrent un halo jaune autour des colonies, ce qui indique que toutes ces souches produisent l'enzyme 3-cétogalactosidase et donc l'oxydation du C3 du glycosyl des saccharides a été provoquée. **Bernaerts et De Ley., (1969)**, ont déclaré que *A. tumefaciens* est capable de convertir le lactose en 3-cétolactose par voie enzymatique, et la présence de l'espèce *A. tumefaciens* a été confirmée grâce à l'établissement d'un dépôt jaune autour des colonies résultant de la précipitation d'oxyde cuivreux  $\text{CuO}_2$ .

L'appartenance au biovar 1 qui correspond à l'espèce *A. tumefaciens* est déterminée par la capacité à produire du 3-cétolactose. Les isolats I9 et I10 qui ne produisent pas de 3-cétolactose appartiennent généralement au biovar 2, qui correspond à l'espèce *Rhizobium rhizogenes* ou au biovar 3 qui correspond à l'espèce *A. vitis* (**Kesters et De Ley., 1984**) comme le confirme l'analyse du gène *rrs* (**Sawada et al., 1993**).

### 3. Hydrolyse de l'urée

Après 48h d'incubation, les souches alcalinisent le bouillon à base de l'urée suite à l'hydrolyse de l'urée qui se traduit par un changement de la coloration du milieu vers le rose-fuchsia (figure 22).



**Figure 22 :** Test de l'hydrolyse de l'urée.**A.** réaction positive se traduit par un changement de la coloration vers le rose-fuchsia.**B.** contrôle négatif.

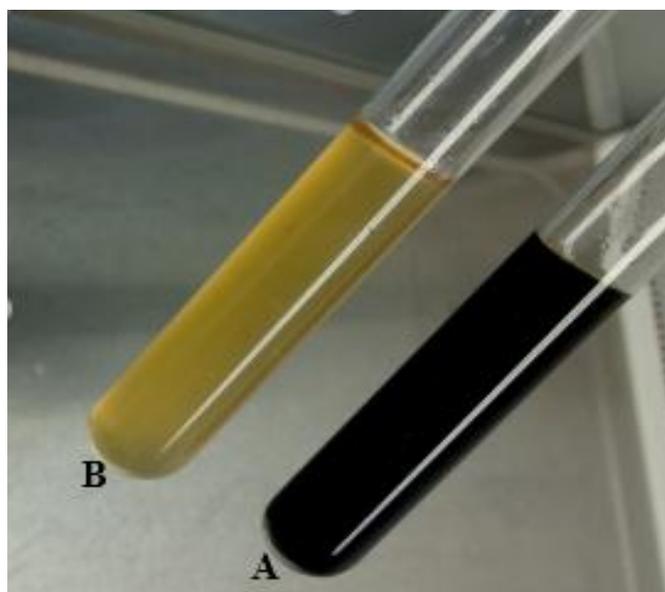
La mise en évidence de la capacité des bactéries appartenant au genre *Agrobacterium* à hydrolyser l'urée a été initialement décrite par **Jarvis et al., (1977)**.

Le bouillon à base d'urée a été formulé pour contenir du rouge de phénol en tant qu'indicateur de pH (acide : couleur jaune, alcalin : couleur fuchsia-rose). Le test à l'uréase est nécessaire pour déterminer la capacité des isolats à sécréter de l'uréase, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des composés d'urée dans le bouillon (**Jarvis et al., 1977**).

*A. Tumefaciens* a uréase à action rapide qui peut dégrader rapidement l'urée (**Oh, P. M., 2014**), qui se traduit par l'augmentation de la valeur du pH au niveau alcalin, en induisant ainsi un changement colorimétrique du bouillon, ce qui indique la dégradation de l'urée et la libération des ions d'ammonium (**Guiraud., 1998**). Ce phénomène a été observé avec les 8 isolats (tableau 6), où le bouillon de couleur jaune-orange à l'origine a été changé en couleur rose-fuchsia (figure 22) au cours des 48 premières heures d'incubation, et les autres isolats (I9 et I10) ont donné une réaction négative où la couleur du milieu reste identique à celle de témoin négatif, ils peuvent être soit du biovar 2 ou du biovar 3.

