

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI – Laghouat -

جامعة عمار تليجي -

Faculté des Science

كلية العلوم

Département d'Agronomie

م الفلاحية



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

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

Thème

**Isolement et caractérisation taxonomiques
des *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir
de la rhizosphère de quelques plantes
spontanées et la mise en évidence de leurs
activités antagonistes.**

présenté par (BENAMOR ;Messaoud)

Le 25/06/2014 (8h30 - 10h30)

(Salle conférence)

Encadré par : (AMEUR, Djamila)

Président : M, Becheur M

Examineur : M, Mokhtar Rahmani

BENAMOR Messaoud

Résumé : Isolement et caractérisation taxonomique de *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir de la rhizosphères de quelques plantes spontanées. mis en évidence testé leur activité antagonistes.

Notre travail a été effectué dans la région « kaff mokrann » Laghouat, sur le sol rhizosphérique des Sept espèces de plantes spontanées, pour l'isolement et l'identification de *Pseudomonas* spp. Fluorescents. Nous avons isolé et purifié 35 isolats bactériens, après les tests biochimiques de la galerie classique, Après les test physiologiques et biochimique nous avons sélectionnés 13 isolats comme étant des *Pseudomonas* spp. fluorescents, quatre (4) ont été identifiés comme des *P. fluorescens* par la plaque API 20NE. Selon les deux clés de Jacques (1994) et Bossis (1995), Nous avons pu affilier ces quatre souches au biovar III ,IV.

Nous avons vérifié l'activité antifongique pour Dix (10) isolats contre deux souches des champignons « *Fusarium* ». Ce test a donné des résultats positifs différentiels sur l'inhibition de croissance mycéliens des champignons.

Les propriétés phénotypiques et nutritionnelles ne donnent pas des résultats précis dans l'identification. Nous suggérons d'utiliser les tests génétiques pour confirmer les caractères phénotypiques.

Mots-clés : Isolement, *Pseudomonas fluorescens*, PGPR, Rhizosphère, API 20NE, plantes spontanées

بن أعر المسعود

ملخص : و خصائص تصنيف البسودوموناس المشعة من منطقة الجذور (الريزوسفار) للنباتات البرية, فعاليتها في المنافسة.

أجرينا دراستنا في منطقة كاف مكران بالأغواط, على التربة الملتصقة بالجذور (الريزوسفار) (7) البرية, من أجل عزل و تصنيف البسودوموناس المشعة. بعد عزل و تطهير البكتيريا, تحصلنا على 35 عزلة, وبعد التحاليل البيوكيميائية الكلاسيكية الأولية, بعد التحاليل الفيزيولوجية و البيوكيميائية 13 عزلة بكتيرية التي تشبه galerie API 20NE من اجل التصنيف الدقيق لهذه البكتيرية. أعطت التجارب التي قمنا بها, و باستعمال مفتاحي (1994) بوسيس (1995) أربعة عينات للبسودوموناس III , IV. - 10. عزلات ضد نوعين من الفطريات الضارة من نوع *Fusarium*. أعطت هذه العزلات نتائج ايجابية متفاوتة في كبح نمو الفطريات. الاعتماد على النمط الظاهري و التغذية لا يعطي نتائج دقيقة في التصنيف, لذا ننصح باستعمال التحاليل الوراثية من أجل التأكد من النمط الظاهري.

الكلمات الدالة (الكلمات المفتاحية): , الريزوسفار, PGPR, API 20NE, النباتات البرية.

BENAMOR Messaoud

Summary : Isolation and Characterization of *Pseudomonas* spp. Fluorescent samples from the rhizosphere of plant spontany

Our work was done in the region "kaff mokrann" LAGHOUAT, the rhizosphérique soil of seven species of spontaneous plants, for the isolation and identification of *Pseudomonas* spp. Fluorescents, We was isolated and purified bacterial isolates 35, After biochemical tests classic galleries, we selected 13 isolates as *Pseudomonas* spp. Fluorescents, We have been using API 20NE plates for the correct identification of these bacteria,

From the results obtained by the two key and Jacques (1994) and Bossis (1995). We could join four isolates of *Pseudomonas* spp. Fluorescens biovar III, IV. We have audited the antagonism to Ten (10) isolates against two strains of fungi "*Fusarium*". Differential test gave positive results on the inhibition of fungal growth.

Dependence on phenotype and nutrition does not give accurate results in the classification. We suggest to use genetic tests confirmed the phenotypic character.

Key-words : Isolation, *Pseudomonas fluorescent*, Rhizosphere, PGPR, API 20NE, spontaneous plants.

Remerciements

*Avant toute chose, je remercie mon Dieu
de me donné la force*

Et le courage d'aboutir à ce travail.

Je remercie mon encadreur

« M^{elle} : Ameer - djamila ».

*Non seulement pour avoir accepté de diriger ce
travail, mais aussi pour son enthousiasme
commutatif, sa compétence, sa patience et surtout
sa disponibilité.*

*Je remercie tous les membres de jury d'avoir
accepté de présider et d'examiner Notre Travail
A M^{elle} ZAZA, M pour ses les conseils pratiques
dans laboratoire.*

*je remercie tous les enseignants du département
d'agronomie*

Merci pour tous

Dédicace

Je dédie mon travail à

Mon père et ma mère

Mes frères et mes Sœurs

A toute la famille,

Mes profs,

Toute ma promotion

*Et mes camarades : hocin, oualid,
mefteh, sid ali, mohamed, messaoud
djekaba khalil, aissa, said, et touts.*

Messaoud

Tableau 1 :	la biomasse de différentes matières vivantes dans le sol.	04
Tableau 2 :	l'origine des échantillons des sols	22
Tableau 3 :	tableau de lecture de galerie API 20NE	35
Table 4 :	résultat des tests préliminaire	42
Tableau 5 :	résultats de test de LOPAT.	46
Tableau 6 :	les résultats globaux des tests biochimiques et physiologiques pour 13 isolats retenus.	49
Tableau 7 :	résultats de tests de Galerie API 20NE	50
Tableau 8 :	résultats de Galerie API 20NE sur logiciel d'identification	50
Tableau 9 :	Résultats d'identification des 4 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescens selon la clé A	51
Tableau 10 :	Résultats d'identification des 4 souches de <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescens selon la clé B	52
Tableau 11 :	L'activité antagoniste des souches bactériennes vis-à-vis des deux champignons	53

Figure 1 :	Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux <i>Pseudomonas</i> .	10
Figure 2 :	Interactions entre les <i>Pseudomonas</i> fluorescents, les micro-organismes phytopathogènes et les cellules racinaires.	15
Figure 3:	L'effet de l'absence ou de la présence de PGPR producteurs d'ACC désaminase quand la plante subit un stress (biotique ou abiotique).	19
Figure 4:	Schéma général de caractérisation du groupe <i>Pseudomonas fluorescens</i> -	25
Figure 5 :	la clé dichotomique (A) proposé par Jacques (1994) pour l'identification des <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents.	26
Figure 6:	Clé dichotomique (B) proposé par Bossis (1995). pour l'identification des <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents	27
Figure 7 :	technique de test antagonisme <i>in vitro</i> .	36
Figure 8:	le taux des <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents dans rhizosphère des espèces végétales étudiées.	39
Figure 9 :	colonies bactériennes à Gram (+) et Gram (-) sous le microscope (G1000)	40
Figure 10 :	résultat du test KOH	40
Figure 11 :	le résultat de hugh et leifson (test d'anaérobiose).	41
Figure 12 :	résultats du test catalase	40
Figure 13 :	résultat de test Levane	43
Figure 14 :	résultat d'oxydase	44
Figure 15 :	résultat du test pectinase	44
Figure 16 :	résultat d'arginine	45
Figure 17 :	résultat d'hypersensibilité sur Tabac	45
Figure 18 :	résultat de Gélatine	47
Figure 19 :	la réduction de nitrate en azote	47
Figure 20 :	résultat de test température (41°C)	48
Figure 21 :	résultat de galerie API 20NE de la souche Am1	48
Figure 22 :	le taux d'inhibition des nos souches vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Albedinis</i> (FOA)	54
Figure 23 :	le taux d'inhibition des nos souches vis-à-vis de <i>Fusarium culmorum</i> (BTCR)	54

ADH : Arginine-dihydrolase
AIA : Acide indole acétique
API : Analyse prohyalactic Index
ARA : Arabinose
Bv : Biovar
°C : Degré Celsius
Cm : Centimètre
CO₂ : Dioxyde de carbone
DRB : *deleterious rhizobacteria*
EDS : Eau Distillée Stérile
Fe : fer
Fo : *Fusarium oxysporum*
G- : Gram négative
g : gramme
G+C : Guanine + cytosine
GN : Gélose Nutritif
h : Heure
H₂O₂ : Eau oxygénée
HCN : L'acide cyanhydrique
HL : Milieu Hugh et Leifson
HR : Hypersensibilité
KA : King (A)
KB : King (B)
Kg : Kilo gramme
Km : Kilomètre
LCD : Lysine-décarboxylase
LDC : Lysine-décarboxylase
LPGA : Extrait de Levure, Peptone ,Glucose, Agar
M : Mol
PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*
µm: micro mètre

Table de matière	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste d'abréviations	
INTRODUCTION	01
<i>Première partie : revue bibliographique</i>	
I. GENERALITE SUR L'HABITAT	04
1. Le sol	04
1.1. La biomasse vivante dans le sol	04
1.2. La rhizosphère	04
1.3. Les micro-organismes de la rhizosphère	05
1.3.1. Les bactéries dans la rhizosphère	05
2. Interactions entre les microorganismes, les plantes et le milieu	05
2.1. Les différents modes d'action des microorganismes / plante	05
2.2. Actions des microorganismes sur le milieu	06
2.3. Actions du milieu sur les microorganismes	06
3. Les besoins nutritifs pour les bactéries	07
3.1. Limitation de fer	07
3.1.1. Chez la plante	07
3.2.2. Chez les bactéries	07
3.2. L'importance de fer chez les micro-organismes	07
3.3. Acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif	08
II. LE GENRE <i>PSEUDOMONAS</i>	09
1. Morphologie et structure	09
2. Croissance et nutrition	10
3. Pigments élaborés par les <i>Pseudomonas</i>	11
4. Caractères métaboliques	11
III. LES <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i>	12
1. Classification	12
2. Caractéristique généraux	12
3. Mobilité	13
4. Voies respiratoires	13
4.1. Respiration sur oxygène	13

4.2. Respiration sur nitrate et dénitrification dissimilatrice	14
5. Reconnaissance des bactéries PGPR par la plante hôte	14
6. Les mécanismes biochimiques développés par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans la lutte biologique	15
6.1. Colonisation de la rhizosphère par les <i>pseudomonas</i>	16
6.2. L'effet de <i>Pseudomonas</i> fluorescents	16
6.2.1. Effet directe	16
6.2.1.1. La compétition	16
6.2.1.2. Production des substances inhibitrices de la croissance des pathogènes	16
A. les antibiotiques, Les sidérophores, Les enzymes , L'acide cyanhydrique	17
6.2.2. Effet indirecte	18
6.2.2.1. la stimulation des mécanismes de résistance naturel	18
7. Mécanismes de stimulation de la croissance de la plante hôte	19
7.1. Stimulation de la germination	20
7.2. Stimulation des interactions entre la microflore symbiotique et la plante hôte	20
7.3. Modification des équilibres microbiens	20
7.4. Amélioration de l'alimentation minérale de la plante	20
<i>Deuxième partie : matériel et méthode</i>	
1. L'origine des isolats bactériens	22
2. Méthode d'isolement des <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents	22
3. Dénombrement les germes	23
4. La purification	23
5. Conservation des souches	23
6. Identification et Caractérisation taxinomique des souches	23
6.1. Les testes physiologiques et biochimiques classiques	24
6.1.1. test de Gram	24
6.1.2. Croissance en anaérobiose	28
6.1.3. Recherche de la catalase	29
6.1.4. Test de LOPAT	29
6.1.5. Production des pigment fluorescents	32
6.1.6. Test Gélatinolyse	32

6.1.7. Test réduction des nitrates	33
6.1.8. Croissance à la température 41°C et 4°C	33
6.2. Galerie API 20 NE	34
7. Recherche de l'antagoniste	36
<i>Troisième partie : résultats et discussion</i>	
1. Dénombrement des bactéries	39
2. L'isolement	39
3. Identification des isolats bactériens	40
3.1. Les testes physiologiques et biochimiques classiques	40
3.1.1. Résultat de test de Gram	40
3.1.2. Résultat de croissance en anaérobiose	41
3.1.3. Résultats de production de catalase	41
3.1.4. Tests de LOPAT.....	43
3.1.5. Production Levane sucrose	43
3.1.6. Production d'oxydase	43
3.1.7. Test de Pectinase	44
3.1.8. Test d'arginine déshydrolyase	44
3.1.9. Test d'hypersensibilité sur Tabac	45
3.1.10. Production des pigments fluorescents	46
3.1.11. Test Gélatinolyse	46
3.1.12. La réduction des nitrates	47
3.1.13. Croissance à 41°C et 4°C	47
3.2. Galerie API 20NE	48
3.2.1. Identification taxonomique	51
4. Résultat Recherche de l'antagoniste	52
CONCLUSION.....	62
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	64
ANNEXE	73

INTRODUCTION

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une part importante de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 10^{10} à 10^{11} bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2002) et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004). De plus, les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Pivato *et al.*, 2009), les cycles géochimiques comme celui de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou du carbone (Högberg *et al.*, 2001) et la structure du sol (Rillig et Mummey, 2006). Cependant, leur impact sur la productivité et la diversité des plantes est encore mal compris, ces microorganismes peuvent vivre dans les différentes parties du sol mais par différent dans leur densité de présence.

Une rhizosphère qui peut être vue comme un « oasis dans le désert » : jusqu'à 10^9 bactéries délétères (DRB : *deleterious rhizobacteria*) et bénéfiques (PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) sont dénombrées par gramme de racine, ce qui représente des populations de bactéries 5 à 15 fois plus élevées dans la rhizosphère que dans le sol non adhérent (Tarnawski, 2004).

Malgré cette biodiversité microbienne, les flores végétales subissent l'action de divers agents pathogènes qui leurs font concurrence sur le plan d'aliment et d'habitat. Ils sont responsables de fontes de semis, de pourritures et de flétrissements, entraînant ainsi des baisses de rendement considérables.

La lutte contre ces agents se révèle très difficile ; quant aux méthodes conventionnelles de lutte chimique, elles ne sont souvent pas assez efficaces, sans compter que les pesticides utilisés présentent un risque sérieux pour l'environnement et la santé publique (Meshram, 1984). À une époque où tous les intervenants du secteur agroalimentaire reconnaissent l'urgence de minimiser les dangers occasionnés par ces produits chimiques, la mise au point de stratégies innovatrices, fiables, et respectueuses de l'environnement, conduira inévitablement à de grands progrès dans la lutte contre plusieurs maladies des plantes cultivées à intérêt économique.

Parmi les alternatives proposées, l'utilisation de PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), est une approche conceptuelle comportant de grandes promesses d'avenir aussi bien en terme d'impact socio-économique qu'en terme de transfert technologique.

Ces PGPR ont pris une place d'honneur et sont souvent utilisées comme modèle de rhizobactéries (Sorensen, 2001). Elles constituent une part importante (jusqu'à 10%) de la microflore rhizosphérique cultivable (Kragelund *et al.*, 1996). Certaines bactéries rhizosphériques stimulatrices de la croissance des plantes (PGPR) ont des effets positifs directs sur le partenaire végétal (Dobbelaere *et al.*, 2003), via notamment la production de phytohormones, de siderophores et d'antibiotiques. Parmi toutes les PGPR, les scientifiques se sont intéressés plus particulièrement aux *Pseudomonas fluorescens*, un groupe de bactéries très répandues et diversifiées qui colonisent de nombreuses niches écologiques et dont quelques grammes ou milligrammes/ha suffisent pour l'amélioration du rendement (Raaijmakers *et al.*, 1995).

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2002). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001; Fenton *et al.*, 1992).

Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers permettent de compétitionner farouchement pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie. On note également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (Kim *et al.*, 2004 ; Iavicoli *et al.*, 2003), mais dans la plupart des

cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène.

Les objectifs de ce travail consiste à rechercher des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents à partir de rhizosphère des plantes spontanées, les stratégies d'étude consistent à :

1) Isoler, à partir de la rhizosphère des plantes spontanées une population bactérienne spécifique des *Pseudomonas spp.* Fluorescents.

2) Identifier les isolats par les différents testes biochimiques classiques et/ou par le système API 20NE. Déduire les différents caractères taxonomiques de *Pseudomona spp.* Fluorescents.

3) Tester l'antagonisme de ces isolats contre quelques champignons phytopathogènes.

I. GENERALITE SUR L'HABITAT

1. Le sol

Le sol se situe dans la biosphère à l'interface de la lithosphère et de l'atmosphère. Il est le résultat de la dégradation de la matière organique (d'origine végétale et animale) provenant de la surface et de la matière minérale ayant essentiellement pour origine la roche-mère qui le supporte (Yves, 1995).

Il est le support sur lequel vivent et se déplacent les êtres vivants aériens. Les végétaux y puisent leurs ressources minérales. C'est aussi l'habitat d'une grande diversité d'espèces souterraines. Il fait partie intégrante de tout écosystème et intervient dans le cycle de la matière (Yves, 1995).

1.1. La biomasse vivante dans le sol

Selon Davet, (1996) la matière vivante, visible ou non à l'œil nu, représente une quantité pas toujours facile à réaliser (tableau 1).

Tableau 1 : la biomasse de différentes matières vivantes dans le sol.

La matières vivantes	La biomasse/ hectare
des bactéries	2,5 à 10 tonnes par hectare
des champignons	1 à 10 tonnes par hectare
des algues	100 à 500 kg pro hectare
des protozoaires	150 à 700 kg par hectare
des nématodes	150 à 400 kg par hectare
des acariens	environ 3 kg par hectare
des collemboles	environ 2 kg par hectare
des racines	2 à 12 tonnes par hectare (matière sèche)

Source : Davet, 1996

1.2. La rhizosphère

La rhizosphère est la région du sol directement influencée par les racines. Elle représente le lieu d'échange essentiel entre la plante et le sol. On y observe une présence importante de microorganismes liés les uns aux autres par de complexes réactions de guerre et de paix. On observe souvent dans la rhizosphère une quantité de microorganismes au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines (Jacques, 1999).

1.3. Les micro-organismes de la rhizosphère

La richesse de la rhizosphère en sucres, amino-acides, acides organiques, isoflavonoides, régulateurs de croissance et en enzymes libérées par la plante (Pierson et Pierson, 2000), rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, champignons, algues et bactéries. Ces êtres vivants, les microorganismes en particulier, sont requis dans le processus de la décomposition et le recyclage des nutriments dans la rhizosphère de la plante (Germida *et al.*, 1998). Ils jouent aussi un rôle significatif dans l'état de la santé des plantes, certains sont nuisibles, d'autres sont bénéfiques et certains ne semblent avoir aucun effet.

1.3.1. Les bactéries dans la rhizosphère

La croissance végétale peut être affectée par les bactéries de différentes façons. En effet, des bactéries peuvent être à l'origine de maladies, inhiber la croissance des plantes, tandis que d'autres peuvent, activement ou non, favoriser la croissance à travers différents mécanismes (fixation d'azote, solubilisation des phosphates, production de sidérophores, phytohormones, ACC déaminase) (Ma *et al.*, 2011). Dans la rhizosphère, la concentration en bactéries peut être 10 à 1 000 fois supérieure à celle du reste du sol (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

2. Interactions entre les microorganismes, les plantes et le milieu

Les interactions entre les microorganismes, les plantes et le milieu sont complexes et réciproques. Les microorganismes interagissent entre eux. Ces interactions peuvent être influencées par les conditions extérieures (température, humidité, pH, ...) qui peuvent déplacer les équilibres vers l'un ou l'autre des microorganismes. Ceux-ci peuvent cependant également agir sur les conditions extérieures par exemple en influençant le pH du milieu, en modifiant la structure du sol ou en minéralisant la matière organique (Jacques, 1999).

2.1. Les différents modes d'action des microorganismes / plante

Selon Jacques (1999), Les modes d'actions des microorganismes sont nombreux. Certains mécanismes protègent indirectement les plantes en renforçant sa vitalité et/ou ses

mécanismes de défenses, alors que d'autres modes d'actions sont directement dirigés sur les microorganismes néfastes pour la santé de la plante.

