

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI - Laghouat -
Faculté des Sciences
Département des Sciences Agronomiques

جامعة عمار ثلثي
كلية العلوم
الفلاحية



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Agronomie
Option : Protection Des Végétaux et d'Environnement

Thème

**Identification de quelques isolats
bactériens responsable de la tumeur du
poirier**

Présentée par : Elbar Chahra

Le : 22/09/2014

Encadrée par : Mlle Zaza Massouda. ; Maître-assistant B

Elbar Chahra

Identification quelque isolats bactériens issues de tumeur de poirier

Le Crown Gall (tumeur du collet), cause par *Agrobacterium tumefaciens* continue d'être une maladie économiquement important à travers le monde .elle est favorisée par les différents facteurs climatiques.

L'étude des cultures de poirier d'une exploitation à Hamda ont permis de constater la présence du symptôme typique de la tumeur du collet, qui se manifeste sur les rameaux de poirier par des galles.

L'étude subséquente au laboratoire a permis, quant à elle, l'isolement de l'agent pathogène à partir des tumeurs végétatives. Son identification par des tests morphologiques, biochimiques préliminaires a révélé aucun des isolats testés n'a été affiliée au genre *Agrobacterium*.

D'après le test de pathogénicité effectué par inoculation artificielle sur les plantules de tomate saines et sur les limbes de kalanchoe (*Kalanchoe daigremantiana*) ne donne pas des symptômes similaires à ceux, observés au niveau de notre exploitation Hamda .

Mots clés : *Agrobacterium tumefaciens*, poirier, Crown Gall, test biochimique, identification

البار شهراء

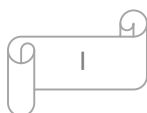
تشخيص أي العينات المسببة لمرض الورم على شجرة الأجااص

يعد مرض الند (crown gall) للأجااص والذي تتسبب في وجوده البكتيريا المسماة ب (*Agrobacterium tumefaciens*) من بين البكتيرية المهمة اقتصاديا حول العالم .حيث تعتبر العوامل المناخية من بين العوامل المحفزة له . بينت الدراسة لا المميزة على غصن أشجار الأجااص بأورام نباتية .

الدراسة المخبرية عزل العامل الممرض حيث سمح التشخيص عن طريق اختبارات الكيمياء الحيوية انه لا ينتمي (*Agrobacterium*).

مرضية الذي اجري على شتلات سليمة لنبات الطماطم (kalanchoe) أن هذان الأخيران لم يبديا اي حساسية اتجاه العامل الممرض .حيث لم يترجم بظهور نموذجية .

الكلمات المفتاحية: , , , اختبارات الكيمياء الحيوية, التميز, *Agrobacterium tumefacie*



Elbar Chahra

Identifying any bacterial from tumor pear

Summary

Crown Gall (gall), caused by *Agrobacterium tumefaciens* continues to be an important economic worldwide disease. she favors by different climatic factors.

Research pear crop in field Hamda revealed the presence of typical symptoms of crown gall, which manifests itself on the branches of pear by vegetative tumors.

Subsequent laboratory study had permitted the isolation of the pathogen from vegetative tumor agent. Identification by morphological tests, preliminary biochemical does not belong revealed it to the genus *Agrobacterium*.

Pathogenicity testing done by artificial inoculation of healthy tomato seedlings and the limbo of kalanchoe (*Kalanchoe daigremantiana*) resulted not appear similar to those, observed in the field Hamda symptoms.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, pear, Crown Gall, biochemical test, identification



Dédicace

*Je dédie ce mémoire qui n'aurait pu aboutir et voir la lumière sans
l'aide de dieu le tout puissant à :*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et
source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me
voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.*

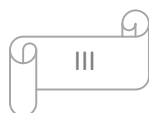
*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, flamme de mon
cœur, ma vie et mon bonheur" ; maman que j'adore.*

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous
mes frères, mes nièces et mes neveux, je dédie ce travail dont le grand
plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et
encouragements.*

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient
toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin
d'étude supérieures, mes aimables amis, collègues d'études de la
section 2^{ème} master de protection des végétaux et l'environnement et
la section 5^{ème} année d'Agronomie et biologie, et frères de cœurs.*

A tous mes enseignants de département d'agronomie et biologie.

Phahra



Remerciements

Avant tout, j'adresse mes remerciements à ALLAH le tout-puissant pour la volonté, la sante et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces longues années d'études et pour la réalisation de ce travail que j'espère être utile.

Il est agréable au moment de présenter ce travail d'adresser mes remerciements à ma promotrice Mlle Zaza Massouda pour avoir proposé et dirigé ce travail et pour ses conseils et ses orientations.

Je tiens aussi remercier celui qui a accordé un coup de main à moi au sujet de la période de ce travail M. Omrane Toumatia.

Aux membres jury pour avoir acceptés de consacrer du temps évaluer notre travail.

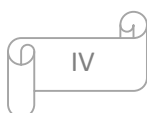
À tous le personnel du laboratoire de département de biologie surtout Mr.Hadji Aissa, Mr. Chouearana, Mr.farouek et M^{me} Leila, M^{lle} Safia, Khadija, Fatima, Siham, Aicha, Rakaia.

À mes enseignants de tous les cycles pour leur encouragement.

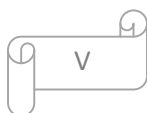
Un grand remerciement à tous les personnes qui ont participé pour atteindre notre travaille surtout ma très chère sœurs « Kheira » et mon frère « Toufik ».

Enfin ,je remercie tous les enseignants du département des sciences agronomique et biologique ,Sans oublier d'exprimer nos sincères remerciements à notre chef de département M.MOULAI ADEL ainsi que son adjoint M.BECHEUR MOURAD pour les efforts qu'ils ont consenti pour nous permettre de travailler dans de meilleures conditions.et a tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci



Résumé.....	
v	
Dédicace.....	v
Remerciements.....	v
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	v
Introduction.....	1
 Revue bibliographiques	
I. Généralités sur la plante hôte	3
I.1.Historique et origine du poirier.....	3
I.2. Classification du poirier.....	3
I.3. Caractères botaniques	4
I.4. Caractères végétatives	4
I.4.1. Floraison	4
I.4.2. Mode de fructification	4
I.4.3. Différentes productions du Poirier	5
I.4.3.1. Bourgeon	5
I.4.3.3.Rameaux	5
I.4.3.4. Brindille	5
I.4.3.5. Gourmand	6
I.4.3.6. Bouton à fleur et lambourde	6
I.5. Exigences edapho-climatiques de la culture.....	6
I.6. Production mondial	7
I.7. Production en Algérie	8
I.8. Les variétés les plus utilisées en Algérie.....	9
I.9. Pathologie et ravageurs du poirier.....	10
I.9.1. Les ravageurs du poirier	10
I.9.2.Pathologies parasitaires.....	11
I.9.2.1. Pathologies fongiques.....	11
I.9.2.2. Pathologies virales.....	11
I.9.2.3. Pathologies bactériennes.....	11



II. Crown Gall	13
II.1. présentation de la maladie.....	13
II. 2. Caractéristique morphologique	13
II.3. statut taxonomique.....	14
II.3.1. Classification selon le caractère pathogène.....	14
II.3.2. Classification déterminée par le plasmide.....	15
II.3.3. Classification selon le caractère phénotypique et génotypique.....	15
II.4. Caractéristique du plasmide Ti.....	16
II.5. Processus d'infection	18
II.5.1. Reconnaissance bactérie/hôte.....	18
II.5.2. Activation du processus d'infection.....	19
II.5.2.1. Transfert ADN-T.....	20
II.5.2. 2. Production du brin T.....	20
II.5.2.3. Transfert du complexe T à la cellule végétale	21
II.5.3. Expression des gènes et fonctionnement au sein de la cellule végétal infectée	21
II.6. Symptomatologie.....	23
II.7. Facteurs favorisant le développement de la maladie.....	23
II.8. Moyen de lutte.....	24
II.8.1. Mesures prophylactiques et culturaux.....	24
II.8.2. Lutte physique.....	24
II.8.3. La lutte chimique.....	25
II.8.4. La lutte génétique	25
II.8.5. La lutte biologique.....	25
II.8.6. Autre antagoniste	26
 Matériels et méthodes	
I. Matériel et méthodes.....	28
I.1. présentation de la région.....	28
II. Prélèvement des échantillons.....	30
II.1. Méthodes d'isolement.....	30
II.2. Dénombrement des colonies.....	31
II.3. Sélection des colonies.....	32
II.4. Purification des isolats	32
II.5. Conservation des isolats.....	33
II.6. Identification et caractérisation des isolats	33

II.6.1. Coloration de Gram.....	34
II.6.2. Test de KOH	35
II.6.3. Test de Hugh Leifson (HL).....	35
II.6.4. Test de King B.....	36
II.6. 5. Test d'YDC.....	36
II.6.6 .Test DIM.....	37
II.6.7. Test d'oxydase	37
II.6.8. Recherche de catalase.....	37
II.6.9. Test PDA+caco ₃	38
II.6. 10. Test de mannitol-mobilité nitrate.....	38
II.6.11. Test du pouvoir pathogène.....	39
I. Résultat et discussion	
I.1. Isolement et identification des bactéries.....	42
I. 2.1.coloration de Gram.....	43
I.2.2.Test de KOH.....	44
I.2.3.Test de High et Leifson.....	45
I.2.4. Production de pigments de fluorescents.....	45
I. 2.5. Test YDC.....	46
I. 2.6. Test DIM.....	47
I. 2.7. Production d'oxydase.....	47
I. 2.8. Test de catalase	48
I. 2.9. Test PDA+caco ₃	50
I.2.11. Test de mannitol-mobilité nitrate.....	50
I. 2.10. Test du pouvoir pathogène	51
Conclusion.....	56
Références bibliographiques.....	57
Annexe.....	68

Introduction

Figure n°1: la production et les superficies depuis 1980.....	7
Figure n°2: aspect microscopique d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
Figure n°3: carte simplifiée du plasmide Ti.....	17
Figure n°4 :régulation des gènes de virulence d' <i>A.tumefaciens</i> par des signaux de la plante hôte.....	20
Figure n°5: Représentation schématique d'une infection par <i>Agrobacterium</i>	22
Figure n°6: Jeunes tumeurs sur porte-greffe de pommier et galle sur <i>Euonymus</i>	23
Figure n°7:Carte de Laghouat indiquant la station d'étude hamda	29
Figure n°8:Tumeur végétale sur rameau de poirie.....	30
Figure n°9: protocole de l'isolement.....	31
Figure n°10: boîte de pétri de (KB) d'isolement des isolats bactérienne	32
Figure n°11: isolat bactérien après purification.....	33
Figure n°12: schéma de détermination des différents genres bactéries proposé par Schaad et al. (2001).....	34
Figure n°13: ensemencement central d'isolat bactérien sur milieu High et Leifson.....	36
Figure n°14: ensemencement central d'isolat bactérien sur milieu mannitol-mobilité.....	39
protocole de test pathogénicité sur plantule de tomate (<i>Lycoperscum esculentum</i> cv.marmand.....	39
Figure n°15: protocole de test pathogénicité sur plantule de tomate (<i>Lycoperscum esculentum</i> cv.marmande).....	40
Figure n°16: test de pathogénicité sur <i>kalanchoe</i> (<i>Kalanchoe daigremantiana</i>).....	40
Figure n°17:Taux des <i>Agrobacterium like bacteria</i> par rapport à la flore totale dans des tumeurs végétatives étudiées	43
Figure n°18: Résultat de coloration de Gram (x100).....	44
Figure n°19: résultat de test KOH.....	44
Figure n°20: résultat de test hugh et leifson.....	45
Figure n°21: résultat de test King B	46
Figure n°22: résultats de test YDC.....	46
Figure n°23: résultat de test DIM	47
Figure n°24: résultat de test d'oxydase	47
Figure n°25: résultat de test catalase	48
Figure n°26: résultat de test PDA+caco ₃	50
Figure n°27: résultat de test mannitol-mobilité	51

ADN-T: acide désoxyribonucléique responsable de l'induction des tumeurs.

ARNr: acide ribonucléique ribosomique.

°C : degré Celsius.

CFU: unité formant une colonie bactérienne.

Cm : centimètre.

CO₂: dioxyde de carbone.

DSA: Direction des services agricoles.

EDS: eau distillée stérile.

G: gramme.

H: heure.

Ha: hectar.

H₂O₂: Eau oxygénée.

Kb: King "B".

Kg: kilo gramme.

KOH: Hydroxyde de Potassium.

Km : kilomètre.

LPGA: extrait de Levure, Peptone. Glucose. Agar.

Min: minute.

ml: millilitre.

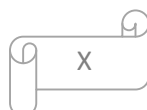
MADR: Ministère d'agriculture et du développement rural.

O₂: oxygène.

Qx: quintaux.

S: seconde.

T : tonne.



	Page
Tableau n°1: les premières 10 pays productives de poirier.....	8
Tableau n°2: Présentation la production Santa Maria entre 2005-2010 dans Laghouat.....	9
Tableau n°3: liste des variétés de poirier.	10
Tableau n°4: Comparaison de l'ancienne et de nouvelle nomenclature des espèces d' <i>Agrobacterium</i>	16
Tableau n°5: la surface des arbres fruitiers dans la région Hamda	28
Tableau n°6: les résultats globale des testes appliqués sur les isolats étudiés	49

Tout comme l'homme et l'animal, les plantes, dans leur environnement, sont au contact de microorganismes capables de les infecter et de leur entraîner des maladies redoutables. Malheureusement, lorsqu'une plante est atteinte d'une maladie, sa croissance, sa fertilité et sa productivité sont fortement affectées, ce qui peut être à l'origine de sérieux problèmes économiques et sociaux.

Selon Tempé, (1987) Connue depuis l'antiquité, le crown Gall (la galle du collet) est une grave bactériose. Elle représente un grave problème économique c'est pourquoi les chercheurs ont rapidement entrepris de rechercher la cause de cette maladie. Dès 1907, Smith et Townsend ont isolé une nouvelle bactérie à partir des galles, *Agrobacterium tumefaciens*, et démontré qu'elle était responsable de la maladie. Le crown galle présentant une gamme d'hôtes très large ,comprenant plus de 643 espèces végétales de 331 genres, dont la majorité sont des dicotylédones avec quelque gymnospermes et peu monocotylédones (Bradbury, 1986 ; De Cleene et de Ley,1976). c'est une maladie ubiquiste, néoplasmodique (Moore et Warren, 1979 ; Moore et Cooksy, 1981), causée par les souches pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* (Conn, 1942).vivant comme un organisme saprophyte (Schroth et al ., 1971), *A.tumefaciens* fait partie de la flore naturelle du sol (Bouzar et Moore ,1987). Les signaux chimiques émis par la plante blessée et la caractéristique de la bactérie d'adhérer sur les cellules végétales sont deux facteurs indispensables au processus d'infection. le pathogène pénètre à la faveur des blessures causées par les incidents climatique telque le gel et les pratique culturales en particulier l'élagage, le greffage et toutes manipulation courantes en pépinière (Auber et al ., 1983 ;Orian et Utra,1970), les insectes , les nématodes et même des facteurs naturels (formation de racines latérales créant des blessures à la jonction des racines principales, cicatrices foliaires à la suite de la chute des feuilles). Sont des facteurs de prédisposition à ces maladies (Orian et Zootra ,1970).

Cette maladie se traduit par l'apparition d'une tumeur au niveau du collet de la plante. Cette tumeur est provoquée par le transfert à la plante d'une portion d'ADN du plasmide Ti. Du fait de leur importance économique, ces bactéries ont été étudiées d'un point de vue phytopathologique et surtout elles ont beaucoup intéressé le domaine de la biotechnologie. En effet, le plasmide Ti, qui porte les gènes de virulence chez *Agrobacterium*, a permis la construction des plantes génétiquement modifiées consistant en l'insertion de gènes d'intérêt dans l'ADN du plasmide Ti pour être transféré au génome de la plante (Bevan, 1984 ; Valentine, 2003). Depuis 2001 la séquence complète de la souche modèle C58 est disponible (Wood et al., 2001 ; Goodner et al., 2001).

Ces bactéries présentent un important problème agronomique car elles infectent les plantes blessées et notamment les plantes greffées, comme les arbres fruitiers ou encore les vignes (Smith et Townsend, 1907 ; Kerr, 1969). Parmi les arbres fruitiers touchés le poirier.

Plusieurs agents pathogènes bactériens, comme *Pseudomonas*, *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens* peuvent affecter le poirier et provoquer plusieurs maladies, à savoir: bactériose, Feu bactérien, le crown gall. Elles sont favorisées par une humidité relative forte et une température élevée.

De ce fait, l'objectif de ce travail est une contribution à l'identification de l'agent causal de tumeur observée sur poirier cultivée au niveau de l'exploitation à Hamda de la wilaya de Laghouat et pris des échantillons similaires de la tumeur de la maladie crown gall. En effet le travail porte sur :

- Isolement de l'agent causal;
- Identification d'agent causal ;
- Test de détermination le pouvoir pathogène.

Etude Bibliographie

I. Généralités sur la plante hôte

I.1. Historique et origine du poirier

Originnaire d'Asie occidentale et fort appréciée des Romains, de la Chine et de l'Europe, la poire est un des fruits qui remonte le plus haut dans l'histoire des humaines. Elle est l'un des plus anciens fruits cultivés. Les poires sont arrivées en Amérique du Nord avec les premiers colons et, de nos jours, leur culture commerciale est pratiquée surtout en Ontario et en Colombie-Britannique, ainsi qu'en plus petite quantité en Nouvelle-Écosse. En 50 après Jésus Christ on comptait 35 espèces différentes, on en dénombre aujourd'hui environ 1500 (AAC, 2007 ; Raynaud, 2008).

En 2009, seuls 4 pays avaient une production dépassant les 500 milliers de tonnes. La France avec 185,8 milliers de tonnes de poires se place comme le 14ème pays producteur dans le monde, derrière la Chine, les États-Unis, l'Italie, l'Argentine, la Corée du Sud, l'Espagne, la Turquie, l'Afrique du Sud, le Japon, les Pays-Bas, la Belgique, le Portugal et l'Inde. Par rapport à 2008, à l'exception de l'Espagne (-28%), tous les principaux pays producteurs ont connu une augmentation de leur production en 2009 (MADR, 2009).

I.2. Classification du poirier

Quezel et Santa (1962) ont mentionné *pyrus communis* L. avec deux sous-espèces : *ssp. longipes* (Coss et Dur) Maire et *ssp. gharbiana* (Trabut) Maire (INRAA, 2006). Le poirier appartient à la classification suivante :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Rosales

Famille : Rosaceae

Sous-famille : Maloideae

Genre : *Pyrus*

Especce : *Pyrus communis* L.

I.3. Caractères botaniques

Le poirier appartient à la famille des Rosacées, tribu des pyrées, fleurs blanches ou rosées ; hermaphrodites, possédant 5 pétales, une vingtaine d'étamines et 2 à 5 carpelles se composant chacun d'un ovaire contenant 2 ovules ; les fleurs sont à désagréable. Feuilles caduques simples, alternes, de relation phyllotaxique 2/5. Inflorescence en grappe corymbiforme à floraison centripète, possédant 5 à 15 fleurs.

Le fruit est une drupe à mésocarpe charnu, à endocarpe cartilagineux formé de 2 à 5 loges renfermant 1 ou 2 pépins ; ce fruit est couronné par l'œil, vestige du calice, la chair de ce fruit est en partie constituée par l'extrémité du pédoncule fructifère.