#### 4. Hydrolyse de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine par les souches bactériennes se manifeste par une coloration noire du milieu de culture due à la libération du glucose et de l'esculétine, responsable de cette teinte (figure 23).



**Figure 23 :** Test de l'hydrolyse de l'esculine. **A.** réaction positive se traduit par un changement de la coloration de milieu de culture vers le noire. **B.** contrôle négatif.

Un test positif d'hydrolyse de l'esculine se manifeste par une coloration noire du milieu de culture due à la libération du glucose et de l'esculétine par l'enzyme esculinase (Nabi et al., 2016). Ce phénomène a été observé avec les 8 premiers isolats (tableau 6), ceci nous a permis de confirmer l'appartenance de ces isolats au biovar 1 (El Arbi et al., 2011). Les autres isolats (I9 et I10) ont donné une réaction négative, sans avoir un changement colorimétrique de milieu gélosé, c'est-à-dire ces isolats peuvent appartenir soit au biovar 2 ou au biovar 3. (El Arbi et al., 2011).

Les résultats des tests biochimiques consignés dans le tableau 6, nous ont permis de confirmer l'appartenance des 8 premiers isolats au biovar 1 (i.e. au complexe *A. tumefaciens*), sans pouvoir se prononcer, pour les autres isolats (I9 et I10), qui peuvent être soit du biovar 2 ou du biovar 3 (i.e. *R. rhizogenes* ou *A. vitis*)

**Tableau 6** : Caractérisation biochimique des isolats

	<b>Uréase</b>	<b>Esculinase</b>	<b>Cétolactose</b>
<b>Biovar 1</b>	+	+	+
<b>Biovar 2</b>	D	D	-
<b>Biovar 3</b>	ND	ND	-
<b>Isolats</b>			
I1	+	+	+
I2	+	+	+
I3	+	+	+
I4	+	+	+
I5	+	+	+
I6	+	+	+
I7	+	+	+
I8	+	+	+
I9	-	-	-
I10	-	-	-

(+) : réaction positive ; (-) : réaction négative ; (D) : réaction diverse ; (ND) : réaction non définie.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La maladie du Gall de collet, est répandue sur les rosacés partout dans le monde, elle est disséminée largement avec le matériel de multiplication des arbres. Cette maladie est plus sévère dans les régions au climat tempéré, où les dommages causés par l'hiver sont des choses courantes. Elle est causée par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* vivante comme un organisme saprophyte, elle fait partie de la flore naturelle du sol et peut survivre de façon systémique dans le système vasculaire des plantes, ne montrant aucun symptôme pendant plusieurs années, jusqu'à ce que les dommages cellulaires surviennent. Compte tenu de l'importance des attaques de cette bactérie pathogène *A. tumefaciens* sur la culture des rosacés au Maroc, nous avons entamé une étude de détection moléculaire de ce pathogène. En effet, nous avons effectué des essais de détection de cette bactérie à partir des colonies purifiées sur milieu de culture (Bio-PCR) et directement à partir des plantes infectées (PCR directe), en évaluant plusieurs protocoles de préparation des matrices d'ADN en utilisant un couple d'amorce spécifique pratiquée pour cette espèce bactérienne. Par ailleurs, les résultats de la caractérisation biochimique ont montré que parmi les isolats obtenus, les huit premiers isolats appartiennent au biovar1 c'est-à-dire au complexe d'espèces *A. tumefaciens* selon la nomenclature actuelle. De plus, un test du pouvoir pathogène des isolats sur des plantes indicatrices de tabac et sur les disques de carotte, nous a permis de confirmer la pathogénicité de la bactérie étudiée. A la lumière des résultats obtenus sur la détection moléculaire *A. tumefaciens*, nous pouvons conclure ce qui suit :

- La PCR est une technique efficace qui permet une détection sensible et rapide des bactéries phytopathogènes.
- L'utilisation d'un couple d'amorce spécifique pour la bactérie en utilisant la PCR standard qui permet la confirmation de la présence de la bactérie dans un échantillon testé.

A partir de ces résultats, nous pouvons recommander ce qui suit :

- Evaluer la détection de cette bactérie phytopathogène dans les semences et dans le sol, puisque la certification de l'innocuité de ces derniers est d'ailleurs un moyen sûr de limiter la propagation des maladies.

