



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



Université Amar Telidji- Laghouat

FACULTE: SCIENCES

DEPARTEMENT: SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par Bellakhdar Mebarka

DOMAINE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE DES SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION: PROTECTION DES VEGETAUX

Thème

**Effet bénéfique de *Pseudomonas* spp fluorescents de la
rhizosphère du Pistachier et Djujbier de deux dayas de wilaya de
Laghouat**

Jury de soutenance:

Mr. Rahmani Mokhtar

M^{me}.Touati Sihame.

M^{lle}.Ameur Djamila

Président

Examineur

Encadreur

Promotion: Juin 2018

Remerciement

LA RÉALISATION DE CE MÉMOIRE A ÉTÉ POSSIBLE GRÂCE AU CONCOURS DE
PLUSIEURS

PERSONNES À QUI NOUS VOUDRONS TÉMOIGNER TOUTES NOS RECONNAISSANCES.
TOUT

D'ABORD NOUS ADRESSONS NOS GRANDS REMERCIEMENTS À VOUS DIEU LE TOUT
PUISSANT QUI NOUS A GUIDÉS ET NOUS A DONNÉ LA SANTÉ, LA FORCE, LE
COURAGE ET

LA PATIENCE POUR MENER À BIEN CE TRAVAIL.

NOUS TIENDRONS À REMERCIER NOTRE ENCADREUR AMEUR DJAMILA
RESPONSABLE DE

CETTE ÉTUDE, POUR SES CONSEILS FRÉQUENTS ET AVISÉS. SON ESPRIT DE
SYNTHÈSE ET

SON ÉRUDITION RESTENT POUR NOUS UN EXEMPLE À SUIVRE.

UN GRAND MERCI POUR TOUS LES ENSEIGNANTS DE DÉPARTEMENT DES SCIENCES
AGRONOMIQUES ET BIOLOGIQUES

NOUS ADRESSONS NOS SINCÈRES REMERCIEMENTS À LA FAMILLE SPÉCIALEMENT
MA

COUSINE ROKAIA, À LES AMIS QUI NOUS SUPPORTÉS DURANT CETTE PÉRIODES ET
POUR

TOUTE PERSONNE NOUS A AIDÉS À RÉDIGER CE MÉMOIRE DE PRÈS OU DE LOIN

DEDICACE

JE VOUDRAIS EXPOSER MON TRAVAIL À MES CHERS PARENTS.

LE PARADIS EST SOUS LES PIEDS D'UNE MÈRE SON AFFECTION ET SA TENDRESSE
ME COMBLE SANS LIMITE ELLE EST LA MEILLEUR CHOSE DURANT MON EXISTENCE
À LA QUELLE JE M'INTÉRESSE « MA MÈRE » QUE DIEU FASSE QU'ELLE SOIT
PROTÉGÉE ET QUELLE EST UNE LONGUE VIE.

À CE LUI QUI M'AS TOUTE APPRIS ET SAUF GARDÉ, IL M'A DONNÉ UN AVENIR ET
UNE RÉUSSITE IL S'EST DONNÉ CORPS ET ÂME POUR QUE JE PUISSE AVOIR UNE
ÉDUCATION EXEMPLAIRE QUI ME PERMET D'AVOIR UNE VALEUR POUR MON
TRAVAIL « MON CHÈRE PÈRE TAHAR » QUE DIEU LUI DONNE UNE LONGUE VIE.

L'EXISTENCE DE MES FRÈRES ET MES SŒURS ME SUFFIT POUR VIVRE ET TOUTE CE
QUI M'EST

TOURE QUI EST : SOUAD, WASSILA, BASSMALA, AHMED ET MOHAMMED.

À TOUTE MA FAMILLE BELLAKHDAR ET CHEMANI PETIT ET GRAND SON
EXCEPTION.

À TOUT CELLE QU'ELLES M'ON OFFERT LEURS AMITIÉS JE LES CONSIDÈRE COMME
DES SŒURS :

NOUR EL IMANE, SAIDIA, HADJER, MANEL MA SŒUR QUE MA MÈRE N'A PAS MIS
AU MONDE AMINA .

À CELLE ON À CE LUI QUI À PU M'AIDER ON QUEL QUE SOIT LA FAÇON DONT QU'IL
M'A AIDÉ QUE CE SOIT PAR ÉCRIT OU PAR ORALE OU AVEC UN SOURIRE OU UNE
PAROLE.

À TOUS MES CAMARADES DE PROMO 2018.

Bellakhdar Mbarka

Résumé	
Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
Introduction	4
I.1 Diversité taxonomique des PGPR	4
I.2. la rhizosphère promotrices de la croissance des plantes	5
I.3 <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents	5
1.4 Effet directe de <i>Pseudomonas</i>	6
I.4. 1 Stimulation de la croissance des plantes	6
a- Solubilisation des phosphates	6
b- synthèse de la phytohormone	6
c- Dénitrification	7
d- Sidérophore	7
I.4.2 Stimulation de la germination	8
Stimulation des interactions entre la microflore symbiotique et la plante	
I.4.3 hôte	8
I.45 Effet indirecte de pseudomonas	9
5.1 II.4. 1-Protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique	
5.2 compétition pour l'espace et les nutriments	10
5.3 Antibiose	10
5.4 les antibiotiques	10
a- le 2,4-diacetylpholorophloglucinol (DAPG)	10
b- Les phénazines (PHZ)	11
c- Pyrolnitrine (PRN)	11
d- pyolutéorine (PLT)	11
e- Cyanure d'hydrogène (HCN)	12
f- les Orfamides A	12
5.5 Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Reistence)	12

6	Les enzymes	13
Chapitre II : Matériel et méthodes		
I.	Matériel biologiques	15
I.1.	Souches bactériennes	15
a-	Souche antagonistes	15
b-	souches de référence cible	16
c-	souches fongique cible	16
II	Réactivation des souches bactériennes et fongiques	16
III	métabolites secondaire à effet biocontrolé	17
III.1.	la production des sidérophores	17
III.2.	la production de l'HCN	17
III.3.	Production d'antibiotique (Phénazine)	17
2.3.1	Extraction d'antibiotique	17
III.3.2	Test d'activité par antibiotiques	18
III.3.2.1	Préparation de la suspension bactérienne	18
III.3.2.2	antibiogramme	
III.	Effet antagonistes des souches de <i>P. spp.</i> fluorescents:	20
III. 1.	Effet sur la croissance mycélienne	20
2.4.1.	La confrontation directe	20
2.4.1.	III.1.2. Antagonisme par confrontation indirecte	21
2.4.2.	Effet sur la sporulation des champignons	22
2.4.3.	Effet sur la germination des spores	22
5	Analyse statistique	23
Chapitre III : Résultats et Discussion		
1.	Production des sidérophores	25
2.	Production de l'HCN	26
3.	Test d'antibiogramme	27
4.	Effet sur la croissance mycélienne	30
4.1.	Par confrontation directe	30
4.2.	Par confrontation indirecte	32
5.	Effet sur la sporulation des champignons	34

6.	Effet sur la germination des spores	35
	Discussion	45
	Conclusion perspective	47
	Références bibliographiques	
	Annexe	

Tableau 1.	souches antagoniste de <i>pseudomonas</i> spp.fluoresents.	9
Tableau 2.	souches des bactéries cible	16
Tableau 3.	souches des champignons testées	16
Tableau 4.	Résultat de la production de sidérophores par les <i>pseudomonas</i> spp.fluoresents.	25
Tableau 5.	Résultats de production de l'HCN par les <i>pseudomonas</i> spp.fluoresents.	26
Tableau 6.	Résultats d'antibiographie contre les souches bactériennes	28
Tableau 7.	Résultats d'antibiographie contre les souches fongiques	29
Tableau 8.	Inhibition obtenue par la méthode de confrontation directe	31
Tableau 9.	Inhibition obtenue par la méthode de confrontation indirecte	33
Tableau 10.	Résultat de sporulation des souches de <i>Fusarium</i>	34
Tableau 11.	Taux d'inhibition de germination des spores des pathogène dans milieu de culture	36

Figure 1.	Protocole expérimental utilisé pour l'extraction des antibiotiques	19
Figure 2.	Confrontation directe entre le champignon et <i>pseudomonans</i> spp. fluorescents	21
Figure 3.	Confrontation indirecte entre le champignon et <i>pseudomonans</i> spp. fluorescents	22
Figure 4.	Résultats de la production des sidérophores	26
Figure 5.	Résultats de la production de l'HCN	27
Figure 6.	L'antibiographie contre les souches bactériennes	29
Figure 7.	Résultats du facteur antibiotiques des souches bactériennes	30
Figure 8.	L'antibiographie contre les souches fongique	31
Figure 9.	Confrontation indirecte entre les souches de <i>pseudomonas</i> spp. fluorescents et F.T ₇	32
Figure 10.	Observation macroscopiques de test de sporulation de <i>Fusarium T₇</i>	35
Figure 11.	Observation microscopiques de test de sporulation de <i>Fusarium T₇</i>	
Figure 12.	Résultat du facteur de temps sur la germination des spores de <i>Fusarium culmorum T₇</i>	37
Figure 13.	Résultats de l'observation microscopique de la germination des spores de <i>Fusarium BTCR</i>	38

ANOVA : ANALYSE OF VARIANCE

HCN : Acide cyanhydrique

ISR : Résistance systémique induite

KB: milieu King B

MH : Milieu Mueller Hinton

PDA: Potato dextrose agar

PGPR: plant growth promoting rhizobacteria

SAR : Résistance systémique acquise

TSA : Milieu Tryptone Soja Agar

Résumé

La concurrence au niveau de rhizosphère entre les agents pathogènes et ceux de la lutte biologique est potentiellement importante, des rhizobactéries comme les *Pseudomonas spp.* fluorescents sont capables de synthétiser plusieurs métabolites secondaires reconnus pour leur rôle dans le biocontrôle, ou dans la phytostimulation. Par le présent travail, nous visons à étudier l'effet des certaines souches de *Pseudomonas spp. fluorescents*, isolées de plantes spontanées de la région de Laghouat (Algérie), contre le *Fusarium culmorum*, pour cela nous avons mis en évidence certain de leurs métabolites secondaires : les sidérophore, l'HCN, les antibiotiques (phénazine), ainsi que l'effet antagoniste de ces souches vis-à-vis de *Fusarium culmorum* sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores.

L'effet de l'activité antagoniste des souches *Pseudomonas spp* fluorescent contre les deux souches du *Fusarium culmorum* BPCR et T₇ en question, a été étudié selon deux méthodes, confrontation directe et indirecte. Les résultats de la confrontation directe montrent un taux d'inhibition varie de 69% à 88% selon les souches pathogènes testées, alors que les résultats de la confrontation à distance montre des forts taux d'inhibition de 83.15 %. L'étude de la sporulation de *Fusarium culmorum* soumis à l'effet antagoniste des souches bactérienne monte qu'il n'est a pas de sporulation des souches fongiques testé. Les résultats de la germination des spores de *Fusarium culmorum* ont montré que les meilleures valeurs enregistrées en absence des souches antagonistes. Dans certain interactions, le taux d'inhibition atteint les 100% , tel est le cas avec les souches R₀₂

L'élimination des pathogènes est liée aux métabolites secrétés par nos souches bactérienne telles que la production de l'acide du cyanure d'hydrogène (HCN), des sidérophores , le phénazine.

Mots clé : PGPR, *Pseudomonas spp* fluorescents, *Fusarium culmorum*, métabolites secondaires

summary

Rhizosphere competition between pathogens and biological control is potentially important, rhizobacteria such as *Pseudomonas spp.* fluorescents are able to synthesize several secondary metabolites recognized for their role in biocontrol, or phytostimulation. By the urgent work, we aim to study the effect of certain strains of *Pseudomonas spp.* fluorescents, isolated from spontaneous plants from the region of Laghouat (Algeria), against *Fusarium culmorum*, for this we have highlighted some of their secondary metabolites: siderophore, HCN, antibiotics (phenazine), as well as antagonistic effect of these strains on *Fusarium culmorum* on mycelial growth, sporulation and spore germination.

The effect of the antagonist activity of fluorescent *Pseudomonas spp.* Strains against the two strains of *Fusarium culmorum* BPCR and T₇ in question was studied according to two methods, direct and indirect confrontation. The results of the direct confrontation show an inhibition rate varies from 69% to 88% according to the pathogenic strains tested, while the results of the remote confrontation show high inhibition rates of 83.15%. The study of the sporulation of *Fusarium culmorum* subjected to the antagonistic effect of bacterial strains rises that there is no sporulation of the fungal strains tested. The results of germination of spores of *Fusarium culmorum* showed that the best values recorded in absence of antagonistic strains. In certain interactions, the inhibition rate is 100%, this is the case with R₀₂ strains.

The elimination of pathogens is linked to metabolites secreted by our bacterial strains such as the production of hydrogen cyanide acid (HCN), siderophores, phenazine.

Key words: PGPR, *Pseudomonas spp* fluorescents, *Fusarium culmorum*, secondary metabolites

ملخص

من المحتمل ان يكون التنافس بين الجراثيم و المكافحة البيولوجية من العوامل المهمة , يمكن للبكتيريا الجذرية مثل البسودوموناس الفلورسنت توليف العديد من المستقبلات الثانوية المعترف بها لدورها في المكافحة البيولوجية او التحفيز النباتي

من خلال هذا العمل ' نهدف الى دراسة تاثير بعض سلالات البسودوموناس spp الفلورسنت , المعزولة من النباتات العفوية من منطقة الاغواط (الجزائر) , ضد فطر الفيوزاريوم HCN, siderophore, المضادات الحيوية (phenazine) , وكذلك التأثير العدائي من هذه السلالات على نمو الفطر التبوغ و انبات الأبوغ

تمت دراسة تأثير النشاط المضاد لسمات البسودوموناس spp ضد سلالاتي الفيوزاريوم كولموروم BTCR و T7 طبقا لطريقتين المواجهة المباشرة و غير المباشرة , وتظهر نتائج المباشرة ان معدل التنشيط يختلف من 69 % الى 88% حسب السلالات المسببة للأمراض المختبرة بينما تظهر نتائج المواجهة النائية معدلات تثبيط عالية تبلغ 83.15% . ان دراسة تبوغ الفيوزاريوم كولموروم المعرضة لتاثير العدائي السلالات البكتيرية يرتفع الى درجة انه لا يوجد تبخر لسلالات الفطريات المختبرة . اظهرت نتائج انبات الأبوغ من الفيوزاريوم كولموروم , ان افضل القيم المسجلة في غياب السلالات المضادة في تفاعلات معينة , يكون معدل النشاط 100% وهذا هو الحال مع سلالات R02 .

