



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



**Université Amar Thelidji- Laghouat**

**FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES**

## **MEMOIRE DE MASTER**

**Présenté par Berkana Hanane**

**DOMAINE DESSCIENCESDE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)**

**FILIERE DESSCIENCES AGRONOMIQUES**

**SPECIALITE : Protection des végétaux et de l'environnement**

### **Thème**

**Contribution à l'étude de quelques métabolites secondaires chez  
certaines souches des *Pseudonoma spp. fluorescents* isolées de  
quelques plantes spontanés de la Wilaya de Laghouat**

### **Membre de jury :**

M<sup>me</sup> MARFOUA M

MAA

Président

M<sup>elle</sup> ZAZA M

MAA

Examineur

M<sup>elle</sup> AMEUR D

MAA

Promoteur

**Septembre –2017**

## Résumé

Nous visons par le présent travail l'étude de l'effet bénéfique de quelques souches de *Pseudomonas* spp fluorescents isolées de la rhizosphère des plantes spontanées de wilaya de Laghouat, nous avons recherché certains mécanismes telle que la production des sédiphores, la solubilisation des phosphate, la fixation d'azote, la production de AIA, production de HCN, la production d'antibiotique et l'activité d'antagonisme *in vitro*.

Après cette étude nous avons remarqué que tous les souches sont capable de fixé l'azote, de produire les sédiphores et l'AIA, la production de l'AIA est de (51,76µg/ml.) et (38,82µg/ml.) chez les souches MA8 et P12 respectivement.

Toutes les souches bactériennes testées sont productrices l'HCN sauf la souche P07. Pour l'activité antagoniste nous avons remarqué pour la confrontation direct est significatif et les souches RS12 et AZ3 et P12 possèdent la meilleur capacité inhibitrice de la croissance de mycélienne contre les deux champignons testé (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersicet* *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*) par contre la confrontation indirect est non significatif les bactéries ont même effet sur les deux champignons testés.

## Les mots clés :

*Pseudomonas* spp fluorescents, sédiphores, AIA, HCN, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersicet* *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*

## Abstract

We investigate the beneficial effect of a few fluorescent *Pseudomonas* spp strains isolated from the rhizosphere of spontaneous wilaya wilaya plants. We looked for mechanisms such as the production of sdirophores, solubilization of phosphate, nitrogen fixation, AIA production, HCN production, antibiotic production and *in vitro* antagonism activity.

After this study we noticed that all strains are capable of fixing nitrogen, producing sdirophores and AIA, production of AIA is (51.76µg / ml.) And (38.82µg / ml .) in strains MA8 and P12 respectively.

All the bacterial strains tested produce HCN except the strain P07. for the antagonistic activity we noticed for direct confrontation is significant and the strains RS12 and AZ3 and P12 possess the best inhibitory capacity of mycelial growth against both fungi tested (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersicet* and *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*) on the other hand the indirect confrontation is not significant the bacteria have the same effect on the two fungi tested.

From the results obtained the strain P12 the best potential for the test *in vivo* in biostimulation and biocontrol tests.

## Keywords :

*Pseudomonas* spp fluorescent, sdirophoresis, AIA, HCN, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*.

## ملخص

هدفنا في هذا العمل دراسة تأثير بعض سلالات *Pseudomonas* spp fluorescent معزولة من الولاية الأغواط، من النباتات فسعيننا لبعض الآليات مثل إنتاج sédiphores، الإذابة من الفوسفات، وتركيب النيتروجين، وإنتاج AIA، وإنتاج CHN، وإنتاج المضادات الحيوية والنشاط المضاد في المختبر. بعد هذه الدراسة وجدنا أن جميع سلالات قادرة على وضع النيتروجين، وإنتاج sédiphores وAIA، إنتاج AIA هو 51،76µg / ml (و 38)، 82µg / ml (في سلالات MA8 و P12 على التوالي).

جميع السلالات الجرثومية اختبار إنتاج هن باستثناء سلالة P07. للنشاط مضاد لاحظنا المواجهة المباشرة أمر مهم و RS12 و AZ3 وسلالات P12 لديهم قدرة أفضل المثبطة للنمو فطر ضد كل من الفطريات المختبرة (الفيوزاريوم والفيوزاريوم *oxysporum f. sp. lycopersicet* *oxysporum f. sp. pisi*) على المواجهة غير المباشرة على العكس من ذلك ليست كبيرة البكتيريا لها تأثير حتى على الفطريات اثنين اختبارها. من النتائج التي تم الحصول عليها P12 سلالة إلى أفضل إمكانات لاختبار في الجسم الحي في بيوسنثيمولاتيون واختبارات التحكم البيولوجي.

## الكلمات المفتاحية :

نيون الزانفة sédiphores، AIA، HCN، الفيوزاريوم *oxysporum f. sp. lycopersicet*، الفيوزاريوم *oxysporum f. sp. pisi*.

# *Remerciements*

*Nous remercions en premier lieu, Dieu pour toutes ses bénédictions qui nous entourent : le guide par le bon chemin de l'Islam et l'offre de tous les moyens de vivre, d'étudier et de faire du bien pour le bien-être des autres pour un lendemain plus meilleur.*

*Nous remercions infiniment notre encadreur Mme Amer J , pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi.*

*Nous remercions aussi les membres du jury qui ont bien voulu accepter, et ce malgré leurs lourdes responsabilités, d'évaluer ce modeste travail.*

*Nos remerciements vont également aux enseignants qui nous ont accompagnés tout le long de notre cursus universitaire.*

*Nous n'oublions pas à remercier toute personne, non citée, ayant contribué de loin ou de près à la réalisation du présent travail.*

*Enfin, nos sincères remerciements à tous les professeurs des départements de Biologie et d'Agronomie de l'université de Laghouat.*

# dédicaces dédicaces

---

*Je dédie ce modeste travail à:*

*Notre seul espoir, notre patrie l'Algérie.*

*Ma mère Meghnia et mon père Dandani qui ont été la lumière de ma vie.*

*Ma sœur : Fatima et Nawel*

*-Mes frères : Rachid, Mohamed, Chikh, Abd Alkader, Hamid*

*-A mes familles Surtouts les familles Berkana et Chenini.*

*-A Toutes Mes Amies*

*Je dédie ce travail pour tout les Person qui connu moi mais moi ne peut pas écrire dans ce Dédicace.*

*Enfin, A tout le groupe de l'option d'Agronomie, ainsi qui a toute la promo2017.*

Résumé .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des tableaux .....	III
Liste d'abréviations.....	IV
Introduction .....	1

## Synthèse bibliographique

Généralité sur l'habitat .....	3
<b>1. . La rhizosphère .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Les micro-organismes de la rhizosphère .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Les bactéries de la rhizosphère .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1 les <i>pseudomonas spp.fluorescents</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Historique.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Morphologie et Structure .....</b>	<b>4</b>
<b>2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. La classification .....</b>	<b>6</b>
<b>A.Clacification de Bergey, 1984.....</b>	<b>6</b>
<b>B.Classification phylogénique.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2 . les <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> agent de la stimulation et de la</b>	
<b>coroissance ..... 6</b>	
<b>2.2.1. La stimulation de croissance de plantes .....</b>	<b>6</b>
<b>A.La1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate(ACC)désaminase .....</b>	<b>6</b>
<b>B. solubilisation des phosphates par les <i>Pseudomonas spp. Fluorescent</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>C.AcideIndole-3-acétique(AIA) .....</b>	<b>7</b>
<b>D.Cytokinines .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2.Lastimulationdegermination.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.3.Dénitrification.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.mecanismed'antagonisme .....</b>	<b>9</b>
<b>A.La compétition .....</b>	<b>9</b>
<b>B. La production des substances inhibitrices de la croissance des pathogènes</b>	
<b>.....</b>	<b>9</b>
<b>C. Induction de résistance systématique .....</b>	<b>10</b>

## Matériel ET Méthodes

I. Origine des souches bactériennes .....	11
II .Mécanisme d'action des <i>Pseudomonas fluorescents</i> .....	11
1. Production de sédirophore .....	12
2. Fixation d'Azote .....	12
3. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA) .....	12
4. Solubilisation du Phosphate .....	12
5. Production de l'Acide Cyanhydrique(HCN) .....	13
6. production des antibiotique.....	13
III. Recherche d'antagonistes .....	13
1.Confrontation direct .....	14
2. la confrontation indirecte .....	14
IV. Analyse statistique .....	15

## Résultats et Discussions

I. Mécanisme d'action des <i>Pseudomonas fluorescent</i> .....	16
1. Production des sédirophores .....	16
2. Fixation de l'Azote .....	17
3. Production de l'AIA .....	18
4. Solubilisation de Phosphate .....	20
5. production l'HCN .....	21
6.production des antibiotiques .....	22
II. Résultats de l'antagonisme <i>in vitro</i> .....	22
1.Confrontation direct .....	23
2.Confrontation indirect .....	24
3.Discussion .....	25
CONCLUSION .....	26
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE .....	27
ANNEEX .....	

<b>Figure1</b>	Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries	5
<b>Figure 2</b>	Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions : <i>Pseudomonas</i> de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol.	08
<b>Figure 3</b>	Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère.	09
<b>Figure 4</b>	Les deux méthodes d'antagonismes <i>in vitro</i> .	15
<b>Figure 5</b>	Colonies de <i>Pseudomonas</i> fluorescents avec halo de solubilisation sur le milieu NPRIB	16
<b>Figure 6</b>	Colonies de <i>Pseudomonas</i> fluorescents avec halo de solubilisation sur le milieu PVK.	18
<b>Figure 7</b>	Résultat de test de fixation d'azote sur le milieu winogradsky.	19
<b>Figure 8</b>	Résultat de test de sédérophore sur le milieu KB+Fe.	21
<b>Figure 9</b>	Le taux d'inhibition des champignons	22
<b>Figure 10</b>	Le taux d'inhibition bar les bactéries	23
<b>Figure 11</b>	Le taux d'inhibition des champignons	24
<b>Figure 12</b>	Le taux d'inhibition par les bactéries	25
<b>Figure 13</b>	Le taux d'inhibition des champignons	25

## Liste Des tableaux

---

<b>Tableau 1</b>	Le non des souches bactériennes et l'origine des ces souches	11
<b>Tableau 2</b>	Le résultat de production de l'AIA	19
<b>Tableau 3</b>	Diamètre de colonies bactériennes sur le milieu NBRIP et le milieu PVK (en mm).	20
<b>Tableau 4</b>	Les résultats de la production de l'HCN	22

## Liste des abréviations

---

<b>AIA</b>	Acide indole-3-acétique
<b>KB</b>	King B
<b>PVK</b>	pikovskaya
<b>NBRIP</b>	National Botanical Research Instituts phosphate
<b>M</b>	Mole
<b>mg</b>	milligramme
<b>TSA</b>	Trypticase soja
<b>tr</b>	tour
<b>MIN</b>	minute
<b>mm</b>	Millimètre
<b>PGPR</b>	Plant Growth Promoting Rhizobacteria.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>PH</b>	Potentiel d'hydrate
<b>S</b>	Second
<b>T</b>	Température
<b>HCN</b>	Acide Cyanhydrique

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryote et eucaryote. Ces microorganismes jouent un rôle clé et influence grand nombre de processus des différents écosystèmes, d'une manière générale, le processeur de minéralisation est une voie importante par laquelle les microorganismes vivant librement influençant la disponibilité des éléments nutritifs et donc la productivité, et la santé des plants (Amkraz, 2013).

