

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat  
Faculté des Sciences  
Département d'Agronomie

جامعة عمار ثليجي - الأغواط -  
كلية العلوم  
قسم العلوم الفلاحية



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

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

### ***Thème***

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

Présentés par Sila Abdelkader et Bezli Hadj Aissa.

(Le 21/09/2014)

Encadrés par :

Encadreur : M<sup>elle</sup> Ameer Djamila (Maître-assistant A),

Co-Encadreur : M<sup>r</sup> Moulai Adel (Maître-assistant A).

**Sila Abdelkader et Bezli Hadj Aissa**

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

Notre travail a été effectué dans la région « El Assafia » Laghouat, sur le sol rhizosphérique des trois espèces de plantes spontanées (*Astragalus armatus*, *Retama raetam* et *Peganum harmala*), pour l'isolement et l'identification de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Nous avons isolé et purifié 22 isolats bactériens, après les tests physiologiques et biochimiques, la comparaison de résultats obtenus avec les clés A et B proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995) et le protocole de Schaad et al, 2001, pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, nous avons sélectionnés 05 isolats (A2P1, A5P3, B3P1, B4P5 et C5P1) comme étant des *Pseudomonas* spp. fluorescents. De plus, nous avons testé l'activité antifongique pour (14) isolats contre deux souches des champignons « *Fusarium* ». Ces tests ont donnés des résultats positifs différentiels sur l'inhibition de croissance mycéliens des champignons.

Nous avons réalisé une identification préliminaire pour nos isolats, selon les clés ces isolats pourraient être des *P. chlororaphis*, *P. fluorescences* biovar II ou biovar IV, pour plus de précision nous suggérons d'utiliser d'autres moyens (plaque API 20, des analyses génétiques). Concernant les tests d'antagonisme la souche L17 présente un taux d'inhibition très important (jusqu'à 95%), nous suggérons de faire des études supplémentaires sur cette souche dans le domaine de lutte biologique.

**Mots-clés:** plante spontanée, Isolement, *Pseudomonas fluorescens*, Rhizosphère, activité antagonique, fusarium.

صليح عبدالقادر ; بزلي الحاج عيسى

(ملخص: عزل و خصائص تصنيف البسودوموناس المشعة من منطقة الجذور (الريزوسفير) لبعض النباتات البرية, وتجربة فعاليتها في المنافسة).

أجرينا دراستنا في منطقة العسافية بالأغواط, على التربة الملتصقة بالجذور(الريزوسفير) لثلاث أنواع من النباتات البرية, من أجل عزل و تصنيف البسودوموناس المشعة. بعد عزل و تحديد هوية البكتيريا, تحصلنا على 22 معزولة, وبعد التحاليل البيوكيميائية الكلاسيكية الأولية, التحاليل الفيزيولوجية و البيوكيميائية و باستعمال مفاتيح التصنيف المقترحة من طرف جاك 1994 و بوسي 1995 و شاد 2001 قمنا باختيار 05 معزولات بكتيرية كبسودوموناس مشعة (A2P1, A5P3, B3P1, B4P5 و C5P1) كما قمنا بإجراء مجموعة من التجارب تحت غطاء التضاد الفطري و الذي اعطى نتائج ايجابية متفاوتة في كبح نمو الفطريات. لقد قمنا بتحديد هوية هذه المعزولات تحديد اولي. حيث يمكننا القول استنادا للمفاتيح المستعملة أنا هذه المعزولات قد تكون بسودوموناس chlororaphis, بسودوموناس biovar I او biovar IV لمزيد من الدقة يمكن الاعتماد على وسائل أخرى مثل التحليل الجينية و Plaque API 20. بالنسبة لتجارب التضاد لدينا المزولة L17 التي أعطت قيمة تضاد فطري وصلت إلى 95 % من اجل هذا يستلزم أن يكون في المستقبل تجارب تكميلية على هذه المعزولة.

الكلمات المفاتيح : النباتات البرية, البسودوموناس المشعة, الريزوسفير. عزل. التضاد الفطري.

**Sila Abdelkader; Bezli Hadj Aissa.**

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

Our work has been elaborated in "Elassafia" area. Laghouat. On the rhizospherical soil of three spontaneous plant species (*Astragalus armatus*, *Retama raetam* et *Peganum harmala*), to isolate and identify the fluoesent of *Pseudomonas spp. Fluorescents*, We have isolated and purified 22 bacterial isolates, After physiological and biochemical tests. The comparison of results obtained with A and B keys proposed by Jacques (1994), Bossis (1995) and the diagram of Schaad (2001), for the identification of *Pseudomonas* spp. fluoescents fluorscent saphocytes has enabled us to select 05 isolats (A2P1, A5P3, B3P1, B4P5 and C5P1). As being fluorescent pseudomonas spp. in addition to this we have tested the antifungic activity for 14 isolats against two root stock of fungi "*Fusarium*" these tests have given differential positive results on the inhibition growing of mycelial mushrooms.

We conducted a preliminary identification for our isolates, according to the key these isolates could be *P. chlororaphis*, *P. fluorescence* biovar II and biovar IV, for more accuracy we suggest using other means (API plate 20, the genetic analyzes). Regarding testing of antagonism L17 strain has an important inhibition level (up 95%), it is suggested that further study of this strain in the field of biological control.