I.4. Caractères végétatives

D'après Jean et Faure (1991), le *pyrus communis* est, soit un buisson épineux, soit un arbre à cime conique atteignant jusqu'à 20 m de hauteur ; aspect général pyramidal (d'où peut-être son nom). Branches insérées à angle aigu sur la tige principale. Ecorce fendillée plus ou moins rugueuse selon les variétés.

I.4.1. Floraison

Floraison aura lieu fin mars, début avril sous le climat parisien, lorsque la température avoisine +10°C. Les différentes variétés ont une floraison échelonnée entre 6 et 20 jours, alors que les variétés à floraison hâtive conservent leur fleur relativement plus longtemps.

I.4.2. Mode de fructification

Quelle que soit sa méthode de conduite, la fructification du poirier s'effectue sur du bois de 2-3-4 ans et plus, très rarement sur du bois de 1an. Cette fructification apparait :

- Naturellement sur les branches fruitières;
- Sur les branches fruitières soumises à l'arcure ou à l'inclinaison ;
- A la suite de la taille des coursonnes portées par les charpentières des formes artificielles libres et palissées.

La taille peut être à l'origine de nouveaux points d'entrée par des microorganismes phytopathogènes.

I.4.3. Les différents organes de productions du Poirier

I.4.3.1. Bourgeon

Jeune rameau résultant du développement de l'œil à bois. Tant qu'il demeure herbacé, c'est-à-dire les premiers mois de sa végétation on lui conserve cette dénomination de « bourgeon », à partir du moment où ses tissus s'aoûtent il devient « rameau ». Selon sa position sur la branche charpentière où il a pris naissance nous aurons :

Bourgeon terminal, futur « prolongement » puisqu'il est issu d'un œil terminal (par sa position naturelle d'œil terminal ou par la taille qui a placé un œil latéral dans cette position d'œil terminal) ; bourgeon axillaire provenant d'un œil axillaire ; bourgeon anticipé, fourni par le développement d'un œil à bois de l'année même de sa formation sur le rameau porteur, ce rameau anticipe d'une année sur son développement normal, ce type de bourgeon est peu fréquent sur le Poirier on ne note sa présence que sur les prolongements ou sur les coursonnes à la suite de pincements sévères.

I.4.3.2. Rameaux

Ce sont des bourgeons aoûtés, dans le cas du Poirier ils sont porteurs indistinctement des yeux à bois, dards, boutons à fruits dans les années qui suivent. Lorsque ce rameau apparaît sur une forme fruitière soumise à la taille il reçoit une formation pour sa mise à fruit et devient alors « coursonne ». Les différents types de rameaux correspondent aux différents types de bourgeons.

I.4.3.3. Brindille

On réserve plus particulièrement le nom de brindille à un petit rameau grêle relativement fréquent sur le Poirier.

La brindille fait 15 à 30 cm de longueur, son faible diamètre lui octroie une grande flexibilité. Cet organe faible est le plus souvent porteur d'yeux à bois. Parfois son extrémité est terminée par un bouton à fleur, on la dit « brindille couronnée ». Cas fréquent lors de la 2^e année de végétation de la brindille. Plus rarement parmi nos variétés fruitières elle est parfois terminée par une épine : B. d'Hardenpont, B. Lebrun, B. Bretonneau, Doyenné d'hiver.

I.4.3.4. Gourmand

C'est un rameau doué d'une végétation exubérante en raison de sa position privilégiée sur une partie de l'arbre ; peut atteindre 1 m et plus dans sa première année de végétation. Il est caractérisé par l'importance de son empatement à son point de naissance sur le rameau porteur. Bien entendu la sève qu'il accapare est au détriment des autres productions voisines. Sur nos formes fruitières c'est plus principalement dans les coudes sur le dessus des branches charpentières placées à l'horizontale que cette production prend naissance. Sur les rameaux ou coursonnes précités apparaissent les productions à fruit proprement dites ou tout au moins orientées pour une transformation progressive vers le bouton à fleur ; il s'agit du dard, de la lambourde, du bouton à fleur (ou bouton à fruit), de la bourse.

I.4.3.5. Bouton à fleur et lambourde

Un dard plus rarement un œil à bois, donnent naissance au bouton à fleur (le plus généralement et à tort on dit bouton à fruit) et organe est arrondi, selon son origine il peut être sessile sur le rameau porteur ou plus ou moins pédoncule quand il résulte de l'évolution d'un dard ridé; dans ce cas certains arboriculteurs lui réservent alors le nom de « lambourde » (Jean,B.,Y.Faure).

I.5. Exigences edapho-climatiques de la culture

Le poirier, est une espèce qui se développe dans des zones climatiques où la température hivernale reste en dessous de 7°C. Ses besoins en froid sont l'ordre de 1200 à 1500 h de température inférieure à 7°C. En phase de dormance, le poirier peut supporter sans en souffrir des températures allant jusqu'à -26°C. Il est moins rustique que le pommier, le poirier est cependant plus exigeant en froid que le pêcher. Les températures au-dessus de 27°C et au-dessous de 12°C et la faiblesse d'hygrométrie réduisent le calibre des fruits.

Le poirier c'est un arbre qui tolère des conditions larges : texture argileuse à sableuse, pH acide ou basique. Cependant, il est exigeant pour l'humidité du sol et ne tolère pas les sels secs. Il se trouve près d'un cours d'eau, il peut supporter des sécheresses estivales modérées ou intenses et brèves, mais il a une faible tolérance à l'engorgement. Cette espèce présente une croissance optimale dans des sols profonds, frais et bien approvisionnés en eau et en nutriments (MADER, 2003 ; CPF, 2013).

I.6. Production mondiale

La production mondiale de poires destinées aux marchés du frais et du transformé qui a stagné jusqu'au début des années 90, a connu par la suite une progression annuelle régulière pour atteindre 21,9 millions de tonnes en 2009. Par rapport à l'année précédente, le niveau de production de poires a augmenté de 4,3% (20,9 millions de tonnes en 2008).

Les surfaces de vergers en poire ont augmenté en 2008 pour se stabiliser à 1,74 million d'hectares en 2009. La superficie mondiale, malgré une certaine diminution entre 2006 et 2007, est restée à un niveau à peu près constant depuis 2000 (figure n°3) (FranceAgrimer, 2010).



Source : FranceAgrimer, 2010

Figure n°1 : la production et les superficies depuis 1980

D'après l'histogramme, La production mondiale a augmenté de 59 % en 10 ans, et 98 % en 20 ans. La production, là aussi à 90 % dans l'hémisphère nord, est très concentrée puisque les 10 premiers pays font 15 millions T, soit 82 % de l'ensemble mondial (FranceAgrimer, 2010) (Tableau n ° 1) :

Tableau n°1 : les premières 10 pays productives de poirier

Pays	Production
Chine	13,7 millions T
Italie	880 000 T
Etats-Unis	790 000 T
Espagne	660 000 T
Argentine	550 000 T
Allemagne	390 000 T
Corée sud	380 000 T
Japon	360 000 T
Turquie	340 000 T
Afrique du sud	320 000 T

Sources : CAC, 2011

I.7. Production en Algérie

La culture du poirier occupe une place prépondérante dans l'économie agricole algérienne. Près de 32 744 ha sont consacrés annuellement à la culture de poires, donnant une production moyenne de 1 038 millions de quintaux et des rendements moyens d'environ 62 300 Qx/ha (MADR, 2009). Les plus trois wilayas productives en Algériens sont le suivants : la wilaya de Ain Defla à production 609 500 Qx, Blida 233 294 Qx et Tipazas 138 940.

La production dans la wilaya de Laghouat en 2010 environ 16 380 Qx de rendement 30%. La variété le plus fréquente en Laghouat sera Santa Maria, et leur production est donne par le Tableau n°2 (DSA, 2010).

Tableau n°2 : Présentation la production Santa Maria entre 2005-2010 dans Laghouat.

Année	2005	2006	2007	2008	2009	2010
superficie complant	623	729	753	754	739	729
superficie de production	298	316	348	350	374	764
Production	10905	3260	11739	12250	6700	16380

Source : DSA, 2010

01.8. Les variétés les plus utilisées en Algérie

Il y a très peu d'informations concernant l'existence de variétés locales de poiriers ; en 1938, Chevais fait état de quelques variétés :

Bouziga, la poire « sultane », el krim, ras el brel, lorteb, harracha.

En 1914, la culture du poirier était considérée comme une curiosité. A partir de 1920 à 1945, plusieurs vergers de poiriers ont été créés (chiffa, isser,..) à partir de variétés importées. Parmi les variétés importées, Sapin (1978) cite :

- wilder
- dr. Jules Guyot
- Williams
- duchesse Bérard
- alexandrine Douillard
- Packham's Triumph
- épine du mas
- passe Crassane
- doyenne du comice

Les variétés autorisées actuellement à la production et la commercialisation sont présentées en (Cf. Tableau n°4). Les trois variétés les plus fréquentes en Algérie seraient Santa Maria, Williams rouge et Dr Jules Guyot.

Tableau n°3 : liste des variétés de poirier

	Type de variétés
1	beurré hardy
2	dr jules guyot
3	epine du mas
4	pakam's triumph
5	santa maria
6	starkrimson
7	wilder
8	beurre précoce morettini
9	conference
10	general leclerc
11	annabi
12	william's rouge
13	passee crassane
14	alexandrine a douillard
15	belle de juin
16	cascade (= lombacad)
17	william's maingot
18	doyenne du comice

Source : INRAA ,2006

I.9. Pathologie et ravageurs du poirier

Il y a lieu de noter que l'aspect maladies et ravageurs des cultures représente un facteur très important dans leur conduite avec une production économiquement viable et respectueuse de l'environnement et surtout pour la santé humaine. Le nombre des maladies affectant le poirier est important : plusieurs de bioagresseurs, et aussi des affections non parasitaires.

I.9.1. Les ravageurs du poirier

le poirier aussi est une culture particulièrement sujette aux attaques de ravageurs, nous pouvons citer ainsi, le carpocapse (*Cydia pomonella*) (Höhn et al 2013).

Le psylle (*cacopsylla pyri*) est le deuxième ravageur clé du poirier après le carpocapse leur dégâts très important de façon directs ou non directs, d'abord, les psylles dépriment les arbres, sont défavorisent la croissance des pousses agissant ainsi en retardant sur le

rendement de l'année suivante et aussi favorise l'infection secondaire par le champignon de fumagine (MAPM, 2009 ; Masseron et Michel., 1991).

I.9.2. Pathologies parasitaires

I.9.2.1. Pathologies fongiques

la tavelure causée par le champignon *venturia pirina* est une maladie occasionnellement grave chez certaines variétés de poires.(Fibl,2011 ;SRPV,2005,Bovey,1972 ;Cigleux et Garcin,2005). La tavelure du poirier se manifeste surtout par des taches sur fruit rendant la commercialisation difficile. Elle est très proche de la tavelure du pommier. Le poirier est globalement moins sensible que le pommier. Cependant, en cas de présence sur bois la protection devient problématique (Corroyer et Libourel, 2000).

La rouille grillagée du poirier est provoquée par un champignon pathogène (*gymnosporangium sabinae*) nécessitant la présence de deux hôtes afin d'effectuer son cycle L'hôte principal est le genévrier, *Juniperus* spp. , et l'hôte secondaire est le poirier (Grillagélateur et Lannoy ; Bovey,1972 ;Vanderweyen,2002 ;Adalia,2005).

I.9.2.2. Pathologies virales

Le poirier peut être attaquée par des virus, dont la dissémination est facilités par les méthodes de propagation végétative utilisées ou par des ravageurs (Bovey, 1972) telque : gravelle causée par stony pit ,*vein yellow of pear* de jaunissement des nervure, *ring pattern mosaic of pear* responsable de mosaïque annulaire (Claude, 1999 ; Bovey, 1972 ; Devsignes,1999).

I.9.2.3. Pathologies bactériennes

Le poirier a, souvent, fait l'objet d'attaque de plusieurs bactéries qui développent des symptômes multiples, parmi les plus graves

Feu bactérien (*fire blight*) causé par *Erwinia amylovora* est la plus dangereuse maladie bactérienne des arbres fruitière à pépins, en plus poirier, qui en est l'hôte principale. (IRDA, 2013 ; Bovey, 1972 ; Phillion, 2013). En cas d'attaque, les pédoncules deviennent sombres, les feuilles brunissent depuis les pétioles et montrent un triangle typique. Les jeunes fruits sont brun foncé et ratatinés. Les jeunes pousses se recourbent en forme de crosse. Les organes malades peuvent présenter des exsudats de bactéries.

L'autre, bactériose provoqué par *Pseudomonas syringae*, Les fruits infectés sont marqués de petites taches circulaires noires et ne se développent pas. Ces symptômes peuvent être confondus avec ceux du feu bactérien (Höhn et *al*, 2013) et aussi le poirier peut être attaqué par l'*Agrobacterium tumefaciens*, l'agent causal de la tumeur de collet.

Et dans notre travail, nous avons étudié une maladie semblable au crown gall sur la plante de poirier afin de déterminer l'agent causal de ce symptôme.

II. Crown Gall

II.1. présentation de la maladie

Le Crown Gall est une maladie bactérienne connue depuis l'antiquité, très répandue dans le monde entier (Willian et Milton, 1976 ; Catharine et *al.*, 2007). Elle est capable d'attaquer plusieurs espèces végétales ligneuses et herbacées , comprenant plus de 643 espèces végétales réparties sur 331 genres, et 93 familles botaniques, essentiellement des dicotylédones (De Clenne et De Ley , 1976 ; Caces, 1999 ; Soriful et *al.* ,2010 ; Malek et *al.*, 2012 ; Mehdi et *al.* , 2013) parmi les espèces touchées ,les arbres fruitiers : abricotiers, amandiers, pêches, pruniers, pommiers, poiriers (Burr et Katz, 1983 ; Schoroth et *al.* , 1988; Michel, 2008; Louise et *al.* , 2011) et la vigne (Ophel et Kerr, 1990), plantes ornementales : le chrysanthème, le *figus benjamina*, le rosier)(Moore et Cooksey ,1981 ; Bouzar et *al.* , 1995 ; Hass et *al.* , 1995 ; Poncet et *al.*, 1996 ; Bouzar et Jones, 2001 ; Zoina et *al.*, 2001), les arbres forestiers : érable , peuplier, l' eucalyptus, cendre (Nesmes et *al.* , 1987 ; Morris et *al.* ,1989 ; Siemaszko, 1929 ; Imazeki, 1960) sont également touchés.

Cette maladie se manifeste par l'apparition d'excroissances sous forme de tumeurs au niveau d'une blessure de la plante ou à la jonction du greffon et du porte-greffe lors de greffes d'arbres fruitiers et de vignes (Umber, 2004).

II. 2. Agent casuel (*Agrobacterium tumefaciens*)

L'*Agrobacterium tumefaciens* est un organisme saprophyte qui fait partie de la flore naturelle du sol. C'est un agent phytopathogène responsable de tumeur du collet. Les *Agrobacterium tumefaciens* possèdent les mêmes caractéristiques de toutes les espèces de genre *agrobactères* se sont des bacilles de coloration Gram négative dont la taille varie entre 0,6 à 1 µm sur 1.5 à 3 µm. Ces bactéries sont pour la plupart des aérobies strictes. Elles sont chimioorganotrophes (Ogawa et Mii, 2005) (figure n°2), non sporulantes très mobiles grâce à des flagelles péritriches (de 1 à 6) (Jordan, 1984). Elles utilisent comme source de carbone une grande variété de composés organiques. Leur température optimale de croissance est située entre 24 et 28 °C. Dans ces conditions et dans un milieu de culture favorable, leur temps de génération avoisine 120 minutes. Elle résiste aussi aux sels de tellure, et à de nombreux antibiotiques de type bêta-lactame (Moore et *al.*, 2001).elles résistent bien aux carences et peuvent croître et survivre pendant plusieurs semaines. Sur

un milieu contenant des sucres elles produisent beaucoup d'exopolysaccharides, les colonies ont un aspect très muqueux. Elles produisent de la catalase et généralement aussi de l'uréase et de l'oxidase (Moore et *al.*, 1988).

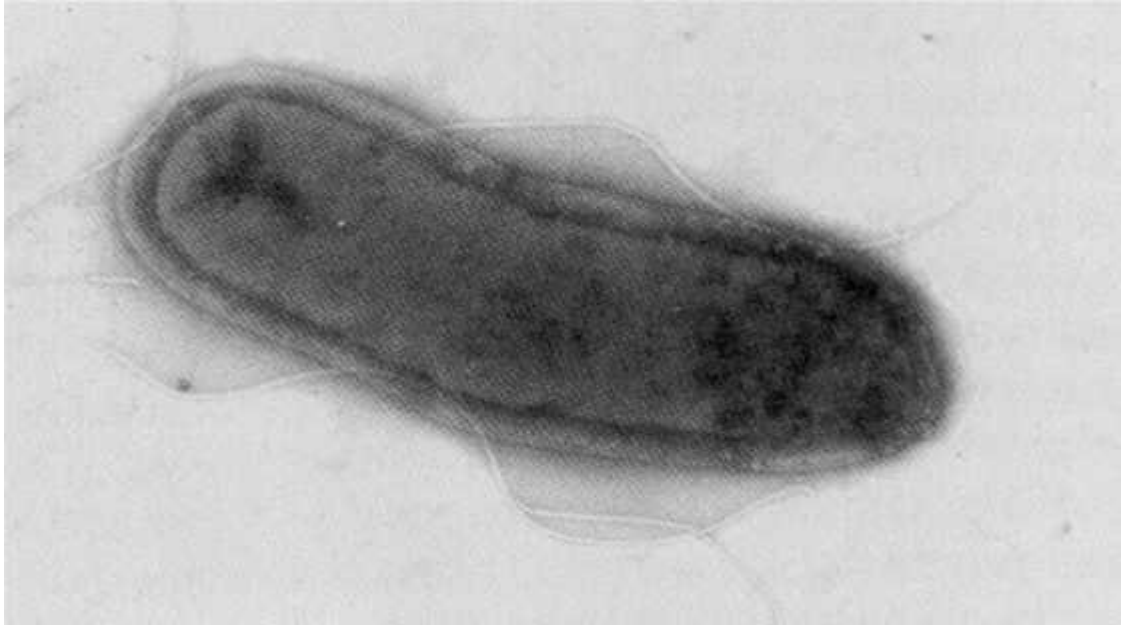


Figure n°2: Aspect microscopique d'*Agrobacterium tumefaciens* (d'après Posted, 2001).

II.3. statut taxonomique

Le genre *Agrobacterium* appartient à la famille des *Rhizobiaceae*, membre de la section des *-Proteobacteria* (Woese et *al.*, 1984 ; Willems et Collins, 1993 ; Lepoiver, 2003). Trois classification du genre ont été proposée par suivant :

II.3.1. Classification selon le caractère pathogène

La première classification du genre *Agrobacterium* a été basé sur le pouvoir pathogène et selon ces critère d'*Agrobacterium* se répartie en 5 espèces :

1. *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsed, 1907), souche induisant le « Crown Gall » sur une gamme d'hôte très variée (De cleene, 1985) ;
2. *Agrobacterium rhizogènes* (Riker et *al.*,1930),souche responsable de la maladie de chevelu racinaire « hairy root » qui est caractérisée par une prolifération incontrôlée et abondant des racines au site d'infection (Braun,1952 ; 1989 ;Tempè et Casse-Delbrate,1989 ; Tepfer,1989 ; Riker et *al.*,1930) ;

3 *Agrobacterium rubi* (Hilderbrand, 1940), souches provoquant le « cane Gall » : tumeurs se développant sur les tiges des plantes du genre *rubus* (Kerstens et De ley ,1984) ;

4. *Agrobacterium vitis* (Ophel et Kerr, 1990), espèce inféodée à la vigne ;

5. *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck et Van Delden, 1902), souches non pathogènes;

Plus récemment, *Agrobacterium larrymorrei* (Bouzar et Jones, 2001), nouvelle souches isolée des tumeurs se développant sur les tiges de *figus benjamine* L.