Les mécanismes de protection des antagonistes comprennent des phénomènes de compétition (pour le fer, pour les sites d'infection, pour les nutriments), le parasitisme, la production de cyanide ou d'antibiotiques, production de substances de croissance de la plante, induction de résistance dans la plante, dégradation des toxines du pathogène. L'action d'un antagoniste efficace ne repose en général pas sur un seul mode d'action, mais sur la combinaison de plusieurs mécanismes. L'action de la souche Fo47 de *Fusarium oxysporum*, qui protège par exemple diverses plantes contre des fusarioses vasculaires, agit par concurrence pour le site d'infection, par compétition pour le fer et le carbone, et en plus par résistance induite dans la plante (Jacques, 1999).

2.2 Actions des microorganismes sur le milieu

Selon Jacques, (1999). Les microorganismes agissent à divers niveaux sur leur milieu. les rôles essentiels qu'ils jouent dans les cycles des éléments nutritifs et dans la formation de l'humus. Ils sont également primordiaux par exemple pour la biodégradation des produits étrangers Xénobiotiques comme les pesticides. Ainsi, plusieurs matières actives de synthèse pour la protection des plantes pourraient voir leur efficacité pratique compromise par une biodégradation accélérée provoquée par leur utilisation répétée.

L'effet des micro organismes du sol sur la structure du sol est également très important. Grâce aux liants qu'ils produisent et aux hyphes des champignons qui agissent comme une sorte de filet, la structure du sol peut être nettement améliorée et stabilisée. Ceci a un effet positif sur l'aération du sol et sur son équilibre hydrique, et d'autre part protège le sol contre l'érosion.

Enfin, ponctuellement, certains microorganismes sont également capable de modifier le pH du sol, ce qui influence la solubilité de certains éléments nutritifs.

2.3 Actions du milieu sur les microorganismes

Selon Jacques (1999), Les microorganismes sont fortement dépendant et ainsi influencés par la régulation des disponibilités en eau et en oxygène du sol. De manière générale, l'activité microbienne diminue avec la disponibilité de l'eau, les bactéries y étant plus sensibles que les champignons, Certains pesticides perturbent grandement les populations microbiennes, agissant indépendamment sur les organismes nuisibles ou les

organismes utiles. Outre l'action directe des pesticides contre les microorganismes du sol, ils peuvent les influencer également indirectement, par exemple en modifiant les exsudats des plantes.

3. Les besoins nutritifs pour les bactéries

Toutes les bactéries ont besoin d'eau, d'une source de carbone (C), d'oxygène (O), d'hydrogène (H), d'azote (N), de soufre (S) et de phosphore (P) qui sont les constituants des glucides, lipides, protéines et des acides nucléiques (C, O, H, N, S et P sont des macro-éléments ou macronutriments) ; des ions (K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Cl^- , ...) et d'une source d'énergie (Rescott *et al.*, 2000).

3.1. Limitation de fer :

3.1.1. Chez la plante ;

Les concentrations de Fe soluble sont par conséquent généralement bien en dessous de celles requises pour une croissance optimale des plantes qui sont estimées à environ 10^{-6} M, concentrations atteintes à des valeurs de pH inférieures à 3 (Ma, 2005). Pour pallier à cette faible disponibilité de Fe (Michaud, 2007).

3.1.2. Chez les bactéries

Bien qu'il soit le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, le fer est très peu soluble en milieu aérobie et à pH physiologique et est de ce fait très peu biodisponible. La concentration de l'ion Fe^{3+} accessible dans l'organisme humain durant une infection est d'environ 10^{-18} M. Cette concentration est bien trop basse pour les micro-organismes qui exigent entre 10^{-7} et 10^{-5} M de fer pour prospérer et se multiplier (Guerinot, 1994).

3.2. L'importance de fer chez les micro-organismes

À l'exception de quelques rares souches de *Lactobacilli* (Imbert et Blondeau, 1998), de *Borrelia burgdorferi* et de *Treponema pallidum* (Meksem, 2010) qui peuvent utiliser le manganèse à la place du fer, tous les autres micro-organismes ont besoin du fer pour se multiplier.

Du fait de ses propriétés de fixation d'oxygène et d'oxydoréduction, il se place au centre des situations de stress oxydatif. Le fer est impliqué en tant que co-facteur enzymatique dans de nombreux processus métaboliques majeurs comme la photosynthèse, la phosphorylation oxydative (Schäfer *et al.*, 1996), le transport et le stockage de l'oxygène et le transfert d'électrons (Andrews *et al.*, 2003 ; Smith, 2000 ; Delepelaire, 2004).

Cet élément intervient dans la régulation génétique et la biosynthèse de l'ADN (Dougherty et Downs, 2006) et participe également dans la fixation de N₂ , la méthanogenèse (la production et la consommation du H₂) et le cycle tricarboxylique (Suttisansanee , 2006).

3.3. Acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif

En conditions anaérobies, la source de fer pour les bactéries à Gram négatif est le fer ferreux (Fe²⁺). Les bactéries pathogènes puisent leur source de fer de l'hème ou des protéines de stockage du fer chez l'organisme hôte (Nader, 2007). le fer libre dans un environnement aérobie varie de 10⁻⁹ M à 10⁻¹⁸ M à pH7, alors que les bactéries nécessitent une concentration de 10⁻⁶ M pour une croissance optimale (Nader, 2008).

Cette concentration est largement supérieure à la concentration de fer disponible chez l'hôte (10⁻²⁴M). Pour cette raison les bactéries à Gram-négatif ont développé plusieurs systèmes pour pouvoir acquérir le fer de l'indirect au direct :

- ✚ **Acquisition indirecte** basée sur des molécules synthétisées par les bactéries et sécrétées dans le milieu extracellulaire capables de complexer le fer (sidérophores) ou l'hème (hémophores) de diverses sources.
- ✚ **Acquisition directe** par un contact direct entre les protéines de surface bactérienne et les sources de fer (transferrine, lactoferrine, ferritine) et d'hème (Hème, hémoprotéines) présentes chez l'hôte (Neilands, 1995).

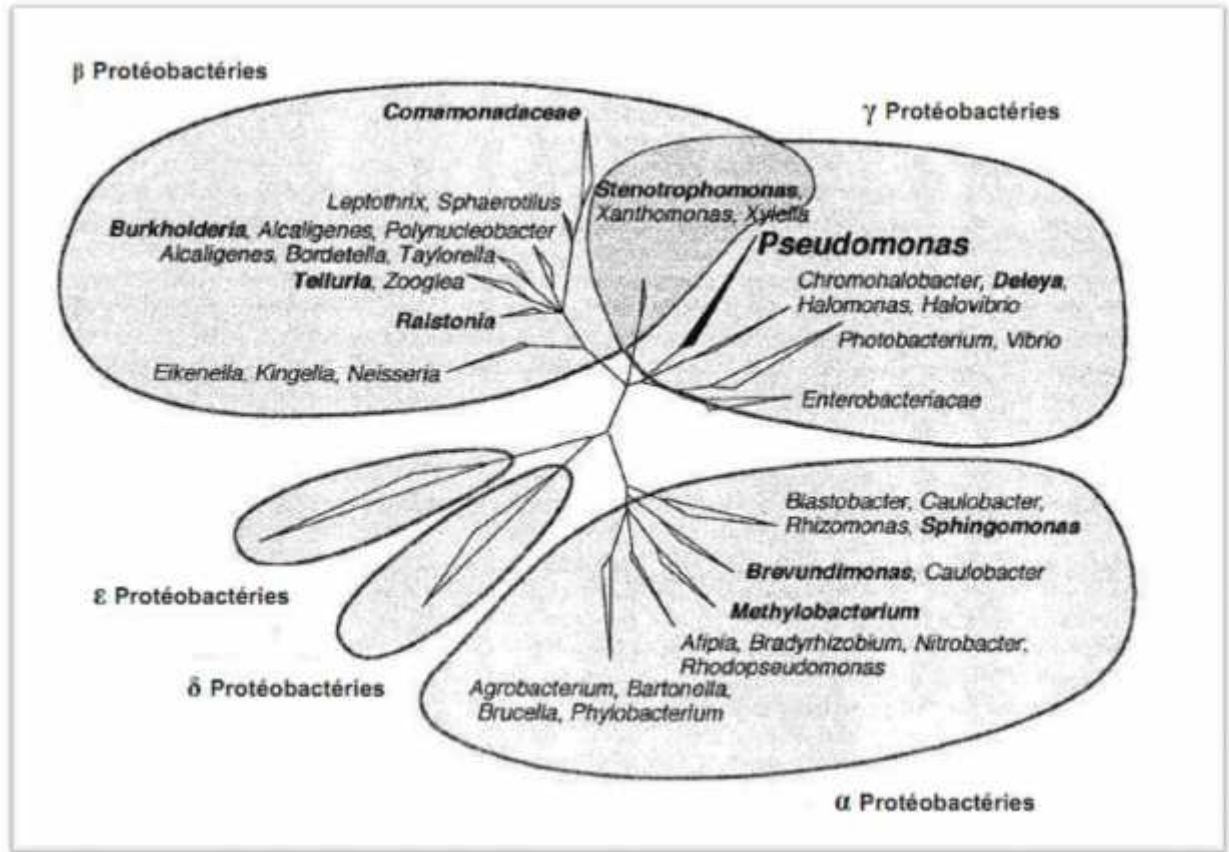
II. LE GENRE *PSEUDOMONAS* :

1. Morphologie et structure

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. ce sont des bacilles à Gram négatif non sporulantes, sont aérobies obligatoires, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 μm (Palleroni, 1984). à l'exception de certaines pouvant utiliser le NO_3 comme accepteur d'électrons. Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche. Elles se cultivent sur des milieux usuels non enrichis et sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Elles présentent un type respiratoire aérobie strict et un type métabolique chimio-organotrophe oxydatif (Bossis *et al.*, 2000).

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2002).

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Fig.1).



Source : (Bossis *et al.*, 2000).

Figure 1 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas*.

2. Croissance et nutrition

Selon Avril *et al.* (1992). 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 auxotrophes nécessaires pour l'identification. L'auxotrophe est caractéristique pour :

- ❖ *P. maltophilia* : méthionine ou cystine.
- ❖ *P. diminuta* - *P. vesicularis* : pantothénate, biotine, cyanocobalamine

3. Pigments élaborés par les *Pseudomonas*

Selon Singleton et Sainsbury (2006). Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine. 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 (pigment jaune à vert) mais certaines souches sont parfois apigmentées.
- ❖ *P. aureofaciens* : pigment jaune orange ou pourpre.

4. Caractères métaboliques

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose) (Palleroni, 1984).

De nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes. L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (Campbell *et al.*, 1995 ; Latour *et al.*, 1996).

Le catabolisme des Xénobiotiques par les *Pseudomonas* spp. fluorescents se caractérise en effet par la variété et la plurifonctionnalité des enzymes déprédatives. Il présente de multiples voies périphériques permettant les premières attaques d'une gamme importante de composés (Golovleva *et al.*, 1992). certaines populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont la possibilité de dissimiler l'azote (Clays-Josserand *et al.*, 1995). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982).

III. LES *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* :

Les *Pseudomonas fluorescens* est une bactérie à Gram négatif, aérobie strict et vagile qui se présente sous forme de bâtonnet. Elle évolue à un pH neutre et sa température optimale de croissance est de 25 à 30 °C (Palleroni, 1984), mais elle peut aussi se développer à une température aussi basse que 4 °C. La souche de *Pseudomonas fluorescens* ne forme pas de spores ou d'autres structures de survie et ne peut pas se développer dans des conditions acides (inférieur à pH 4,5). Comme sa demande nutritionnelle est modeste, elle peut survivre et se multiplier pendant plusieurs mois dans des environnements humides. La plupart des souches sont des chimio-organotrophes strictement aérobies nécessitant à la fois de l'oxygène et du carbone organique pour leur croissance (Holt, 1994).

1. Classification

Le groupe des *Pseudomonas* fluorescents est composé de bactéries qui, dans des conditions de carence de fer, produisent des pigments jaune-vert fluorescents. Huit espèces différentes appartiennent à ce groupe : *Pseudomonas aeruginosa*, espèce pathogène de l'homme, *P. syringae*, *P. viridiflava*, et *P. cichorii*, espèces phytopathogènes et enfin *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens* et *P. chlororaphis*, qui rassemblent des organismes saprophytes. La classification des *Pseudomonas* est la suivante :

Règne : *Bactéria*

Division : *Protéobactéria*

Classe : *Gammaprotéobactéria*

Ordre : *Pseudomonadales*

Famille : *Pseudomonadacéae*

Genre : *Pseudomonas*

2. Caractéristique généraux

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents forment un groupe appartenant au genre *Pseudomonas* sensu stricto (groupe ARN I sensu Palleroni). Les membres de ce groupe se caractérisent par l'aptitude à synthétiser en situation de carence en fer des sidérophores présentant un groupe chromophore jaune-vert, fluorescent sous rayonnement ultraviolet (Palleroni, 1984, 1992). L'étude des cytochromes respiratoires permet ainsi de distinguer d'une part *P. aeruginosa* et les espèces saprophytes, qui possèdent une

cytochrome C oxydase (Stanier *et al.*, 1966), et d'autre part la plupart des espèces phytopathogènes dépourvues de cette enzyme (Lelliot *et al.*, 1966 ; Sands *et al.*, 1967). La présence ou non de cette enzyme clé est donc considérée comme un caractère taxinomique permettant de discriminer aisément les espèces fluorescentes étudiées. Généralement, les espèces oxydase-positive présentent un métabolisme plus varié que les espèces oxydase-négative qui sont toutes phytopathogènes (Misaghi et Grogan, 1969 ; Palleroni, 1984).

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents stimuler la croissance et/ou d'améliorer l'état sanitaire des plantes (Lemanceau, 1992). De plus, la résistance naturelle de certains sols à diverses maladies d'origine tellurique (Lucas *et al.*, 1989 ; Lemanceau et Alabouvette, 1993). L'aptitude de certains isolats à dégrader des substances Xénobiotiques a également retenu l'attention de différents chercheurs.

Pseudomonas spp. fluorescents ont la possibilité de dissimiler l'azote (Gamble *et al.*, 1977 ; Clays-Josserand *et al.*, 1995). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982). Ces bactéries contribuent donc, de façon significative, à la réduction des nitrates et des nitrites qui constituent des polluants des nappes phréatiques.

3. La mobilité :

selon Weger *et al.* (1987) et Scher *et al.* (1988) ont remarqué que la mobilité est nécessaire à la colonisation de la rhizosphère, en observant des mutants de *P. fluorescens* WCS374 dépourvus de flagelles, qui sont devenus incapables de coloniser les racines de pommes de terre et de soja respectivement.

4. Voies respiratoires

4.1. Respiration sur oxygène

Les *Pseudomonas spp.* sont définis comme étant des microorganismes aérobies utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Palleroni, 1984). Cette respiration sur O₂ est celle qui présente le rendement énergétique le plus important suite au potentiel redox élevé de l'oxygène. Elle est caractérisée par des cytochromes oxydases, transporteurs d'électrons terminaux qui réagissent directement avec l'oxygène. Les *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophytes possèdent tous une cytochrome oxydase c présentant un pic d'absorption caractéristique à 552/554 nm. Cette enzyme est mise en évidence par l'oxalate de N,N-diméthyl-paraphénylène diainine (Lelliot *et al.*, 1966 ; Stanier *et al.*, 1966).

4.2. Respiration sur nitrate et dénitrification dissimilatrice

Lorsque l'oxygène n'est plus disponible en quantité suffisante, certaines espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents font appel aux oxydes d'azote. La réduction des nitrates ($\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$) se fait à l'intérieur de la cellule au niveau de la membrane interne grâce à la nitrate réductase. Elle est généralement inhibée en aérobiose, (Tiedje, 1988). La réduction de NO_2^- , NO et N_2O est sous le contrôle de réductases plus ou moins liées à la membrane plasmique et elle s'exprime côté péri-plasmique (Knowles, 1982). La respiration sur nitrates et la dénitrification présentent un rendement énergétique plus faible que la respiration sur oxygène.

5. Reconnaissance des bactéries PGPR par la plante hôte

Selon Rovira (1969), les premiers substrats utilisés par les PGPR du genre *Pseudomonas* sont des sucres simples, des acides organiques et des acides aminés, ce qui explique un fort chimiotactisme vers les racines des plantes (Lugtenberg *et al.*, 2002 ; Preston, 2004). La perception de la bactérie par la plante hôte n'est pas un mécanisme complètement élucidé. Deux molécules bactériennes sont à la base de la reconnaissance de la bactérie par la plante. En effet, la flagelline (peptide Flg22) qui est une sous-unité du flagelle polaire des *Pseudomonas* est reconnue par la plante grâce à une protéine kinase associée à la membrane.

Toutefois, cette protéine kinase est habituellement une structure permettant à la plante de reconnaître les pathogènes et de mettre en place une cascade de réactions afin de se défendre.

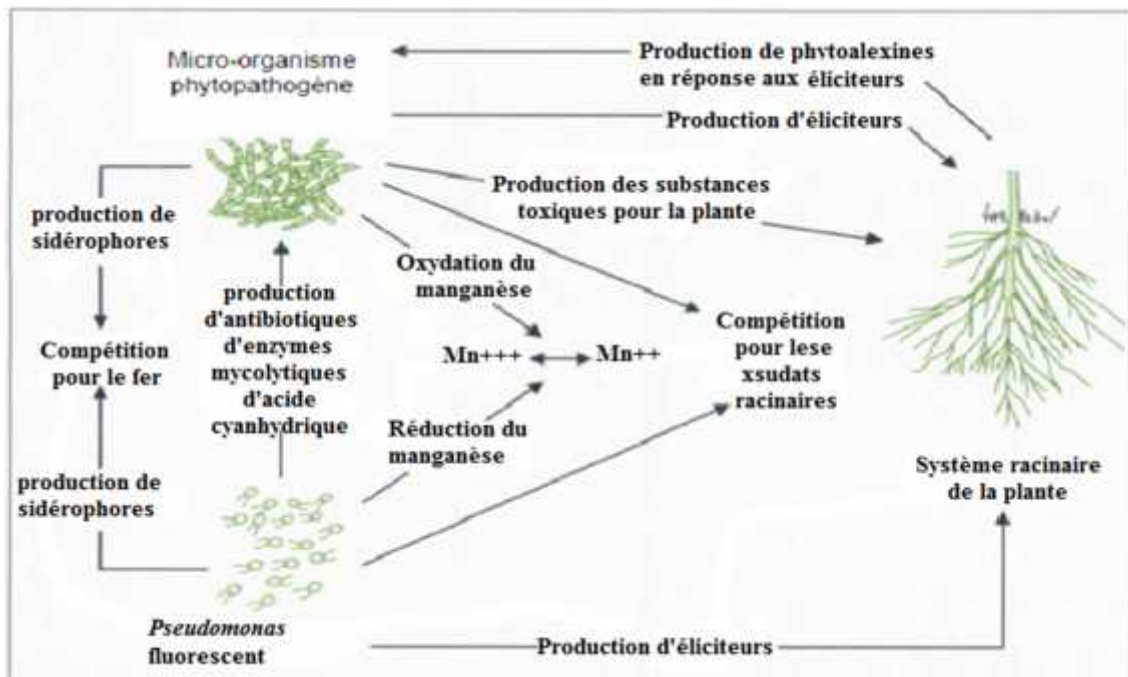
De plus, la reconnaissance de la flagelline est un mécanisme hôte et souche spécifique (Gómez-Gómez et Boller, 2002). L'autre type de molécule permettant la reconnaissance spécifique des bactéries sont les lipopolysaccharide (LPS). La reconnaissance des LPS a été principalement étudiée dans le cadre de la reconnaissance de pathogènes, mais cela s'applique également pour les *Pseudomonas* PGPR. En effet, si la reconnaissance de certains pathogènes se fait par rapport à la structure du LPS et permet la libération par la plante de composés antimicrobiens (Dangl et Jones 2001), la reconnaissance spécifique de *Pseudomonas* PGPR se fait également grâce au LPS sans induction de la réponse hypersensible (HR). Il est capable en revanche d'induire une résistance locale induite (LIR), ainsi qu'une réponse systémique induite (ISR), permettant à la bactérie de coloniser

la plante tout en la protégeant contre d'éventuels pathogènes. De plus, le DAPG produit par ces mêmes bactéries est également capable d'induire l'ISR chez la plante (Jourdan *et al.*, 2008).

6. Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique

Différents mécanismes, agissant seuls ou en combinaison, ont été avancés pour expliquer comment ces *Pseudomonas* fluorescents sont capables de réduire la gravité de ces maladies (Figure 2).

- la simple occupation des sites d'infection potentielle par colonisation de la rhizosphère, empêchant ainsi la croissance des pathogènes ;
- la production de métabolites inhibiteurs de la croissance des pathogènes, et la compétition pour les éléments nutritifs et l'espace.
- la stimulation des mécanismes de résistance de l'hôte vis-à-vis des agents pathogènes.



(Jacques *et al.*, 1993).