**Key-words:** Isolates, *Pseudomonas fluorescent*, Rhizosphere, spontaneous plant, *Fusarium*.

## ❧ Remerciements ❧

*En préambule à ce mémoire nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous à donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.*

*Les premières personnes que Je tiens à remercier mes encadreur M<sup>elle</sup> Amur Djamila et M<sup>r</sup> Maulâi Adel pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'ils trouvent dans ce travail un hommage vivant de leur haute personnalité.*

*Nous exprimant nos profonde reconnaissance à tous les membres du Jury M<sup>elle</sup> Zaza et M<sup>r</sup> Rahmani qui sont aussi nos enseignants nous leurs devant un grand respect.*

*Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos sincères remerciements aux corps professoral de département d'agronomie sur tout à madame Touati Siham pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.*

*Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

*Tout d'abord je remercie D.F.E.U, d'avoir pu achever*

*ce*

*Modeste mémoire, que j'espère qu'en le consultant vous*

*Trouvez un sentiment de joie.*

*Je tiens à dédier ce travail à :*

*Ma très chère mère, et mon père, pour leurs*

*Soutiens inconditionnels grâce au quel, j'ai la chance De  
réaliser mes études, chacun de leurs manières . Mes chers  
frères Mohamed et Hocine et ma belle sœur Anfal et*

*ma tante Rahma Et à*

*Ma chère Sarah*

*Je tiens aussi à remercier mes amis Abdelkader Saila et*

*Choaib Mechrouia et Ladjal Abdelkader. et Islam*

*Wadahi*

## ∞ Dédicaces ∞

*Je dédie le fruit de ce modeste travail à :*

*Vous qui m'avez bien éduquée ;*

*Instruite et m'avez tracé un chemin plein de lumière sans obstacles ;*

*C'est pour vous montrer ma gratitude et ma reconnaissance, pour ce que vous avez fait pour moi et pour ce que vous avez fait de moi :*

*Aux prunelles de mes yeux : Mon père et ma mère ;*

*Mes très chères partenaires familiaux ;*

*Mes sœurs et mes frères ;*

*Les gens qui m'ont accompagné Choib mechraoui ;*

*Brik Abdelhamid ; Aissa Bezli ; Leajale Aek ; Lamri Mohamed ;*

*Sans oublier mon cher ami M<sup>r</sup> Mahi Brahim.*

*« Soit la miséricorde de DIEU autour de lui »*

*Les futures cadres supérieures ;*

*Mes collègues et mes ami(e) s ;*

*Qui seront toujours dans mon cœur.*

*Abdelkader.*

## *Liste des tableaux*

**Page**

<b>Tableau 1.</b> La biomasse de différentes matières vivantes dans le sol.....	4
<b>Tableau 2.</b> Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> (depuis 2004).....	18
<b>Tableau 3.</b> L'origine des échantillons de sol.....	26
<b>Tableau 4.</b> Résultats des tests d'identification.....	39
<b>Tableau 5.</b> Les résultats de tests LOPAT.....	42
<b>Tableau 6.</b> Résultats globaux des tests biochimiques et physiologiques pour les 05 isolats retenus.....	43
<b>Tableau 7.</b> L'activité antagoniste des souches bactériennes vis-à-vis des deux champignons (KB).....	44
<b>Tableau 8.</b> L'activité antagoniste des souches bactériennes vis-à-vis des deux champignons (PDA).....	45

<b>Figure 1.</b> Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère.....	17
<b>Figure 2.</b> Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions : <i>Pseudomonas</i> de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol.....	21
<b>Figure 3:</b> Technique de suspensions-dilutions.....	27
<b>Figure 4.</b> Schéma de détermination des différents genres bactériens proposé par (Schaad <i>et al</i> , 2001).....	29
<b>Figure 5:</b> la clé dichotomique (A) proposé par Jacques (1994) pour l'identification des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	30
<b>Figure 6.</b> Clé dichotomique (B) proposé par Bossis (1995) pour l'identification des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	30
<b>Figure 7.</b> Technique du test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	37
<b>Figure 8.</b> Photo de résultats de croissance en anaérobiose.....	38
<b>Figure 9.</b> Photo de résultat du test pectinase.....	40
<b>Figure 10.</b> Photo représente les résultats de test d'hypersensibilité sur tabac.....	41
<b>Figure 11.</b> Photo de test d'arginine déshydrolase.....	41
<b>Figure 12.</b> Photo de Test d'oxydase.....	42
<b>Figure 13.</b> Le taux d'inhibition des souches testés vis-à-vis le <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (FOA).....	45
<b>Figure 14.</b> Le taux d'inhibition des souches vis-à-vis <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopercisi</i> .....	46