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents forment un groupe diversifié de bactéries qui peuvent généralement être distinguées visuellement des autres par leur aptitude à produire un pigment jaune vert soluble dans l'eau (Pallereni et al., 1973). Elles représentent une grande fraction de la communauté microbienne partagent leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et actinomycose. Ils sont retrouvés sous les différents horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes.

Le terme PGPR plants growth- promoting rhizobactéria désignant ces bactéries a été introduit par Kloepper et Schroth 1978. Différents mécanismes sont à l'origine des effets PGPR des bactéries rhizosphériques.

Certaines bactéries PGPR sont utilisées en tant qu'inoculat pour améliorer le développement des racines via la production de certaines phytohormones (Bloemberg et Lugtenberg, 2001), tels que des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines (Vessey, 2003).

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents inhibent 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 une grande compétition pour l'acquisition du fer. Dans un milieu comme le sol où cet élément est présent en très faible quantité, cela peut nuire à la croissance saprophyte de plusieurs agents pathogènes et ainsi réduire la sévérité de la maladie.

## Introduction

---

L'objectif de ce travail est d'étudier le mécanisme d'action des souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* et tester l'effet antagoniste de ces souches bactériennes contre deux champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* et *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*.

En ce qui concerne les mécanismes d'action nous avons cherché à mettre en évidence :

- la solubilisation des phosphates
- la fixation d'azote
- la production de sédrophore
- la production de l'AIA
- la production d'acide cyanhydrique(HCN)
- la production des antibiotiques

Et la recherche des antagonistes, Pour cet activité nous avons utilisé deux méthodes de confrontation ; l'une direct et l'autre indirecte.

### Généralité sur l'habitat

#### 1. La rhizosphère

Selon Perrier (2004) et INRA (2009), la rhizosphère est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les micro-organismes associés. Cette zone est réduite à une ou deux dizaines de centimètres sous des pelouses ou des prairies, mais elle est parfois plus épaisse dans les forêts des zones tempérées.

L'effet rhizosphère (Katzenelson *et al.*; 1962) est un processus dynamique résultant d'interaction entre la plante hôte, le sol, les conditions climatiques, les pratiques culturales et les interactions au sein des communautés microbiennes. L'ensemble de ces processus induit des caractéristiques physico-chimiques et biologiques différents du sol non rhizosphérique (Garbaye, 1991).

##### 1.1 Les micro-organismes de la rhizosphère

La richesse de la rhizosphère en sucre, aminoacide, acides organiques, isoflavonoïdes, régulateurs de croissance et enzyme libérées par les plantes (Pierson et Pierson, 2010), rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en verre 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 et la santé des plantes, certains sont nuisibles, d'autres sont bénéfiques et certains ne semblent avoir aucun effet.

##### 1.2. Les bactéries de la rhizosphère

Dans la rhizosphère, les bactéries constituent les microorganismes le plus nombreux (leur densité est de l'ordre de  $10^9$  / g de sol) et les plus variés. Elles sont plus fortement stimulées par l'effet rhizosphérique que les Actinomycètes, les champignons, les algues et les protozoaires (Dommergues et Manganot, 1970).

Ces bactéries ont des relations directes ou indirectes avec la plante et selon leur relation, les bactéries peuvent être saprophytes, délétères, bénéfiques pour la plante dont les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (dans ce groupe se trouvent aussi les bactéries fixatrices d'azote, symbiotiques des plantes, les rhizobia)

### 1.2.1. les *Pseudomonas* spp. fluorescents

#### 1. Historique

En raison de leur présence généralisée dans l'eau et des graines de plantes telles que les dicotylédones, les *Pseudomonas* ont été observés au début de l'histoire de microbiologie. Le nom générique *Pseudomonas* créé pour ces organismes a été défini en terme assez vague. En 1984 par Migula, comme un genre de bactéries à gram- négatives. En forme de tige et possédant des flagelles polaires. Peu de temps après, les *Pseudomonas* ont été isolés de nombreuses niches et un grand nombre de noms d'espèces a été initialement attribuée au genre. Selon la deuxième édition du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986).

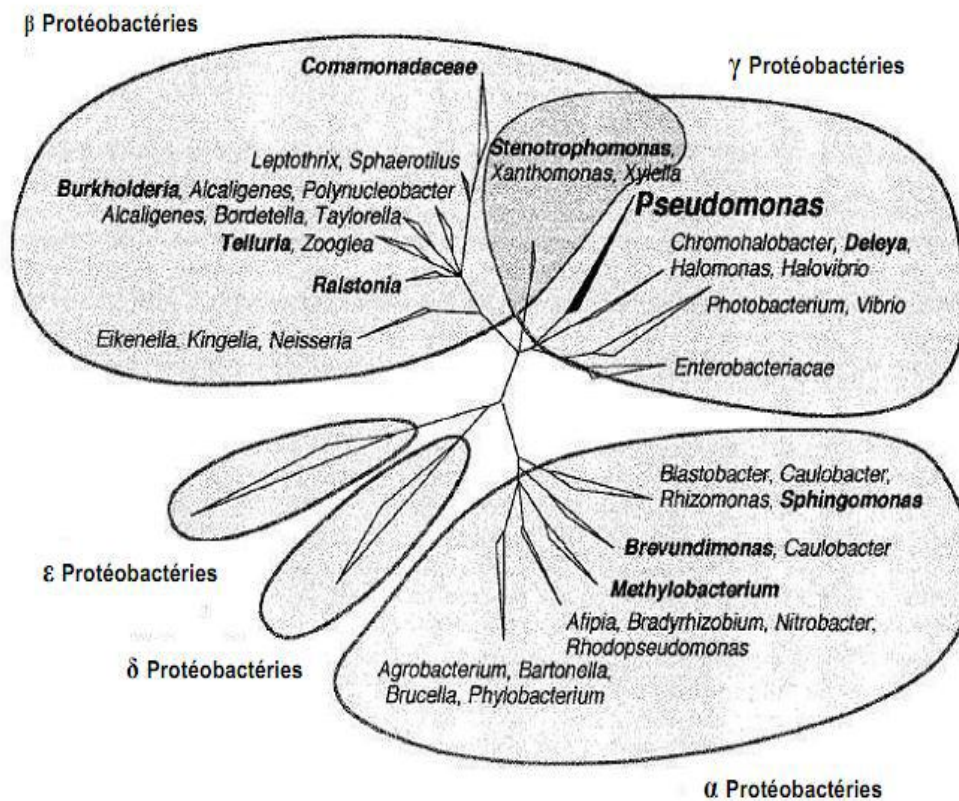
#### 2. Morphologie et Structure

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Ces bactéries Gram négatives, non sporulant, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines pouvant utiliser le NO<sub>3</sub> comme accepteur d'électrons. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires, et elles ont un métabolisme mésophile et chimioorganotrophe, la plupart étant saprophytes (Bossiset *al.*, 2000). Quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'humain. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodiet *al.*, 2001). Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *P. fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars (Bossiset *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 biologiques. 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 population des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003).

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe  $\gamma$  des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces

ubiquitaires (Bossiset *al.*, 2000 ; Palleron 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 (Figure1).



**Figure 1.** Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossiset *al.*, 2000).

### 2. *Pseudomonas fluorescens*

La *Pseudomonas fluorescens* est une bactérie à Gram négative, aérobie strict qui se présente sous forme de bâtonnet. Elle évolue à 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'autre structure de survie et ne peut pas se développer dans des conditions acides (pH inférieur à 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 *et al.*, 1994).

Ces espèces représentent en effet un intérêt potentiel pour l'environnement et l'agriculture, certaines souches améliorent la croissance et la santé des plantes, et contribuent donc à réduire l'utilisation d'intrants de synthèse en agriculture, d'autres sont capables de réduire les oxydes d'azote et de dégrader les composés xénobiotiques (Bossiset *al.*, 2000).

### 2.1. La classification

Le groupe *Pseudomonas* *fluorescens* est composé de bactéries qui dans des pigments jaune-vert fluorescence. Huit espèces différentes appartiennent à ce groupe : *Pseudomonas aeruginosa* (espèce pathogène de l'homme), *P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. chihorii* (espèce pathogène) et enfin *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens* et *P. chlororaphi*, qui rassemblent des organismes saprophytes.

La classification des *Pseudomonas* est la suivante :

#### A. Classification de Bergry, 1984

- Embranchement : Gracilicutes Gram-.
- Groupe 4 : Bâtonnat ou cocci aérobies ou micro aérophiles, Gram-.
- Famille : Pseudomonadaceae.
- Genre : *Pseudomonas*.

#### B. Classification phylogénique

- Règne : Bactéria
- Division : Protéobactéria
- Classe : Gammaprotéobactéria
- Ordre : Pseudomonadales
- Famille : *Pseudomonadaceae*
- Genre : *Pseudomonas*

### 2.2 .Les *Pseudomonas* spp. fluorescents agent de la stimulation et de la croissance

#### 2.2.1. La stimulation de croissance de plantes :

##### A. La 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACC):

Certaines souches de *Pseudomonas* possèdent le gène de l'ACC désaminase (1-aminocyclopropane 1- carboxylate) qui implique dans l'amélioration de la croissance de la plante hôte (Lemanceau, 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.

