
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la
Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaïb d'Aïn-Témouchent



Institut des Sciences

Département des Sciences de la nature et de la vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Sciences biologiques
Option : Microbiologie appliquée

Présenté par :

Melle. **ZENASNI Amina**

Isolement des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents
rhizosphériques à partir de sol agricole et évaluation de leur rôle
dans la croissance végétale et le biocontrôle des
phytopathogènes

Encadrant :

M. BAKLI Mahfoud

Maître de conférence "B" à C.U.B.B.A.T.

Soutenu le 18/06/2018

Devant le jury composé de :

Président : M. AMARA Mohammed (M.C.A) C.U.B.B.A.T.

Examineur: M. BENYAMINA Sofiane Mourad (M.C.B) C.U.B.B.A.T.

Encadrant : M. BAKLI Mahfoud (M.C.B) C.U.B.B.A.T.

Remerciements

En préambule à ce projet, nous souhaitons adresser tous nos remerciements au bon Dieu "ALLAH" qui nous a donné la santé, l'a volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé

Ces quelques lignes vont me permettre de remercier les responsables et personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail soit au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui, mon travail n'aurait pu aboutir.

J'adresse ma gratitude et je remercie Monsieur Bakfi Mahfoud qui a dirigé ce travail, ça ne sera pas suffisant pour lui exprimer toute ma grande reconnaissance pour la confiance, la disponibilité, la générosité et le grand soutien qu'il m'a accordé pour faire aboutir ce travail.

Je suis très honorée par la présence de Mr Amara Mohammed pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de mon mémoire, qu'il trouve ici mes vifs remerciements.

Mes remerciements sont aussi adressés au membre de jury Mr Benyamina Sofiane Mourad qui m'a fait l'honneur en acceptant d'examiner ce travail et qu'il accepte ici mes sentiments de gratitude.

J'adresse un remerciement particulier à Mme Lachachi et Monsieur Mouedden pour leurs aides, ses précieux conseils avisés. C'est avec plaisir que je eux témoigne toute ma reconnaissance sans oublier leur gentillesse, leur sympathie et leurs encouragements.

Je remercie aussi mes amies les étudiantes Nadia et Ibtissem pour leur encouragement durant toute la période de la réalisation de ce modeste travail.

Je remercie aussi mes collègues de travail au lycée « Abou Bakr Belkaid » à Ain Tolba, en particulier ma chère Sirine

Enfin, à tout ceux et celles qui de près ou de loin ont apporté leur modeste contribution sans citer les noms !



Dédicaces



Je dédie ce travail :

*A la mémoire de ma mère que l'absence
n'exclue pas sa présence en moi, que dieu
l'accueille dans son vaste paradis.*

*A mon très cher Papa qui m'a toujours soutenu, que dieu le garde pour
moi,*

*A ma sœur : Amel, et toute ma famille qui m'ont toujours encouragé au
cours de la réalisation de ce mémoire, Cette réussite n'aurais jamais vu le
jour sans l'appui moral et intellectuel des membres de ma familles et mes
amis*

A mes princesses : Allaa et Amani

*A ma grand-mère, je te dis : je t'aime énormément que dieu te garde pour
moi*

*Mes camarades de formation pour tous ces agréables moments passés
ensemble. Touts ceux et celles que j'ai rencontré et qui m'ont aidé durant 5
ans des études universitaires.*

*Mon enseignante Mme LACHACHI, votre encouragement je ne serais pas
arrivée à atteindre mes objectifs et d'avoir l'envie de continuer mes études.*

Merci à tous et à toutes.

Amina

Résumé

19 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents ont été isolées à partir des racines et sols rhizosphériques de blé dur et d'orge de différents biotopes, ces souches ont été criblées *in vitro* pour leur activité promotrice de la croissance des plantes et de biocontrôle contre *Fusarium oxysporum*. A partir d'un bio-test *in vitro* de *Lactuca sativa*, 8 souches ont été sélectionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance végétale (PGPR). D'après des tests macroscopiques, microscopiques et physicochimiques, les souches ont été affiliées aux espèces *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* et *P.putida*. Ces souches ont été testées pour leur capacité à produire des enzymes d'intérêt agricole, les souches OD11, FR14, FR24, FR13 ont été toutes productrices des protéases, amylases, lipases. Tous les isolats ont été étudiés pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis *Fusarium oxysporum* par la technique de culture duelle. FR14 et FR15 ont montré une inhibition importante de la croissance mycélienne avec un pourcentage d'inhibition de 52,72% et 41,81% respectivement. Deux métabolites antifongiques (phénazines, pyrrolnitrines) ont été extraits à partir des cultures des souches FR14 et FR15, par l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM). Les valeurs R_f obtenus variaient de 0,6 à 0,62 pour les PHZ et absence des PLN. Les extraits phénaziques ont été re-testés pour leurs activités antifongiques contre *F.ox* et *Aspergillus niger*, les résultats ont montré une activité inhibitrice des deux pathogènes plus importante de l'extrait de la souche FR14 avec un I% de 23,63% pour *F.ox* et 11,66% pour *A.niger*. Ces résultats observés permettent aux souches FR14 et FR15 d'être des agents potentiels de biocontrôle pour une future application.

Mots-clés : Biocontrôle, inhibition, métabolites, PGPR, *Pseudomonas* spp fluorescents.

Abstract

19 strains of fluorescent *Pseudomonas* sp. were isolated from the rhizosphere and rhizosphere roots of durum wheat and barley from different biotopes, these strains were screened *in vitro* for their plant growth-promoting activity and biocontrol against *Fusarium oxysporum*. From an *in vitro* bioassay of *Lactuca sativa*, 8 strains were selected as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). According to macroscopic, microscopic and physicochemical tests, the strains were affiliated with *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* and *P.putida* species. These strains were tested for their ability to produce enzymes of agricultural interest, strains OD11, FR14, FR24, FR13 were all producing proteases, amylases, lipases. All isolates were studied for their antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* by the dual plate assay. FR14 and FR15 showed significant inhibition of mycelial growth with a percentage inhibition of 52.72% and 41.81% respectively. Two antifungal metabolites (phenazines, pyrrolnitrins) were extracted from cultures of strains FR14 and FR15 by the use of thin layer chromatography (TLC). The R_f values obtained ranged from 0.6 to 0.62 for PHZ and lack of PLN. The phenazic extracts were re-tested for their antifungal activities against *F.ox* and *Aspergillus niger*, the results showed a greater inhibitory activity of the two pathogens of the extract of the FR14 strain with an I% of 23.63% for *F.ox* and 11.66% for *A.niger*. These observed results allow strains FR14 and FR15 to be potential biocontrol agents for a future application.

Keywords : Biocontrol, inhibition, metabolites, PGPR, fluorescents *Pseudomonas* sp.

المخلص

تم عزل 19 عزلة من بكتيريا *Pseudomonas* المشعة انطلاقاً من جذور و ريزوسفير القمح الصلب و الشعير ببيئات مختلفة. هذه العزلات تم انتقائها في المختبر من اجل نشاطها المحفز لنمو النبات و المكافحة البيولوجية ضد *Fusarium oxysporum*. من خلال الفحص البيولوجي على بذور *Lactuca sativa*، 8 عزلات اظهرت نشاطاً محفزاً لنمو النبات PGPR. تبعا لنتائج الكشف المظهري و المجهرى و البيوكيميائي، هذه السلالات تم معرفة انتمائها للانواع *P.aeruginosa*، *P.fluorescens*، *P.putida*. تم اختبار هذه العزلات لقدرتها على انتاج الانزيمات ذات الاهمية الزراعية، السلالات OD11 FR14 FR24 FR13 كانت كلها منتجة للبروتيناز، الاميلاز و الليباز. تمت دراسة جميع العزلات لفاعلتها العدائية ضد *Fusarium oxysporum* بواسطة تقنية الزراعة المزدوجة. اظهرت FR14 و FR15 تثبيطاً ملحوظاً لنمو الفطر بنسبة تثبيط 52.72% و 41.81% على التوالي. تم استخراج ابيضين مضادين للفطريات (phenazine)، (pyrrolnitrines) من السلالتين FR14 FR15، باستخدام تقنية العزل الكروماتوغرافي (TLC). تراوحت قيم Rf التي تم الحصول عليها من 0.6 إلى 0.62 لـ PHZ و انعدام PLN. أعيد اختبار مستخلصات الفينازين لنشاطها المضاد للفطريات ضد فطرين *F.ox* و *Aspergillus niger*، و اظهرت النتائج نشاطاً مثبطاً أكبر لمستخلص السلالة FR14 بنسبة تثبيط 23.63% لـ *F.ox* و 11.66% لـ *A.niger*. تسمح هذه النتائج المرصودة للسلالتين FR14 و FR15 بأن تكون محتملة التطبيق في المكافحة البيولوجية في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: مكافحة بيولوجية، تثبيط، مواد ابيضية، بكتيريا محفزة لنمو النبات، *Pseudomonas* مشعة.

Liste des abréviations

°C	Celsius
%	Pourcentage
ABA	Acide abscisique
ACC	Aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase
ADH	Arginine dihydrolase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIA	Acide indole-acétique
C	Cytochrome C
CCM	Chromatographie sur couche mince
CWDE	Cell wall degrading enzymes
Da	Dalton
DAPG	Diacetylphloroglucinol
D.O	Densité optique
EDS	Eau distillée stérile
e PGPR	Rhizobactéries promotrices de la croissance végétale extracellulaires
F.ox	<i>Fusarium oxysporum</i>
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
GFP	Protéine verte fluorescente
H₂S	Sulfure d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HCN	Cyanide d'hydrogène
I%	Pourcentage d'inhibition
i PGPR	Rhizobactéries promotrices de la croissance végétale intracellulaires
ISR	Resistance systémique induite
LDC	Lysine décarboxylase
LOPAT	Levane sucrase, oxydase, potato, arginine dehydrolase, test d'hypersensibilité de tabac
ml	Millilitre
min	Minutes
NA	Nutrient agar

NB	Nutrient broth
nm	Nanomètre
ODC	Ornithine décarboxylase
OHPCA	hydroxyphénazine
OHPHZ	Hydroxyphénazine
ONPG	Ortho-nitrophényl- β -galactoside
PCA	Acide phénazine-1-carboxylique
PCN	phénazine-1- carboxamide
PDA	Potato-dextrose-agar
PGPR	Rhizobactéries promotrices de la croissance végétale
pH	Potentiel d'hydrogène
PHZ	Phénazine
PLT	Pyolutéorine
PRN	Pyrrolnitrine
Pvd	Pyoverdine
PYO	Pyocyanine
Rf	Rapport frontal
rpm	Rotation par minute
TDA	Tryptophane désaminase
VP	Voges-Proskauer
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra-violet
μl	Microlitre

Liste des figures

Figure 01. Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère.....	06
Figure 02. Représentation schématique des interactions mutualistes entre la plante (autotrophe) et les microorganismes (hétérotrophes) et entre les microorganismes eux-mêmes au sein de la rhizosphère.....	08
Figure 03. Images de microscopie confocale montrant la colonisation des poils racinaires de <i>Poacées</i> par la bactérie <i>Azospirillum</i> marquée à l’GFP.....	11
Figure 04. Diagramme schématisé montre les effets directs et indirects des PGPR sur la croissance des plantes.....	12
Figure 05. Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement associés aux <i>Pseudomonas</i>	16
Figure 06. Vue microscopique des <i>Pseudomonas</i> après la coloration différentielle de Gram.....	17
Figure 07. Structure générale des pyoverdines.....	18
Figure 08. Structure générale des pyocyanines.....	18
Figure 09. Exemples des différents sidérophores classés en fonction de leurs groupements fonctionnels et leurs organismes producteurs	21
Figure 10. A/ Phénazines produites par les différentes espèces de <i>Pseudomonas</i> . B/ Structure des phénazines.....	25
Figure 11. Localisation géographique des trois sites de prélèvement	32
Figure 12. Les différents sites de prélèvement des échantillons de blé dur et d’orge (photos originales).....	34
Figure 13. Les six échantillons des sols rhizosphériques et racines des plantules après agitation (photo originale).....	35
Figure 14. Les graines de laitue (<i>Lactuca sativa L.</i>) prégermées de 24 heures	37
Figure 15. Démarche d’évaluation du pouvoir antagoniste des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescentes (originale).....	41
Figure 16. Aspect des colonies de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents sous UV (365nm)	44

Figure 17. Effet des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents en bio-test de laitue.....	45
Figure18. Production des enzymes par les souches étudiées.....	50
Figure 19. Taux d'inhibition du champignon phytopathogène <i>Fusarium oxysporum</i> par les souches <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents testées.....	52
Figure 20. Identification des composés des extraits phénaziques des souches FR14 et FR15.....	54
Figure 21. Taux d'inhibition des champignons pathogènes par les extraits phénaziques des souches testées.....	55

Liste des tableaux

Tableau 01. Les types d'association des PGPR avec les plantes.....	11
Tableau 02. Modes d'action des PGPR et leurs effets bénéfiques sur les plantes...	13
Tableau 03. Quelques caractères permettant de caractériser les espèces <i>Pseudomonas</i> spp.....	19
Tableau 04. Autres types des sidérophores produits par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	23
Tableau 05. Principaux antibiotiques sécrétés par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents	24
Tableau 06. Les principales maladies transmises par le sol contre lesquelles l'utilisation de <i>Pseudomonas</i> fluorescents a déjà été envisagée.....	27
Tableau 07. Effets des <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents agents de phytostimulation	30
Tableau 08. Code et localisation géographique des échantillons utilisés pour l'isolement.....	33
Tableau 09. Les différents codes des souches de <i>Pseudomonas</i> spp rhizosphériques purifiées et vues sous UV _{365nm}	36
Tableau 10. Les souches <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents ayant un effet stimulateur de la croissance des racines (mesure de la longueur des racines bactérisées).....	46
Tableau 11. Caractéristiques culturelles des isolats de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents sur différents milieux de culture.....	47
Tableau 12. Quelques caractères physiologiques et biochimiques de 8 souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents étudiées.....	49
Tableau 13. Production des enzymes par les souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	50
Tableau 14. Activité antifongique des espèces de <i>Pseudomonas</i> testées contre <i>F.oxysporum</i>	52
Tableau 15. Analyse de la chromatographie sur couche mince des métabolites antimicrobiens extraits des souches FR14 et FR15.....	54
Tableau 16. Effet des extraits phenaziques des souches FR14 et FR15 sur la croissance mycélienne de <i>F.ox</i> et <i>A.niger</i>	55

Table des matières

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale	01
Revue bibliographique.....	04
I. Rhizosphère et diversité de la flore microbienne du sol.....	05
1. Définition de la rhizosphère	05
2. Rhizosphère et interactions plante-bactéries	06
3. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes	08
3.1. Définition des PGPR	09
3.2. PGPR comme des probiotiques.....	10
3.3. Formes des PGPR	10
4. Principaux rôles des PGPR	12
II. Potentiel biotechnologique des PGPR	14
III. <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents rhizosphériques	15
1. Genre <i>Pseudomonas</i> spp	15
1.1. Caractères généraux	17
1.2. Morphologie et structure	17
1.3. Croissance et nutrition	18
1.4. Pigments élaborés par les <i>Pseudomonas</i> spp	18
1.5. Caractères métaboliques.....	19
2. <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents	20
2.1. Taxonomie	20
2.2. Métabolites des <i>Pseudomonas</i> fluorescents	20
2.2.1. Sidérophores	20
2.2.1.1. Pyoverdines	22

2.2.1.2. Autres sidérophores produits par les <i>P.</i> fluorescents.....	22
2.2.2. Antibiotiques	23
2.2.2.1 Les phénazines	24
3. <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans la rhizosphère	25
A. Les <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents qu'agents de lutte biologique	26
• Modes d'action de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents en lutte biologique	28
1. Compétition spaciale/trophique	28
2. Antibiose	28
3. Parasitisme	29
4. Induction de la résistance systémique.....	29
B. <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents qu'agent de phytostimulation	30
• Modes d'action en phytostimulation	30
Matériels et méthodes.....	31
Première partie : Isolement, sélection, purification, conservation des <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents à partir de la rhizosphère	32
1. Isolement des <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents rhizosphériques.....	32
1. Echantillonnage.....	32
2. Procédure d'isolement	34
2. Sélection des colonies bactériennes et purification	35
3. Conservation des souches.....	36
Deuxième partie : Criblage des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescentes. rhizosphériques phyto-bénéfiques	37
1. Préparation de l'inoculum	37
2. Désinfection des graines de laitue (<i>Lactuca sativa</i>)	37
3. Le test <i>in vitro</i> (bio-test de <i>Lactuca sativa</i>)	37
Troisième partie : Caractérisation morpho-physicochimique des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescente phyto-bénéfiques sélectionnées.....	38
1. Aspect des colonies.....	38
2. Aspect microscopique.....	38
2.1. La mobilité bactérienne (observation à l'état frais).....	38
2.2. Coloration de Gram	38
3. Recherche de la catalase.....	38

4. Recherche d'oxydase	38
5. Croissance à 4°C et à 41°C	38
Quatrième partie : Production des enzymes d'intérêt agricole	39
1. Cellulases.....	39
2. Amylases.....	39
3. Protéases.....	39
4. Lipases.....	39
Cinquième partie : Evaluation de l'activité de biocontrôle des souches sélectionnées et de leurs métabolites secondaires à l'égard d'un champignon phytopathogène <i>Fusarium oxysporum</i>	40
1. Extraction et identification des métabolites antifongiques.....	40
a. Evaluation du pouvoir antagoniste <i>in vitro</i>	40
b. Extraction des métabolites antimicrobiens : phénazines et pyrrolnitrines	41
▪ Extraction des phénazines et pyrrolnitrines	41
▪ Chromatographie sur couche mince	42
2. Evaluation de l'activité antifongique des extraits métaboliques.....	42
Résultats et discussions.....	43
I. Isolement des <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents à partir de la rhizosphère....	44
II. Sélection « screening » des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescentes rhizosphériques phytobénéfiques.....	45
III. Caractérisation morpho-physicochimique des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescente phytobénéfiques sélectionnées.....	47
1. Aspect des colonies.....	47
2. Examen microscopique.....	47
3. Caractéristiques physicochimiques.....	47
IV. Production des enzymes d'intérêt agricole.....	50
V. Evaluation de l'activité de biocontrôle des souches sélectionnées.....	51
1. a. Test d'antagonisme contre <i>Fusarium oxysporum in vitro</i>	51
b. Extraction des métabolites secondaires à effet antifongique.....	52
2. Evaluation de l'activité antifongique des extraits bruts de deux souches FR14 et FR15.....	54
Discussion générale.....	56

Conclusion générale et perspectives.....	60
Références bibliographiques.....	63
Annexes	
Glossaires	

Introduction
générale

Introduction générale

L'agriculture constitue la source principale de nutrition pour l'humanité. Aujourd'hui, l'agriculture durable est devenue extrêmement importante pour accomplir les demandes en nourriture (**Singh, Sarma et al. 2017**). En effet, les récents rapports de la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) indiquent que d'ici 2050 il sera nécessaire de doubler la production agricole mondiale actuelle pour nourrir les 9 milliards d'êtres humains. Avec cette croissance démographique forte, les techniques agricoles traditionnelles et conventionnelles sont devenues insuffisantes pour répondre aux besoins futurs de l'agriculture (**Singh, Sarma et al. 2017**).

De plus, chaque année des pertes économiques très importantes sont signalées à cause de l'occurrence des maladies des plantes. A l'échelle mondiale, les maladies des plantes sont devenues une menace majeure pour la production agricole et la stabilité des écosystèmes naturels, elles sont responsables de la perte d'au moins 10% de la production mondiale alimentaire (**Strange and Scott 2005**). Des pertes économiques des cultures de pomme de terre au niveau mondial sont plus de 6,7 milliard de dollars dues aux mildious causés par le champignon phytopathogène *Phytophthora infestans* (**Haverkort, Boonekamp et al. 2008**).

Cependant, la mécanisation et les moyens modernes de l'agronomie (fertilisation, biologie génétique, ...etc) sont devenues de plus en plus critiquées en raison des dégradations de l'environnement dont elles sont responsables dans une grande partie (**KIRDI 2011; El-Hafid 2013**). En plus, l'utilisation des produits chimiques sous forme des fertilisants et des pesticides ou les plantes résistantes, sont à la base de l'amélioration des rendements des diverses cultures (**KIRDI 2011**), mais dans l'autre côté ces intrants chimiques ont provoqué des sérieux problèmes sur la biodiversité, la santé humaine, et le développement de la résistance chez les agents pathogènes (insectes, nématodes, champignons, bactéries).

Ces contraintes ont obligé la communauté scientifique à chercher des alternatives pour assurer la durabilité de l'agriculture par l'utilisation des microorganismes bénéfiques (**Vessey 2003**) en augmentant le rendement et en sauvegardant les ressources naturelles et la santé des plantes (**KIRDI 2011**).