ويرتبط القضاء على مسببات الأمراض الى الأيضات التي تفرزها سلالتان البكتيرية مثل انتاج حمض السيانييد الهيدروجيني (HCN) و siderophore والفينازين

الكلمات المفتاحية : البسودوموناس spp , PGPR , الفيوزاريوم كولموروم , الأيضات الثانوية

Dans certains pays l'application des micro-organismes pour le contrôle ou la suppression d'agents nuisibles ou pathogènes a été imposée par des directives gouvernementales afin de minimiser voir même éradiquer l'utilisation des pesticides chimiques vu les préoccupations du grand public relatives d'une part au problème de résistance aux pesticides chimiques (Martinez *et al.*, 2013) et d'autre part, aux conséquences néfastes des résidus chimiques aussi bien sur l'environnement que sur la santé humaine (Whipps et Lumsden, 2001).

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques.

Les *Pseudomonas* montrent diverses activités dans les sols. Un faible nombre d'espèces sont reconnues comme des pathogènes de plantes. D'autres sont connues pour promouvoir naturellement la santé des plantes en contrôlant de nombreux pathogènes de plantes (Peix *et al.* 2009)

Les *Pseudomonas* fluorescentes constituent le plus groupe l'important des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et impliqués dans le biocontrôle des maladies des plantes. Grace à différentes propriétés, incluant, la colonisation efficace des racines, des tubercules, etc. et à la capacité d'utiliser un grand nombre de substrats organiques. Les *Pseudomonas* sont généralement rencontrés au niveau des racines et scrutant des exsudats ; relativement faciles à cultiver dans les conditions de laboratoire, la production de variété de métabolites secondaires qui empoisonnent les bactéries et les champignons pathogènes et la compatibilité des plantes avec les pesticides généralement utilisés comme agents de biocontrôle.

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents améliorent la croissance des plantes directement ou indirectement. La promotion indirecte se produit lorsque ces bactéries empêchent ou diminuent les effets nocifs des microorganismes phytopathogènes par colonisation et production d'antibiotiques. La promotion directe consiste à améliorer la croissance des plantes. Elle se fait soit en

fournissant à la plante des phytohormones favorisant la croissance végétale ou de faciliter l'absorption de certains éléments nutritifs de l'environnement par production de sidérophores ou par fixation d'azote (Doubou *et al.*, 2001). Les modes d'action des PGPR sont : la production de phytohormones (Frankenberger et Arshad, 1991), la production de sidérophore (O'Sullivan et O'Gara, 1992 ; Loper et Henkels, 1999), la solubilisation du phosphate (Kloepper *et al.*, 1989), l'inhibition des microorganismes pathogènes (Antoun *et al.* 1980 ; Crawford *et al.*, 1993) et la détoxification du milieu (Beauchamp, 1993).

Cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations (Grichko et Glick, 2001), ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds (Burd *et al.*, 1998 ; Belimov *et al.*, 2001).

Le *Fusarium* vit soit en saprophyte sur les déchets agricoles, participant ainsi à la biodégradation des produits industriels, soit en parasite, surtout des plantes, où il produit une pourriture des racines et une destruction des tissus (Smith et Moss, 1985). Ces infections peuvent poser des problèmes économiques considérables en cas de contamination importante des récoltes, d'autant plus que certaines espèces sont productrices de toxines potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux.

Diverses espèces de *Pseudomonas* possèdent des capacités inhibitrices vis-à-vis différentes champignons phytopathogènes. Miliani, (2012) a montré que *P. fluorescens* est susceptible d'induire un antagonisme plus marqué vis à vis de *Fusarium*. Selon Raaijmakers *et al.*, (1995) ; Haas et Keel, (2003), certaines souches de *Pseudomonas* qui produisent de l'HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4- diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliqués dans le biocontrôle. Le parasitisme et/ou la lyse des champignons par les rhizobactéries est facilitée par la production d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les parois des cellules fongiques.

Dans ce travail nous avons essayé de mettre en évidence *in vitro* la production de quelques uns de ces métabolites secondaires : la production des sidérophores, production des antibiotiques (Phénazine) et production de l'HCN chez un ensemble des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents isolé de la région de Laghouat.

En plus, nous avons étudié l'effet antagoniste de certain de ces souches vis-à-vis de deux souches d'un champignon phytopathogène *Fusarium culmorum*, à savoir leur effet sur la croissance mycélienne, la sporulation et sur la germination des spores.

I- Introduction

Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "rhizo" ou "rhiza" signifiant "racine" et "sphère", le champ d'action ou d'influence est définie comme étant la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines (Campbell et Greaves 1990; Westover *et al.* 1997).

Il est aussi un espace de transition obligatoire, non seulement de l'eau et des nutriments qui sont prélevés par la plante, mais aussi pour les composés libérés par la plante dans le sol : la rhizodéposition. La nature de ces composés organiques revêt une importance particulière dans le processus d'agrégation.

Dans la rhizosphère, la quantité de microorganismes est au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de 10^9 par gramme de sol (Davet, 1996). La densité des champignons est estimée à 10^6 par gramme de sol. Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de 10^3 par gramme de sol.(Sabihi ;2016) .

II-1. Diversité taxonomique des PGPR

Au cours des dernières années, le nombre de PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative, principalement puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère et que les mécanismes d'action des PGPR ont été suffisamment étudiés. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants: *Proteobacteries*, *Firmicutes*, *Actinobacteries* et *Bacteroidetes* (Hugenholtz, 2002).

Actuellement, de nombreux genres bactériens incluent les PGPR, révélant des taxons très divers (Kloepper, 1992) : *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*.

II.2. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

PGPR sont des bactéries bénéfiques de la rhizosphère capables de coloniser le milieu racinaire (Kloepper *et al.*, 1991; Kloepper, 1994). Elles ont été appelées «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» (PGPR) par Kloepper et Schroth (1978). Par définition, elles doivent, en plus de coloniser les racines et favoriser la croissance des plantes, avoir la capacité de survivre et se multiplier dans les nodules en compétition avec la flore normale. Du moins, elles doivent coloniser le temps nécessaire pour exprimer leurs propriétés de protection et de stimulation (Kloepper, 1994).

II-3-*Pseudomonas spp.fluorescents* :

Pseudomonas spp fluorescents saprophyte est une bactérie Gram négatif, oxydase positive, en forme de bâtonnet appartenant au genre des *Pseudomonas*. Elle est mobile grâce à des multiples flagelles. De plus, elle tient la deuxième partie de son nom (*fluorescens*) du fait qu'elle est fluorescente. Cette fluorescence est due à la production d'un pigment appelé fluorescéine. Sa température de croissance optimale se situe entre 20°C à 30°C.

Les *Pseudomonas spp. fluorescents* sont connus pour leurs aptitude d'adhésion aux particules du sol et au rhizoplan, mais sont aussi mobiles et prototrophes (de Weger *et al.*, 1994), produisant des antibiotiques (Garbaye, 1994 ; Natsch *et al.*, 1994), et des enzymes hydrolytiques (Lim *et al.*, 1991; Neilsen *et al.*, 1998; Neilsen et Sorensen, 1999) . Ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération in situ relativement court (Garbaye, 1994).

Les *pseudomonas spp. fluorescents* présentent des effets dans certaines conditions bénéfiques sur la croissance des plantes et sur leur production vis-à-vis des agents pathogènes telluriques.

II.4. Effets directs

II.4.1. Stimulation de la croissance des plantes

a-Solubilisation des phosphates

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 phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes (Kim *et al.*, 1998; Richardson, 2001). Les espèces de *Pseudomonas spp. fluorescents* comme *P. chlororaphis*, *P. putida* et *P. aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (Cattelan *et al.*, 1999; Bano et Musarat, 2003).

b- Synthèse de phyto-hormones

b.1. 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 leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments 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.

b.2. 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).

b.3. La 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase

L'éthylène est la seule phytohormone gazeuse. Il est connu pour être l'hormone des blessures, parce que sa production dans la plante peut être induite par n'importe quel perturbation physique ou chimique des tissus (Salisbury, 1994). Parmi ses nombreux effets

sur la croissance et le développement de la plante, la production d'éthylène peut causer l'inhibition de la croissance des racines. Glick *et al.* (1998) ont émit, une théorie selon laquelle le mode d'action de certains PGPR serait par l'intermédiaire d'une ACC-désaminase. Cette enzyme clive l'ACC précurseur immédiat de l'éthylène. L'ACC-désaminase diminuerait la production d'éthylène au niveau des racines de la plante hôte et résulterait en leurs allongements.

Les *Pseudomonas spp. fluorescents* sont des producteurs d'ACC-désaminase (Glick *et al.* 1994). La transformation des *Pseudomonas spp.* par des gènes codant cette enzyme, permet à celles-ci de croître sur un milieu dont la seule source de carbone et d'azote est le ACC, et de stimuler l'élongation des racine (Shah *et al.*, 1998).

c- 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 réactions par les quelles les nitrates sont réduits en dinitrogène (N₂), par des métallo-enzymes comme la nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase. Les *Pseudomonas spp. fluorescents* sont capable de s'adapter aux manque d'oxygène par l'utilisation des oxydes d'azote comme accepteurs alternatifs d'électrons (Stewart, 1988). La respiration sur nitrate et la réduction des nitrites sont impliquées dans la compétition des souches modèles de *Pseudomonas spp. fluorescents* dans le sol (Philippot *et al.*, 1995; Ghiglione, 2000).

d- Sédorphore :

La majorité des espèces de *Pseudomonas spp. fluorescents* produisent des sidérophores. Un nombre important d'espèces de plantes peuvent assimiler les complexes Fe³⁺-sidérophore bactériens (Becker et Cook, 1988; Loper, 1988; Bitter *et al.*, 1991). Les sidérophores jaunes-verts sont només pyoverdines (PVDs) ou pseudobactines (Budzikiewicz, 1993, 1997). A côté de la PVD, *P. aeruginosa* produit un autre sidérophore nommé pyocheline avec une affinité plus faible pour le Fe³⁺ (Cox *et al.* 1981). Les espèces de *Pseudomonas spp. fluorescents* produisent aussi la pseudomonine (isoxazolidone) comme *P. fluorescens*, *P. stutzeri* et *P. putida* (Lewis *et al.*, 2000; Mossialos *et al.*, 2000; Mercado-Blanco *et al.*, 2001).

II.4.2. Stimulation de la germination

Une des composantes du rendement agronomique des grandes cultures est la densité du peuplement végétal. Or, cette densité est liée à la faculté et à l'énergie germinative des semences. 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. Ainsi Kloepper *et al* (1986) 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. De même Hôte *et al* (1991) ont enregistré une augmentation significative du taux de germination de semences de maïs soumises au froid après inoculation de deux souches de *Pseudomonas fluorescents*. L'une d'entre elles a, de plus, permis de maintenir le pourcentage de germination d'un lot de semences âgé de deux ans au même niveau que celui uniquement âgé de 1 an. Ces souches sont appelées «Emergence Promoting Rhizobacteria» (EPR) (Kloepper *et al*, 1986). Récemment, 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.

II.4.3- Stimulation des interactions entre la microflore symbiotique et la plante hôte

Certaines souches de *Pseudomonas spp fluorescents* stimulent la nodulation des légumineuses. Ainsi, Grimes et Mount (1987) ont montré qu'une souche de *P. putida* augmente de façon significative la nodulation du haricot par *Rhizobium*. De même, Polonenko *et al* (1987) ont montré que certaines rhizobactéries pouvaient améliorer la nodulation du soja par *Bradyrhizobium*. Ces souches sont appelées «Nodulating Promoting Rhizobacteria» (NPR). Toutes ces souches stimulent la croissance racinaires, produisent de l'acide indole acétique et sont **pectinolytiques**. Elles provoquent une augmentation de la masse de nodosités plutôt que de leur nombre (Zablotowicz, in Howell et Okon, 1987). De même, certaines souches de bactéries influencent positivement la colonisation racinaire de la plante hôte par des endomycorhizes (von Alten *et al*, 1991) ou par des ectomycorhizes (Garbaye et Bowen, 1987). Mamoun et Olivier (1992) ont montré que certaines souches de *Pseudomonas spp fluorescents* améliorent la pérennité de l'association symbiotique entre l'ectomycorhize *Tuber melanosporum* et le noisetier. Par ailleurs, l'effet bénéfique, de

l'inoculation mycorhizienne sur la plante, pourrait être stimulé par certaines rhizobactéries productrices de substances de croissance (Linderman et Paulitz, 1990) et par les rhizobactéries qui augmentent la solubilité des phosphates dans le sol (Raj *et al*, 1981). Ainsi 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).

II.5. Effets indirects

II.5. 1-Protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique

L'utilisation de bactéries pour lutter contre les maladies d'origine tellurique a fait l'objet de nombreuses synthèses bibliographiques (Schroth et Hancock, 1982; Leong, 1986; Neilands et Leong, 1986; Fravel, 1988) aux quelles le lecteur pourra se reporter pour plus de détails. Les modèles biologiques utilisés mettent en jeu différentes souches de *Pseudomonas* et différentes maladies. Les problèmes pathologiques les plus étudiés sont : les fontes de semis, les fusarioses, le piétin échaudage et les pourritures racinaires, jambe noire, Veticilliose. Même si les travaux de lutte biologique sont très nombreux, il est regrettable de constater que seuls quelques uns évaluent l'efficacité de cette lutte en termes d'augmentation de rendement (Kloepper *et al*, 1980c; Suslow et Schroth, 1982b; Saktivel et Gnanamamickam, 1987; Weller et Cook, 1986; Xu et Gross, 1986b; Leeman *et al*, 1991; Lemanceau et Alabouvette, 1991). La plupart des essais sont en effets réalisés en conditions contrôlées ou sont arrêtés avant la récolte.

II.5. 2- Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova *et al.*, 2005). Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant la colonisation racinaire sont la mobilité (présence d'un flagelle), le **chimiotactisme**, les lipopolysaccharides (LPS), la capacité de synthétiser des vitamines et des macromolécules et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

II.5. 3. Antibiose

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993 ; de Souza et al., 2003 ; Haas et Defago 2005).