### **B. solubilisation des phosphates par les *Pseudomonas* spp. fluorescents :**

Les bactéries solubilisant le phosphate sont communes dans la rhizosphère, cette dernière étant le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La sécrétion d'acides organiques et de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Kim et al ; 1998. Richardson, 2001). Les espèces de *pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. chlororaphis*, *P. aeruginosa* ont été identifiées comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (Cattelan et al., 1999 ; Bano et Musarat, 2003).

### **C. Acide Indole-3-acétique (AIA) :**

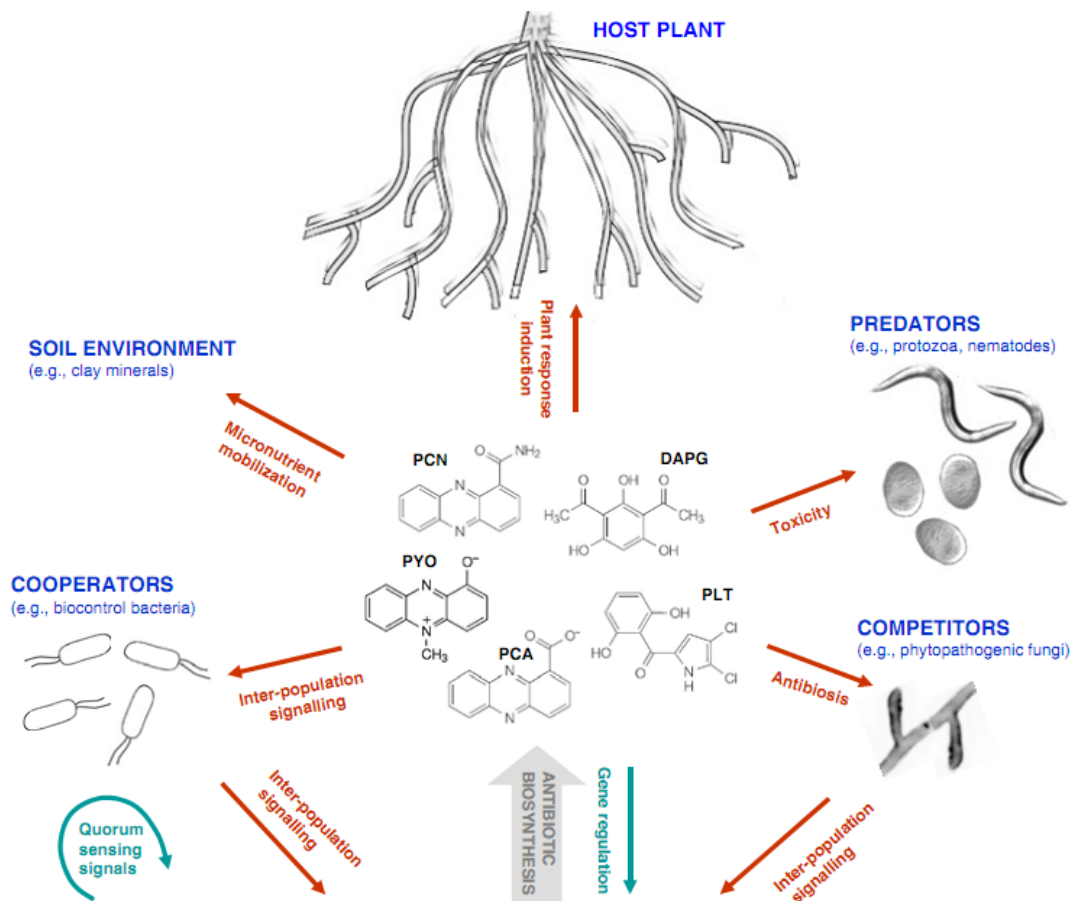
Cette phytohormone est impliquée dans l'initiation de la division des cellules au niveau des racines, et de leurs élargissements (Salisbury, 1994). Communément produite par les rhizobactéries (Barazani et Friedman, 1999). Les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leur capacité à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriment pour la plante. (Patten et Glick 2002), ont rapporté le rôle de l'AIA produit par *p.putida*, chez la plante hôte, dans le développement de son système racinaire.

### **D. Cytokinines :**

Les cytokinines forment une classe de phytohormones qui stimulent les divisions cellulaires, l'élargissement et le développement des tissus (Salisbury, 1994). Ce sont des signaux impliqués dans la médiation du stress environnemental des racines vers les parties supérieures de la plante. La production de cytokinines a été rapportée chez *P. fluorescens* (Garcia et al ; 2001).

#### **2.2.2. La stimulation de germination**

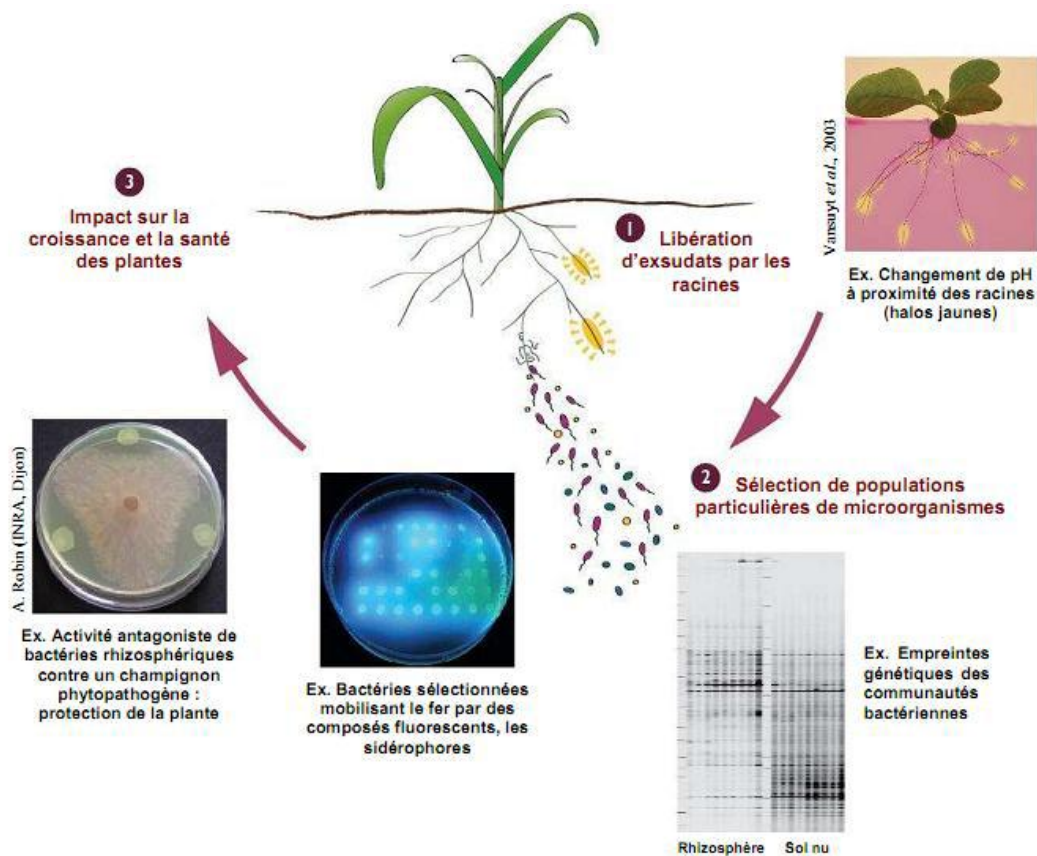
Certaines souches bactériennes, appartenant au groupe de *Pseudomonas* spp. fluorescents, semblent améliorer la germination des grains lorsque les conditions d'environnement sont défavorables. On a montré que le taux de germination de graines de *colza*, semées dans le sol froid et battant, pouvait être significativement augmenté grâce à l'inoculation par certaines souches bactériennes (Digat et Gardan, 1987).



**Figure 02.** Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions : *Pseudomonas* de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol (Dubuiset *al.*, 2007).

### 2.2.3. Dénitrification

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. La dénitrification est composée de quatre réaction par les quelles les nitrates sont réduits en dit nitrogène (N<sub>2</sub>). Par des métallo-enzymes comme le nitrate réductase, nitrite réductose, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase ( Lemanceau, 1998).



**Figure 03.** Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Lemanceau *et al.*, 2006).

### 2.3. mécanisme d'antagonisme

#### A. La compétition

Le premier type d'interaction mis en jeu entre les micro-organismes est le phénomène de compétition aussi bien pour les espèces que les éléments nutritifs. La compétition trophique exercée essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer. En effet, ce dernier élément bien qu'il est abondant dans le sol, s'y trouve essentiellement sous forme oxydé ( $Fe^{3+}$ ) non assimilable par les micro-organismes telluriques (Kloepper *et al.*, 1980).

#### B. La production des substances inhibitrices de la croissance des pathogènes

Les *Pseudomonas fluorescens* produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui jouent un rôle dans l'effet antagonisme.

La production d'acide cyanhydrique (HCN) est nécessaire à la production de la plante vis-à-vis de l'agent de la pourriture noire du Tabac. Les souches *Pseudomonas*

*fluorescents* produits des antibiotiques et jouent un rôle important dans l'inhibition d'agent phytopathogènes telle que le 2,4-diacétylphloroglucinol.

### **C. Induction de résistances systémique**

Il existe des interactions entre les *Pseudomonas* et les cellules racinaires, qui permettant d'augmenter la résistance de celles-ci à l'infection par des micro-organismes. La réduction du manganèse par *Pseudomonas fluorescens* pourrait jouer un rôle, cette réduction augmenterait la quantité du manganèse disponible pour la plante (Digate *et al.*, 1990).

Ce mode d'action des PGPR antagonistes est expliqué par l'induction de la résistance naturelle des plantes contre les maladies. Cette induction peut se faire par différents mécanismes :

- L'inoculation par des bactéries antagoniste peut induire des modifications morphologiques chez la plante la rendant ainsi moins sensible à l'attaque de pathogène.
- L'inoculation par les antagonismes peut induire la synthèse des molécules dans les tissus interne des plantes ce qui leur confère une certaine immunité contre les agent pathogènes (Rezzonico *et al.*, 2005).

Notrebut consiste à la mise en évidence de l'effet bénéfique des souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* isolé à partir de la rhizosphère de certaines plantes spontanées dans certains régions de la wilaya de Laghouat.

### I .Origine des souches bactériennes:

Les bactéries utilisés dans ces essais ont été isolées et identifiées à université de Amar Telidji de Laghouat en 2015 et 2016 (tableau 1), la régénération des souches bactériens a été fait par repiquée dans des boites de Pétri contenant le milieu de KB (Annexe 1) à une température de 28 °C pendant 24h en parallèle nous avons confirmé leur pureté.