Le sol est le support principal de la plupart des produits issus de l'agriculture. Il constitue également le support de vie d'une très grande variété d'organismes

vivants en interactions continues (plantes, vers de terre, nématodes, acariens, protozoaires, algues, champignons, eubactéries, *Archaea*, etc.) (**Agueniou et Zeggagh, 2017**). La rhizosphère ; la zone d'interface entre la plante et le sol ; abrite plusieurs microorganismes qui interagissent avec la plante et en influencent sa croissance. Certains ont des effets délétères, d'autres sont bénéfiques.

Les rhizobactéries promotrices de la croissance végétale (Plant Growth Promoting Rhizospheria, PGPR) initialement décrites par Kloepper et Schroth (1978), ces dernières établissent une symbiose associative avec les plantes en stimulant leur croissance et induisant une résistance contre divers microorganismes phytopathogènes (**El-Hafid 2013**).

Parmi les bactéries d'intérêt agricole (PGPR) les *Pseudomonas* spp. fluorescents font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation dans l'agriculture en tant que biofertilisants ou biopesticides offre un bon rendement et pourrait permettre de diminuer les apports d'engrais ou de pesticides chimiques, ainsi ces bactéries sont connues pour leur effet d'améliorer la santé et stimuler la croissance des plantes (**Rabhi 2011**). Ces bactéries sont un bon outil de lutte biologique; car elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses grâce à leur activité antagoniste vis-à-vis des phytopathogènes par la production des métabolites secondaires à effet antimicrobien (lyse cellulaire, arrêt de la réplication de l'ADN, pouvoir oxydant...etc.) (**RAI 2017**).

L'objectif de ce travail était la mise en évidence de bactéries indigènes bénéfiques pour les plantes en évaluant leurs contributions dans la croissance et la suppression des agents phytopathogènes.

Dans cette optique, nous avons réalisé ce travail dont les stratégies étaient:

- L'isolement des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents rhizosphériques à partir des différentes parcelles des champs à exploitation agricole (blé dur, orge).
- Le criblage des souches stimulatrices de la croissance végétale (Bio-test sur graines de laitue « *Lactuca sativa L.* »).
- Production des enzymes d'intérêt agricole (cellulases, amylases, protéases, lipases) par les souches sélectionnées.

Introduction générale

- Evaluation « *in vitro* » de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents rhizosphériques contre le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*.
- Extraction et identification des métabolites secondaires à effet antimicrobien par la chromatographie sur couche mince (CCM).
- Test d'antagonisme des extraits métaboliques de *Pseudomonas* à l'égard des champignons phytopathogènes.

Revue
bibliographique

I. Rhizosphère et diversité de la flore microbienne du sol

Le sol n'est pas simplement le support dans lequel les plantes s'enracinent et puisent les éléments nutritifs indispensables à leur développement. Le sol est un réservoir de microorganismes (champignons et bactéries), en termes de diversité et de densité. Le sol est un environnement extrêmement riche qui abrite une multitude de microorganismes. Parmi ces microorganismes, les bactéries sont de loin les plus abondantes à la fois en termes de biomasse et de diversité taxonomique

Rares sont les microorganismes pathogènes. En revanche, nombre d'entre eux favorisent la croissance des végétaux, assurent la dégradation de polluants, et fournissent des composés d'intérêt tels des enzymes, des antibiotiques ou d'autres biomolécules actives (antiviraux, antitumoraux) (**Kang, Shen *et al.* 2013**).

Plus récemment, l'étude de métagénomés de sols contrastés en termes de caractéristiques physicochimiques et géographiques a permis d'estimer entre 2000 et 10^4 le nombre d'espèces bactériennes par gramme de sol (**Theodorakopoulos, Bachar *et al.* 2013**).

1. Définition de la rhizosphère

La rhizosphère est la zone étroite du sol particulièrement influencée par les systèmes racinaires (**Dobbelaere, Vanderleyden *et al.* 2003**). Cette zone est riche en nutriments quand elle est comparée avec le sol nu en raison de l'accumulation d'une variété des exsudats racinaires, tels que les acides aminés et les sucres, fournissant une source d'énergie et de nutriments aux bactéries telluriques (**Gray and Smith 2005**).

En 1904, Hiltner avait défini la rhizosphère comme étant une niche écologique bien caractérisée comprenant du volume du sol entourant les racines des plantes ayant la plus forte population microbienne qui est 10– 100 fois supérieure à celle d'un sol nu (**Weller and Thomashow 1994; Singh, Joshi *et al.* 2017**).

Parallèlement, environ 15% de la surface des racines des plantes est couverte de populations microbiennes appartenant à plusieurs espèces bactériennes, et les activités métaboliques de ces bactéries stimulent le transport et l'absorption des nutriments minéraux par les racines des plantes (Singh, Joshi *et al.* 2017).

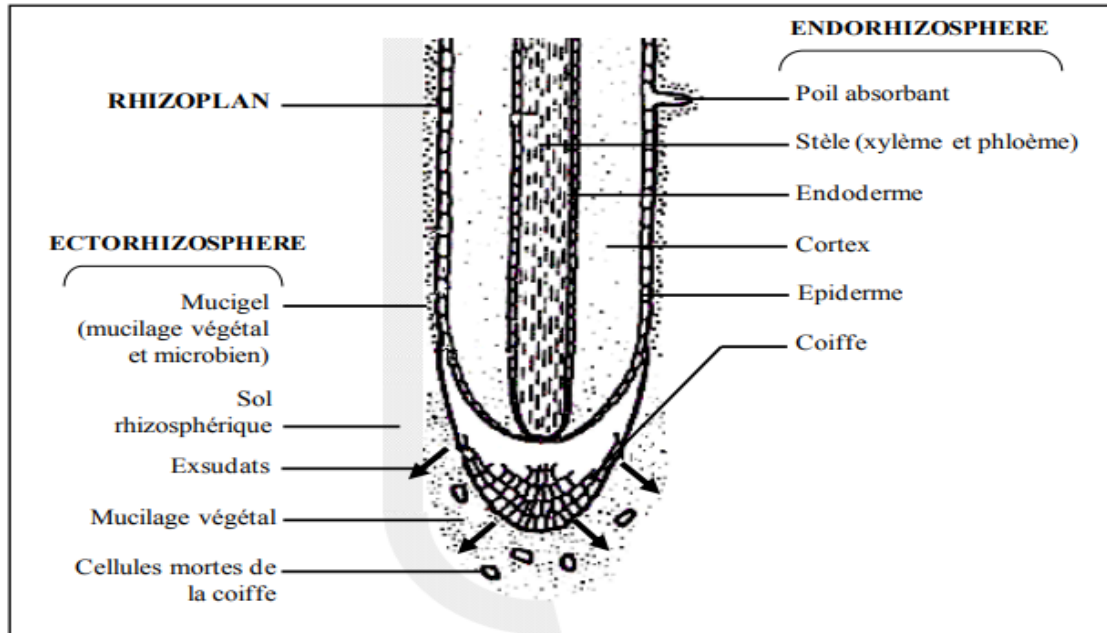


Figure 1. Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (D'après Lynch, 1983).

La rhizosphère se décompose en trois zones : l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface des racines) et l'ectorhizosphère (sol adhérent aux racines ou sol rhizosphérique).

2. Rhizosphère et interactions plante-bactéries

La rhizosphère est naturellement colonisée par les microbes (bactéries et champignons), les bactéries sont les organismes les plus nombreux (leur densité est de l'ordre de plus de 10^9 cellules par gramme de tissus des racines de plantes) et les plus variés. Les bactéries associées à la rhizosphère peuvent avoir un effet positif, négatif ou neutre sur la croissance des plantes (MESSAOUDI 2015).

La rhizosphère est donc un milieu dynamique et structuré. Elle abrite une multitude de microorganismes interagissant de diverses façons avec la plante et qui sont structurés en communautés complexes dans lesquelles diverses interactions entre les microorganismes eux-mêmes existent.

Certaines bactéries du sol sont responsables de pertes économiques considérables liées à leur pouvoir pathogène vis-à-vis des plantes. Cependant, une grande partie des bactéries telluriques est capable d'améliorer la croissance des plantes. La plupart des bactéries de la rhizosphère aident à leur tour, par mutualisme, les plantes par la fixation de l'azote atmosphérique, la dégradation de la matière organique, ainsi que par la stimulation de la croissance et la protection des végétaux. Ils existent des mécanismes d'associations très spécifiques et complexes entre les plantes et les microorganismes. Ces associations peuvent être responsable de l'induction de la résistance (*ISR*) et/ou de la tolérance des plantes à divers stress biotiques et abiotiques (**Agueniou Fatiha 2017**)

Les microorganismes rhizosphériques peuvent être différenciés en deux groupes se distinguant par le niveau d'interdépendance qui existe entre la plante et les microorganismes; les symbiotiques et les non symbiotiques. Au sein de chaque groupe, il existe divers microbes qui se distinguent par leur effet sur la plante : positif, négatif ou neutre (**figure 2**).

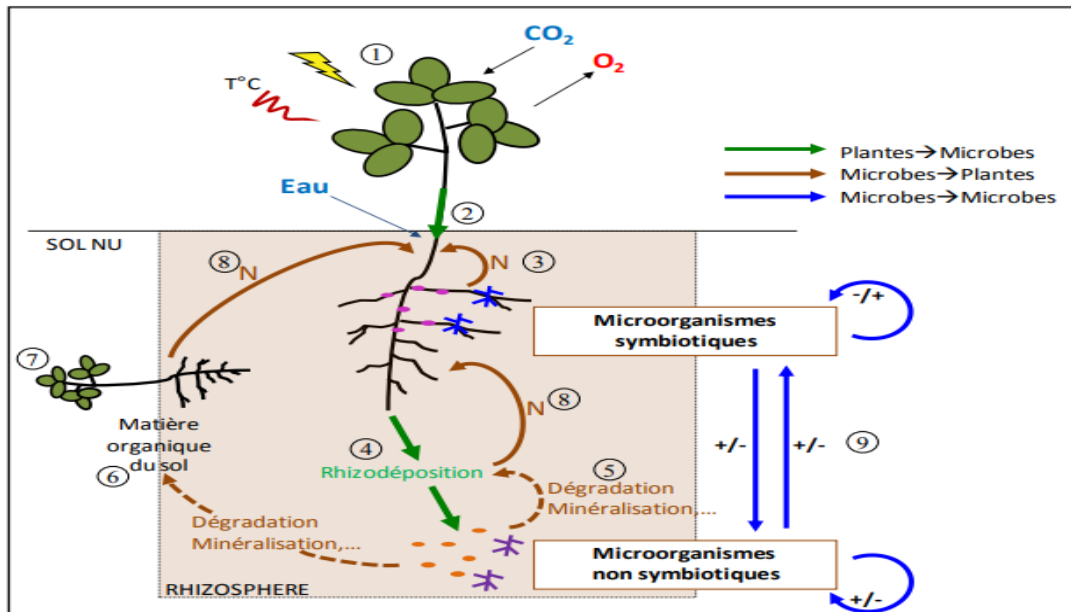


Figure 2. Représentation schématique des interactions mutualistes entre la plante (autotrophe) et les microorganismes (hétérotrophes) et entre les microorganismes eux-mêmes au sein de la rhizosphère (MEZAACHE 2012). (1) La plante réalise la photosynthèse grâce à l'énergie lumineuse, le CO₂, l'eau et les nutriments ; la température est également un facteur important dans ce processus. (2) Une partie des photosynthétats produits par la plante suite à la photosynthèse va être fourni aux microorganismes symbiotiques qui (3) en échange vont fournir des nutriments (N) à la plante. (4) Le reste des photosynthétats sera libéré dans le sol, via la rhizodéposition, et disponible pour la croissance des microorganismes non symbiotiques. Ces derniers vont, en retour, dégrader la matière organique présente (5) dans la rhizosphère ou (6) dans le sol nu, ainsi que (7) la matière végétale à la mort de la plante afin de (8) fournir des nutriments à la plante. (9) Il existe aussi des interactions entre les microorganismes eux-mêmes qui peuvent intervenir dans les interactions plante-microbes.

3. Rhizobactéries promotrices de la croissance (PGPR)

Les bactéries associées aux plantes peuvent être classées en trois groupes selon leur effet sur la plante : bactéries bénéfiques, délétères, neutres. Les bactéries à effet bénéfique peuvent être référées comme les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Kloepper, Lifshitz *et al.* 1989). Les microorganismes du sol, dont une grande partie est considérée comme PGPR, partagent le même environnement que les racines des cultures. Elles sont donc exposées aux mêmes contraintes

environnementales que ces dernières, telles que la sécheresse, la salinité, les températures extrêmes. (RAI 2017).

3.1. Définition des PGPR

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) ont été définies pour la première fois par Kloepper et Schroth (1978) comme étant les bactéries qui colonisent le sol (Dorjey, Dolkar *et al.* 2017).

Le terme ‘rhizobactéries’ est largement utilisé pour désigner un groupe des bactéries bénéfiques présentes dans la rhizosphère et capables de coloniser le système racinaire (Gosal, Kaur *et al.* 2017). Les PGPR les plus fréquemment identifiées sont *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Azotobacter* et autres.

Les bactéries qui colonisent les racines des plantes ou toute autre partie de la plante et qui améliorent la croissance des plantes grâce à une grande variété de mécanismes sont appelées rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Gosal, Kaur *et al.* 2017). Les PGPR composent un groupe hétérogène de bactéries qui peuvent se développer dans, sur, ou autour des tissus des racines végétales, stimulant la croissance des plantes directement et / ou indirectement (Kang, Shen *et al.* 2013).

Les rhizobactéries sont caractérisées par les caractéristiques intrinsèques suivantes :

- ✓ Capables de coloniser les racines ou autre partie de la plante.
- ✓ Lorsqu’elles sont utilisées comme des probiotiques (bio-inoculants), elles doivent survivent, multiplient, et expriment leurs activités promotrices de la croissance des plantes.
- ✓ Doivent promouvoir la croissance des plantes.

3.2. PGPR comme des probiotiques

L'importance des probiotiques est principalement axée sur la nourriture humaine, mais la recherche en cours liée à l'agriculture se concentre sur la relation entre les probiotiques et les plantes (Gosal, Kaur *et al.* 2017). D'ailleurs, les plantes par leur caractère sessile peuvent confronter des changements environnementaux (salinité, sécheresse, températures extrêmes et toxines), leur adaptation génétique face à ces changements est moins. Donc, elles peuvent utiliser les microorganismes ayant la possibilité de supporter les changements environnementaux grâce à leur cycle de vie rapide et court.

3.3. Formes des PGPR

Les rhizobactéries promotrices de la croissance peuvent interagir avec les racines des plantes par différents types d'association, selon différents degrés de proximité avec les racines et selon le sol qui les entoure. Ces bactéries peuvent être classées en : PGPR extracellulaires (ePGPR) et PGPR intracellulaires (iPGPR) (Martínez-Viveros, Jorquera *et al.* 2010). Les ePGPR se divisent en trois types selon le degré d'association avec les racines ; celles qui se retrouvent dans le rhizoplan, d'autres colonisant la surface des racines et d'autres se trouvent dans l'espace entre les cellules du cortex racinaires, tandis que les iPGPR sont généralement localisées à l'intérieur des structures nodulaires spécialisées des cellules racinaires (tableau 1). Les bactéries du genre: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum* (figure 3), *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Serratia* appartiennent au ePGPR (Ahemad and Kibret 2014) . Les iPGPR appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* comprennent les espèces *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* et *Rhizobium*, *Frankia* (Bhattacharyya and Jha 2012).

Le tableau suivant représente les types d'association des rhizobactéries promotrices de la croissance végétale avec les plantes:

Tableau 1. Les types d'association des PGPR avec les plantes (Badri and Vivanco 2009).

PGPR endophytes	PGPR symbiotiques	PGPR associatives	PGPR libres
<ul style="list-style-type: none"> - Des bactéries vivent dans les tissus végétaux. - Ne causent aucun dommage chez leur hôte. - Etablissent une association mutualiste. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les PGPR vivent en symbiose avec les plantes - Une interaction réciproque pour les deux partenaires. 	<ul style="list-style-type: none"> - Largement distribué dans la partie rhizosphérique - Exercent plusieurs processus stimulant la croissance végétale. 	<ul style="list-style-type: none"> - Existence indépendante dans le sol. - Ne nécessitent pas l'hôte pour leur développement. - L'espèce type est (<i>Azotobacter</i>)

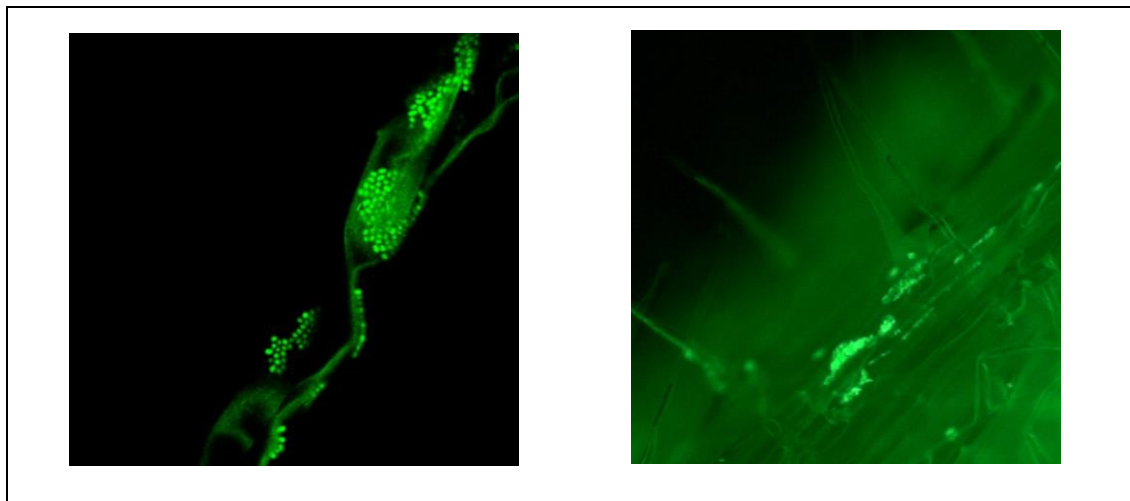


Figure 3. Images de microscopie confocale montrant la colonisation des poils racinaires de *Poacées* par la bactérie *Azospirillum* marquée à l’GFP.

4. Principaux rôles des PGPR

Plusieurs travaux ont montré l'utilité des bactéries bénéfiques pour la promotion de la croissance végétale (Tran Van *et al.*, 1996 ; Shamsuddin *et al.*, 2010) (tableau 2). Les RFCP (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes) les plus étudiées sont des *Pseudomonas* fluorescents, des *Bacillus*, des *Azospirillum*, des *Azotobacter*, des *Klebsiella*, des *Enterobacter*, des *Rhizobium* et des *Serratia* spp (Messaoudi, 2015).

Les PGPR stimulent la croissance des plantes par l'apport des nutriments grâce aux différents processus tels que la fixation biologique d'azote, la solubilisation du phosphate et du potassium, l'induction de la production des phytohormones et la résistance de la plante aux pathogènes du sol (Lamizadeh, Enayatizamir *et al.* 2016) (figure 4).