II.3.2. Classification déterminée par le plasmide

En fait, les caractéristiques pathogènes reposent sur la présence ou l'absence des plasmides Ti ou Ri chez les agrobactéries , Zaenen et Coll. (1974) ont trouvé des plasmide d'un grande poid moléculaire dans 11 souches pathogène. L'hypothèse avancée était que ce plasmide transporte l'information génétique « tumor inducing principal » proposée par braun (1947). (),ce plasmide inducteur du mécanisme de pathogénèse est désigne par le « plasmide Ti » ou pTi pour (tumor inducing) chez *A.tumefaciens* et « plasmide Ri » ou pRi pour « root inducing » chez *A.rhizogènese* (Moore et *al.*, 1979 ;White et Nester ,1980 ;Ream,1989). Ces plasmides sont conjugatifs et peuvent être acquis ou perdus. La perte ou l'acquisition d'un plasmide engendre la reclassification de la souche dans une autre espèce. C'est pourquoi, il était nécessaire de proposer une autre taxonomie plus stable. (Kerstens et de Ley ,1984 ; Bundock et Hooykaas, 1988).

II.3.3. Classification selon le caractère phénotypique et génotypique

Contrairement à la dernière, la nouvelle structure taxonomique se base sur des caractères phénotypique et génotypique stable (Kerster et De Ley ,1984). Selon cette classification la plupart des membres du genre *Agrobacterium* sont groupes dans au moins 4 groupes (biovars) taxonomiques ne correspondant à la pathogèncité. (Cf. Tableau n° 4).

Tableau n°4 : Comparaison de l'ancienne et de nouvelle nomenclature des espèces d'*Agrobacterium*.

Nouvelle taxonomie	Ancienne taxonomie
<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 1 <i>A. radiobacter</i> biovar 1 <i>A. rhizogène</i> biovar 1
<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 2 <i>A. radiobacter</i> biovar 2 <i>A. rhizogène</i> biovar 2
<i>A. vitis</i>	<i>A. tumefaciens</i> biovar 3 <i>A. radiobacter</i> biovar 3
<i>A. rubi</i>	<i>A. rubi</i>

Source:(Lepoivre, 2003).

II. 4. Caractéristique du plasmide Ti

Le caractère pathogène d'*Agrobacterium* est porté par le plasmide Ti (Van larebeke et *al.*, 1974). Ce matériel extra-chromosomique représente 5% du génome bactérien (215 milliers de paire de base), ces plasmides se disséminent dans la population bactérienne par, transfert conjugatif, ce dernier porte cinq région (Genetello *et al.*, 1977 ; Zhu et *al.*, 2000) (Figure n°3).

- La région ADN-T: la région transférable de l'ADN plasmidique (transferred DNA : ADN-T) ;
- la région de virulence (*vir*) ;
- la région responsable de la réplication du plasmide (ORI) ;
- les loci *tra* et *trb* dirigeant le transfert conjugatif du plasmide Ti ;
- la région responsable du catabolisme des opines (OPC).

1. La région T (ADN-T) :

Le T-DNA est une région de taille comprise entre 13 et 30 Kb (Varain, 2013), porté par les plasmides Ti ou Ri d'*Agrobacterium*. Cette région s'insère aléatoirement dans le génome actif la plante hôte (Chilton et *al.*, 1977 ;Gelvin,1992).

Les T-DNA comprend un certain nombre de gènes, parmi ces dernières des gènes de synthèse d'hormones végétales comme l'auxine et la cytokinine ou les oncogènes qui vont permettre la prolifération cellulaire et aider à la formation des tumeurs ou des racines adventives, et les gènes de synthèse des opines. Ces composés sont des sources de carbone et d'azote pour les bactéries et ne sont catabolisés que par ces dernières. Les gènes du T-DNA permettent donc à la bactérie de créer une niche écologique propre à son développement (Holsters *et al.*, 1983) ;

La région Vir : cette région permet le transfert de l'ADN-T vers la plante. Elle comporte 20 gènes essentiels à l'induction de tumeur chez l'hôte (Weidner *et al.*, 2003);

La région ORI (règion de replication): les trois gènes de cette région permettent une répllication stable du plasmide dans la bactérie et sont impliqués dans les fonctions d'incompatibilité (Weidner *et al.*, 2003).

Les locus *trac* et *trb* : Ces gènes sont impliqués dans le transfert conjugatif du plasmide. Ils sont active par le opines (Weidner *et al.*, 2003);

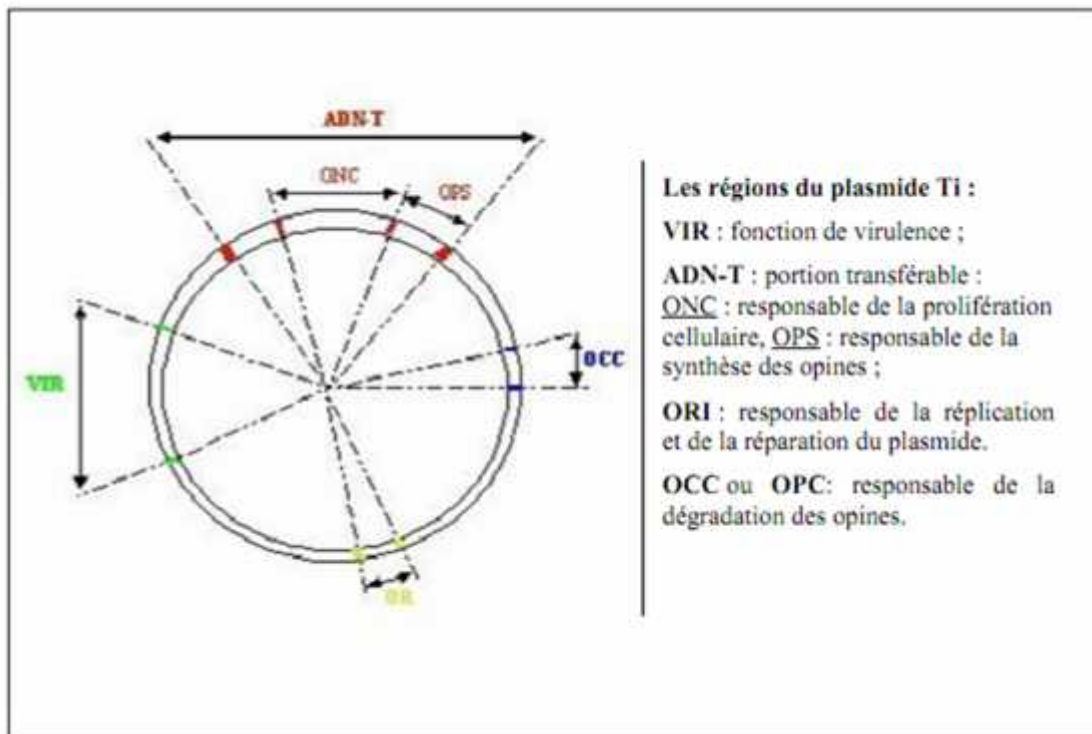


Figure n°3 : Carte simplifiée du plasmide Ti (d'après Eijersbergen et Hooykaas, 1993).

II.5. Processus d'infection

Mobile dans la solution du sol, les bactéries *d'A.tumefaciens* sont attirées par les substances émises par les plantes blessées (Winans, 1992). Ces substances sont des composés phénoliques dérivés du syringol telsque (acétosyringone, acide sinapique, syringaldéhyde, diméthoxyphénolet des monosaccharides telque : le glucose, l'arabiose, xylose et l'acide glucorinique .Un PH acide est également indispensable (Stacheletal.,1985 ;Wimnas,1992 ;Mantis et Minans,1993 ;Lee et al .,1995 ;Li et al.,2002).

Le mécanisme de pathogénèse d'*Agrobacterium* a été qualifié de «colonisation génétique » (Schell, 1975).en effet, le processus de parasitisme se déroule en 5 étapes essentielles.

- 1) Reconnaissance bactérie/hôte ;
- 2) activation du processus d'infection ;
- 3) Transfert et insertion du ADN-T dans le génome de la cellule végétale ;
- 4) expression des gènes du fragment transféré.

II.5.1. Reconnaissance bactérie/hôte

Lors d'une blessure, la plante libère des molécules chimio-attractantes telles que des sucres et des composés phénoliques attirant ainsi la bactérie qui se déplace vers la blessure à l'aide de ses flagelles en suivant un gradient de concentration (Ashby et al, 1988 ; Winans, 1992). Pour établir un contact physique avec son hôte, *A. tumefaciens* reconnaît des protéines localisées sur la paroi végétale apparentées à la vitronectine, protéine impliquée dans le maintien de la structure et dans la cohésion des cellules végétales (Wagner et Matthyse, 1992). Ces protéines sont reconnues par des polysaccharides de type 1-2 glucane, synthétisés par les gènes du chromosome bactérien tels que *exoC*, *chvA* et *chvB* (Cangelosi et al, 1987). L'interaction du polysaccharide avec la protéine de type vitronectine entraîne la synthèse de filaments de type cellulose stabilisant et renforçant ainsi l'attachement de la bactérie sur la cellule hôte.

II.5.2. Activation du processus d'infection

L'activation des gènes de virulence *vir* est une étape indispensable pour le processus de transgénése. Les protéines *virA* et *virG* correspondent à un système à deux composantes (*virA/virG*) et (*virA/chvE*) nécessaires à l'induction des gènes *vir* (Figure n°2). La protéine *virA*, à active kinase s'autophosphoryle et transfère cette phosphorylation à une autre protéine, cytoolique cette fois et codée par *virG*. Cette dernière déclenche l'expression des gènes *vir* localisés sur la région *vir* du plasmide (Peng *et al.*, 1988 ;Lee et Coll,1996). Les gènes *vir* sont provoqués en cascade dans l'ordre *virG*,*virB*,*virC* ,*virD* et *virE*.

Si les composés phénoliques sont en faible concentration ne permettant pas l'activation de *virA*, la protéine *chvE* (une protéine périplasmique, chromosomale pouvant lier des monosaccharides) prend en charge le deuxième composante. Une fois activée par son ligand, elle augmente la sensibilité de *virA* aux composés phénoliques. En plus de six opérons de virulence (*virA* ,*virG* ,*virB* ,*virD* et *virE*),19autres gènes de la même région sont impliqués dans la préparation du fragment ADN-T et dans son transport. Les plus étudiés sont *virJ*,*virK* ,*virL*et *virM* (Kalogeraki et Winans,1998).

Le troisième activateur des gènes *vir* est l'acidité (Winnas, 1992 ;Lie *et al.*,2002).celle ci régule l'expression du gène *virG* placé également sous le contrôle d'un promoteur sensible au pH acide du milieu externe via une protéine chromosomale (Mantis et Winnas ,1993).

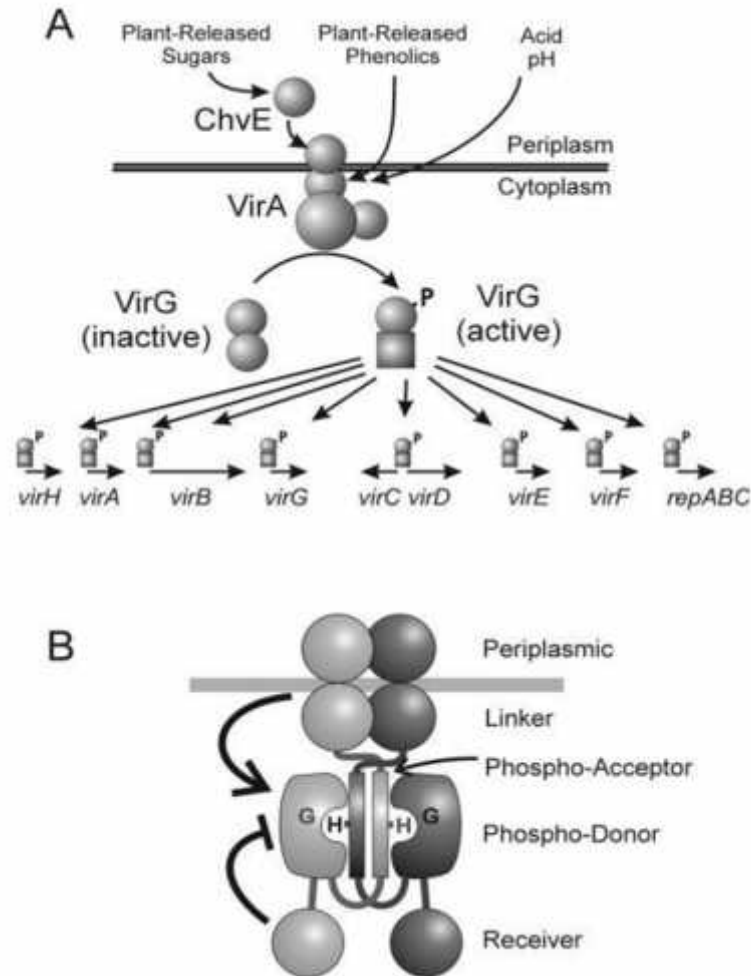


Figure n°4 : Régulation des gènes de virulence d'*A. tumefaciens* par des signaux de la plante hôte (Brencic et Winans, 2005).

II.5.2.1. Transfert ADN-T

Même si le processus de transfert d'ADN-T par *Agrobacterium* est unique car il a lieu entre deux organismes de règnes différents. La mise en place du transfert du T-DNA rappelle en denombreux points de la conjugaison bactérienne.

II.5.2. 2. Production du brin T

L'expression des gènes *vir* conduit à la production d'un brin d'ADN-T. Pour cela, les endonucléases *VirD1* et *VirD2* vont agir spécifiquement pour couper un fragment de plasmide Ti (Filichkin et Gelvin, 1993). La protéine *VirD1* sépare les deux brins d'ADN-T. La protéine *VirD2* quand à elle clive l'ADN-T au niveau des séquences répétées de 25 nucléotides, spécifiques des régions flanquantes de ce fragment. *VirD2* se fixe

covalamment à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T (Gelvin, 2003). Le complexe *VirD2*/ADN-T se sépare du reste du plasmide, et ainsi le brin T est formé et il va pouvoir s'orienter afin d'être transféré dans la cellule hôte pendant que le plasmide Ti est régénéré à l'aide de la machinerie de réparation de l'ADN de la bactérie.

II.5.2.3. Transfert du complexe T à la cellule végétale

Le complexe *VirD2*/ADN-T est transféré vers la cellule hôte à travers la membrane bactérienne et la paroi végétale, pour atteindre le noyau végétal, par un système de sécrétion de type IV. Deux autres familles de protéines vont alors agir : *VirB* et *VirD4*. Les protéines *VirB* sont responsables de la formation d'un pore de transport et d'une structure sur la surface appelée le pilus T. Ce pilus T est composé de pilin-T, une molécule formée par *VirB2* (Christie, 1997 ; Kado, 2000). La protéine *VirD4*, de la membrane interne, dirige l'interaction entre le brin d'ADN-T et le complexe *VirB*. C'est ce qui est appelé système de sécrétion de type IV (Regensburg-Tuink et Hooykaas, 1993 ; Vergunst *et al.*, 2000 ; Schrammeijer *et al.*, 2003 ; Vergunst *et al.*, 2003 ; Michielse *et al.*, 2005). D'autres protéines de virulence, *VirE2*, *VirE3* et *VirF* sont également exportées par le système de sécrétion de type IV. Le rôle de *VirE2* semble être de protéger l'ADN-T contre les nucléases et de le maintenir dans un état déplié pour faciliter son transfert dans le pore nucléaire (Citovsky *et al.*, 1989).

II.5.3. Expression des gènes et fonctionnement au sein de la cellule végétal infectée

Une fois le ADN-T intègre au sein du génome végétal (chilton *et al.*,1977 ; Gelvin,1992 ; Gelvin, 2000 ; Tzfira et Citovsky, 2000 ; Zhu *et al.* ,2000 ;Zupan *et al.* ,2000),le brin Test recouvert de protéines *virE2* afin de le protéger des nucléases végétales et de lui conférer la structure nécessaire pour son transport jusqu'au noyau de la cellule hote.les gènes qu'il porte s'expriment et le métabolisme de la cellule végétale est détourné au profit de la bactérie (Chupeau,2001). Ce détournement est entièrement voué à la production de substance spécifiques aux cellules tumoral dites « opines ». Ces opines synthétisées dans les cellules végétal favorisent la multiplication des bactéries pathogènes (Petit *et al.* , 1978) et sont donc prometteuses de la dissémination de la pathogénie (Tempé *et al.*,1978).

À la suite de ce transfert du matériel génétique bactérien, le fonctionnement de la plante se voit modifié. Premièrement, il y a une production accrue d'hormones de croissance, les gènes *tms* et *tmr* portés par le ADN-T et qui codent pour des protéines nécessaires à la synthèse des phytohormones (auxines et cytokinines). Cette accumulation d'hormones se traduit par une croissance désordonnée et illimitée engendrant l'apparition de tumeurs (Nester et al., 1984 ; Morris, 1986 ; Meyer et al., 1997 ; Zambryski, 1998). Deuxièmement, il y a synthèse et libération des opines (Ogawa et al., 2000) (Figure n°5). En 1943, Braun a montré que la tumeur peut croître indéfiniment en l'absence de substances de croissance.

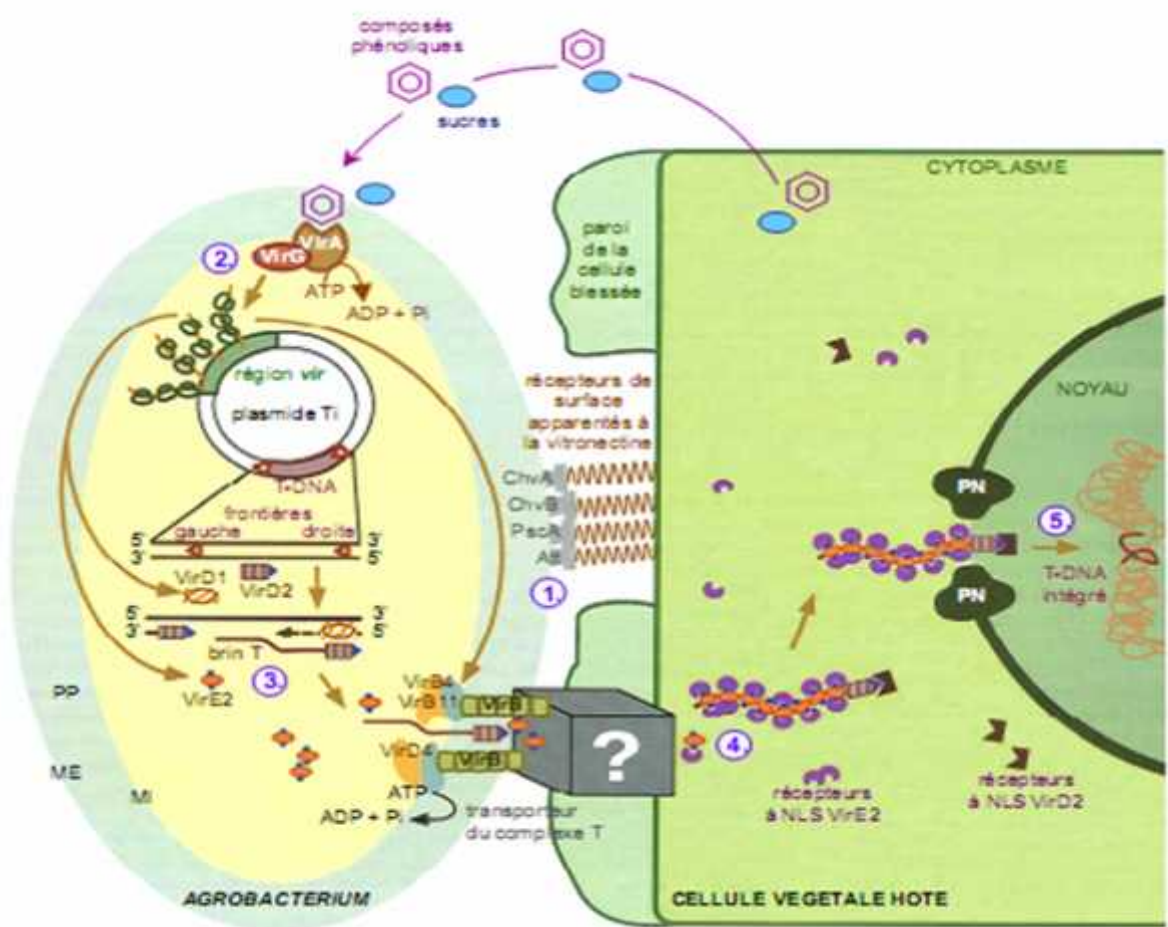


Figure n°5 : Représentation schématique d'une infection par *Agrobacterium*

Schéma résumant les principales étapes du processus d'infection (d'après Sheng et Citovsky, 1996).