**Tableau I :** l'origine des souches bactériennes

Souche	Origine rhizosphère	L'origine géographique	Année de d'isolement
AZ3	<i>Pistacia atlantica</i>	Elhouita– Laghouat	2016
AZ7	<i>Pistacia atlantica</i>	Laghouat	2016
BH1	<i>Pistacia atlantica</i>	Elhouita – Laghouat	2016
RS21	<i>Ziziphus mauritiana</i>	Laghouat	2016
P01	<i>Astragalus armatus</i>	Elassafia	2015
P07	<i>Astragalus armatus</i>	Elassafia	2015
P12	<i>Astragalus armatus</i>	Elassafia	2015
P05	<i>Astragalus armatus</i>	Elassafia	2015
MA8	<i>Astragalus armatus</i>	Kaf Mokran	2015

(Table origine 2017)

### II .Mécanisme d'action des *Pseudomonas fluorescents* :

Pour étudier l'effet bénéfique des souches de *Pseudomonas fluorescens* nous avons recherché quelque mécanisme d'action, la production de sédirophore, solubilisation de phosphore, fixation d'azote, production de l'AIA, synthèse des antibiotique, production de l'HCN et l'antagonisme.

#### 1. Production de sédirophore :

Dans ce test nous avons ensemencé des souches bactériennes sur le milieu de KB additionné 50mg/l de  $Fe^{+3}$  et sur le milieu KB (Annexe 1) seul, puis incubé à  $28^{\circ}C$  pendant 72h, dans le but de chercher un pigment fluorescent indicateur des sédirophores en cas de carence en fer (Angayarkanniet *al.*, 2012).

### 2. Fixation d'Azote

Dans ce test nous avons ensemencé des souches bactériennes (PH1, AZ3, P05, P07, P12, RS21) sur le milieu de Winogradsky sans azote (Annexe 1), après incubation à  $28^{\circ}C$  et pendant 24h. Si il y a une croissance bactérienne ; c'est un résultat positif (+), alors que l'absence de croissance bactérienne est un résultat négatif (-).

### 3. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA) :

La production de l'AIA par les différentes souches étudiées a été testée sur le milieu de KB liquide auquel est ajoutée 30 mg L-Tryptophane (Annexe 1) selon Khalid *et al.*, 2004, chaque souche est inoculée dans 100ml de milieu KB liquide et incubée pendant 5 jours sous agitation à 180t/m, après l'incubation nous avons fait une centrifugation (4500 /15min), puis nous avons prélevé un volume de 1ml de surnageant et 2ml de réactif de Salkowsky (1ml de  $FeCl_3$  0.5 M et 50 ml de 35% d'acide perchlorique). L'apparition d'une couleur rose indique la présence de l'AIA, la quantité de ce dernier est déterminée d'après une courbe d'étalonnage, par lecture de l'absorbance à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin (1 ml de milieu non inoculé + 1 ml de réactif de Salkowsky). Ce test a été réalisé pour 6 souches bactériennes (MA8, P12, RS21, P07, AZ3e, HB1).

### 4. Solubilisation de Phosphate :

La capacité des souches à dissoudre le phosphate tricalcique  $Ca_3(PO_4)_2$  a été testée selon la méthode décrite par Nautiyal (1999). Les bactéries testées sont déposées sous forme de spots sur les deux milieux solides NBRIP (National Botanical Research Institute phosphate) et PVK (Annexe 1). Après l'incubation à  $28^{\circ}C$  pendant 10 jours, le diamètre total (diamètre du halo + diamètre de la colonie) est mesuré. Le diamètre du halo de solubilisation pour chacune des souches est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total. Ce test a été réalisé pour 5 souches bactériennes (P01, AZ3, AZ4, RS21, P05).

### 5. Production de l'Acide Cyanhydrique (HCN) :

La capacité de produire l'acide cyanhydrique par les souches de *Pseudomonas* est étudiée selon la méthode de Bakker et Schippers (1987). Chaque souche est inoculée, à l'aide d'une anse, sur le milieu Trypticase soja (TSA) (Annexe 1) additionné de glycine (4,4 g/l). Un papier filtre imprégné d'une solution de couleur jaune (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium) est déposé sur le couvercle de chaque boîte de Pétri en position inversée. Celles-ci sont scellées avec du papier Parafilm et incubées à 28 °C pendant 5 jours. Elles sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les souches, HCN+, capables de virer la couleur du papier, du jaune à l'orangé (Abbas-Zadehet *al.*, 2010).

### 6. Production des antibiotiques :

Dans ce test nous avons inoculé chaque souche dans 100ml de milieu KB liquide et incubé pendant 5 jours à 28°C et sous agitation 180 tr/min, après la centrifugation (4500 /15min), nous avons séparé le surnageant dans des flacons et ajoutés le même quantité d'acétate d'éthyle, puis nous avons versé le chaque contenant dans un ampoule( utilisé la phase organique), à l'aide de rotovaporle solvant est vaporisé à 40°C, ensuite nous avons ajouté 0,6 ml de méthanol pour récupérer le résidu sec. Puis ils ont été stockés à 4°C jusqu'à la réalisation d'un antibiogramme contre deux champignons *Fusarium oxysporum* ; *f. sp.lycoparsici* et *Fusarium oxysporum f. sp.pisi*.

Pour ce dernier, nous avons étalé une suspension fongique sur le milieu MH, des disques de papier filtre n°=3 imprégnés de 40ml du l'extrait d'antibiotique ont été déposés dans ces boîtes de pétri puis lissés à 4°C pendant 2h ensuite à 25°C pendant 24 à 72h. Ce test est réalisé en 3 répétitions. Le diamètre de la zone d'inhibition au tour du disque est mesuré.

### III. Recherche d'antagonistes :

Le pouvoir antagoniste des 8 souches (AZ3, AZ4, BH1, RS21, P01, P07, P12, P05) de *Pseudomonas spp.* fluorescents a été testé par l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* ; *f. sp.lycoparsici* et *Fusarium oxysporum f. sp.pisi*) pour cela nous avons utilisé deux méthodes d'antagonisme direct et l'autre indirect.

La comparaison entre la croissance de champignon en présence des bactéries avec la croissance du champignon sur les boîtes témoins après 5 jours d'incubations, permet de distinguer les zones d'inhibition.

Le taux d'inhibition I(%) de la croissance du mycélienne a été évaluée selon la formule suivante(Hamouniet *al.*, 1996) :

$$I (\%) = (1 - Dpa / Dt ) * 100$$

Dt : croissance radiale de témoin.

Dpa : croissance mycélienne radiale du pathogène en présence de bactéries.

### 1-Confrontation direct

Ce test d'antagonisme effectué sur : KB (Annexe 1) dans chacun boîte de Pétri nous avonsensemencé à l'extrémité de la boîte des souches bactériennes en sport (Bakker et Couk, 1988), après 24 h d'incubation à 28C° nous avons placé un disque de 4 mm de chacun champignon au centre de la boîte

Dans d'autre boîte contenant le milieu KB nous avons placé le disque de chacun champignon seule comme témoins d'expériences. Ce test est réalisé en 3 répétitions (fig.04).

### 2. la confrontation indirecte

Ce test d'antagonisme effectué sur le deux milieux solide : KB et PDA (annexe 1) ; selon la méthode de Corderoet *al.* , 2014, dans chaque boîte de pétri contenant à sa moitié le milieu PDA etdans l'autre moitié le milieu KB en laissant un vide entre les deux milieux pour évitertout contact entre eux ,dans chacun boîte de Pétri nous avonsensemencé à l'extrémité des souches bactériennes sur le milieu KB, nous avons placé un disque de 6 mm de chaquechampignon au centre de milieu de PDA(fig.04),après 24h d'incubation à 28C°.

Dans une autre boîte contenant le milieu KB et PDA nous avons placé le disque de chaque champignon seule sur le milieu de PDA comme témoin, ce test a été réalisé en 4 répétitions, la moitié ont été scellé à l'aide des papiers parafilmset l'autre moitié été laisse sans papiers parafilm. Les observations sont notées après 5 jours d'incubation.

### 3. Analyse statistique

Nous avons réalisé l'analyse statistique de la variance (ANOVA) par logiciel Stat Bocs Végétale selon le Newman-Keuls ( $\alpha=5\%$ ), la mise en évidence de différences significatives concerne l'effet chaque facteur contrôlé f1, les souches bactériennes, f2. Les champignons et leur interaction f1\*f2.