- Evaluer la détection de cette bactérie phytopathogène dans des échantillons asymptomatiques, afin d'effectuer la lutte.
- Adopter des techniques moléculaires plus sensibles, fiables et rapides telle que la PCR en temps réel.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ashby AM., Watson MD., Loake GJ., and Shaw CH. (1988).** Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *J. Bacteriol.* 170, 4181–4187.
- Beijerinck MW., Delden V. (1902).** Abteilung II. 9, 3-43.
- Beijersbergen A., Hooykaas, P.J.J. (1993).** The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. in: Nester, E.W., & Verma, D.P.S. (Ed.). *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 37-49.
- Benjama A. (2017).** Le Crown Gall des rosacées fruitières et rosier au Maroc : Aspects épidémiologiques, détection biochimique et moléculaire, et perspective de lutte biologique par la K1026. *Agronomie*, 131-132.
- Benjama A., Redwane A., El Gadda M., El Medraoui L., Ouzrit M., Boussad L., El OuardR., Nesme X. (2002).** Premiers résultats de lutte biologique par la K 84 et la K 1026 contre *Agrobacterium tumefaciens*, agent du crown-gall des rosacées fruitières et rosier au Maroc. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 32, 509 –514.
- Benjama A. (2000).** Dépistage d’*Agrobacterium* des rosacées fruitières par chromatographie en phase gazeuse au Maroc : Avantages et inconvénients. *El-Awamia*, 101, 67-89.
- Benjama A., Alami N., Saadaoui MM. (1996).** Etude sérologique des souches marocaines d’*Agrobacterium tumefaciens*, agent de la galle du collet des rosacées fruitières. *Agronomie* 16, 517–522.
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geiderq., K. (1992).** Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11), 3522-3526.
- Bernaerts J.E., De Ley J. (1963).** A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature*, N°199 pp 406-407.
- Bini F., Geider K., Bazzi C. (2008).** Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel virD2 gene-specific primers that discriminate two subgroups. *Eur J Plant Pathol*, 122:403–411.

**Bouzar H., and Jones JB. (2001)** . *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 1023-1026.

**Bouzar H., Daouzli N., Krimi, Z., Alim A. et Khemici E. (1993)**. 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.

**Brisbane, P. and Kerr, A. (1983)**. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3), pp.425-431.

**Brunaud V., Balzergue S., Dubreucq B., Aubourg S., Samson F., Chauvin S., Bechtold N., Cruaud C., DeRose R., Pelletier G., Lepiniec L., Caboche M., and Lecharny A.(2002)**. T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep*, 3, 1152-1157.

**Burr, T.J. (2004)**. Grape Crown Gall Biology and Strategies for Control. New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, *Foundation plant service, FPS Grape program newsletter*,18(16).

**Cangelosi GA., Hung L., Puvanesarajah V., Stacey G., Ozga DA., Leigh JA., and Nester EW. (1987)**. Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. *J Bacteriol*, 169, 2086-2091.

**Chilton MD., and Que Q. (2003)**. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at doublestranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiol*, 133, 956-965.

**Chilton MD., Drummond MH., Merio DJ., Sciaky D., Montoya AL., Gordon MP., and Nester EW. (1977)**. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11, 263-271.

**Christie PJ., and Cascales E. (2005)**. Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems. *Mol Membr Biol*, 22, 51-61.

**Conn, H. J. (1942)**. Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bacteriol* , U.353-360.

**Costechareyre D ., Rhouma A., Lavire C., Portier P., Chapulliot D., Bertolla F., Boubaker A., Dessaux Y., and Nesme X. (2010)**. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by recA allele analysis: *Agrobacterium* recA diversity. *Microb Ecol*, 60, 862-872.

**Cubero J., et López M. (2005).** *Agrobacterium tumefaciens* Persistence in Plant Tissues after Transformation. in *Methods in Molecular Biology*, Volume 286, Peña L. (ed.), Transgenic Plants Methods and Protocols, Humana Press, Inc. Totowa, N.

**Cubero J., Martinez M. C., Llop, P. et Lopez, M. M. (1999).** A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *J. Appl. Microbiol.* 86, 591-602

**De Boer S. H., Ward L. J., Li, X., Chittaranjan S. (1995).** Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Research*, 23(13), 2567–2568.