II.5.4. Les antibiotiques

Plusieurs antibiotiques ont été identifiés chez le genre *pseudomonas*, tels que le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène, l'oomycine A, la phénazine, la pyolutéorine, la pyocyanine, la pyrrolnitrine, la tropolone ou encore des lipopeptides cycliques (viscosinamide, tensine, amphisine ...) (Keel et al., 1992 ; Raaijmakers et al., 2002 ; Magnin Robert, 2007).

a. le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)

La production de DAPG par *P. fluorescens* CHAO semble être impliquée dans l'induction de cette résistance systémique. En effet, lors de la confrontation entre *P. parasitica* et *A. thaliana* colonisé par différents mutants de CHAO (déficient en HCN, DAPG, pyolutéorine, exoprotéase de sidérophores), seules les mutants déficients en DAPG menaient à une baisse significative de l'ISR. (lavicola et al., 2005 in Meliani., 2012).

b. Les phénazines (PHZ)

Les phénazines représentent une vaste famille de molécules hétérocycliques azotées fortement pigmentées et capables d'une action antibiotique à large spectre. Cela fait bien 150 ans qu'ils sont reconnus mais les données sur leurs synthèses et activités antimicrobienne sont récentes. La capacité d'en produire ces métabolites est très bien documentée dans trois espèces : *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* (Rahm, 2008).

Plus de 50 phénazines sont présentement connus, toutes ayant le même noyau hétérocyclique, et certaines souches peuvent produire jusqu'à 10 dérivés différents en même temps (Delaney et al 2001 ; Chin-A-Woeng et al., 2003 ; Mavrodi et al., 1998). A

l'exception des *P. fluorescens* qui produisent un seul type de phénazine-1-carboxylic acid (PCA), la majorité des autres pseudomonads en produisent une variété importante.

c. Pyrrolnitrine (PRN)

La pyrrolnitrine (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophényl)-pyrrole) est un antibiotique à large spectre isolé pour la première fois dans les années soixante à partir de *Pseudomonas pyrricinia*. Par la suite, ce composé a été isolé chez plusieurs autres espèces de bactéries incluant *Myxococcus fluvus*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia sp* ; ainsi que plusieurs *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Hammer *et al* ; 1999). Ce métabolite très actif a également connu un usage médical pour le traitement des mycoses cutanées tandis qu'un dérivé de la molécule a été développé comme fongicide agricole (fludioxonil) (McSpadden Gardner *et al* ; 2002).

La production de ce composé par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *R. solani*, *V. dahliae*, *G. graminis* et *F. oxysporum* (Homma *et al* ; 1989). Ces antibiotiques sont synthétisés via l'action de quatre gènes, *prnA*, *prnB*, *prnC* et *prnD* (Kirner *et al* ; 1998).

d. Pyolutéorine (PLT)

La pyolutéorine est produite par plusieurs espèces de *Pseudomonas* mais son rôle dans la suppression d'agents phytopathogènes a été étudié surtout chez les souches de *P. fluorescens* CHAO et Pf-5 qui produisent également le DAPG et la pyrrolnitrine. Parmi ces trois métabolites, la pyolutéorine s'avère la plus toxique envers *P. ultimum*. Une quantité de 10 µg appliquée à la surface des graines de coton permet de les prémunir contre la fonte de semis (Bander *et al* ; 1999).

e. Cyanure d'hydrogène (HCN)

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un métabolite secondaire qui fait partie des cyanides. La production de HCN semble confinée aux *Protéobactéries* et elle a été mise en évidence chez plusieurs souches de *P. fluorescens*. La production de HCN par *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression d'agents pathogènes comme *Theilaviopsis basicola*, *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (Ramette *et al* ; 2003). Le composé agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire.

f. Les Orfamides A

Se sont des lipopeptides cycliques récemment découverts (CLP), dont la structure a été déchiffré suite aux données du séquençage génomique et utilisant une nouvelle approche génomi-isotopique. Cette approche a abouti à la découverte du gène orphelin codant pour la synthèse de l'orfamide chez la souche Pf-5 (Loper et al., 2007 ; Mavrodi et al., 2007).

II.5.5- Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (van Loon, 2007). Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (van Loon *et al.*, 2005 ; Jourdan *et al.*, 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés incluent des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartiennent au genre *Pseudomonas (fluorescens, putida, aeruginosa)*, et aux entérobactéries comme *Serratia (marcescens, plymuthica)* ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

II.2.2.5-Les enzymes

La production d'enzyme mycolitique est également évoquée pour expliquer l'action antagoniste des *Pseudomonas fluorescens* (Lam *et al.*, 1992).

L'excrétion d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques est fréquemment impliqué dans les attaques des champignons phytopathogènes (Martin et Loper 1999; Nielsen et Sorensen, 1998; Picard *et al.*, 2000). La lyse des parois cellulaires, par les enzymes dégradatives excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue du mycoparasitisme. La Chitinase, la β -1,3 glucanase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités dégradatives des composés des parois cellulaires tels que : la chitine, le β 1-6 glucane et les ponts glucosidiques (Schroth et Hancock, 1981; Chet, 1987; Lorito *et al.*, 1996). Les

microorganismes excrétant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces (Ordentlich *et al.*, 1988; Inbar et Chet, 1991). Le contrôle biologique de *Fusarium solani*, se fait essentiellement via les activités des laminarinase et chitinase chez *P. stutzeri* YPL-1 (Lim *et al.*, 1991). Nielson *et al.* (1998) ont rapporté que dans la rhizosphère de la betterave à sucre, les *Pseudomonas spp. fluorescents* inhibaient *R. solani* par production d'endochitinase.

Des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents isolées de la région de Laghouat ont fait l'objet de cette étude pour mettre en évidence d'une part leur pouvoir à produire certains métabolites secondaires: sidérophores, production d'antibiotiques tel que l'acide cyanhydrique (HCN) et les phénazines. Et d'autre part, leur effet sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores de deux souches phytopathogènes du *Fusarium culmorum*.

I .Matériel Biologique :

I.1. Souches bactériennes :

Nous avons utilisé neuf souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents, ont été choisies en fonction de la production d'antifongiques sur des champignons phytopathogènes, dans études précédentes, elles proviennent de la collection d'Universitaire de Laghouat Ammar Theliji, département d'Agronomie. L'origine de chaque souche et la date d'isolement sont assignés dans le tableau II.

Tableau 1 : Souches antagonistes de *Pseudomonas spp.* fluorescents .

espèces	Souche	Origine	Année d'isolement
<i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents	P12	<i>Ziziphus lotus</i>	2014
	AZ4	<i>Pistacia atlantica</i>	2016
	R02	<i>Retama raetama</i>	2015
	R05	<i>Retama raetam</i>	2015
	P429	<i>Pistacia atlantica</i>	2015
	P430	<i>Pistacia atlantica</i>	2015
	P437	<i>Pistacia atlantica</i>	2015
	P438	<i>Pistacia atlantica</i>	2015
	P706*	<i>Ziziphus lotus</i>	2016

(*) La souche P706 n'a été utilisée que pour la production d'antibiotique.

Trois souches de référence (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) nous a été fournir pour tester les antibiotiques des *Pseudomonas spp.* fluorescents. Le tableau (2) .

Tableau 2 : Souches cibles

Gram	Souche	Code
Gram +	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 25991
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739

1.2. Souches fongiques

Les deux souches phytopathogènes appartenant au champignon *Fusarium culmorum* qui ont fait l'objet de cette l'étude ont été fournies par le laboratoire du département d'agronomie, Université Ammar Theliji. Il s'agit des souches T7 et BTCR. (Tab.3)

Tableau 3 : Souches du champignon .

Espèce	souche	Origine
<i>F. culmorum</i>	T7	Epi de blé
<i>F. culmorum</i>	BTCR	Epi de blé

Avant toute expérimentation réalisée, les bactéries antagonistes ont été réactivées sur milieu KB à 28°C pendant 24 heures, les souches de références cibles ont été réactivées sur milieu GN à 37°C en utilisant la technique des stries par épuisement dans des conditions de travail en asepsie. Cette technique permet d'obtenir des colonies pures et séparées. les souches fongiques cibles ont été réactivées sur milieu PDA à 27°C pendant 7 jours .

II. Métabolite secondaire à effet Biocontrôle :

II.1. La production de sidérophores

Les neuf souches de *Pseudomonas* a été testée sur milieu solide « King B ». Ce dernier additionné ou non avec 100 µl de FeCl₃, la lecture est faite après l'incubation à 28°C pendant trois jours, L'apparition d'un pigment fluorescent sur le milieu sans fer et son absence sur le milieu additionné de fer indique une production de sidérophores. (Schwyn et Neilands, 1987) modifié par Mahmoud et Abd Alla., (2001).

II.2. Production d'acide cyanhydrique (HCN) :

La capacité à 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 pipette pasteur, sur le milieu (TSA) additionné de glycine (4,4 g /l). Les bactériens sontensemencés par strie, un disque de papier Whatman n°1 imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium) sont déposés dans les couvercles des boites, et incubées inversées à 28°C pendant 4jours.

Le test a été réalisé en trois répétitions le virage de la couleur jaune vers le brun clair au rouge brun indique respectivement une production modérée et élevée d'HCN par la bactérie productrice (Trivedi et al. 2008). Le témoin négatif est représenté par un milieu sans inoculum.

II.3. Production d'antibiotique (phénazine)

II.3.1. Extraction des antibiotiques :

Dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu KB liquide et additionné de 2% de glycose nous avons ajouté un volume de 100 µl d'une culture fraîche. La culture bactérienne a été incubée à 28°C et à l'obscurité pendant 4 jours sous agitation permanente à 150 rpm. Après séparation des cellules par centrifugation (4500 /20 min). Au surnageant a été ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter, et la phase organique a été évaporé au rota vapeur à 40°C. L'extrait sec a été récupéré par 0.6 ml de méthanol puis conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation. (Thomashow et Weller, 1988).

II.3.2. Test d'activité par antibiographie :

Un test d'antibiographie est une technique de laboratoire visant la sensibilité de trois souches bactériennes E.C, BC, ML et deux souches fongiques *Fusarium culmorum* BTCT, T7 vis-à-vis de sept antibiotiques. Les méthodes utilisées sont respectivement celles décrites par Vincent *et al.*, (1991) et Veselova *et al.*, (2008).

II.3.2. 1. Préparation de la suspension bactérienne :

A l'aide d'une pipette pasteur stérile, nous prélevons une colonie bien isolée d'une culture bactérienne (d'E.coli, et un d'BC et d'ML) qui ont été incubées sur le milieu GN après 24h, puis nous avons préparé dans un tube qui contient de l'eau physiologique une suspension à 620ng une concentration équivalente à 0.1, puis nous avons étalé $100\mu\text{l}$ de la suspension sur toute la surface du milieu MH à l'aide d'un écouvillon afin d'obtenir une quantité la plus homogène que possible de bactérie à la surface.

II.3.2. 2. Préparation de la suspension sporale :

Une suspension sporale du champignon a été préparée à une concentration de 10^6 spores/ml. Les spores de champignon *F. culmorum* sont obtenues en inondant pendant plus d'un mois le milieu PDA avec 10ml d'eau physiologique stérile, les conidies sont délogées en grattant la surface de milieu avec le bout d'une pipette pasteur stérile, en suite ont été versées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu MH $100\mu\text{l}$ de suspension de champignon, puis nous avons étalé la suspension sur toute la surface de la gélose afin d'obtenir une quantité la plus homogène que possible à la surface.

II.3.2. 3. antibiographie

Un petit disque de 0.6mm de papier Whatman n°1 imprégné de $40\mu\text{l}$ d'une solution d'extrait contenant l'extrait antibiotique. A l'aide d'une pince stérile, nous avons déposé les disques des antibiotiques sur le milieu (7 disques qui doivent être séparés l'un de l'autre). Le 8^{ème} disque imbibé de méthanol, le témoin négatif, en suite ces disques ont été fixés par un pipette pasteur. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Après l'incubation à 37°C pour les bactéries et à 27°C pour les champignons pendant 24h, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'un pied à colin, (le diamètre de disque compris).

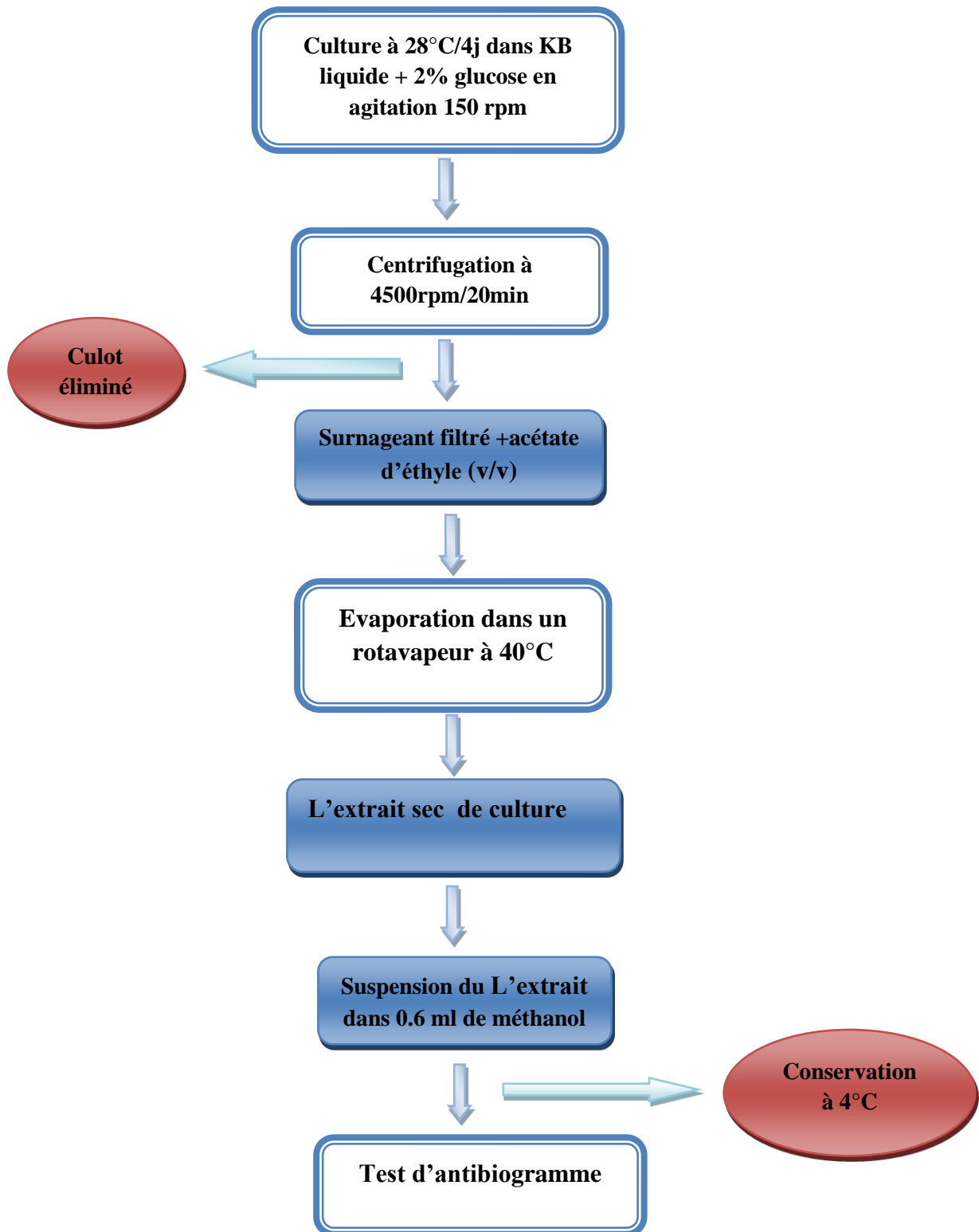


Figure 1. Protocole expérimental utilisé pour l'extraction des antibiotiques.