Figure 2 : Interactions entre les *Pseudomonas* fluorescents, les micro-organismes phytopathogènes et les cellules racinaires

6.1. Colonisation de la rhizosphère par les *pseudomonas* :

Cette colonisation est susceptible d'exercer une protection contre les maladies du sol et apparait liée a un processus d'antagonisme, ou comme un préalable a l'expression de facteurs responsables de l'antagonisme (antibiose, stimulation de la résistance).

Ce phénomène de colonisation peut être décomposé en trois étapes :

- le chimiotactisme, associé aux exsudats racinaires
- l'adsorption des micro-organismes sur les racines
- et la colonisation proprement dite de la rhizosphère, qui implique une consommation des exsudats racinaires.

6.2. L'effet de *Pseudomonas* fluorescents

6.2.1. Effet directe

6.2.1.1. La compétition

Le premier type d'interaction mis en jeu entre les micro-organismes est le phénomène de compétition aussi bien pour l'espace que pour les éléments nutritifs. La compétition trophique s'exerce essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer. En effet, ce dernier élément bien qu'abondant dans le sol, s'y trouve essentiellement sous forme oxydée (Fe^{3+}) non assimilable par les micro-organismes telluriques. Certains ont développé des stratégies d'acquisition (d'assimilation) du fer en synthétisant des sidérophores (molécules chélatrices du fer) et des protéines membranaires réceptrices du complexe sidérophores/fer à leur surface (Kloepper *et al.*, 1980).

La compétition pour les substrats carbonés des exsudats racinaires permet aux PGPR antagonistes de réduire les populations d'agents pathogènes au niveau des zones à forte exsudation (Lemanceau, 1992). La répartition des micro-organismes dans la rhizosphère n'est pas aléatoire ; elle est le résultat du pouvoir compétitif de ces micro-organismes. En général, ils ont tendance à coloniser les jonctions cellulaires et les zones d'émergence des racines (zones d'exsudation intense) soit 10% seulement de la surface racinaire (Bowen et Rovira, 1976).

6.2.1.2. Production des substances inhibitrices de la croissance des pathogènes :

Selon Leisinger et Margraff (1979), Les *Pseudomonas* fluorescents produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui pourraient jouer un rôle dans l'effet antagoniste de

ces micro-organismes dans le sol. Ces agents inhibiteurs peuvent être scindés en 4 groupes, les antibiotiques, les sidérophores, les enzymes et l'acide cyanhydrique (HCN).

A. les antibiotiques :

Plusieurs antibiotiques sont produits par les *Pseudomonas* fluorescents et jouent un rôle important dans l'inhibition d'agents phytopathogènes, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DPG) produit par *P. fluorescens* CHA0 (Haas *et al.*, 1991 ; Keel *et al.*, 1992, 1996) a montré un effet suppressif sur plusieurs phytopathogènes (*G. graminis* et *Thielaviopsis basicola*), d'autres antibiotiques sont produits par les *Pseudomonas* dont le pyoluteorine (James et Gutterson, 1986 ; Howie et Suslow, 1991 ; Maurhofer *et al.*, 1994 ; Pyrrolnitrin Rosales *et al.*, 1995 ; Ligon *et al.*, 2000). D'autre part, certains composés volatils (HCN) émis par les bactéries du genre *Pseudomonas* ont des effets antibiotiques et jouent un rôle dans la protection de la plante hôte (Voisard *et al.*, 1989).

B. Les sidérophores :

Le fer se trouve le plus souvent dans des conditions de pH proches de la neutralité et dans un environnement aérobie sous la forme de polymères d'hydroxydes ferriques fortement insolubles (à pH 7, la concentration en Fe^{3+} soluble est évaluée à 10^{-17} M) (Jacques *et al.*, 1993). La plupart des micro-organismes ont donc développé un mécanisme hautement spécifique de captation des ions ferriques basé sur la production de sidérophores dans des conditions de carence en fer. Ce sont des substances de faible poids moléculaire, chelatrices du Fe^{3+} et servant de transporteur de l'ion ferrique à l'intérieur de la cellule microbienne (Neilands et Leong, 1986). Les *Pseudomonas* fluorescents produisent deux types de sidérophores, l'un dit de faible affinité (pyocheline) décèle chez *P. aeruginosa* (Cox *et al.*, 1981) et l'autre, possédant une affinité élevée (pyoverdine ou pseudobactine). La production en quantités importantes de ces molécules chelatrices dans le sol permet aux *Pseudomonas* fluorescents de s'approprier tout le fer nécessaire à leur croissance et de le rendre inaccessible aux autres microorganismes (Viswanathan et Samiyappan, 2004).

C. Les enzymes :

la production d'enzymes mycolitiques est également évoquée pour expliquer l'action antagoniste des *Pseudomonas* fluorescents (Lam *et al.*, 1992). Pour une souche de *Pseudomonas stutzeri* (non fluorescent), (Lim *et al.*, 1991) ont montré que la chitinase et la

laminarinase produites par cette souche sont responsables de l'antagonisme in vitro observe vis-à-vis de *Fusarium solani*.

D. L'acide cyanhydrique :

selon Voisard *et al.* (1989), la production d'acide cyanhydrique (HCN) par la souche de *P. fluorescens* CHA5 est nécessaire à la protection de la plante vis à-vis de l'agent de la pourriture noire du tabac. Ce mécanisme est de moindre importance avec la souche CHA77 (Haas *et al.*, 1991). L'HCN produit dans la rhizosphère activerait des réactions de défense de la plante, ce qui correspond a un mécanisme indirect de protection.

6.2.2. Effet indirecte

6.2.2.1. la stimulation des mécanismes de résistance naturel

Il existe des interactions entre les *Pseudomonas* et les cellules racinaires, qui permettent d'augmenter la résistance de celles-ci a l'infection par des micro-organismes. La réduction du manganèse par les *Pseudomonas* fluorescents pourrait jouer un rôle (Sarniguet, 1990). Cette réduction augmenterait la quantité de manganèse disponible pour la plante et, par ce biais, conduirait à une meilleure tolérance de cette dernière au parasite (Van Peer *et al.*, 1991).

Ce mode d'action des PGPR antagonistes est expliqué par l'induction de la résistance naturelle des plantes contre les maladies (Digat *et al.*, 1993). Lors de ce phénomène appelé aussi « résistance systémique induite » (RSI), des rhizobactéries non pathogènes peuvent conférer à la plante un certain degré de protection à des attaques ultérieures par un phytopathogènes (ou un agent délétère) via la stimulation de mécanismes de défense systémiques. Cette « immunité » s' initie suite à la perception par la plante de molécules dites éliciteurs produites par le microorganisme bénéfique (Jourdan, 2008). Cette induction de la résistance peut se faire par différents mécanismes :

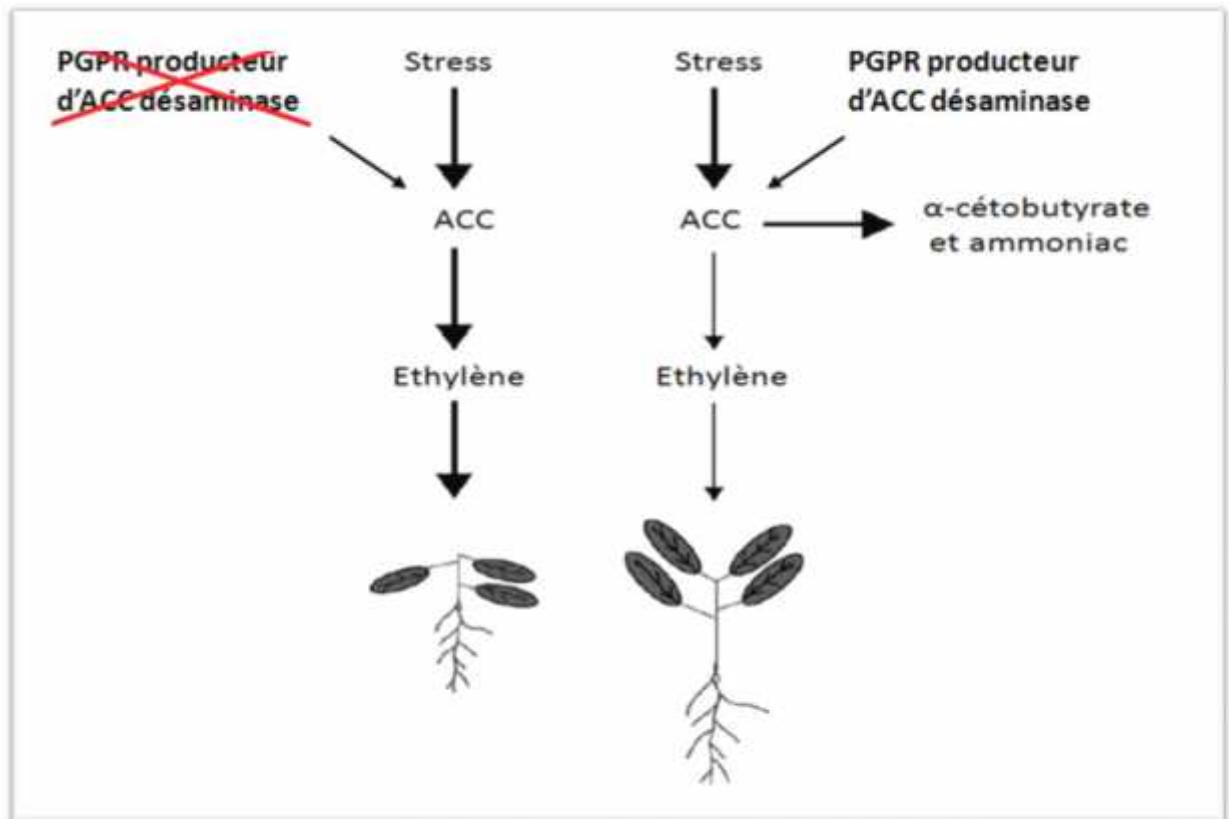
a) L'inoculation par la bactérie antagoniste peut induire des modifications morphologiques et cytologiques chez la plante la rendant ainsi moins sensible à l'attaque de l'agent pathogène (Anderson et Guerra, 1985).

b) L'inoculation par les antagonistes peut induire la synthèse de molécules dans les tissus internes des plantes ce qui leur confère une certaine immunité contre les agents pathogènes. En effet, l'inoculation des racines d'oeillet par une bactérie du genre

Pseudomonas les protège contre la *Fusariose* vasculaire. Cette résistance semble être associée à l'accumulation de Phytoalexines au niveau de la plante (Van peer *et al.* 1991).

7. Mécanismes de stimulation de la croissance de la plante hôte

certaines souches de *Pseudomonas* possèdent le gène de l'ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) qui est impliqué dans l'amélioration de la croissance de la plante hôte (Glick *et al.*, 1998). Cette enzyme peut cliver le précurseur de l'éthylène l'ACC et donc ainsi réduire le taux d'éthylène dans la plante. L'éthylène est une phytohormone qui inhibe la croissance racinaire, et sa diminution, grâce à l'ACC désaminase, permet d'observer une élévation racinaire. la production d'éthylène peut causer l'inhibition de la croissance des racines (Glick *et al.*, 1998). (Figure 3).



Source : Glick *et al.*, 2004

Figure 3: Représentation schématique de l'effet de l'absence (gauche) ou de la présence (droite) de PGPR producteurs d'ACC désaminase quand la plante subit un stress (biotique ou abiotique). La taille des flèches indique le degré relatif du flux.

7.1. Stimulation de la germination

Certaines souches bactériennes, appartenant en particulier au groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescents, semblent améliorer la germination des graines lorsque les conditions d'environnement sont défavorables (Kloepper *et al.*, 1986 ; Hôte *et al.*, 1991) ont montré que le taux de germination de graines de *colza*, semées dans un sol froid et battant, pouvait être significativement augmenté grâce à l'inoculation par certaines souches bactériennes. (Digat *et al.*, 1990) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas* peuvent stimuler significativement la germination de graines de tomate même lorsque les conditions d'environnement ne semblent pas défavorables.

7.2. Stimulation des interactions entre la microflore symbiotique et la plante hôte

L'association d'*endomycorhizes* et de *Pseudomonas* fluorescents s'accompagne d'une plus grande stimulation de la croissance de la plante que la seule inoculation bactérienne ou fongique (Meyer et Linderman, 1986 ; Oliveira *et al.*, 1987). certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents améliorent la pérennité de l'association symbiotique entre l'*ectomycorhize Tuber melanosporum* et le noisetier (Mamoun et Olivier, 1992).

7.3. Modification des équilibres microbiens

Seules Les souches de *Pseudomonas*, ayant provoqué une réduction de la densité des champignons et des bactéries Gram +, ont déterminé une augmentation de croissance des pommes de terre par la Compétition et Antibiose (Kloepper et Schroth, 1981).

7.4. Amélioration de l'alimentation minérale de la plante

la stimulation de la croissance et du rendement des plantes après leur inoculation avec les PGPR implique la solubilisation du Phosphate, du Potassium et par la stimulation de l'absorption de l'azote atmosphérique en le rendant assimilable par la plante (Glick *et al.*, 2007).

1. L'origine des isolats bactériens :

Dans notre travail nous avons réalisé l'isolement de rhizobactéries sur des échantillons de sol, prélevés à partir de la rhizosphère de sept (07) espèces de plantes spontanées (tableau 2), dans la région de kaf-Mokrane à un (01) km au nord -ouest du chef lieu de la Wilaya de Laghouat .

Nous avons prélevé un échantillon aléatoire composé du sol de la zone rhizosphérique de chacun des espèces à une profondeur de 15 à 20 Cm. Les échantillons ont été mis dans des sacs en plastique stériles.

Tableau 2 : l'origine des échantillons des sols

Les échantillons	Origine végétale	Code
Echantillon 01 :	Rhizosphère de <i>Maricandia arvensis</i>	Ma
Echantillon 02 :	Rhizosphère d' <i>Euphorbia helioscapia</i>	Eu
Echantillon 03 :	Rhizosphère d' <i>Echinops spinosus</i>	Ec
Echantillon 04 :	Rhizosphère d' <i>Astragalus armatus</i>	As
Echantillon 05 :	Rhizosphère de <i>Retama reatam</i>	Ru
Echantillon 06 :	Rhizosphère d' <i>Aristida pungens</i>	Ar
Echantillon 07 :	Rhizosphère de <i>Mathiola livida</i>	Ml

2. Méthode d'isolement des *Pseudomonas* spp. fluorescents :

L'isolement des bactéries appartenant aux *Pseudomonas* spp. fluorescents du sol rhizosphérique à été effectué par la méthode des suspension, dilution (klement *et al.*1990).

Nous avons mis un (1) g du sol dans un tube à essais contenant 9 ml d'eau distillée stérile et fait une agitation orbitale à 120 rpm, durant 15 min, un (01) ml de cette suspension a été prélevé et mis dans un autre tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile, une série de dilution en cascade a été réalisée jusqu'à 10^{-5} (Annexe 02).

L'ensemencement a été effectué sur deux milieux de culture, un milieu général LPGA (Smidi, 1982) et un autre milieu sélectif King B (king *et al.* 1954).

Nous avons étalé 0,1ml de chaque dilution sur les deux milieux (KB et LPGA) dans des boites de Pétri avec deux répétition pour chaque dilution. L'incubation a été effectuée pendant 24 à 48 h à une température de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ (Annexe 2).

3. Dénombrement les germes

A l'aide de l'appareil compteur de colonie, nous avons dénombré toutes les colonies apparues sur les deux milieux après 24h et 48h aux différentes dilutions.

L'énumération consiste à calculer les bactéries présentes sur les boîtes en Unité Formant Colonie (UFC), Pour le calcul, seules les boîtes ayant 30 à 300 colonies sont retenues. Nous avons utilisé la formule de klement *et al.* (1990).

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

N : la moyenne des colonies issues des boîtes de même dilution

X : le nombre de dilution

4. La purification

Après 48 h d'incubation, nous avons repéré les colonies fluorescentes (celles produisant un pigment fluorescent) à l'œil nu, sur le milieu B de King. Alors que, nous avons choisi les colonies selon les caractères morphologiques de *Pseudomonas* fluorescents, qui porte principalement la forme (circulaire, lisse et plane) sur le milieu LPGA. Nous avons ensemencé les colonies en strie sur le milieu KB. Après cinq (5) purifications successives, nous avons obtenu des cultures pures (Annexe 2).

5. Conservation des souches :

Après la purification, nous avons repiqué les isolats purs dans des tubes contenant le milieu KB. Ces tubes ont été mis au réfrigérateur à température de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$, pour les utiliser ultérieurement (Annexe 2).

6. Identification et Caractérisation taxonomique des souches :

L'identification préliminaire des espèces de *Pseudomonas* produisant le pigment fluorescent, est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques (morphologie cellulaire), la coloration de Gram, la recherche de catalase et de l'oxydase, arginine dihydrolase, voie d'utilisation du glucose, ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques (Holt *et al.* 1994 ; Bossis *et al.* 2000).

L'identification préliminaire de *Pseudomonas* spp. fluorescents est essentiellement basé sur les caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de l'oxydase, Levane sucrase, arginine dihydrolase, hypersensibilité de

Tabac, voies d'utilisation du glucose. Ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques (figure 4) (Schaad *et al.*, 2001), le système Galerie API 20 NE, et les clés dichotomiques (A et B) proposées respectivement par Jacques (1994) et Bossis (1995) (Figure 5 et 6).

6.1. Les tests physiologiques et biochimiques classiques

6.1.1 Test de Gram

6.1.1.1. Coloration de Gram ;

La coloration de Gram est un critère essentiel de la classification des bactéries (Schaad *et al.* 2001). Il y a plusieurs facteurs qui vont intervenir dans cette coloration : la différence de composition chimique de bactérie et la différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool.

a) Faire un frottis

Sur une lame propre, nous avons déposé une goutte d'eau distillée stérile sur la lame, à l'aide d'une anse de platine stérile, nous avons touché une colonie bactérienne, Puis nous avons frotté la pointe dans la goutte d'eau. Laissé sécher à l'air. Nous avons fait passer trois (3) fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

b) La coloration

Nous avons déposé quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé et laissé agir une (1) minute (Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries). Nous avons jeté l'excès de colorant. Puis rincé très brièvement en faisant couler d'eau distillée sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).

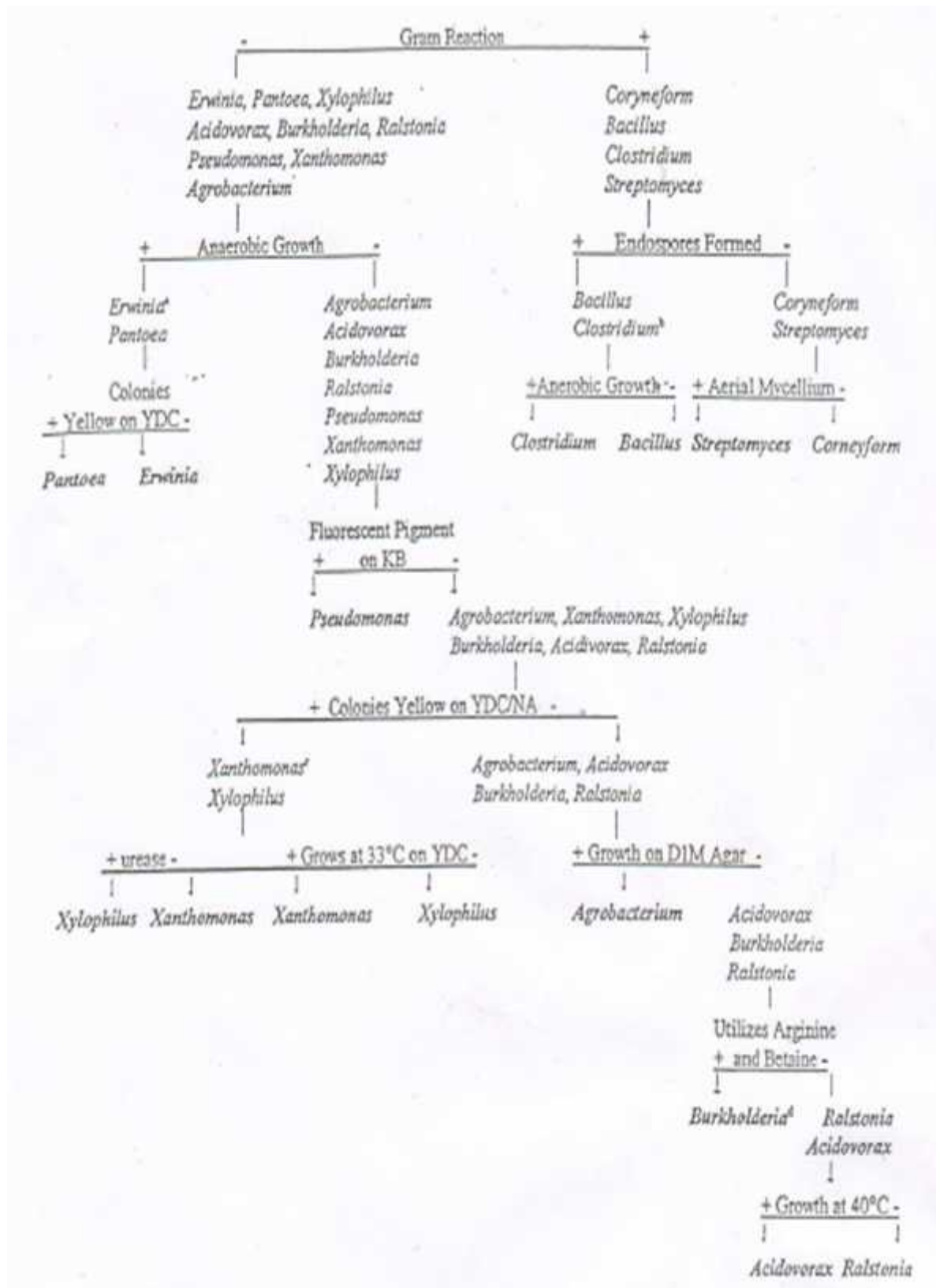


Figure 4 : Schéma de détermination des différents genres bactériens proposé par Schaad *et al.* (2001).