**De Cleene M. et De Ley J. (1976).** The host range of crown gall. *Botanical Review* 42, 390-466 evidence for generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 2693–2697.

**Dessaux Y., Petit A., and Tempe J. (1992).** Opines in *Agrobacterium* biology. *Molecular Signals in Plant-Microbe Interactions*, 109–136.

**Dessaux Y., Guyon P., Petit A., Tempé J., Demarez M., Legrain C., Tate ME., and Farrand SK. (1988).** Opine utilization by *Agrobacterium* spp.: octopine-type Ti plasmids encode two pathways for mannopinic acid degradation. *J Bacteriol*, 170, 2939-2946.

**Diana V. B., et Dejeu L. (2011).** Crown gall (*Agrobacterium* spp.) and grapevine. *J. Hort.Forest. Biotechnol.*, 15(1). 130-138. *Disease*, 647, 674 – 676.

**Dong L.C., Sun C.W., Thies K.L., Luthe D.S., Graves, Jr. C.H. (1992).** Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 82: 434- 439.

**DePinto M. C., Lavermicocca P., Evidente A., Corsaro, M. M., Lazzaroni S., De Gara L. (2003).** Exopolysaccharides produced by plant pathogenic bacteria affect ascorbate metabolism in *Nicotiana tabacum*. *Plant and cell physiology*, 44(8) : 803-810.

**Eastwell J.C., Willis L.U., Cavileer I.D., (1995).** A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 79-80.

**El Arbi M., Rhouma A., Chaari A., & Nesme X. (2011).** Première observation de la maladie de la galle du collet causée par *Agrobacterium tumefaciens* sur l'olivier en Tunisie. *plant pathology*, 33(4), 458-464.

**EL bakkal S. (2017).** Efficacité de la lutte biologique contre la galle du collet de la vigne causée par *Allorhizobium vitis*. mémoire : Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources. Faculté des Sciences et Techniques : Université sidi mohamed ben abdellah Fès, 43(1).

**Efetova M., Zeier J., Riederer M., Lee CW., Stingl N., Mueller M., Hartung W., Hedrich R., and Deeken R. (2007).** A central role of abscisic acid in drought stress protection of *Agrobacterium* induced tumors on *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 145, 853-862

**Escobar M.A., Civerolo E.L., Summerfelt K.R., Dandekar A.M. (2001).** RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, pp: 13437-13442

**Filichkin SA., and Gelvin SB. (1993).** Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1, D2 endonuclease. *Mol Microbiol*, 8, 915-926.

**Fokar M. (1998).** Antisense-mediated resistance to *Agrobacterium vitis*. *Agronomie*. Texas Tech University, 82-87.

**Gelvin SB. (2003).** *Agrobacterium*-mediated plant transformation : the biology behind the "genejockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 16-37.

**Goodner B., Hinkle G., Gattung S., Miller N., Blanchard M., Quorllo B., Goldman BS., Cao Y., Askenazi M., Halling C., Mullin L., Houmiel K., Gordon J., Vaudin M., Iartchouk O., Epp A., Liu F., Wollam C., Allinger M., Doughty D., Scott C., Lappas C., Markelz B., Flanagan C., Crowell C., Gurson J., Lomo C., Sear C., Strub G., Cielo C., and Slater S. (2001).** Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2323-2328.

**Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod/RIA, Paris, France.

**Guyon P., Chilton MD., Petit A., and Tempe J. (1980).** Agropine in "nulltype" crown Gall tumors : evidence for generality of the opine concept. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 2693–2697.

**Hannou N., Llop P., Faure D., López M., Moumni M. (2013).** Characterization of *Erwinia amylovora* strains from Middle Atlas Mountains in Morocco by PCR based on tandem repeat sequences. *Eur J Plant Pathol*, 136:665–674.