## Liste des abréviations

<b>ADH:</b> Arginine-dihydrolase	<b>INRA:</b> Institut Nationale de Recherche Agronomique
<b>AIA:</b> Acide indole acétique	<b>N<sub>2</sub>:</b> Azote
<b>API:</b> Analyse prohyalactic Index	<b>ITAB:</b> Institut Technique de l'Agriculture Biologique
<b>ARA:</b> Arabinose	<b>LOPAT:</b> Levane, Oxydase, Pecténase, Arginine et hypersensibilité sur Tabac
<b>Bv:</b> Biovar	<b>Rpm:</b> Tour par minute
<b>°C:</b> Degré Celsius	<b>API:</b> Appareil et procédé d'identification
<b>Cm:</b> Centimètre	<b>ADN :</b> Acide désoxyribonucléique
<b>Co<sub>2</sub>:</b> Dioxyde de carbone	<b>ARNr :</b> Acide ribonucléique ribosomal
<b>DRB:</b> <i>deleterious rhizobacteria</i>	<b>PCR :</b> réaction de polymérisation en chaîne
<b>EDS:</b> Eau Distillée Stérile	<b>PGPR :</b> plant growth promoting
<b>Fe:</b> fer	
<b>Foa:</b> <i>Fusarium oxysporum albédinisse</i>	
<b>G-:</b> Gram négative	
<b>G+:</b> Gram positive	
<b>g:</b> gramme	
<b>G+C:</b> Guanine + cytosine	
<b>GN:</b> Gélose Nutritif	
<b>h:</b> Heure	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> Eau oxygénée	
<b>HCN:</b> L'acide cyanhydrique	
<b>HL:</b> Milieu Hugh et Leifson	
<b>HR:</b> Hypersensibilité	
<b>KA:</b> King (A)	
<b>KB:</b> King (B)	
<b>Kg:</b> Kilo gramme	
<b>Km:</b> Kilomètre	
<b>LCD:</b> Lysine-décarboxylase	
<b>LDC:</b> Lysine-décarboxylase	
<b>LPGA:</b> Extrait de Levure, Peptone, Glucose, Agar	
<b>M:</b> Mol	
<b>PGPR:</b> <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>	
<b>µm:</b> micro mètre	
<b>C:</b> carbone	

## Table des matières

Page

Résumés	
Remercîment	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	1
Partie 1. Synthèse bibliographique	
Chapitre 1. Le sol, constituants inerte et êtres vivantes	
Introduction.....	4
1. La biomasse vivante dans le sol.....	4
2. La rhizosphère.....	5
3. Les composés organiques de la rhizosphère.....	5
4. Les microorganismes de rhizosphère.....	5
4.1.Les actinobactéries.....	6
4.2.Les champignons.....	6
4.3.Les bactéries.....	6
5. Rôles de bactéries.....	7
6. La nutrition des bactéries.....	7
7. Le fer et les bactéries.....	7
8. Acquisition du fer par les bactérie.....	8
Conclusion.....	8
Chapitre2. Pseudomonas, caractères et classification	
Introduction.....	9
1. Pseudomonas dans le sol.....	9
2. Caractéristiques métaboliques.....	9
3. Méthodes de la classification.....	10
3.1. Classification par les Caractéristiques phénotypiques.....	10
3.2. Classification génétiques.....	10
4. L'utilisation des Pseudomonas.....	12
Conclusion.....	12
Chapitre 3. Utilisation des P. fluorescents dans la lutte biologique	
Introduction.....	13

c. Notion de la lutte biologique .....	13
1. Les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents agents de biocontrôle et de croissance des plantes.....	15
2. Stimulation de la croissance des plantes.....	16
2.1.Solubilisation des phosphates par les <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents.....	16
2.2.Synthèse de phyto-hormones.....	19
2.3.Dénitrification.....	19
2.4.Les médiateurs de l'absorption de fer par les <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents.....	20
3. Mécanismes d'antagonismes.....	20
4. Métabolites Secondaires possédant des propriétés de biocontrôle.....	22
a. Les phénazines.....	22
b. Phloroglucinols.....	22
c. Pyrolnitrine (PRN).....	23
d. Pyolutéorine (PLT).....	23
e. Mupirocine.....	23
f. Antibiotiques peptidique.....	23
g. Enzymes dégradant les parois fongiques.....	24
5. La régulation d'antibiotique (Quorum Sensing QS).....	24
Conclusion.....	25
Partie 2. Matériels et méthodes .....	26
I. Isolement et identification des <i>Pseudomonas</i> .....	26
1. Prelevement des echantillons.....	26
2. Méthode d'isolement.....	26
3. Purrification .....	27
4. Conservation des isolats.....	28
5. Identification taxonomique des souches .....	28
5.1.Production de pigment fluorescent.....	31
5.2.Tests de gram.....	31
5.2.1. Coloration de Gram.....	31
5.2.2. Test KOH.....	31
5.3.Croissance en anaérobiose.....	32
5.4.Catalase.....	32
5.5.Tests de LOPAT.....	33
5.5.1. Production de levane sucrase.....	33
5.5.2. Oxydase.....	33

5.5.3. Pouvoir pectolytique .....	33
5.5.4. Arginine dihydrolase .....	33
5.5.5. Test d'hypersensibilité sur tabac .....	33
5.6. Test gélatinolyse .....	34
5.7. Dénitrification .....	34
5.8. Test de croissance/ température (4-41 <sup>0</sup> C) .....	34
I. Recherche d'antagonistes .....	35
a. Souches bactériennes utilisées .....	35
b. Isolats cryptogamiques .....	35
II. Sélection des souches antagonistes .....	36
<i>Partie 3. Résultats et discussion</i>	
Résultats .....	38
1. L'isolement .....	38
2. Identification des isolats bactériens .....	38
2.1. Production du pigment fluorescent .....	38
2.2. Résultats de croissance en anaérobiose .....	38
2.3. Résultats de production de catalase .....	39
2.4. Teste de gram .....	39
2.5. Tests de LOPAT .....	41
2.5.1. Production Levane sucrase .....	41
2.5.2. Test de Pécitase .....	41
2.5.3. Test d'hypersensibilité sur Tabac .....	41
2.5.4. Test d'arginine déshydrolase .....	42
2.5.5. Production d'oxydase .....	42
2.6. Test gélatinolyse .....	43
2.7. La réduction des nitrates .....	43
2.8. Croissance à 41 <sup>o</sup> c et 4 <sup>o</sup> c .....	44
3. Résumé des résultats .....	44
4. Résultat de recherche d'antagonistes .....	44
Discussion .....	48
Conclusion générale .....	53
Références bibliographiques .....	55
Annexe .....	61