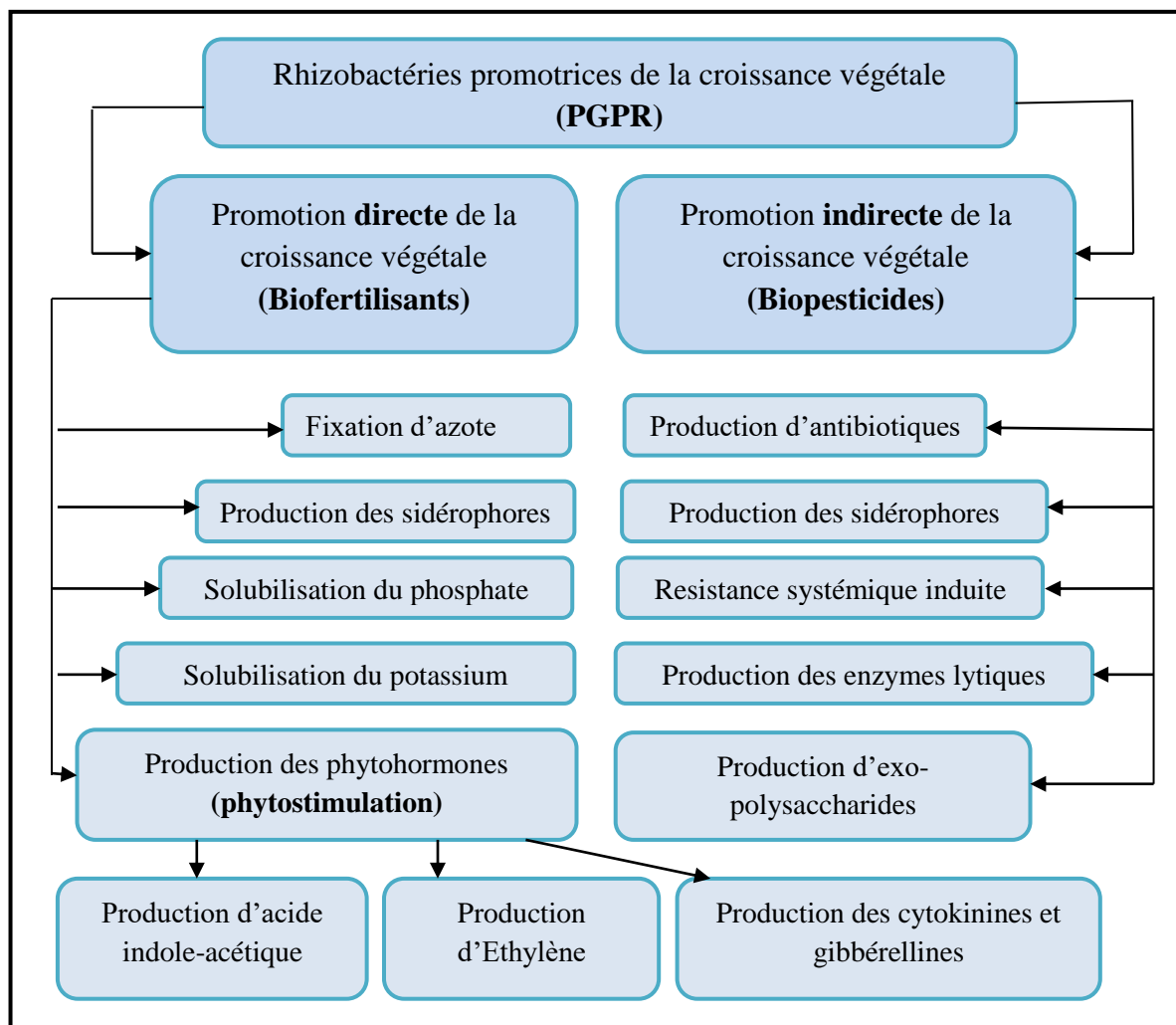


Figure 4. Diagramme schématisé montre les effets directs et indirects des PGPR sur la croissance des plantes (Gupta, Parihar *et al.* 2015).

Le tableau suivant représente quelques exemples des microorganismes bénéfiques de la rhizosphère avec leurs modes d'action et leurs effets sur les plantes.

Tableau 2. Modes d'action des PGPR et leurs effets bénéfiques sur les plantes

	Mode d'action	Effet sur les plantes	Références
Rhizobactéries promotrices de la croissance végétale (PGPR)	Colonisation des racines et sécrétion des métabolites	Régulation de la production d'éthylène, production des phytohormones.	(Yadegari, Rahmani <i>et al.</i> 2010)
	Métabolites antifongiques comme les antibiotiques	Biocontrôle des phytopathogènes, capacité de coloniser les racines.	(Van Loon, Bakker <i>et al.</i> 1998)
	Dégradation des polluants	Atténuation de la toxicité des métaux lourds.	(Kuiper, Legendijk <i>et al.</i> 2004)

II. Potentiel biotechnologique des PGPR en agriculture

Face aux stress abiotiques (stress salin, thermique et hydrique) et biotiques (les organismes phytopathogènes) et dès lors l'exploitation du potentiel microbiologique des sols, une nouvelle lumière a été apportée sur le rôle de ces microorganismes. Parmi les différentes microbiotes colonisant le sol, PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) considérée comme une nouvelle solution contre les stress abiotiques (**Turan et al., 2017**).

Somers *et al.*, (**Somers, Vanderleyden et al. 2004**) ont classé les PGPR en fonction de leurs activités fonctionnelles dans la rhizosphère en :

- ✚ **Biofertilisants** : augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes,
- ✚ **Phytestimulateurs** : améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones,
- ✚ **Rhizoremédiateurs** : dégradant les polluants organiques,
- ✚ **Biopesticides** : lutte contre les maladies, principalement par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques.

L'utilisation des PGPR en agriculture peut permettre de stimuler la croissance des plantes et de contourner leurs pathogènes (**Benmati, 2014**). Des cultures de Tomate, concombre, laitue et pomme de terre bacterisées avec les PGPR de genre *Pseudomonas* ont montré une augmentation du poids frais des racines et une suppression des effets délétères des agents phytopathogènes. Par ailleurs, Walley et Germida (**Walley and Germida 1997**) ont observés une augmentation du poids sec des plantules de 16 à 48 % et de 82 à 137 % du poids sec des racines inoculés par *Pseudomonas* fluorescents. Dans le même contexte, Gupta *et al.*, (**Gupta, Meyer et al. 2002**) ont reportés que les graines d'arachide bacterisées avec la souche *Pseudomonas* GRC2 ont montré une augmentation significative de la germination (83%) sous les conditions de serre.

III. *Pseudomonas* spp fluorescents rhizosphériques

1. Genre *Pseudomonas* spp

Le genre *Pseudomonas* a été découvert en 1894 par Migula, c'est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (**Mezaache, 2012**).

Les *Pseudomonas* fluorescents sont des bactéries que l'on rencontre communément dans l'eau, dans les sols et, en particulier, au niveau des rhizosphères (**Kanyinda et al., 2014**). Dans ce dernier milieu, deux espèces de *Pseudomonas* fluorescents, *P. fluorescens* et *P. putida*, sont prédominants, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (**Rabhi 2011**).

Pseudomonas fluorescens a été décrite pour la première fois en 1886 par **Flügge**. Elle appartient au genre *Pseudomonas* de la famille des *Pseudomonadaceae* (**Dima, 2015**). La fluorescence est due à la production d'un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme.

Certaines de ces souches bactériennes appelées rhizobactéries retiennent l'attention des bactériologistes depuis une dizaine d'années. Elles possèdent en effet les propriétés intéressantes de stimuler la croissance des plantes et, dans certaines conditions, d'assurer une protection relative des systèmes racinaires contre les agents pathogènes telluriques.

Cependant, les souches du groupe *P.fluorescens-P.putida* ont une grande hétérogénéité et il est difficile de classer les souches inconnues dans ces deux espèces et leurs biovars (**Digat and Gardan 1987**).

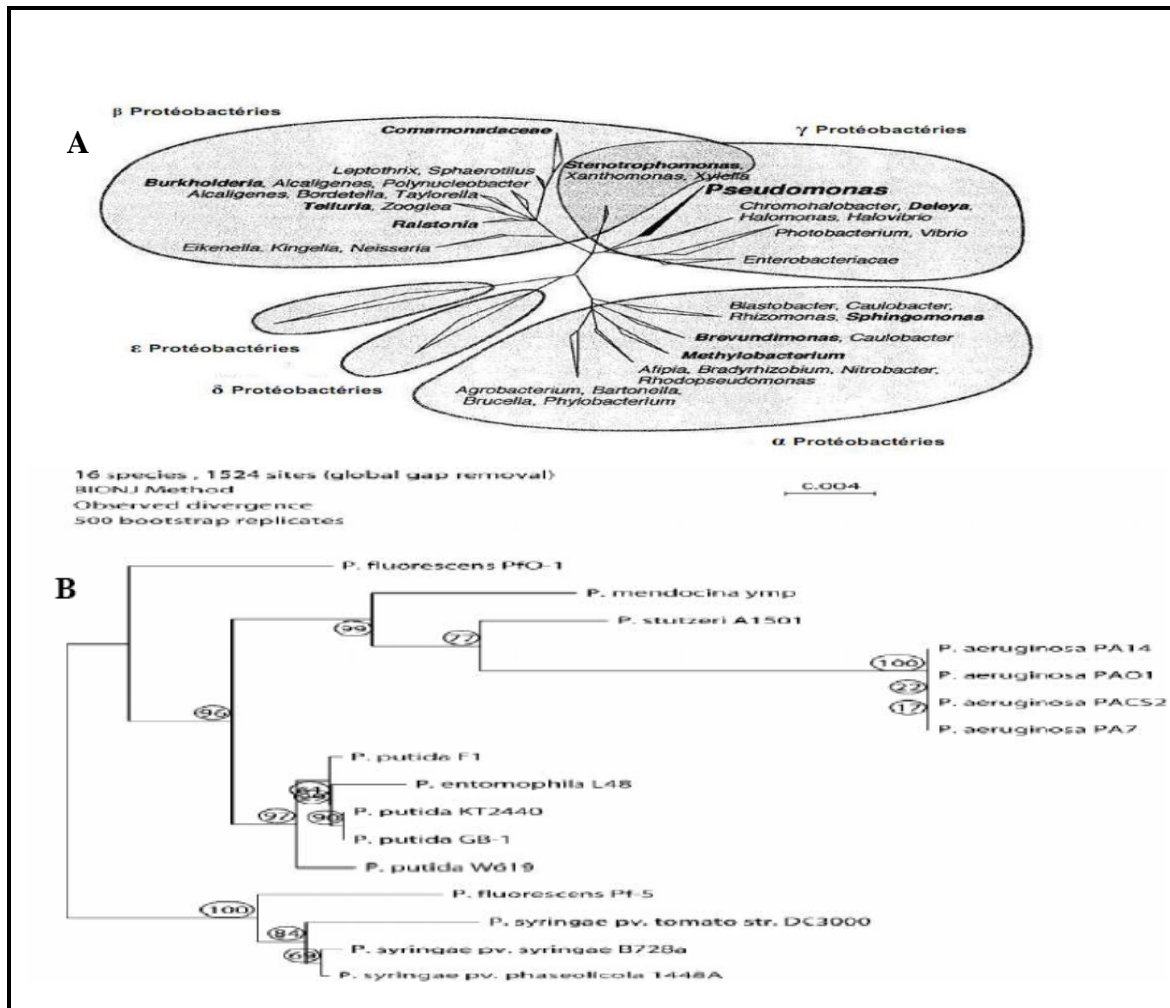


Figure 5. (A) : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis, Lemanceau *et al.* 2000)., (B) : Arbre phylogénétique ARNr 16S du genre *Pseudomonas* (Rehm 2008)

1.1. Caractères généraux

Les *Pseudomonas* spp peuvent être définis comme suit :

- Bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature polaire, rarement non mobiles, non sporulés (**figure 6**).
- Bactéries chimioorganotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire avec comme accepteur final d'électrons l'oxygène moléculaire en aérobose et pour certaines espèces le nitrate en anaérobose avec synthèse d'une nitrate réductase « respiration des nitrates ».
- Oxydase positif, c'est-à-dire possédant pour la plupart une chaîne cytochromique complète comprenant le cytochrome C.
- Oxydatifs ou inactifs dans l'épreuve Hugh et Leifson.
- Utilisent plusieurs sources hydrocarbonés comme source de carbone et d'énergie.
- Bactéries caractérisées par leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques.
- Pourcentage G+C compris entre 58 et 70 (**Meliani, 2012**).



Figure 6. Vue microscopique des *Pseudomonas* après la coloration différentielle de Gram

1.2. Morphologie et structure

- bâtonnets droits et fins (0,5 et 1,3 μm), Gram négatif.
- Très mobiles à l'état frais, en aérobose mobilité très vive dans le test « mannitol-mobilité ». Pour les espèces multitriches le type de ciliature ne peut être établi que statistiquement en déterminant l'index flagellaire. Elle peut varier selon les conditions de culture. Quelques souches et *P. mallei* sont immobiles et aciliées.

1.3. Croissance et nutrition

- De nombreuses espèces ou souches de *Pseudomonas* ne cultivent pas à 37°C alors que la température de 30°C convient à tous, pathogènes et saprophytes.
- La culture est facile sur milieu complexe avec ou sans production de pigment. Ils sont capables de cultiver sur des milieux minéraux synthétiques avec une source simple de carbone : acétate, pyruvate. Ces propriétés sont utilisées pour mettre en évidence les auxotrophies nécessaires pour l'identification.
- L'auxotrophie, ou besoins en facteurs de croissance, est caractéristique pour :
 - *P. maltophilia* : méthionine ou cystine.
 - *P. diminuta* – *P. vesicularis* : pantothénate, biotine, cyanocobalamine.
- L'espèce-type ; *Pseudomonas aeruginosa* ; est mésophile tandis que la majorité des espèces sont psychrotrophes.

1.4. Pigments élaborés par les *Pseudomonas* spp

Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine (**figure 7 et 8**). Les espèces pigmentées sont par exemple :

– *P. aeruginosa* : pyocyanine + pyoverdine, il possède l'un ou l'autre ou les deux, mais pouvant être perdus par mutation. Il existe des variétés mélanogènes ou érythroènes produisant un pigment noir ou un pigment rouge.

– *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, et *P. cichorii* produisent de la pyoverdine mais certaines souches sont parfois apigmentées.

– *P. aureofaciens* : pigment jaune orange ou pourpre (**Singleton et Sainsbury, 2006**).

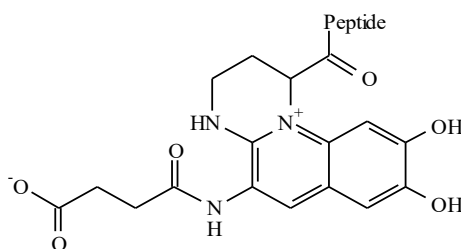


Figure 7. Structure générale des pyoverdines

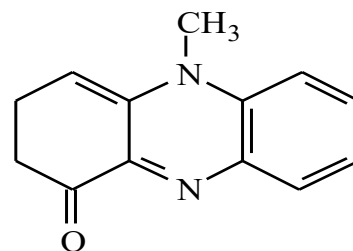


Figure 8. Structure générale des pyocyanines

1.5. Caractères métaboliques

Les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* se cultivent sur des milieux de culture usuels non enrichis et sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme source de carbone et d'énergie.

L'attaque des hydrates de carbone par oxydation peut être à la base de l'identification des *Pseudomonas spp*, mais toutes les espèces ne donnent pas de produits acides à partir de sucres comme le glucose : certaines donnent une alcalinisation ou sont inactives (Meliani 2012).

L'utilisation des galeries API 20NE, permettent une identification biochimique et un diagnostic correct des espèces *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. stutzeri*

Le tableau ci-dessous présente quelques caractères qui peuvent différencier entre les espèces *Pseudomonas spp* :

Tableau 3. Quelques caractères permettant de caractériser les espèces *Pseudomonas spp*

Caractère	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. simiae</i>	<i>P. stutzeri</i>
Oxydase	+	+	+	+	+
Nbre de flagelles	1	>1	>1		1
Croissance à 4°C	-	+	D	+	-
Croissance à 41°C	+	-	-	-	D
Pyocyanine	+	-	-	-	-
Pyoverdine	+	+	+	+	-
ADH	+	+	+	+	-
ONPG	D	-	-	-	-
LDC	-	-	-		-
Amylase	-	-	-		+
Gélatinas	D	+	-	+	-
Glucose*	+	+	+	+	+
Glucose**	+	+	+	-	+
Fructose**	+	+	+		+

Maltose*	-	-	-	-	+
Lactose**	-	D	D	-	-
Mannitol	D	+	D	D	D
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. simiae</i>	<i>P. stutzeri</i>

* : assimilation, ** : acidification oxydative, D : variable, (+) : présent, (-) : absent

2. *Pseudomonas* spp fluorescents

La variété du métabolisme des *Pseudomonas* fluorescents est basée sur la production des métabolites antibactériens et antifongiques comme l'acide phenazine carboxilique (PCA), le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine (PRN) et la pyoluteorine (PLT) (Meliani, 2012), ainsi que la production d'une large gamme de sidérophores. Ces métabolites confèrent à ces bactéries une plasticité importante dans leur adaptation à des environnements variés tels que la rhizosphère et le sol.

2.1. Taxonomie

Les *Pseudomonas* fluorescents sont classés au sein des espèces *fluorescens* et *putida*, et des deux groupes intermédiaires définis selon Palleroni (1984). Ce classement est basé sur la mise en évidence de deux aptitudes métaboliques (la protéolyse et l'utilisation du tréhalose). Les deux sont présentes chez *P. fluorescens* et absentes chez *P. putida*, alors que l'une ou l'autre seulement s'exprime dans les groupes intermédiaires (Mamoun et Olivier, 1989).

2.2. Métabolites de *Pseudomonas* fluorescents

2.2.1. Sidérophores

Le rôle des sidérophores consiste à solubiliser et à chélater le fer dans le milieu extracellulaire et de le transporter vers le cytoplasme de la bactérie (Meliani, 2012).

Les sidérophores sont des métabolites secondaires produits à la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire du cycle de vie de la bactérie. Ce sont des molécules à faible poids moléculaire (200-2000 Da), riches en hétéro-atomes (oxygénés et azotés) susceptibles d'interagir avec les ions métalliques. Les sidérophores sont capables de chélater le Fe^{3+} avec une grande affinité (figure 9).

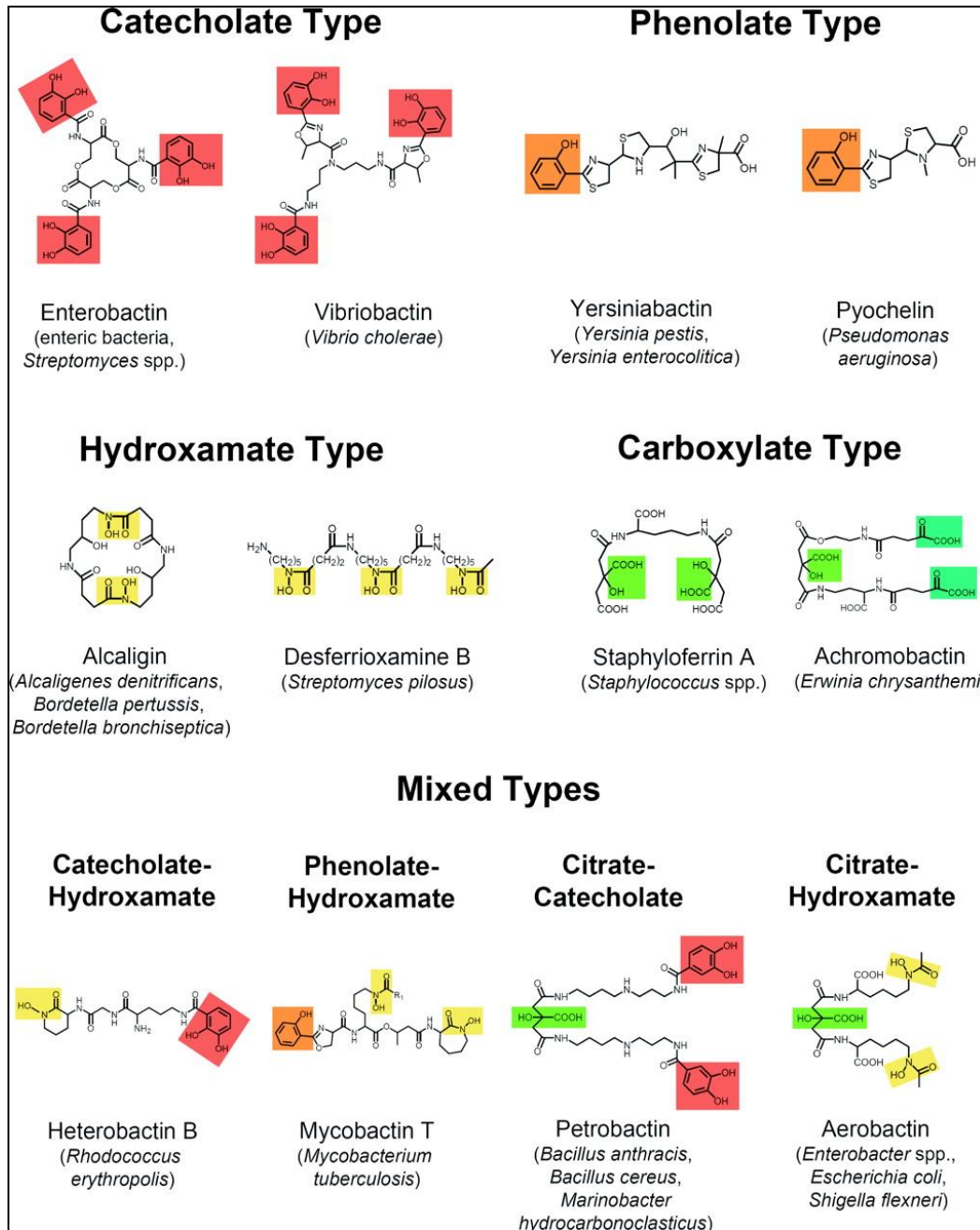


Figure 9. Exemples des différents sidérophores classés en fonction de leurs groupements fonctionnels et leurs organismes producteurs (Miethke and Marahiel 2007).