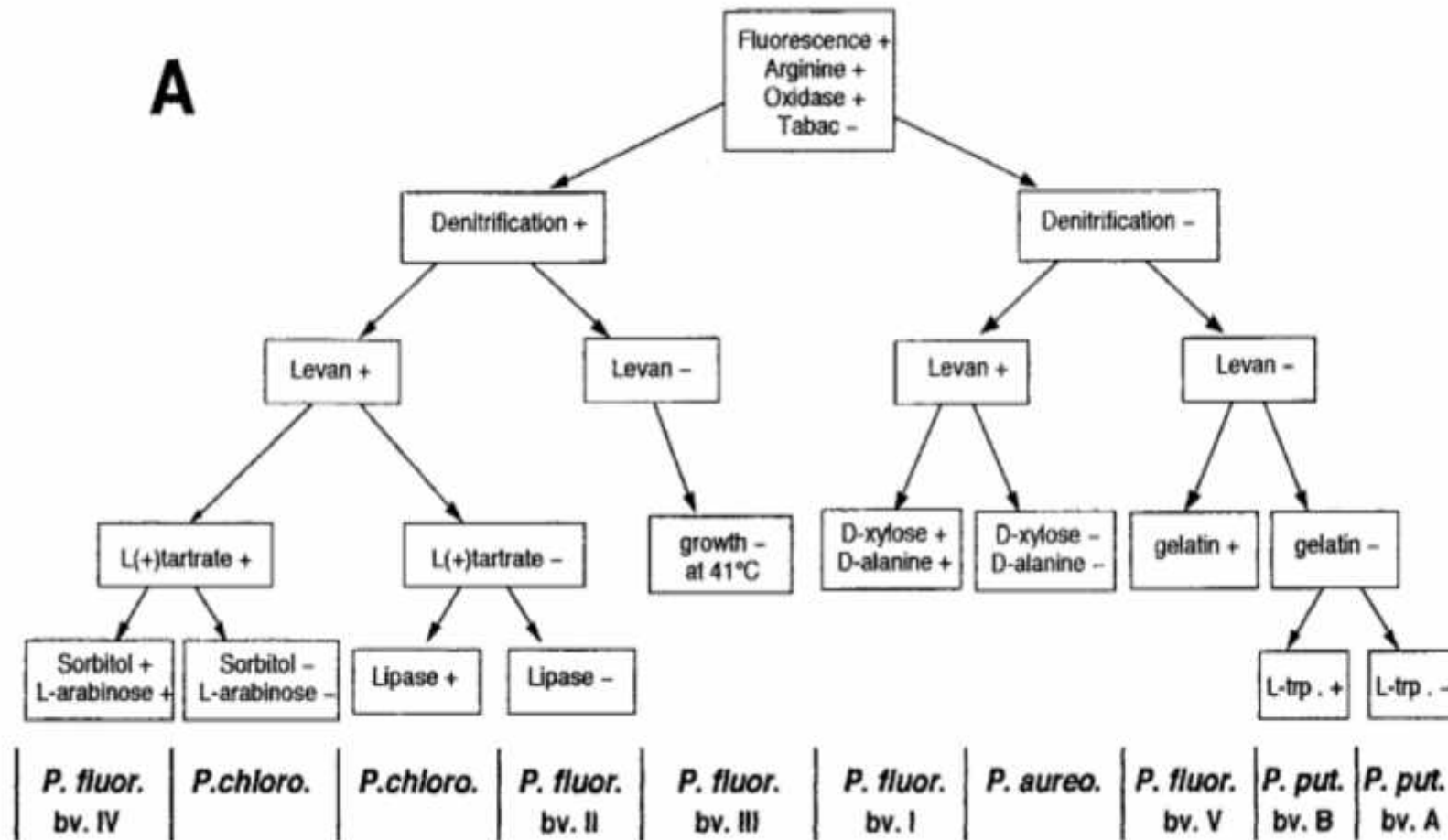


Figure 5 : la clé dichotomique (A) proposé par Jacques (1994) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

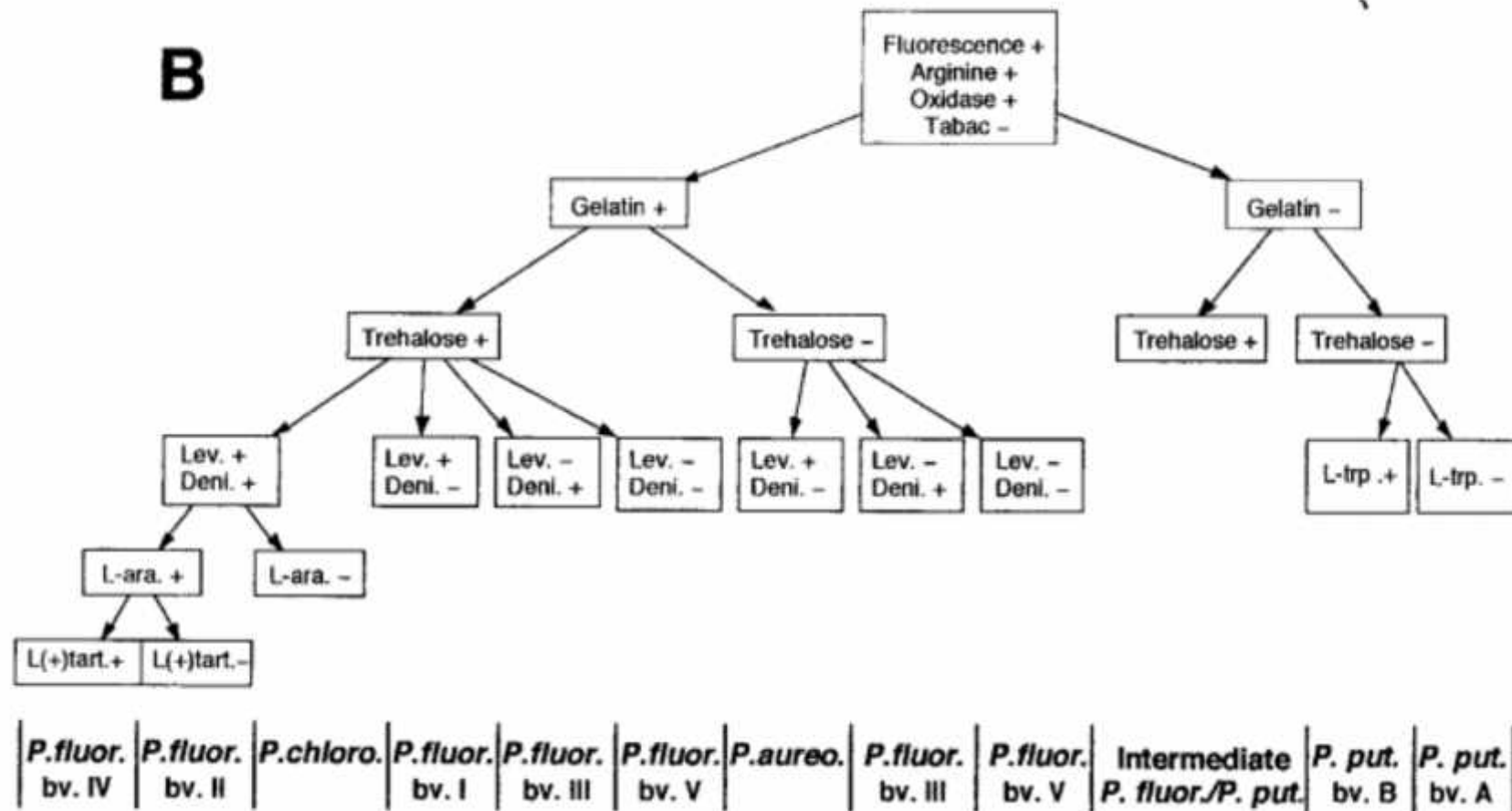


Figure 6 : Clé dichotomique (B) proposé par Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas spp.* fluorescents.

Nous avons déposé quelques gouttes de lugol (composé iodé) sur le frottis est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries, et laissé agir une (1) minute, jeté la solution de Lugol, et rincé brièvement à l'eau distillée comme précédemment décrit.

Nous avons décoloré en faisant couler la solution de décoloration (l'alcool) sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis. Puis rincé à l'eau distillée. Contre-colorer en déposant la solution de fuschine (rose) pendant une (1) minute, Puis rincé à l'eau distillée, et laissé sécher à l'air. L'observation a été fait sous microscope optique (G 10×100×1.25).

La lecture de la coloration de Gram est basée sur le changement de couleur de la paroi des bactéries. Les pores de la paroi des Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool. La paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram- est dissoute par l'alcool. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette. Et recoloré par le fuschine (rose).

6.1.1.2. Test KOH

En parallèle la coloration de Gram, un test plus rapide a été effectué, qui permet de distinguer entre Gram positif et Gram négatif, sur une lame propre deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 3%), sont mises en contact avec une crème bactérienne en effectuant un mouvement circulaire. La solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s (Bourgault et Lamothe, 1988) (la formation des filés observable à l'œil nu). Pour une réaction négative aucune viscosité n'est observée, donc les bactéries sont des grams positifs.

6.1.2. Croissance en anaérobiose

Le milieu Hugh et Leifson permet de distinguer entre les deux processus. La dégradation d'un glucide s'accompagne d'une acidification du milieu : lors de la respiration le glucide est oxydé en CO₂, par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral) ; lors de la fermentation le glucide est oxydé en acide, alcool, qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement. Toutes les voies fermentaire ne sont cependant pas également acidifiantes (Schaad *et al.* 2001) (Annexe 1).

Nous avons préparé des tubes contenant de huit ml (8) de milieu Hugh et Leifson, puis ensemencé la bactérie par piqûre centrale, avec un fil de platine. Pour réaliser une condition anaérobie nous avons ajouté 1cm d'huile de paraffine stérile, enfin incubé à une température $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 à 48h.

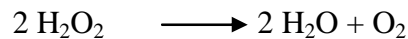
La réaction positive (+) : le milieu devienne jaune (les bactéries oxydent le glucide par respiration aérobie).

La réaction négative (-) : pas changement de couleur verte donc les bactéries inactive.

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

6.1.3. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire existante chez toutes les bactéries aérobies, elle leur permet de vivre en présence d'oxygène. En plus de la chaîne respiratoire des cytochromes, il existe en effet chez les aérobies une chaîne accessoire courte, fixant l'hydrogène sur l'oxygène en aboutissant à de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) selon la réaction (Lévy *et al.* 1992) (Annexe 1).



La recherche de cette enzyme est effectuée simplement par mise en contact d'une colonie bactérienne étudiée avec une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2), et attendu quelques secondes puis lire la réaction obtenue.

La réaction de catalase positive (+) se traduit par l'apparition des bulles après un dégagement gazeux c'est l'oxygène, l'absence des bulles et le dégagement gazeux indique la réaction négative (-).

6.1.4. Test de LOPAT

6.1.4.1. Production de Levane sucrase

La recherche de Levane sucrase a été effectuée sur milieu Levane. Après ensemencement du milieu, et incubation de 3 à 5 jours à température ambiante, le développement de colonies blanchâtres, convexes et brillantes indique la présence de Levane sucrase (Lelliot et Stead, 1987 ; Hildebrand, 1988).

Le test Levane sert à déterminer si la bactérie polymérise le fructose en poly- fructose (Schaad *et al.* 2001) (Annexe 1).

Nous avons devisé la boîte qui contenant le milieu Levane en trois secteurs pour tester trois isolats au même temps. à l'aide d'une anse de platine, Nous avons ensemencé le milieu par stries avec les bactéries jeune âgée de 24-48 heures. et incubé une température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pour 48 heures. Après l'incubation, nous avons lu les résultats obtenus.

Résultat positif : Strie partiellement saillante et luisante (vue du dessus), présence d'une zone opaque et luisante en marge de la strie (vue du dessous).

Résultat négative : strie prostrée et non luisante.

6.1.4.2. Recherche de l'oxydase

L'oxydase a été recherché sur papier filtre selon la technique de (Kovacs, 1956), une colonie est étalée sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée, indique la présence de l'enzyme cytochrome C oxydase.

Nous avons déposé un disque d'oxydase sur une lame neuf, puis l'humidifié par quelques gouttes d'eau distillée stérile. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, nous avons prélevé une colonie bactérienne jeune âgée de 24h et l'étalé sur le disque.

La réaction positive (+) indique qu'il y a eu oxydation du réactif phénylène diamine par l'apparition de couleur bleu violète, et l'absence d'une coloration indique une réaction négative (-) (Schaad *et al.* 2001).

6.1.4.3. Teste de pectinase

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents phytopatgènes oxydase positive isolés ont été caractérisé, en fonction de leur pouvoir pectolytique sur tranches de pomme de terre d'une part et l'induction de la réaction d'hypersensibilité sur plante hétérologue d'autre part (Lelliot *et al.* 1966 ; Lelliot et Stead, 1987; Cottyn *et al.* 2009).

Le test est réalisé sur des tubercules de la pomme de terre qui ont été désinfecté par l'eau de javel puis l'éthanol pure (95%), puis ont été rincé abondement par l'eau distillée stérile. les tubercules ainsi désinfecté ont été coupé en tranches de forme

disque de 7mm de hauteur, puis déposé en dessus de papier buvard stérile dans des boîtes de Pétri stérile.

A l'aide d'un scalpel stérile, nous avons réalisé un petite creux au centre des disques, puis versé une petite quantité de (0,1ml) de la suspension bactérienne (d'une concentration de 10^6 - 10^7 cellule/ml) dans les creux réalisé, nous avons réalisé deux répétitions pour chaque isolat.

Pour humecté le milieu, nous avons inondé le papier buvard avec quelque gouttes l'eau distillée stérile. Laissé en incubation à une température de $28\pm 2^\circ\text{C}$, pendant 10 à 14 jours. la réaction positive (+) est traduite par la couleur marron à la surface et sur les bordures des creux avec une odeur spécifique, indique la dégradation de la pectine du milieu. Si il n'ya aucun changement de couleur ou d'odeur indique une réaction négative (-) (Schaad *et al.* 2001).

6.1.4.4. Test d'arginine dihydrolase ;

L'arginine dihydrolase c'est un complexe enzymatique capable de dégrader l'arginine en anaérobiose (Hildebrand, 1988) (Annexe 1).

Nous avonsensemencé la bactérie par une piqûre centrale sur des tubes contenu de (8ml) de milieu d'arginine puis ajouté une quantité d'huile de paraffine stérile environ (1cm), pour condition anaérobie. Après nous avons incubé les tubes à une température de $28\pm 2^\circ\text{C}$ pendant 5 jours. Pour une réaction positive (+), le milieu demeure rose, si le milieu devient jaune orangé est une réaction négative (-).

6.1.4.5. Test d'hypersensibilité sur tabac ;

Le test d'hypersensibilité (HR) sur tabac sert à mettre en évidence le pouvoir pathogène d'une bactérie par le dessèchement des zones d'inoculation sur les feuilles de tabac (Klement, 1963).

Nous avons préparé une suspension bactérienne à partir d'une culture jeune âgée de 24h dans l'eau physiologique stérile à une concentration 10^6 à 10^7 (cellules/ml). Et à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml, nous avons injecté la suspension bactérienne dans l'espace intercellulaire le long de la nervure centrale ou d'une nervure secondaire. L'inoculation ce fait par la suspension bactérienne sur la face inférieur des feuille de Tabac. Les plantes sont placées à la température ambiante d'une salle.

Après 24h à 48h, si il n'y a pas de changement de la couleur et l'aspect du tissu, c'est une réponse négative (-), mais si il y a formation d'une zone foliaire translucides avec un aspect humide, par la suite les tissus se dessèchent et prennent une coloration brun clair à beige c'est une réponse positive (+).

6.1.5. Production du pigment fluorescent

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent deux types de siderophores, l'un dit de faible affinité (pyocyanine) décèle chez *P. aeruginosa* (Cox *et al.* 1981) et l'autre, possédant une affinité élevée (pyoverdine ou pseudobactine). La production en quantités importantes de ces molécules chelatrices dans le sol permet aux *Pseudomonas* fluorescents de s'appropriier tout le fer nécessaire à leur croissance et de le rendre inaccessible aux autres microorganismes (Viswanathan et Samiyappan, 2004) (Annexe 1).

La pyocyanine est un pigment bleu-vert qui a été identifié comme le responsable de l'activité électrochimique de *P. aeruginosa* (Rabaey *et al.*, 2004 ; Schaetzle *et al.*, 2008), la recherche de ce pigment est effectuée sur milieu King A.

La majorité des espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des sidérophores jaunes-verts sont només pyoverdines (PVDs) ou pseudobactines (Budzikiewicz. 1993, 1997). Les *Pseudomonas* produisent des siderophores fluorescents visibles sur milieu King B (King *et al.* 1954).

Nous avons utilisé des tubes contenant (8 ml) de milieu de culture King B et d'autres tubes contenant le milieu King A, puis ensemencé les bactéries sur les deux milieux et les incubé à une température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pendant 48 à 72 h.

L'apparition de couleur bleu sur le milieu King A indique la présence de pyocyanine. Alor que l'apparition de couleur jaune vert sur le milieu King B, indique la présence de pyoverdines.

6.1.6. Test gélatinolyse

Les enzymes qui permettent la dégradation de composés protéiques, de polypeptides ou d'acides aminés sont recherchées sur des milieux spécifiques. En pratique nous recherchons la gélatinase sur la milieu gélatine nutritive, ce enzyme capables d'hydrolyser la gélatine, donc il entraîne des modification sur leur structure (Schaad *et al.* 2001) (Annexe 1).

Sur des tubes contenant de (8ml) de milieu gélatine, nous avons ensemencé avec une piqure centrale une crème bactérienne jeune âgé de 24 heures. Puis incubé pendant 3 à 10 jours à une température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Après l'incubation, et pour vérifier la liquéfaction de la gélatine. C'est-à-dire vérifier la fragmentation (hydrolyse) de la gélatine sont mise à une température de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 10 minute (Lelliot et Stead, 1987).

La réaction positive (+), la liquéfaction de milieu (absence le prise de gel), indique les bactéries actives par l'hydrolyse de gélatine. La réaction négative (-) c'est la présence de la prise de gel.

6.1.7. Test réduction des nitrates

La dénitrification est un processus microbien dans lequel les oxydes d'azote sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons, pour la production d'énergie en absence d'oxygène. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont les dénitrifiantes les plus communs des sols des régions tempérées (Gamble *et al.* 1977).

Nous avons utilisé des tubes contenant le milieu EPN (Eau Peptoné Nitraté) pour vérifier la dénitrification. Nous avons ensemencé des bactéries jeunes âgée de 24h, par piqure centrale, et les incubé à une température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Après 5 jours d'incubation, Nous avons ajouté une goutte de (NIT1 et NIT2) pour vérifier la réduction des nitrates en nitrites, après 5 minute si le résultat est positive le milieu devient rose-rouge, si il reste incolore indique un résultat négative.

En cas du résultat négatif, nous avons vérifié la capacité de réduction des nitrates en azote, en ajoutant de 2 à 3 mg de Zinc (Zn) dans les tubes. Après 5 minute, pour un résultat positif (+) le milieu reste incolore. Or le milieu devient rose pour un résultat négatif (-).

6.1.8. Croissance à la température 41°C et 4°C

Quelques espèces sont mésophiles cultivées à 41°C comme *P. aeruginosa* et d'autres sont psychotrophes, se développant même à 4°C , comme *P. fluorescens*. (Christian et Jean Yves, 1996 ; Schaad *et al.*, 2001).