III. Effet antagonistes des souches de *P. spp.* fluorescents:

Nous avons effectué le test d'antagonisme entre les souches de *P. spp.* fluorescents et les deux souche de champignons pathogènes de *Fusarium culmorum*.

Pour ce faire, ils ont subis des tests sur la croissance mycélienne, effet sur la sporulation et leur effet sur la germination des spores.

L'évaluation du taux d'inhibition du *F.culmorum* est estimée selon la formule suivant (Wang et al 2002) :

$$\text{Taux d'inhibition} = (\text{R témoin} - \text{R test} / \text{R témoin}) \times 100\%$$

R témoin = résultats obtenus par le champignon .

R test = résultats obtenus par l'antagoniste.

III.1. Effet sur la croissance mycélienne

Ce teste a été réalisé en appliquant deux méthode de confrontation une directe et l'autre à distance (indirect).

III.1.1. La confrontation directe (méthode des spots)

Les tests a été réalisés sur trois milieux de culture solides (PDA, King B et TSA), selon la méthode de spots (Hibar *et al.*, 2005) , dans une boite de Pétri contenant le milieu approprié, quartes spots d'une crème bactérienne de souche inhibitrice ont été inoculé à l'aide d'une pipette pasteur stérile et à équidistance 2cm du centre de la boîte, après 24h d'incubation a 28°C La rondelle du champignon de 0.6 mm est ensuite déposée au centre. Après sept jours d'incubation à 28°C, des mesures de la croissance du champignon a été fait à l'aide d'un pied à coulisse et ont été comparée au témoin ne contenant que le mycélium fongique. Trois répétitions ont été effectuées

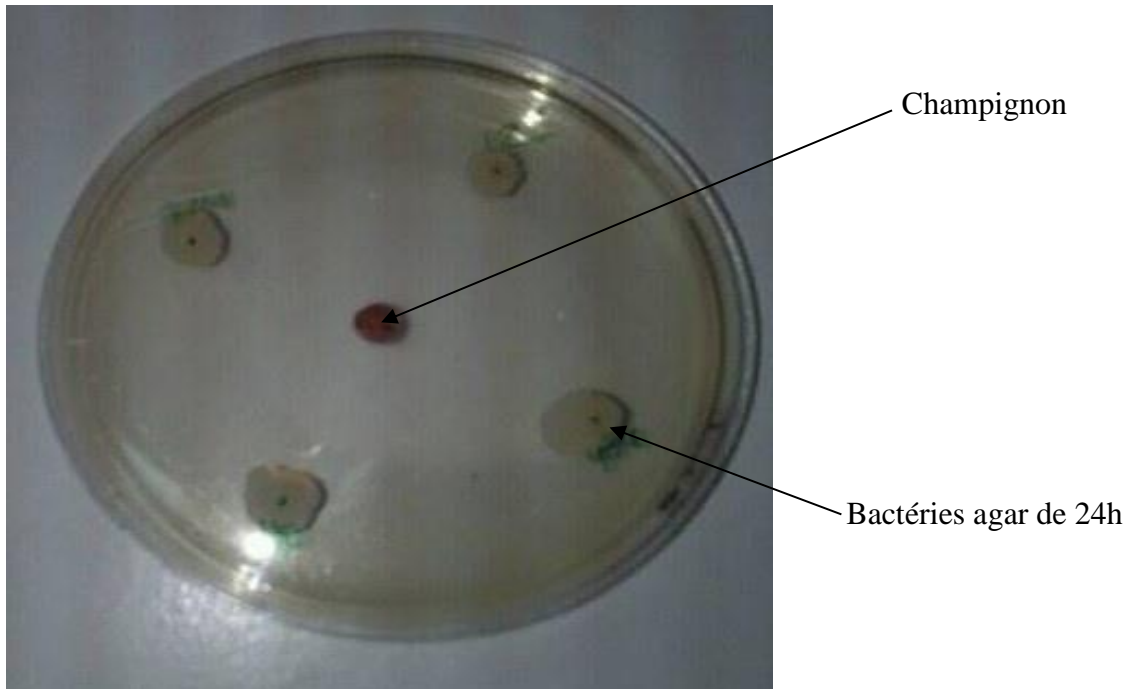


Figure 3. Confrontation directe entre le champignon et *Pseudomonas spp.* fluorescents

III.1.2. Antagonisme par confrontation indirecte :

Les champignons et la bactérie antagonistes sontensemencés dans des boites de Pétri à deux compartiment. Le compartimentage évite le contact entre la gélose supportant la bactérie et la gélose sur laquelle se trouve le champignon, en empêchant ainsi la diffusion de substance dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite pourra dans cet essai inhibé la croissance de champignon.

Nous avons ensemences le champignon dans l'un des compartiments contenant le milieu PDA et la bactérie dans l'autre contenant de milieu TSA+ glycine (fig.3). Ces dernières sont scellées au parafilm, les boites témoins sont ensemencées avec les disques de champignon en absence de bactérie antagoniste. les boites sont incubées à 28°C pendant sept jours.

Après l'incubation, le diamètre des colonies fongiques est alors mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

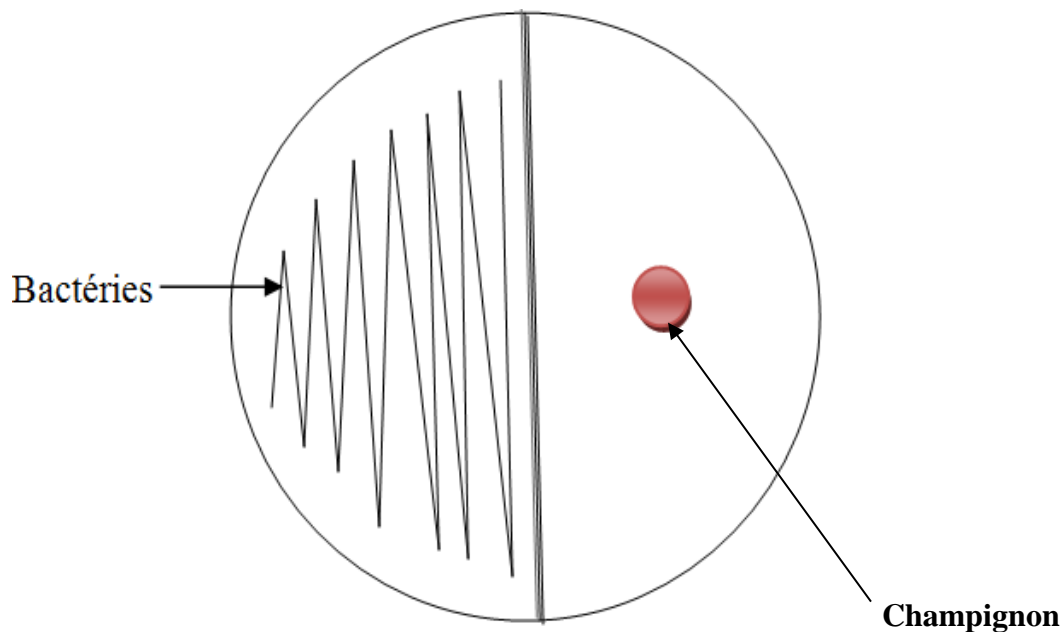


Figure 3 : de confrontation indirecte entre le champignon et *Pseudomonas spp.* fluorescents en biote de pétrie à deux compartiment.

III.2. Effet de sporulation des champignons :

Avec une micropipette nous avons ajoutée 100µl d'une suspension bactérienne dans des boites pétrie contenant le milieu MH liquide. Un disque de champignon (T7et BTCA) est prélevé puis déposé au centre de boite, en plus le témoin contenant le mycélium fongique seule, le test a été effectué en trois répétitions, en suite l'incubation est faite à 28°C pendant 14 jours. (Omar et al ., 2006).

III.3. Effet sur la germination des spores :

Pour ce test nous avons utilisée trois milieux de cultures liquides déférents (KB, PDA, MH). La première étape consiste a préparé la suspension bactériens en ensemencant sur 10ml d'eau physiologique par une culture fraiche de (24h) des quatre souches *Pseudomonas* (R02, 429, 12, et AZ4) a concentration de 10^8 cellule/ml en deux période : 24h avant l'inoculation du champignon et en même temps que ce dernier. La suspension sporale a été réalisée de la mémé façon que celle pour l'antibiographe (cf. **II.3.2. 2.**)

Le témoin n'est pasensemencé avec les bactéries, le test effectuée en deux répétitions, après incubation sous agitation 180 rmp pendant de 20h à 28°C. Le comptage des spores, germées ou non, a été détermine sous microscope.

VI. Analyse statistique :

Une analyse statistique (ANOVA) des données est utilisée pour valoriser les résultats obtenus par l'utilisation du logiciel Stat box végétale (7.6), les groupes homogènes sont donnés par le logiciel en utilisant le test NEWMAN-KEULS au seuil de 5%

Résultats :

1. Production de sidérophores :

La production de sidérophores effectuée sur milieu KB qui est connu par sa composition exempte de fer, permettant ainsi la libération des sidérophores dans le milieu (La fluorescence indique la production de sidérophores). Dans un milieu riche en fer, les pseudomonas ne produisent pas de sidérophores. Les résultats sont illustrés dans le tableau 4.

A l'issu de ces résultats, nous remarquons que tous les souches sont capable de produire les sidérophores dans milieu KB pauvre de fer en proportions variables

Tableau 4 : Résultat de la production de sidérophores par les *Pseudomonas* spp.fluorescents

SOUCHES	KB sans fer	KB + fer
P12	++	-
AZ4	+	-
P429	++	-
P430	+	-
P437	++	-
P438	++	-
R ₀₂	+++	-
R ₀₅	+++	-

(-) Pas de production

(+) Production moyenne

(++) Production importante

(+++) Production très importante

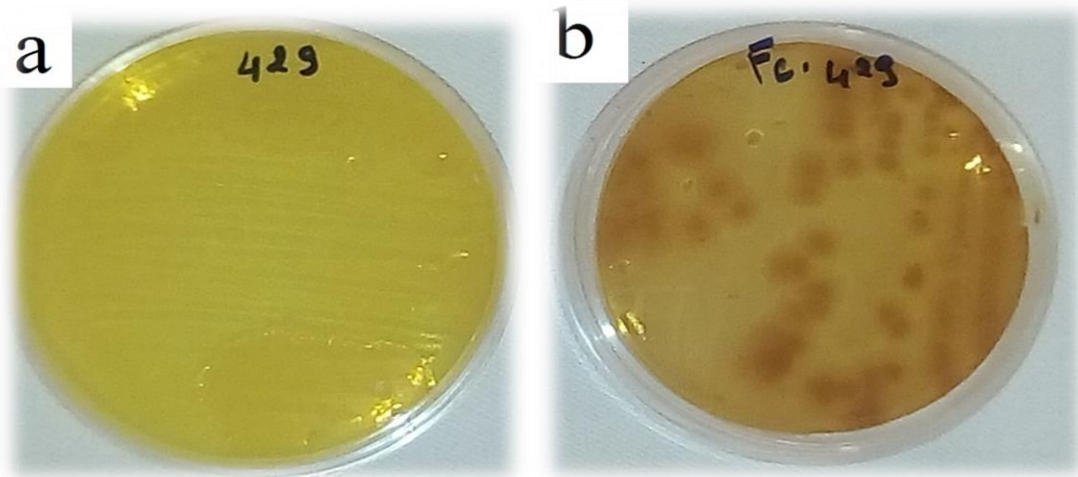


Figure 4. Résultats de production des sidérophore

a- Production de sidérophore

b- Pas de production

2. Production de l'HCN :

La production de l'HCN a été révélée par la formation de couleur orangé sur papier filtre imprégné de pictate de sodium. Huit souches ont été testé, parmi eux trois souches (P12, R₀₂, R₀₅) productrice de l'HCN, cette production est moyenne chez P12, tandis qu'elle est importante chez R₀₂ et R₀₅. Mais les 5 autres ne produisent pas de l'HCN. Les résultats sont représentés dans tableau 5, figure 5.