Les parties impliquées dans la coordination du fer sont mises en évidence comme suit: Les catécholates sont en rouge, les phénolates en orange, les hydroxamates en jaune pâle, les α -hydroxy-carboxylates à partir d'unités 2-oxo-glutarate) sont en bleu-vert.

2.2.1.1. Pyoverdines

Différentes souches de *Pseudomonas* secrètent des pyoverdines chimiquement diversifiées. Elles sont considérées comme des sidérophores en 1978 grâce aux travaux fondateurs de J-M.Meyer et ses collaborateurs (**Meyer *et al.*, 1978**), à ce jour, plus de 70 pyoverdines différentes ont été décrites.

Les pyoverdines sont une classe hétérogène de sidérophores fluorescents qui définissent les *Pseudomonas* fluorescentes et sont considérés comme de produits primaires de ces bactéries.

La structure des Pvds varie d'une espèce à l'autre et même entre les souches de la même espèce. Les différentes souches de *P. aeruginosa* produisent trois types de Pvds de structures différentes : PvdI, PvdII, PvdIII. Cette variabilité structurale constitue un outil de différenciation et de taxonomie au sein du genre *Pseudomonas* : le sidérotypage.

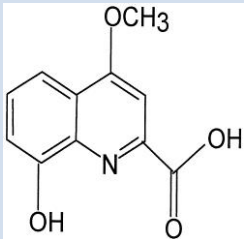
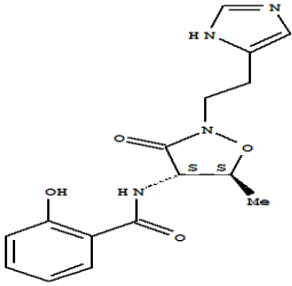
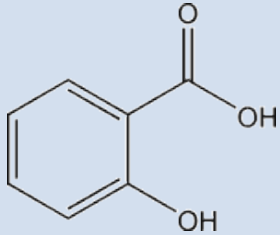
La production ou l'absence de production des pyoverdines permet de classer les espèces du genre en deux groupes :

- *Pseudomonas* du groupe fluorescent : exemples : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. putida*, *P. plecoglossidica*, *P. simiae*, *P. syringae*
- *Pseudomonas* du groupe non-fluorescent : exemples : *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. fragi*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*

2.2.1.2. Autres sidérophores produits par les *P. fluorescents*

Les *Pseudomonas* fluorescents ont la capacité de produire d'autres types de sidérophores. Le tableau (4) suivant montre quelques exemples

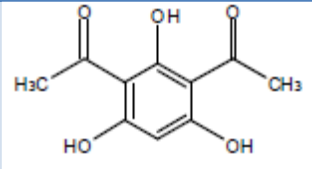
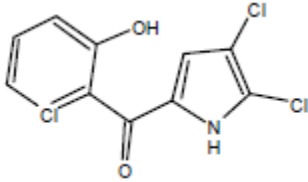
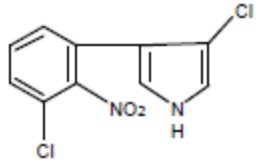
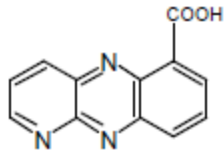
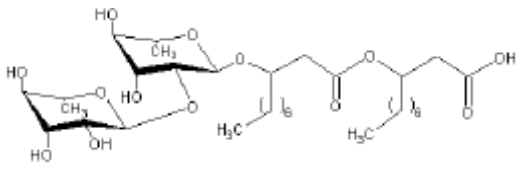
Tableau 4. Autres types des sidérophores produits par les *Pseudomonas* fluorescents

Type des sidérophores	Caractéristiques	Structure
Quinolobactine	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Comporte une structure quinoléine ✓ Une affinité moyenne pour le fer ✓ Anti-Pythium 	
Pseudomonine	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nouveau isoxazolidone similaire à la pyocheline ✓ Possède un fragment histamine 	
Acide salicylique	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Faible affinité pour le fer 	

2.2.2. Antibiotiques

Plusieurs souches de *Pseudomonas* fluorescents sont capables de produire une gamme d'antibiotiques tels que le 2,4-diacetylphloroglucinol(DAPG), le cyanure d'hydrogène (HCN), les rhamnolipides, l'oomycine A, la phenazine, la pyocyanine, la pyrrolnitrine, ou des lipopeptides cycliques. Le tableau suivant montre quelques antibiotiques produits par ces souches (**tableau 5**).

Tableau 5. Principaux antibiotiques sécrétés par les *Pseudomonas* fluorescents (Dwivedi and Johri 2003)

Nom	Structure moléculaire
2,4-Diacétylphloroglucinol	
Pyolutéorine	
Pyrrolnitrine	
Phénazines	
Rhamnolipides	

Howell *et al* (1979), ont montré l'efficacité de la pyrrolnitrine comme inhibiteur de la croissance de pathogènes du cotonnier tels *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Alternaria sp.*, *Verticillium dahliae*, ainsi que l'activité inhibitrice de la pyoluteorine vis-à-vis de la croissance de *Pythium ultimum*.

2.2.2.1 Les phénazines

Les phénazines est un groupe hétérogène des petites molécules organiques d'origine microbienne (figure 10/A). L'aptitude à les produire est limitée aux bactéries (*Pseudomonas*, *Bulkholderia*, *Streptomyces*, *Sorangium*, *Nocardia* et *Brevibacterium*). Ces molécules sont produites de faibles concentrations et peuvent avoir un effet délétère pour la croissance ou les activités métaboliques d'autres

microorganismes (Kavitha, Mathiyazhagan *et al.* 2005). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des phénazines avec un grand spectre d'activité contre les bactéries et champignons (Faille 2010). Ces métabolites ont différentes fonctions biologiques et participent notamment à la virulence de la bactérie (Mavrodi, Ksenzenko *et al.* 1998; Wang, Kern *et al.* 2010).

Les phénazines sont parmi les métabolites secondaires les plus importants produits par *P.aeruginosa*. Cette dernière produit 4 phénazines différentes : la pyocyanine (1-hydroxy-5-méthylphénazine), la phénazine-1-carboxylique acide (PCA), la 1-hydroxyphénazine (1-OHPHZ) et la phénazine-1-carboxamide (PCN) (figure 10/A).

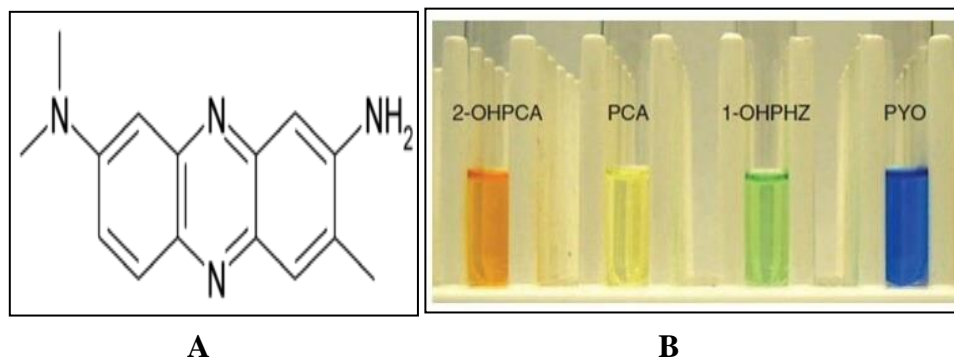


Figure 10. A/ Structure des phénazines.

B/ Phénazines produites par les différentes espèces de *Pseudomonas* (Price-Whelan *et al.*, 2006).

2- OHPCA : 2-hydroxyphénazine; PCA : phénazine-1-carboxylique acide; 1-OHPHZ : 1-hydroxyphénazine; PYO : pyocyanine

3. *Pseudomonas* fluorescents dans la rhizosphère

Les *Pseudomonas* spp fluorescents associés aux plantes incluent des souches pathogènes et des souches bénéfiques (Rabhi, 2011). Les souches de *Pseudomonas* fluorescentes influençant efficacement l'hôte végétal, sont désignés comme des « plant-probiotic fluorescent *Pseudomonas* spp » (Höfte and Altier 2010). Les *Pseudomonas* ne forment pas une symbiose similaire à celle formée par les autres *rhizobia* avec les plantes, cependant ils sont capables de pénétrer les tissus végétaux et s'établir comme des endophytes (Marquez-Santacruz, Hernandez-Leon *et al.* 2010).

Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer les effets bénéfiques des *Pseudomonas* spp fluorescents dans la rhizosphère. D'abord, ces bactéries sont attachées à la racine par le phénomène de chimiotactisme exercé par les exsudats racinaires en particulier les sucres et les acides aminés, puis distribuées de façon passive. Ensuite, elles se multiplient et colonisent de façon active la rhizosphère. **(Rabhi ,2011).**

Les espèces de *Pseudomonas* fluorescents ont un grand pouvoir de chélation du fer et pourraient rendre l'ion ferrique inaccessible aux autres microorganismes notamment les espèces pathogènes. En plus, elles peuvent produire des métabolites interférant avec la croissance des phytopathogènes, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produit le cyanure d'hydrogène (HCN) qui réduit la pathogénicité des champignons tels *Thielaviopsis basicola*, agent de la pourriture noire du tabac **(Mercado-Blanco et Bakker, 2007).**

Les espèces de *Pseudomonas* affectent également la croissance des plantes en améliorant leur alimentation minérale. *Pseudomonas striata*, *P. cissicola* , *P. fluorescens*, *P. pinophilum*, *P. putida*, *P. syringae* , *P. aeruginosa*, *P. putrefaciens* et *P. stutzeri* isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche, du maïs, du soja et d'autres céréales solubilisent efficacement les phosphates **(Tilak et al., 2005).**

B. Les *Pseudomonas* spp fluorescents qu'agents de lutte biologique

Une nouvelle lumière a été apportée sur le rôle de ces microorganismes dans le fonctionnement des écosystèmes grâce à l'étude et la compréhension de l'effet de la rhizosphère sur les communautés microbiennes ainsi que l'effet de ces dernières sur la croissance des plantes **(Rai, 2017).**

Différentes espèces de *Pseudomonas* fluorescents ont été rapportées comme des PGPR et sont appliquées comme agents de biocontrôle contre les microorganismes pathogènes notamment les champignons phytopathogènes grâce à leur abondance dans la rhizosphère **(Rovira and Sands 1971)** . *P. aeruginosa* (Bano et Musarrat, 2003), *P. putida* **(Scher and Baker 1980)**, *P. chlororaphis* **(Chin-A-Woeng, Thomas-Oates et al. 2001)**. Ces bactéries non seulement stimulent la croissance des plantes et réduisent les maladies causées par les phytopathogènes

(bactéries, champignons, virus, nématodes), mais aussi améliorent la défense de la plante, ce qui est désigné par ‘résistance systémique induite’ (ISR) (Rai, 2017).

P. fluorescens et *P. putida* sont des agents actifs de biocontrôle contre les maladies des plantes transmises par le sol (le piétin échaudage des céréales, les fontes de semis du cotonnier, du concombre, du blé...etc). Ils peuvent prévenir les effets délétères des organismes phytopathogènes par la production des métabolites antibactériens et antifongiques (Rovira and Sands 1971; Gaur, Shani *et al.* 2004; Hayat, Ali *et al.* 2010; Sharma, Bora *et al.* 2017). Ces bactéries produisent des métabolites secondaires tels que les sidérophores, les antibiotiques, les composés volatiles, HCN, les enzymes et les phytohormones. *P.fluorescens* isolée de la rhizosphère de riz a été rapportée comme un agent suppressif de la brûlure bactérienne causée par *X. oryzae pv. Oryzae* (Jeyalakshmi, Madhiazhagan *et al.* 2010). Toutes fois, les *Pseudomonas* spp fluorescents ne sont pas toutes des antagonistes et le degré de contrôle dépend de la disponibilité des micronutriments dans le sol ; notamment les sels minéraux ; leurs effets sur le pathogène ou l’interaction hôte-pathogène.

Tableau 6. Les principales maladies transmises par le sol contre lesquelles l’utilisation de *Pseudomonas* fluorescents a déjà été envisagée (Jacques, Delfosse *et al.* 1993)

Maladie	Agent phytopathogène	Cultures
Piétin échaudage	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Cereales, gazon..
Fonte des semis	<i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Cotonnier, blé, pois chiche, soja, pois
Verticilliose	<i>Verticillium dahliae</i>	Pomme de terre, palmier, olivier,
Pourriture des tubercules	<i>Erwinia carotovora</i>	tomate
Pourriture des racines	<i>Thielaviopsis basicola</i>	Pomme de terre
Pourriture du collet	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Tabac
Fusarioses des racines et du collet	<i>F.o.f.sp. lycopersici</i> <i>Fusarium solani</i>	Arachides Tomates Haricot, lentille

Fusarioses vasculaires	<i>Fusarium oxysporum spp.</i>	
	<i>F.o.f.sp. lentis</i>	Lin, concombre, radis,
	<i>F.o.f.sp. albedinis</i>	Lentille Palmier, dattier
Galle du collet	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Arbres fruitiers, vigne

- **Modes d'action de *Pseudomonas* spp fluorescents en lutte biologique**

Les rhizobactéries, du groupe *Pseudomonas* spp. fluorescents, agissent d'une façon directe sur la croissance des plantes en stimulant leurs aptitudes physiologiques (**van Loon and Glick 2004**) et/ou indirectement en limitant les actions néfastes des agents pathogènes et délétères.

1. Compétition spatiale/trophique

L'effet protecteur conféré par les *Pseudomonas* fluorescents agents de biocontrôle, est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels ou pour les niches écologiques (**Bakker, Ran et al. 2003**). La compétition pour les nutriments se fait généralement par la disponibilité en fer dans le milieu. Par la production de sidérophores, les *P. fluorescens* piègent le fer présent dans le milieu en privant les autres microorganismes et en inhibant leurs pouvoirs de pathogénicité (**Meliani 2012**).

Certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* sont dotées d'une capacité agressive à coloniser les racines des plantes (**Haas and Keel 2003**). La réduction de la maladie peut être le résultat d'une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (**MESSAOUDI 2015**).

2. Antibiose

Ce mécanisme est le plus connu et le plus répandu chez les *P.fluorescens*, ce qui leurs confèrent la particularité d'être des agents de biocontrôle. Nombreux métabolites secondaires à activités antifongiques et/ou antibactériennes sont

synthétisés par les *P. spp* fluorescents. L'acide cyanhydrique (HCN), la pyoluteorine, le DAPG, la pyrrolnitrine, les phénazines (PCA) sont identifiées (cf paragraphe 2.2.1. p20-21).

3. Parasitisme

Le parasitisme est un type d'association entre deux microorganismes dont le premier (appelé hôte) est blessé ou tué par un autre (appelé parasite). Ce type d'association qui existe entre les parasites et les pathogènes des plantes peut conduire à la lutte biologique.

4. Induction de la résistance systémique (ISR)

L'expression de mécanismes de défense systémiques chez les plantes peut être initiée suite à l'interaction avec certaines rhizobactéries non pathogènes (**Meliani 2012**), parmi lesquelles *Pseudomonas spp* fluorescents ont la capacité d'induire une résistance (ISR) chez la plante contre les champignons phytopathogènes.

Certains *Pseudomonas* colonisant les racines protègent les plantes des phytopathogènes par l'induction de la résistance systémique (**Weller 2007**). Van Peer *et al.*, (**Van Peer, Niemann *et al.* 1991**) ont rapporté que la souche *Pseudomonas* WCS417 a induit une résistance chez l'espèce *Dianthus caryophyllus* (œillet giroflé) contre la fusariose causée par *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* lorsque les racines ont été inoculées avec des bactéries une semaine avant l'inoculation avec le pathogène. Cette souche a été isolée de la rhizosphère de blé et a également favorisé la croissance de plusieurs cultures. Par la suite, les souches WCS417 et WCS374 ont montré une induction de la résistance chez le radis contre *F. oxysporum f. sp. raphani* et autres pathogènes (**Hoffland, Hakulinen *et al.* 1996**). WCS417 appliquée comme un traitement de semence des graines de radis a montré une réduction de la flétrissure fusarienne de 42% et augmentation du rendement de 45% (**Leeman, Van Pelt *et al.* 1995**).

Wei *et al.*, (**Wei, Kloepper *et al.* 1991**), ont démontré que la souche *P. putida* 89B-27 induit la résistance des feuilles de concombre contre l'antracnose, causée par *Colletotrichum orbiculare*. Ainsi, la souche bactérienne *P.fluorescens* CHAO provoque une augmentation du chevelu racinaire et la résistance naturelle au *Thielaviopsis basicola* des plantes de tabac bactériées (**Voisard, Keel *et al.* 1989**).

B. *Pseudomonas* spp fluorescents qu'agent de phytostimulation

- **Modes d'action en phytostimulation**

Les *Pseudomonas* spp fluorescents sont capables de synthétiser des métabolites secondaires qui influencent positivement sur la croissance des plantes (Sturz and Christie 2003). La quasi-totalité des travaux effectués sur la phytostimulation a mis en exergue une amélioration généralisée sur la nutrition minérale de la plante, néanmoins des études spécifiques ont montré des effets particuliers sur les apports en fer, en phosphore, en azote et en manganèse. Le tableau suivant représente les modes d'action des *Pseudomonas* fluorescents phytostimulatrices (tableau 7).

Tableau 7. Effets des *Pseudomonas* spp fluorescents agents de phytostimulation (Reddy 2016)

Amélioration de nutrition	<p>Fer : synthèse des sidérophores en condition de carence en fer tels que les pyoverdines, pyochelines, ferribactines, pseudomonines.</p> <p>Phosphore : solubilisation du phosphore naturel puisse servir dans le métabolisme et la croissance des plantes en séquestrant les cations métalliques intervenant dans son absorption et en le libérant lorsqu'il est lié aux argiles et à l'oxyde de fer d'aluminium.</p> <p>Azote : la dénitrification dissimulatrice profitable pour la plante, la stimulation de la nodulation des légumineuses en association avec <i>Rhizobium</i> spp.</p>
Production de substances de croissance	<p>Manganèse : solubilisation du manganèse grâce à des agents chélateurs (composés phénoliques, acides organiques). Augmentation de sa disponibilité dans le milieu.</p> <p>Phytohormones : tels que les auxines principalement l'Acide-indole-acétique (AIA)</p> <p>Ethylène : en faibles concentration peut favoriser réellement la croissance chez plusieurs espèces végétales, en synthétisant l'enzyme vitale, "ACC" (1- aminocyclopropane-1-carboxylate desaminase) qui régule la production de l'éthylène.</p> <p>Gibbérellines, Cytokinines et composés vitaminiques</p>

Matériel et méthodes

Première partie : Isolement, sélection, purification, conservation des *Pseudomonas* spp fluorescents à partir de la rhizosphère

1. Isolement des *Pseudomonas* spp fluorescents rhizosphériques

1. Echantillonnage

Six échantillons de sols rhizosphériques (1, 2, 3, 4, 5 et 6) ont été prélevés au niveau de la commune de Béni-Saf, wilaya d'Ain Témouchent, Nord-Ouest d'Algérie (**Figure 11**), en mois de Mars 2018 à partir des trois sites distincts des champs exploités en céréaliculture : blé dur (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) et orge (*Hordeum vulgare*) (**figure 12**). Chaque échantillon de sol est composé de plantules et de sol rhizosphérique adhérent. Le tableau 8 précise la localisation géographique, le type de la rhizosphère (plante d'origine) et le code de chaque échantillon.



Figure 11. Localisation géographique des trois sites de prélèvements (**google maps, 2018**).

S1 : Ghar El Baroud

S2 : Ferme de Remini

S3 : Oued DIRIS

Tableau 8. Code et localisation géographique des échantillons utilisés pour l'isolement

Code de l'échantillon		Localisation géographique	Plante	Site
S1	Parcelle 1	35°17'17.9"N 1°23'19.0"W	Blé dur	Ghar El Baroud
	Parcelle 2	35°17'17.3"N 1°23'21.7"W		
S2	Parcelle 1	35°17'01.0"N 1°23'54.5"W	Blé dur	Ferme de REMINE
	Parcelle 2	35°16'59.4"N 1°23'55.8"W		
S3	Parcelle 1	35°16'48.5"N 1°23'52.2"W	Orge	Oued DIRIS
	Parcelle 2	35°16'48.2"N 1°23'51.1"W		

Au niveau de chaque site, les prélèvements ont été effectués sur 2 parcelles prises au hasard. Dans chaque parcelle. Des plants entiers des mêmes cultures ont été prélevés avec leurs systèmes racinaires. Suffisamment de sol a été gardé autour du système racinaire pour éviter une perte rapide de l'humidité.