Nous avons préparé des boites de Pétrie contenant le milieu KB, puis ensemencé par les bactéries pour vérifier l'intervalle de croissance. Les boites ont été mis à une température de 41°C , et d'autre à une température de 4°C , pendant 48h. Nous avons réalisé deux répétitions pour chaque isolat.

6.2. Galerie API 20 NE :

La galerie API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bactéries Gram négatif non entérobactéries comme les *Pseudomonas* spp. Cette galerie comporte huit tests conventionnels liés à l'activité de divers enzymes (Nitrate réductase ou dénitrification, tryptophanase ou formation de l'indole à partir du tryptophane, fermentation du glucose, Arginine déshydrogénase ou formation de l'ammoniac à partir de l'arginine, uréase, Esculinase, gélatinase ou liquéfaction de la gélatine et la α -galactosidase) et 12 tests d'assimilation de sucres (Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, N-acétyl-D glucosamine, Maltose, Gluconate, Caprate, Adipate, Malate, Citrate et Phényl-acétate). A ces tests le 21^{ème} test s'ajoute, il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase ou test de l'oxydase). Des substrats déshydratés sont contenus dans des micro-tubes. Ces substrats sont mis en solution grâce à l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier. À la suite d'une période d'incubation de 24 et 48 heures à une température de $29 \pm 2^\circ\text{C}$, permettant à la bactérie de réagir avec les substrats, les diverses réactions sont notées afin de déterminer le code d'identification composé de 7 chiffres (Amkraz, 2013 ; bioMérieux, 2006) (Annexe 1).

Préparation des suspensions

Ce test a été réalisé que pour Six (6) isolats, selon le protocole proposé par le producteur (bioMérieux), nous avons préparé la suspension bactérienne (A) à partir de cultures pure âgées de 24 heures dans 5 ml d'eau physiologie stérile (0.9 % de NaCl) à une concentration de 10^8 bactéries/ml.

Pour la préparation de la suspension (B), 200 μ l de la suspension bactérienne (A) a été mis dans une ampoule d'AUX medium.

Inoculation de la galerie

Ces tests doivent être incubés dans des atmosphères humides, donc nous avons versé l'eau distillée stérile dans les alvéoles. Nous avons distribué la suspension bactérienne (A), déjà préparé dans les micro-tubes (et non les cupules), pour les huit (8) tests conventionnelle (de NO_3 à PNPG), Les cupules des tests GLU, ADH et URE on été couvertes d'huile de paraffine pour formé un ménisque convexe et anaérobie. Les cupules et les micro-tubes des tests d'assimilation ont été remplis avec la suspension(B),

en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe mais jamais concave. Les galeries ainsi inoculés sont incubées à $29 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 à 48 h.

Après l'incubation et l'addition du réactif JAMES pour le test TRP, et des réactifs (VIP 1 +VIP 2) et/ou Zn pour le test NO_3^- . La lecture des résultats a été faite à l'aide du tableau de lecture (tableau 3), et l'identification a été réalisée à l'aide de logiciel d'identification (identification microbienne via les API Microsoft Excel).

Tableau 3 : tableau de lecture de galerie API 20NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	nitrate de Potassium	0.136	Réduction des Nitrates en nitrites	<u>NIT 1 +NIT 2 / 5 min</u>	
				Incolore	Rose- rouge
			Réduction des Nitrates en azote	<u>Zn / 5min</u>	
				Rose	Incolore
TRP	l-tryptophane	0.2	Formation d'indole (TRyptophane)	<u>JAMES/immédiat</u>	
				incolore vert pâle /jaune	Rose
<u>GLU</u>	D-glucose	1.92	Fermentation(GLUcose)	Bleu à vert	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1.92	Arginine DIHydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
<u>URE</u>	Urée	0.76	UREase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0.56 0.072	Hydroolyse (β - glucosidase)(Esculine)	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	0.6	Hydroolyse(protéase)(GELatine)	Pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β D-galactopyranoside	0.22	β - galactosidase(para-NitroPHényl- β D-Galactopyranosidase)	incolore	Jaune
GLU	D-glucose	1,56	Assimilation (GLUcose)	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1.4	Assimilation (ARAbinose)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1.4	Assimilation(MANnosE)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1.36	Assimilation(MANnitol)	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1.28	Assimilation(N-Acétyl-Glucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-mattose	1.4	Glucosamine)	Transparence	Trouble
GNT	Potassium gluconate	1.84	Assimilation(MALtose)	Transparence	Trouble
CAP	acide caprique	0.78	Assimilation(potassium GlucoNaTe)	Transparence	Trouble
ADI	acide adipique	1.12	Glucosamine)	Transparence	Trouble
MLT	acide malique	1.56	Assimilation(acide CAPrique)	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	2.28	Assimilation(acide ADIrique)	Transparence	Trouble
PAC	acide phénylacétique	0.8	Assimilation(MaLaTe)	transparence	Trouble
			Assimilation(trisodium CITrate)		
			Assimilation(acide PhénylACétique)		

Source ; bioMérieux, 2006

7. Recherche des antagonistes :

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant les paroi cellulaires. Les plus caractérisées de ces métabolites secondaires sont les: phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis-à-vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (Iavicoli *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2004). Dans ce contexte nous avons testé l'activité antagoniste de Dix (10) de nos isolats (M11, Ec1, As1, Ma1, Am2, M12, Ru1, Am4, Am1, Eu1)

7.1. Sélection des souches antagonistes :

La sélection des souches bactériennes antagonistes a été réalisée selon la méthode des spots décrite par Becker et Cook (1988), cette méthode consiste à déposer quatre (4) spots bactérien à la périphérie de la boîte de Pétri et les laisser en incubation à la température de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, après 24 h, nous avons déposé un disque mycélien de 5 mm de diamètre du champignon étudié, dans la centre de la boîte Pétrie, (Figure 7). Nous avons testé les dix (10) souches sur deux milieux de culture KB et PDA avec deux répétitions pour chaque souche contre deux champignons phytopathogènes, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA1) et *Fusarium culmorum* (BT11) (Les deux espèces de champignons ont été isolées et identifiées respectivement par M^m "Touati" et M^m "houaiti") au niveau du laboratoire phytopathologie de Laghouat pour estimé l'activité antifongique de nos isolats, nous avons déposé un disque de chaque champignon comme des témoins sur d'autre boites dans les mêmes conditions d'incubation.

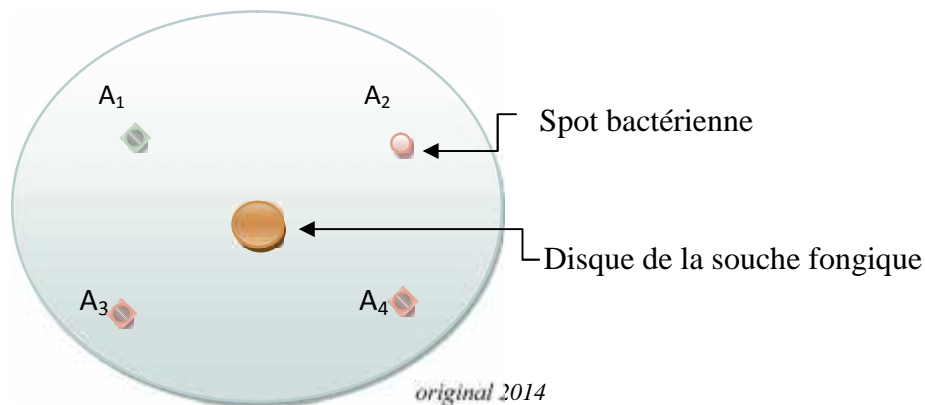


Figure 7 : technique du test d'antagonisme *in vitro*.

La lecture des résultats se fait en comparaison avec la croissance mycélienne de témoin, après cinq (5) jours. Le taux d'inhibition a été calculé selon la formule de (Hmouni *et al.*, 1996). L'activité d'antagoniste est révélée par la présence de zone d'inhibition.

$$(I \%) = (1 - C_n/C_0) \times 100$$

I : taux d'inhibition

C_n : diamètre moyenne de la croissance du pathogène en présence de l'antagoniste

C₀ : diamètre moyenne de la croissance du pathogène en absence de l'antagoniste (témoin)

I. RESULTATS :

1. Dénombrement des bactéries :

Sur le milieu LPGA, nous avons estimé le nombre total des bactéries viables dans la rhizosphère des sept (7) plantes spontanés (tableau 1), et le nombre des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur le milieu KB.

Le taux des *Pseudomonas* spp. fluorescents par rapport au nombre total des bactéries dans la rhizosphère des 7 espèces végétales étudiées est de 72% chez *Aristicla puigurs*, et de 54% chez *Mathiola livida*, les Cinq (5) autre espèces ont enregistré des taux entre 71.4 % et 53.3% (figure 8).

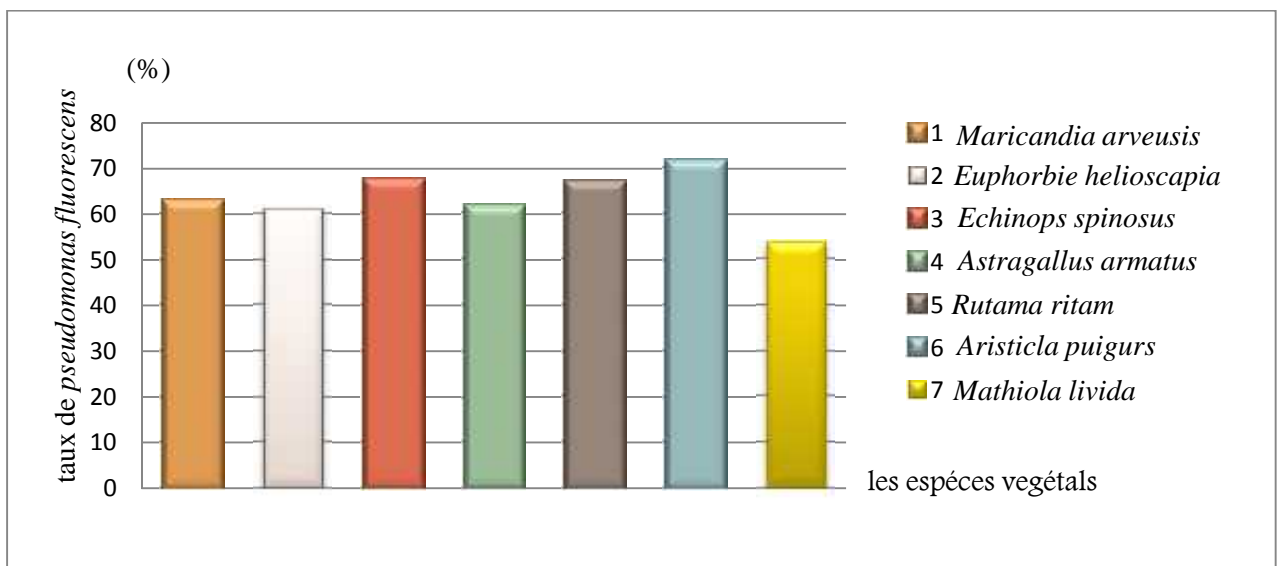


Figure 8: le taux des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans rhizosphère des espèces végétales étudiées.

2. L'isolement

A partir de sept (7) échantillons du sol rhizosphérique des plantes spontanés (*Maricandia arvensis*, *Euphorbia helioscapia*, *Echinops spinosus*, *Astragallus armatus*, *Retama reatam*, *Aristida pungens*, *Mathiola livida*), nous avons pu isoler et purifier 35 isolats bactériens qui ont les caractéristiques de *Pseudomonas* spp. fluorescents. La sélection a été basée sur les caractères macromorphologiques : des colonies de petites taille, circulaire, régulière, lisse, plate sur le milieu LPGA, en plus de la brillance et la pigmentation jaune à verte visible à l'œil nu sur le milieu King B.

3. Identification des isolats bactériens

3.1. Les testes physiologiques et biochimiques classiques :

La coloration de Gram, est une étape essentielle dans la classification des bactéries, Cette technique à été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram. Nous avons réalisé le test de Gram pour 35 isolats.

3.1.1. Résultat du test de Gram

Après la coloration de Gram, nous avons éliminé huit (08) isolats parce-qu'elles sont des Gram positive (couleur violet) et les autres isolats (27) sont des bacilles à Gram négative (couleur rose) (figure 9) (Table 4).

Selon Palleroni, (1984), Les *Pseudomonas* ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 µm.

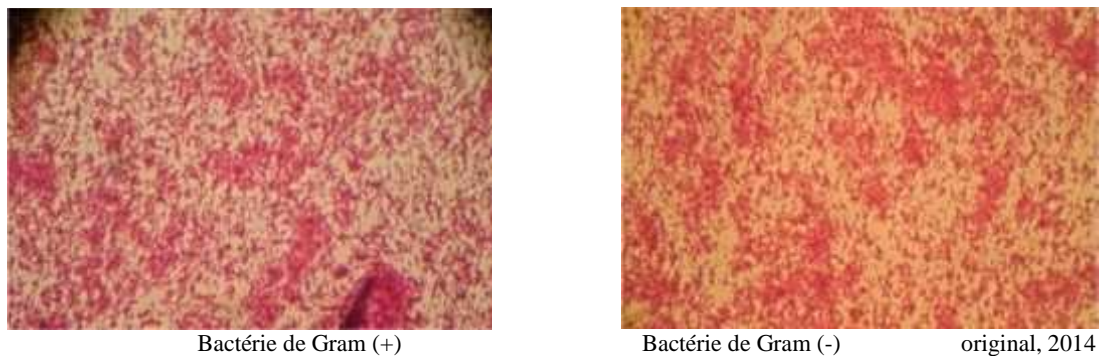


Figure 9 : colonies bactériennes à Gram (+) et Gram (-) sous le microscope (G1000)

Ces résultats sont confirmés par le test de KOH, nous avons observé une viscosité pour les (27) isolats, et nous n'avons pas observé de viscosité pour les huit autres isolats (figure. 10). Selon Bourgault et Lamothe, (1988), la solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s.



Figure 10 : résultat du test KOH

3.1.2. Résultat de la croissance en anaérobiose

Après 48 à 72 h l'incubation, nous avons observé un virage de couleur pour Cinq isolats, Le contenu des tubes à viré au jaune (résultat négative), et les autres tubes ont resté verts. Donc nous avons identifié les 22 isolats comme étant des bactéries aérobies strictes non fermentatives (Figure 11) (Table 4).

Parmi les composants du milieu Hugh et Leifson c'est le bleu de bromothymol, ce dernière est un indicateur de pH où le milieu acide il devient jaune. En condition d'anaérobie par l'huile de paraffine la couleur jaune signifie la dégradation de glucide par la vois fermentative.

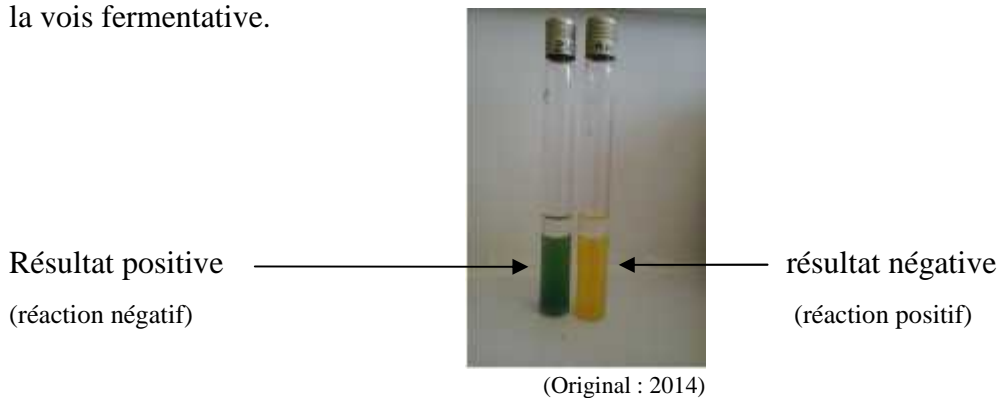


Figure 11 : le résultat test d'anaérobiose.

3.1.3. Résultats de la production de catalase

Après le test de catalase, nous avons observé des bulles pour dix huit (18) isolats (catalases positives) et nous n'observe aucune dégagement gazeuse (bulles) pour quatre isolats (figure 12) (Table 4).

Selon Lévy *et al.* (1992) une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène.

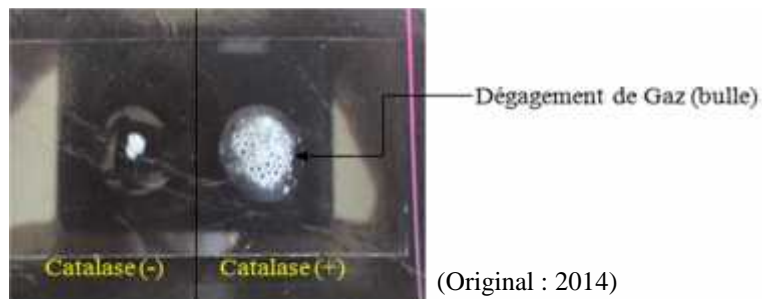


Figure 12 : résultats du test catalase

Table 4 : résultat des tests préliminaire

Les tests Les isolats	Coloration de Gram	KOH	Anaérobiose (Hugh et Leifson)	catalase	L'oxydase	Pigments fluorescents
Ma1	G-	+	-	+	+	+++
Ma2	G-	+	+	/	/	/
Ma3	G-	+	+	/	/	/
Ma4	G+	-	/	/	/	/
Ma5	G+	-	/	/	/	/
Eu1	G-	+	-	+	+	+++
Eu2	G+	-	/	/	/	/
Eu3	G-	+	+	/	/	/
Eu4	G-	+	-	-	/	/
Eu5	G+	-	/	/	/	/
Ec1	G-	+	-	+	+	++
Ec2	G-	+	-	+	+	++
Ec3	G-	+	-	-	/	/
Ec4	G-	+	-	-	/	/
Ec5	G+	-	/	/	/	/
As1	G-	+	-	+	+	+
As2	G-	+	-	+	+	+++
As3	G-	+	-	-	/	/
As4	G+	-	/	/	/	/
As5	G+	-	/	/	/	/
Ru1	G-	+	-	+	+	++
Ru2	G-	+	-	+	-	/
Ru3	G-	+	-	+	-	/
Ru4	G-	+	-	+	-	/
Ru5	G-	+	-	+	-	/
Am1	G-	+	-	+	+	+++
Am2	G-	+	-	+	+	+++
Am3	G-	+	-	+	+	+
Am4	G-	+	-	+	+	+++
Am5	G-	+	+	/	/	/
Ml1	G-	+	-	+	+	++
Ml2	G-	+	-	+	+	+
Ml3	G+	-	/	/	/	/
Ml4	G-	+	+	/	/	/
Ml5	G-	+	-	+	-	/

G- : bactérie de Gram négatif. G+ : bactérie de Gram positif. + : réaction positive. - : réaction négative. / : Éliminé par la résultat précédant. +++ : Très fluorescent. ++ : Moyennement fluorescent. + : faiblement fluorescent.

3.1.4. Tests de LOPAT

Les tests de LOPAT sont des tests la feurs pour déterminer les caractères métaboliques de *Pseudomonas* spp. fluorescents dont les résultats sont représentés dans le tableau (5).

3.1.4.1. Production Levane sucrase :

Sur le milieu Levane nous avons observé des stries saillantes et luisantes pour six (6) isolats, ce sont des Levane positif, indique la polymérisation du fructose en poly-fructose. Mais pour les Sept (7) autres isolats nous avons observé des stries non luisantes, indique qu'aucune activité de dégradation de fructose n'a été produite (réaction négatif) (figure 13) (Table 5).

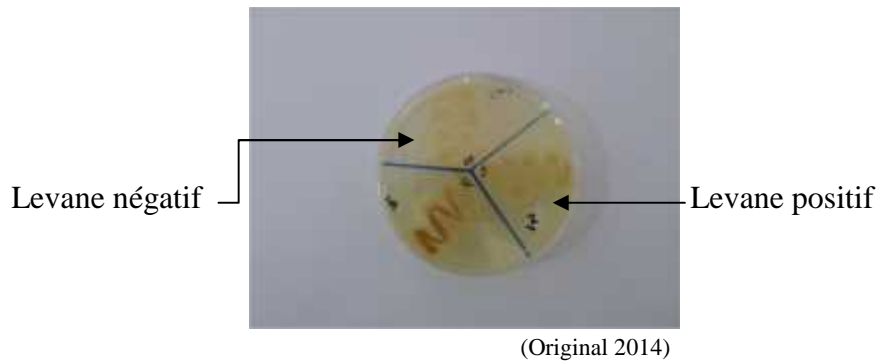


Figure 13 : résultat de test Levane

3.1.4.2. Production d'oxydase :

L'oxydation de N-diméthyle paraphénylène diamine par la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase intracellulaire et l'oxygène moléculaire donné une couleur bleu violète, qui montre les bactéries d'oxydase positive (+) (Kovacs, 1956).