Tableau 5 : résultats de la production de l'HCN par les *Pseudomonas* spp. fluorescents

Souches	Production d'HCN
P12	++
AZ4	-
P429	-
P430	-
P437	-
P437	-
R ₀₂	+++
R ₀₅	+++

(-) pas de production

(++) Production moyenne

(+++ Production important

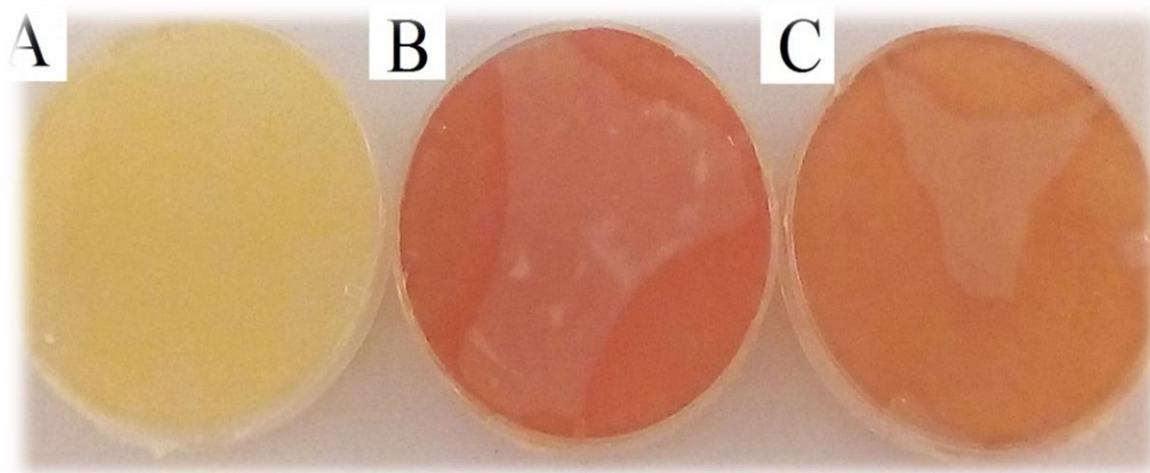


Figure 5. Résultats de la production de l'HCN

A- Pas de production B-Production importante C- Production moyenne

3. Test de l'activité antibiographie :

L'antibiographie a été effectuée sur trois souches bactériennes de référence (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Micrococcus luteus*) et deux souches de champignon phytopathogène le *Fusarium culmorum* (T₇, B_{TCR}). Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaire correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

La réaction des bactéries et les champignons testés vis-à-vis d'antibiotiques sécrétés par nos souches sont représentée dans les tableaux 6 et 7.

➤ Bactéries de référence cible

Selon le test de variance au seuil de 5%, montrent qu'il existe une différence significative (P=0.004). Sur les trois bactéries testées, les souches ML et BC ont montré une sensibilité élevée à tous les antibiotiques utilisée tableau 6. Les plus grande zone d'inhibition est obtenue par la souche P 706 avec 15.64mm contre BC suivi par la zone de 15.49 mm enregistré contre et ML, classé respectivement dans les groupes (a) et (ab). La plus petite zone d'inhibition est obtenue par souche R02 contre la bactérie E. coli avec une zone d'inhibition de 3.8mm, classé dans le groupe (f).

La souche d'*E. coli* a présenté la résistance la plus élevée pour l'ensemble des antibiotiques de souches antagonistes, à l'exception de l'antibiotique de la souche P12 où les zones d'inhibitions ont été classées dans le 5^{ème} groupe homogène.

Figure 6 : les résultats de l'antibiogramme contre les souches bactériennes.

Souches bactériennes	Taux d'inhibition (mm)		
	EC	BC	ML
AZ4	6 (ef)*	13.59 (abc)*	14.69 (abc)
P12	8.36 (de)	13.95 (abc)	13.82 (abc)
R02	3.82 (f)	12.29 (abc)	11.36 (bcd)
P706	5.33 (ef)	15.64 (a)	15.49 (ab)
P429	4.69 (ef)	14.43 (abc)	13.25 (abc)
R05	6.19 (ef)	11.25 (cd)	12.97 (abc)
P437	5.56 (ef)	7.6 (ef)	8.55 (de)

(*) Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent aux mêmes groupes homogènes, selon le test de Newman-Keuls ($\alpha=5\%$)

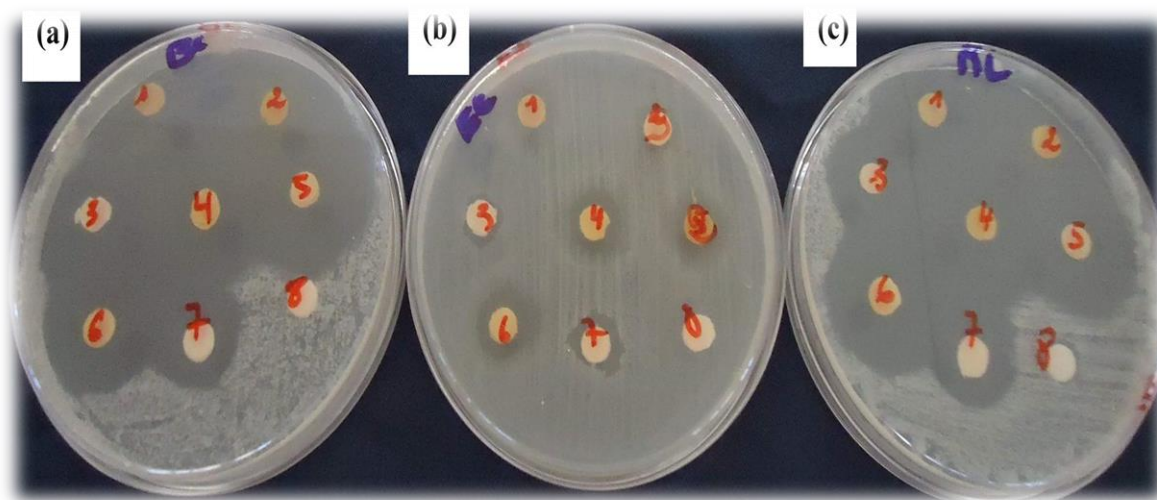


Figure 6. L'antibiogramme contre les souches bactériennes cibles.

1. souche AZ4 ; 2. Souche P12 ; 3. Souche R₀₂; 4. Souche P706 ;

5. Souche P429 ; 6. Souche R₀₅ ; 7. Souche P437 ; 8. Témoin (méthanol).

a- *Bacillus cereus*

b- *Escherichia coli*

c- *Micrococcus luteus*

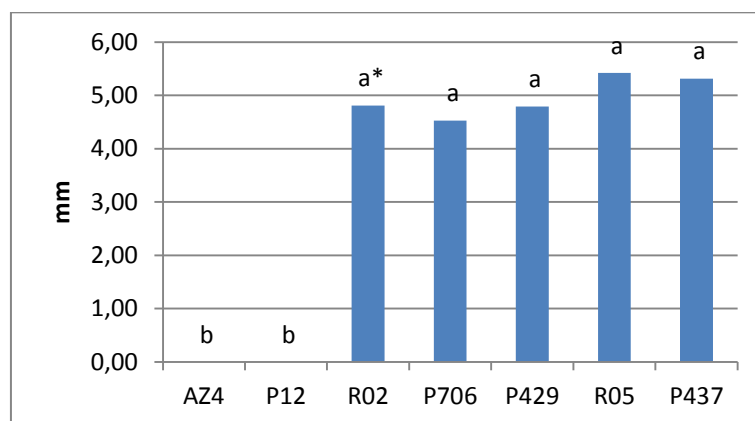
➤ Champignon phytopathogène cible

La comparaison de la sensibilité aux antibiotiques et l'analyse de variance, montrent qu'il existe une différence significative ($P= 0,000$) que pour le facteur antibiotiques , mais pour le facteur souches fongiques et pour l'interaction entre les antibiotiques et les souches fongiques la différence est non significative ($P= 0,11$) ;

D'après le tableau 7, les deux souches de *Fusarium culmorum* réagissent de la même façon à l'égard de tous les antibiotiques testés. Alors que les antibiotiques sont significativement différents, les antibiotiques de six souches R02, R05, P706, P437 et P429 sont actifs sur les deux souches fongiques de la même façon, ils ont été tous classés dans le groupe homogène (a), les antibiotiques de souche AZ4 et P12 n'ont montré aucune activité figure 7.

Tableau 7 : résultats d'antibiogramme des souches fongiques.

Souches bactériennes	Taux d'inhibition (mm)	
	BTCR	T ₇
AZ4	0	0
P12	0	0
R02	4.87	4.75
P706	4.55	4.50
P429	4.67	4.91
R05	4.2	6.64
P437	5.37	5.26



(*Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent aux mêmes groupes homogènes, selon le test de Newman-Keuls ($\alpha=5\%$))

Figure 7 : résultats du facteur antibiotiques des souches bactériennes.

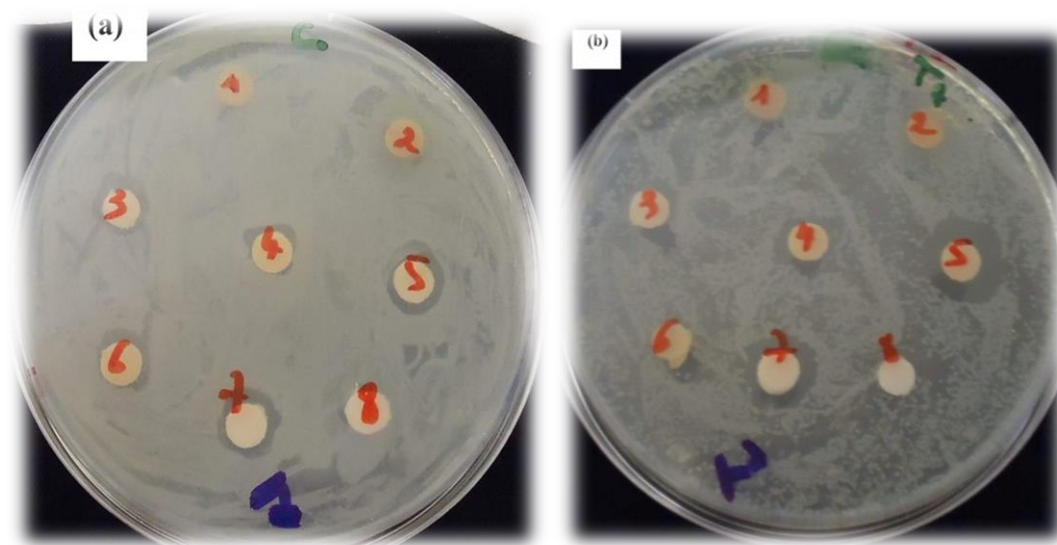


Figure 8. L'antibiogramme contre les souches de *Fusarium culmurom*

a- *Fusarium culmurom* BTCR

b-*Fusarium culmurom* T₇

4. Résultats de l'activité antagoniste *in vitro*

4.1. Effet sur la croissance mycélienne

a)- confrontation directe

L'inhibition des souches de *Fusarium* BTCR et T₇ par les souches de *P. spp* fluorescents sur trois milieux de cultures nutritif TSA, KB et PDA, le tableau (8) montre les résultats obtenus par la méthode de confrontation directe.

Selon l'analyse de la variance au seuil de 5%. Le test *in vitro* de l'activité antagoniste de *Pseudomonas* contre *Fusarium* par contact direct a révélé un effet significative (Prob=0.013) pour les trois facteurs étudiés à savoir, facteur du champignon pathogène, facteur souches bactériennes et facteur milieu de culture. Les résultats montrent que la croissance mycélienne des souches fongiques témoins est plus importante en comparaison à ceux obtenus avec les différentes confrontations (pathogène – antagoniste).

C'est-à-dire que les huit souches bactériennes testées, ont une action inhibitrice sur la croissance mycélienne de *Fusarium* par rapport au témoin (tableau 8).

Le pourcentage d'inhibition les plus élevés de croissance mycélienne de *F.culmorum* est obtenu sur TSA avec la souche de R₀₂ de l'ordre de 88% classé dans par le groupe homogène (a), suivie par la souche R₀₅ groupe (ab) contre *BTCR* avec un pourcentage de 86.33%. Les bactéries classé dans le groupe (f) ont manifesté la plus faible inhibition et engendré une réduction de croissance sur T₇ de 69 à 70 %. Ce test d'inhibition a montré que le *F. culmorum* est le plus sensible à l'action des bactéries antagonistes. D'une manière générale les meilleurs résultats ont et obtenue sur le milieu TSA.

Tableau 8 : Inhibitions obtenues par la méthode de confrontation directe.

Souche bactéries	Souches fongiques	Taux d'inhibition de croissance mycélienne %		
		Milieu TSA	Milieu KB	Milieu PDA
R ₀₂	BTCR	88 (a)*	84 (abc)	81.333 (abcde)
	T ₇	76,33 (bcdef)	74,67 (cdef)	72 (def)
R ₀₅	BTCR	86,33 (ab)	79,667(abcde)	74.333 (cdef)
	T ₇	79,667 (abcde)	75,667(cdef)	76.667 (bcdef)
P438	BTCR	78,333 (bcdef)	76,333(bcdef)	77 (bcdef)
	T ₇	81,667 (abcd)	70,333 (def)	69 (f)
P429	BTCR	79 (bcdef)	76,667(bcdef)	73.667 (cdef)
	T ₇	70,333 (ef)	70,667 (def)	76 (cdef)
AZ4	BTCR	77,667 (bcdef)	76 (cdef)	74.667 (cdef)
	T ₇	71,333 (def)	70,333 (ef)	75.333 (cdef)
P12	BTCR	74,333 (cdef)	73,667 (cdef)	74 (cdef)
	T ₇	69 (f)	70,667 (def)	73 (def)
P437	BTCR	77 (bcdef)	78,333(bcdef)	74.667 (cdef)
	T ₇	70 (f)	69,333 (f)	76.333 (bcdef)
P430	BTCR	79 ,333(abcde)	74 (cdef)	73.667 (cdef)
	T ₇	69,333 (f)	71,667 (def)	77.667 (bcdef)

(*) Les valeurs suivies de la même lettre appartient aux mêmes groupes homogènes, selon le test de Newman-keuls ($\alpha=5\%$)

b) - Confrontation indirecte

Nous avons testé les composés inhibiteurs volatile des souches antagonistes de *Pseudomonas spp* fluorescents vis-à-vis *Fusarium culmorum* (BTCR et T₇) par la méthode confrontation indirecte. les résultats sont représentés dans le tableau (9).

L'analyse de la variance à seuil de 5% a montré une différence significative pour l'ensemble des facteurs étudiés à savoir facteur de champignon, facteur souches antagonistes et leur interaction. Cette dernière a illustré un effet significatif à une prob de 0.025 où il ressort que deux groupes homogènes (a) et (b).

Les résultats obtenus de cet essai montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches de *Fusarium* exercé par la souche antagoniste de *Pseudomonas* comparativement aux témoins. Il ressort de ces résultats, que malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats pathogènes et l'antagoniste testé, ce dernier a pu exercer un effet inhibiteur sur le développement des colonies des pathogènes BTCR et T₇. Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies de *Fusarium* cultivés en présence et en l'absence de l'antagoniste (Figures 10).