## **Introduction générale**

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes. Parmi ces microorganismes, certains sont présents dans la rhizosphère sans que leur influence sur le développement des végétaux ne soit connue (microorganismes commensaux), certains sont favorables aux plantes (mutualistes) alors que d'autres ont des effets délétères sur les plantes (parasites et phytopathogènes). La croissance, la santé des plantes et leur diversité sont donc influencées par la diversité des populations microbiennes présentes dans la rhizosphère. (Mezaache, 2012).

La diversité microbienne de la rhizosphère est difficilement quantifiable. Les travaux de ces dernières années tendent vers un consensus selon lequel un gramme de sol contiendrait  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries, de 6000 à 50000 espèces bactériennes et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques. (Florence, 2006 et Faugier, 2011).

Ces microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes, d'une manière générale, le processus de minéralisation est une voie importante par laquelle les microorganismes vivant librement influencent la disponibilité des éléments nutritifs et donc la productivité, la santé et la diversité des plantes. Par ce processus, les microorganismes du sol décomposent la matière organique soluble et insoluble et libèrent ensuite des éléments minéraux disponibles pour les plantes. (Amkraz, 2013).

Malgré cette biodiversité microbienne et, les flores végétales subissent l'action de divers agents pathogènes qui leurs font concurrence sur le plan d'aliment et d'habitat. Ils sont responsables de fontes de semis, de pourritures et de flétrissements, entraînant ainsi des baisses de rendement considérables. (Harir, 2010).

La lutte contre ces agents se révèle très difficile; quant aux méthodes conventionnelles de lutte chimique, elles ne sont souvent pas assez efficaces, sans compter que les pesticides utilisés présentent un risque sérieux pour l'environnement et la santé publique (Meshram, 1984). À une époque où tous les intervenants du secteur agroalimentaire reconnaissent l'urgence de minimiser les dangers occasionnés par ces produits chimiques, la mise au point de stratégies innovatrices, fiables, et respectueuses de l'environnement, conduira inévitablement à de grands progrès dans la lutte contre plusieurs maladies des plantes cultivées à intérêt économique. (Mezaache, 2012).

Parmi les alternative a la lutte chimique le recours a la protection biologique cette méthode constitue, une des solutions alternatives qui permettra de lutter contre les agents

phytopathogènes tout en diminuant l'emploi de produit chimique. Si les traitements avec des pesticides (insecticides, acaricides, fongicides, bactéricides et herbicides) présentent de bon résultat à court terme et à long terme leur action secondaire sur l'environnement devient inquiétante. C'est ainsi que la lutte biologique s'est avérée le moyen de lutte le plus respectueux pour l'environnement, parce qu'elle fait appel à des antagonistes naturels, et met en jeu des mécanismes complexes difficile à contourner par le parasite. Parmi les agents biologique possible, les *Pseudomonas*, les *Bacillus spp.* et les *Trichoderma* semblent actuellement les plus étudiés ces dernières années. (Ammar, 2011).

Certaines bactéries, principalement les *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus* (Gray et Smith, 2005) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (voie indirecte). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme *PGPR* (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). (Rabhi, 2012).

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

Le présent travail vise à étudier l'isolement et caractérisation taxonomiques des *Pseudomonas spp.* fluorescents à partir de la rhizosphère de 03 plantes spontanées (*Astragalus armatus*, *Retama raetam* et *Peganum harmala*) et la mise en évidence de leurs activités antagonistes contre deux champignons (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albédinis* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*).

pour attendre l'objectif visé ; il est nécessaire d'utiliser des milieux de culture adéquat et technique d'isolement et d'identification permettant de cultiver le plus grand nombre de souches sélectionné (souche de *Pseudomonas spp.* fluorescents), ensuite les souches performant par la mise en évidence de leurre activité antagoniste *in vitro* vis-à-vis deux

l'agent phytopathogène cette étude permet de cibler le mode d'action de ces microorganismes antagoniste.

Le présent travail est divisé en trois grandes parties :

***La partie bibliographique*** est divisée en trois chapitres:

Le premier chapitre traite le sol, la rhizosphère et la biodiversité microbienne dans les deux niveaux, le 2<sup>ème</sup> chapitre présentera les caractères et la classification de *pseudomonas*, quant au 3<sup>ème</sup> chapitre, il abordera les stratégies de lutte.

***La partie matériels et méthodes*** abordera le choix de matériel végétal et microbien, le déroulement des tests physiologique et biochimiques et les tests d'antagonismes.

***La partie analyses et discussions*** occupe une place importante dans notre travail, présentera les principaux résultats obtenus ainsi que leurs analyses et discussion.

Et enfin une conclusion.