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

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

II.6. Symptômes

Les symptômes causés par *Agrobacterium* ont une apparence quelque peu spectaculaire et caractéristique. Dans le cas de la tumeur du collet, les symptômes peuvent s'observer au collet ou sur les racines ou des racines adventives (Chevelu Racinaire, Hary Root). Ou, dans certains cas, sur les parties aériennes (pousses et branches) des plantes infectées. Ils se manifestent par l'apparition d'excroissance végétale plus ou moins sphériques, blanchâtre, De tailles variées, elles mesurent de quelques millimètres à plusieurs centimètres de diamètre. En vieillissant, les tumeurs prennent une teinte brun-noirâtre elles durcissent et se craquellent pouvant être la cible de micro-organismes tels que *Phytophthora*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*..., qui participent au dépérissement de la plante infectée. Des tumeurs secondaires peuvent aussi se développer en différents points du système racinaire perturbant profondément la circulation de la sève. Les végétaux infectés montrent souvent des symptômes de carence en éléments nutritifs, comme une décoloration des feuilles, suivie d'un affaiblissement général et d'un rabougrissement (Figure n°6) (Beneddra et al., 1996 ;Pionnat et al., 1999).



Figure n°6 : Jeunes tumeurs sur porte-greffe de pommier et galle sur *Euonymus* (d'après lacy et al., 2009).

II.7. Facteurs favorisant le développement de la maladie

L'infection et le développement des symptômes sont favorisés par des températures se situant entre 20 °C et 31 °C. À la suite de l'infection, de minuscules galles apparaissent entre deux et quatre semaines lorsque la température est supérieure à 20 °C mais inférieure à 32 °C. À une telle température, l'infection est inhibée. Le développement des tumeurs est retardé si la température est inférieure à 15 °C. À une telle température, les infections sont

latentes, c'est-à-dire que les symptômes se développeront lorsque la température augmentera (Moore et al, 2001 ;lacriox, 2003).

II.8. Moyens de lutte

Une fois que la plante est infectée par *Agrobacterium*, il n'existe pas de méthode de lutte curative car même en l'absence de la bactérie il y aura progression de la croissance de la tumeur. Ainsi, les méthodes de lutte doivent être préventives à travers de mesures prophylactique ou de pratiques culturales adaptées (Vicedo et al. ,1993 ; Raio et al., 1997 ; Rhouma, 2006).

II.8.1. Mesures prophylactiques et culturaux

La prévention de la galle du collet passer par un contrôle de l'état sanitaire des plantes et du sol dans la but d'atténuer les dégâts vertigineux causées par *Agrobacterium* .La lutte culturale stricte se réalise difficilement. Les producteurs doivent utilise des plantes sains et des boutures provenant de plantes contrôles et l'évitiation la plantations trop denses, traitement rapidement le foyer de la maladie par l'arrachage des plantes maladies puis s'en débarrassage, lors des pratiques culturales minimisent les blessures aux tiges et aux racines ,désinfectées par thermothérapie, notamment la vigne (traitement à l'eau chaud)(Moore et Allen, 1986), Assure un bon contrôle des populations d'insectes et de nématodes ,La rotation des cultures en alternance au moins 3 ans avec des cultures monocotylédones (comme le maïs) insensible ou résistances à *Agrobacterium* (New and Kerr, 1972 ; Moore et Allen, 1986 ; Raio et al., 1997).

II.8.2. Lutte physique

La solarisation est une technique efficaces qui consiste à couvrir le sol durant la période chaude de l'année par une bâché en plastique transparent (katan et al .,1976 ;Kata,1980 ;Stapleton et De vay, 1986). Les modifications chimiques, physiques et biologiques se produisant sous le plastique, en raison de la température élevée du sol ont entrainé dans plusieurs essais une importance réduction des microorganismes phytopathogènes (Katan et De Vay ,1991). Afin de mettre en évidence l'efficacité de cette technique sur les population d'*agrobacterium*, des essais de ce traitement sont réalises pendant plusieurs années (Raio et al., 1997) et les résultats prèlimaires montrent que la

température élevée entraîne la perte du plasmide Ti et donc la perte du caractère pathogène contribuant efficacement au contrôle du Crown Gall (Raio et al., 1998).

II.8.3. La lutte chimique

Comme la plupart des maladies bactériennes, les produits qui se sont révélés efficaces contre la maladie de galle du collet sont rarissimes. En effet, les antibiotiques qui sont recommandés comme bactéricides généraux restent inefficaces. Alors que l'utilisation des produits à base de cuivre (0.25%) lors de la plantation a permis la réduction des attaques de pommier de 2% à 18% (Nesme, 2001). De leur part, Suo et Leung (2001), ont signalé une réduction significative d'attaque et de poids des galles avec un prétraitement des rameaux de rosier par l'acibenzolar-S-méthyl.

II.8.4. La lutte génétique

Toujours, pour parvenir à une meilleure protection contre la galle de collet, une méthode prometteuse a été développée les plantes sensible aux souches pathogène *Agrobacterium*. La prolifération des gènes bactériens provoquant la tumeur est réprimée de manière active (Escobar et al., 2001), et les plantes deviennent ainsi résistantes. la technique a déjà été testée expérimentalement avec succès sur les plantes de pommier (Viss et al., 2003).

II.8.5. La lutte biologique

Avant l'apparition de la lutte biologique, la tumeur du collet entraînait des pertes annuelles d'environ 10 % des stocks dans les pépinières canadiennes. L'utilisation d'*Agrobacterium radiobacter* a réduit les taux d'infection à environ 1 ou 2 %, ce qui revient au profite à la fois des producteurs et de l'industrie. Les produits à base d'*A. radiobacter* sont appliqués sous forme de solutions à immersion pour les racines, les tiges et les graines en germination dans les serres et les pépinières. Le produit est efficace contre la tumeur du collet pour deux raisons. Premièrement, il produit un antibiotique toxique pour le microorganisme infectieux. Deuxièmement, il entre en compétition pour l'espace sur la racine hôte, réduisant ainsi la présence du microorganisme infectieux. (Vicedo et al., 1993).

La souche k84 d'*Agrobacterium radiobacter* découvert par le Dr ALAN KERR en Australie au début des années 1970 et sa commercialisation ont marqué un tournant dans le traitement de la tumeur du collet (Moore, 1977). En effet à été utilisée avec succès

(Moore,1988) dans plusieurs pays tels que l'Australie ,la Grèce ,Italie, le japon, l'Afrique du sud, l'Espagne, Canada et les Etats Unis (shim et al,1987)et aussi en région méditerranéenne (Bazzi et Mazzucchi, 1978, Farkaset Hass,1985 ;Lopez et al.,1987 ;kimi,1990)

La souche k84 protège les blessures des racines contre l'infection par *A.tumefaciens* et cela par l'antibiotique « agrocine 84 » qu'elle produit et qui présente une toxicité spécifique contre les souches sensibles (Ferrand et al., 1987 ;Keri et Hlay,1994 ;Ellis et al.,1979). Il existe plusieurs produits commerciaux à base l'antagoniste k84 (pesticides biologique) destinés à la lutte biologique contre la galle du collet.

Dernièrement, Une nouvelle souche génétiquement modifiée de la bactérie (K1026) été enregistrée aux États-Unis en 1998.

Cette nouvelle souche a été modifiée de manière à éliminer la possibilité d'échange génétique entre l'agent de lutte biologique et la bactérie pathogène dans le sol, ce qui minimise l'apparition de la résistance chez l'agent pathogène. Elle est obtenue par une délétion d'une région du plasmide pAgK84, responsable de la conjugaison. K1026 a été le premier microbe transgénique disponible comme produit commercial. Cependant, cette souche n'est pas encore autorisée dans certains pays comme le Canada.

Certaines bactéries sont résistantes à l'antibiotique produit par *A. radiobacter*. Par exemple, l'efficacité est médiocre pour ce qui est des pommiers et des vignes. (Bourchier ,2004).

II.8.6. Autres antagonistes

Vu que les deux souches d'*A. radiobacter* sont plus efficaces surtout pour les souches pathogènes à plasmide de type nopaline , il a été question de la recherche d'autres antagonistes pouvant être plus efficaces. Certains champignons (*Aspegillus* et *Penicillium*) et des bactéries (*Pseudomonas*, *Bacillus*,Actinomycète,...) se sont avérés très actifs *in vitro*, mais sans avoir un effet significatif au champ (Cooksey et Moore, 1980). Récemment,Une souche non pathogène d'*A. vitis* (E26) efficace contre les souches d'*A. tumefaciens* ont été découverte. Le composé antibactérien actif a été caractérisé et purifié (Wang et al., 2003).

D'autres travaux de recherche ont ciblé les extraits végétaux à la recherche d'une molécule active contre la maladie de la galle du collet. Une activité intéressante est observée au niveau de l'extrait de l'ail (Khlaif, 2001) et du faux poivron (Rhouma, 2006), avec les quels il y a réduction de l'incidence de la maladie. La recherche d'autres antagonistes contre *A. tumefaciens* sont encore en cours.

Matériel et Méthodes

<I. Matériel et Méthodes

Le but de ce travail est une contribution à l'identification de l'agent causale de tumeurs observées sur poirier cultivée au niveau de l'exploitation à Hamda de la wilaya de Laghouat et pris des échantillons similaire de la tumeur de la maladie de crown gall.

Ce travail est réalisé au laboratoire de la faculté d'Agronomie. Notre objectif, est une contribution à l'identification de l'agent causale de la tumeur observées sur poirier cultivé au niveau de l'exploitation à la zone de Hamda qui situe a 4 km au nord de la willaya de Laghouat (Figure n°7). Nous avons proposé dans une première étape un isolement de l'agent pathogène. Dans une deuxième étape une identification de l'agent causal. Enfin le test de détermination le pouvoir pathogène.

I.1. Présentation de la région

La Prospections sur terrain ainsi que la récolte d'échantillons de tumeurs végétatives du poirier se sont déroulées dans la station Hamda, une zone côtière à vocation fruitière importante, située à 4 km au nord de Laghouat. Ses coordonnées géographiques sont les suivantes : altitude 770 m, latitude 33°51 min 12 s Nord et longitude 2° 27s. Son climat, froid en hiver et chaud en été. À sol sableux. Notre exploitation s'étalé sur une superficie de 12 Ha dont la S.A.U est de 12 Ha aussi. Les plus important de ces cultures est l'arboriculture qui est entourée par des arbres de *Casuarina Torulosa* qui jouent le rôle de brise de vent (Tableau n°5). Cette exploitation est également plantée des plantes des vignes, quelque palmier dattier et d'autre culture maraîchère comme l'aubergine, tomate, poivron, fève et haricot vert Qui s'étale sur 1Ha. Les techniques culturales utilisée dans le champ sont le labour, le binage, le désherbage, l'irrigation par rigole et aucune traitement phytosanitaires ont été applique.

Tableau n°5 : la surface des arbres fruitiers dans l'exploitation

Surface	Culture	Pied
1Ha	Pommier	400
1Ha	Abricotier	400
1Ha	Poirier	800
1Ha	Cognassier	600
1Ha	Grenadier	800
1Ha	D'olivier	400

Source : D.S.A, 2010

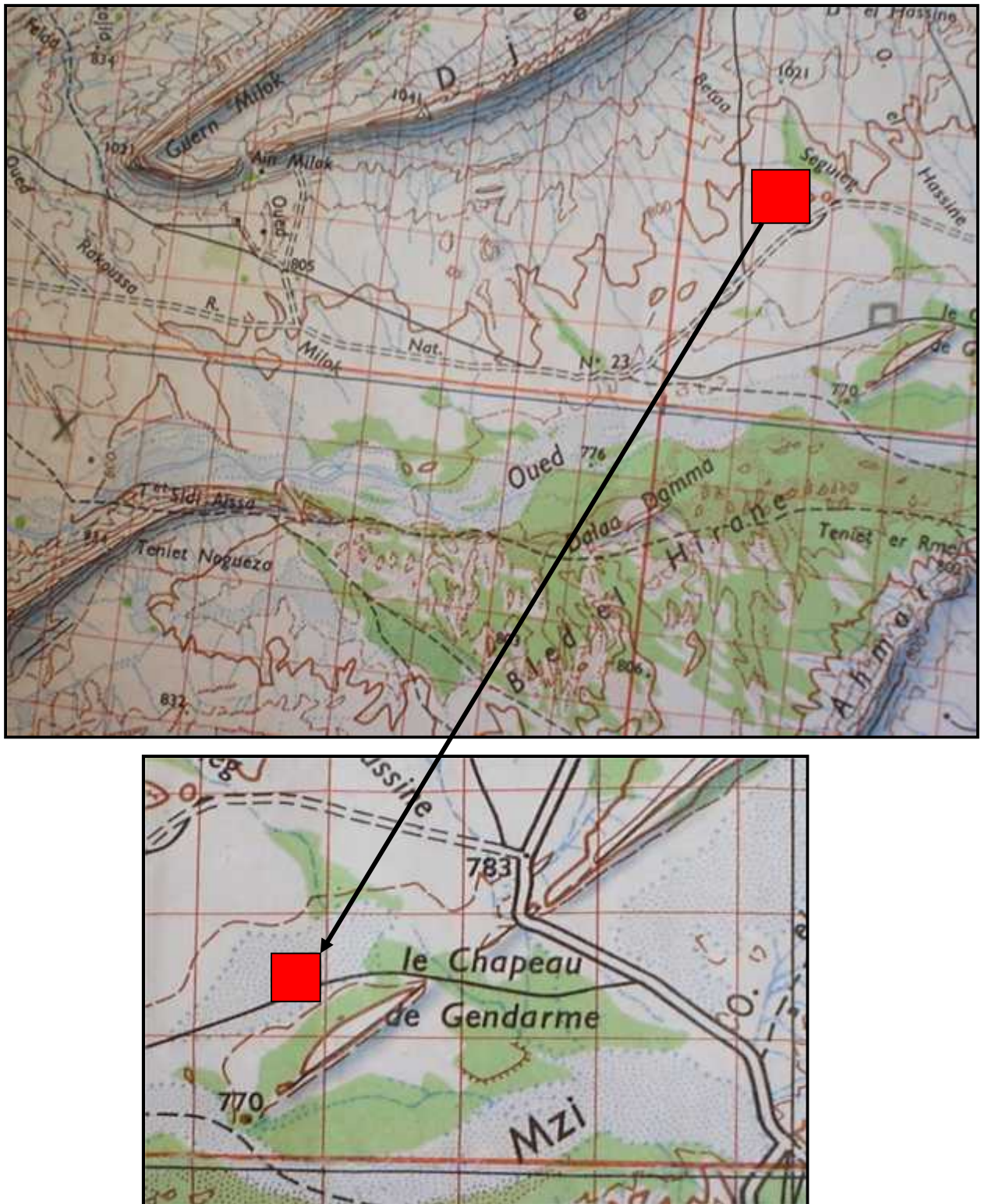


Figure n°7 : Carte de Laghouat indiquant la station d'étude Hamda (D.S.A, 2010).

Echelle : 1/100 000

II. Prélèvement des échantillons

Le prélèvement des échantillons sont effectués à partir de différentes plantes de poirier qui présentent des symptômes typique au Crown galle. À l'aide d'un sécateur stérile nous avons coupé les tumeurs qui sont ensuite mises dans des sachets stériles et ramenées au laboratoire pour des isollements, dans l'objectif de déterminer l'agent causale de ces tumeurs végétales. Les échantillons prélevés ont été maintenus et conservés à une température de 4°C.

II.1. Méthodes d'isolement

L'isolement des bactéries a été effectué selon la méthode suspensions-dilutions décrite par Moore et coll. (1988). Les tumeurs ont subi une désinfection superficielle afin d'éliminer les agents saprophytes avec une solution d'hypochlorite de sodium à une concentration à 1% pendant 20 min, suivie de 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile ensuite, 1 g de tissu végétale a été prélevé à partir de chaque tumeur puis, découpé et écrasée entre mortier et pilon dans 9 ml d'eau distillée stérile, puis laissé pendant 20 min pour assurer une bonne macération. De cette solution mère sept dilutions décimales en cascade sont réalisées, allant de 10^{-1} jusqu'à 10^{-7} . Un volume de 100 μ l de chaque dilution est étalé sur les milieux choisis à raison de trois répétition par milieu dans les trois premiers isolements nous avons utilisé le milieu général LPGA et deux milieu semi sélectif : King B, NKS et pour les 6 derniers isolements nous avons utilisé les milieux : LPGA, King B, MG additionné de tellurite de potassium (60 μ l) (Figure n°8). L'incubation des boîtes de pétri s'effectue pendant 3 à 5 jours, à $25\pm 2^\circ\text{C}$. Les répétitions augmentent la chance d'isoler un grand nombre des isolats.