Les souches bactériennes sont plus actives contre le *Fusarium BTCR* comparées au T₇ avec de taux qui varie entre de 83,15% et 65,19%. A l'exception de la souche R₀₅ contre T₇ qui a donné le même effet que ce qui est enregistré contre BTCR avec un taux de 58,06 %, elle a été classée aussi dans le groupe homogène (a). Toutefois, les taux d'inhibition les plus faibles sont notés par les souches (P12, R₀₂ et P430) contre T₇ avec des taux qui varient entre 21.53% et 30.91%.

Tableau 09 : Inhibitions obtenues par la méthode de confrontation indirecte.

Souches antagoniste	Souches fongiques	Taux d'inhibition %
R02	<i>BTCR</i>	83.153 (a)*
R05	<i>BTCR</i>	82.508 (a)
430	<i>BTCR</i>	79.258 (a)
12	<i>BTCR</i>	65.193 (a)
R05	T7	58.060 (a)
12	T7	30.913 (b)
R02	T7	24.570 (b)
430	T7	21.525 (b)

(*) Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent aux mêmes groupes homogènes, selon le test de Newman-Keuls ($\alpha=5\%$)

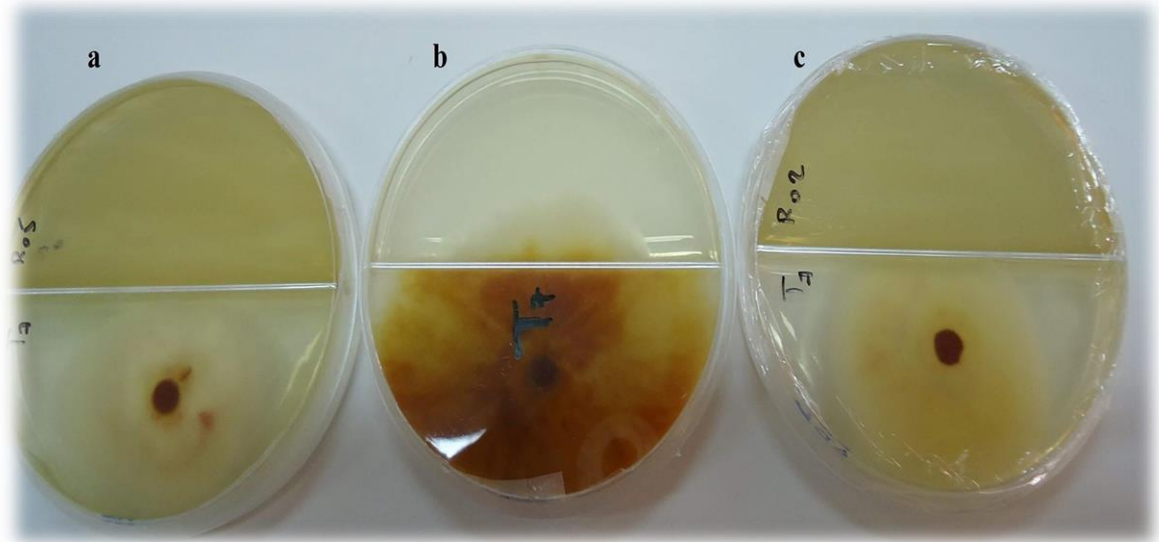


Figure 8. Confrontation indirecte entre les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents et *T7*.

a-T₇-R₀₅

b- T₇ -Témoin

c-T₇-R₀₂

4.2. Effet sur la sporulation

Sur le milieu liquide MH, les quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont inhibé la croissance mycélienne de *Fusarium* par rapport au témoin, cette l'inhibition a été enregistré par toutes les souches antagonistes atteint 100%, nous avons observé une véritable croissance mycélienne à l'œil nu et la sporulation après observation microscopique que pour le témoin (Tableau 10, Figure 11).

Pour la souche P429 contre BTCR nous avons observé un trouble, après vérification par observation microscopique nous avons observé un mycélium très fin et sans présence de spores (Figure 11) . Nous pouvons noter aussi que le milieu MH change de couleur en présence de *Pseudomonas* spp. et *Fusarium* qui peut être une production de pigment jaune-vert (la fluorescence) (Figure 11).

Tableau 10. Résultat de la croissance mycélienne et la sporulation des souches de *Fusarium*

souches de <i>Fusarium</i> souches bactériennes	<i>BTCR</i>	T ₇
P12	-	-
R₀₂	-	-
R₀₅	-	-
P429	++	-
Témoin	+++	+++

(-) : pas de croissance et pas de sporulation (++) : croissance sans sporulation (trouble)
 (+++) : croissance + Sporulation

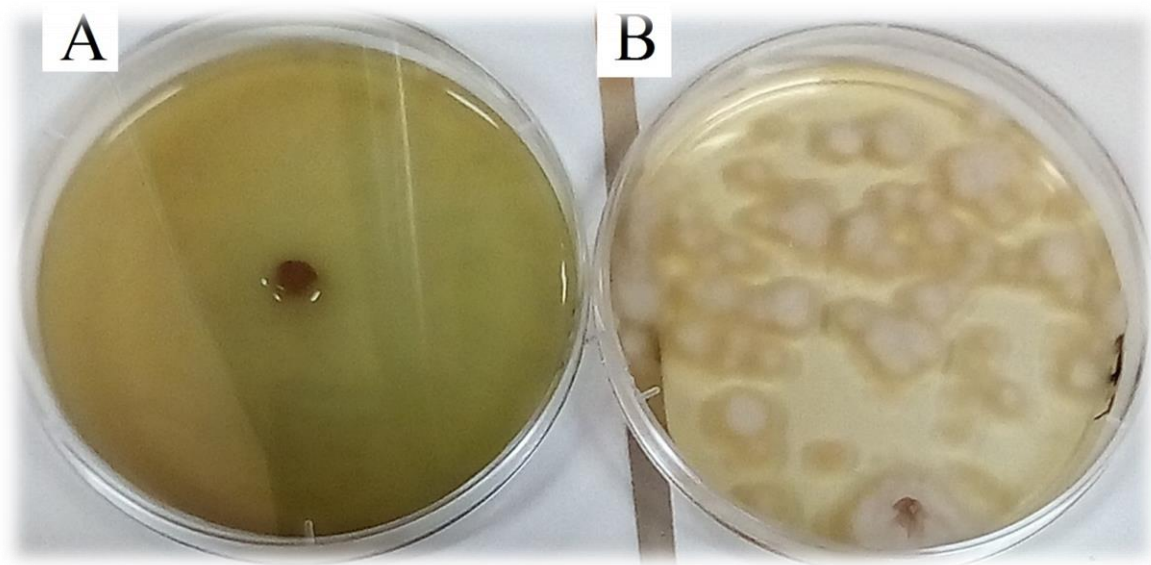


Figure 11. Observation macroscopique de test de sporulation de *Fusarium culmorum* T₇

A- pas de croissance et pas de sporulation; **B-** croissance + Sporulation (témoin non bactériisé)

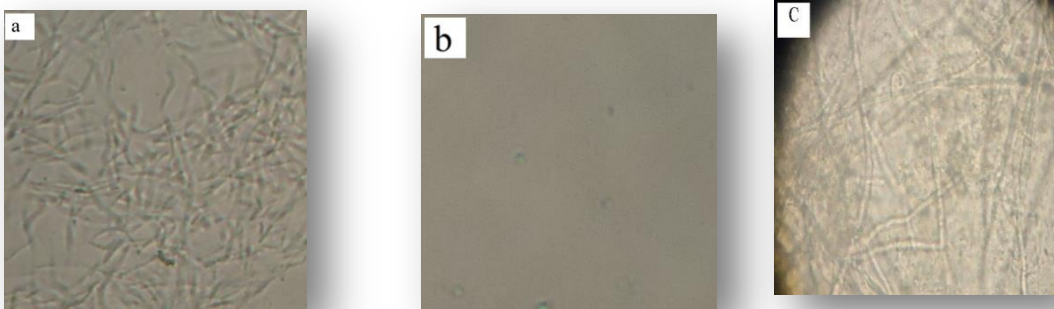


Figure 12. Observation microscopique de test de sporulation de *Fusarium culmorum* T₇

(a) : pas de croissance et pas de sporulation (trouble) (b) : croissance sans sporulation
 (c) : croissance + Sporulation

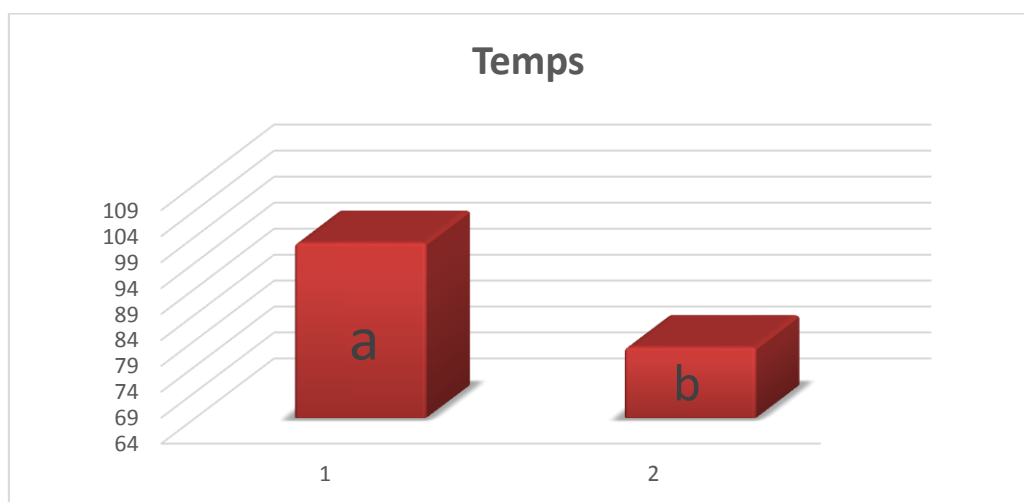
4.3. Effet sur la germination des spores fongique :

Ce test a été réalisé pour quatre souches bactériennes vis à vis *Fusarium culmorum* (BTCR), la germination de ces spores a été évaluée par observation microscopique. L'ensemencement n'a pas été en même temps. Les résultats sont représentés dans le tableau 11.

L'analyse de la variance au seuil de 5% a montré un effet non significatif sur la germination des spores des champignons pour l'ensemble des facteurs étudiés et leur interaction à l'exception du facteur temps. Le test classe le facteur de temps en deux groupes homogènes figure (12). Les résultats obtenus montrent que toutes les souches de *Pseudomonas* testés ont bloqué la germination des spores de *F. Culmorum* quel que soit le milieu de culture utilisé, mais ces souches sont influencé par le temps d'inoculation des bactéries, dans le cas d' inoculation de champignon après 24h d'inoculation des bactéries les résultats sont meilleur que ceux du champignon inoculé en même temps que la bactéries .expliquant ce résultat que l'ensemencement d'inoculum bactérienne avant d'inoculation fongique de 24h , permet aux bactéries de libérer des métabolites antifongiques en inhibant ainsi la germination des spores.

Tableau 8 : Taux d'inhibition de germination des spores des pathogène dans milieu de culture

Souches antagonistes	Milieux	Bactérie inoculée en même temps que le champignon	Bactérie inoculé 24h avant le champignon
P12	KB	92,500	97,5
	PDA	90	96,5
	MH	50	98
R ₀₂	KB	50	96,5
	PDA	10	94
	MH	100	94
AZ4	KB	96,5	91
	PDA	96,5	94
	MH	91,5	88,5
P429	KB	94,5	99
	PDA	98	100
	MH	50	100



Les valeurs suivies de la même lettre appartient aux mêmes groupes homogènes, selon le test de Newman-keuls ($\alpha=5\%$)

Figure 10. Résultat de facteur de temps sur la germination

1 : Bactérie inoculé 24h avant le champignon **2 :** Bactérie inoculée en même temps que le champignon

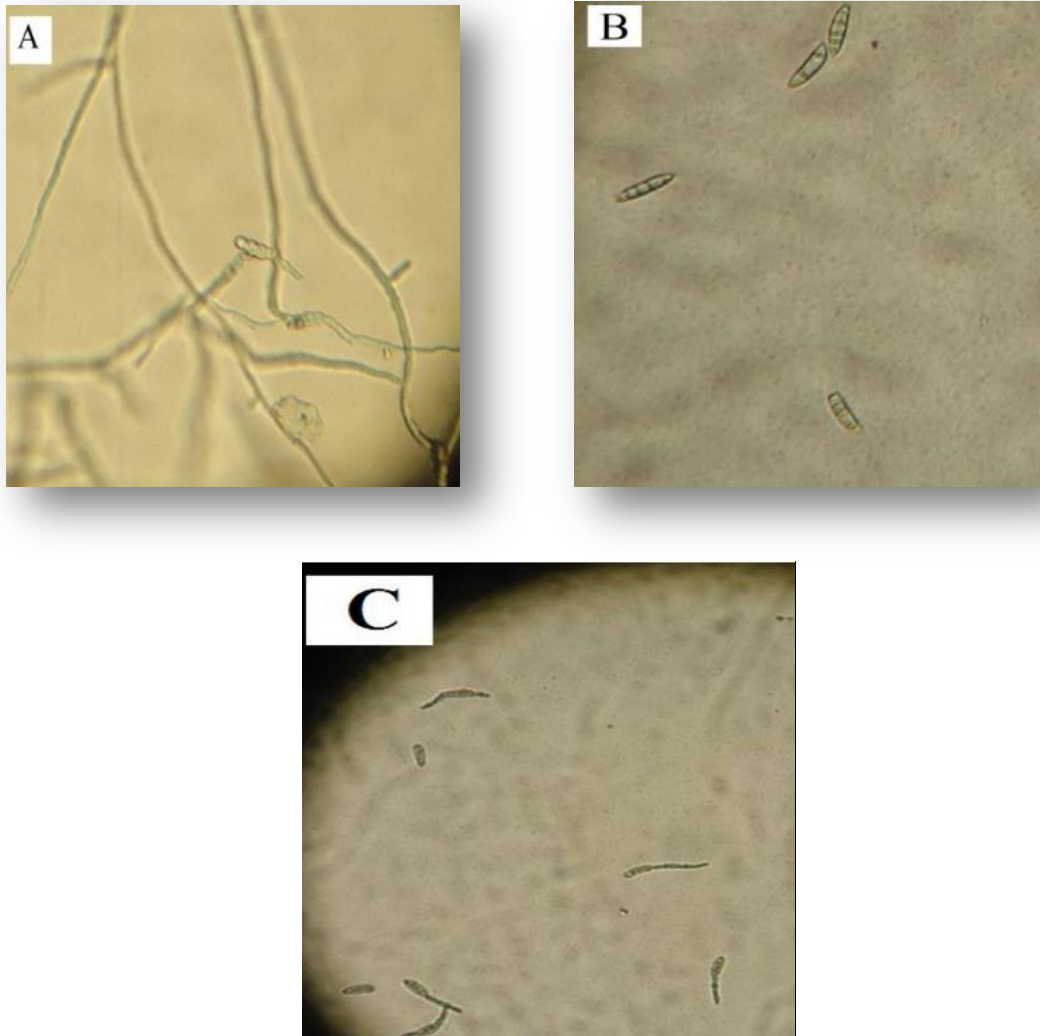


Figure 10. Résultats de l'observation microscopique de la germination des spores de *Fusarium culmorum* BTCR

A : Témoin non bacterisé

B : spores du champignon inoculé 24h après la Bactérie

C : spores du champignon inoculé inoculée en même temps que le bactérie

Discussion

De nombreuses recherches ont concerné *Pseudomonas* qui sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol.