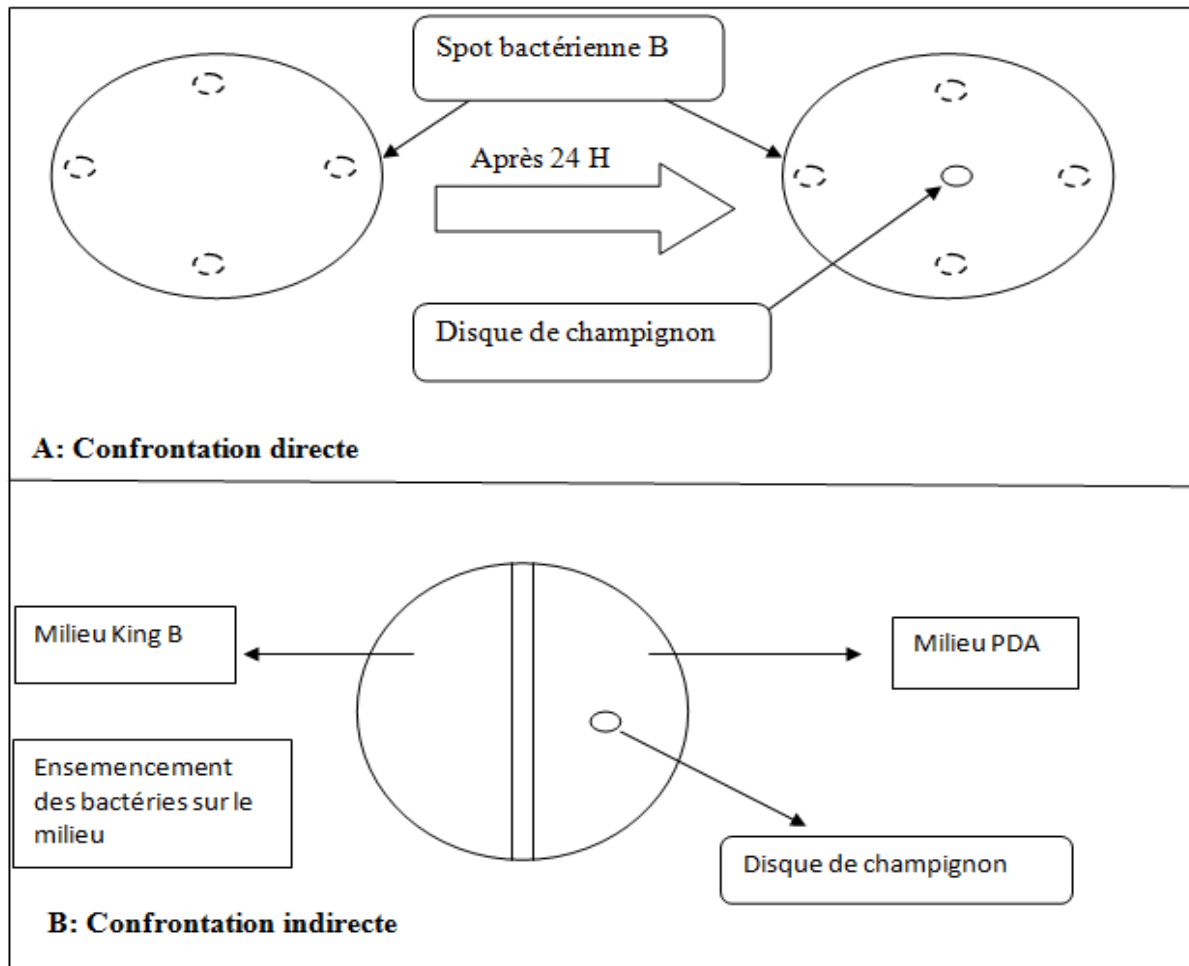


Figure 04: les deux méthodes d'antagonismes *in vitro*.

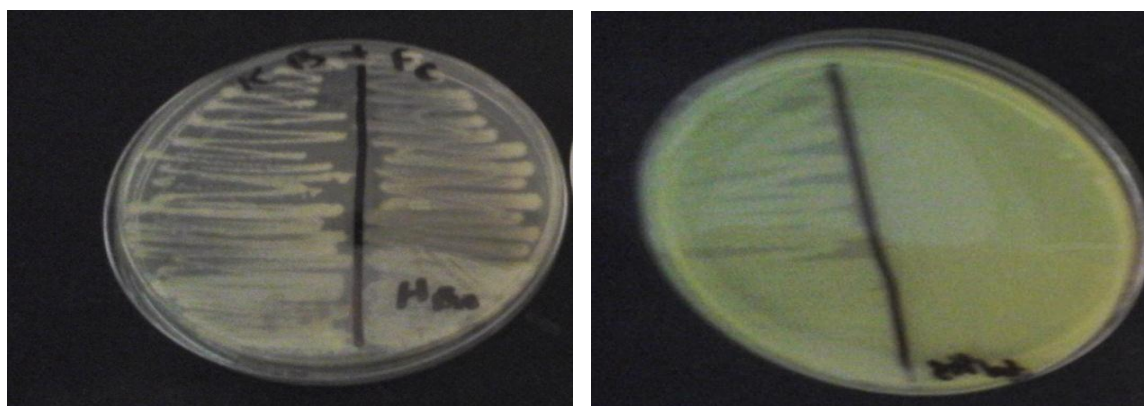
(Source originale 2017)

Dans notre travail, nous avons utilisé des souches bactériennes, appartenant à *Pseudomonas* spp. fluorescentes isolées et identifiées à l'université de Amar Telidji de Laghouat, nous avons vérifié leur pureté sur le milieu KB par l'obtention de souches pures fluorescentes.

### I. Mécanisme d'action des *Pseudomonas* fluorescent

#### 1. Production des sédirophores :

Après l'incubation à 28°C pendant 72h, nous avons remarqué que les 6 souches HB1, P5, AZ3, RS21, P7, et MA8 ont produit des pigments fluorescents sur le milieu KB par contre sur le milieu KB additionné de fer nous n'avons pas observé de pigment confirmant que en absence de fer ces bactéries produisent des sédirophores.



( originale 2017)

**Milieu KB + Fe**

**Milieu KB**

**Fig05:** production du sédirophore par la souche HB1.

Les sidérophores sont synthétisés et sécrétés pour la solubilisation d'ions ferriques par des microorganismes aérobies, tels que les bactéries, certains champignons mais aussi organismes supérieurs (certaines plantes monocotylédones) en réponse à des conditions de carence en fer (Ratledge et Dover, 2000). La fluctuation dans la production de sidérophores constatée chez les souches de *Pseudomonas* serait due à leur exigence en fer (Mazumdar *et al.*, 2007), ou au degré d'affinité du système d'assimilation du fer existant. Ce dernier peut être de faible ou de haute affinité (Page *et al.*, 1982).

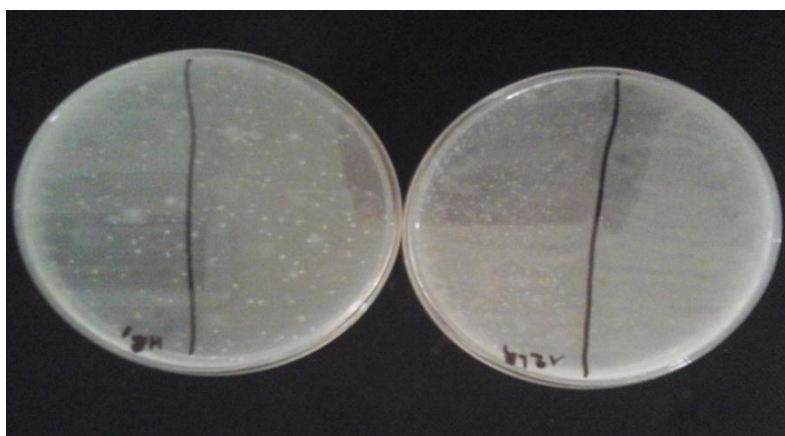
Les *Pseudomonas.spp* fluorescents productrices du sidérophore de couleur jeune verts sur le milieu KB nommés la pyoverdine ont également été utilisés dans le but de les identifier. La dépression de la synthèse de pyoverdine par limitation en fer pourrait expliquer le rôle que jouerait le pigment dans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

Meyer et Abdallah (1978), avaient auparavant rapporté que l'addition de 1mg/l de  $FeCl_3$  réprimait la production de pyoverdines, et que la concentration de celle-ci était inversement proportionnelle à la concentration ferrique du milieu, lorsque la phase exponentielle est achevée et que la phase stationnaire est entamée. La derepression 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, en effet ces pigments peuvent complexer le fer  $Fe^{3+}$  avec une constante d'affinité élevée  $K=10^{32}/M$ . Les pyoverdines produites par les espèces de *Pseudomonas* contiennent deux groupes fonctionnels (Hydroxamate et Catécholates). Il existe d'autres types de sidérophores non fluorescents, et qui jouent un rôle dans la survie des bactéries (Meyer et Hornsperger, 1978; Meyer et Stintzi, 1998).

Meyer et Abdallah (1978) ont rapporté que cette production a aussi été observée chez d'autres souches de *Pseudomonas* fluorescents tel que : *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* et *P. syringae*.

### 2. Fixation de l'Azote :

Dans ce test nous avons testé les 6 souches (PH1 , AZ3, P05, P07,P12 ,RS21) de *Pseudomonas* fluorescents sur un milieu de winogradsky sans azote. Après l'incubation à 24h/ 28°C nous avons observé des colonies bactériennes sur le milieu de culture c'est-à-dire que ces souches sont capables de fixer l'azote.



**Fig 06:**Résultat du test de fixation de l'azote sur le milieu Winogradsky.

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote. La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux (N<sub>2</sub>) inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyenset *al.*, 2010). Quelques bactéries fixatrices d'azote sont libres dans la rhizosphère (e.g. *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Herba spirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonaset* *Xanthobacter*) (Tilak *et al.*, 2005).

certaines populations de *Pseudomonas spp* fluorescents ont la possibilité de dissimiler l'Azote (Gambleet *al.*, 1977 ; Clays-Josserand *et al.*,1995). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982).

### 3. Production de l'AIA :

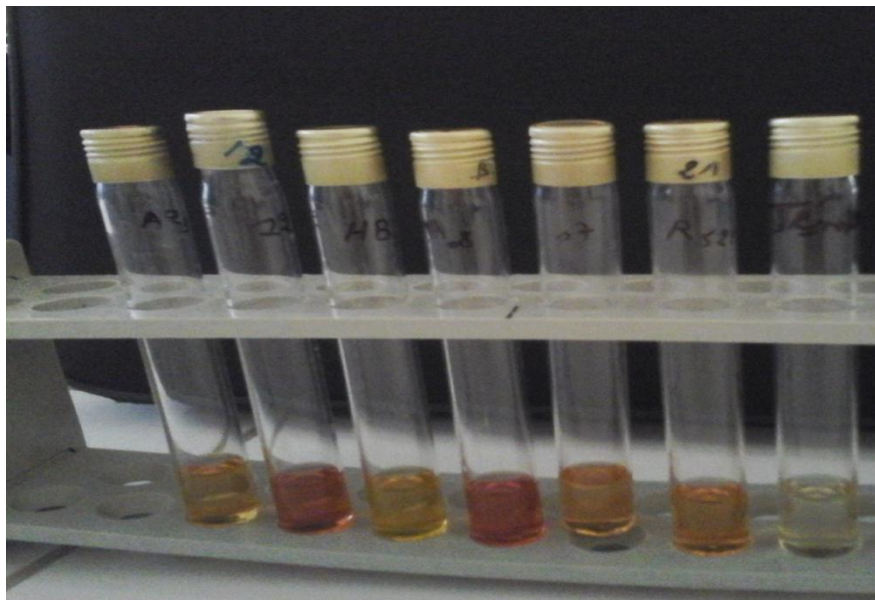
Dans ce test nous avons testé 6 souches bactériennes de *Pseudomonas* fluorescents, les 6 montrent un variation de couleur rose indiqué la présence de l'AIA( Tab. 2)

**Tableau 2** : le résultat de production de l AIA

Souche	Taux (µg/ml)	Couleur
<b>p07</b>	12 ,294	Rose claire
<b>HB1</b>	7,882	Rose très claire
<b>Ma8</b>	51,764	Rose rouge
<b>RS21</b>	13,294	Rose claire
<b>P12</b>	38,823	Rose rouge
<b>Az3</b>	11,117	Rose claire

Nous avons enregistré une production d'AIA pour l'ensemble des souches varié de 7,8 µg/ml jusqu'à 51,7µg/ml.