- Haas J.H., Moore L.W., Ream W. et Manulis, S. (1995).** Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2879-2884
- Hildebrand EM. (1940).** Cane gall of brambles caused by *Phytomonas n. sp.* *J. Agric. Res.* 61, 685- 696.
- Hwang HH., and Gelvin SB. (2004).** Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell*, 16, 3148-
- Jarvis S.C., Scholefield D., Pain B. (1977).** Nitrogen cycling in grazing systems. In: Bacon, P.E. (Ed.), Nitrogen Fertilization in the Environment. Marcel Dekker, New York, pp. 381–419.3167.
- Kerr A., Brisbane P.G. (1983).** *Agrobacterium*. In P.C. Fahy & G.J. Persly (Eds.), *Plant Bacterial Disease, A Diagnostic Guide* (pp. 27–43). New York; Academic Press.
- Kerstens K., De Ley J. (1984).** Genus III. *Agrobacterium*. Conn. 1942. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, 1, 244-254.
- Labarre, M. (2006).** Les hémoglobines tronquées de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Thèse : biochimie. la Faculté des études supérieures de l'Université Laval : Université Laval Québec. p .30.
- Lacroix M., (2003).** La tumeur du collet et de la tige causée par *Agrobacterium*. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, direction de l'innovation scientifique et technologique. *Science*,12-17.
- Lang J. (2013).** Intrication des signalisations opine, quorum- sensing et GABA chez le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* : conséquences sur la colonisation de l'hôte et la dissémination des gènes plasmidiques. Thèse : Biologie. Ecole doctorale : sciences du vegeta : Universite paris-sud 11 p.59.
- Larzule D. (1993).** La PCR, un procédé de répliation in vitro. *Edition Médicinales Internationales*, 26 : 27, 387p.
- Lepoivre P. (2003).** Détection et identification des agents phytopathogènes. *European Scientific Journal, ESJ*, 12(24), 234.

**Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C., Lopez M. (1999).** A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37 23–31.

**López M.M., Bertolini E., Olmos A., Caruso P., Gorris M.T., Llop P, Penyalver R. et Cambra M. (2003).** Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *International Microbiology*, 6: 233-243.

**MADRPM, (2002).** Données générales sur l’agriculture marocaine. Direction de la statistique ([www.agriculture.ovh.org/arbo.htm](http://www.agriculture.ovh.org/arbo.htm)); Le: 15/02/2019.

**Marty L., Vigouroux A., Aumont-Nicaise M., Dessaux Y., Faure D., Moréra S. (2016).** Structural basis for high specificity of amadori compound and mannopine opine binding in bacterial pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), 22638-22649.

**Megateli, M. (2012).** Pouvoir pathogène et performances de transformation de trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* in vitro et in planta sur quelques espèces d'eucalyptus. Thèse :Biologie.la Faculté des études supérieures de l'Université Laval : Université Laval Québec.86, p.22.

**Moore L.W., Bouzar H. et Burr T.(2001).** *Agrobacterium*: in: Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (ed.). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition. Press, St Paul, USA

**Moore L. W., Kado C. I. et Bouzar H .(1988).** *Agrobacterium* . in N. W. Schaad (ed.), Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. *American Phytopathol, Soc.*, pp. 16-36.

**Mougel C., Cournoyer B., Nesme, X. (2001).** Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Appl. Environ. Microbiol*, 67(1), 65-74.

**Murugesan S., Manoharan C., Vijayakumar R., Panneerselvam A. (2010).** Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the root nodules of some leguminous plants. *Intl J Microbiol Res*, 1, pp.92-96.

**Nabi N., Chaouachi M., Zellama M. S., Hafsa A. B., Mrabet B., Saïd K., Fathia H. S. (2016).** A new QRT-PCR assay designed for the differentiation between elements provided

from *Agrobacterium* sp. in GMOs plant events and natural *Agrobacterium* sp. bacteria. *Food chemistry*, 196, 58-65.

**Nesme X. (1995).** Mise au point d'une méthode de diagnostic. *L'Arboriculture Fruitière* 483, 17– 20.

**Nesme X., Leclerc, M.C. et Bardin, R. (1989).** PCR detection of an original endosymbiont. *proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22).

**Odile G. (2006).** Studies on the crown gall disease of flower crops. pathogenicity and inculum potential of causal bacterium. *ann.phytopathol.Soc*, 50 ,205-217.

**Ogawa Y., Mii M. (2005).** Evaluation of 12 beta-lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. *Plant Cell Rep*, 23, 736- 743.

**Oh, P. M. (2014).** Comparison of two selective media for the isolation of *Agrobacterium tumefaciens* from the soil. Thèse : Biological Science. Faculty of science : University tunku abdul rahman.

**Ophel K., Kerr A. (1990).** *Agrobacterium vitis* sp. no. For strain of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 40, 236-241.