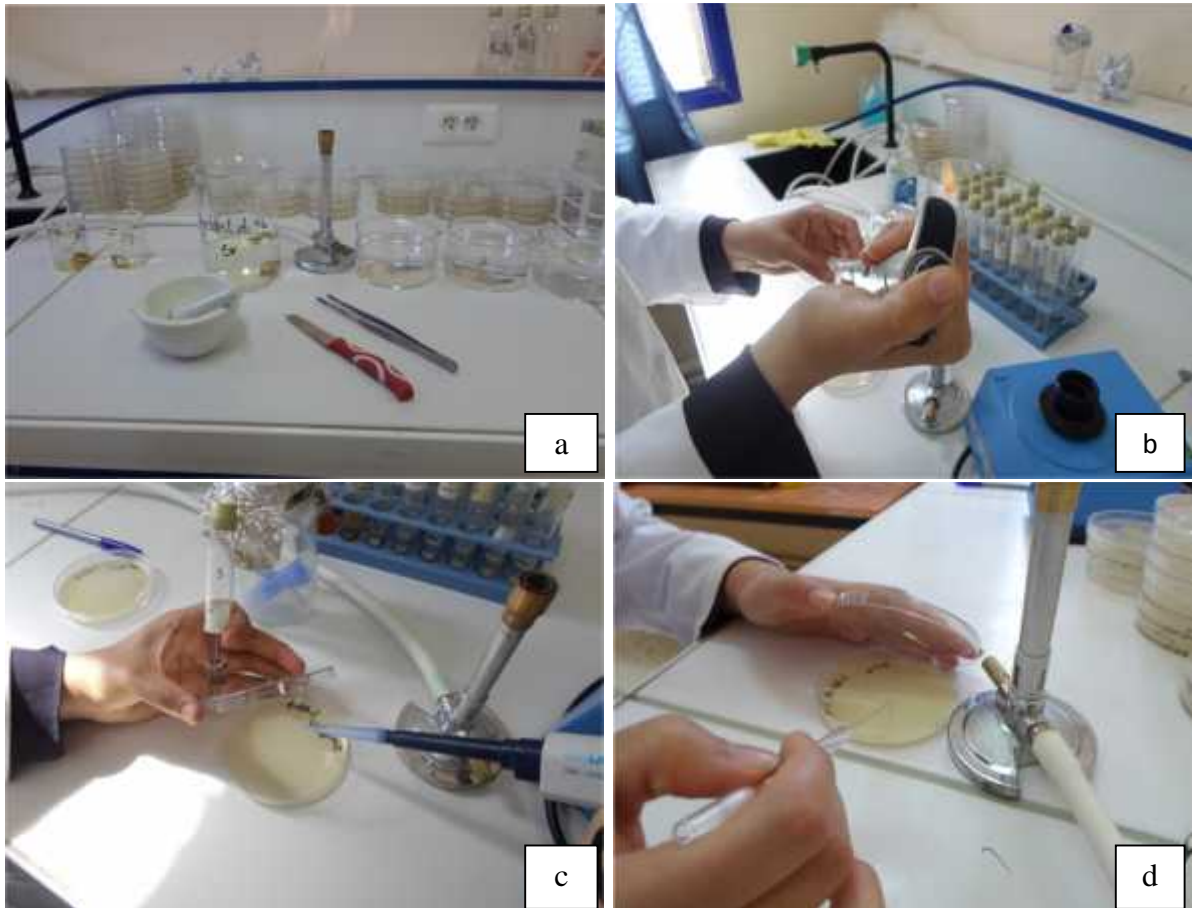


Figure n°8: protocole de l'isolement (Original, 2014).

- A : Désinfection superficielle des échantillons ;
- B : Préparation d'une série de dilution;
- C : Volume de 100 μ l étalé sur le milieu d'isolement ;
- D : Etalement sur milieu de culture.

II.2. Dénombrement des colonies

Après l'incubation, à l'aide de l'appareil compteur de colonies, nous avons effectué le comptage des colonies sur les milieux (LPGA, King B, NKS, MG+Tellurite)(Annexe),

Le dénombrement consiste à calculer les bactéries qui se sont développées sur les boîtes de pétrie en unité formant colonie (UFC), seules les boîtes ayant 30 à 300 colonies sont retenues (Figure n°9) (Klement et *al.*, 1990). Nous avons utilisé la formule suivante pour estimer le nombre des bactéries viables;

$$\text{UFC} = N \times 10^x \times 10 \text{ (cellule.ml}^{-1}\text{)}$$

N : La moyenne entre de boîtes de même dilution ;

x : Nombre de dilution ;

UFC: Unité formant colonie.



Figure n°9 : Boîte d'isolement sur milieu King B (Original, 2014)

II.3. Sélection des colonies

Après une incubation de 3 à 5 jours, les colonies présentant les caractéristiques macroscopiques d'*Agrobacterium like bacteria* sont sélectionnées pour leur ultérieure identification.

II.4. Purification des isolats

Les souches sélectionnées ont subi une purification par repiquages successifs sur le milieu King B. par épuisement en trois secteurs jusqu'à l'obtention de colonies bactériennes pures (Figure n°10).



Figure n°10: Isolat bactérien après purification (Original, 2014)

II.5. Conservation des isolats

Après purification des isolats, les jeunes colonies bactériennes sont aseptiquement transférées par ensemencement dans des tubes à essai contenant le milieu King b inclinée. Après 24 heures d'incubation, ces tubes ont été conservés à 4°C. Une autre conservation a été effectuée dans des eppendorfs contenant l'eau distillée stérile.

II.6. Identification des isolats

L'identification préliminaire des isolats purs est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques et physicochimiques. Cette identification est basée sur le schéma de détermination des différents genres bactéries propose par Schaad et *al.* (2001)(Figure n°11). Nous avons procédé d'abord à la coloration de Gram, puis aux tests biochimique, premièrement test de croissance en anaérobiose, test de fluorescence sur milieu King b, test d'YDC et croissance sur DIM.

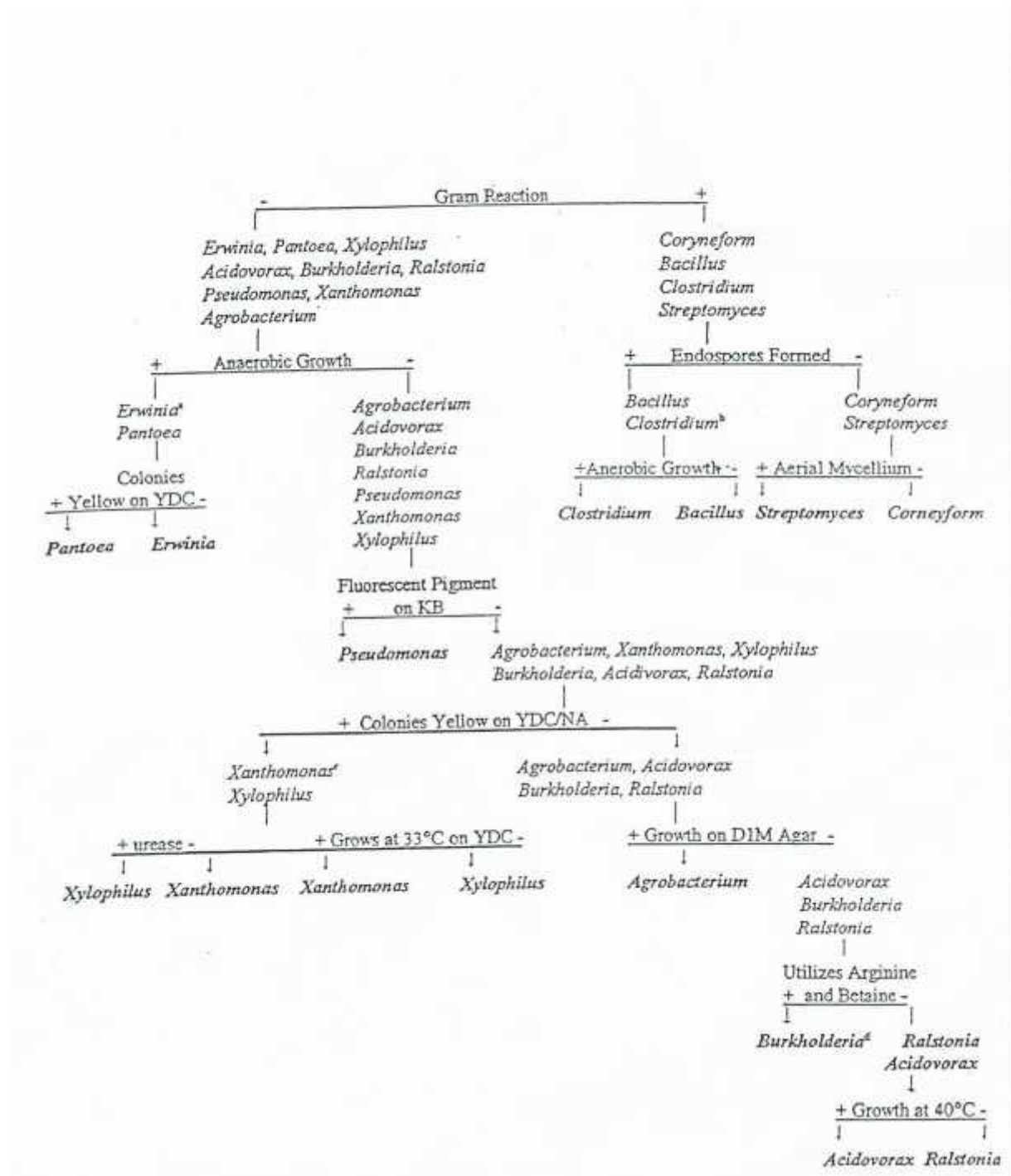


Figure n°11 : Schéma de détermination des différents genres bactéries proposé par Schaad et al. (2001)

II.6.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram, c'est une coloration de base en bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon la structure de leur paroi (Schaad et al., 2001).

Cette coloration consiste en la préparation d'un frottis à partir d'une culture bactérienne pure âgée de 24 h, sur une lame propre, puis sa fixation à la chaleur. suivi par sa coloration

avec le cristal violet que nous avons laissé agir une minute puis nous l'avons rincé abondamment à l'eau afin d'éliminer toute trace de solution en excès ensuite ,nous avons versé sur la lame quelque goutte de lugol , et laissé agir une minute et rincé soigneusement avec l'eau , après, décoloration à l'alcool pendant 30s puis lave rapidement à l'eau. Ensuite, le frottis est soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuch sine. Après un bref rinçage, nous avons séché le frottis à l'aire libre ou par papier buvard puis nous l'avons examiné, consécutivement, à l'objectif 40X et 100 X utilisant l'huile à immersion.

La lecture de la coloration de Gram est basée sur le changement de couleur, où, les bactéries qui ont gardés la première coloration violette sont des Gram positif (+) celles qui ont été décoloré par l'alcool se présentent en rose: coloré par la fuschine sont des Gram négatif (-).

II.6.2. Test de KOH

Parallèlement, un test plus rapide, a été effectué. Deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à une concentration de 3%, sont mises en contact avec une crème bactérienne âgée de 24 à 48 sur une lame, en effectuant un mouvement circulaire. La solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si visqueux (élastique) est obtenue après 30 s et en l'absence de la viscosité les bactéries sont de gram positif (Bourgault et Lamothe, 1988 ; Schaad *et al.* ,2001).

II.6.3. Test de Hugh Leifson (HL)

Le milieu de Hugh et Leifson permet de distinguer entre les deux processus. La dégradation d'un glucide s'accompagne généralement d'une acidification du milieu : lors des respirations le glucide est oxydé en CO₂. Par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral): Lors des fermentations le glucide est oxydé en acides, alcools, qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement, Toutes les voies fermentaires ne sont cependant pas également acidifiantes (Schaad *et al.* 2001).

Le milieu de Hugh et Leifson contient un indicateur de pH. Le bleu de bromothymol, qui prend une couleur jaune en milieu acide.

A l'aide d'un milieu à faible teneur en peptone et à forte concentration en glucose. L'acidification du milieu fait changer l'indicateur, le bleu de bromothymol, qui passe du vert au jaune.

Ce test consiste à ensemencer par piqure centrale, avec un fil de platine la bactérie .nous avons ajouté 1cm d'huile de paraffine stérile pour l'anaérobiose bactérienne .nous avons incubé les tubes à une température de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pendant 24 à 48h (Figure n°12).

La réaction positive (+) : obtention de couleur jaune (les bactéries oxydent le glucide par respiration aérobie) ;

La réaction négative (-) : les bactéries inactives ou inertes ne change pas la couleur verte.



Figure n°12: Ensemencement central d'isolat bactérien sur milieu High et Leifson (Original, 2014)

II.6.4. Test de King B

La production du pigment fluorescent a été vérifiée sur milieu King B. Après une incubation de 24 à 48 heures à une température de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, le développement d'un pigment vert fluorescent a été révélé à l'œil nu ou sous une lampe de Wood émettant une lumière ultraviolette (UV) (entre 254 et 366 nm).

II.6. 5. Test d'YDC

Ce test on peut l'utilise en général pour la plupart des isolats de tissus végétaux afin de tester la pigmentation après l'incubation pendant 48 à $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Schaad, 2001). Le test consiste a ensemencées les isolats bactérienne jeune de 24 à 48 h par la méthode des stries.

La lecture du test d'YDC s'effectue après 48 h. la réaction positive (+) indique qu'il y a un changement de couleur pour former un composé coloré en jaune et l'absence de coloration indique une réaction négative.

II.6.6 .Test de croissance sur DIM

Nous avons fait l'ensemencement des isolats bactérienne pure âgées de 24 à 48 h à l'aide d'une anse stérile par la technique dans d'une boîte pétri contenant le milieu DIM a base de cellulose. Après une période de 2 jours d'incubation à $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, avons obtenu la lecture des résultats qu'est effectuée simplement par une croissance.

La lecture de test de DIM positive (+) se traduit par la croissance des bactéries sur le milieu et la réaction négative (-) est connue par l'absence de croissance.

II.6.7. Test d'oxydase

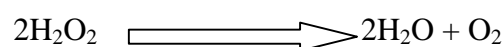
Le test oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome c.

A l'aide d'une anse de platine stérile, nous avons prélevé une colonie bactérienne pure âgée de 24 à 48 et nous l'avons placé sur un disque d'oxydase mise au préalable sur une lame en verre propre.

La lecture du test oxydase s'effectue quelques secondes après, La réaction positive (+) indique qu'il y a eu oxydation du réactif phénylènediamine pour former un composé coloré en bleu violète, l'indophénol, et l'absence de coloration indique une réaction négative (-) (Schaad et *al.*, 2001).

II.6.8. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire existante chez toutes les bactéries aérobies, elles leur permettent de vivre en présence d'oxygène. En plus de la chaîne respiratoire des cytochromes, il existe en effet chez les aérobies une chaîne accessoire courte, fixant l'hydrogène sur l'oxygène en aboutissant à de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) selon la réaction suivant:



La recherche de cette enzyme est effectuée simplement par mise en contact d'une colonie avec quelques gouttes d' H_2O_2 , un important dégagement gazeux traduit la présence d'une catalase.

La lecture de test catalase positive (+) se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène et la réaction négative (-) est connue par absence de bulles.

Et à travers les trois tests de détermination du biovar des *Agrobacterium* qui propose par Schaad. (2001). Les tests sont le suivant :

II.6.9. Test PDA+CaCO₃

Nous avons prélevé à l'aide d'une anse de platine une crème bactérienne pure âgée de 24 à 48 h, puis nous l'avons mis dans 9 ml de l'eau distille stérile .la densité optique effectué par spectrophotomètre à (620 nm) .ensuite, nous avons ensemences les isolats en spot sur le milieu PDA additionné de 0.5% CaCO₃.la lecture de résultat après 48h à l'incubation.

La lecture de test PDA+caco₃ positive (+) se traduit par l'apparition d'un halo claire, et la réaction négative (-) est connue par l'absence.

II.6. 10. Test de mannitol-mobilité nitrate

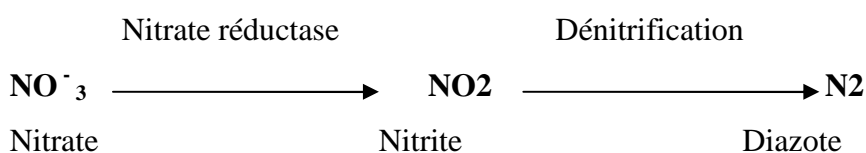
Ce test permet l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de dégradation du mannose. La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque conduit elle même à la formation d'acides à chaînes courtes.

Mannitol \longrightarrow fructose \longrightarrow acide à chaines courtes

Au cours de ce test on peut également utilise ce test à raison d'étude la mobilité d'isolats bactérienne pure.

Enfin, nous avons recherché la production d'une enzyme : le nitrate réductase par la bactérie. Ce test va donc consister à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux.

La réduction des nitrates par le nitrate réductase se traduit par production de nitrites Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.



En l'absence de nitrites, nous avons recherché la disparition des nitrates par addition de zinc : en effet le zinc réduit les nitrates en nitrites.



Le test consiste à ensemencer les isolats bactérienne pure âgée de 24 à 48h, à l'aide d'une anse de platine par piqure central sur milieu spécifique mannitol-mobilité .l'incubation à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 48h (Figure n°13).



Figure n°13 : Ensemencement central d'isolat bactérien sur milieu mannitol-mobilité (Original, 2014)

II.6.11. Test du pouvoir pathogène

Pour tester le pouvoir pathogène des isolats obtenus, deux plantes –tests ont été utilisées à savoir le kalanchoe (*Kalanchoe daigremantiana*), la tomate (*Lycoperscum esculentum* Mill cv. marmande).

L'élevage des plantules des tomates a été réalisé dans un récipient de semis. Puis nous avons repiqué les plantules dans des pots contenant un 1/2 de tourbe stérile et un 1/2 de sable stérile. L'irrigation de ces plantules est effectuée quotidiennement par l'eau du robinet stérile.

Au stade 3^{ème} à 4^{ème} feuille, les plantules ayant des tailles identiques sont choisies .Puis, nous avons réalisé deux blessures à l'aide d'un scalpel stérile au niveau de 2^{ème} et 3^{ème} entre

nœud de la tige de plantule de tomate. Après, nous avons inoculé grâce à une anse stériles une crème bactérienne âgée 24 de 48 h des isolats testés sur les blessures et recouverte le site d'infection par papier aluminium stérile. Chaque isolat testé à raison de deux répétitions. (Figure n°14).

Et pour le *kalanchoe*, nous avons réalisées des blessures à l'aide d'un scalpel stérile sur le limbe des jeunes feuilles. Puis, nous avons prélevés grâce d'une anse stérile une crème bactérienne pure âgées de 24 à 48 h et nous avons inoculé au niveau de blessure et nous avons recouverte le site d'infection par papier aluminium stérile. et suivie par un arrosage régulièrement (Figure n°15). Les isolats induisent des tumeurs sur le site de l'inoculation après 2 à 3 semaines.

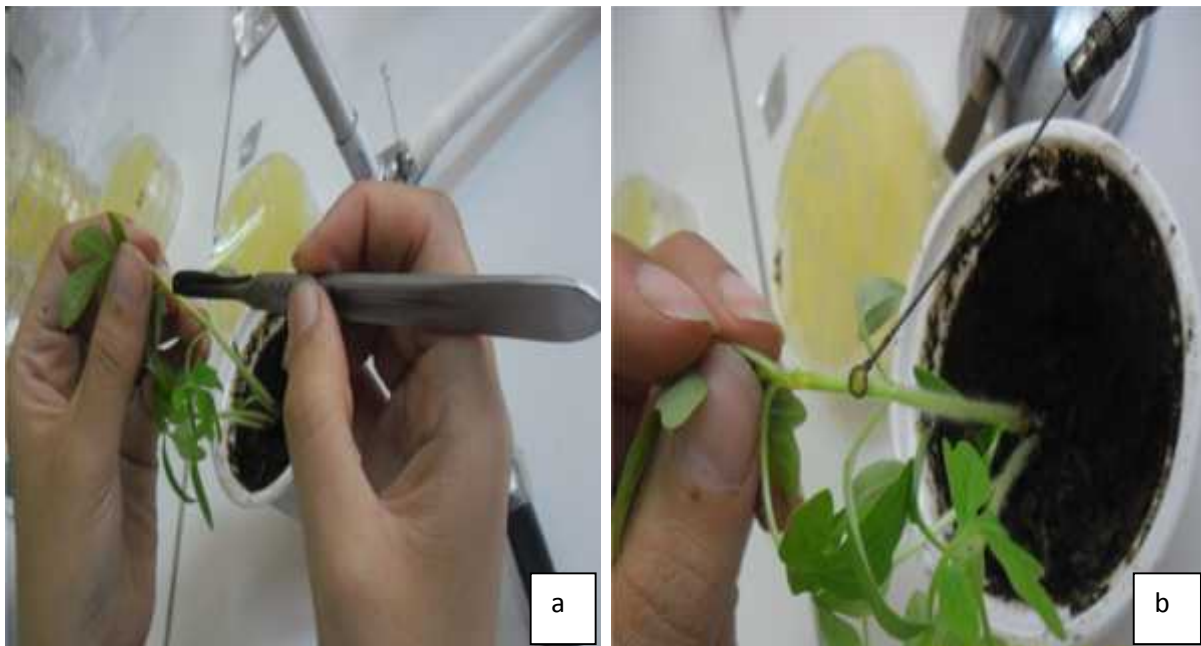


Figure n°14 : protocole de test pathogénicité sur plantule de tomate (*Lycopersum esculentum* cv.marmande) (Original, 2014).