## Chapitre 1. Le sol, constituants inertes et êtres vivants

### Introduction

Les sols ont une vocation principale de production agricole et sylvicole, assurent le développement de la végétation naturelle et un support de la biodiversité. Les sols sont aussi des réacteurs biologiques qui assurent de nombreuses fonctions environnementales. En ralentissant l'écoulement de l'eau de pluie qu'ils absorbent partiellement, les sols participent de la prévention des inondations et des coulées de boue. Ils jouent un rôle de filtre et stockent en partie des molécules introduites par l'Homme (métaux lourds, produits phytosanitaires...), étant ainsi des acteurs indirects de la qualité de l'eau. Après les océans, les sols sont le deuxième réservoir de carbone (C), en contact avec l'atmosphère. (MENESR, 2008).

D'après Faugier 2011, le sol est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et est à ce titre un réservoir majeur de la diversité microbienne.

#### 1. La biomasse vivante dans le sol

D'après MENESR 2008, Faugier 2011, il existe environs 260 millions d'êtres vivants vivent en moyenne dans un mètre carré de sol de prairie permanente. Le sol est surtout peuplé de bactéries et d'actinomycètes, mais également de champignons (Cf. tableau 1), d'algues, de vertébrés (serpents, renards, lapins, taupes..., surtout des locataires temporaires) et d'invertébrés (fourmis, termites, mille-pattes, vers de terre...). Par sa nature chimique et physique complexe, le sol offre des habitats très diversifiés. D'un sol à l'autre, les différences en termes de biodiversité sont grandes: la communauté des vers de terre ne dépasse pas 100 individus/m<sup>2</sup> dans des sols pauvres en matière organique alors qu'elle atteint plus de 1 000 individus/m<sup>2</sup> dans des sols riches.

**Tableau 1.** La biomasse de différentes matières vivantes dans le sol.

Des bactéries	2.5 à10 tonnes par hectare
Des champignons	1 à10 tonnes par hectare
des algues	100 à 500 kg par hectare
Des protozoaires	150 à 700 kg par hectare
Des nématodes	150 à 400 kg par hectare
Des acariens	Environ 3 kg par hectare
Des collemboles	Environ 2 kg par hectare
Des racines	2.5 à10 tonnes par hectare

Source: Davet 1996.

## 2. La rhizosphère

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

D'après ITAB (2002) et Perrier (2004), les pédologues distinguent généralement deux régions dans cet horizon correspondant aux 20 premiers centimètres de sol :

- a. **la rhizosphère à proprement parlé**: les quelques millimètres de sol adhérant aux racines qui constituent le « manchon rhizosphérique » ;
- b. **le sol distant (« bulk soil » en anglais)**: la fraction du sol, au niveau racinaire, qui n'est pas sous l'influence des racines.

## 3. Les composés organiques de la rhizosphère

D'après Perrier 2004, les composés organiques de la rhizosphère sont:

- a. **La rhizodéposition**: La « rhizodéposition » constitue l'ensemble des composés organiques libérés par les racines;
- b. **Les exsudats racinaires** : Ce sont de petites molécules organiques, solubles dans l'eau ou volatiles : glucides, acides organiques, acides aminés, acides gras, stérols, vitamines, enzymes, nucléotides...etc.;
- c. **Les acides organiques**: Les acides organiques des sols et de la solution du sol comprennent des acides aliphatiques et aromatiques carboxyliques bien définis;
- d. **Les sucres**: Les sucres du sol sont présent sous forme simple (mono ou di-saccharides) ou condensée (polysaccharides). Les polysaccharides comme la cellulose peuvent constituer plus de 15 % de la matière organique du sol;

La rhizosphère est caractérisée aussi par sa richesse en micro-organismes, et notamment en bactéries et champignons microscopiques qui se nourrissent de ces composés, ainsi que des débris issus des cellules végétales mortes.

## 4. Les microorganismes de rhizosphère

Selon Florence (2006) et Faugier (2011), la rhizosphère est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et à ce titre un réservoir majeur de la diversité microbienne.

Les différentes familles de microorganismes trouvées dans les sols sont les bactéries, les champignons, les protozoaires, les algues et la microfaune. Les deux principaux groupes en quantité et en diversité sont les bactéries et les champignons au sens large. Les microorganismes sont localisés dans toute l'épaisseur du sol mais se rencontrent préférentiellement dans les sites où les conditions nutritionnelles et énergétiques sont satisfaisantes, c'est-à-dire dans les litières, les humus et les horizons superficiels des sols, et en particulier dans la rhizosphère (Djigal, 2003).

#### **a. Les actinobactéries**

Les actinomycètes sont des décomposeurs primaires des matières végétales résistantes comme l'écorce, les feuilles et les tiges. Ils sont particulièrement efficaces dans la dégradation de la cellulose, de la chitine, et de la lignine. Les espèces du genre *Frankia* forment des symbioses fixatrices d'azote en associations avec les casuarinacées et d'autres plantes supérieures. Ces bactéries ont aussi d'autres capacités métaboliques très importantes, comme la production de pigments et d'antibiotiques. (Harir, 2010).

#### **b. Les champignons**

La majorité des grands groupes taxonomiques de champignons sont tous hébergés dans le sol. Elles présentent une grande diversité, des études récentes estiment le nombre d'espèces à 1,5 millions approximativement. Les champignons sont souvent dominants dans les sols naturels en termes de biomasse. Dans certains sols, leur biomasse qui constitue une portion importante du pool de nutriment, peut être plus importante que celle de tous les autres microorganismes, plantes et animaux réunis. (Le calvez, 2009; Eyi Ndong, 2009).