**Ouartsi A. (2004).** Contribution à l'étude des fonctions déterminées par l'ORF8 du T-DNA du plasmide Ri2659 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Thèse pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT en Biologie Moléculaire, Université badji mokhtar-annaba

**Paradies F. (1999).** Caractérisation biologique et moléculaire de trois isolats du virus de la mosaïque du concombre (CMV) provenant de la vigne et d'orangers. *Science*, 80(22).

**Pastrik K.H., Rainey F.A. (1999).** Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology*, 147: 687-693.

**Petit A., and Tempe J. (1984).** The function of T-DNA in nature. In L. van Floten-Doting, G. P. S. Groot, and T. C. Hall (ed.), *Molecular form and function of the plant genome*. Plenum Press, New York, N.Y. p. 625–636

- Pionnat S., Keller H., Hericher D., Bettachini A., Dessaux Y., Nesme X., Poncet C. (1999).** Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiate a spread of Crown gall disease in mediterranean countries. *Appl Environ. Microbiol*, 65, 4197–4206.
- Popoff M.Y., Kersters K., Kiredjian M., Miras I., and Coynault C. (1984).** Taxonomic position of *Agrobacterium* strains of hospital origin. *Ann. Microbiol*, 135a, 427-442.
- Portier P. (2004).** Sélection d'écotypes bactériens pathogènes et non-pathogènes par la plante en relation avec la différenciation en espèces génomiques chez *Agrobacterium spp.* Diplôme de Doctorat, université Claude Bernard – Lyon 1. *Rev. Plant Sci.* 16:279-295
- Pulawska J. (2010).** Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium spp.* *Journal of Plant Pathology*, S87-S98.
- Pulawska J., Sobiczewski P. (2005).** Development of a semi- nested PCR-based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 710-721.
- Puopolo G., Raio A., Zoina A. (2007).** Early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in symptomless artificially inoculated chrysanthemum and peach plants using PCR. *Journal of Plant Pathology*, 89: 185-190.
- Riker A.J., Banfield W., Wright W., Keitt G., and Sagen K. (1930).** *J. Agric. Res.* 41, 887.
- Riker A. J., (1924).** Relation of temperature and moisture in the development of crown-gall. *Phytopathology*, 14, 30.
- Roszak D.B., Colwell R.R. (1987).** Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Research*, 51: 365-379
- Sawada H. (2004).** *Rhizobium* in Plant pathogenic bacteria: a reference guide. CABI, Wallingford, UK. *General Plant Pathology*, 70(6), 342-347.
- Sawada H., Tsuchiya K. (2003).** Taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *Jpn J Phytopathol.* 10(2).
- Sawada H., Ieki H., Masuda I. (1995).** PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:828-831.

**Shaad N.W., Jones J.B., Chun,W . (2001).** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *Third edition*, 218-229.

**Shams M., Vial L., Chapulliot D., Nesme X., Lavire, C. (2013).** Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium spp.* using recA-based PCR. *Syst. Appl. Microbiol*, 36, 351–358.

**Smith EF.,Townsend CO. (1907).** A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25, 671-673.

**Savoie F. (2011).** Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* Producteurs de Shiga-toxines (STEC) dans les aliments.Thèse :biotechnology.faculty of science, Université de Bourgogne.

**Stonier T., Beardsley R. E., Parson C. L. et Mc. Sharry J. (1966).** *Agrobacterium tumefaciens* conn.III. Effect of thermal shock on bacteria in relation to tumor inducing ability. *J. Bact*, 91, 266-269

**Szegedi E., Bottka S . (2002).** Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semi selective medium. *Science*, 41 (1), 37-42.

**Taylor R. K., Guilford P. J., Clark R. G., Hale C. N., Forster R. L. S. (2001).** Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural. Science*, Vol. 29: 35-43.

**Tinland B., and Hohn B. (1995).** Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. *Genet. Eng*, 17, 209-229.

**Turner P. C., Mclennan A. G., Bates A. D., Whites M. R. H.(2000).** Amplification en chaîne par polymérase. *L'Essentiel en Biologie Moléculaire*P. 155,174, *ISBN : 2-911808-10-X*.

**Tzfira T., Li J., Lacroix B., and Citovsky V. (2004).** *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet*, 20, 375-383.