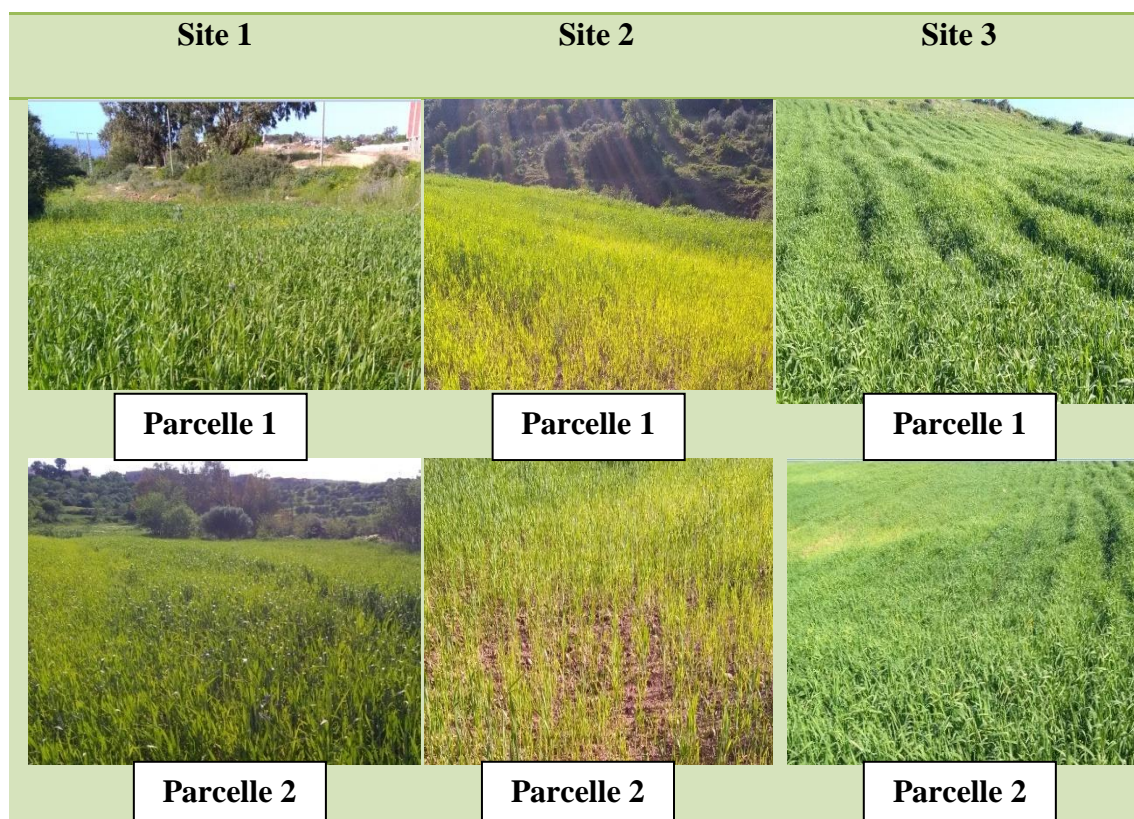


Figure 12 Les différents sites de prélèvement des échantillons de blé dur et d’orge (photos originales).

2. Procédure d’isolement

Les plantules végétales ont été fortement secouées pour enlever le sol adhérent à leurs racines, ces dernières ont été découpées à l’aide d’un scalpel stérile en portions de 2 à 3 cm de longueur. L’isolement des bactéries a été effectué par la méthode des suspensions-dilutions selon le protocole suivant :

Dans des fioles stériles de capacité de 250 ml, 10 g de chaque échantillon de sol ont été additionné à 100 ml d’eau physiologique stérile et agiter pendant 20 minutes à une température ambiante ;

Des tubes à essais contenant 9 ml d’eau distillée stérile ont été préparés ; à l’aide d’une micropipette, 1 ml de la suspension mère (10^{-1}) a été stérilement prélevé puis ajouté au premier tube à essai contenant 9 ml d’eau distillée stérile, constituant la deuxième dilution (10^{-2}) ; Des dilutions décimales successives (jusqu’à 10^{-6}) ont été préparées de la même façon

Le milieu de culture King B agar (**King et al., 1954**) (Annexe I) a été utilisé pour l’isolement des bactéries à partir des dilutions préparées.

A partir de chaque dilution (10^{-3} 10^{-4} et 10^{-6}), un volume de 100 μ l a été étalé sur deux boîtes de Pétri contenant le milieu King B agar. Les boîtes ont été incubées dans une étuve à une température de 28°C pendant 24/48 h.



Figure 13. Les six échantillons des sols rhizosphériques et racines des plantules après agitation (photo originale)

2. Sélection des colonies bactériennes et purification

La caractérisation phénotypique traditionnelle est toujours admise comme étape primordiale voir indispensable pour la séparation des bactéries nouvellement isolées. Après 48 h d'incubation à 28°C, les 25 colonies les plus représentatives ont été sélectionnées en se basant sur des critères morphologiques (couleur, aspect extérieur, aspect de la bordure, fluorescence sous UV...etc) (**AnnexeII**).

Après 48h d'incubation à 28°C, 19 colonies d'apparences différentes, fluorescentes développées sur le milieu King's B, ont été purifiées sur des nouvelles boîtes de pétri contenant le milieu King's B agar puis désignées par un code (**tableau 9**) puis incubé à 28°C pendant 48h.

Tableau 9. Les différents codes des souches de *Pseudomonas* spp rhizosphériques purifiées et vues sous UV_{365nm}

Code des souches isolées	Origine
GB11	Ghar El baroud
GB12	Parcelle n° 1
GB13	
GB14	
GB21	Ghar El baroud
GB22	Parcelle n° 2
GB23	
FR12	Ferme Remini
FR13	Parcelle n° 1
FR14	
FR15	
FR21	Ferme Remini
FR22	Parcelle n° 2
FR23	
FR24	
FR25	
OD11	Oued DIRIS
OD13	Parcelle n° 1
OD21	Oued DIRIS parcelle n°2

3. Conservation des souches

Après incubation à 28°C pendant 48 heures, les souches purifiées ont été placées au réfrigérateur à 4°C. Un repiquage régulier a été effectué pour garder leur viabilité. Pour une conservation de longue durée, les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents ont été maintenues au congélateur dans des tubes cryogéniques contenant le milieu King's B additionné de 30 % de glycérol.

Deuxième partie : Criblage des souches de *Pseudomonas* spp fluorescentes rhizosphériques phyto-bénéfiques

1. Préparation de l'inoculum

Les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents sélectionnées ont été cultivées individuellement sur le milieu King's B. Après 48h d'incubation à 22°C, les cultures bactériennes ont été collectées par addition de l'EDS dans chaque boîte et raclage à l'aide d'un étaleur stérile.

La densité optique des suspensions mères des souches a été d'abord déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 560 nm, puis ajustée par des dilutions appropriées des suspensions à D.O= 2.0, équivalente à une concentration de 10^9 à 10^{10} UFC/ml.

2. Désinfection des graines de laitue (*Lactuca sativa*)

Les graines de laitue ont subi une désinfection superficielle par trempage à deux reprises dans l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 2 min, et rinçage abondant à l'EDS après chaque trempage. Dans des conditions d'asepsie, les graines désinfectées ont été séchées dans du papier buvard stérile puis dispersées dans des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée en raison de 20 graines par boîte puis incubées pendant 24 heures à température ambiante (**figure 14**).

3. Le test *in vitro* (bio-test de *Lactuca sativa*)

Ce test permet la sélection des souches de *Pseudomonas* spp fluorescentes stimulatrices de la croissance végétale en vue de la sensibilité des graines de la laitue. Ce test s'agit de l'inoculation des graines de cette plante prégermées sur boîte de pétri par les souches de *Pseudomonas* spp fluorescentes et ensuite la mesure du pourcentage de germination et la longueur des racines après 48 h d'incubation.



Figure 14. Les graines de laitue (*Lactuca sativa* L.) prégermées de 24 heures

Troisième partie : Caractérisation morpho-physicochimique des souches de *Pseudomonas* spp fluorescente phyto-bénéfiques sélectionnées

Les souches codées (FR15, OD11, OD21, FR13, FR14, OD13, GB13, FR24) ont été identifiées selon leurs caractères morphologiques et biochimiques

1. Aspect des colonies :

Après repiquage des souches, Les colonies sont soumises à l'observation macroscopique (forme, couleur, relief, diamètre etc...). L'observation est réalisée après culture sur les deux milieux différents, King B et Nutrient Agar (NA).

2. Aspect microscopique :

2.1. La mobilité bactérienne (observation à l'état frais) :

L'observation microscopique à l'état frais est réalisée sur des cultures en phase de croissance exponentielle. Une colonie pure est prélevée et mélangée avec une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique (OPTIKA®) au grossissement x 40.

2.2. Coloration de Gram :

La coloration différentielle de Gram a été réalisée selon le protocole cité dans l'annexe III.

3. Recherche de la catalase

Une colonie bactérienne est déposée sur une lame en verre propre en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10 volumes. Une réaction positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène.

4. Recherche d'oxydase

L'oxydase est recherchée sur des disques commercialisés pour la recherche de l'oxydase. Une colonie pure est déposée sur le disque, la réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

5. Croissance à 4°C et à 41°C

Les huit souches sélectionnées ont été testées pour leur pouvoir de croissance à température basse (4°C) et élevée (41°C), une suspension bactérienne a été préparée par l'inoculation d'une colonie dans un tube contenant 15 ml de bouillon nutritif (BN) puis incubée à 28°C pendant 48 heures.

Quatrième partie : Production des enzymes d'intérêt agricole

Certaines enzymes produites par les bactéries du sol (cellulase, la chitinase, protéase etc.) jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique dans le sol en participant à sa fertilité et à la disponibilité des éléments minéraux nécessaires pour la nutrition des plantes. En plus, ces enzymes peuvent jouer un rôle dans la suppression des maladies des plantes causées par les phytopathogènes en participant dans la dégradation des parois cellulaires (Abdelwahab 2017).

1. Cellulases

Pour révéler l'expression d'enzymes à activité cellulasique, un bouillon ordinaire (BN) a été préparée en rajoutant de la cellulose comme la seule source de carbone, puis le milieu ainsi préparé est autoclavée à 121°C/20 min.

Les 8 souches ont étéensemencées dans des tubes contenant 15ml de BN, puis incubées à 28°C pendant 24 heures. Après 24 h d'incubation le réactif de Fehling (A et B) est rajouté puis chauffé, l'apparition d'un culot rouge brique indique une réaction positive.

2. Amylases

La mise en évidence de la capacité des souches étudiées à dégrader l'amidon est réalisée sur un milieu de culture à base d'amidon (gélose à l'amidon) (AnnexeI)

Les 8 souches ont étéensemencées par touche (spots) dans une boites de pétri, puis incubées à 28°C pendant 24 heures. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo clair autour les colonies après inondation de la boite par une solution de lugol.

3. Protéases

La révélation de l'activité protéasique des isolats est réalisée sur la gélose au lait préparée comme suite : au 100 ml de gélose ordinaire liquéfiée et refroidie à 45°C, 5ml de lait stérilisé est ajouté. Les souches étudiées ont étéensemencées par touche (spots) dans une boites de pétri, puis incubées à 28°C pendant 24 heures. Une réaction positive est révélée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

4. Lipases

La recherche de lipases est effectuée par la mise en culture des isolats sur GN additionné de 1% d'acide oléique. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo autour des colonies.

Cinquième partie : Evaluation de l'activité de biocontrôle des souches sélectionnées et de leurs métabolites secondaires à l'égard d'un champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum est un champignon tellurique filamenteux décrit par Snyder et Hansen en 1940, ce champignon a la capacité de provoquer des maladies sur de nombreuses espèces végétales cultivées, d'intérêt économique (**Armstrong and Armstrong 1981**). En effet, certaines souches de *F.oxysporum* sont dites pathogènes et engendrent des fusarioses (trachéomyose, nécrose, fontes de semis) sur des plantes hôtes.

La détection du pouvoir antagoniste des isolats sélectionnés à l'égard de *F. oxysporum* par la synthèse des métabolites secondaires a été testée *in vitro*. La souche de *F. oxysporum* nous a été fournie gracieusement par Mr Ider Sofiane, laboratoire de Microbiologie, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella.

1. Extraction et identification des métabolites antifongiques

a. Evaluation du pouvoir antagoniste *in vitro*

Le pouvoir antimicrobien des isolats est déterminé par la mise en culture des suspensions bactériennes étudiées âgées de 18h, avec le champignon phytopathogène, La méthode utilisée « *Dual plate assay* » est celle décrite par (**Vincent, Harrison et al. 1991**). Les 8 isolats bactériens sont étalés à 1cm du bord d'une boîte de Pétri contenant du PDA et incubés pendant une nuit à 28°C, à l'opposé un disque fongique de 8mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte. Les boîtes sont alors incubées pendant une semaine à température ambiante (**figure 15**).

Les résultats sont notés lorsque la croissance des *mycelia* dans les boîtes des témoins atteint les points d'inoculation des souches bactériennes. La réduction du diamètre des colonies mycéliennes du champignon pathogène en présence des souches de *Pseudomonas*, comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

$$I = [(T-C)/T] \times 100$$

I : pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

T : diamètre moyen de mycélium dans la boîte de témoin (mm).

C : diamètre moyen de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (mm).

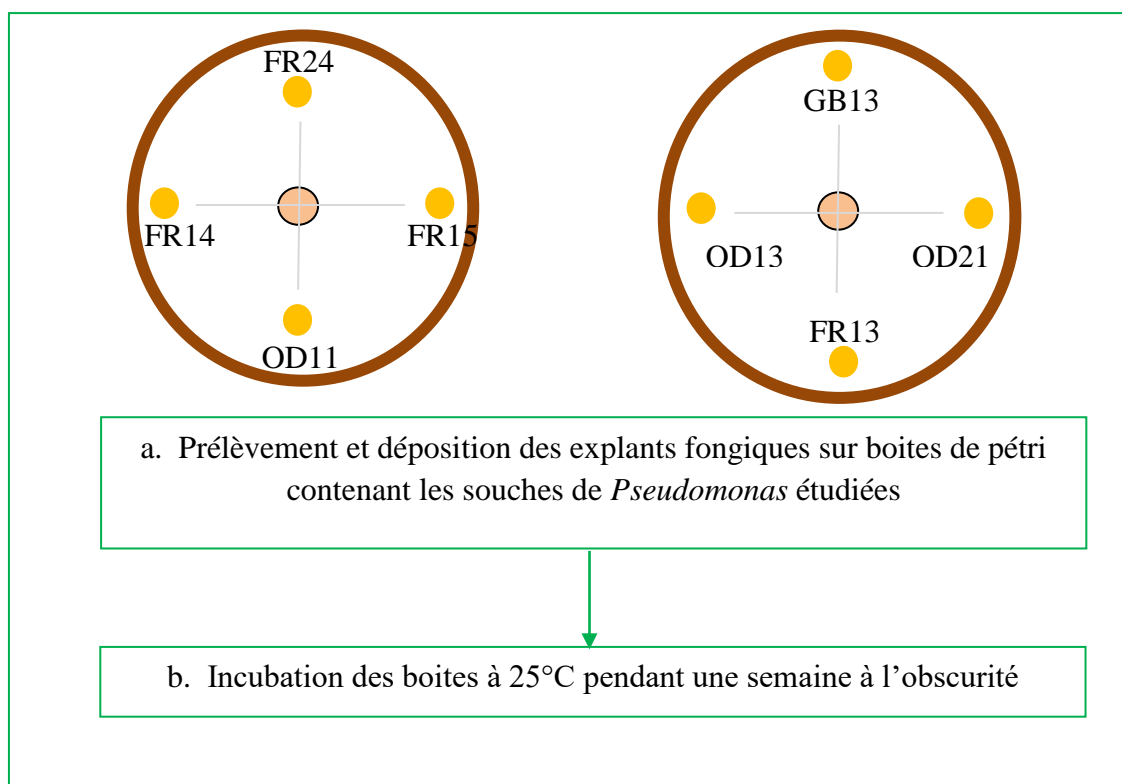


Figure 15. Démarche d'évaluation du pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescentes (originale)

b. Extraction des métabolites antimicrobiens : phénazines et pyrrolnitrines

La recherche de métabolites à effet antibiotique a été effectuée chez les souches ayant manifestées un pouvoir antagoniste vis-à-vis la souche pathogène fongique « *Fusarium oxysporum* ». La production d'antibiotique de nature phénazinique se manifeste par des colonies pigmentées sur PDA qui lorsqu'elles sont examinées sous UV à 365nm révèlent des zones sombres autour des colonies produisant des phénazines (**Thomashow and Weller 1988**).

- **Extraction des phénazines et pyrrolnitrines**

La production des phénazines et pyrrolnitrines, *in vitro*, a été recherchée chez les souches FR14 et FR15 ayant manifestés un pouvoir antagoniste plus important (52,72% et 41,81 %) respectivement vis-à-vis le champignon pathogène *F.ox*.

Les inoculums frais de 18 heures des souches FR14et FR15 ont été inoculés dans des Erlenmeyers de capacité de 250 ml contenant 100 ml de BN à l'extrait de levure, puis incubés pendant 5 jours à 28°C sous agitation permanente (180 rpm).

Pour l'extraction des phénazines, les bouillons de fermentation ont été acidifiés (pH2) avec HCl puis centrifugés à 10,000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été extrait avec le même volume d'acétate d'éthyle, la phase organique contenant les métabolites a été d'abord filtrée à travers du sulfate d'ammonium anhydre, puis évaporée sous vide dans un rotavapor à 55°C. L'extrait sec est remis en suspension dans 1ml de méthanol. Pour l'extraction des pyrrolnitrines, les culots ont été suspendus dans 5ml d'acétone et mélangés puis la phase d'acétone est évaporée et la phase aqueuse résiduaire a été extrait avec 15ml d'acétate d'éthyle puis évaporée à 55°C, le résidu sec a été retenu dans 25µl de méthanol.

- **Chromatographie sur couche mince**

Le fractionnement de l'extrait a été effectué par CCM sur gel de silice. Le volume de dépôt est de 30 µl et la phase mobile est constituée de chloroforme/acétate d'éthyle (1:1). Après migration et évaporation du solvant, les bandes ont été délimitées et les rapports frontaux sont calculés (R_f).

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par un composant}}{\text{distance parcourue par un solvant}}$$

2. Evaluation de l'activité antifongique des extraits métaboliques

L'activité antifongique des extraits brutes obtenus des souches bactériennes FR14 et FR15 a été testée contre deux champignons phytopathogènes *F.ox* et *Aspergillus niger* selon la méthode des disques (Vincent 1947). Les disques stériles ont été imprégnés dans une solution d'extrait brut des métabolites puis placés dans des boîtes de pétri contenant au centre un explant fongique, puis incubées à 28°C pendant une semaine l'activité antifongique est exprimé en fonction du pourcentage d'inhibition (I%).

Résultats et
discussions

I. Isolement des *Pseudomonas* spp fluorescents à partir de la rhizosphère

L'isolement à partir de la partie rhizosphérique des six parcelles de blé dur et d'orge pour les trois sites d'échantillonnage, nous a permis d'obtenir 25 souches de *Pseudomonas* dont 10 souches (soit 40%) ont été isolées de la région Ghar El Baroud, 9 souches (soit 36%) ont été isolées de la Ferme REMINI et 6 souches (soit 24%) sont originaires de la région Oued DIRIS. D'autre part, 19 souches (soit 76%) sont originaires des fragments des racines de blé dur (S1 et S2), 6 souches (soit 24%) ont été isolées des fragments des racines d'orge (S3).

Après le test de fluorescence sous UV_(365nm), uniquement 19 souches ont révélés la présence d'un pigment vert fluorescent (Pvd) (**figure 16**). Ces dernières ont fait l'objet d'un repiquage sur des nouvelles boîtes de pétri contenant le milieu King's B en vue de leur purification.