A : blessure sur plantule de tomate.

B : inoculation des isolats bactérienne.



Figure n°15 : test de pathogénicité sur *kalanchoe* (*Kalanchoe daigremantiana*) (Original ,2014).

Résultats et Discussion

I. Résultats

Le présent travail est une contribution à l'identification de l'agent causale des tumeurs observées sur des arbres de poirier cultivés dans une exploitation agricole à Hamda "Laghout ". L'examen visuel qui repose sur l'observation des symptômes caractéristiques de la maladie est complété par des analyses pour confirmer l'absence de la bactérie en cause et ce, par une série de tests au laboratoire.

Au cours de notre expérimentation, les symptômes semblables à celles de la galle du collet ont été observés. En effet, les plantes infectées étaient à l'âge adulte. Ces tumeurs ont été localisées au niveau de la partie aérienne sur les rameaux. Il s'agit d'excroissances végétales plus ou moins sphériques, spongieuses dont la surface est irrégulière, de tailles variées, elles mesurent de quelques millimètres de diamètre (Figure n°16). Ces tumeurs ont été prélevées puis transportées au laboratoire afin d'isoler et d'identifier l'agent causal.



Figure n°16 : Tumeur végétale sur rameau de poirier (Original, 2014).

I.1. Isolement et identification des bactéries

L'isolement de l'agent pathogène a été réalisé sur des milieux de culture suivant : un milieu général LPGA, deux milieux semi sélectifs "NKS, MG", et un milieu sélectif King B.

Après 3 à 5 jours d'incubation des boîtes d'isolement à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, des colonies bactériennes se sont développées sur les milieux utilisés, parmi ces colonies,

certaines ont des caractéristiques morphologiques semblables à celles d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Dans l'objectif d'évaluer le taux des "*Agrobacterium like bacteria*" par rapport à la flore bactérienne totale, nous avons fait le dénombrement des colonies bactériennes. Les résultats obtenus par ce dénombrement, montrent une faible présence des "*Agrobacterium like bacteria*" par rapport à la microflore bactérienne totale avec des pourcentages variables de 6% à 18 % (Figure n°17).

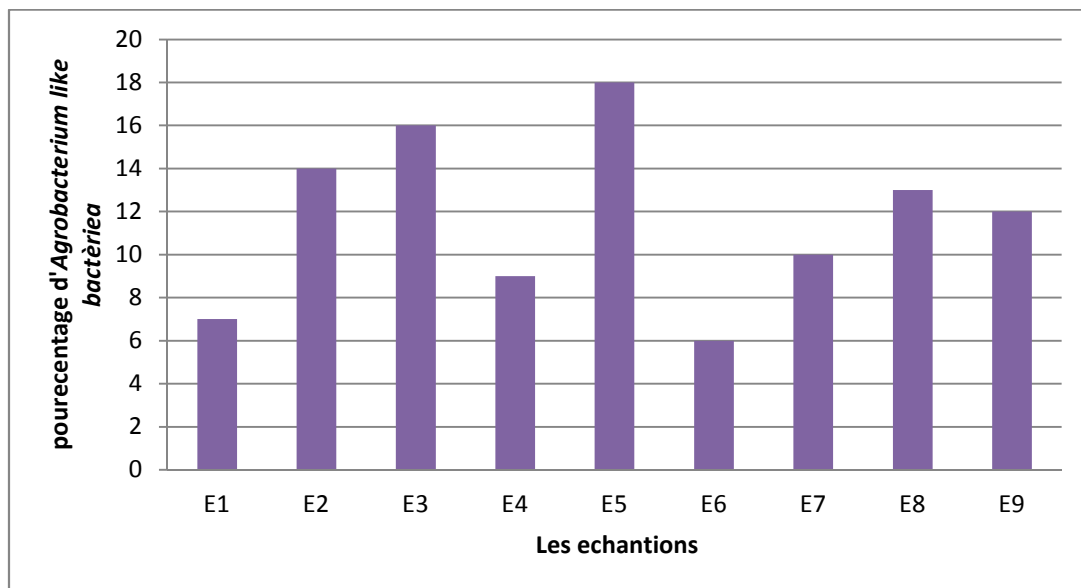


Figure n°17: Taux des *Agrobacterium like bacteria* par rapport à la flore totale dans des tumeurs végétatives étudiées (Original, 2014)

Parmi les isolats obtenus, nous avons sélectionné 37 isolats purs qui montrent les caractères morphologiques d'"*Agrobacterium like bacteria*". Ces colonies sont circulaires, d'un contour rond très régulière et convexes, lisse brillantes, prenant parfois la couleur du milieu d'isolement. Et aussi nous avons éliminé six isolats fluorescents (*Pseudomonas sp* .fluorescentes).

Dans le but d'identifier les isolats retenus, nous nous sommes basés sur les tests biochimiques et biophysiques (Schaad, 2001). Les résultats obtenus sont présentés comme suit :

I.2.1. Coloration de Gram

La coloration de gram et l'observation microscopique montre que parmi l'ensemble des isolats étudiés, 30 sont des Gram négatif de couleur rose et 7 isolats sont des cocci à Gram positif de couleur violet (Figure n°18).

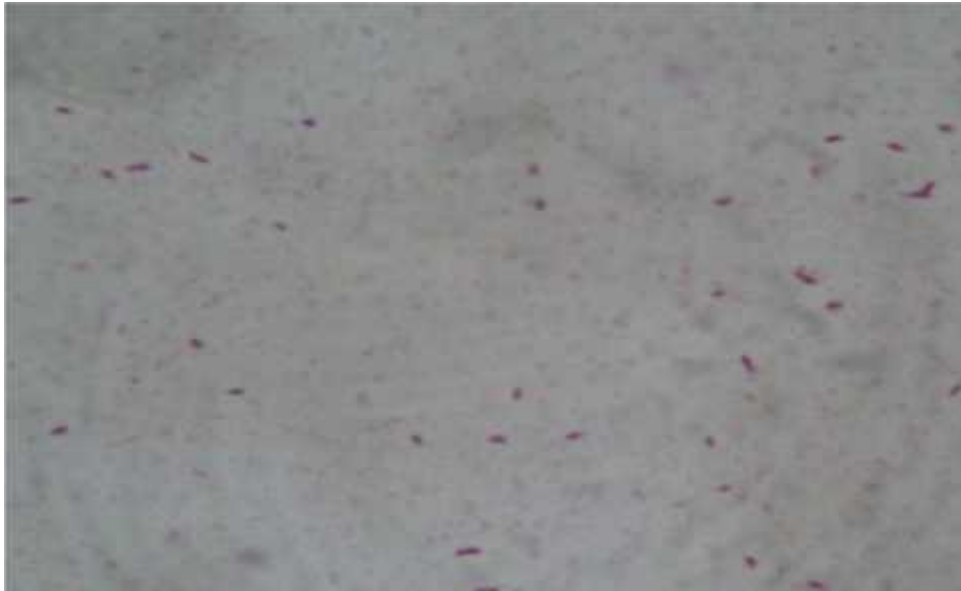


Figure n°18: Résultat de coloration de Gram (x100) (Original, 2014)

I.2.2. Test de KOH

Le résultat obtenu par la coloration de gram a été confirmé par le test KOH, pour ce test, nous avons obtenus une viscosité pour 30 isolats étudiés ce qui confirme que ces bactérie sont des Gram négatif et un résultat négatif pour les 7 isolats restants (Figure n°19).



Figure n°19: Résultat de test KOH (Original, 2014)

I.2.3. Test de Hugh et Leifson

Après 48 à 72 h d'incubation, nous avons observé un changement de couleur dans la majorité des tubes à essai. Parmi l'ensemble des isolats testés, 2 uniquement sont restés verts. Donc ces isolats sont des bactéries aérobies strictes non fermentatives et pour les 28 isolats ont viré vers la couleur jaune. D'après ces résultats on peut dire que les 28 isolats sont des bactéries anaérobies strictes fermentatives (Figure n°20).

Parmi les composants de milieu Hugh et Leifson c'est le bleu de bromothymol, ce dernier est un indicateur de pH, dont la coloration devient jaune si le milieu est acide. En condition d'anaérobiose par huile de paraffine signifier la dégradation des glucides par voie fermentative.



Figure n°20: Resultat de test High et Leifson(Original,2014)

I. 2.4. Production de pigment fluorescent

Sur le milieu King B, l'absence de pigment jaune vert fluorescent diffuse sur le milieu B de king pour l'ensemble des isolats testés indique que ces bactéries ne sont pas des *Pseudomonas* sp fluorescentes (Figure n°21).



Figure n°21: Résultat de test de fluorescence de King B (Original, 2014)

I. 2.5. Test YDC

D'après les résultats de test d'YDC, une pigmentation jaune a été observée après 48 h pour les 10 isolats et une réaction négative (pigmentation beige) pour les 20 isolats restants. (Figure n°22).



Figure n° 22: Résultats de test YDC (Original, 2014)

I.2.6. Test de croissance D1M

Parmi les 30 isolats testés, seuls les 12 isolats ont montré une réaction positive. Cela s'explique par une croissance sur le milieu D1M. Tandis que les restes des isolats (18 isolats) ont montré une réaction négative, ce qui signifie l'absence de croissance sur le milieu D1M (Figure n°23).

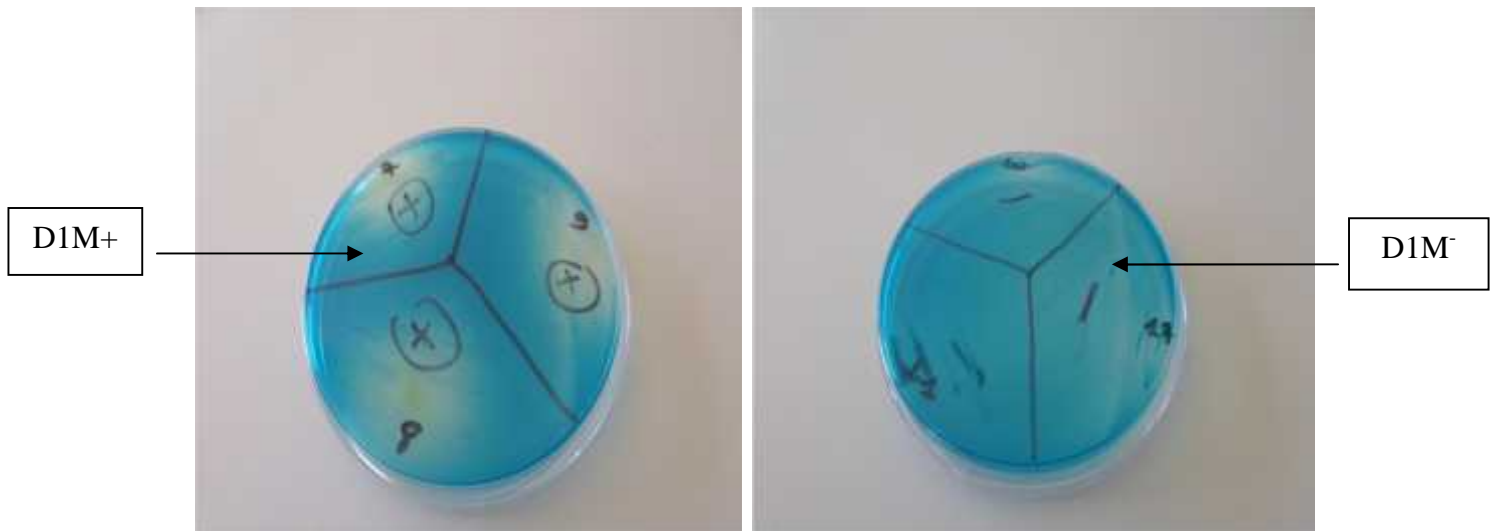


Figure n°23: Résultat de test D1M (Original, 2014)

I.2.7. Production d'oxydase

L'apparition d'une coloration bleu violet sur les disques pour les 13 isolats testés, qui montre des bactéries d'oxydase positive (+) et les restes isolats oxydase négatifs (Figure n°24).

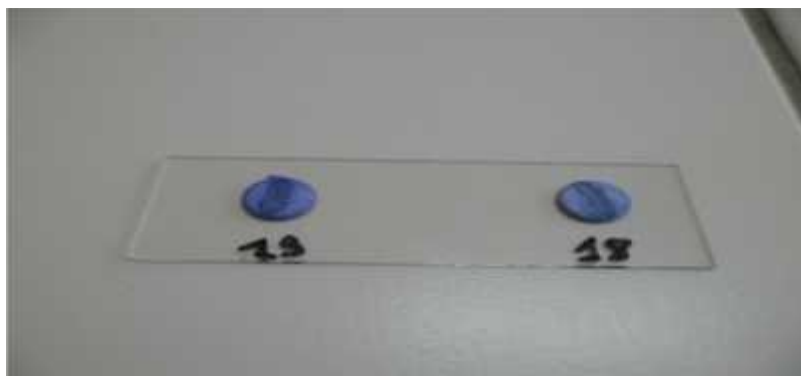


Figure n°24: Résultat de test d'oxydase (Original, 2014)

I.2.8. Test de catalase

Pour les 22 isolats testés nous avons obtenu une réaction positive. Dont la présence de la catalase se matérialise par la production de bulles. Une réaction positivée indique qu'il y a eu destruction du peroxyde d'hydrogène et libération d'oxygène et pour les restes réactions négatifs (Figure n°25).



Figure n°25: Résultat de test catalase (Original, 2014)

Tableau n°6: Les résultats globale des testes appliqués sur les isolats étudiés

isolats	Gram	KOH	YDC	KB	Oxydase	Catalase	HL	D1M	Hypothèse
1	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Erwinia</i>
2	+	-	/	/	/	/	/	/	/
3	+	-	/	/	/	/	/	/	/
4	+	-	/	/	/	/	/	/	/
5	-	+	+	-	-	+	+	+	<i>Panteoa</i>
6	-	+	+	-	-	+	+	+	<i>Panteoa</i>
7	-	+	+	-	-	+	+	+	<i>Panteoa</i>
8	-	+	+	-	-	+	+	+	<i>Panteoa</i>
9	-	+	+	-	-	+	+	+	<i>Panteoa</i>
10	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Panteoa</i>
11	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Panteoa</i>
12	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Erwinia</i>
13	-	+	+	-	-	+	+	+	<i>Panteoa</i>
14	-	+	+	-	-	-	+	+	<i>Panteoa</i>
15	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Panteoa</i>
16	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>Erwinia</i>
17	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Erwinia</i>
18	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Erwinia</i>
19	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Erwinia</i>
20	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Erwinia</i>
21	-	+	-	-	+	-	+	+	<i>Erwinia</i>
22	+	-	/	/	/	/	/	/	/
23	-	+	-	-	-	+	+	-	<i>Erwinia</i>
24	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Erwinia</i>
25	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>Erwinia</i>
26	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Panteoa</i>
27	-	+	-	-	-	-	+	+	<i>Erwinia</i>
28	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>Erwinia</i>
29	-	+	+	-	-	+	-	+	<i>Xanthomonas</i> <i>Xylophilus</i>
30	-	-	/	/	/	/	/	/	/
31	-	+	-	-	+	-	-	-	<i>Acidovorax</i> <i>Burkholderia</i> <i>Ralstonia</i>
32	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Erwinia</i>
33	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>Erwinia</i>
34	+	-	/	/	/	/	/	/	/
35	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Panteoa</i>
36	-	+	+	-	-	+	+	-	<i>Panteoa</i>
37	-	+	-	-	+	-	+	-	<i>Erwinia</i>

Source : original, 2014

(-) : résultat négatif

(+): résultat positif

Il ressort du tableau ci-dessus qu'aucun isolat n'a été affilié au genre *Agrobacterium*. Nous avons pu attribuer ces isolats issus de tumeurs de poirier à différents genres bactériens : 15 isolats appartiennent au genre *Erwinia*, 12 au genre *Pantoea* et 2 isolats non déterminé le genre. Et concernant le test DIM, nous avons étudiés l'ensemble des isolats et ne suivent pas la méthode d'élimination des isolats qui possède des résultats négatifs pour les tests avant.

➤ Détermination des biovars :

La Détermination des biovars se fait utilisant les quatre tests suivants: Test PDA+CaCO₃, Test de mannitol-mobilité nitrate, production de 3-cétolactose et test de pectolytique. Par manque de moyens nous avons pu faire deux tests les résultats obtenus sont les suivants :

I.2.9. Test PDA+CaCO₃

Après l'incubation à 48h, nous avons observé sur le milieu PDA additionné à 0.5% de CaCO₃ une production d'un halo clair pour les 19 isolats et aucun changement pour les autres isolats (Figure n°26).



Figure n°26: Résultats de test PDA+CaCO₃ (original, 2014)

I.2.10. Test de mannitol-mobilité nitrate

Après une incubation de 48h, nous avons observé un mouvement des bactéries dans le milieu mannitol-mobilité pour tous les 29 isolats sauf un seul isolat.

Pour la 2^{ème} lecture, nous avons observé un changement de couleur de milieu mannitol-mobilité pour les 23 isolats de couleur rouge à une couleur jaune (isolats mannitol⁺) et pour les autres isolats le milieu reste inchangé (isolats mannitol⁻) (Figure n°27).

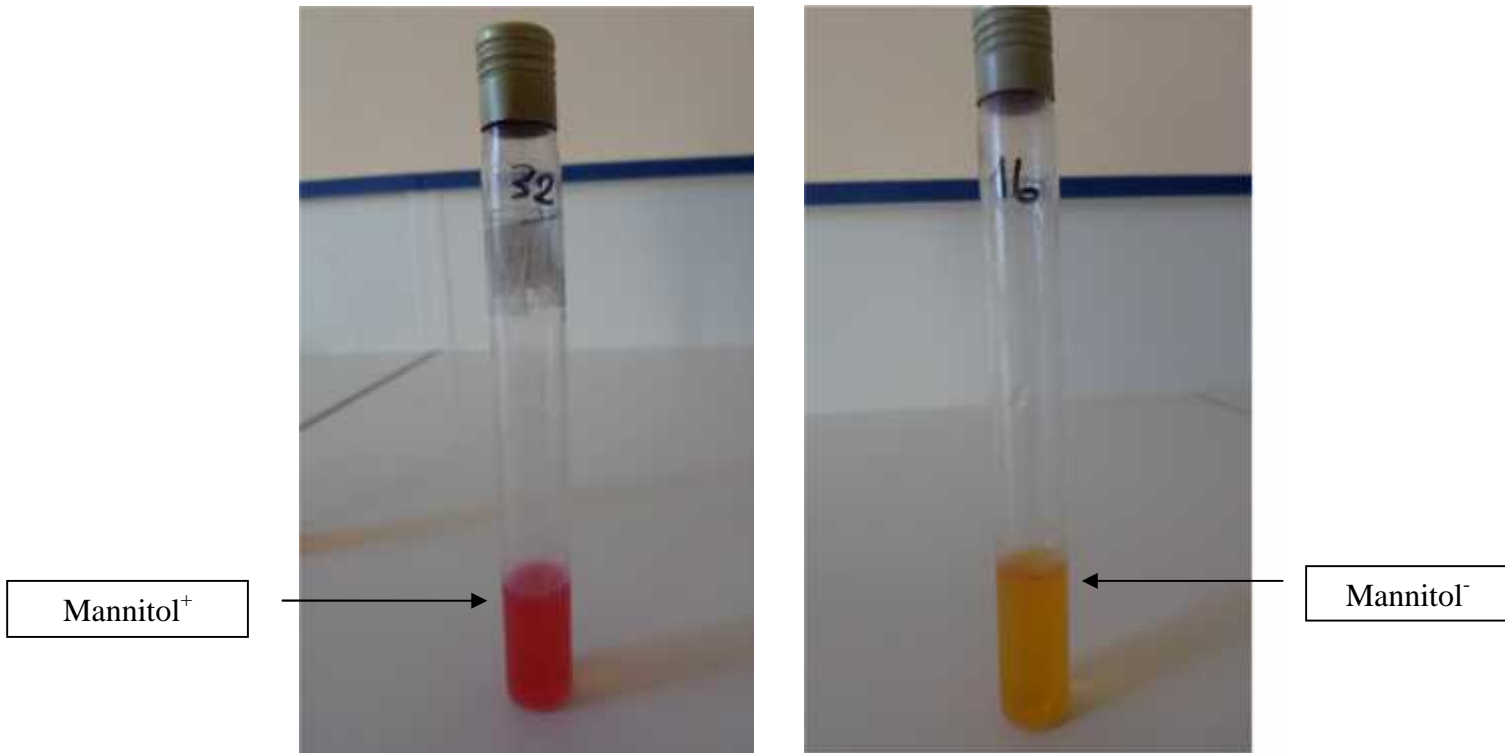


Figure n°27: Résultat de test mannitol-mobilité (original, 2010)

Alors, nous avons ajouté 3 gouttes de nitrate d'acide sulfanilique puis 3 gouttes de d'alpha naphthylamine dans les tubes, et après 5 min le résultat affiche. La réaction positive donnant une coloration orange à rouge brique. (Figure n°28).