Les souches RS21,P07, AZ3et HB1 ont enregistré respectivement de taux de 13,294  $\mu\text{g/ml}$  ,12,294 $\mu\text{g/ml}$ , 11,117 $\mu\text{g/ml}$ , 7,882  $\mu\text{g/ml}$  , alors que les souches MA8, p12ont produites taux les plus élevé qui sont respectivement 51,764  $\mu\text{g/ml}$  ;38,823  $\mu\text{g/ml}$ .



**Fig 7 :** les résultats de la production de l'AIA.

Les communautés bactériennes peuvent affecter directement la croissance des plantes par la production de molécules biologiquement actives, telles que les substances de croissance (Glick, 1995). Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables de produire de l'AIA (Sandhyaet al., 2009). La production de cette hormone par *Pseudomonas* est bénéfique pour la croissance et le développement végétal. Elle joue un rôle très important dans la division cellulaire, l'élongation des racines, la prolifération des poils absorbants et dans le mécanisme de tolérance de la plante (Marulandaet al., 2009 in Sandhyaet al., 2010).

La fluctuation de la quantité de l'AIA produite par les souches de *Pseudomonas*, est probablement due à la variabilité génétique entre eux. La production de cette hormone est influencée par les conditions de culture, mais en vivo le stade de croissance et par la disponibilité du substrat dans le milieu. (Mizaet al.,2001 ;Mishraet al.,2010).

#### **4. Solubilisation de Phosphate :**

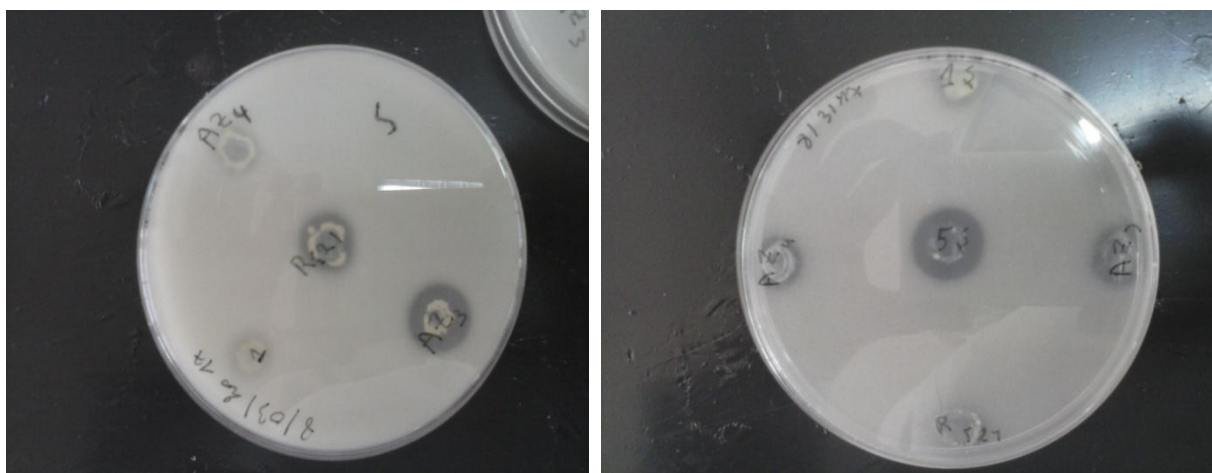
Les Cinq (5) souches de *Pseudomonas* fluorescent ont été testées pour leur capacité desolubiliser le phosphate inorganique sur deux milieux solides NBRIP et PVK contenant le phosphatetricalcique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme seule source de phosphore.

## Résultats & Discussion

Sur le milieu NBRIP quatre souches ont produit une zone claire autour de la colonie traduit une solubilisation de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . (Tab 2) avec un diamètre du halo de 5mm, 8.5mm, 9.3mm, 7.6mm respectivement pour les souches : P01, AZ3, AZ4, RS21 la souche P05 est incapable la solubilité de phosphate, par contre sur le milieu solide PVK les Cinq souches ont produit une zone claire autour de la colonie (tab 3. Fig05). Le diamètre du halo est de 6.9mm, 8.1mm, 10.5mm, 8.9mm, et 11.24mm produit par Les souches P01, AZ3, AZ4, RS21 et P05 respectivement.

**Tableau3** : Diamètre de halo sur le milieu NBRIP et le milieu PVK (en mm).

Souches	NBRIP	PVK
P1	5	6.9
AZ3	8.5	8.1
AZ4	9.3	10.5
RS21	7.6	8.9
P5	0	11.24



A

B

**Fig08**: Colonies de *Pseudomonas* fluorescents avec halo de solubilisation ( A :sur le milieu NPRIB, B :sur le milieu PVK ).

Le phosphore, est le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote. Et même dans des sols qui en sont riches, le phosphore se trouve sous une forme insoluble: oxydes de fer et d'aluminium dans les sols acides, et oxydes de calcium dans les sols basiques, et seulement une faible proportion (0.1%) est assimilable par les plantes (Stevenson et Cole, 1999). En plus les  $\frac{3}{4}$  du phosphore apporté par les fertilisants appliqués au sol précipitent en des formes insolubles, augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément (Goldstein, 1986).

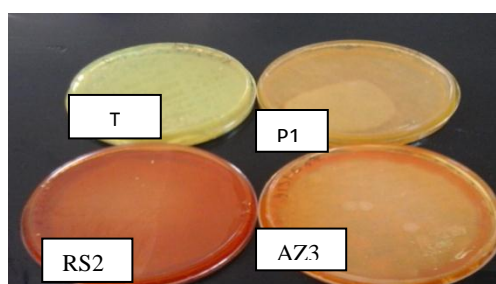
Les bactéries solubilisant le phosphore secrètent des acides organiques et des phosphatases, qui convertissent les formes insolubles de phosphates en ions de phosphate soluble monobasique ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) et dibasique ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Ce phénomène est attribué à la solubilisation minérale du phosphate (Mezaache, 2012).

### 5. production d'acide cyanhydrique l'HCN :

Le résultat du test de production de l'HCN nous ont permis de sélectionner quatre souches (BH1, AZ3, RS21, P12, P05) capable de produire l'HCN. La production est faible chez P12, P07, AZ3, tandis qu'elle est forte chez RS21, HB1, Ces derniers rassemblent les plus performantes en production de HCN, en virant la couleur du papier filtre vers l'orangée foncée ou marron (Fig 4). Mais la souche P07 n'est incapable de le synthétiser.

**Tableau 4** : le résultat de la production de l'HCN

Souches	RS21	HB1	P12	P05	AZ3	P07
Productions de l'HCN	+++	+++	+	++	++	-



( Origine 2017)

**Figure 09** : Résultat de test de HCN

L'absence de production chez la souche P07 peut être due à la perte des gènes responsable de la biosynthèse. La production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression de différents d'agents pathogènes. La production de l'HCN classé parmi les plus efficaces dans le biocontrôle des champignons photopathogènes telluriques. Il agit directement sur les cellules en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire. Il contribue également à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci (Blumer et Haas, 2000 ; Ramette *et al.*, 2003 ; Ahmed *et al.*, 2008).

### 6. Production des antibiotiques

Pour les résultats de la production des antibiotiques par (8) souches bactériennes (AZ3, AZ4, P 07, P05, RS21, BH1, P12, P01) seul 4 souches AZ4, P01, MH8, P12 ont donné un effet antibiotique contre FOL avec des zones d'inhibitions 11,30 ; 11,02 ; 10,14 ; 9,2 mm respectivement.

Les souches *Pseudomonas fluorescens* produits des antibiotiques et jouent un rôle important dans l'inhibition d'agent phytopathogènes telle que phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) (Haas et Défago, 2005).

### II. Résultats de l'antagonisme *in vitro*

Les résultats de l'antagonisme de huit (8) souches bactériennes (AZ3, AZ4, P 07, P05, RS21, BH1, P12, P01) vis-à-vis de deux espèces de champignon phytopatogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* par deux méthodes de confrontation direct et indirect.

Après 5 jours d'incubation nous avons calculé le taux d'incubation des champignons par l'utilisation de la formule déjà cité en matériel et méthodes (cf :III).

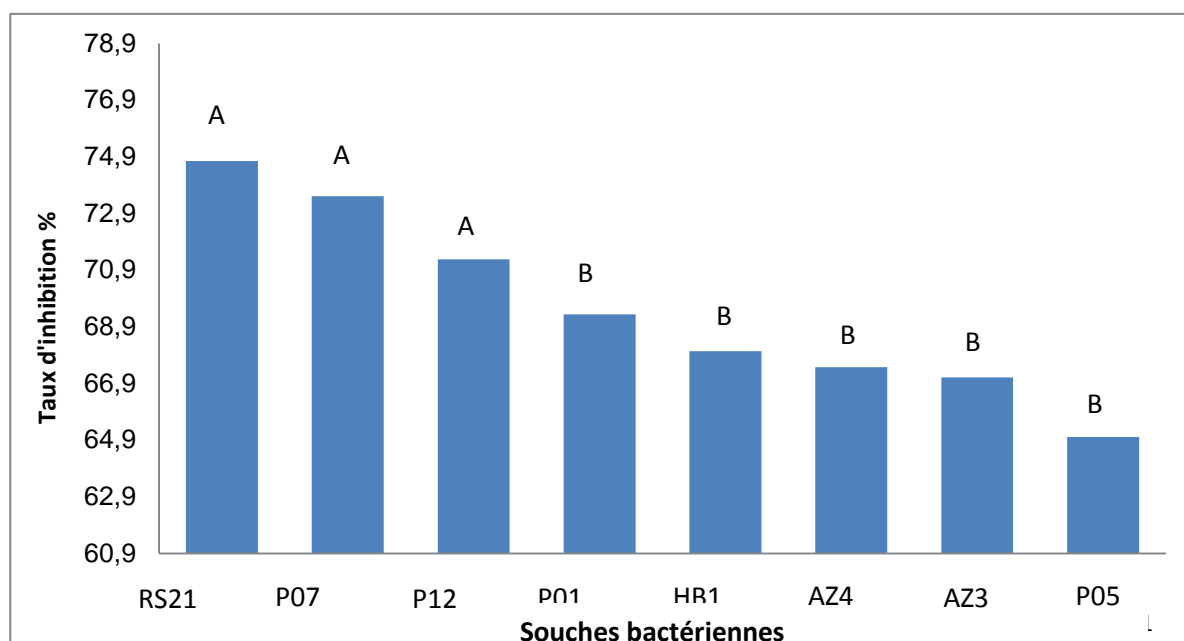
Pour cet essai, nous avons réalisé la discussion de effet direct et indirect étudié en parallèle.