#### **c. Les bactéries**

Les bactéries sont ubiquistes et elles présentent une population très abondante dans le sol, mais leur activité est principalement concentrée dans les premiers cm du sol. Elles constituent avec les champignons la biomasse dominante du sol. C'est également une population très diversifiée avec une estimation de 30000 espèces dans le sol. Les bactéries hétérotrophes constituent les types dominants dans le sol. De part leurs consommation et minéralisation des matériels organiques, elles représentent la plupart des flux d'énergie à travers le sol. Les bactéries interviennent dans un grand nombre de processus, et d'interactions mutualistes ou antagonistes avec les autres organismes du sol. Elles jouent un rôle fondamental dans les cycles de l'azote (ammonification, nitrification, dénitrification, fixation symbiotique de N<sub>2</sub>),

du carbone (décomposition et minéralisation) du phosphore, du soufre, et dans le recyclage des déchets et des polluants comme les pesticides. Elles interviennent également dans le maintien de la structure du sol, par la formation d'agrégats. (Djigal, 2003; Perrier, 2004 et Mezaache, 2012).

## 5. Rôles des bactéries

Selon ITAB 2002, les transformations des éléments utiles à la plante carbone, azote, soufre et phosphore...etc., sont étroitement liées à l'activité bactérienne des sols. Les bactéries sont responsables de nombreux processus:

- Libération des éléments nutritifs à partir de la matière organique et des minéraux du sol;
- Oxydation de l'ammonium en nitrates (nitrification - bactéries nitrosomonas et nitrobacters);
- Production d'hormones de croissance qui favorisent le développement des racines;
- Compétition avec les micro-organismes pathogènes limitant ainsi les risques de maladie;
- Formation des agrégats du sol.

## 6. La nutrition des bactéries

Une bactérie, pour qu'elle puisse synthétiser ses constituants et se déplacer, doit dépenser d'eau, d'une source de carbone (C), d'oxygène (O), d'hydrogène (H), d'azote (N), de soufre (S) et de phosphore (P) qui sont les constituants des glucides, lipides, protéines et des acides nucléiques (C, O, H, N, S et P sont des macroéléments ou macronutriments) ; des ions (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup>, ...) et d'une source d'énergie soit par photosynthèse (cas des bactéries photosynthétiques) soit par des réactions biochimiques d'oxydoréduction. (Meliani, 2012).

## 7. Le fer et les bactéries

A l'exception de quelque rares souches de *Lactobacillis*, de *Borrelia* et de *Treponema pallidum* qui peuvent utiliser le manganèse a la place de fer, tout les micro-organismes ont besoin de fer pour se multiplier. (Faugier, 2011).

Du fait de ses priorités de fixation d'oxygène et d'oxydoréduction, il se place au centre de situation de stresse oxydatif. Le fer est impliqué en tant que cofacteur enzymatique dans de nombreux processus métaboliques majeurs bactériennes comme la photosynthèse, la phosphorylation oxydatif, le transport et le stockage de l'oxygène et le transfert d'électrons.

Cet élément intervient dans la régulation génétique et la biosynthèse de l'AND et participe également dans la fixation de  $N_2$ , la méthanogènes et le cycle tricarboxylique. (Meliani, 2012).

### **8. Acquisition du fer par les bactéries**

Les sidérophores autant que métabolites secondaire à un faible poids moléculaire, sont riche en hétéroatomes oxygénés et azotés susceptibles d'entrer en interactions avec les ions métalliques. Les sidérophores sont capables de chélater le  $Fe^{+3}$  avec une grande affinité. (Nader, 2008).

Le rôle des sidérophores consiste a solubiliser et chélater le fer dans le milieu extracellulaire et de le transporter vers le cytoplasme de la bactérie. Chez les bactéries à gram négative le fer doit franchir l'enveloppe bactérienne afin de devenir disponible dans le cytoplasme. Les bactéries peuvent utiliser lors propre sidérophores (endogènes) mais également des sidérophores synthétisés par d'autres micro-organismes (exogènes). (Meksem, 2010).

### **Conclusion**

En fin de ce chapitre nous pouvons dire comme synthèse, que les bactéries sont présentes dans le sol avec une masse très importante de point de vue quantité et diversité où nous avons distingué plusieurs groupes appartient de cette grande famille. Parmi ces groupes les *pseudomonas* qui ont une grande importance aux différents niveaux.

Le présente chapitre va représenter les caractéristiques et la classification des ces bactéries.

## Chapitre 2. Les *Pseudomonas*, caractères et classification

### 1. Introduction

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique.

Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng *et al.*, 2002). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001, Fenton *et al.*, 1992).

### 2. Caractéristiques métaboliques

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

Les températures cardinales aux quelles les espèces se multiplient varient de 4° à 41°C, cette dernière est caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*, alors que la température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à un pH inférieur à 4.5 (Palleroni, 1984).

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (Palleroni, 1984), certaines seulement comme *P. pseudoalcaligenes* peuvent dégrader le poly  $\beta$ -hydroxybutyrate; (Palleroni, 1993). L'aptitude de certains isolats à dégrader des substances xénobiotiques a également retenu l'attention de différents chercheurs (Latour et Lemanceau, 1997 ; Bossis *et al.*, 2000). De nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes.