L'adjonction de poudre de Zinc sous forme de $ZnCl_2$ va permettre la réduction des nitrates en nitrites et donc de confirmer le pouvoir dénitrifiant des isolats.

I.2.11. Test du pouvoir pathogène

Pour le test du pouvoir pathogène sur les plantules de tomate (*Lycopersum esculentum* Mille cv.marmande) et les plantes de *kalanchoe* (*Kalanchoe daigremantiana*) donné des résultats négatifs pour tous les isolats testés, aucun symptômes n'a été observés sur les deux plantes tests après 3 semaines de la date de l'inoculation.

II. Discussion

Crown Gall est une maladie bactérienne connue depuis l'antiquité, très répandue dans la monde entier (Willian et Milton, 1976 ; Catharine et *al.*, 2007). Elle est capable d'attaquer plusieurs espèces végétales ligneuses et herbacées.

En Algérie, le Crown Gall sévit dans 99% des pépinières de production de plants fruitiers ou importante gamme d'espèces fruitières est atteinte ; pêche (5.39%), amandier (3.43%), cerisier (1.50%), pommier (1.47%), et olivier (1.30%). Si chiffres de cette étude ne paraissent pas assez importants (Bouzar et coll, 1991). Cette situation résulte vraisemblablement de l'intervention de plusieurs facteurs : intensification de l'arboriculture, importation de la porte greffe, absence de variétés commerciales résistantes, mauvaises pratiques agricoles et moyens de lutte inadéquate (Lopez et coll, 1983).

Dans notre travail, l'objectif principal est l'isolement et l'identification de l'agent causal de tumeurs observées sur des rameaux de poirier et la mise en évidence de son éventuel pouvoir pathogène.

L'observation de symptômes spécifiques et leur évolution dans le temps et l'espace est la première étape dans le diagnostic des maladies des plantes. L'état des cultures et sur le terrain sont complexes, différents agents peuvent produire des symptômes semblables, et aussi un seul agent peut produire des symptômes variables selon les circonstances de croissance et de l'environnement. Le diagnostic sera facilité par l'obtention de toutes les informations possibles sur les circonstances entourant l'apparition des symptômes: espèces cultivées et le cultivar, les pratiques culturelles, l'heure des premiers symptômes, le stade de croissance de la plante, de la distribution des plantes malades sur le terrain, etc.

Des tumeurs végétatives semblables celles du "Crown gall", ont été observé sur des plants de poirier au niveau d'une exploitation agricole à Hamda" Laghouat ". Ces tumeurs affectent différents organes aériens de la plante. Il s'agit d'excroissances végétatives plus ou moins sphériques, spongieuses et dont la surface est irrégulière, de tailles variables, elles mesurent de quelques millimètres à plusieurs centimètres de diamètre.

Les symptômes rencontrés sur les plantes de poirier ne permettent pas de déterminer l'agent causal de ces tumeurs car plusieurs bactérioses produisent des galles lorsqu'elles attaquent la plante. Ainsi, une confusion peut être faite entre les *Agrobacterium tumefaciens* et *Pseudomonase savostonia* qui se caractérise par des tumeurs qui peuvent apparaître sur l'ensemble de l'arbre et plus particulièrement sur les jeunes pousses. Ces dernières sont d'abord petites, molles et vertes puis augmentent de volume, se lignifient, durcissent et se crevassent en surface. Après quelques mois, ces galles ou tumeurs acquièrent un aspect spongieux devenant dur et brun gênant ainsi la circulation de la sève et entraînant l'affaiblissement de l'arbre suivi de la mort des branches et des bourgeons (Hosni et al., 2011). Pour ce faire, une analyse plus approfondie est donc, indispensable à la détermination de l'agent causal de la maladie observée.

D'après l'isolement de l'agent Pathogène associé aux rameaux du poirier à partir des tumeurs végétatives sur des milieux de la culture milieu général, semi sélectifs "NKS, MG " et sélectif King B a abouti à l'apparition des différents types de colonies bactériennes. Parmi ces colonies, certaines sont semblables à celles inductrices du crown gall Ces dernières se développées après 48 d'incubation. Ces colonies sont circulaires, d'un contour rond très régulière et son convexes, lisse brillantes, prenant parfois la couleur du milieu d'isolement. Le même résultat a été obtenu par Goszczynska *et al.*, (2000), qui ont indiqué que les colonies des bactéries phytopathogènes apparaissent plus lentement que les colonies des bactéries saprophytes.

D'après le dénombrement des colonies, nous avons remarqué que le taux d' "*Agrobacteriem like bacteria*" au niveau des échantillons de tumeurs végétatives analysés, varie respectivement entre 6 % à 18%. Ces nombres sont très faibles par rapport à la flore bactérienne totale.

Les 37 isolats présentent des caractéristiques morphologiques des "*Agrobacterium like bacteria*". Ces isolats ont été purifiés sur le milieu King B. L'observation microscopique de la coloration de Gram confirme que ces 30 isolats sont des bacilles Gram négatif et les 7 isolats sont des gram positif, ces dernières possèdent une paroi épaisse à deux couches de peptidoglycane qui empêche la dégradation du violet de gentiane par l'alcoolé, donc les germes gardant la couleur violet. Par contre les bactéries de gram négatif possèdent une paroi mince permet la dégradation par l'alcool et recoloration par la fuschine. Ces résultats confirmés par le test le plus rapide KOH. Plusieurs auteurs, dans la littérature, ont montré que

les cellules d'*Agrobacterium* se présentent sous forme de bâtonnets, Gram négatifs et mobiles (Ogawa et Mii, 2005).

La coloration de Gram et la fermentation du glucose ont été des caractères clés pour classer les genres des bacilles à gram négatif non fermentaires.

Le test de Hugh et Leifson c'est un test qui précise l'aérobiose ou l'anaérobiose des bactéries. Nous avons utilisé le milieu Hugh et Leifson qui possède un indicateur d'acidification c'est le bleu de bromothymol, ce dernière devient jaune pour les bactéries actives (la dégradation du glucide qui libère des acides et éventuellement des gaz).

Dans notre travail, le résultat obtenu par ce test est négatif pour les 30 isolats, 2 isolats ont donne des réactions négatifs en condition anaérobique (gardent la coloration vert). Ce sont des souches aérobies strictes et les restes donnent des résultats positifs (devient jaune). Le résultat obtenu par le test de catalase montre que 22 isolats ont une réaction positive ce qui indique une destruction de peroxyde d'hydrogène et libération d'oxygène (Reynolds et Richland, 2011). Par contre nous avons 08 isolats ont une réaction négative donc ces bactéries n'ont pas un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes.

Les *Agrobacterium* sont définis comme étant des microorganismes aérobies (Davoodi et al., 2013 ; Freney et al., 1985).

La comparaison entre le test de catalase et la croissance en anaérobiose montre que ces deux tests ont des résultats dans le même sens, de plus ils ont des mêmes résultats puisque ces deux test ont permis de sélectionnée 2 isolats (souches catalase positive et aérobies stricte).

D'après le test oxydase nous avons trouvé que toutes les souches testé 13 pouvant donner une réaction positive donc ce sont des microorganismes hétérotrophes qui ont l'aptitude d'utiliser une gamme étendue de composés organique (Latour et Lemanceau, 1997). Contrairement aux espèces oxydase-négative qui sont toutes phytopathogènes. (Misaghi et Grogan, 1969; Palleroni, 1984).

Après l'ensemencement sur le milieu King B, n'a été observe aucun production de pigment fluorescent diffusible dans le milieu, en-conséquence, ces bactéries ne sont pas produit pas la pyoverdine (Lelliott et al., 1966 ; Palleroni, 1984 ; bultreys et al., 2003). Le milieu King B est considéré comme sélectif pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents (King et al., 1954).

Le test d'YDC basé sur la production par les bactéries de pigmentation jaune sur ce milieu, nous a permis d'éliminer les *Xanthomonas* qui ont la faculté de produire ce pigment. D'après ce test 10 isolats ont été éliminés.

Et concernant le dernier test dans le schéma de détermination des différents genres bactériens proposé par Schaad (2001). Le milieu DIM, si l'*Agrobacterium* seul que se croit sur ce milieu nous a montré que les 2 bactéries fermentatif n'ont pas pu croître sur ce milieu à base de Cellulose.

D'après les résultats de l'identification des genres basée sur le protocole de Schaad, aucun isolats testés n'a été affilié au genre *Agrobacterium*. Nous n'avons pas pu aller jusqu'à la détermination des biovars vu que ces isolats n'ont pas été attribués au genre *Agrobacterium*.

Et par ses tests biochimiques d'identification les genres nous avons trouvés les genres suivants : sont *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Xylophilus*, *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pantoea* et *pseudomonase* et la colonisation de ces genres les tumeurs végétatives logique puisque ces genres sont des bactéries endophytes.

Un test de pathogénicité a été parallèlement réalisé dans l'objectif de vérifier le pouvoir pathogène utilisant des plantules de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mille cv. marmande) et des plantules de *kalanchoe* (*Kalanchoe daigremantiana*). Après 3 semaines de l'inoculation artificielles, ces plantules n'ont pas développé aucun symptôme ou des tumeurs végétatives similaires à ceux, observés au niveau de l'exploitation agricole. Donc nos isolats testés ne sont pas des isolats pathogènes.

Les *Agrobacterium tumefaciens* exige des conditions climatiques favorables dont la température optimale pour son infection se situe entre 20 °C et 31 °C. Cependant nos résultats obtenus permettent de dire que les conditions dans lesquelles notre expérimentation ne permet pas le développement de ces tumeurs (Moore et al., 2002).

Et concernant les conditions de nos études ne sont favorables pour nos bactéries étudiées

Conclusion

Le poirier (*pyrus communis* L.) de la famille *rosacée*. Est l'un des fruits populaires dans le monde entier. En revanche, sa culture a été limitée et affaiblie par une panoplie de maladies microbiennes d'origines variables. La galle du collet dont l'agent pathogène est *Agrobacterium tumefaciens* est parmi les bactérioses aériennes les plus courantes.

L'isolement réalisé à partir des tumeurs végétatives du poirier a permis d'obtenir des différents types de colonies bactériennes ayant "*Agrobacterium like bacteria*". Les différents tests morphologique et biochimique ont montré que les souches isolées ne relèvent pas de l'espèce *Agrobacterium tumefaciens*.

D'après le test de pathogénicité effectué sur les plantules saines de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. marmande) et sur les limbes de kalanchoe (*Kalanchoe daigremontiana*) ne donne pas des symptômes semblables aux symptômes observés sur l'exploitation agricole, donc tous les isolats étudiés sont non pathogènes.

Au terme de cette ébauche, nous avons jugé utile de se fixer certains points comme objectifs à développer :

L'observation de symptômes spécifiques et leur évolution dans le temps et l'espace est la première étape dans le diagnostic des maladies des plantes mais n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique totale et précise.

Les résultats obtenus dans ce travail sont des résultats préliminaires. Nous suggérons de refaire le test de Hugh Leifson et en plus nous suggérons de faire la détection d'autres agents causaux des maladies par d'autres isollements et d'autres analyses. Pour trouver la cause principale de l'apparition de ces symptômes dans cette région chaude.

Ainsi que, l'étude des facteurs de développement de l'agent causal influencés sur la détermination de l'interaction plante-pathogène et microorganisme -l'environnement (facteur climatique et édaphique) comme les caractéristiques physico-chimiques du sol, l'humidité du sol, température...etc.).

Référence bibliographique

- Adalia Astal.2005. les maladies des nos arbres.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada. 2007. La sélection des poires.
- Agriculture, pêcheries et alimentaire.2011.Tumeur du collet dans la framboise.3p.
- Alain, M., Trillut.M1991.le poirier .ed. centr technique inter professionnel des fruits et légumes .paris .217p.
- Ashby,A.M.,Watston,M.D.,et al.1988.Ti plasmids specified chemotaxis of *agrobacterium tumefaciens* C58 C1 toward vir .inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotylonous and dicotyledonous plants.J. bacterial.n°170, p: 4181-4187.
- Auber,B.,Fournies,F.,Scotto la Massese,C., et Faivre-Amito,A.1983.un cas de galle sur racines de vitis vinifiere a accassionnées par un complexe aèmatodes.crown gall .fruits.n°38 ,P :8276-830.
- Bazzi,C., and Mazguchi U.1978. Biological contol of grown gallon sweet cherry, myrobolan and peach in Italy. Proc. 4th Int conf. plant. Bact.Angers, France,p:251-254.
- Beijerinck, M.W., and van Delden, A.1902. Uber die assimilation des freien sticks toffs durch Bakerien. Zentralblatt fur Bakteriologie, parasitenkund, infektionskrankheilen and hygiene Abteilung II.n°9, p: 3-43.
- Beneddra, T., Petit, A., Picard.c., Nesme, x.1996. Correlation between sensceptibility to grown gall and sensitivity to cytokinine in aspen cultivar. Phytopathol. n°86, p:225-231.
- Bevan M.1984.Binary, A.vectorsfor plant transformation.nuc acres.n°12, p:8711-8721.
- Bouchier, R.2004.biocontrol des plants.
- Bourgault,A.M.and Lamothe,F.1988. Evaluation of the koh test and the antibiotic disk test in routine clinical anerobic bacteriology .j.clin.microbiol.n°26, p: 2144-2146.
- Bouzar,h.,and j
- Jones, J.B.2001.Agrobacterium *larryomorrei* sp.nov,a pathogen isolated from a eveal tumors of ficus benjamina .int.j.syst.evalu.microbiol.n°51,P:620-627.
- Bouzar,H.,and Moore,L.W.1987.isolation of different agrobacterium biovar from an natural oak savanna and talgrass prairie .appl.enivon.microbiol.n°,p:717-721.

- Bouzar, H., Chilton, W.S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J.B., and Hodge, W. 1995. A new agrobacterium strain isolated from aerial tumors on *fucus benjamina* l. *appl. environ. microbiol.* n°61, p: 65-73.
- Bovey, B. 1972. La défense des plantes cultivées : *traité pratique de phytopathologie et de zoologie agricole*. 6^{ème} ed. paris. payot lausaure.
- Bradbury, J.F. 1986. Guide of plant pathogenic bacteria. ferry lane, kwe, surrey, England .C.A.B international. 332p.
- Braum, A.C. 1952. Conditioning of the host cell as a factor in the transformation process in grown gall. *Growth.* n° 16, p:65-74.
- Bultreys, A., Ghisen, I et al. 2003. High performance liquid chromatography analyse of pyoverdine siderophores différentaire among phytopathogenic fluroscent pseudomonase species .*applied and environnement microbiology* .n°62.vol 2.p:1143-1153.
- Bun, T.J., and katz, B.H- 1983. Isolation of Agrobacterium biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vinegard soil. *Phytopatho.* n°73, p.163-165.
- Bundock, P., and HooKaas, p. 1988. Interaction between A-T and plant cells., p. 207-229-in : Romeo, J,T-, Downum, K.r., verpoort, R. (ed). *Phytochemical signals and plant- microbe interactions* plenum press, New York, (N.Y).
- Catharine E. white and Steplen C. Winans. 2007. Cell-cell communication in the plant pathogen A-T. *Philosophical transactions of the royal society*, 13 March 2007, n°362, P:, 1135-1148.
- Cazelles, O., Hasler, T. Tumeur bacterienne du collet et des racines.
- Centre de la propietat forestal. 2007. Le poirier (*pyrus communis*) et le pommier(*Malus sylvestris*) à bois. 47p.
- Characterization of agrobacteria from weeping fig. *Plant pathol.* n°50, p: 620-627.
- Christire, P.J. 1997. The Agrobacterium Tumefaciens T-complex transport apparatus : aparadigm for a new family of multiphcahonal transporters in eubacteria. *J.Bacteriol.* n°:179, p: 94-3085
- Chyveau, X. 2001. Les raffinements sexuels d'une bacteria du sol au service du génie génétique – *medicine science.* n°17, p : 856-866.
- Cigeux, C., Gacin, A. 2005. L'abroriculture biologique: *etat des lieux de la conservation* .ctifle. 90p.

- Citovsky, V., Wong, M.L., et Zambryski, p.1985.conoperative interaction of agro bacterium vir E2 protein with single-stranded DNA: *implications for the T-DNA transfer process, proceeding of the nationnal academy of sciences*, n°: 86, p:1193-1197.
- College of Agriculture, consumer and environmental sciences .1999. Report on plant disease.
- Conn,H.J.1942.validityo the genus alcaligenes .j.bacterial.n°44,p:353-360.
- Crroyer. N., Lib ovrel.G.2000. Le poirier en biologique
- Davoodi,A.,Hajivand,SH., et al .2013. Isolation of agrobacterium tumefaciens strains from crown gall disease on imported roses plants in qazuin .*journal of ornamental and horticulturalplants* .6 may 2013.n°3, vol2, p:117-124.
- De Cleene, M.1985. The susceptibility of monocotyledons to agrobacterium *phytopathoogische zeitschrift*. n°113, p: 81-89.
- De cleene,m.,and De Ley,J .1976. The hoste range of crown gall .*botanical review*.n°42, p: 390-466.
- Desvignes,J.,C.1999.maladies à virus des arbres fruitère : *maladies à viroides à phytoplasme et autres agents infectieuse* .ctifl.p :160-167.
- Efficacy of different Agrobacterium strains in transformation of pineaceous gymnosperms .*Physiol.Molecul. Plant . Pathol*. n°34,p: 451-461.
- Elarbi,M., Rhooma, A et *al*. 2013. Première observation de la maladie de la galle du collet causée par A-T sur l'olivier en Tunisie. *Canadian journal of plant pathology*, 30, november 2013, n°, 33, p:458-464.
- Ellis, J-G, Ken, A., et *al*.1979. Arginine catabolism : *a new function of both octopine and nopaline Ti plasmids of Agrobacterium*. *Mol Gen Genet*. n°.173,p:263-269.
- Ellis, M.A.2008.Bacterial Grown gall of fruit Grops
- Farkas, E., and Hass, J.H.1985. Biological control of crown gall in rose nursery stoch. *Phytoparasitica*.n°.13, p: 121-127.
- Farrand, S.K.,Ryder,M.H., et *al*.1987. Genetics and molecular biology of agrocin production and sensitivity in agrobacterium. *Cun.plant.sciences. biotechnol. Agric*.n°4, p; 42-55.