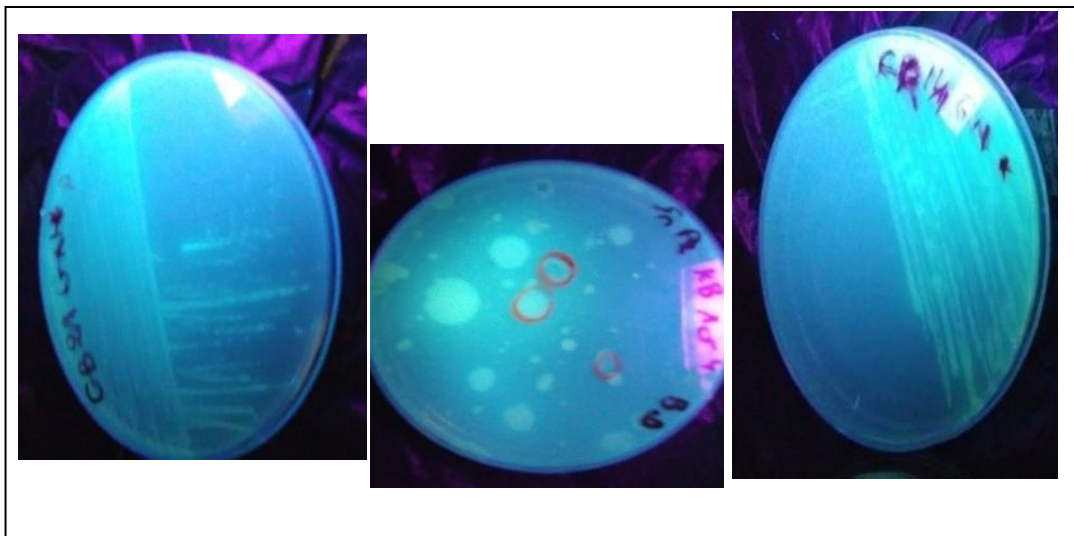


Figure 16. Aspect des colonies de *Pseudomonas* spp fluorescents sous UV (365nm)

II. Sélection « screening » des souches de *Pseudomonas* spp fluorescentes rhizosphériques phyto-bénéfiques

Le criblage des souches *Pseudomonas* fluorescentes phyto-bénéfiques révèle un test important par le biais d'un test *in vitro* ; bio-test sur graines de laitue.

Le bio-test nous a permis de classer les 19 souches de *Pseudomonas* fluorescentes en trois catégories comparativement au témoin non inoculé (**figure 17/2**) : les souches inhibitrices de la croissance des plantules de *Lactuca sativa* L. (4 souches, soit 21,04%), les souches stimulatrices de la croissance (8 souches, soit 42,10%) (**Figure 17/1**) et les souches sans effet sur la croissance végétale (7 souches, soit 36,84%).

Par ailleurs, nous avons constaté que certaines souches inhibitrices ont causé non seulement l'inhibition totale de la croissance des graines germées mais aussi une nécrose d'une partie des racines (**figure 17.3**).

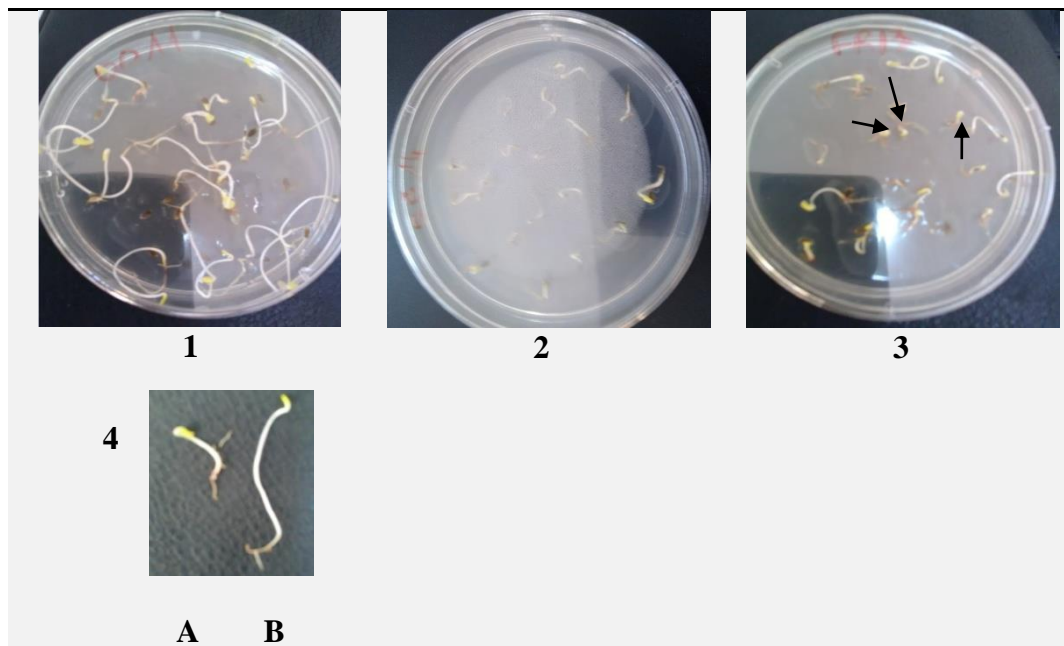


Figure 17. Effet des souches de *Pseudomonas* spp fluorescentes en bio-test de laitue

- 1. A/ stimulation de la croissance
- 2. témoin non inoculé
- 3. inhibition de la croissance
- 4. A/ plantule témoin B/ plantule stimulée
- La flèche indique une nécrose

Le tableau ci-dessous résume les résultats de calcul de l'effet des 8 souches étant stimulatrices de la croissance sur la longueur des racines des graines de laitue :

Tableau 10. Les souches *Pseudomonas* spp fluorescents ayant un effet stimulateur de la croissance des racines (mesure de la longueur des racines bactériées).

Souches	Longueur moyenne des racines de <i>Lactuca sativa</i> L. (mm)
FR15	13,1
Témoin	15,2
OD21	17,6
GB13	17,9
FR24	18,9
OD13	20
FR13	20,8
FR14	22
OD11	23

Les 8 souches ont causé une stimulation de la germination et l'élongation des racines des graines de laitue. Il ressort de ces résultats que parmi les huit souches, 7 souches ont causé une stimulation significative (**figure 17.4B**) comparativement au témoin, sauf la souche FR15 qui a causé une stimulation moins importante que le témoin.

Prenons en considération de l'origine géographique des souches, 1 souche (soit 12,5%) est originaire du premier site (Ghar El Baroud), 4 souches (soit 50%) sont originaires du deuxième site (Ferme REMINI) dont 2 souches ont causé les meilleures stimulations de la longueur des racines de *Lactuca sativa*. Enfin, 3 souches sont originaires du troisième site (Oued DIRIS) (soit 37,5%) dont une souche a causé une stimulation maximale des graines de laitue. La stimulation maximale de la croissance des graines avec une longueur moyenne de 23mm a été obtenue suite à l'application de la souche codée OD11 originaire du troisième site (Oued DIRIS).

III. Caractérisation morpho-physicochimique des souches de *Pseudomonas* spp fluorescente phyto-bénéfiques sélectionnées

1. Aspect des colonies

Les 8 isolats de *Pseudomonas* ont été cultivées sur différents milieux de culture (NA et King's B) afin de les caractériser morphologiquement. Après 48 heures d'incubation, les souches ont été observées à l'œil nu (**tableau 11**), toutes les souches ont développées des petites ou moyennes, lisses, rondes ou irrégulières colonies. 3 souches ont montré une pigmentation jaune verte, tandis que les 5 autres n'ont pas développées une pigmentation. Sous la lumière UV_{365nm}, les souches ont montrés un pigment jaune verdâtre sur les deux milieux de culture, avec une fluorescence très intense dans le milieu King's B.

Tableau 11. Caractéristiques culturelles des isolats de *Pseudomonas* spp fluorescents sur différents milieux de culture

Souches	Aspects des colonies sur NA (Nutrient Agar)	Aspect des colonies sur King's B
OD11	Jaune, ronde, convexe, brillante	Ronde, jaune verte, convexe
FR24	Jaune, ronde, convexe	Ronde, blanche, convexe
OD21	Blanche, irrégulière, lisse, plate, opaque	Irrégulière, blanche, convexe
OD13	Jaune, ronde, convexe	Ronde, jaune verte, convexe
GB13	Jaune, ronde, convexe	Ronde, blanche, bombée
FR14	Jaune, ronde, convexe, brillante	Irrégulière, jaune verte, convexe
FR15	Blanche pâle, bombée	Ronde, blanche, plate
FR13	Blanche, irrégulière, lisse, plate, opaque	Ronde, blanche, plate

2. Examen microscopique

L'observation microscopique à l'état frais a révélé des bacilles très mobiles et asporulés. La coloration de Gram a révélé des bacilles à Gram négatif droits ou légèrement incurvés à bouts arrondis. Les cellules se présentent isolées ou groupées par deux.

3. Caractéristiques physicochimiques

La réaction positive du cytochrome oxydase est un caractère indispensable dans l'identification des espèces de *Pseudomonas*. Toutes les souches sont oxydase (+).

Toutes les souches étudiées sont Gram-, mobiles, catalase (+), citrate (+), ADH (+). Par ailleurs, elles donnent une réponse négative aux, LDC, ODC, TDA, H₂S, Uréase, VP. Toutes les souches produisent un pigment soluble dans l'eau, pyoverdine, sur le milieu King's B. Quatre souches (FR14, FR24, OD11, OD21) sont incapables de synthétiser la pyocyanine sur King'A, et incapables de pousser à 41°C. Ces caractères orientent vers les espèces *P.fluorescens* ou *P.putida*. Par ailleurs la croissance des souches FR14 et OD11 à 4°C confirme leur appartenance à l'espèce *P.fluorescens*. FR24 et OD21 appartiennent à l'espèce *P.putida* en raison de l'absence de la Gélatinase. Les autres espèces (FR13, FR15, GB13, OD13) capables de synthétiser la pyocyanine et croître à 41°C et hydrolysent la gélatine (Gel+) appartiennent à l'espèce *P.aeruginosa* (**tableau 12**).

Tableau 12. Quelques caractères physiologiques et biochimiques de 8 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents étudiées

Tests	Souches							
	FR13	FR14	FR15	FR24	GB13	OD11	OD13	OD21
Coloration de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance sur King B	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance sur King A	+	-	+	-	+	-	+	-
Croissance à 4°C	-	+	-	-	-	+	-	-
Croissance à 41°C	+	-	+	-	+	-	+	-
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	+	-	+	-	+	-	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélatinase	+	+	+	-	+	+	+	-
Lysine décarboxylase (LDC)	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase (ADH)	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine décarboxylase (ODC)	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane désaminase (TDA)	-	-	-	-	-	-	-	-
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer (VP)	-	-	-	-	-	-	-	-

IV. Production des enzymes d'intérêt agricole

Les souches étudiées ont été testées pour leur pouvoir à produire des enzymes impliqués dans la dégradation de la matière organique ainsi dans la suppression des maladies fongiques en dégradant les parois fongiques (protéases, cellulases, amylases, etc...). Après 24 heures d'incubation, nous avons noté une absence totale de cellulases chez toutes les souches, alors que les enzymes dégradant les parois fongiques tels que les protéases sont produites par 6 souches, les amylases et les lipases sont produites par 5 souches (**figure 18**). Tenons compte, les souches OD11, FR14, FR24, FR13 sont toutes productrices des protéases, amylases, lipases (**tableau 13**).

Tableau 13. Production des enzymes par les souches de *Pseudomonas fluorescents*

Souches	Protéases	Amylases	Lipases	Cellulases
OD11	+	+	+	-
GB13	-	-	-	-
FR14	+	+	+	-
FR15	+	-	-	-
OD21	-	+	+	-
FR24	+	+	+	-
FR13	+	+	+	-
OD13	+	-	-	-

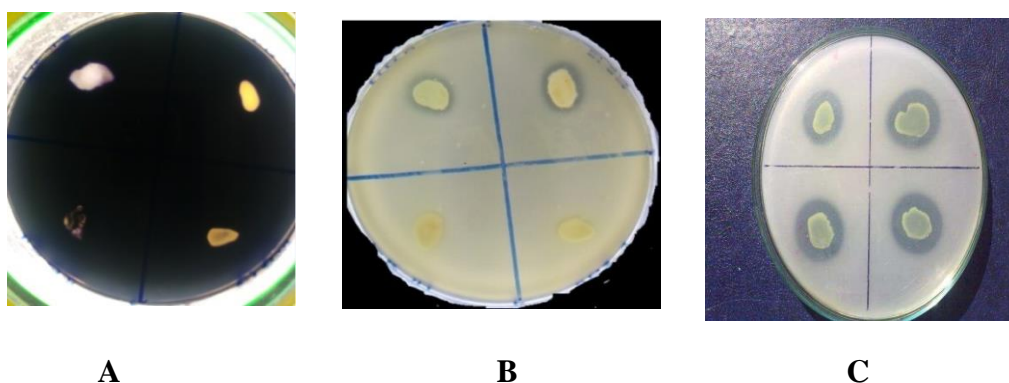


Figure 18. Production des enzymes par les souches étudiées

A/Amylases , B/Protéases, C/lipases

V. Evaluation de l'activité de biocontrôle des souches sélectionnées

1. a. Test d'antagonisme contre *Fusarium oxysporum* in vitro

A travers le test d'antagonisme sur boîte vis-à-vis *Fusarium oxysporum*, nous avons estimé des zones d'inhibition autour le champignon développées par les souches *Pseudomonas* fluorescent.

4 souches (OD11, FR24, FR15, FR14) parmi les 8 souches manifestent une action inhibitrice vis-à-vis le champignon phytopathogènes (**figure 20**). Le diamètre des colonies mycéliennes de *F. oxysporum* a été réduit fortement en présence des souches antagonistes de *Pseudomonas* fluorescents, comparé au témoin non inoculé. L'action inhibitrice la plus forte est estimée à 52,72% pour la souche FR14, 41,81% pour la souche FR15 et 34,54% pour la souche FR24. La souche OD11 montre la plus faible action inhibitrice avec un pourcentage d'inhibition de 12,72% (tableau 14).

La présence des zones d'antibiose autour le pathogène montre la présence de métabolites secondaires à effet antifongique synthétisés par les souches ayant manifestés une action inhibitrice contre le pathogène.

D'après les travaux de Sharma *et al.*, (2017), trois souches de *Pseudomonas* fluorescents (*putida*, *fluorescens*, *aeruginosa*) ont été criblé pour leur pouvoir antagoniste contre 4 souches fongiques phytopathogènes incluant *F.oxysporum*. Le pourcentage (I%) contre cette espèce fongique était maximal chez la souche *P.aeruginosa* (19,3%), suivi par la souche *P.putida* (I%=17,7%) et le pourcentage le plus faible (14,5%) était pour la souche *P.fluorescens*. (Rabhi 2011), a isolé des souches à partir de rhizoplan et les racines de l'orge cultivé dans un site salin, dont 10 espèces ont montré une activité inhibitrice contre *F.oxysporum* varie de 29 à 36% comparativement à la souche *P.fluorescens* CHA0 (25%). Dans le même contexte (Verma, Sharma *et al.* 2018), ont isolé *P.putida* d'un sol rhizosphérique de pomme, ils ont montré que cette souche inhibe *Dematophora necatrix* (I%=38,46) et *Phytophthora cactorum* (I%=36,18).

Tableau 14. Activité antifongique des espèces de *Pseudomonas* testées contre *F.oxysporum*

Les espèces de <i>Pseudomonas</i>	Pourcentage d'inhibition du champignon pathogène <i>Fusarium oxysporum</i> (C=55mm)	
	(mm dia)	I%
OD11	48	12,72
FR24	36	34,54
FR14	26	52,72
FR15	32	41,81

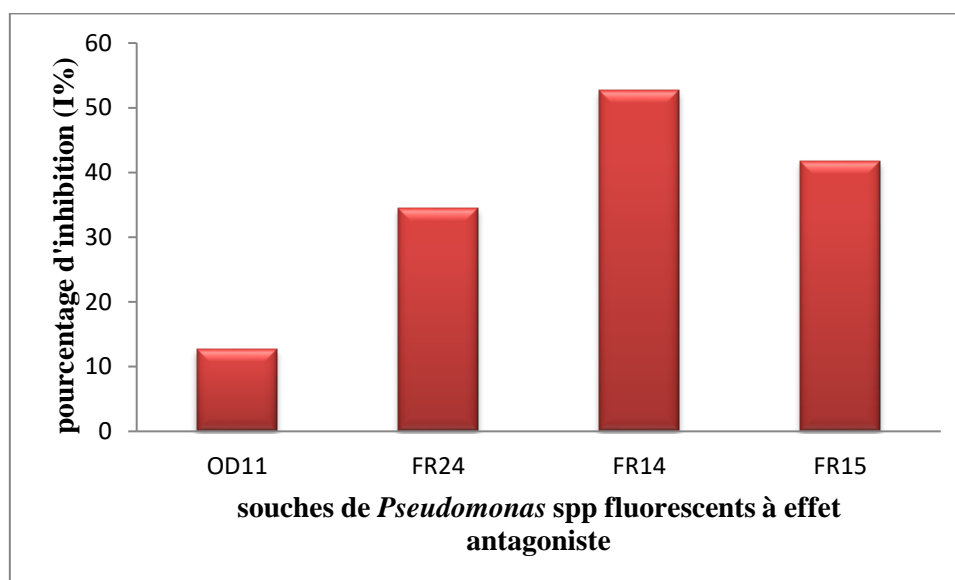


Figure 19. Taux d'inhibition du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* par les souches *Pseudomonas* spp fluorescents testées

b. Extraction des métabolites secondaires à effet antifongique

Les extraits bruts à partir des cultures des souches bactériennes FR14 et FR15 ont été évalués pour les valeurs R_f et la couleur des spots sur la plaque de CCM.

L'extrait phénazinique obtenue par l'acétate d'éthyle a donné sur la plaque de CCM une seule tache de couleur jaune (**figure 20**) avec un rapport frontal égal de

0,62 pour la souche FR14 et 0,6 pour la souche FR15 (**tableau 15**). Ces résultats de cette étude ont été identiques à celles obtenus par Sharma *et al.*, (**2017**) qui ont montré des rapports frontaux qui varient de 0,6 à 0,62 pour les trois souches étudiées (*P.putida*, *P.fluorescens*, *P.aeruginosa*). Mezaache (**MEZAACHE 2012**) a détecté la présence des composés phenaziques extraits d'une culture de la souche *Pseudomonas* (P2) avec trois taches révélant la présence de trois composés actifs avec des rapports frontaux de (0,20-0,3-0,08), une bioautographie effectuée sur les extraits obtenus a montré une ressemblance de la tache (T1) avec le standard utilisé phénazine-1-carboxylate (PCA).

Les extraits de pyrrolnitrine après une séparation sur couche mince, ont montré des résultats négatifs indiquant l'absence de synthèse de ce métabolite chez les deux souches testées FR14 et FR15. Ce métabolite était absent chez la souche *P.putida* testée par Sharma *et al.*, (**2017**).

Tenons en compte que le rapport frontal (facteur de rétention) pour le même composé à séparer varie avec les éluants ou les systèmes de solvants utilisés pour la migration ainsi que le matériau de la plaque et le composé lui-même. Dans les travaux réalisés par (**SHARMA P 2017**), qui ont utilisé un système méthanol-chloroforme (50 :50), la valeur de R_f des phénazines était respectivement 0,6-0,6-0,62 pour les espèces *P.putida*, *P.fluorescens*, *P.aeruginosa*. Dans une autre étude (**MEZAACHE 2012**), qui a utilisé le système benzène-acide acétique, le rapport frontal était de 0,08 à 0,3. (**DAHAAH 2017**), a utilisé le mélange chloroforme-méthanol et le R_f était de 0,85.

Le R_f des produits dépend de leur affinité relative pour la phase stationnaire et la phase mobile. Dans la plupart des cas, la phase stationnaire est polaire (silice, alumine, cellulose). Plus un composé est lui-même polaire, plus il aura d'affinité pour la phase stationnaire et, par conséquent, plus il sera retenu sur la plaque. Plus on augmente la polarité de l'éluant, plus il entre en compétition avec la phase stationnaire et puisqu'il est en mouvement, plus il entraîne le composé avec lui.

Tableau 15. Analyse de la chromatographie sur couche mince des métabolites antimicrobiens extraits des souches FR14 et FR15

Espèces de <i>Pseudomonas</i>	Les valeurs R _f	
	Les métabolites extraits	
	Phénazine	Pyrrrolnitrine
FR14	0,62	-
FR15	0,6	-

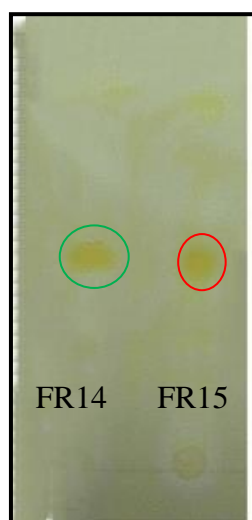


Figure 20. Identification des composés des extraits phénaziques des souches FR14 et FR15

2. Evaluation de l'activité antifongique des extraits bruts de deux souches FR14 et FR15

Au terme d'une semaine d'incubation à température ambiante, les extraits phénaziques de deux souches ont montré un pourcentage d'inhibition contre les deux souches pathogènes *Aspergillus niger* et *F.oxysporum* qui varie d'une souche à l'autre. Le tableau 16 montre le taux d'inhibition par les deux souches testées.

Tableau 16. Effet des extraits phénaziques des souches FR14 et FR15 sur la croissance mycélienne de *F.ox* et *A.niger*.