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent un grand nombre de métabolites secondaires (Margraff, 1979) qui prouvaient jouer un rôle dans l'effet antagoniste. Ces agents inhibiteurs peuvent être scindés en quatre groupes : les antibiotiques, les sidérophores, les enzymes et l'acide cyanhydrique (HCN). (Philippe Delfosse et al., 1993)

Cette production des molécules inhibitrices impliquées dans l'antibiose *in vitro* constitue le premier critère ciblé dans un travail de recherche et de screening des rhizobactéries agents potentiels du contrôle biologique de divers pathogènes (Amkraz, 2013). La plupart des *Pseudomonas* spp. fluorescents dont l'efficacité a été prouvée dans le biocontrôle des maladies de plantes, produisent un ou plusieurs antibiotiques autre que les sidérophores (Haas et Défago, 2005). L'activité antifongique de nos souches de *Pseudomonas* fluorescens contre les deux isolats de *Fusarium culmorum* pourrait être fortement liée aux substances inhibitrices telles que les sidérophores, du HCN. En effet le rôle de sidérophore mais aussi à la production d'une substance antibiotique dépendante de la concentration en fer mais le mécanisme le plus classique est que les souches sont capables de réduire la croissance de ces agents en synthétisant des sidérophores sur milieu PDA, l'inhibition de la croissance de *F. culmorum* et n'était pas bien marquée. Ceci s'expliquerait par la vitesse plus importante sur ce milieu en comparaison avec celles développées sur milieu King B et TSA, et très important pour la survie, la persistance et surtout le contrôle du métabolisme du fer des souches productrices (Dowling et O'Gara, 1994).

Les résultats de confrontation obtenus montrent que les bactéries antagonistes testées ont un effet inhibiteur important sur le développement et la sporulation et aussi sur la germination des spores dès les deux souches de l'agent pathogène. La souche R₀₂ a révélé un effet inhibiteur le plus élevé contre le *F. culmorum*. *F. culmorum* BTCR semble être le plus sensible sur le milieu TSA avec un pourcentage d'inhibition de 88%, tandis que *F. culmorum* T₇ semble le plus sensible sur le milieu PDA avec un pourcentage d'inhibition de 69,33%. On peut constater que la croissance de *F. culmorum* est fortement inhibée par *P* spp. fluorescents sur le milieu TSA, alors que dans le milieu PDA, le pourcentage d'inhibition de

ces deux champignons est inférieur par rapport les autres milieux, ceci laisse supposer que le mécanisme d'action de *P. spp. fluorescents* est différent sur les trois milieux de culture. Le fort pouvoir inhibiteur exercé par la souche R₀₂ vis-à-vis du champignon cible sur le milieu King B carencé en fer peut être expliqué par un phénomène de compétition pour cet élément. L'inhibition des champignons sur le milieu carencé en fer peut non seulement être due aux sidérophores, mais aussi à la production d'une substance antibiotique dépendante de la concentration en fer. Mais le mécanisme le plus classique est que les souches sont capables de réduire la croissance de ces agents en synthétisant des sidérophores. Sur milieu PDA, l'inhibition de la croissance du *F. culmorum* n'était pas bien marquée. Ceci s'expliquerait par la vitesse de croissance plus importante de ces champignons sur ce milieu en comparaison avec celles développées sur le milieu King B et milieu TSA.

Le compartimentage évite le contact entre la gélose supportant la bactérie et la gélose sur laquelle se trouve le champignon. En empêchant ainsi la diffusion de substances dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite (HCN) par la bactérie pourra dans cet essai provoquer une inhibition de la croissance du champignon. Les résultats obtenus à la suite de cette expérience sont indiqués que malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats de *Fusarium* et les bactéries, l'activité antifongique de nos *Pseudomonas* contre les deux isolats de *Fusarium culmorum* peut être fortement liée aux substances volatiles, telle que du HCN. Elles sont capables de limiter et même de stopper le développement des agents pathogènes. Ces derniers ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies fongiques à des taux de l'ordre de 83,15%.

De même, des chercheurs ont mis en évidence la production d'une substance volatile par la souche *P. polymyxa E681*. En effet, Les résultats ont démontré pour la première fois que cette souche produit un mélange volatil qui peut améliorer la croissance des plantes et susciter une résistance systémique induite contre *Pseudomonas syringae* en l'absence de contact physique avec les plantes (Lee B *et al* ;2012).

La technique de confrontation en milieu liquide confirme les résultats des confrontations en milieu solide. Les résultats obtenus aussi démontrent que même en confrontation en milieu liquide les *Pseudomonas spp fluorescent* peut exercer un effet inhibiteur sur le développement du pathogène. L'étude des mécanismes impliqués dans la relation antagoniste a révélé que le *Pseudomonas* par antibiose en libérant des substances volatiles et non volatiles actives sur la croissance mycélienne et la germination des conidies.

La réduction de nombre de spores peut être en relation avec la quantité de substances antifongiques sécrétées par les bactéries antagonistes qui inhibent la division des spores et leur germination. Les observations microscopiques ont montré aussi l'efficacité des bactéries antagonistes sur la germination des spores des deux souches de *Fusarium culmorum* à des taux de 100% au bout de 20h, alors que sans traitement bactérien les spores ont germé pour donner naissance aux hyphes mycéliens.

Les sidérophores microbiens peuvent stimuler directement la croissance des plantes en augmentant la disponibilité du fer dans le sol entourant les racines ou indirectement par inhibition compétitive de la croissance des pathogènes des plantes en piégeant le fer et le rendant moins disponible pour les agents pathogènes (Fgaier et Eberl, 2011).

Le test des siderophores a révélé que tous les souches pseudomonas fluorescents analysés produisent des siderophores à des taux variables. Un résultat similaire a été obtenu par (Omidvani *et al.*, 2010, Bholay *et al.*, 2012, Mezzache, 2012.), qui ont conclu que *Pseudomonas* fluorescents produisent des siderophores type Hydroxamate.

L'antagonisme induit par la production de siderophore, impose l'expression du phénotype d'inhibition de la croissance du micro-organisme phytopathogène visé, uniquement en absence de fer (Kloepper *et al.*, 1980). (Jenifer *et al.* 2013).

Un autre métabolite secondaire synthétisé par certaines rhizobactéries est l'acide cyanhydrique. Bien que ce composé soit un inhibiteur métabolique général, il est excrété comme moyen d'éviter la prédation ou la compétition (Heydari *et al.* 2008).

La production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression de différents d'agents pathogènes. 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) et peut agir comme un inducteur de résistance végétale (Kumar *et al.*, 2012). Les résultats de ce test ont montré que, les souches P12, R₀₂ et R₀₅ ont productrice l'HCN, les autres souches se sont avérées incapables de produire ce composé volatile. Ceci serait la conséquence de l'inexistence de gènes (hcn) responsables de la synthèse de ce métabolite (Laville *et al.*, 1998) ou bien de l'absence d'un précurseur adéquat (Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986). La variabilité de l'expression des gènes (hcnA, hcnB et hcnC) expliquerait la différence dans la production de HCN entre les souches de *Pseudomonas* (Ramette *et al.*, 2003). Cette

variabilité permet la classification des bactéries en deux groupes : les producteurs faibles et les producteurs forts.

Nous avons constaté que la souche P429 non productrice de HCN a révélé un effet inhibiteur de la croissance mycélienne par confrontation indirecte ce qui nous conduit à chercher d'autre métabolite volatile que l'HCN jouant un rôle dans l'antagonisme.

L'HCN empêche le fonctionnement approprié des enzymes et le récepteur naturel par le mécanisme réversible de l'inhibition (Defago, 1974). On le connaît également pour empêcher l'action du cytochrome oxydase (Gebring et al., 1993). Dix *Pseudomonas* fluorescents isolées à partir de rhizosphère du tournesol, pomme de terre et du maïs ont été capable d'augmenter la croissance de plants et de supprimer la nécrose du collet du tournesol à travers un mécanisme de suppression de la maladie par production d' HCN (Shivani *et al.*,2005).

Yuan *et al.*, (2012) ont noté que les composés volatils produits par les bactéries a réduit la croissance du mycélium et inhibé la germination des spores de *F. oxysporum*. Les souches bactériennes ont montré une forte activité contre ce champignon. L'effet antagoniste peut être dû à la synthèse d'autres antibiotiques tels que la phénazine carboxylique, la pyrrolnitrine et pyolutéorine (Haas et Defago, 2005). D'après nos résultats d'antibiogramme les extrait d'antipolitique contre les bactéries EC et BC et ML .Ont révèlent que la plus petite zone d'inhibition est observée contre E.coli qui montre que cette souche a résisté aux antibiotiques, les bactéries BC et ML ont montré une sensibilité élevée aux antibiotiques de *Pseudomonas* testés, La variabilité dans l'inhibition observée entre les souches, peut être expliquée par la quantité et l'efficacité de l'antibiotique produit, et/ou par la nature de la paroi de ces souches, soit Gram positif ou Gram négatif. En effet, ces dernière possèdent une perméabilité sélective ; la surface des lipopolysaccharide contient des charges négatives qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage de molécules à haut poids moléculaire (Garret et Grisham,2000).

La lyse des champignons par les rhizobacteries est facilitée par la production d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les parois des cellules fongiques.

Le rôle des métabolites antimicrobiens dans la suppression du flétrissement de la lentille du à *Fusarium oxysporum* a été rapporté dans des conditions *in vitro* (Rao *et al.*, 1999). Pal *et al.* (2000) ont rapporté que les pigments fluorescents et les antibiotiques antifongiques ont été produits par *Pseudomonas glumes* responsable du biocontrôle de *R. solani*. Ahmad zadeh

et al., (2004) en étudiant la production de métabolites antimicrobiens par les *Pseudomonas* ont observé que 15 sur 19 isolats ont pu produire le phloroglucinol -du diacétyle 2-4. La Production du 2-4 phloroglucinol diacétylique par des *Pseudomonas* isolés de la rhizosphère du tabac était également enregistrée par Ramette *et al.* (2006).

Le Pseudomonas spp. fluorescents, bactérie aérobie stricte et libre dans le sol. C'est une bactérie rhizosphérique phytoprotectrice des plantes (PGPR).

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance et sporulation et germination des spores.

Cette étude a montré l'effet nettement antagoniste *in vitro* de *Pseudomonas spp.* fluorescents vis-à-vis de *Fusarium culmorum*, agents responsables de la fusariose du blé. En effet, les essais de confrontations entre les souches bactérienne et les deux souches fongiques que ce soit d'une façon directe sur milieu de culture ou bien à distance, ont révélé une inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes testés. Dans le cas de la confrontation à distance, malgré l'absence d'un contact direct entre les pathogènes et l'agent antagoniste, une réduction du diamètre des colonies des mycètes est observée par rapport au témoin non traité. Les bactéries antagonistes produisent aussi des composants volatils capables de réduire la croissance de *Fusarium*. En outre, la sensibilité des souches du *F.culmorum* à certains extraits d'antibiotiques de ces bactéries antagonistes.

Les bactéries antagonistes de *P. spp.* fluorescents ont montré également une capacité à inhiber la sporulation et la germination des spores de *Fusarium culmorum* qui jouent un rôle primordial dans l'incidence de la fusariose de l'épi de blé. Ce travail a permis aussi d'explorer la capacité des bactéries du *Pseudomonas* en particulier les souches R_{02} à réduire la croissance des *Fusarium culmorum*.

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe estimée varie de 88% enregistré par l'interaction de la souche R_{02} avec la souche fongique T_7 sur milieu TSA et 83,15% enregistré sur le milieu KB, à 81,33% enregistré sur le milieu PDA.

L'étude de la sporulation de *Fusarium culmorum* soumis à l'effet antagoniste des souches bactérienne montre qu'il n'y a pas de sporulation des souches fongiques testés.

Les résultats de la germination des spores de *Fusarium culmorum* ont montré que les meilleures valeurs enregistrées en absence des souches antagonistes (Témoin). Dans certaines interactions, le taux d'inhibition atteint les 100% tel est le cas avec les souches R_{02} , P429.

Dans manière générale l'activité phytoprotection de *Pseudomonas* spp fluorescent se basent sur la production des métabolites secondaire impliquées dans l'inhibition des pathogènes via la production des sidérophores ou /et via la production des antibiotiques tel que le phénazine ou par la production de L'HCN.

Sachant que nos souches synthétise des sidérophores et des antibiotiques comme la phénazin et certaines produisent de l'HCN et qui ont pour aptitude à réduire la croissance mycélium et la germination des spores de *Fusarium culmorum*.

En se basant sur ces résultats, il est souhaitable de poursuivre cette étude par la confirmation des résultats de la confrontation avec les souches R02 et R05 et P429 comme agent de lutte biologique pour contrôler les pathogènes des plantes ; en élargissant les essais d'antagonisme par des *Pseudomonas* sur une gamme plus variés des *Fusarium* pathogènes ; ainsi que de tester l'effet *in vivo* des souches *Pseudomonas* sur la croissance des *Fusarium* pathogènes et le développement des maladies fongiques ; et continue l'étude par des essais d'antagoniste *in vivo* contre le *Fusarium culmorum* et les autre pathogène pour confirmer les résultats des essais *in vitro* ; sans négliger l'étude des gènes responsable de la biosynthèse de l'HCN et les autres métabolites chez les *Pseudomonas* impliquée dans la suppression de différents d'agents pathogènes.