- Filichkin, S.A., and Cielvin.1993. Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* vir D1,D2 endonuclease. *Mol microbial*.n°8, p: 915-926.
- France agrimer.établissement national des produits de l’agriculture et de la mer .2009. Bilan de la campagne.
- Gelvin,S.B .1992.Chemical signalling between agrobacterium and its plant host, p.137-167.in :Verm,D.P.S.(ed),*molecular signals in plant microbe commuication* .C.r
- R.C.press,boca raton,fla.
- Gelvis, S.B.2000.A and plant genes involved in – TDN transfer and integration amm.plant physiol. *Plant mot. Boil.* n°51, p:223-256.
- Genetello,C.,Van Larebeke,N,et *al*.1977. Ti plasmids of agobacterium tumefaciens as conjugative plasmids .*nature, london*.n°265,p:561-563.
- Goodner B., Hinkle G., Gattung S., et *al* .2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent A-T C 58. *Science*.n°294,P: 2323-2328.
- Goszycznska,T., Serfontein,J,J., et *al* .2000. A safrine manuel for phytobacteriology : *introduction to practical phytobacteriology*.1^{ère} éd. layout,design,technical editing &production .50p.
- Guide technique. Creation et conduit d’un verger de pommier .ITAE.tessla e merdja birtouta. Alger.119p.
- Hartman, J, E., Henaur,B. plant pathology fact sheet. crown gall.
- Hass,J.H.,Moore,L.W.,Ream,W.,and Manolis ,S.1995. Universal pcr primers for detection of pytopathogenic agrobacterium strains.*appl.environ.microbiol*.n°61, p:2879-2884.
- Holn ,H.,Bunter,M et *al*.2013. Guide phytosanitaire pour l’arboriculture fruitière .
- Holsters,M.,Silva,B., et *al* .1983. Analysis of the boundaries of the octopine and-t in tumors induces by agrobacterium tumefaciens. *Mol.gemet*.n°190, p.35-41.
- Imazeki, R.1960. Introduced diseases wiyh particulas attention to the threat the pose forest protection in Asia.*proc.5th worled.for.congr.seattle.U.S.A*.
- INRAA.2006. descende rapport national sur l’état des ressources phytogénétiques .30p.
- INRAA.2006.rapport nationale sur l’état des ressources phylogénétiques pour l’alimentation et l’agriculture.

- Interreg,2011. Arboriculture bio-maladies: *tavelure sur poirier*.
- Jean, B., Faure.Y.1991. Atlase d'arboriculture fruitière (poirier,pommies ,nashe).technique de documentation .l'avoisier,paris,207p.
- Kado,C.I. 2000. The role of the T- pilusin Horizontal gene transfer and tumorigenesis. Cunent opinion Microbiology.n°3, p:643-648.
- Kalogeraki, V.S., and Winans, S.C.1998.Wound released chemicals signals may elicit multiple repanse from an A-T strain contanning an octopine type Ti plasmid. J.Bacteriol.n°180, p :5660-5667.
- Katan,J., creenberger, H.A., and Grinstein, A. 1976. Salar heating by polyethelene mulching for the control of disease caused by soil.*Borne pathogen*. Phytopathol. n°66. 683-688.
- Katan.J., and Devay, J.E.1991.Soil solonization. Boca Ratam. Florida: CRC press, Inc.
- Ken,A., and Htay,K.1974. Biological control of crown gall through bacteriocin production physiol. Plant pathol.n°4, p.37-44.
- Kersters, K., and Deley, J.1984. Genus III- Agrobacterium comm..1942.p.244-254. In: Krieg N,R., and Holt, J.G.(ed) *Bergrey mauvel of systematic Bacteriology*, vol1. Willians et Wilkins co., Baltimore
- Khalaif, H., 2001. Rapport d'activités. Dans le rapport final du projet INCO-DC. P.77.89.
- Klement, Z.1990. Methode in phytopathology.ed.printed in hungary.568p.
- Krimi,Z.1990.la lute biologique contre la grown gall en Algérie: efficacité de la souche bactériocimogène k 84 et isolement de nouveaux antagonistes bactériens. Thèse de magistere.I.N.A. Alger .97p.
- Krimi,Z. 2003. Persistance du plasmide ti d'agrobacterium dans le sol et son stabilite in situ et in vitro.thèse de doctora d'état ES.sciences .université a boubek belkaid telmecen Algerie .
- Lacroix, M.2003. La Tumeur du collet: une maladie du sol qu'il faut savoir prévenir.
- Lacy,H.G., Hansen.M.A.2009.Grown gall of woody ornometals
- Lai, E.M., and kado, C.I. 2000. The T-pilus of A.T. Trendsmicrobiol. n°8, p: 361-365.
- Laure,P.2004. Les poires .paris.p :80-82.

- Lelliott,R.A.,Billing,E et Hayward,A.A.1966. A determinative scheme for the flurescent plant pathogenic pseudomonase .journal .app.bacteriel.n°29,p:470-489.
- Li, l., Jia, X. et al. 2002. Aglobal pH sensor : *A sensor protein chvG regulates acid-inducible genes onits twochromosomes and T, plasmid*. PNAS. n°99, p: 12369-12374.
- Lopez,M.M.,Gorris,M.T.,Tempranol et al .1987.resultats of sewen years of biological control of agrobacterium tumefaciens in spain .bull.oepp/eppo bul.n°17,p:273-279.
- Luisetti.J.,gaignardjl.pseudomonase syringae bactérie èpiphyte ,glacogène et pathogène .pathologie vègètal (synthese),20 fèvrier 1993,n°13,p :337-345.
- Masseron,A.,et Trillot,M.1991. Le poirier: ctifl. p: 100-111.
- Matin,A.,Auger,E.A et al. 1989. Genetic of stravation survival in modifferentitaing bacteria. Annu. Rev. Microbiol.n°.43,p. 293-316.
- Meyer, A-D., Aebi, K., and Meins, F. J.R.1997. to bacco plants canging atms pocus of Tiplasmid origin.
- Michel ,C. 2010. étude du comportement de divers cultivars de poirier a l'inoculation avec differents inocula de venturia pirina .ed.(INRA,agrocapus,universiè d'angers).31p.
- Ministère de l'Agriculture et de la pêche Maritime Agriculture. 2009. Les ravageurs des arbres fruitiers : *le psylle du poirier*.
- Moore L.W., Allen J. 1986. Controlled heating of root- pruned dormant prunus spp. Spp. Seedling before transplanting to prevent crown gall. Plant dis. n°70,p.532-536.
- Moore, L.,W., Boozar,H., and Borr, T. 2001. Agrobacterium. In : schaad, N.W., Jones, J.B., chun, W. *laboratory guide for identification of plant pathogenic Bacteria*, thid edition, Aps press, st parl, USA.
- Moore,L.M. 1988. Use of agrobacterium radiobacter in agricultural ecosystem. microbiol. sciences.n°15, p: 92-95.
- Moore,L.W. 1976. Latent infections and seasonal variability of crown gall development in seed lings of three prumus speicies.phytopath.n°66,p: 1097-1101.
- Moore,L.W., and Cooksey, D.A. 1981. Biology of *Agrobacrerium tumefaciens* : plant interactions.Int . Rev. cytol.13: 15-46.
- Moore,L.W., and Warren, S.1979. Agrobacterium radiobacterstrain 84 and biological control of crown gall. Ann. Revphytopathol.n°.17, p. 163-179..

- Morris, R.O. 1986. Genes specifying auscin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Ann. Rev. plant physiol.* n°37, p: 505-538.
- Morris, J.W., Castle, L.A., and Morris, R.O. 1989. Of *Agrobacterium tumefaciens* to canot suspension culture cells. *Bacteriol.* n°174, p:5999-6003
- Nesme, X., Beneddra, T. et Collin, E. 1990. Importance du Grown gall chez les hybrides *Populus tremula* L x *Populus alba* L les pépinières forestières.
- Nesmes, X., Michel, M.F., and Digat, B. 1987. Population heterogeneity of A-T in galls of *Populus L.* from signale nursery. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 655-659.
- Nestre, E.W., Cordon, M.P., et al. 1984. Crown gall : a molecular and physiological analysis. *Ann. Rev. plant physiol.* n°35, p:279-287.
- New, B., Ken, A. 1972. Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *J. Appl. Bacteriol.* n°39, p:233-236.
- Ogawa Y., and Mii, M. 2005. Evaluation of 12 beta-lactam antibiotics for *Agrobacterium* mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxins. *Plant Cell Rep.* n°23, p:736-743.
- Ogawa, Y., Echikawa, K. et Mii, M. 2000. Highly tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strain from crown gall tumors of chrysanthemum. *Archives of microbiology.* n°173, p: 311-315.
- Ophel, K., and Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. fur strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* n°40, p: 236-241.
- Orian D., and Zootra, D. 1970. The importance of the rootknot nematode to the penetration of A.T into almond roots. *Hassadeh* 50, p : 939-940.
- Pee, Y.W., Jin, S et al. 1995. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the vir A protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* n°92, p:12245-12249.
- Pillion V. 2013. Feu bactérienne sur poirier et pommiers. 1p.
- Pionnat, S., Keller, H., et al. 1999. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated spread of crown gall disease in Mediterranean countries. *Appl. Environ. Microbiol.* n°65, p:4197-4206.
- Palleroni, N.J. 1984. Genre 1 *Pseudomonas* migula. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Krieg et Holt. vol 1, p:141-155.
- Poneet, C., Anatomini, C, Bettachimi, A., Hericher, D., Pionnat, S., Simonini, L., Dessaux, Y., and Nesme, X. 1996.

- Poudyi.W., Skiredj A. 2003. L'abricotier, le prunier, le poirier et le pommier.
- Raio,A., Zaina.A., and Moore, L.w.1998. Poss of agrobacterium T.tumor induing plasmid in solarized soil. Iobc bull. n°21, p: 320-328.
- Raio,M.,Zoina,a., and Moore,W.l.1997. The effect of solar heating of soil on naturel and inoculated agrobacteria .
- Rateur.M., Lannoy.V.2003. La rouille griallagée du poirier
- Raynand ,N. 2008. La carte d'identité de la poire.
- Ream,W. 1989. Agrobacterium tumefaciens and interkingdom genetic exchange .ann.rev.phytopatol.n°27,p: 583-618.
- Région centre .2011.Diagnostic filière fruits .règion centre .17p.
- Rhouma,A. 2006. Recrudescence de la galle du collet des arbres fruitiers: caractéristique biochimique et moléculaire des isolats, epidemiologie et possibilité de lute biologi. Thèse de doctorat en science agronomique , INAT, Tunisie p.176.
- Riker,A.j.,Banfield,W.M. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple tress.j.agr.res.n°41,p: 507-540.
- Riley ,RS., and Weaver,R.E. 1976. Comparision of the thirty-seven strains of vd-3 bacteria with agrobacterium radiobacter:clinical microbiology.16 septembre1976.n°2,vol 5,p:172-177.
- Rougieux.e.2000. La productio, fruitière .12p.
- Schaad,N.W.,Jones,J.B et Chun,W. 2001. Intial identification of commun genora .in :Schaad,N.W. ed .lab. *Guide for identification of plant pathogenic bacteria* .2nd,ed.st. paul,m.n.aps.press.p:1-15.
- Schell, J.1975. The role of plasmid in crown gall formation by A.T.in: pedoux, L., genetic manipulation with plant materials Newyork: plenum, p.601.
- Schim,J.S., famand, S.L., and Ken,A. 1987. Biological control of crown gall: *construction and testing of new biocontrol agents phytopathol.* n°77, p: 463-466.
- Schrammeijer B., Dulk- Ras., et al. 2003. Analysis of vir protein translocation from Agrobacterium tumefaciens using saccharomyces cerevisiae as a model : *evidence for transport of a novel effector protein vir E3*, Nucleic Acids Reserch, n°31, p: 860-868.
- Schroth, M.N., Wein bold, A.R., Mcain, A-H., Hildebrand, D.C., and Ross, N. 1971. Biology and control of A-T. Hilgardin.n°40, p: 537-552.

- Shams,M., compillo,T., Lavire, C et al . Rapid and efficient methods to isolate , Type strains and determine species of Agrobacterium ssp. *In pure culture and complex environments*
- Sheng,J., and citovsky, v. 1996. Agrobacterium-plant cell DNA transport: *have virolence proteins, will travel*. Plant cell.n°8,p. 1699-1710.
- Sielaszko,W. 1929. Phytopathologische beobabacetetnger in polen .centralbl .fur bukt .abt.n°2,p :113-116.
- Smith, E.F., and Townsed, C.O.1907. A plant tumor of bacterial origin. Science.n° 25,P: 671-673.
- Soriful.M.I., Munsina. A., Rahman A.Metal.2010. Isolation of Agrobacterium tumefaciens strains from Grown gall sample of dicot plants in Bangladesh. Current research in Bacteriology.n° 3,vol 1,P: 27-36.
- Stachell,S.E., Messens, E., et al .1985.Identification of the signal moleculs produced by wonded plant cells with activate the T-DNA transfer process in A.T. Nature.n°318, p:624-629.
- Stapleton, J.J., and de vay, J.E.1968. soil salarization: *a non- chemical approach for management of plant pathogens and pests-crop protection*. n°5, p.190-198.
- Suo,Y., et leung, D.M.W.2001. Induction of resistance to diplocarparrosae and A.T.by acid enzolar-S- methyl(BTH) in rose. Zeitschrift fur plolamzenkran kheiten and pflanzenschutz.n°108, vol 4, p. 382-391.
- Winans, S.C.1992. microbial Rev.n° .56, p.12-31.
- Wood, D.W. et Coll. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens C58*. Science. n° 294, p: 2317-2323.
- Tempé, J.1978. Les transferts de gènes chez les plantes C.R.SOC. Biol., n°181 ,P : 597-603.
- Tempè,J,andCasse-Delbart,f. 1989. Cell culture and stomatic cell genetics of plants. in : Schell,J.,and Vasil,i.K.(ed).n *molecule biologicalof plant nuclear genes*. n°6, p:25-49.acaderci press san sieg.
- Tempè,J.,Estrade,C.,and Petit, A. 1878. in : proc. 4thint. conf . plant pathol. bacteriol. ride. M.ed. INRA-Angers. p:153-160.

- Tepfer, d.a.1989. plant microbe interaction in:kosuge,T.,Nester,E.W.,(ed) *.moleculaire and genetic perspectives.*
- Tzfira ,t.,and citvosky,v.2000. From host recognition to ADN-T integration the function of bacterial and plant gens in the agrobacterium-plant cell interactionmol.plant pathol.n°1 , p:201-212.
- Valentine I. 2003. A-T and the plant: *the David and Goliath of modern genti as plant physiology.*133: 948-955.
- Vanderweyen. A. 2002. Gymnosporangium sabinae, la rouille grillagée du poirier. *Cercle de mycologie de bruxelles.* n°2, p :65-80.
- Vergunst,A.C., Vanlier, M.C., et al.2003. Recognition of the A.T vir E2 translocation signal by the vir B/ D4 transport system does not require vir E1, plant physiology, n°133, p:978-988.
- Vergunst,A-c., Schrammeijer B.,et al.2000. vir B/D4 – dependent protein translocation from agrobacterium into plant cells. *Science.* n°290, p:979-982.
- Vicedo,B., penaluer, R., et al.1993. Biological control of A-T control of A-T colonization, and pag k84 Transfer with A. radio bacter k 84 and the tra-mutant strain k 1026. *Appl. Environ. Microbiol.*n°59, p.305-315.
- Viss, W., Humann, J.L., Cook, M., Driver, J., and Ream, W.2003. Crown gall. Resistant transgenic apple trees that silence A.T oncogenes. *Molecular Breeding .* n°12,p: 283.295.
- Wagner, V.T., and Matthy,A.G. 1992. Involvement of a vitronectin-like protein in attachment
- Wang, H.M., Wang, H.X., et Li, J.Y.2003. Purification and characterization of antibacteriol compound produced by Agrobacterium vitis strain E26 with activity against A-T. *Plant. Pathology.*n°.52, p.134-139.
- Weidner,M.,Fureland,G. 2003. La transgense grace à agrobacterium tumefaciens.
- White, F., and Nester, E.1980.Hairy root: plasmider encodes virulence traits in Agrobacterium rhizogenes. *J. bacterial.*n°.141, p.1134-1141.
- Willems, A., and Collins, M.D. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria base don 16s ARNr gene segences. *Int. J. syst. Bacteriol.*n°.43, p.305-313.
- Woese, C.R. , stackebrandt, E., et al. 1984. The phylogeny ol, purpul bacteria : the alfa sibdivision. *Syst. Appl. Microbial.* n°5,p: 315-326.

- Young, J.K., Kuykendall, D.L., *et al.* 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998. As new combinations : *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *R. undicola*, *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* n°51, P: 89-103.
- Zaenen, I., Vanlarebek, N., *et al.* 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* n°86, p: 109-127
- Zambrysk, P.C. 1998. Base processes underlying *Agrobacterium* mediated DNA transfer to plant cells. *Ann. Rev. Genet.* n°22, p. 1-30.
- Zhuji., Oger, P.M. *et al.* 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* n°182, p: 3885-3895.
- Zoina, A., Raic, A., Peluso, R., and Spasiano, A. 2001. Characterization of *Agrobacterium* from weeping fig (*Ficus benjamina*). *Plant Pathol.* n°50, p: 620-627.
- Zupan, J., Muth, T.R., *et al.* 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants : *A feast of fundamental insights*. *Plants*. *J.* n°23, p: 11-28.

Annexe

Milieu King B

Protéose peptone	20g
K ₂ HPO ₄	1.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1.5g
Glycérol	15 ml
Agar	18 g
Ph=7.2	

Milieu LPGA

Extrait de levure	5g
Bactopeptone	5g
Glucose	10g
Ph=7.2	

Milieu N (Nutriment Glucose Agar)

Saccharose	5g
Nano3	2.5g
K ₂ HPO ₄	0.1g
Na cl	0.2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
Fe EDTA	2ML
Agar	18g

Après autoclavage à 120°C pendant 20 min, laisser refroidir puis ajouter au milieu Cycloheximide à 2% 1ml.

Sodium sélénite à 1%	1ml
----------------------	-----

Biotine à 20 g/l	1ml
------------------	-----

Milieu MG (mannitol-Glutamate)

Mannitol	10g
----------	-----

L(-) acide glutamique	2g
-----------------------	----

KH ₂ PO ₄	0.5g
---------------------------------	------

Nacl	0.2g
------	------

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
---------------------------------------	------

Extrait de levure	1ml
-------------------	-----

Agar	18g
------	-----

Tellurit de potassium

Hugh et Leifson

Bactopeptone	2g
--------------	----

NaCl	5 g
------	-----

K ₂ HPO ⁺	0.3g
---------------------------------	------

Bleu de promothymol	1% :3 ml
---------------------	----------

Glucose	10 g
---------	------

Agar	3 g
------	-----

Ph = 7.1

Milieu YDC (Yeast Dextrose Carbonate de Calcium et Agar)

Extrait de levure	10g
-------------------	-----

CACO ₃	20g
-------------------	-----

Glucose	20 g
---------	------

Agar	18g
------	-----

Ph =7.2

Milieu PDA+caco₃

Agar	20 g
Glucose	20 g
Pomme de terre	200 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 7	