Nous avons obtenu des résultats positifs, pour 13 isolats et résultats négatif pour cinq 5 isolats (figu 14).

Après le test de Gram, Hugh et Leifson, catalase et l'oxydase, nous avons sélectionné 13 isolats qui peuvent appartenir au *Pseudomonas*.



Figure 14 : résultat d'oxydase

3.1.4.3. Test de Pectinase :

Après 14 jours l'incubation, nous n'avons pas observé de changement de la couleur des tranches de la pomme de terre, ni de leur odeur, ces résultats montrent que les (13) isolats sont incapables de dégrader le pectine, ce sont des pectinase négatif.

Selon Cooksey *et al.* (1990), la réaction positive détermine la présence de pectinase (substrat utilisé l'acide polygalacturonique) par la bactérie, ce qui indique la dégradation de pectinase et donne une odeur et une zone pourrie de couleur marron à noir (figure 15) (tableau 5).

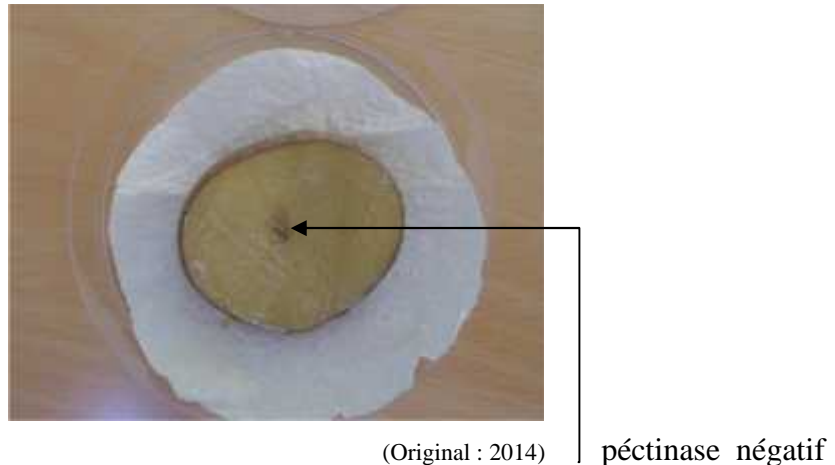
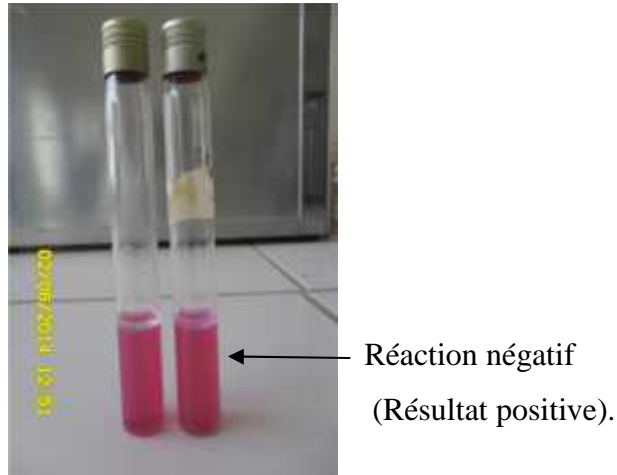


Figure 15 : résultat du test pectinase

3.1.4.4. Test d'arginine déshydrolase :

Après 5 jours d'incubation, la couleur du milieu a demeuré rose, donc les résultats pour le test ADH sont des résultats positifs pour l'ensemble des isolats (figure 16) (tableau 5).



(Original : 2014)

Figure 16 : résultat d'arginine

3.1.4.5. Test d'hypersensibilité sur Tabac :

Le développement de collapse au niveau des zones inoculées 2 à 3 jours après, traduit une réaction d'hypersensibilité positive sur tabac (Klement, 1963).

La HR est une réaction rapide de défense des plantes correspondant à une mort programmée des cellules aux sites d'invasion, qui bloque la progression du pathogène (Klement, 1982). Le test HR est réalisé pour distinguer entre les espèces pathogènes, qui donnent des réactions positifs sur Tabac, et les espèces saprophytes ou non pathogènes, qui donnent des réactions négatifs. Pour nos isolats n'avons observé aucune réaction d'hypersensibilité (figure 17) (tableau 5).



(original : 2014)

Figure 17 : résultat d'hypersensibilité sur Tabac

L'ensemble des résultats des tests de LOPAT, réalisé pour 13 de nos isolats, sont représentés dans le tableau (5)

Tableau 5 : résultats de test de LOPAT.

Les isolats	M1	Ec1	A1	Ec2	M1	Am2	M2	R1	Am4	Am1	A2	Am3	E1
Levane	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Péctinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HR sur Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : réaction positif, - : réaction négatif

3.1.5. Production du pigment fluorescent

Pour les 13 isolats nous n'avons pas observé sur le milieu KA la production de pyocyanine (couleur bleue). Par ailleurs sur le milieu King B, nous avons obtenu un résultats positive pour l'ensemble des isolats par l'apparition des pigments jaune vert fluorescents plus ou moins important, par l'utilisation une lampe Ultra-violet (UV) (366nm), indique la production de pyoverdine (Tableau 6).

La pyocyanine (1-hydroxy-5methyl-phénazine) est prédominante chez *P. aeruginosa* (Demange *et al.*, 1989). Cette phénazine de couleur bleue est toxique pour une large gamme de bactéries et champignons (Hassan et Fridovich, 1980).

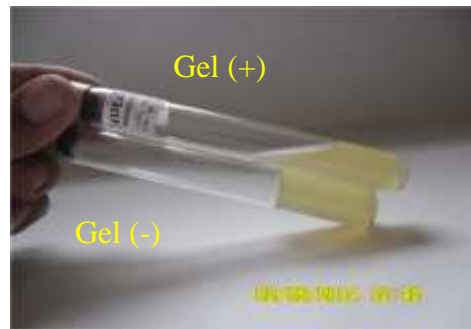
Nos isolats ne peuvent pas produire la pyocyanine, donc ces bactériens ne peuvent pas être des *Pseudomonas aeruginosa*.

3.1.6. Test gélatinolyse

Après 10 jours d'incubation, nous avons observé la liquéfaction de 11 tubes. Alor que deux (2) tubes ont été semblables au témoin négatif (non ensemencé)(figure 18).

La production de protéases extracellulaires, comme évidence l'hydrolyse de la gélatine, est une propriété universelle de *P. aeruginosa*, présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P.putida* (Stanier *et al.*, 1966).

L'hydrolyse de la gélatine permet la distinction de *P. putida* et les autres *Pseudomonas* spp. fluorescents.

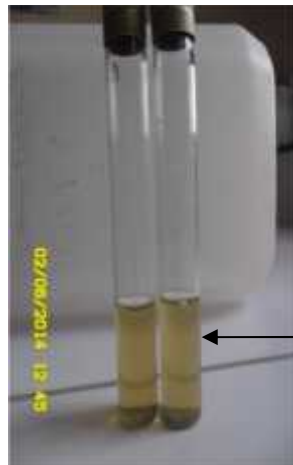


(Original : 2014)

Figure 18 : résultat du test gélatin

3.1.7. La réduction des nitrates

Après 5 jours d'incubation, nous avons ajouté une goutte de réactif VIP1 et une goutte de VIP2), et après 5 minute aucune changement n'a été observé sur le milieu, ce là indique qu'il n'est y a pas de réduction les nitrates en nitrites, puis nous avons ajouté 2 mg du Zinc (Zn), après 5 minute le contenu des tubes reste incolore, ce résultat montre que les bactéries sont capable de réduire la nitrate en azote. Nous avons obtenu ces résultats pour tous les isolats (figure 19).



Résultat positif
(La réduction de nitrate en azote)

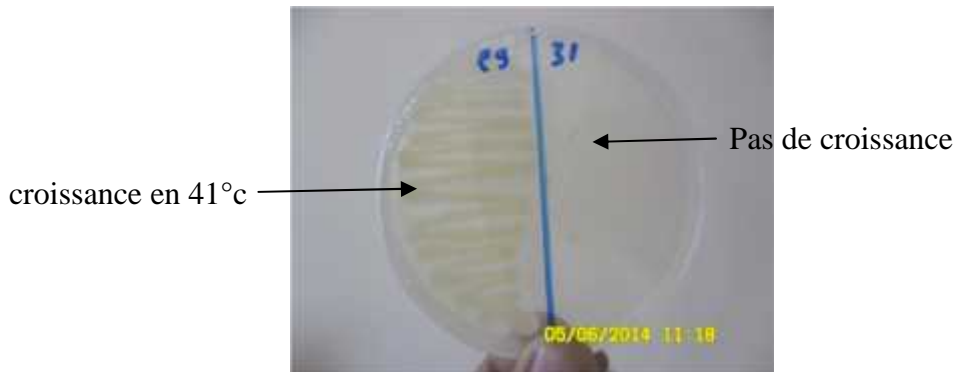
(Original : 2014)

Figure 19 : la réduction de nitrate en azote

3.1.8. Croissance à 41°C et 4°C :

Après l'incubation comparative entre les deux conditions d'incubation (température). Nous avons remarqué une croissance pour 9 isolats à 4°C et les autre 4 isolats nous n'avons observe aucune croissance sur les boites (tableau 6). Mais pour la température

41°C nous avons observé l'inverse (croissance pour 4 isolats et aucune croissance pour les 9 isolats (figure 20).



(original : 2014)

Figure 20 : résultat de test température (41°C)

3.2. Galerie API 20NE :

Nous avons fait la lecture de la plaque API 20NE après 24 et 48h d'incubation, pour les six isolats testés (M11, Ec2, Ru1, Am1, As2, Eu1), pour une identification plus exacte et plus rapide (figure 21).

La lecture des Galeries API 20NE a révélé que quatre souches (M11, Ru1, Am1 et Eu1) sont des *Pseudomonas fluorescens* avec une bonne identification et une probabilité supérieure à 87%, Et la souche (Ec2) est identifiée comme *Burkholderia cepacia* avec pas bon identification (tableau 7). Mais pour la souche (As2) elle correspond à *Ochrobactrum anthropi*, avec pas bon identification.



(Original : 2014)

Figure 21 : résultat de galerie API 20NE de la souche Am1

Tableau 6 : les résultats globaux des tests biochimiques et physiologiques pour les 13 isolats retenus.

Les souches	M11	Ec1	As1	Ec2	Ma1	Am2	M12	Ru1	Am4	Am1	As2	Am3	Eu1
Coloration de Gram	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-	G-
KOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levane	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Péctinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HR sur tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
King A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
King B	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+++	+++	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélatine	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
T 41°C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
T 4°C	++	++	+	-	+	++	++	+	++	+	-	-	+
Réduction de nitrate en azote	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

L
O
P
A
T

G- : gram négatif, HL : Hugh et Leifson, HR : hypersensibilité, T : température, + : réaction positive, - : réaction négative. + : fable fluorescente. ++ : moyennement fluorescente. +++ : très fluorescente

Tableau 7 : résultats de la galerie API 20NE

Les isolats Les tests	M11	Ec2	Ru1	Am1	Eu1	As2
NO3	+	+	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	+	+	+
URE	-	-	-	-	-	+
ESC	+	+	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+	+	-
PNPG	-	+	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+
ARA	+	-	+	+	+	+
MNA	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	-	+	+
MAG	+	+	+	+	+	+
MAL	-	+	-	-	+	+
GNT	+	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+	+	+
ADI	-	+	-	-	+	+
MLT	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+
PAC	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+

Nous avons identifié ces isolats à l'aide de logiciel d'identification (identification microbienne via les API-Microsoft Excel), les résultats obtenus sont représentés dans le tableau (8).

Tableau 8 : résultats de Galerie API 20NE sur logiciel d'identification

Les souches	Souche (taxon le plus probable)	Remarque	Indice de typicité	Probabilité
M11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bonne identification	0.48	95.1%
Am1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bonne identification	0.29	99.3%
Ru1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bonne identification	0.36	87.7%
Eu1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bonne identification	0.28	85.0%
Ec2	<i>Burkholderia cepacia</i>	Pas bon identification	0.24	98.6%
As2	<i>ochrobactrum anthropi</i>	Pas bon identification	-0.32	47.2%

Identification taxonomique

La classification intra spécifique peut être effectuée pour 4 souches (Ru1, Am1, M11, Eu1) par la lecture des tests Tryptophane, Arabinose sur la galerie API 20 NE, les résultats de la galerie classique, et les deux clés A et B. Mais pour les autres isolats identifiés que testée par les tests biochimique classique et physiologique, nous ne pouvons pas déterminer les biovars par manque de tests.

a) Selon la clé A

La classification basée sur la réponse aux tests métaboliques figurants dans la clé A proposée par Jacques (1994), les résultats présentés dans le tableau (9).

Pour les souches (M11 et Ru1) avec NO_3^+ , Lev - et croissance à 41°C -, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar III.

Pour les souches (Am1 et Eu1) avec NO_3^+ , Lev + et ARA+, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar IV.

Tableau 9 : Résultats d'identification des 4 souches de *Pseudomonas* spp. *Fluorescens* selon la clé A

Les souches	M11	Ru1	Am1	Eu1
Levane	-	-	+	+
Oxydase	+	+	+	+
Péctinase	-	-	-	-
Arginine	-	-	+	+
HR sur tabac	-	-	-	-
King A	-	-	-	-
King B	++	++	+++	+
Gélatine	+	+	+	+
T : 41°C	-	-	-	-
T : 4°C	+	+	+	+
NO_3	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+
Biovar	III	III	IV	IV

(+) : positif, (-) : négatif, +++ : plus fluorescente

b) Selon la clé B

Selon la proportion de Bossis (1994), nous avons affiliées ces 4 souches (tableau 10).

Pour les souches (Ml1 et Ru1) avec NO₃⁺, Lev - et Gél⁺, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar III.

Pour les souches (Am1 et Eu1) avec NO₃⁺, Lev + et ARA⁺ et Gél⁺, peuvent être des *Pseudomonas fluorescens*, biovar IV/II

Tableau 10 : Résultats d'identification des 4 souches de *Pseudomonas* spp. *Fluorescens* selon la clé B

Les souches	Ml1	Ru1	Am1	Eu1
Levane	-	-	+	+
Oxydase	+	+	+	+
Péctinase	-	-	-	-
Arginine	-	-	+	+
HR sur tabac	-	-	-	-
King A	-	-	-	-
King B	++	++	+++	+
Gélatine	+	+	+	+
T : 41°C	-	-	-	-
T : 4°C	+	+	+	+
NO ₃	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+
Biovar	III	III	IV/II	IV/II

(+) : positif, (-) : négatif, +++ : plus fluorescente

4. Résultat de recherche de l'antagoniste

Les résultats des tests préliminaires, de détection d'activités antagonistes des 10 souches bactériennes identifiées comme des *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis de deux espèces de *Fusarium* montre une très grande variabilité dans les intensités de réponse.

Les réponses obtenus indique des spectres de réponse, allant de l'absence d'action jusqu'à des activité importante (tableau 11).

Nous avons utilisé deux milieux de culture différent KA et PDA pour sélectionner les souches inhibitrices et estimé l'effet des souches antagonistes sur la croissance des deux champignons par rapport au témoin.

Nous avons calculé le taux d'inhibition pour les champignons, en utilisant la formule $(I\%) = (1 - C_n/C_0) \times 100$ Hmouni *et al.* (1996), la réponse de nos souches est représentée dans les figures (figures 22, 23).

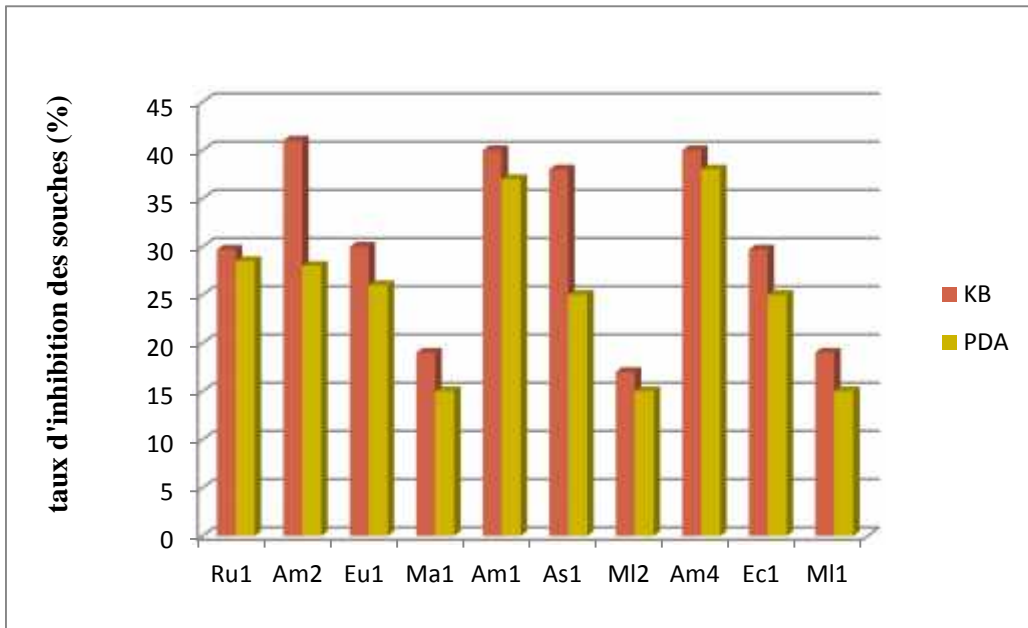
Tableau 11 : L'activité antagoniste des souches bactériennes vis-à-vis des deux champignons

Les 2 champignons	Type de réponse	Nombre des souches	Les souches bactériennes
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (FOA1)	+	3	Ma1, MI2, MI1
	++	5	Ru1, Eu1, As1, Am2, Ec1
	+++	2	Am1, Am4
<i>Fusarium culmorum</i> (BT11)	-	1	MI2
	+	7	Am2, Ma1, MI1, Ru1, Am1, Ec1, As1
	++	2	Am4, Eu1

- : non antagoniste, + : présence d'une légère activité antagoniste, ++ : action antagoniste importante, +++ : action antagoniste très importante.

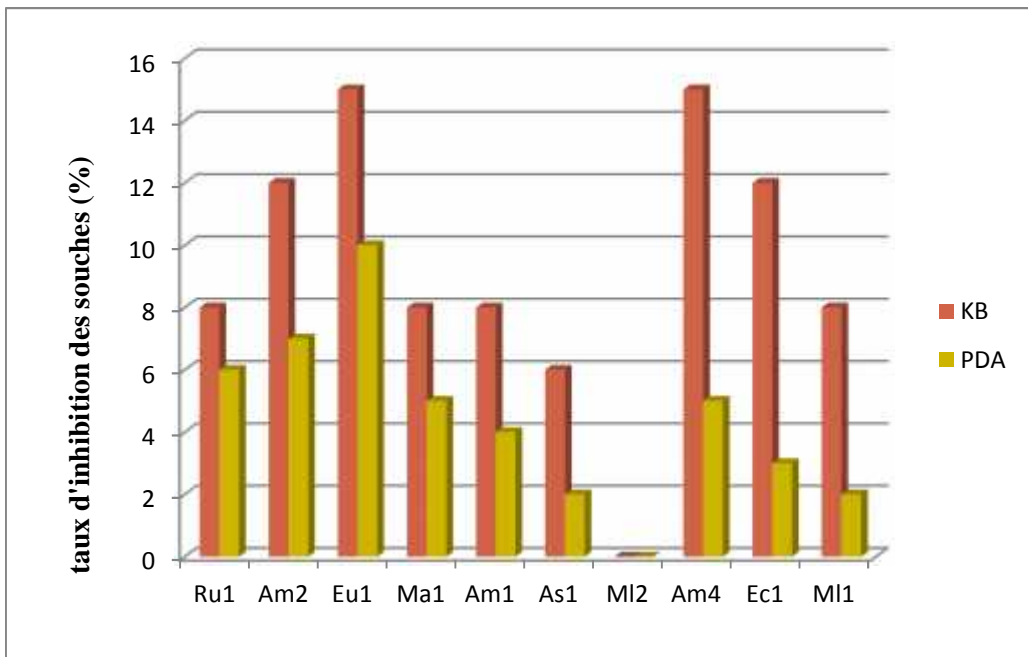
Sur le milieu KB, en comparant l'effet antagoniste des différentes souches bactériennes. Nous avons remarqué aussi une activité d'antagoniste différentielle entre elles, et nous avons remarqué que l'activité de l'antagonisme des souches contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA1) est plus élevée par rapport à *Fusarium culmorum* (BT11). Par exemple la souche MI2, elle n'implique pas aucune effet sur le champignon *Fusarium culmorum* (BT11) mais elle est antagoniste pour le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA1), un taux maximal d'inhibition a été enregistré avec les souches (Am1, Am2, Am4) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* qui est d'ordre de 40%. Et le taux minimal d'inhibition a été enregistré avec les souches (MI1, MI2, Ma1) d'ordre de 15% (figure 22). Mais le taux d'inhibition contre *F. culmorum* elle est varié entre 14 et 6% (figure 23).