Références bibliographiques

1. Antoun H., Bordeleau L. M., et Gagnon C., 1980. Identification d'un isolat d'actinomycète par la caractérisation partielle d'un antibiotique qu'il produit. *Phytoprotection*. 61, 79-87
2. Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. et Gardan, L., 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 5163.
3. Bitter, W., Marugg, J.D., de Weger, L.A., Tommassen, J. and Weisbeek, M. P. J., 1991. The ferric-pseudobactin receptor PUPA of *Pseudomonas putida* WCS358 : homology to TonB-dependent *Escherichia coli* receptors and specificity of the protein. *Mol. Microbiol.* 5: 647-655.
4. Bender .C.L.,and Rangaswamy V.,1999 . Polyketoole production by Plant associated *Pseudomonas* *Anh.Rev. phytopathol.*37 :175 -196 .
5. 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.
6. Budzikiewicz, H., 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 209–228.
7. 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.
8. Bakker, P. A. H. M., Schippers, B. and Weisbeek, P. J., 1988. Siderophore production by plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *J. Plant Nutr.* 11: 925–933
9. Budzikiewicz, H., 1997. Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z.Naturforsch* 52 (C): 713–720.
10. Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L. and Cook, J.C., 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78: 302-308.
11. Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. 1ère édition, INRA, Paris.
12. Digat B, Gaudillat M, Labadie JM (1990) Susceptibility of various tomato and lettuce genotypes to plantgrowth-promoting *Pseudomonas*. *Symbiosis* 9, 295-303
13. Defago, G., 1993. 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* 42: 311–312.
14. Delaney, S.M., Mavrđi, D.V., Bonsall, R.F. and Thamashow , .L.S. , 2001.phzO ,a gene Compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 . *J Bacteriol*, 183 :318-327 .
15. Defago and Haas, 1990 .,G. Defago, D. Haas *Pseudomonads* as antagonists of soil-borne plant pathogens: mode of action and genetic analysis *Soil Biochem.*, 6 (1990), pp. 249-291 .
16. Defago G.,Berling C .H Burger U., Haas ,D., Kahr G ., Keel C ., Voisard C., Witter P.,

17. Eyquem ,A., Alouf.J ., et Montagnier.J.L., 2000. Traité de microbiologie clinique. Deuxièmes mises à jour et compléments. PICCIN, p : 238
18. Ginard M, Lalucat J, Tummler B. Romling U., 1997. Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*47:132–143
19. Garbaye, J., 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis (Tansley review,76). *New Phytologist*, 128: 197-210.
20. Grimes HD, Mount MS (1987) Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biol Biochem* 6, 27-30
21. Garbaye J, Bowen GD (1987) Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. *Can J For Res* 17, 941-943
22. Garbaye, J., 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210.
23. 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.
24. Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.M.K. and Pasternak, J.J., 1994. 1-Aminocyclopropane-l-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* 40: 911-915
25. Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J., 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190: 63-68.
26. Höfte M, Boelens J, Vestraete W (1991) Seed protection and promotion of seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2 and ANP15. *Soil Biol Biochem* 23, 407-410
27. Howell CR, Okon Y (1987) Recent results of greenhouse and field trials on bacterial-induced plant growth promotion with no obvious symptoms of plant disease. In: *Proc Int Workshop PGPR*. Ontario,Canada, 29-33
28. Hammer K.A ., Carson C.F. , and Riley T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oil and other plant extracts. *J. Applied Microbiol* 86 : 985-990.
29. Haas, D. et Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319. Lugtenberg, B.J., Chin, A. W.T.F. and Bloemberg, G.V., 2002. Microbeplant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81:373-383.
30. interactions. In: *Biological control of*
31. Jourdan, E., M. Ongena, et P. Thonart. , 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12:437-449.
32. Kloepper, J.W. (1994). Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In Y. Okon (dir.). *Azospirillum/plant associations*. (p. 111-118). Boca Raton, FL, USA.
33. Kloepper, J.W., Zablotowick, R.M., Tipping, E.M., et Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In D.L. Keister, et

- P.B. Cregan (dir.), The rhizosphere and plant growth. (p. 315-326). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
34. Kloepper, J.W. (1994). Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In Y.
 35. Kloepper, J.W., Zablotowick, R.M., Tipping, E.M., t Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In D.L. Keister, et P.B. Cregan (dir.), The rhizosphere and plant growth. (p. 315-326). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
 36. Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. et Schroth., M.N., 1980. Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4: 317–320
 37. Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN (1980a) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885-886
 38. Kloepper, J.W. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In Y.
 39. Kim, K.Y. and McDonald, G.A., 1998. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Fert. Soils* 26: 79-87.
 40. Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B., 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809-1817.
 41. Knowles, C. J. and Bunch, A. W., 1986. Microbial cyanide metabolism. *Adv. Microb. Physiol.* 27: 73-111.
 42. Kloepper JW, Scher FM, Laliberte M, Tipping B (1986) Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: Iron, siderophores and plant diseases (TR Swinburne, ed) NATO ASI Series A, Life Sci, Plenum Press, New York, 351, 155-164
 43. Lee B., Farag M.A., Park H.B., Kloepper J.W., Lee S.H. et Ryu C.M. Résistance systémique induite contre *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* par une longue chaîne bactérienne volatile émise par *Paenibacillus polymyxa* dans *Arabidopsis thaliana*. Les progrès récents en engrais biologiques et fongicides biologiques (PGPR) pour une agriculture durable. Actes du 3ème Conférence asiatique sur la croissance des plantes-Promouvoir Rhizobacteria (PGPR) et d'autres agents microbiens, Manille, Philippines, 21-24 (2012) 462-468
 44. Lim, H.S., Kim, Y.S. et Kim, S.D., 1991 *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 510–516
 45. Linderman RG, Paulitz TC (1990) Mycorrhizalrhizobacterial
 46. Leong J (1986) Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 24, 187-208
 47. Leeman M, Scheffer RJ, Schippers B (1991) Control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens* WCS374, in greenhouse trials. In: Plant growth-

- promoting rhizobacteria-progress and prospects (C Keel, B Koller, G Defago, eds) IOBC/ WPRS, XIV/8, 34-38
48. Lugtenberg, B., et F. Kamilova., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
 49. Lemanceau P, Alabouvette C (1991) Biological control of Fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protec* 10,279-286
 50. Lewis, T.A., Cortese, M., Sebat, J., Green, T., Lee, C.H. and Crawford R.L., 2000. A *Pseudomonas stutzeri* gene cluster encoding the biosynthesis of the CCl₄-dechlorination agent pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid). *Environ. Microbiol.* 2: 407–416
 51. Loper J.E., Gross H. ,2007 . Genomic analysis of antifunga métabolite production by *Pseudomonas fluorescens* pf-5 . *Eur J Plant pathol*, 119 : 265-281 .
 52. Loper J.E., Gross H, 2007.Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas* pf-5. *Eur J Plan pathol* , 119 :267-281.
 53. Mercado-Blanco, J., et P.A.H.M. Bakker., 2007. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek.* 92: 367-389
 54. Mamoun M, Olivier JM (1992) Effect of soil pseudomonads on colonisation of hazel roots by ectomycorrhizal species *Tuber melanosporum* and its competitors. *Plant Soil* 139, 265-273
 55. Mossialos, D., Meyer, J.M., Budzikiewicz, H., Wolff, U., Koedam, N. and Baysse, C., 2000. Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 487–492
 56. Meyer JR, Linderman RG (1986) Response of subterranean clover to dual inoculation with vesiculararbuscular mycorrhizal fungi and a plant growthpromoting bacteria, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol Biochem* 18, 185-190
 57. Mercado-Blanco, J., van der Drift, K. M.G.M., Olsson, P.E., ThomasOates, J.E., van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M., 2001. Analysis of the pmsCEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* 183:1909–1920.
 58. Mavrodi,D.V.,V.N. Kezenzenko , R.F.Bonsall , R.J.Cook,A.M Boronin,and L.S. Thomashow.1998. Aseven gene locus for synthesis of phenazine-1- carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79.*J.Bacteriol* .180 :2541-2548.
 59. Mc Spadden Gardener ,B., and Fravel ,D .R. 2002. Biological control of plant pathogens ;Researsch commercialization and application in the USA . *Onlin.Plant Health progresse* :10 :1094
 60. Natsh A., Keel C., Hanspetera P., Dieter., et gene V.D., 1994. Cotibution of the global regulator gen *gac A* to persistence and dessimination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CH 10 ontroduced into soil microsomes. *App. Envir. Microbiol.* 60(7): 2553-2560.

61. Nielsen, M.N. et Sorensen, J., 1999. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 30, 217–227
62. Nielsen K, et al., 1998 Sustained oscillations in glycolysis: an experimental and theoretical study of chaotic and complex periodic behavior and of quenching of simple oscillations. *Biophys Chem* 72(1-2):49-62
63. Neilands JB, Leong SA (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu Rev Plant Physiol* 37, 187-208
64. Okon (dir.). *Azospirillum/plant associations*. (p. 111-118). Boca Raton, FL, USA.
65. Oliveira E, Sieverding E, Toros (1987) Interaction between three species of VAM fungi and an isolate of *Pseudomonas putida* on cassava. In: *Proc 7th North Am Conf Mycorrhizae* (DM Sylvia, LL Hung, JH Graham, eds) Univ Florida, Gainesville, FL 216
66. Piccolo A., Spaccini R., Haberhauer G. et Gerzabek M. H. (1999) – Increased sequestration of organic carbon in soil by hydrophobic protection. *Naturwissenschaften*. 86: 496-499.
67. 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.
68. Philippot, L., Clays-Josserand, A. and Lensi, R., 1995. Use of Tn5 mutants to assess the role of the dissimilatory nitrite reductase in the competitive abilities of two *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1426–1430.
69. Polonenko DR, Scher FM, Kloepper JW, Singleton CA, Laliberté EM, Zaleska I (1987) Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. *Can J Microbiol* 33, 498-503
70. Raj J, Bagyaraj DJ, Manjunath A (1981) Influence of soil inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza and a phosphate-dissolving bacterium on plant growth and 32P-uptake. *Soil Biol Biochem* 13, 105-108
71. 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
72. Ramos Solano, B., J. Barriuso Maicas, M.T. Pereyra de la Iglesia, J. Domenech, et F. J. Gutiérrez Mañero., 2008 . Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*. 98: 451-457.
73. Rahm Bernd H.A., 2008 .*Pseudomonas* .Model Organism pathogen . Cell Factory. Edited by WILEY.VCH. Verlag GmbH et Co.kGaA. P : 144
74. Sakthivel, N. et Gnanamanickam, S.S., 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for the enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.). *Appl Environ Microbiol* 53, 2056–2059.
75. soil-borne plant pathogens (D Hornby, ed) CAB,Int, 261-283
76. Schroth MN, Hancock JG (1982) Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* 216, 1376-1381
77. Suslow TV, Schroth MN (1982b) Rhizobacteria of sugarbeet: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72, 199-206

78. Sakthivel N, Gnanamanickam SS (1987) Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L). *Appl Environ Microbiol* 53, 2056-2059
79. 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.
80. Shah, S., Li, J., Moffatt, B.A. and Glick, B.R., 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growthpromoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 44: 833-84
81. Tarchitzky J., Hatcher P. G. et Chen Y. (2000) - Properties and distribution of humic substances and inorganic structure- stabilizing components in particle-size fractions of cultivated Mediterranean soils. *Soil Science.* 165:328-342
82. Van Peer R, Niemann CJ, Schippers B (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCS417r. *Phytopathology* 81, 728-734
83. Van Loon, L.C., et P.A.H.M. Bakker., 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, p. 39-66. In Z.A. Siddiqui (ed.), *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer Science Dordrecht, The Netherlands.
84. Voisard, C, Keel, C, Haas, D. and Défago, G., 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8:351–358
85. Weller, D.M. et Cook, R. J., 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* 73:463-469
86. Weller DM, Cook RJ (1986) Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, and implications of *Pythium* control. *Can J Plant Pathol* 8, 328-334
87. Xu GW, Gross DC (1986b) Field evaluations of the interactions among fluorescent pseudomonads, *Erwinia carotorova*, and potato yields. *Phytopathology* 76, 423-430

1. Vers la compréhension des dialogues microbiens dans l'écosystème sol:
étude de l'interaction entre *Streptomyces* et *Pseudomonas*

Towards the understanding of microbial dialogues within soil ecosystem:
study of the interaction between *Streptomyces* and *Pseudomonas*

Soutenance publique prévue le 16 Septembre 2014 devant la commission d'examen
: par Justine GALET

2. Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *Pseudomonas aeruginosa*

Présenté et soutenu par : Boudouda Rahma Le : 16/06/2015

3. Étude de l'activité antibactérienne et antifongique d'une collection d'actinomycètes

Année universitaire 2015 - 2016

Présenté et soutenu par :

Le : 30 /06/2016

Mlle ZERGANE Nousseiba Mlle BOUHIDEL Rayane

4. Afrique SCIENCE 10(3) (2014) 243 - 255

1. Milieu King B (King et al. 1954)

C'est un milieu semi sélectif. Il se compose de:

Peptone dite "B"	20,0g
Glycérol	10,0ml
Hydrogénophosphate de potassium	1,5g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1,5g
Agar	12,0g
Eau distillée	qsp 1000ml

PH 7,2

2. Milieu de la gélose nutritive (GN) (Lapage & Mitchell, 1970)

C'est un milieu non sélectif contenant une base nutritive ordinaire permettant la culture des bactéries non exigeantes comme les Pseudomonas. Il se compose de:

Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure	3,0g
Peptone	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar	15,0g
Eau distillée	qsp1000ml

pH 7,4

3. Milieu Mueller Hinton (Kirby & Bauer, 1966)

C'est un milieu utilisé pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Il se compose de:

Infusion de viande de bœuf	300,0g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon	1,5g

Agar	17,0g
Eau distillée	1000ml
pH	7,0

4. Milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA)

Le PDA est le milieu usuel de culture pour la plupart des champignons. Il contient de la pomme de terre, du sucre sous forme de dextrose et de la gélose (Agar). Il se compose de :

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
L'eau distillée	1000 ml

5. Milieu TSA (Tryptic Soy Agar)

Milieu d'utilisation générale permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de Microorganisme. Il compose de :

Tryptic-soy-Agar	40 g
Glycine	4,4 g
Eau distillée	1000 ml

Tous les milieux autoclaver pendant 20 min à 120°C.

INTRODUCTION

MATERIEL ET METHODES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CONCLUSION

REFENECE

RESULTAT ET DISCUSION

ANNEXE