L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (Campbell *et al.*, 1995 ; Latour *et al.*, 1996).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exo-polysaccharide (E.P.S) leur permet de former des bio films, grâce aux quels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (Visca *et al.*, 2007). Ce genre produit beaucoup de poly hydroxy alcanates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (Holloway, 1992).

### 3. Méthodes de la classification

Selon Palleroni (2005), nombreuses méthodes utilisées dans la classification des *Pseudomonas*. Ces méthodes révèlent les efforts fournis pour la caractérisation des espèces de *Pseudomonas*, incluant la sensibilité à certains composés, les caractéristiques génétiques et écologiques, le pouvoir pathogène et la structure antigénique (Peix *et al.*, 2009).

#### a. Classification par les Caractéristiques phénotypiques

Comprennent les tests tels que : la forme cellulaire, le type de flagelle, l'utilisation des sources de carbones tel que : les acides organiques, les polyols, les acides aminés, la capacité de croissance dans des conditions de culture variables, la synthèse d'exo-enzymes et la production d'antibiotiques (Palleroni, 2005).

#### b. Classification par étude chémo-taxonomiques

Parmi les caractéristiques utilisées dans la taxonomie des *Pseudomonas*, l'utilité des études chémo-taxonomiques a été prouvée à maintes reprises, dans la reclassification des espèces (Peix *et al.*, 2009).

La présence de certains lipides polaires comme le phosphatidyl-glycerol, diphosphatidyl-glycerol et la phosphatidyl-éthanolamine (Camara *et al.*, 2007), les ARN stable (5S rRNA et tRNA) de faible poids moléculaire (Höfle, 1988, 1990), les systèmes quinones, en plus d'autres marqueurs ont été utilisés dans la reclassification de certains genres de *Pseudomonas* dans d'autres genres (Kampfer *et al.*, 2008).

#### c. Classification génétiques

Les gènes ribosomiaux sont présents chez tous les organismes, et possèdent la même fonction vitale : la synthèse protéique. Ces caractéristiques font des ribosomes d'excellents candidats d'études pour les taxonomistes. En effet ces molécules possèdent un niveau

d'évolution assez élevé pour assurer une variabilité entre les différentes espèces ; mais avec un degré de conservation suffisant pour assurer que ces différences correspondent à des catégories taxonomiques stables comme les genres et les espèces.

Parmi tout les ARN ribosomiaux seul le gène ARNr16S remplit ces deux caractéristiques, le gène ARNr23S est extrêmement conservé alors que le gène ARNr5S est trop petit (Peix *et al.*, 2009). C'est pour cela que le gène ARNr16S est devenu la molécule clé sur laquelle est basée la classification des procaryotes, incluant celle des *Pseudomonas* (Anzai *et al.*, 2000; Palleroni, 2005).

Parfois l'analyse du gène ARNr16S ne permet pas la différenciation entre des espèces très proche. D'autres gènes ayant démontré leur importance pour la différenciation entre les espèces ont été analysés. Ces gènes nommés gènes de ménage : *recA* (recombinase A), *rpoD* (facteur  $\sigma 70$  de l'ARN polymérase), *gyrB* (sous unité  $\beta$  de l'ADN gyrase), *rpoB* (sous unité  $\beta$  de l'ARN polymérase), ont permis la différenciation des espèces de *Pseudomonas* (Hilario *et al.*, 2004). En effet, la discrimination entre des espèces très proches de *Pseudomonas* est obtenue par l'analyse du gène *rpoB*.

L'arbre phylogénétique obtenu avec ce gène donne une résolution 3 fois plus importante que celui obtenu avec le gène ARNr16S (Ait-Tayeb *et al.*, 2005). Et pourtant c'est le gène ARNr16S, qui a permis la différenciation des sous espèces de *P. chlororaphis* (Peix *et al.*, 2007). Cependant, l'analyse des gènes de ménage n'est pas communément utilisée dans la description des espèces de *Pseudomonas*. Et seulement, la description des gènes *rpoD*, *gyrB*, *rpoB* a été incluse dans des descriptions récentes de *Pseudomonas*: chez *P. xiamenensis* (Lai et Shao, 2008), chez 107 espèces de référence de *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2010), et chez *P. syringae*, *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* (Ramette *et al.*, 2011).

Un autre marqueur phylogénétique a été utilisé dans les études taxonomiques, il s'agit des ITS (intergenic spacer), région située entre ADNr 16S-23S. Cette séquence présente une grande variabilité tant du point de vue taille que séquence, permettent ainsi une distinction entre des espèces très proches (Gurtler et Stanisich, 1996).

Des protocoles spécifiques utilisant des amorces universelles, ont été désignés pour analyser cette séquence chez les *Pseudomonas* environnementaux (Locatelli *et al.*, 2002).

Une méthode prometteuse pour l'identification des microorganismes, et qui peut analyser jusqu'à 300 échantillons en une seule fois est le MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry), par l'analyse des protéines

ribosomiques (Pineda *et al.*, 2003). En effet, les résultats d'identification des isolats de *Pseudomonas* sont excellents, jusqu'à 100% de résultats corrects (Dieckmann *et al.*, 2005; Degand *et al.*, 2008).

#### 4.L'utilisation des *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894 in Palleroni 2005), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre .Le premier rapport sur l'utilisation d'un *Pseudomonas* produisant un antibiotique pour le contrôle d'un agent pathogène racinaire, en l'occurrence *Rhizoctonia solani* (Howell et Stipatovic, 1979).