**Ullrich CI., and Aloni R. (2000).** Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *J Exp Bot*, 51, 1951-1960.

**Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort RA., and Schell J. (1974).** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, 252, 169-170.

**Veluthambi K., Krishnan M., Gould JH., Smith RH., Gelvin SB. (1989).** Opines stimulate induction of the vir genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J Bacteriol*, 171, 3696–3703

**Veselov D., Langhans M., Hartung W., Aloni R., Feussner I., Götz C., Veselova S., Schlomski S., Dickler C., Bächmann K., and Ullrich CI.(2003).** Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58- induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta*, 216, 512-522.

**Wächter R., Langhans M., Aloni R., Götz S., Weilmünster A., Koops A., Temguia L., Mistrik I., Pavlovkin J., Rascher U., Schwalm K., Koch KE., Ullrich CI. (2003).** Vascularization, highvolume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 133, 1024-1037.

**Wagner VT., and Matthysse AG. (1992).** Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. *J Bacteriol*, 174, 5999-6003.

**Wood DW., Setubal JC., Kaul R., Monks DE., Kitajima JP., Okura VK., Zhou Y., Chen L., Wood GE., Almeida NF Jr., Woo L., Chen Y., Paulsen IT., Eisen JA., Karp PD., Bovee D Sr., Chapman P., Clendenning J., Deatherage G., Gillet W., Grant C., Kutuyavin T., Levy R., Li MJ., McClelland E., Palmieri A, Raymond C., Rouse G., Saenphimmachak C., Wu Z., Romero P., Gordon D., Zhang S., Yoo H., Tao Y., Biddle P., Jung M., Krespan W., Perry M., GordonKamm B., Liao L., Kim S., Hendrick C., Zhao ZY., Dolan M., Chumley F., Tingey SV., Tomb JF., Gordon MP., Olson MV., and Nester EW. (2001).** The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, b ,294, 2317-2323.

# ANNEXES

- **Milieux de culture**

<b>Milieu 1A-Te</b>		<b>Milieu MG- Tellurite</b>	
Composition	Quantité	Composition	Quantité
L-arabitol	3.04 g	D-Mannitol	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.54 g	L- acide glutamique	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.04 g		
NH <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	0.16 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0.25 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.2 g
Taurocholate de sodium	0.29 g	NaCl	0.2 g
Crystal violet	2 mL	Agar	15 g
Sélénite de sodium	10 mL	H <sub>2</sub> O distillée	1000 ml
Agar	15 g		
Potassium tellurite	0.08 g	Potassium tellurite	0.2 g
Cycloheximide (2%)	1ml	Cycloheximide (2%)	1ml
H <sub>2</sub> O distillée	1000ml		

<b>Milieu LPGA</b>		<b>Milieu YMA</b>	
Composition	Quantité	Composition	Quantité
Extrait de levure	5g	D-Mannitol	5 g
Bacto-peptone	5g	Extrait de levure	2 g
Glucose	10g	NaCl	0.5 g
Agar	15g	CaCl <sub>2</sub>	0.2 g
H <sub>2</sub> O distillée	1000ml	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.2 g
		Agar	15 g
		H <sub>2</sub> O distillée	1000 ml

<b>Milieu LB – NaCl</b>	
Composition	Quantité
Bacto-tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Agar	15g
H <sub>2</sub> O distillée	1000ml

- **Bouillon à base d'urée :**

Une quantité de :

Extrait de levure	0,1g
Rouge de phénol	0,01g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,1g

Ont été bien mélangés et surmontés jusqu' au 950ml avec ED.

Une solution d'urée a été préparée avec 20g d'urée poudre dans 50ml ED,

et complété dans le mélange précédent ;

- **Gélose à l'esculine :**

Peptone	10g
Citrate de fer ammoniacal	20g
Esculine	1g

- **Tampons :**

<b>TBE × 10</b>		<b>0.01 M PBS (Phosphate buffered saline)</b>	
Composition	Quantité	Composition	Quantité
Tris base	108 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.7 g
Acide borique	55 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.4 g
EDTA	7.5 g	NaCl	8.0 g
H <sub>2</sub> O distillée	1000 ml	H <sub>2</sub> O distillée	1000 ml

- **Marqueurs de taille d'ADN :**