Sur le milieu PDA, nous avons remarqué qu'il existe toujours une activité antagoniste chez les différentes souches bactériennes, mais moins importantes vis-à-vis des deux champignons avec un taux d'inhibition variée entre 38 à 13% contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Et de 9 à 2% vis-à-vis *F. culmorum*.



(original : 2014)

Figure 22 : le taux d'inhibition des nos souches vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA1)



(Original : 2014)

Figure 23 : le taux d'inhibition des nos souches vis-à-vis de *Fusarium culmorum* (BT11)

II. DISCUSSION

Dans notre travail, nous avons cherché la flore bactérienne qui corresponde au groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère des plantes spontanés (*Maricandia arvensis*, *Euphorbie helioscapia*, *Echinops spinosus*, *Astragalus armatus*, *Rutama ritam*, *Aristicla puigurs*, *Mathiola livida*.).

Dans nos échantillons et après le dénombrement comparatif entre les colonies bactériennes à partir des deux milieux de culture LPGA et KB (général et sélectif), nous avons remarqué une forte présence des *Pseudomonas* spp. fluorescents par rapport à la microflore bactérienne totale avec des pourcentages qui varient entre 72 et 54 %. La plante influencerait sur la structure et l'activité des communautés microbiennes en favorisant les populations qui lui sont bénéfiques (Lynch, 1987 ; Cook *et al.*, 1995).

L'identification préliminaire des espèces de *Pseudomonas* produisant le pigment fluorescent est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la mobilité, la recherche de la catalase et de l'oxydase, arginine dihydrolase, voie d'utilisation du glucose, ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques selon (Holt *et al.* 1994. et Bossis *et al.* 2000).

Les isolements effectués ont permis de sélectionner 35 isolats et après le test de Gram, l'oxydase et le test anaérobie. Après la coloration de Gram, nous avons gardé 27 isolats qui correspondent à des bacilles à Gram négatif de couleur rose, 8 isolats de couleur violet ont été éliminés, qui correspondent au Gram positif, ces dernières possèdent une paroi épaisse, et sont composé de deux couches de peptidoglycane qui empêche la dégradation du violet de gentiane par l'alcool, donc les germes gardant la couleur violet. Par contre les bactéries de Gram négatif possèdent une paroi mince donc, qui permet la dégradation par l'alcool et recoloration par la fuschine. Ces résultats ont été confirmés par le test KOH

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. Qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert, Mais cette définition ne permet pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (Palleroni, 2008).

Les caractéristiques spécifiques et intra spécifiques ont été réalisées selon le schéma (Figure 4, p 25) de détermination des différents genres bactériens proposé par Schaad *et al.* (2001). et les deux clés dichotomiques (A et B) (Figure 7 et 8. P26, 27) proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes.

Selon (Palleroni, 2008) les *Pseudomonas* spp. Fluorescents sont des bactéries aérobie strict, Nous avons utilisé le milieu Hugh et Leifson qui possède un indicateur d'acidification c'est le bleu de bromothymol, ce dernière devient jaune pour les bactéries actives, (la dégradation du glucide qui libère des acides et éventuellement des gaz).

Les 27 isolats, sont donné des résultats négatif sur le test Hugh et Leifson en condition d'anaérobie sauf cinq tube qui devient jaune (résultat positif).

Les tests (LOPAT) permettent de distinguer, au sein du groupe, les espèces non pathogènes comme *Pseudomonas* spp. Fluorescents et les espèces phytopathogènes (Semel,1989). Selon Lelliott *et al.* (1966) les tests biochimiques (LOPAT) sont utilisé pour distinguer quelques espèces de *P.* fluorescents.

La production de Levane sucrase extracellulaire, qui est présente chez quelques biovars de *P. fluorescens*, mais absente chez *P. putida* (Jacques, 1994; Bossis, 1995). Cette enzyme catalyse la synthèse de Levane à partir du sucrose, mais catalyse aussi l'hydrolyse du Levane en monosaccharides (Hettwer *et al.*, 1995), et le saccharose un diholoside non-réducteur (Pascal et Dedonder, 1972).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents à cytochrome oxydase positive sont des microorganismes hétérotrophes (non pathogènes) qui ont l'aptitude d'utiliser une gamme étendue de composés organiques (Latour et Lemanceau, 1997). Contrairement aux espèces oxydase-négative qui sont toutes phytopathogènes (Misaghi et Grogan, 1969; Palleroni, 1984). Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram négatives. Il permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélose. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N-diméthyle paraphenylene diamine, substrat qui prend une coloration bleu violète (Avril *et al.*,1992).

Après le test d'oxydase, nous avons éliminé neuf isolats par ce que elles ne possèdent pas le cytochrome C oxydase et reste 13 isolats qui sont d'oxydase positif.

L'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matière organique. Elle constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose. La

complexité du catabolisme de l'arginine révèle l'intérêt de ce substrat pour les microorganismes (Cunin *et al.*, 1986).

La dégradation de l'arginine est une voie caractéristique des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes (Thornley, 1960). Elle fonctionne seulement en absence d'O₂ et sous conditions non-dénitrifiantes, c'est-à-dire lorsque la chaîne respiratoire est totalement bloquée (Shoosmith et Sherris, 1960; Mercenier *et al.*, 1980). C'est la seule voie fermentative connue chez ces bactéries (Latour et Lemanceau, 1997).

Toutes les isolats ont répondu positivement sur le test l'arginine indique la présence de l'enzyme l'arginine déshydrolase.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents phytopathogènes oxydase positive ont été caractérisé, ces en fonction de leur pouvoir pécotolytique sur tranches de la pomme de terre d'une part et l'induction de la réaction d'hypersensibilité sur plante de tabac d'autre part (Lelliot *et al.*, 1966; Lelliot et Stead, 1987; Cottyn *et al.*, 2009).

Pour les tests pécotolytique et d'hypersensibilité sur tabac ils n'ant révélé aucun effet positif qui indique que ces isolats sont pathogènes. Ainsi que le pécinase et le test d'hypersensibilité sur tabac qui provoquent respectivement des pourriture et des nécroses c'est un indicateur qui permet de différencier entre les espèces saprophytes et les espèces phytopathogènes (Klement, 1963 ; Cooksey *et al.*, 1990).

La pyocyanine (1-hydroxy-5methyl-phénazine), est prédominante chez *P. aeruginosa* (Demange *et al.*, 1989). Cette phénazine de couleur bleue sur le milieu King A est toxique pour une large gamme de bactéries et champignons (Hassan et Fridovich, 1980), nous avons obtenu des résultats négatifs pour l'ensemble des isolats sur le milieu King A par l'absence de production la pyocyanine montré que tous ces isolats ne sont pas des *Pseudomonas aeruginosa*.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents productrices du sidérophore de couleur jaune vertes sur le milieu King B només la pyoverdine ont également été utilisés dans le but de les identifier (Meyer *et al.* 2007 ; Behrendt *et al.* 2009; Meyer 2010). La dépression de la synthèse de pyoverdine par la limitation en fer pourrait expliquer le rôle que jouerait le pigment dans le transport et le métabolisme du fer.

Les résultats obtenus sont positives pour tous les isolats étudiés, ces bactéries produisent des pigments fluorescents sous une lampe ultra-violette (UV) avec différent degré de fluorescence.

La production de protéases extracellulaires, comme évidence l'hydrolyse de la gélatine, est une propriété universelle de *P. aeruginosa*, présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P. putida* (Stanier *et al.*, 1966).

Le résultat de test gélatine à été positive pour 11 isolats et négative pour les deux autre isolats, donc les 11 isolats ne sont pas des *Pseudomonas putida*, et les deux autre isolats peuvent être des *Pseudomonas putida* ou *Pseudomonas fluorescens* biovar V selon la clé A dichotomiques proposé par Jacques (1994).

La croissance des *Pseudomonas* spp. fluorescents est possible entre 4°C et 41°C (Schaad *et al.*, 1992). Ce test réalisé pour éliminer les *Pseudomonas aeruginosa* qui n'est capable de croître à une température de 4°C (Avril *et al.*, 1992 ; Schaad *et al.*, 2001), mais la seule capable de croître à une température à 41°C (Schaad *et al.*, 2001).

Pour nos isolats, nous avons observé la croissance de trois (3) isolats à 41°C et non pas à 4°C, et le contraire a été observé pour les autres isolats.

L'utilisation de galeries API 20NE permettent généralement un diagnostic plus ou moins exacte des espèces *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, et *P. putida* (Lacroix *et al.*, 1995). Nous avons testé six (6) isolats par la galerie API 20NE pour une identification précise, parmi ces isolats nous avons identifié 4 (MI1, Ru1, Am1 et, Eu1) souches comme des *Pseudomonas fluorescens* ont des bonne identifications avec des probabilité supérieur (85.1%), mais la (Ec2) et (As2) ont été identifié respectivement comme *Burkholderia cepacia* avec pas bon identification, et *ochrobactrum anthropi* avec Pas bon identification 47.2%.

Selon Palleroni (1984), si des colonies bactériennes sont fluorescentes sur le milieu King B, c'est une caractéristique de la présence d'une *Pseudomonas*, nous nous somme passé aux tests LOPAT et à la galerie API 20NE

Après les tests King A, croissance à 41°C et à 4°C, test Arabinose et le test de gélatine, nous avons éliminé les *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida*.

Selon les clés A et B, et les résultats de galeries API 20NE, l'affiliation des quatre (4) souches identifiés comme des *Pseudomonas fluorescens* aux deux biovar. Les souches (MI1, Ru1, Am1 et, Eu1) à bonne identification avec probabilité supérieur (95.1%).

Selon la clé dichotomique proposée par Jacques (1994), les deux souches (Am1 et Eu1) sont rattachées au biovar IV. Les souches souches (MI1 et Ru1) sont rattachées au biovar III.

Selon la clé dichotomique proposée par Bossis (1995), Les souches (MI1 et Ru1) sont affiliées au biovar III, les deux souches (Am1 et Eu1) sont rattachées au biovar IV ou le

biovar II, pour les dernières souches nous sommes besoin d'utiliser d'autre test, le test tartrate pour différencier entre ces deux biovars.

Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*. Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores (Iavicoli *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004).

Pour nos souches et sur le milieu KB, en comparant l'effet antagoniste des différentes souches bactériennes en remarquant que toutes les souches présentent une activité d'antagoniste différentielle entre elles, et nous avons remarqué que l'activité de l'antagonisme des souches contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA1) est plus élevée par rapporte *Fusarium culmorum* (BT11), les souches produisent des sidérophores à couleur verte jaune pour acquisition le fer et un effet de compétition.

D'après nos résultats sur le milieu PDA qui ne favorisent pas la production des pigments fluorescents, les souches bactériennes se caractérisent par des activités antagonistes importantes. Ceci peut s'expliquer par l'implication d'autres mécanismes d'action, en montrant que la fluorescence ce signe de synthèse des sidérophores, n'est pas subordonnée obligatoirement à l'activité antagoniste.

Donc les *Pseudomonas* spp. fluorescents possèdent d'autres mécanismes inhibiteurs dans leur pouvoir d'antagonisme qui peuvent être attribués à la synthèse des antibiotiques et d'autres types des métabolites à effet d'antibiose.

Le principal mécanisme mis en cause dans l'effet d'antagonisme des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents est celui de la chélation du fer ferrique par des sidérophores produites sous l'influence de l'environnement et les conditions de culture *in vitro* (Lenhoff, 1963, et Digat, 1983) figure(24).

D'après nos résultats sur le milieu PDA qui ne favorisent pas la production des pigments fluorescents (figure 24), les souches bactériennes se caractérisent par des activités antagonistes importantes. Ceci peut s'expliquer par l'implication d'autres mécanismes d'action, en montrant que la *P. fluorescens*, signe de synthèse des sidérophores, n'est pas subordonnée obligatoirement à l'activité antagoniste.

Donc les *Pseudomonas* spp. fluorescents possède d'autre mécanismes inhibiteurs dans leur pouvoir d'antagonisme qui peuvent être attribuer à la synthèse des antibiotiques et d'autres types des métabolites à effet d'antibiose.

La rhizosphère représente une diversité microbienne. Parmi cette biodiversité, nous avons recherché, les *Pseudomonas* spp. Fluorescents rhizosphériques de Sept espèces végétales spontanées (*Maricandia arvensis*, *Euphorbia helioscopia*, *Echinops spinosus*, *Astragalus armatus*, *Retama reatam*, *Aristida pungens*, *Mathiola livida*)

Nous avons remarqué la dominance de *Pseudomonas* spp. Fluorescents avec des taux qui varient entre 53 et 71% par rapport à la microflore bactérienne totale.

Après l'isolement et la purification, nous avons sélectionné 35 isolats bactériens selon les caractères morphologiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Après les tests physiologiques et biochimiques classiques, nous avons sélectionné 13 isolats comme étant des *Pseudomonas fluorescens*. L'utilisation de la galerie API 20NE a été appliquée pour Six isolats.

L'identification taxonomique a été basée sur la combinaison des résultats obtenus de la galerie classique et ceux les plaques API 20NE, et selon les deux clé dichotomique (A et B), proposées par Jacques (1994), et Bossis (1995). Quatre isolats ont été identifiés comme de *Pseudomonas fluorescens* avec une bonne identification à probabilité supérieur 85 %. Les deux autres isolats ont donné des espèces différentes des *Pseudomonas* spp. fluorescents, nous suggérons de refaire les tests pour les deux derniers isolats.

Nous avons réalisé le test d'antagonisme pour dix (10) souches contre deux espèces fongiques du *Fusarium*. les isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont montré une activité antagoniste appréciable, *in vitro*, sur la croissance des formes spéciales de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Foa1), Et *Fusarium culmorum* (BT11). Cet antagonisme a été moins spécifique pour l'isolat MI2, dont l'activité s'est exprimée sur les deux milieux de culture utilisés, et avec les deux isolats fongiques testés. Toutefois *F. oxysporum* f. sp *albedinis* est le plus sensible aux actions de ces *Pseudomonas*.

Les résultats de ce travail sont des résultats préliminaires. Nous avons eu certains résultats contradictoires (le test ADH de la galerie classique et la galerie API 20NE) et l'identification de deux isolats (As2, Ec2), nous suggérons d'utiliser les tests génétiques pour confirmés les caractères phénotypiques.

Amkraz. N. 2013. *Utilisation des Pseudomonas spp. fluorescents et des plantes aromatiques et médicinales contre Clavibacter michiganensis sub sp. michiganensis, agent du chancre bactérien de la tomate*. Thèse de Doctorat National : Université ben zehre. Maroc. Soutenue le : 29 juin 2013. P 110-111.

Anderson, A. J., Guerra, D., 1985. *Responses of bean to root colonization with Pseudomonas putida in a hydroponic system*. *Phytopathology*, 75(9): P 992-995.

Andrews S., Robinson A., and Rodríguez-Quñones F., 2003. *Bacterial iron homeostasis*. *Microbiology Reviews*. 27: 215- 23.

Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H., 1992. *Bactériologie Clinique*. 2ème édition, Ellipses. P: 265- 270.

Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L., 2000. *The taxonomy of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida : current status and need for revision*. *Agronomie* 20. INRA, EDP sciences. P: 51- 63.

Bowen, G.D. and Rovira, A.D., 1976. *Microbial colonization of plant roots*. *Annu. Rev. Phytopathol* 14: P 121-144.

Braun V., 2001. *Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria*. *Int J Med Microbiol*, 291: P 67- 79.

Calmel M., 1996. *Etude de la colonisation de la rhizosphère du maïs par une souche de Pseudomonas fluorescens. Influence du mode d'inoculation*. DEA, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. pp 43.

Campbell, J.I.A., Jacobsen, C.S. and Sorensen, J., 1995. *Species variation and plasmid incidence among fluorescent Pseudomonas strains isolated from agricultural and industrial soils*. *FEMS. Microbiol. Ecol*. 18: 51-62.

Chin-A-Woeng, T. F., G. V. Bloemberg. and B. J. Lugtenberg. 2003. *Phenazines and their role in biocontrol by Pseudomonas bacteria*. *New. Phyto*. 157 : 503-523.

Chin-A-Woeng, T. F.C., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J.J. and Bloemberg, G. V., 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*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 14:1006-1015.

Clays-Josserand A, Lemanceau P, Philippot L, Lensi R., 1995. *Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent Pseudomonas spp.* *Appl Environ Microbiol* 61, 1745-1749.

Clays-Josserand, A., Lemanceau, P., Philippot, L. and Lensi, R., 1995. *Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent Pseudomonas spp.* *Appl. Environ. Microbiol*. 61: 1745-1749.

- Courtade, A., 1997. *Etude des interactions plante / microorganismes dans le modèle maïs-Pseudomonas fluorescens M.3.1 – Fusarium roseum*. Thèse de Doctorat de l'institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, France. 178pp.
- Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L., Cook, J.C., 1981. *Pyochelin : novel structure of an iron-chelating growth promoter for Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, pp.4256-4260.
- Curie C., and Briat J.F., 2003. Iron transport and signaling in plants. *Annual Reviews in Plant Biology*, 54:183- 206.
- Curl, E., Truelove B., 1986. *The rhizosphere*. Springer-Verlag, 288 pp.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. and Scannell, J.W., 2002. *Estimating prokaryotic diversity and its limits*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 10494-10499.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. and Scannell, J.W., 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 10494-10499.
- Dangl JL, Jones JDG. 2001. *Plant pathogens and integrated defenceresponses to infection*. *Nature* 441. p 826-833.
- Daou, N. 2008. *Identification de nouveaux facteurs hôtes-dépendants chez Bacillus cereus. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'IlsA, une protéine de surface essentielle pour l'acquisition du fer au cours de l'infection*. Thèse Doctorat), l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ), Spécialité : Microbiologie. P: 25-30.
- Davet, P., 1996. *Vie microbienne du sol et production végétale*. Institut national de la Recherche Agronomique, INRA, 75338 Paris Cedex 07, ISBN 2-7380-0648-5, 383 pp.
- De Weger, L.A., Van der Vlugt, C.I.M., Wijfjes, A.H.M., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B., Lugtenberg, B., 1987. *Flagella of a plant growth stimulating Pseudomonas fluorescens strain are required for colonization of potato roots*. *J. Bacterio.*, 169, pp.2769-2773.
- Digat, B. 1983. *Modes d'action et effets des rhizobacteries promotrices de la croissance et du développement des plantes*. In : Les antagonismes microbiens. Modes d'action et applications a la lutte biologique contre les maladies des plantes. 24^{ème} Coll. Soc. Fr. Phytopathol. Bordeaux, 26-28 mai. 360 p.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y., 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22: 107-149.
- Dougherty M.J., and Downs D.M., 2006. *A connection between iron-sulfur cluster metabolism and the biosynthesis of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine pyrophosphate in Salmonella enterica*. *Microbiology*. 152. p 2345- 2353.

- Fenton, A.M., Stephens, P.M., Crowley, J. O'Callaghan, M. and O'Gara, F., 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58. p. 3873-3878.
- Gamble TN, Betlach MR, Tiedje JM. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl Environ Microbiol* 33, 926-939.
- Glick BR, Penrose DM, Li J. 1998. *A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria.*J. Theor. Biol. 190: p 63-68.
- Gobran, GR., Clegg, S., Courchesne, F. 1998. Rhizospheric processes influencing the biogeochemistry of forest ecosystems. *Biogeochemistry* . 42. p 107-120
- Golovleva, L.A., Maltseva, O.V. and Solyanikova, I.P., 1992. *Metabolism of foreign compounds in Pseudomonas spp.* In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (Galli, E., Silver, S., Witholt, B., eds), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 231-238.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T. 2002. *Flagellin perception* : a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7: 251-256.
- Gray, EJ., Smith, DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR : commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry.* 37.p 395- 412.
- Guerinot M., 1994. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol*, 48. P 743- 772.
- Haas, D., Keel, C., Laville, J., et al. 1991. *Secondary metabolites of Pseudomonas fluorescens strain CHA0 involved in the suppression of root diseases.* In: Hennecke, H., Verma, D.P.S. *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions* .Ed. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. pp. 450-456.
- Haas, D., Keel, C., Laville, J., et al., 1991. *Secondary metabolites of Pseudomonas fluorescens strain CHA0 involved in the suppression of root diseases.* In: Hennecke, H., Verma, D.P.S. *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions* .Ed. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, pp. 450-456.
- Haas, D., Keel, C.H. 2003. *Regulation of antibiotic production in root-colonizing Pseudomonas spp.* And relevance for biological control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopat*, 41: 117- 53.
- Hinsinger P, Jaillard B, Dufey, JE . 1992. Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal* 56. P 977-982.
- Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. and Read, D.J. 2001. *Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration.* *Nature.* 411 : 789-792.

- Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. and Read, D.J., 2001. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature*. 411: 789-792.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994. *Genus Pseudomonas*. In: Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A.;Staley, J.T., Williams, S.T. (Eds) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins, pp. 93-94.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. and Bohannon, B.J.M., 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.* 6: 613-622.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. and Bohannon, B.J.M., 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.* 6: 613-622.
- Howie, W. J., Suslow, T.V. 1991. *Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of Pythiummultimum in the cotton spermosphere and rhizosphere by Pseudomonasfluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Inter.*, 37, pp 393-399.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A. and Métraux, J.P. 2003. *Induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana in response to root inoculation with Pseudomonas fluorescensCHA0*. *Mol. Plant Microbe Interact* Vol. 16, No.10. 851-858.
- Imbert M., Blondeau R. 1998. *On the iron requirement of lactobacilli grown inchemically defined medium*. *CurrMicrobiol.* 37(1): 64- 66.
- Jacques F.,1999. Institut de recherches et de consultations en agronomie et écologie appliquées (biophyt sa): Fertilité des sols : *Les produits biologiques*. P . Cours dispenser les 18 et 19 janvier 1999 à Paris.
- Jacques, P., Delfosse, P., Ongena, M., Lepoivre, P., Cornélis, P., Koedam, N., Neirinckx, L., Thonart, P. 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, pp.301-307.
- Jourdan E, Ongena M, Thonart P. 2008. *Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12. p 437-449.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., Defago, G. 1992. *Suppression of root diseases by Pseudomonas fluorescens CHA0 – importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, pp.4-13.
- Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R.J. and Thomashow, L.S., 1996. Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ.Microbiol.* 62: 552-563.

- Kim, M. S., Y. C., Kim, and Cho, B. H. 2004. Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis*O6 upon challenge inoculation with *Corynesporacassiicola*. *Plant Biol.* Mar- Apr;6(2):105-108.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N., 1980. *Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria*. *Nature*, 286. P 885–886.
- Knowles, R.1982. *Denitrification*.*Microbiol. Rev* 46. P 43-70.
- Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R., 2001. Ammonia-oxidizing bacteria : a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55. p 485-529.
- Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R., 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55: 485-529.
- Kragelund L., Leopold C., and Nybroe, O., 1996. *Outer membrane protein heterogeneity within Pseudomonas fluorescens and P. putida and use of Opr F antibody as a probe for Rna homology group I pseudomonads*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 480-485.
- Lam, S.T., Gaffney, T.D., Ligon, J., et al., 1992. *Mutants of a Pseudomonas fluorescens biological control strain with altered production of anti-fungal activities*. In: Nester, E., Comai, L., Gordon, M., Leigh, J. Ed. *Book of abstracts of the sixth international symposium on molecular plant-microbes interactions*. Seattle, University of Washington, 231p.
- Latour, X. and Lemanceau, P., 1997. *Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent Pseudomonas spp.*, *Agronomie*, 17. P 427–443.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. and Lemanceau, P., 1996. *The composition of fluorescent Pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62. P 2449-2456.
- Lawton JH, Jones CG. 1995. Linking species and ecosystems. Organisms as ecosystems engineers. In Jones CG and Lawton JH (Eds) *Linking Species and Ecosystems Chapman and Hall Inc.* 9 pp.
- Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. and Read, D.J., 2004. Networks of power and influence : *the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning*.*Can. J. Bot.* 82. P 1016-1045.
- Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. and Read, D.J., 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82: 1016-1045.
- Leisinger, T., and Margraff, R. 1979. *Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads*. *Microbiol. Rev.* 43(3). P 422–442.
- Lelliot, R. A. and Stead, D. E. 1987. In : T. F. Preece (Ed.). *Methods in Plant pathology*. Vol 2: *Methods for diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell. Oxford. UK, 212 p.

Lemanceau P, Alabouvette C. 1993. Suppression of fusarium wilts by fluorescent pseudomonads : *mechanisms and applications*. BiocontrolSciTechnol 3. P 219-234.

Letoffe S., Nato F., Goldberg M.E. Wandersman C., 1999. *Interactions of Has A, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor Has R*. Mol, Microbiol, 33. P 546- 555.

Ligon, J. M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H.J., Van Pee, K.H. 2000. Natural products with antifungal activity from Pseudomonas biocontrol bacteria. Pest Management Science, 56, pp. 688-695.

Lim, H.S., Kim, Y.S., Kim, S.D. 1991. *Pseudomonas stutzeri YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against Fusarium solani, an agent of plant root rot*. Appl. Environ. Microbiol., 57, pp.510-516.

Lucas P, Sarnigueta, Collet JM, Lucas M . 1989. Réceptivité des sols au piétin-échaudage (Gaeumannomycesgraminis var. tritici) : *influence de certaines techniques culturales*. Soil Biol Biochem 21. P 1073-1078

Lugtenberg B, Kamilova F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63. P 541-556.

Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TFC, BloembergGV . 2002. *Microbial-plant interactions: principles and mechanisms*. Antonie van Leeuwenhoek 81. P 373-383.

Ma J.F., 2005. Plant root responses to three abundant soil minerals : silicon, aluminium and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 267- 281.

Matsubara, T. and Zumft, W. G., 1982. *Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) pseudomonads*. Arch Microbiol.132: p 322-328.

Matsubara, T. and Zumft, W. G., 1982. Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) pseudomonads. *Arch Microbiol*.132: 322-328.

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mettraux, J.P. and Défago, G., 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: *Influence of the gacA gene and of pyoverdine production*. *Phytopathol*. 84: 139–146.

Meksem A., 2010. *Études structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB-dépendants de bactéries à Gram-négatif*. Thèse doctorat. l'université de Strasbourg, Discipline: Sciences du Vivant Spécialité: Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie. pp 14-79.

Michaud, A. 2007. *Interaction entre biodisponibilité, phytotoxicité du cuivre et nutrition en fer de graminées mécanismes physiologiques et rhizosphériques*. Thèse doctorat. Discipline : Sciences du sol. Pp : 31- 33.

Misaghi I, Grogan RG (1969) Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 59, 1436-1450.

Nader M., 2008. Assimilation du fer chez *Pseudomonas aeruginosa*: Étude du mécanisme de transport de la Pyoverdine ferrique à travers la membrane externe. Thèse pour obtenir le titre de docteur de l'université de strasbourg , discipline : biologie. Pp : 4- 5.

Nader M., Dobbelaere, W., Vincent M., Journet L., Adams H., Cobessi D., Gallay J., Schalk I. J., 2007. *Identification of residues of FpvA involved in the different steps of Pvd-Fe uptake in Pseudomonas aeruginosa. Biochemistry*, 46. P 11707- 11717.

Neilands J.B., 1995. Siderophores: *Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. J. Biol. Chem*, 270 : 26723- 26726.

Neilands, J.B., Leong, S.A. 1986. *Siderophores in relation to plant growth and disease. Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37, pp.187-208.

Palleroni N.J. 1984. *Pseudomonas (Migula). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Edited by N. R. Krieg and J. G. Holt. Baltimore, MD : Williams and Wilkins. (1):141- 199.

Palleroni, N.J. and Moore, E.R.B., 2004. Taxonomy of pseudomonads: *experimental approaches*. In "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, pp. 3-44.

Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M., 1973. *Nucleic acid homologies in the genus Pseudomonas. Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 333–339.

Palleroni N.J. . 1992. Introduction to the family Pseudomonadaceae. In *The Prokaryotes (MP Balows, ed)*, Springer-Verlag, New York, 3071-3085

Preston, GM. 2004. *Plant perceptions of plant growth-promoting Pseudomonas. Phil. Trans. R. Soc. B* 359: 907-918.

Raaijmakers J.M., Leeman M., Van Oorschot M.M.P., van der Sluis I., Schippers B., et Bakker P.A.H.M., 1995. Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85: 1075- 1081.

Référence bibliographique :

RESCOTT, M, Lansing., HARLEY, John., KLEIN, Donald., 2000. *Microbiologie*. 2^{ème} édition. Paris:boeck.P.153-204.

Richards BN. 1987. The microbiology of terrestrial ecosystems. *In John Wiley and Sons New York*, 28 pp.

Rillig, M. C. and Mummey, D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171: 41-53.

Rillig, M.C. and Mummey, D.L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171: 41-53.

- Rosales, A.M., Thomashow, L., Cook, R.J., Mew, T.W. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85, pp 1028-1032.
- Sands DC, Gleason FH, Hildebrand DC. 1967. *Cytochromes of Pseudomonas syringae*. J Bacteriol. vol. 94, p. 1785-1786.
- Sarniguet, A. 1990. Receptivite des sols au pietinechaudage du ble : *influence des rotations et de la fertilisation azotee en relation avec certains facteurs physicochimiques et les peuplements de Pseudomonas fluorescens*. These doctorat .Universite Paris-Sud, Orsay, 98p.
- Schäfer G., Purschke W.G., Gleissner M., Schmidt C.L . 996. Respiratory chains of archaea and extremophiles. *BiochimBiophysActa*.1275(1-2). P 16- 20.
- Scher, F.M., Kloepper, J.W., Singleton, C., Zaleska, I., Laliberte, M. 1988. Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species : relationship to bacterial motility, chemotaxis, and generation time. *Phytopathology*, 78, pp 1055-1059.
- Singleton P., Sainsbury D. 2006. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Third Edition* Paul Singleton and Diana Sainsbury. John Wiley and Sons Ltd. ISBN. Pp: 637- 638.
- Smith J., 2004. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 30(3):173- 185.
- Sorensen, D., Nielsen, T.H., Christophersen, C., Sorensen, J., and Gajhede, M. 2001. Cyclic lipounde capeptideamphisin from *Pseudomonas* sp. Strain DSS73. *ActaCrystallogr C* 57: 1123-1124.
- Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966. *The aerobic pseudomonads, a taxonomic study*. *J. Gen. Microbiol.* 43. P 159-271
- Suttisansanee U. 2006. *Biochemistry in bacterioferritin*. A thesis Presented to the university of waterloo in fulfillment of the thesis requirement for the degree of master of science in chemistry. P 32- 50.
- Tarnawski, S. 2004. Réponse des populations de *Pseudomonas* à une augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique dans la rhizosphère de *Lolium perenne* et *Molinia coerulea*. Thèse doctorat. p 8-35.
- TiedjeJM . 1988. *Ecology of denitrification and dissimilatory nitrite reduction to ammonium*. In : *Biology of Anaerobic Microorganisms* (AJB Zehnder, ed), Wiley Interscience Publications, New York, 179-244
- Ulrich B. 1987. *Stability, elasticity, and resilience of terrestrial ecosystems with respect to matter balance*. In Shultze ED Zölfer H (Eds) *Ecological Studies* 61 Springer-Verlar, Berlin Heidelberg. 38 pp.

Van peer R., Niemann C. J. and Schippers B. 1991. *Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusariumwilt of carnation by Pseudomonas Sp. Strain WCS417r*. Phytopathology 81. P 728-734.

Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard F., Guerinot M., Briat J.F., and Curie C., 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell*, 14:1223- 1233.

Viswanathan, R., Samiyappan, R. 2004. Production of secondary metabolites by strains of *Pseudomonas* spp. *antagonistic to Colletotrichumfalcatum causing red rot disease in sugarcane*. ActaPhytopath. etEntomologicaHungarica, 39, pp.29-38.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Défago, G. 1989. *Cyanide production by Pseudomonas fluorescens helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions*. EMBO J., 8, pp.351-358.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Défago, G. 1989. *Cyanide production by Pseudomonas fluorescens helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions*. EMBO J., 8, pp.351-358.

ANNEXE 1 : les compositions des milieu des cultures.

1. LPGA

Extrait de levure	5g
Bactopeptone	5g
Glucose	10g
Agar bactériologique	18g
Eau distillée	1L

2. King B

Peptone	20g
Glycérol	15ml
K ₂ HPO ₄	1.5g
MgSO ₄	1.5g
Agar	20g
Eau distillée	1L

3. King A

Peptone	20g
Glycérol	10g
Chlorure de magnésium	1.4g
Sulfate de potassium	10g
Agar (gélose)	13.6g
Eau distillée	1L

4. LEVANE

Extrait de levure	20g
Bactopeptone	15g
NaCl	1.5g
Saccharose	1.5g
Agar bactériologique	15g
Eau distillée	1L

5. ARGININE

Bactopeptone	1g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0.3g
Agar bactériologique	3g
Rouge de phénol (solution 0.1%)	10ml
Arginine	10g
Eau distillée	1L

6. Hugh et Leifson

Bactopeptone	2g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0.3g
Bleu de promothymol 1%	3ml
Glucose	10g
Agar	3g
Eau distillée	1L

7. Gélatine Gélatinase

Bactopeptone	5g
Extrait de levure	3g
Gélatine	12g
Eau distillée	1L

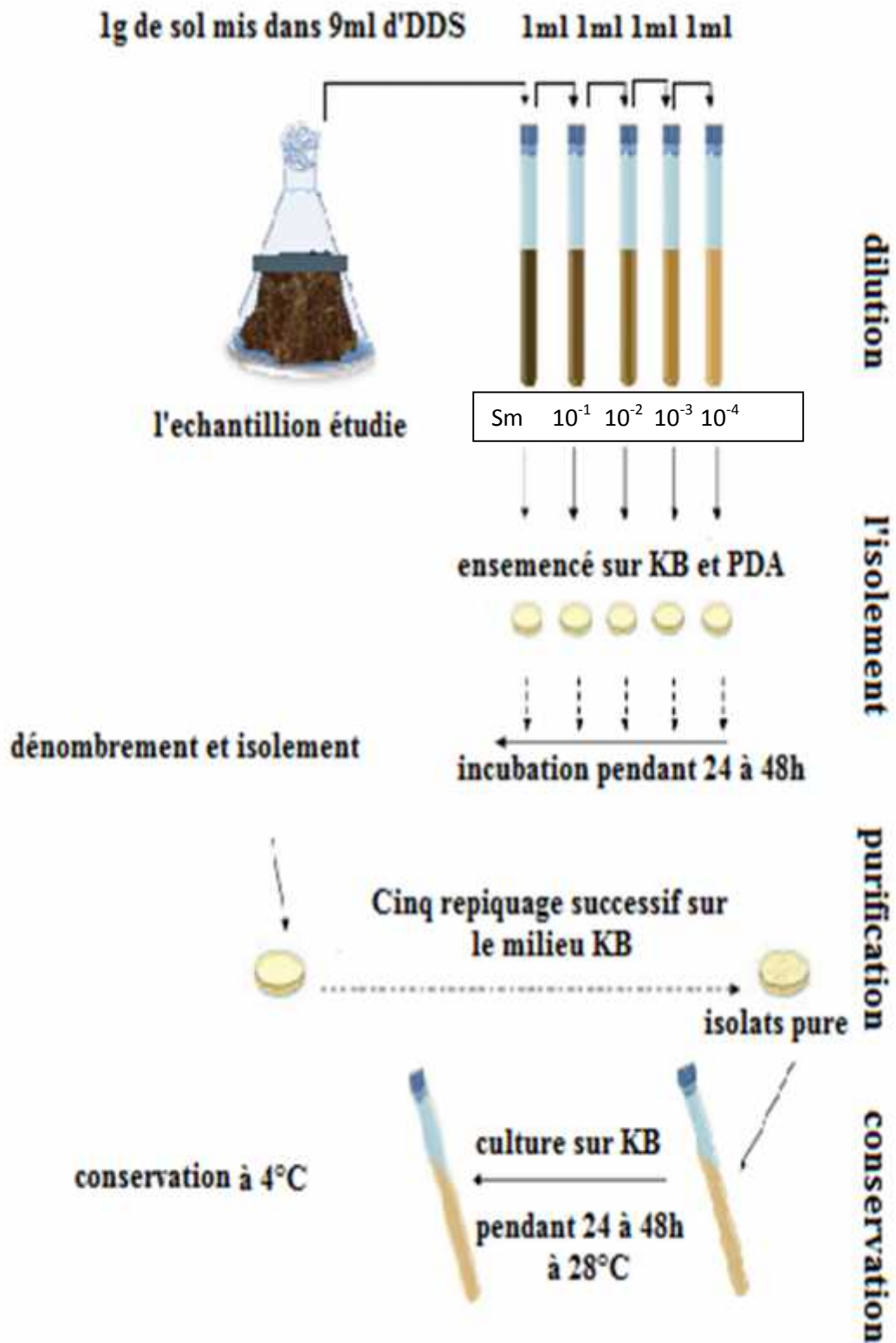
8. EPN

Peptone	10g
Nitrate de potassium	0.1g
Eau distillée	1L

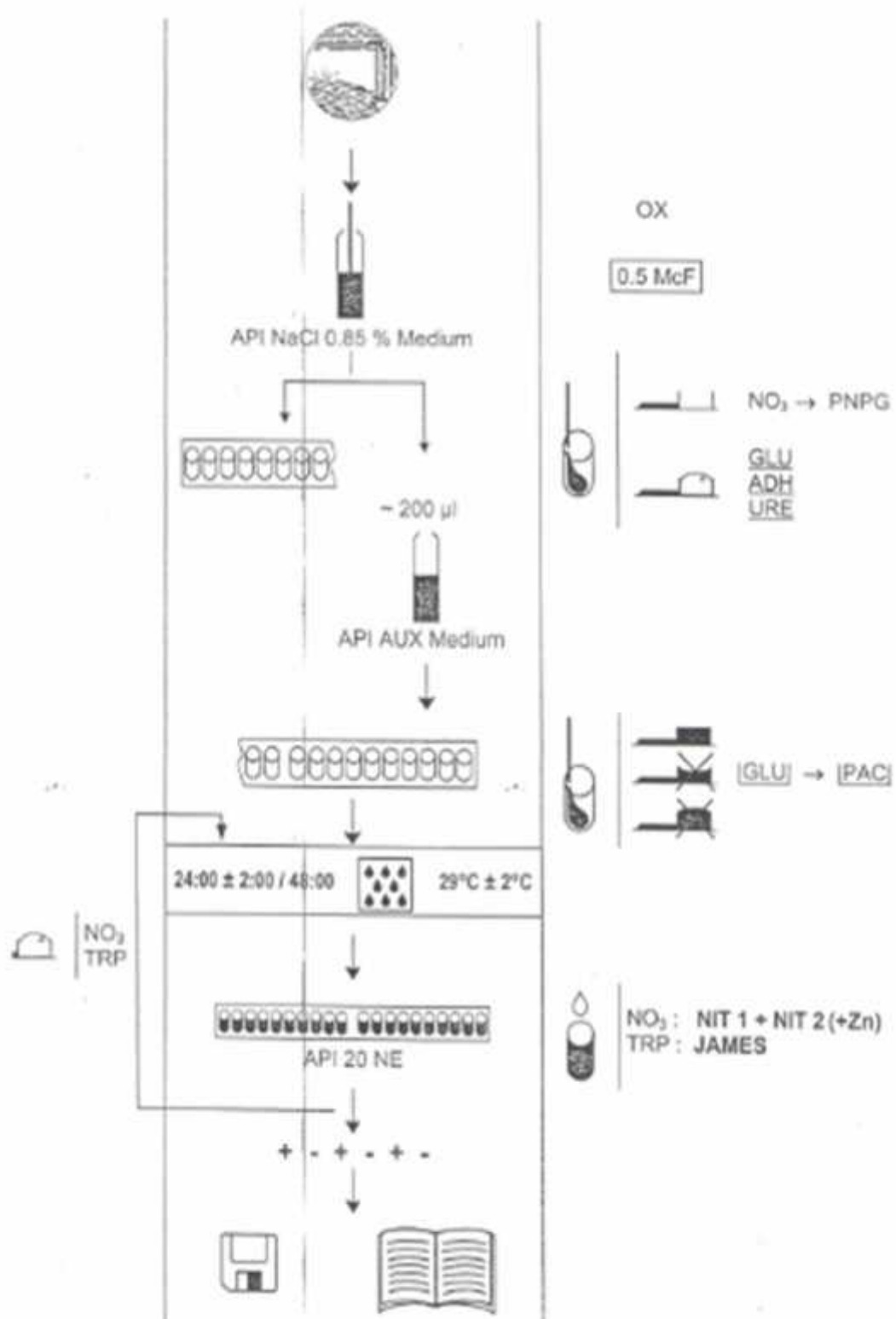
9. PDA

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1L

ANNEXE 02 : technique d'isolement, purification et conservation des isolats



ANNEXE 3 : protocole de plaque API 20NE



ANNEXE 4 : fiches de la lecture les plaques API 20NE.