Extraits phénaziques des souches	<i>F.oxysporum</i> C=55		<i>A.niger</i> C=60	
	Z (mm)	I (%)	Z (mm)	I (%)
FR14	42	23,63	53	11,66
FR15	50	9,1	57	5

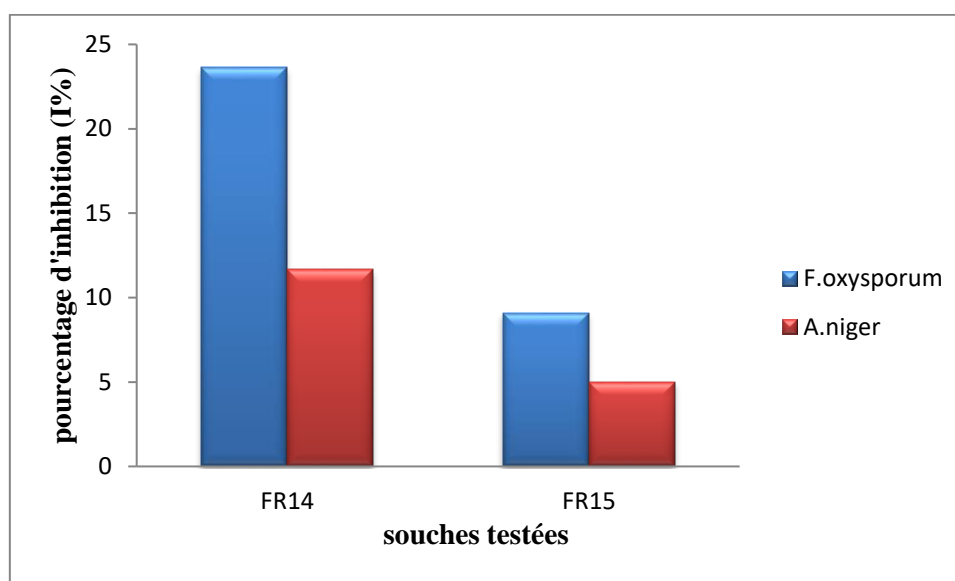


Figure 21. Taux d'inhibition des champignons pathogènes par les extraits phénaziques des souches testées

Les résultats du taux d'inhibition des champignons pathogènes par les extraits phénaziques des souches testées ont montré que l'extrait phénazique de la souche FR14 inhibe la croissance mycélienne des deux champignons plus que celui de la souche FR15. Cette différence peut être expliquée par l'efficacité de l'extrait lui-même ou la variabilité de la sensibilité des champignons (**figure 21**).

Discussion générale

Pseudomonas spp fluorescents sont parmi les espèces bactériennes les plus étudiées à l'échelle mondiale grâce à leur très vaste distribution dans les niches écologiques et aux méthodes simples de culture. Ces bactéries sont présentes dans presque tous les écosystèmes mêmes les habitats extrêmes. Cette abondance reflète le caractère adaptatif de ces souches qui a été déjà mis en évidence par (**Latour, Corberand et al. 1996**) concernant les souches *P.fluorescens*.

Dans notre étude, les isolements effectués ont permis de sélectionner 25 souches de *Pseudomonas* dont 19 souches étant des *Pseudomonas* spp. fluorescents qui proviennent des différents sites (Ghar El Baroud, ferme Remini et Oued Diris), prenons en considération que ces trois sites sont loin l'un de l'autre et se caractérisent par différents sols. Comparativement aux deux autres sites, la répartition de *Pseudomonas* spp fluorescents était plus importante dans le premier site (Ghar El Baroud) avec un pourcentage de 40%, prenons en compte les espèces végétales cultivées, 76% des espèces *P.fluorescens* proviennent des cultures de blé dur tandis que 24% proviennent des cultures d'orge.

Ces résultats montrent que les *Pseudomonas* spp sont généralement communs dans la rhizosphère et aussi leur plasticité à coloniser plusieurs écosystèmes et à s'adapter à des environnement variés, selon (**Latour and Lemanceau 1997**), cette plasticité importante est due à la variabilité du métabolisme des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

La sélection que nous avons menée sur les 19 souches isolées et purifiées des différents échantillons provenant des différents sites, à savoir Ghar El Baroud, Ferme Remini, Oued Diris, nous a permis d'identifier 8 souches (42,10%) de *Pseudomonas* spp fluorescents stimulatrices de la croissance végétale, dont une souche a été isolée du premier site, 4 souches du deuxième site et 3 souches du troisième site.

Le criblage « *screening* » des souches *Pseudomonas* spp fluorescents rhizobactériennes stimulatrices de la croissance a été menée par le biais d'un bio-test sur les graines de laitue (*Lactuca sativa L.*) *in vitro*, ce test nous a permis d'obtenir 8 souches *Pseudomonas* PGPR, le pourcentage de PGPR de ce travail est supérieur à

celui rapporté par (KIRDI 2011) à savoir le pourcentage de PGPR d'un total de 101 souches isolées et purifiées soit 11,9% et celui de (Zermane 2005) qui est de 5%.

Le test de sélection des souches PGPR *in vitro*, est une étape indispensable pour la sélection de souches phyto-bénéfiques intéressantes avant de passer aux tests *in vivo* pour éviter les risques d'avoir des souches non intéressantes qui peuvent être phytopathogènes.

Les 8 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents sélectionnées ont été identifiées phénotypiquement par des tests morphologiques, culturels et biochimiques afin de les rapprocher au trois espèces fluorescentes possibles : *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* et *P.putida*. La coloration de Gram a fait ressortir des bacilles à parois Gram – aux bords étroits. Toutes les espèces ont possédé la cytochrome oxydase respiratoire, la présence ou non de cette enzyme est un caractère taxonomique permet d'identifier les espèces *Pseudomonas* spp fluorescents. D'après (Latour and Lemanceau 1997), les espèces *Pseudomonas* spp fluorescents possédant la cytochrome oxydase positive sont des microorganismes hétérotrophes, qui ont la capacité d'utiliser une gamme des substrats organiques.

Certaines souches de *Pseudomonas* spp fluorescents ont la capacité de se développer à des températures extrêmes, l'espèce type *Pseudomonas aeruginosa* est capable de se croître à 41°C, tandis que seule *Pseudomonas fluorescens* peut se croître à 4°C. En plus, *Pseudomonas putida* est la seule souche incapable d'hydrolyser la gélatine. Ces caractères ont été pris en considération lors de l'identification de ces espèces. Parmi les 8 souches sélectionnées, 4 souches ont eu la capacité de se développer à 41°C et hydrolyser la gélatine ce qui confirme leur appartenance au *P.aeruginosa*, 2 souches ont été rapproché à *P.fluorescens* car elles ont poussé à 4°C. Deux souches ont été identifiées comme *P.putida* car elles sont incapables d'hydrolyser la gélatine.

L'identification phénotypique reste une étape primordiale voir indispensable pour l'identification des *Pseudomonas* spp fluorescents. Cependant, d'autres tests phénotypiques et génotypiques (LOPAT, ARNr 16S) sont nécessaires pour identifier avec certitude ces bactéries.

Parmi les PGPR, *Pseudomonas* spp fluorescents se caractérisent par la production de nombreux métabolites secondaires, contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas nécessaires ni pour la croissance ni pour la multiplication cellulaire, mais ils peuvent jouer un rôle très important dans la dégradation de la matière organique en améliorant la fertilité du sol et par conséquent l'augmentation de la disponibilité des minéraux indispensables à la croissance végétale et l'amélioration du rendement. Ces métabolites peuvent également jouer un rôle dans l'atténuation des maladies des plantes par le biais d'interactions entre les *Pseudomonas* spp fluorescents et les espèces phytopathogènes. Parmi ces métabolites, on trouve les enzymes telles que les cellulases, protéases, lipases et les chitinases. D'après nos résultats de la production des enzymes, 62,5%, 40% et 40% des souches ont été productrices respectivement des protéases, amylases et lipases. Ces résultats confirment que ces bactéries peuvent produire des enzymes hydrolytiques en l'occurrence des protéases qui provoquent la lyse des champignons pathogènes en dégradant leurs parois (CWDE: cell wall degrading enzymes). (Naik et Sakyhivel (**Naik and Sakhivel 2006**)) ont montré que la souche *Pseudomonas* PUP6 produirait des protéases ayant une activité CWDE.

Les *Pseudomonas* spp fluorescents ont été largement rapportées comme des agents de biocontrôle. Elles sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à inhiber la croissance des phytopathogènes *in vitro*. (**Howell and Stipanovic 1979**) ont été les premiers qui ont montré que *Pseudomonas* produit un antibiotique pour le contrôle de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani*. Ils identifiaient la pyrrolnitrine, un métabolite secondaire responsable d'inhibition de cet agent pathogène.

La recherche de l'activité antagoniste *in vitro* a été testée sur les 8 souches de *Pseudomonas* identifiées. Les résultats obtenus ont montré que le degré d'antagonisme varie d'une souche à l'autre. Parmi les 8 souches uniquement 4 souches ont manifestées un pouvoir inhibiteur sur la croissance du pathogène *F.oxysporum* avec une inhibition maximale par la souche FR14.

La différence dans l'activité antagoniste exercée par ces bactéries peut être expliquée par la production d'une ou plusieurs substances antimicrobiennes. Cela dépend de l'espèce, de la nature du métabolite ainsi que la quantité libérée dans le milieu utilisé (**Kamilova, Validov et al. 2005**).

Parmi les mécanismes avec lesquels *Pseudomonas* empêche la croissance des phytopathogènes sont la synthèse des métabolites secondaires tels que les antibiotiques. Ces métabolites ont montré leur efficacité *in vitro* à l'égard des organismes pathogènes.

Parmi ces composés antibiotiques, six ont prouvé leur efficacité dans le biocontrôle des maladies racinaires. Les phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine et les lipopeptides cycliques sont diffusible, alors que l'acide cyanhydrique est volatile (DAHAH 2017). Les phénazines ont été largement rapportés comme des antibiotiques produits par les espèces *Pseudomonas* jouant un rôle dans la suppression des maladies des plantes, trois types des phénazines sont déjà décrits : la phénazine-1-carboxylate (PCA) et le 2-hydroxy-phénazine-1-carboxylate (2-OH-PCA), et un troisième mineur le 2-hydroxy-phénazine (2-OH-PZ).

Notre résultat de la CCM montre la présence d'une phénazine à un rapport frontal de 0,6 et 0,62 respectivement pour les souches FR15 et FR14 et une absence des pyrrolnitrines. D'après ce résultat, les deux souches sont productrices d'un seul type d'antibiotiques : les phénazines.

Le pourcentage d'inhibition des souches pathogènes dépend de la souche *Pseudomonas* productrice ainsi que la capacité de l'extrait phénazique de diffuser dans le milieu. Le pouvoir inhibiteur des composés phénaziques est due à la capacité oxydo-réductrice de ces métabolites qui induise l'accumulation de peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres qui entraînent la mort de la cellule en attaquant les membranes et le matériel génétique (Mavrodi, Blankenfeldt *et al.* 2006).

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives

Ce travail a eu pour objectif d'isoler et sélectionner des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents indigènes pour leurs propriétés PGPR et biocontrôle des maladies des plantes. Ces bactéries ont fait l'objet d'explorations suppressives de nombreuses maladies causées par les phytopathogènes notamment les champignons.

Les PGPR (dans notre cas les *Pseudomonas* spp fluorescents) sont devenues une alternative très intéressante envisagée à l'utilisation intensive et répétée des antibiotiques de synthèse chimique par l'utilisation des composés synthétisés par ces bactéries jouant un rôle dans la suppression des maladies.

Nous avons pu isoler 19 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents à partir de trois sites différents. Ces souches ont fait l'objet d'une présélection pour leur effet stimulateur ou inhibiteur de la croissance végétale, 8 souches ont été des souches phytostimulatrices avec un pourcentage de stimulation de 42,10%. Ce résultat permet d'utiliser ces souches prochainement comme des phytostimulateurs.

Les souches ainsi criblées ont été identifiées phénotypiquement. Cette étude a permis de rassembler les isolats en trois groupes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* avec une dominance de l'espèce type *Pseudomonas aeruginosa* (4 souches parmi les 8 souches). Cependant, l'identification phénotypique doit être confirmée par une identification génotypique car il existe une ligne très fine entre les deux espèces *P.fluorescens* et *P.putida* et aussi l'existence des biovars dans la même espèce bactérienne.

Parmi les souches identifiées, 4 souches ont montré un pouvoir antagoniste *in vitro* contre un champignon pathogène *Fusarium oxysporum*. Ces souches ont été révélées productrices des métabolites secondaires à effet antifongique tels que les enzymes dégradants les parois fongiques (protéases) et les antibiotiques (phénazines) aussi bien des enzymes participant à l'amélioration de la fertilité du sol (amylases, protéases, lipases), ce qui leurs permet d'être des agents de biocontrôle, biofertilisation.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'antagonisme existants chez les *Pseudomonas*, nous avons procédé à l'extraction de quelques métabolites secondaires comme les phénazines et les pyrrolnitrines. Nos résultats ont montré une présence des

phénazines et l'absence des pyrrolnitrines. Les phénazines sont les principaux pigments qui jouent un rôle crucial dans l'antagonisme direct entre ces bactéries et les champignons phytopathogènes. Cependant, des études plus profondes doivent être avancées pour mieux comprendre les propriétés biologiques de ces composés.

Bien que le criblage des souches phytobénéfiques œuvre dans une perspective de localiser les souches ayant réunies le maximum des activités antagonistes vis-à-vis les phytopathogènes, l'antagonisme *in vitro* ne peut pas, à lui seul, s'imposer comme le critère fondamental de sélection. Des investigations et d'autres études pourront approfondir un criblage efficace des souches les plus performantes.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses. D'un point de vue taxonomique, il serait nécessaire de procéder à l'identification génotypique car le groupe *P.fluorescens* -*P.putida* est un groupe très hétérogène nécessitant des études génétiques plus profondes.

Il serait aussi nécessaire d'étudier et identifier d'autres métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas* à effet antimicrobien et de poursuivre les études sur les propriétés biologiques de ces composés et comprendre leurs mécanismes d'action.

Enfin d'un point de vue application agricole, il serait nécessaire d'avancer les études pour la compréhension de la complexité de l'environnement rhizosphérique, les mécanismes d'action des PGPR et procéder à l'application de ces organismes dans l'agriculture durable soit sous forme d'inoculants ou des formulations.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdelwahab, R. (2017). Effet du stress salin sur les bactéries du sol: rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin, Université Ferhat Abbas Sétif.
- Agueniou Fatiha, Z. H. (2017). Effet de la physicochimie des sols sur la diversité phénotypique et fonctionnelle des bactéries telluriques et l'interaction Bactérie-Blé dur. Master Université A.MIRA Bejaia
- Ahemad, M. and M. Kibret (2014). "Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective." *Journal of King Saud University-Science* 26(1): 1-20.
- Armstrong, G. and J. K. Armstrong (1981). "Another approach to race classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*." *Phytopathology* 71: 474-478.
- Badri, D. V. and J. M. Vivanco (2009). "Regulation and function of root exudates." *Plant Cell Environ* 32(6): 666-681.
- Bakker, P., L. Ran, et al. (2003). "Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases." *Canadian Journal of Plant Pathology* 25(1): 5-9.
- Bhattacharyya, P. N. and D. K. Jha (2012). "Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(4): 1327-1350.
- Bossis, E., P. Lemanceau, et al. (2000). "The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision." *Agronomie* 20(1): 51-63.
- Chin-A-Woeng, T. F., J. E. Thomas-Oates, et al. (2001). "Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains." *Molecular plant-microbe interactions* 14(8): 1006-1015.
- DAHAH, H. (2017). Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires sécrétés par des *Pseudomonas* originaires des conditions extrêmes. Doctorat ABDELHAMID IBN-BADIS DE MOSTAGANEM.
- Digat, B. and L. Gardan (1987). "Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida*." *EPPO Bulletin* 17(4): 559-568.

- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden, et al. (2003). "Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere." *Critical reviews in plant sciences* 22(2): 107-149.
- Dorjey, S., D. Dolkar, et al. (2017). "Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*: A Review." *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 6(7): 1335-1344.
- Dwivedi, D. and B. Johri (2003). "Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation." *Current science*: 1693-1703.
- El-Hafid, B. F. e. N. (2013). "Isolement et caractérisation des bactéries productrices d'enzymes à intérêt agricole à partir du sol et d'algues marines."
- Faille, A. (2010). Identification de composés naturels contre *Saprolegnia* sp., un champignon pathogène en aquaculture. Doctorat en Science Montréal
- Gaur, R., N. Shani, et al. (2004). "Diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads do not influence AM fungi in wheat rhizosphere." *Current science*: 453-457.
- Gosal, S., J. Kaur, et al. (2017). *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: A Probiotic for Plant Health and Productivity*. Probiotics and Plant Health, Springer: 589-600.
- Gray, E. and D. Smith (2005). "Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes." *Soil Biology and Biochemistry* 37(3): 395-412.
- Gupta, A., J. M. Meyer, et al. (2002). "Development of heavy metal-resistant mutants of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. NBRI 4014 and their characterization." *Current Microbiology* 45(5): 323-327.
- Gupta, G., S. S. Parihar, et al. (2015). "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture." *J Microb Biochem Technol* 7(2): 096-102.
- Haas, D. and C. Keel (2003). "Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease." *Annual review of phytopathology* 41(1): 117-153.
- Haverkort, A., P. Boonekamp, et al. (2008). "Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification." *Potato research* 51(1): 47-57.
- Hayat, R., S. Ali, et al. (2010). "Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review." *Annals of Microbiology* 60(4): 579-598.

- Hoffland, E., J. Hakulinen, et al. (1996). "Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species." *Phytopathology* 86(7): 757-762.
- Höfte, M. and N. Altier (2010). "Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems." *Research in Microbiology* 161(6): 464-471.
- Howell, C. and R. Stipanovic (1979). "Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium." *Phytopathology* 69(5): 480-482.
- Jacques, P., P. Delfosse, et al. (1993). "Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol." *Cahiers Agricultures* 2(5): 301-307 (301).
- Jeyalakshmi, C., K. Madhiazhagan, et al. (2010). "Effect of different methods of application of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial leaf blight under direct sown rice." *J. Biopesticides* 3(2): 487-488.
- Kamilova, F., S. Validov, et al. (2005). "Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria." *Environmental Microbiology* 7(11): 1809-1817.
- Kang, Y., M. Shen, et al. (2013). "A possible mechanism of action of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus pumilus* WP8 via regulation of soil bacterial community structure." *The Journal of general and applied microbiology* 59(4): 267-277.
- Kavitha, K., S. Mathiyazhagan, et al. (2005). "Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode." *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 38(1): 69-76.
- KIRDI, B. (2011). Rôle des PGPR «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites.
- Kloepper, J. W., R. Lifshitz, et al. (1989). "Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity." *Trends in biotechnology* 7(2): 39-44.
- Kuiper, I., E. L. Lagendijk, et al. (2004). "Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction." *Molecular plant-microbe interactions* 17(1): 6-15.
- Lamizadeh, E., N. Enayatizamir, et al. (2016). "Isolation and identification of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from the rhizosphere of sugarcane in saline and non-saline soil." *Int J Curr Microbiol App Sci* 5(10): 1072-1083.