#### 1. Confrontation directe

L'analyse de la variance montre que les facteurs étudiés les souches bactériennes, les champignons ont des résultats hautement significatif avec une probabilité (0,000), par contre leur interaction est non significative.

Pour facteur souches bactérienne nous avons remarqué que les meilleur taux d'inhibition ont été obtenu par les souches RS21 et P07 et P12 avec de taux 74,74% et 73,50% et 71,28% respectivement et sont classé dans le groupe homogène (A) et les autres souches : P01, HB1,

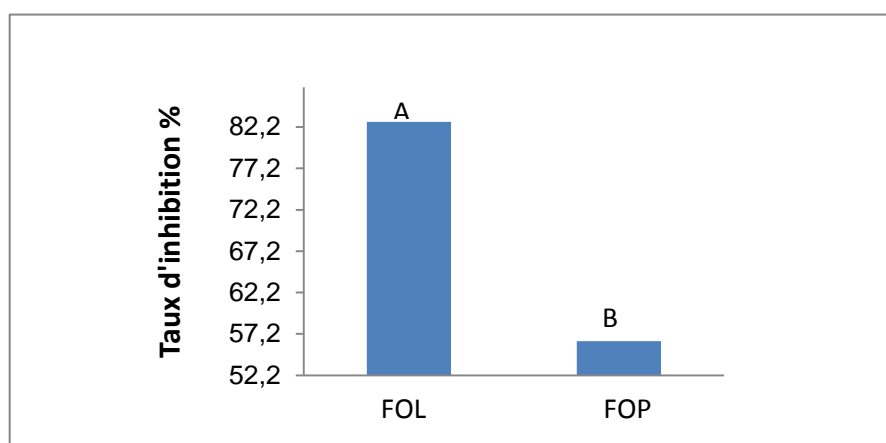
AZ4, AZ3, P05 sont classé dans le groupe homogène (B) avec un taux d'inhibition qui varie entre 68,04 % et 65,01%. (Fig .10).



A et B : Groupe homogène

**Fig10** : taux d'inhibition des bactéries.

Pour le facteur champignons, nous avons remarqué que l'isolat fongique qui a été le plus sensible aux effets de bactéries testé est le *Fusariumoxysporum f. sp. lycopersici*(FOL) avec un taux de ( 82,81%), et classé dans le groupe homogène (A), par contre l'isolat fongique *Fusariumoxysporumf.sp.pisi*(FOP) plus résistant avec un taux de 56,31% qui le classe en groupe homogène (B). (Fig.11).



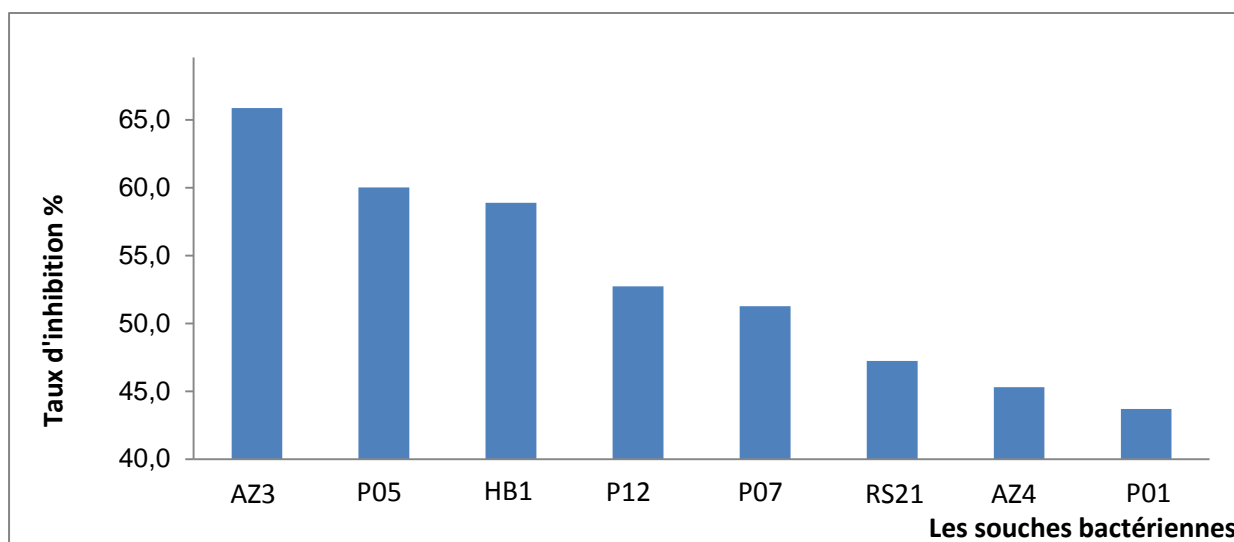
FOP: *Fusariumoxysporumf.sp.pisi* ,

FOL: *Fusariumoxysporum f. sp. lycopersici*.

**Figure 11** : Le taux d'inhibition des champignons.

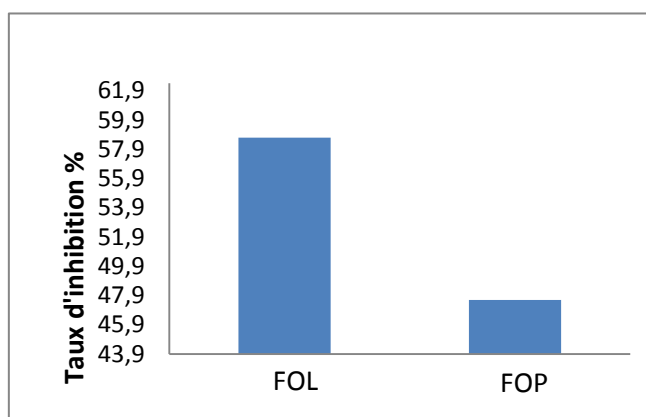
### 2. Confrontation indirect

Selon les résultats de la confrontation indirect entre les bactéries et les champignons nous avons constaté que la variance à une différence non significative avec une probabilité de 0.56075, nous avons enregistré pour l'ensemble des souches des taux qui varié entre 65.88% et 43.71%. (Fig.12).



**Figure 12:** le taux d'inhibition par les bactéries

Pour le facteur champignon nous avons remarqué que les résultats sont non significatifs avec des probabilités 0.99. (Fig.12), et l'effet des bactéries est le même sur les deux champignons avec des taux de 58, 58 et 68% pour le *Fusariumoxysporum f. sp. lycopersici*(FOL) et de 47,59% pour le *Fusariumoxysporumf.sp.pisi*(FOP) ( fig .13 ).



FOP: *Fusariumoxysporumf.sp.pisi* ,

FOL: *Fusariumoxysporum f. sp. lycopersici*.

**Figure13 :** Le taux d'inhibition des champignons

### 3. Discussion

Toutes nos souches ont montré un pouvoir antagoniste, vis-à-vis de phytopathogènes fongiques. Ces souches ont producteurs de métabolites secondaires (sidérophores, HCN, AIA, compétition pour les nutriments et d'autres composés antimicrobiens et d'autre produits).

Le test d'antagonisme permettre de sélectionné des souches capable d'être utilisé comme des agents de lutte biologique, nous avons testé huit (8) souches bactériennes contre deux champignon le *Fusariumoxysporum f. sp. lycopersici* et *Fusariumoxysporumf. sp.pisi* par de méthode de confrontation une direct et l'autre indirect, pour la confrontation direct la réduction de fer disponible pour les phytopathogènes présents dans la rhizosphère (Scher et Baker, 1982), la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante. Les *Pseudomonas* produisent notamment, de nombreux métabolites antifongiques (Weller *et al.*, 2002, 2007). En effet, la plupart des *Pseudomonas* produisent des antifongiques tels que des phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) qui sont les antifongiques les plus fréquemment détectés (Haas et Défago, 2005). Nous avons constaté que la souche RS21 et AZ3 et P12 possédé la capacité inhibitrice de la croissance mycélienne contre les deux champignons testé comparant avec les autres. Cela peut être expliqué par la variabilité de leur métabolite secondaire, que ce soit pour les bactéries et les champignons.

Ces bactéries sont capable d'induire une résistance systémique contre un pathogène donné, et porte le nom d'ISR (van Loon *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2001).

Pour la confrontation indirect la production des produits volatile telle que HCN est la plus visé, nos bactéries ont le même effet sur les deux champignons testé malgré que les résultats de production de l'HCN ont montré une production élevés par les souches : RS21, AZ3 et P12 et la P07 est incapable de produire cet acide, donc soit que dans les conditions de cet essai la P07 a produit de l'HCN, ou il y a un autre mécanisme analogue qui a pu intervenir.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé des souches bactériennes isolées dans la wilaya de Laghouat à l'université de Amar Teliidji, à partir de la rhizosphère de certaines plantes spontanées.

Pour étudier l'action de *Pseudomonas spp. fluorescents* nous avons testé certains mécanismes tels que la production des sédirophores, la solubilisation des phosphates, la fixation d'azote, la production de AIA, la production de HCN et l'activité d'antagonisme).

Ces souches ont des propriétés promotrices de la croissance végétale telles que : la capacité de solubiliser le phosphate inorganique, d'inhiber la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes et de produire l'acide cyanhydrique (HCN).

Nous avons montré dans cette étude les potentialités de production de métabolites secondaires chez des souches de *Pseudomonas spp. fluorescents*. Toutes les souches ont synthétisé les sidérophores, la production de ces métabolites est dépendante de la composition des milieux de culture.

La capacité de solubilisation des phosphates est retrouvée chez toutes les souches et pour la fixation d'azote, toutes les souches sont fixatrices d'azote.

Quant à la production de l'AIA, toutes les souches de *Pseudomonas* testées sont productrices. Avec des taux élevés enregistrés chez MA8 (51,76 µg/ml), P12 (38,82 µg/ml) et faibles chez les autres.