- Latour, X., T. Corberand, et al. (1996). "The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type." *Appl Environ Microbiol* 62(7): 2449-2456.
- Latour, X. and P. Lemanceau (1997). "Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp." *Agronomie* 9(17): 427-443.
- Leeman, M., J. Van Pelt, et al. (1995). "Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*." *Phytopathology* 85(9): 1021-1027.
- Marquez-Santacruz, H., R. Hernandez-Leon, et al. (2010). "Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere." *Genetics and Molecular Research* 9(4): 2372-2380.
- Martínez-Viveros, O., M. Jorquera, et al. (2010). "Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria." *Journal of soil science and plant nutrition* 10(3): 293-319.
- Mavrodi, D. V., W. Blankenfeldt, et al. (2006). "Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation." *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 417-445.
- Mavrodi, D. V., V. N. Ksenzenko, et al. (1998). "A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79." *Journal of bacteriology* 180(9): 2541-2548.
- Meliani, A. (2012). Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens* Doctorat université d'Oran
- MESSAOUDI, H. (2015). Effets de l'inoculation avec des bactéries rhizosphériques sur la croissance du blé et le développement de quelques bio-agresseurs qui lui sont associés.
- MEZAACHE, S. (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre, Université Ferhat Abbas de Sétif 1.
- Miethke, M. and M. A. Marahiel (2007). "Siderophore-based iron acquisition and pathogen control." *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3): 413-451.
- Naik, P. R. and N. Sakthivel (2006). "Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-

- promoting traits and antifungal potential." *Research in Microbiology* 157(6): 538-546.
- Rabhi, N. E. H. (2011). Isolement de *Pseudomonas* spp. fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels. magistere Université Ferhat Abbas Setif
- RAI, A. (2017). Effet du stress salin sur les bactéries du sol: rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie- plante sous stress salin, Université Ferhat Abbas Sétif.
- Reddy, P. P. (2016). *Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection*, Springer.
- Rehm, B. H. (2008). *Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory*, John Wiley & Sons.
- Rovira, A. and D. Sands (1971). "Fluorescent pseudomonads—a residual component in the soil microflora?" *Journal of Applied Microbiology* 34(1): 253-259.
- Scher, F. M. and R. Baker (1980). "Mechanism of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil." *Phytopathology* 70(5): 412-417.
- Sharma, P., L. C. Bora, et al. (2017). "Isolation and characterization of native fluorescent *Pseudomonas* from rice fields of Assam (India)." *Applied Biological Research* 19(2): 146-155.
- SHARMA P, V. P., KAUR M (2017). "Identification of secondary metabolites produced by fluorescent *Pseudomonas* for controlling fungal pathogens of apple." *Indian Phytopathological Society* 2017 70 (4) : 452-456: 5.
- Singh, H. B., B. K. Sarma, et al. (2017). *Advances in PGPR Research*, CABI.
- Singh, S. R., D. Joshi, et al. (2017). *Plant Growth-Promoting Bacteria: An Emerging Tool for Sustainable Crop Production Under Salt Stress. Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*, Springer: 101-131.
- Somers, E., J. Vanderleyden, et al. (2004). "Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet." *Critical reviews in microbiology* 30(4): 205-240.
- Strange, R. N. and P. R. Scott (2005). "Plant disease: a threat to global food security." *Annual review of phytopathology* 43.
- Sturz, A. and B. Christie (2003). "Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria." *Soil and Tillage Research* 72(2): 107-123.

- Theodorakopoulos, N., D. Bachar, et al. (2013). "Exploration of *Deinococcus-Thermus* molecular diversity by novel group-specific PCR primers." *Microbiologyopen* 2(5): 862-872.
- Thomashow, L. S. and D. M. Weller (1988). "Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*." *Journal of bacteriology* 170(8): 3499-3508.
- van Loon, L. C. and B. R. Glick (2004). *Increased plant fitness by rhizobacteria. Molecular ecotoxicology of plants*, Springer: 177-205.
- Van Peer, R., G. Niemann, et al. (1991). "Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417 r." *Phytopathology* 81(7): 728-734.
- Verma, P. P., P. Sharma, et al. (2018). "Optimization of Cultural Conditions for High Production of Antifungal Activity by Fluorescent *Pseudomonas* sp. against *Dematophora necatrix* and *Phytophthora cactorum*." *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 7(1): 2813-2823.
- Vessey, J. K. (2003). "Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers." *Plant and soil* 255(2): 571-586.
- Vincent, J. (1947). "Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors." *Nature* 159(4051): 850.
- Vincent, M. N., L. Harrison, et al. (1991). "Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain." *Appl Environ Microbiol* 57(10): 2928-2934.
- Voisard, C., C. Keel, et al. (1989). "Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions." *The EMBO Journal* 8(2): 351-358.
- Walley, F. and J. Germida (1997). "Response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to interactions between *Pseudomonas* species and *Glomus clarum* NT4." *Biology and Fertility of Soils* 24(4): 365-371.
- Wang, Y., S. E. Kern, et al. (2010). "Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer." *Journal of bacteriology* 192(1): 365-369.
- Wei, G., J. W. Kloepper, et al. (1991). "Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria." *Phytopathology* 81(11): 1508-1512.

Références bibliographiques

- Weller, D. M. (2007). "Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years." *Phytopathology* 97(2): 250-256.
- Weller, D. M. and L. S. Thomashow (1994). "Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere." *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs*: 1-18.
- Yadegari, M., H. A. Rahmani, et al. (2010). "Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*." *Journal of Plant nutrition* 33(12): 1733-1743.
- Zermane, N. (2005). "Potential of rhizobacteria to control parasitic weeds of the genus *Orobanche*." *TROPICAL AGRICULTURE* 17: 155.

Annexes

Annexe I : Milieux de culture utilisés (composition pour un litre de milieu) :

<p>King's B :</p> <p>Peptone20,0 g</p> <p>Glycérol.....10,0 ml</p> <p>Phosphate dipotassique1,5 g</p> <p>Sulfate de magnésium, 7 H₂O.....1,5 g</p> <p>Agar bactériologique.....15,0 g</p> <p>pH : 7,2 ± 0,2.</p>	<p>King's A :</p> <p>Peptone.....20,00g</p> <p>Sulfate de potassium10,00g</p> <p>Chlorure de magnésium ...1,40g</p> <p>Agar15,00 g</p> <p>pH: 7,2</p>
<p>GN (Gélose nutritive) :</p> <p>Extrait de levure.....2g</p> <p>Extrait de viande.....1g</p> <p>Peptone.....5g</p> <p>NaCl.....5g</p> <p>Agar.....15g</p> <p>pH final : 7,4</p>	<p>BN (Bouillon nutritif) :</p> <p>Peptone..... 5,00 g</p> <p>Extrait de viande..... 3,00 g</p> <p>pH: 6,8</p>
<p>PDA (Potato Dextrose Agar)</p> <p>Extrait de pomme de terre.....250ml</p> <p>Glucose.....20g</p> <p>Agar.....20g</p> <p>Eau distillée.....1000ml</p> <p>Ph : 5,4</p>	<p>Gélose au lait :</p> <p>Gélose nutritive additionnée à 45 °C d'un volume de lait stérile.</p>
<p>Gélose à l'amidon :</p> <p>Peptones.....5g</p> <p>Amidon.....10g</p> <p>Agar.....10g</p> <p>Eau distillée.....1000ml</p>	<p>Gélose au tween 80 :</p> <p>Peptone.....10 g</p> <p>NaCl.....5 g</p> <p>CaCl₂.H₂O.....0,1g</p> <p>Tween 80.....1%</p> <p>Agar.....18g</p> <p>Eau distillée.....1000ml</p> <p>pH : 7,4</p>

Annexe II : Caractéristiques morphologiques des 25 souches de *Pseudomonas* isolées sur King B

Site de prélèvement		Dilution	Aspects des colonies sur King B
Site 1	Parcelle 1	10 ⁻³	Colonie 1 : blanche, irrégulière, opaque, bombée, brillante
		10 ⁻³	Colonie 2 : blanche, irrégulière, opaque, convexe
		10 ⁻³	Colonie 3 : blanche, régulière, translucide, plate
		10 ⁻³	Colonie 4 : blanche, régulière, translucide, plate
		10 ⁻⁴	Colonie 5 : jaune, irrégulière, plate, translucide
		10 ⁻⁴	Colonie 6 : blanche, opaque, régulière
		10 ⁻⁶	Colonie 7 : blanche, régulière, opaque, bombée
	Parcelle 2	10 ⁻⁴	Colonie 1 : grande, irrégulière, opaque, brillante, convexe
		10 ⁻⁴	Colonie 2 : grande, régulière, opaque, brillante
		10 ⁻⁶	Colonie 3 : petite, orange, régulière, opaque, convexe
Site 2	Parcelle 1	10 ⁻³	Colonie 1 : blanche, grande, régulière, opaque, convexe
		10 ⁻³	Colonie 2 : petite, irrégulière, opaque, bombée, blanche
		10 ⁻³	Colonie 3 : blanche, régulière, opaque, bombée
		10 ⁻⁴	Colonie 4 : jaune, régulière, opaque, plate
	Parcelle 2	10 ⁻³	Colonie 1 : petite, régulière, bombée, opaque, brillante
		10 ⁻³	Colonie 2 : petite, régulière, bombée, translucide, brillante
		10 ⁻⁴	Colonie 3 : grande, blanche, opaque, régulière, brillante, bombée, pigment vert
		10 ⁻⁴	Colonie 4 : moyenne, jaune, régulière, brillante, convexe
		10 ⁻⁴	Colonie 5 : blanche, régulière, opaque, brillante, semi-bombée

Site 3	Parcelle 1	10^{-3}	Colonie 1 : blanche, irrégulière, translucide, convexe, brillante
		10^{-3}	Colonie 2 : blanche, régulière, opaque, convexe, brillante
		10^{-3}	Colonie 3 : blanche, régulière, opaque, convexe, brillante
		10^{-3}	Colonie 4 : beige, régulière, opaque, convexe, brillante
		10^{-3}	Colonie 5 : blanche, irrégulière, bombée, brillante
	Parcelle 2	10^{-6}	Colonie 1 : moyenne, brillante, blanche, plate, régulière

Annexe III : Coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mis au point le protocole en 1884. Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ en sont dépourvues. Cette paroi de part son organisation permet de les classer soit dans les Gram+ ou les Gram-. Cette information est importante car elle est utilisée dans la taxonomie. Elle permet ainsi, avec la reconnaissance de la morphologie et le mode de groupement des bactéries de renseigner sur l'ordre dont fait partie les bactéries étudiées.

- 1. Réalisation d'un frottis** à partir d'une suspension bactérienne puis en faisant des rotations jusqu'à séchage.
- 2. Fixation :** soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame ou on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.
- 3. La coloration au violet de Gentiane** (colorant basique): la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau distillée.
- 4. Mordançage au lugol** (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

5. **Décoloration à l'alcool:** verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
6. **Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine:** laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

Annexe IV : Données sur *Lactuca sativa* et *Fusarium oxysporum*

Lactuca sativa

L'appellation « laitue » dérive du latin *lactuca* qui rappelle aussi la présence dans cette plante d'un latex blanc caractéristique du genre et *sativa* signifie « cultivé » en latin.

Classification APG III (2009)	
Règne	<i>Plantae</i>
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Noyau des Dicotylédones vraies
Clade	Astéridées
Clade	Campanulidées
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Lactuca</i>

Nom binominal : *Lactuca sativa*

La laitue cultivée est une plante herbacée, annuelle, avec deux phases bien distinctes : la phase végétative, formant une pomme plus ou moins fermée, est le stade utilisé pour la consommation et la phase reproductrice, au cours de laquelle la tige principale s'allonge (montaison), aboutit à la floraison et à la production de semences. La plante forme d'abord une rosette de feuilles entières. Puis survient la période de pommaison, au cours de laquelle se différencient les types de laitue. En effet, les feuilles se redressent, s'imbriquent plus ou moins, aboutissant à la formation d'une pomme fermée ou d'un ensemble de feuilles serrées formant un bouquet ouvert.

 ***Fusarium oxysporum***

Classification	
Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Sous-classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre	<i>Hypocreales</i>
Famille	<i>Nectriaceae</i>
Genre	<i>Fusarium</i>

Nom binominal : ***Fusarium oxysporum***

Températures de croissance :

- optimale : 25 - 30 °C
- minimale : 5 °C
- maximale : 37°C

Incidences agronomiques :

Nombreuses variétés pathogènes de plante : concombre, courgette, topinambour, piment, pomme de terre, patates douces, tomates, pastèques, céleri, asperge, ail, oignon, chou, gingembre, banane, et de nombreuses plantes environnementales.

Provoque une pourriture des tissus avec apparition d'un mycélium blanc rosé à la surface.

Quelques souches productrices de mycotoxines : moniliformine, zéaralénone, wortmannine, et plus rarement : nivalénol, fusarénone X, Sambutoxine.

Annexe V : Chromatographie sur couche mince

Principe : La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée **éluant**, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élu­tion, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (Rf) :

$$R_f = \frac{\text{hauteur de la tache}}{\text{hauteur du front du solvant}}$$

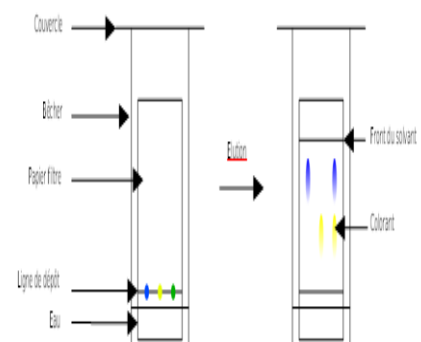
Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même Rf).

Annexe VI : Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une opération qui permet la séparation d'un ou plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides pratiquement non-miscibles.

Protocole expérimental :

- **Préparation de l'extraction :** ➡ Verser la solution (solvant initial, espèce à extraire) dans une ampoule à décanter.



⇒ Ajouter le solvant extracteur.

- **Extraction :** ⇒ Agiter et dégazer plusieurs fois.
- **Décantation :** ⇒ Laisser reposer l'ampoule à décanter jusqu'à ce que les deux phases soient bien séparées.
- **Séparation :** ⇒ Déboucher l'ampoule à décanter.

⇒ Ouvrir le robinet et recueillir chaque phase dans deux récipients différents

Glossaires

Agriculture durable : également appelée soutenable, c'est l'application à l'agriculture des principes du développement durable. Elle limite de pesticides qui peuvent nuire à la santé des agriculteurs et des consommateurs et vise à protéger la biodiversité.

Agriculture biologique : constitue un mode de production qui trouve son originalité dans le recours à des pratiques culturales et d'élevage soucieuses du respect des équilibres naturels. Ainsi, elle exclut l'usage des produits chimiques de synthèse, des OGM et limite d'intrants.

Agriculture intensive : est un système de production agricole caractérisé par l'usage important d'intrants et cherchant à maximiser la production par rapport aux facteurs de production, qu'il s'agisse de la main d'œuvre, du sol ou des autres moyens de production (matériel, intrants divers).

Biocontrôle : est un ensemble de méthodes de protection des végétaux basé sur l'utilisation de mécanismes naturels. Seules ou associées à d'autres moyens de protection des plantes, ces techniques sont fondées sur les mécanismes et interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel.

Biofertilisant : est un produit contenant des microorganismes vivants qui contribue à améliorer la croissance des plantes. Il optimise les fonctions du sol et sa fertilité grâce à l'action des microorganismes qu'il contient.

Biopesticides : sont des éléments organiques qui remplacent les pesticides de synthèse jugés dangereux pour la planète. Ce sont des organismes vivants ou des dérivés composés de molécules naturelles.

Bioremédiation : est une technique consistant à augmenter la biodégradation ou la biotransformation, en inoculant des microorganismes spécifiques (bioaugmentation) ou en stimulant l'activité de populations microbiennes indigènes, par biostimulation, par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité).

Fonte de semis : est une maladie des plantes, dont un des principaux symptômes est un pourrissement des jeunes pousses en cours de germination, elle est causée par des champignons. Elle est considérée comme cryptogamique.

Intrants chimiques : sont les différents produits apportés aux terres et aux cultures, qui ne proviennent ni de l'exploitation agricole, ni de sa proximité. Les intrants ne sont pas naturellement présents dans le sol, ils y sont rajoutés pour améliorer le rendement des cultures.

Nécrose : est la dernière étape de la mort cellulaire. En biologie, la nécrose est la mort et la décomposition d'un tissu organique, elle est une altération des tissus suite à la mort de ses cellules. En botanique chez les plantes, elle peut survenir à la suite d'une insuffisance ou de la toxicité d'un élément nutritif, ou encore d'un dommage apparu lors d'une pulvérisation.

Piétin échaudage : maladie fongique des céréales causée par *Gaeumannomyces graminis var.tritic* provoquant la pourriture des racines, et cause l'échaudage du grain.

Résumé : 19 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents ont été isolées à partir des racines et sols rhizosphériques de blé dur et d'orge de différents biotopes, ces souches ont été criblées *in vitro* pour leur activité promotrice de la croissance des plantes et de biocontrôle contre *Fusarium oxysporum*. A partir d'un bio-test *in vitro* de *Lactuca sativa*, 8 souches ont été sélectionnées comme des rhizobactéries promotrices de la croissance végétale (PGPR). D'après des tests macroscopiques, microscopiques et physicochimiques, les souches ont été affiliées aux espèces *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* et *P.putida*. Ces souches ont été testées pour leur capacité à produire des enzymes d'intérêt agricole, les souches OD11, FR14, FR24, FR13 ont été toutes productrices des protéases, amylases, lipases. Tous les isolats ont été étudiés pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis *Fusarium oxysporum* par la technique de culture duelle. FR14 et FR15 ont montré une inhibition importante de la croissance mycélienne avec un pourcentage d'inhibition de 52,72% et 41,81% respectivement. Deux métabolites antifongiques (phénazines, pyrrolnitrines) ont été extraits à partir des cultures des souches FR14 et FR15, par l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM). Les valeurs R_f obtenus variaient de 0,6 à 0,62 pour les PHZ et absence des PLN. Les extraits phénaziques ont été re-testés pour leurs activités antifongiques contre *F.ox* et *Aspergillus niger*, les résultats ont montré une activité inhibitrice des deux pathogènes plus importante de l'extrait de la souche FR14 avec un I% de 23,63% pour *F.ox* et 11,66% pour *A.niger*. Ces résultats observés permettent aux souches FR14 et FR15 d'être des agents potentiels de biocontrôle pour une future application.

Mots-clés : Biocontrôle, inhibition, métabolites, PGPR, *Pseudomonas* spp fluorescents.

Abstract : 19 strains of fluorescent *Pseudomonas* sp. were isolated from the rhizosphere and rhizosphere roots of durum wheat and barley from different biotopes, these strains were screened *in vitro* for their plant growth-promoting activity and biocontrol against *Fusarium oxysporum*. From an *in vitro* bioassay of *Lactuca sativa*, 8 strains were selected as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). According to macroscopic, microscopic and physicochemical tests, the strains were affiliated with *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* and *P.putida* species. These strains were tested for their ability to produce enzymes of agricultural interest, strains OD11, FR14, FR24, FR13 were all producing proteases, amylases, lipases. All isolates were studied for their antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* by the dual plate assay. FR14 and FR15 showed significant inhibition of mycelial growth with a percentage inhibition of 52.72% and 41.81% respectively. Two antifungal metabolites (phenazines, pyrrolnitrins) were extracted from cultures of strains FR14 and FR15 by the use of thin layer chromatography (TLC). The R_f values obtained ranged from 0.6 to 0.62 for PHZ and lack of PLN. The phenazic extracts were re-tested for their antifungal activities against *F.ox* and *Aspergillus niger*, the results showed a greater inhibitory activity of the two pathogens of the extract of the FR14 strain with an I% of 23.63%. *F.ox* and 11.66% for *A.niger*. These observed results allow strains FR14 and FR15 to be potential biocontrol agents for a future application.

Keywords : Biocontrol, inhibition, metabolites, PGPR, fluorescents *Pseudomonas* sp.

المخلص: تم عزل 19 عزلة من بكتيريا *Pseudomonas* المشعة انطلاقاً من جذور و ريزوسفير القمح الصلب و الشعير ببيئات مختلفة. هذه العزلات تم انتقائها في المختبر من اجل نشاطها المحفز لنمو النبات و المكافحة البيولوجية ضد *Fusarium oxysporum*. من خلال الفحص البيولوجي على بذور *Lactuca sativa*، 8 عزلات اظهرت نشاطاً محفزاً لنمو النبات PGPR. تبعا لنتائج الكشف المظهري و المجهري و البيوكيميائي، هذه السلالات تم معرفة انتمائها للأنواع *P.aeruginosa*، *P.fluorescens*، *P.putida*. تم اختبار هذه العزلات لقدرتها على انتاج الانزيمات ذات الاهمية الزراعية، السلالات OD11 FR14 FR24 FR13 كانت كلها منتجة للبروتيناز، الاميلاز و الليباز. تمت دراسة جميع العزلات لفاعلتها العدائية ضد *Fusarium oxysporum* بواسطة تقنية الزراعة المزدوجة. اظهرت FR14 و FR15 تثبيطاً ملحوظاً لنمو الفطر بنسبة تثبيط 52.72% و 41.81% على التوالي. تم استخراج ايتين مضادين للفطريات (phenazine، pyrrolnitrines) من السلالتين FR14 و FR15، باستخدام تقنية العزل الكروماتوغرافي (TLC). تراوحت قيم R_f التي تم الحصول عليها من 0.6 إلى 0.62 لـ PHZ وانعدام PLN. أُعيد اختبار مستخلصات الفينازين لنشاطها المضاد للفطريات ضد فطرين *Aspergillus niger* و *F.ox*، وأظهرت النتائج نشاطاً مثبطاً أكبر لمستخلص السلالة FR14 بنسبة تثبيط 23.63% لـ *F.ox* و 11.66% لـ *A.niger*. تسمح هذه النتائج المرصودة للسلالتين FR14 و FR15 بأن تكون محتملة التطبيق في المكافحة البيولوجية، تثبيط، مواد ايسية، بكتيريا محفزة لنمو النبات، *Pseudomonas* مشعة.

الكلمات المفتاحية: مكافحة بيولوجية، تثبيط، مواد ايسية، بكتيريا محفزة لنمو النبات، *Pseudomonas* مشعة.