Pour la production de l'HCN. Toutes les souches bactériennes ont produit l'HCN (BH1, AZ3, RS21, p12, p05) sauf la souche P07. L'effet d'antibiotique n'a été observé que contre FOL (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*) par les souches AZ4, P12, MH8, P01.

Les souches de *Pseudomonas spp. fluorescents* ont montré une activité antagoniste appréciable, *in vitro*, sur la croissance des formes spéciales de deux champignons de *Fusarium oxysporum*. Les résultats d'antagonisme obtenus sur la confrontation directe sont significatifs par rapport à ceux obtenus sur la confrontation indirecte.

Pour la confrontation directe nous avons constaté que les souches RS12 et AZ3 et P12 possèdent la meilleure capacité inhibitrice de la croissance mycélienne contre les deux champignons par ce test. Nous avons mis en évidence l'effet des antibiotiques, des sédirophores et la compétition pour l'espace et les nutriments, par rapport à la confrontation indirecte où la

production des produit volatile telque HCN est la plus visé, les bactéries ont même effet sur les deux champignons testés.

À la fin de ces essais nous suggérons :

- quantifie la production de sédirophores et la solubilisation des phosphores.
- Pour l'antagonisme recherché les mécanismes d'antibiotique impliqué.
- Pour la souche P12 faire des essais de biocontrôle et de biostimulation

## Références bibliographiques

---

- **Abbas-Zadeh, P., N. Saleh-Rastin, H. Asadi-Rahmani, K. Khavazi, A. Soltani, A.R. Shoary-Nejati, et M. Miransari. 2010.** Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta. Physiol. Plant.* 32: 281-282.
- **Abu-Zarga M., Sabri.,Al-Boudi A., Ajaz S., Sultana N., Rhman A-U.(1995).**New cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus totus*. *Journal of natural products*, **56**:504-511.
- **Alyafi J.(1979).** *Approche Systematique et ecologique du genre Pistacia L.* DONS LA REGION MEDITERRANENNE . These Doct .es science . Univ. Aix Marseille III.
- **Ardnt S.K., Clifford S.C. and Popp M. (2001).** Ziziphus- a multipurpose fruit tree for aridregions. In: sustainable land-use in deserts. Breckle S.W., veste M. AND Wuchere W.,springer. Heideiberg, Stuttgart, Naw York, 388-399.
- **Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-181.
- **Baba Aaiss F (2000).** Encyclopedie des planets utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ed : EDAS .217P.
- **Bakker, A.W., et B. Schippers. 1987.** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth-stimulation. *Soil. Biol. Biochem.* 19: 451-457.
- **Bakker.P.A.H.M., Shippers, B and Weisbeek, P.J., 1988:** Sidephore production by plant growth promoting *Pseudomonas* .spp. *J. Plant Nuir* : 11:925-933.
- **Bangera K.G. and Thomashow L.S. (1996).** Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antipiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *MOL. Pant Micropbe Interact.* 9:83-90.
- **Bano N. and Musarrat J., 2003.** Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Cur. Microbiol.* 46: 324-328.
- **Bangera K.G. and Thomashow L.S(1999)** Identifikation and Characterization of a gene cluster for senthesis of the polyketid antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Psudomonas fluorescens* Q2687 . *J .Bacteriol.* 181:3155-3163.
- **Barazani, O. and Friedman, J., 1999.** Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J. Chem. Ecol.* 25:2397-2406.
- **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.

## Références bibliographiques

---

- **Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg. B.J.J., 2003.** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*. 157:503–523.
- **Digat, B. and Gardan, L., 1987.** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP*. 17: 559-568.
- **Dubuis, C. and Haas, D., 2007.** Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 650-654.
- **Dommergues, Y., Mangenot, F., 1970.** Ecologie microbienne du sol. Paris.masson, 76p.
- **Garbaye, J., 1991.** Helper bacteria: a new dimension to the myccorhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210.
- **Garcia de Salmone, I. E., Hynes, R. K. and Nelson, L., 2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47: 404-411.
- **Glick, B.R. 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- **Haas, D. and Keel, C., 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:117–153.
- **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.
- **Khalid, A., M. Arshad, et Z. A. Zahir. 2004.** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473-480.
- **Kim, K.Y., D. Jordan, et G. A. McDonald. 1998.** Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil Soils.* 26: 79-87.
- **Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N., 1980a.** Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885–886.
- **Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth., M.N., 1980b.** *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4: 317–320.

## Références bibliographiques

---

- **Knowles, C. J. and Bunch, A. W., 1982.** Denitrification. *Microbiol. Rev* 46.p 43-70.
- **Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C., 1966.** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470–489.
- **Lemanceau, P., 1992.** Beneficial effects of rhizobacteria on plants : exemple of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 12: 413-437.
- **Lemanceau, P., Offre, P., Mougel, C., Gamalero, E., Dessaux, Y., Moenne-Loccoz, Y. and Berta, G., 2006.** Microbial ecology of the rhizosphere. In: *Microbiological methods for assessing soil quality*. Bloem, J., Hopkins, D.W. et Benedetti, A. (eds). CABI publishing, Massachusetts, Cambridge, MA, Etats-Unis, pp. 228-230.
- **Lucas, P., Sarniguet, A., Collet.J.M.1989.** Réceptivité des sols au piétin-échaudage ( *Gaeumannomycesgraminis* var,*tritici* ) : influence de certains techniques culturales . *Soil Biol Biochem* 27 , P : 1073-1078.
- **Marulanda, A., J.M. Barea, R. Azoen. 2009.** Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *J. Plant growth regul.* Doi : 10.1007/s00344-009-9079-6 .
- **Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S., 2001.** Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35–43.
- **Mazumdar, T., C. Goswami., et N.C. Talukdar. 2007.** Characterisation and screening of beneficial bacteria obtained on King’s B agar from tea rhizospher. *Indian. J. Biotechnol.* 6: 490- 494.
- **Meyer, J.M. and Abdallah, M.A., 1978.** The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- **Meyer, J.M. and Hornsperger, J.M., 1978.** Role of pyoverdine, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport. *J. Gen. Microbiol.* 107: 329-331.
- **Meyer, J.M., Hohnadel, D., Khan, A. and Cornelis, P., 1990.** Pyoverdin-facilitated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: immunological characterization of the ferripyoverdin receptor. *Mol. Microbiol.* 4(8): 1401-1405.

## Références bibliographiques

---

- Meyer, J.M., Gruffaz, C., Tulkki, T. and Izard, D., 2007. Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2543–2556.
- Mezaache, S.2012. Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches des *Pseudomonas* isolées de la Rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de Doctorat .Université de Ferhat Abbas .Sétif.
- Misaghi, I. and Grogan, R. G., 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* 59: 1436-1450.
- Mishra, M., U. Kumar, P.K. Mishra, et V. Prakas. 2010. Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria for the enhancement of *Cicer arietinum* L. growth and germination. *Adv. Bacterial. Research.* 4: 92-96.
- Miza, M.S., W, Ahmed, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, et K.A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization and effect of plant growth promoting bacteria on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant soil.* 237: 47-54 .
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilization microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265-270 .
- Page, W.J. et M. Von tigeewtrom.1982. Iron- and molybdenum-repressible outer membrane proteins in competent *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 151: 273-242 .
- Palleroni, N.J., 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- Palleroni, N.J., 1992. Present situation of the taxonomy of the aerobic *Pseudomonas*. In: Galli, E., Silver, S., Wiltholt, B. (Eds.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 105–1105.
- 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.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. *Can. J. Microbiol.* 48: 635-642.
- Perrier, T.2004. Etude théorique et expérimentale du comportement biogéochimique de l'américium-241 en conditions rhizosphériques simplifiées. Application dans un sol agricole calcaire. Thèse de Doctorat. université Henri Poincare Nancy.1.337 p.

## Références bibliographiques

---

- **Pierson, L.S.III. et Pierson, E. A., 2010.** Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:1659–1670.
- **Ramette, A., M. Frapolli, G. Defago, et Y. Moenne-Loccoz. 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol Plant Microbe Interact.* 16: 525-535
- **Ratledge, C. and Dover, L.G., 2000.** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu.Rev. Microbiol.* 54: 881–941.
- **Richardson, A.E., 2001.** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants *Aus. J. Plant Physiol.* 28(9): 897–906.
- **Salisbury, F.B., 1994.** The Role of Plant Hormones. In: *Plant-Environment Interactions*. Wilkinson, R.E. (ed.). Marcel Dekker, New York, USA., pp. 39-81.
- **Sandhya, V., S.K.Z. Ali, M. Grover, G. Reddy, et B. Venkateswarlu. 2009.** Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol. Fertil. Soils.* 46: 17-26 **108**.
- **Sandhya, V., S.K.Z. Ali, B. Venkateswarlu, G. Reddy, et M. Grover. 2010.** Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Arch. Microbiol.* 192: 867-876. Sands, D.C. and Rovira, A.D., 1971. Fluorescent Pseudomonads a Residual Component in the Soil Microflora? *J. Appl. Microbiol.* 34(1): 253–259.
- **Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M., 1966.** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271
- **Whippes, J. 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot.* 52: 487-511

### Annexe 1 : Les milieux de cultures utilisés

#### 1.Milieu de King B :

Agar	20g
Peptone	20g
Glycérol	15g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydre)	1,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5g
Eau distillée	1000 ml

#### 2.Milieu de PDA :

Saccharose	20g
Agar	15g
Pommes de terre	200g

#### 3.Milieu de BNRIP :

Glucose	10 g	
Ca 3(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		5 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5 g	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g	
KCl	0,2 g	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,1 g
Agar agar	15g	
Eau distillée	1000 ml	

#### 4.Milieu de PVK :

Glucose	10 g	
Ca 3(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,5g
NaCl	0,2 g	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g	
KCl	0,2 g	
Extrat de levure		0,5g

FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,002 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,002 g
Agar agar	15g

### 5.Milieu de l'HCN:

TSA à 4,4 g de glycine

### 6.Milieu pour la production de l'AIA :

Tryptophane	0,30g
-------------	-------

Milieu de LB :

-	Extrat de levure	10g
-	Nacl	5g
-		10g
-		

### 7. milieu de winogradsky

Solution mère

KH <sub>3</sub> PO <sub>2</sub>	25g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	12,5g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5g
NaSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5g
Nacl	12,5g
L'eau déstillé	500ml
Solution mère	2,5ml
D-Glucose	0,5g
CaCo <sub>3</sub>	0,1g
Agar agar	7,5g
Eau distillé	500g