#### Conclusion

Il existe une diversité d'interactions dans le sol (symbioses, parasitismes, compétition, prédation). Ces relations entre les microorganismes et aussi avec les organismes eucaryotes comme les nématodes, les plantes et les animaux et avec les composants abiotiques de l'environnement constituent la base de l'écologie microbienne dans le sol, elles constituent les moteurs des différents processus qui se déroulent dans le sol. (Trévors et Van EJsas, 1997 In Ammar, 2011).

Pour cette raison notre 3<sup>ème</sup> chapitre va aborder l'exploitation de différentes relations entre les micro-organismes dans la lutte biologique en générale et l'utilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents contre les champignons phytopathogènes.

## Chapitre 3. Utilisation des *P. fluorescents* dans la lutte biologique

### Introduction

Les plantes subissent les attaques de nombreux bio-agresseurs. Parmi eux, les champignons, les virus et les bactéries phytopathogènes, causent des maladies sur tous les organes et peuvent causer des pertes très importantes. Pour diminuer les pertes de rendement occasionnées sur les plantes nous pouvons utiliser plusieurs méthodes de lutte (La lutte Prophylactique, La lutte chimique et la lutte biologique).

La lutte chimique contre ces agents se révèle très difficile; quant aux méthodes conventionnelles de lutte chimique, elles ne sont souvent pas assez efficaces, sans compter que les pesticides utilisés présentent un risque sérieux pour l'environnement et la santé publique (Meshram, 1984). Parmi les alternatives à la lutte chimique le recours à la protection biologique :

#### a. Notion de la lutte biologique

La lutte biologique a pour principe d'utiliser des agents biologiques capables d'entrer en compétition (antagonisme) avec les agents pathogènes et les ravageurs sans avoir d'activité néfaste sur la plante. Ces agents naturels sont réunis sous le concept de biopesticides (Rahman *et al*, 2007).

Au niveau de la rhizosphère et du contrôle des agents pathogènes telluriques, la lutte se fait principalement via des bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium* et *Pseudomonas* ; et des champignons des genres *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium* et *Trichoderma* (Benizri *et al*, 2001).

Ces microorganismes utilisent différents mécanismes pour lutter contre les agents phytopathogènes du sol, à savoir : L'antibiose, la compétition, le parasitisme et/ou l'induction des mécanismes de la résistance chez la plante (Lehr *et al*, 2008).

#### i. L'antibiose

L'antibiose, par définition, est l'inhibition de l'agent phytopathogène par la production des métabolites secondaires par un autre micro-organisme. Ce mode d'action est le plus étudié chez les agents de lutte biologique. Il consiste à sécréter des substances antibiotiques. Possédant un faible poids moléculaire ayant une fonction antifongique et/ou antibactérienne. Agissant par l'inhibition de la croissance mycélienne ou interfèrent avec la germination et ou

la sporulation des agents phytopathogènes, d'autres provoquent la distorsion des hyphes fongiques (Lepoivre, 2003).

## ii. La compétition

La compétition nutritive est un moyen important de la lutte biologique du fait que le manque de nutriments peut engendrer automatiquement la mort du pathogène (Benitez *et al*, 2004). La compétition nutritionnelle et la compétition spatiale contribue dans la réduction des infections racinaires provoquées par les agents phytopathogènes. En effet certaines PGPB protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (Palleroni, 2005).

La compétition pour le fer est la mieux documentée. Quoique très abondant, cet élément se trouve souvent sous la forme de polymères d'hydroxydes ferriques très insolubles. Les bactéries possèdent un mécanisme très spécifique de captation des ions ferriques basé sur la production de sidérophores en conditions de carence en fer. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire chélatrices du  $Fe^{3+}$  et servant de transporteur de l'ion ferrique à l'intérieur de la cellule (Lepoivre, 2003).

## iii. Parasitisme

Le parasitisme consiste en l'interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre. L'agent antagoniste sécrète des enzymes dégradant les parois cellulaires des agents pathogènes comme les protéases, les chitinases et les glucanases. Les agents de biocontrôle qui utilisent ce mode sont nombreux. *Bacillus subtilis* réduit les populations de *Pythium ultimum* et *Rhizoctania solani* par sécrétion de glucanases et de protéases. *Trichoderma* est le microorganisme antagoniste le mieux étudié du point de vue parasitisme. Les enzymes lytiques (chitinase, cellulase, glucanases,...etc) produit par ce champignon sont capables de dégrader les parois cellulaires de nombreux pathogènes (Lepoivre, 2003).

### 1. Les *Pseudomonas spp.* fluorescents agents de biocontrôle et de croissance des plantes

La plupart des substances chimiques utilisées pour combattre les maladies en plus d'être dangereux pour l'homme, les animaux et les organismes bénéfiques ; persistent dans les écosystèmes naturels. Durant les trois dernières décennies, les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont été identifiés comme agents potentiels de biocontrôle, à l'encontre des phytopathogènes. (Schroth *et al.*, 1992).

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents (Cf. tableau 2) saprophyte sont les habitants type des sols agricoles et la rhizosphère des plantes, et sont impliqués dans de nombreuses interactions avec les plantes. Ces bactéries sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole, et sont responsable de la suppression des maladies fongiques dans les cultures. Ces *Pseudomonas* diminuent la sévérité de la maladie et stimulent la croissance des plantes comme le riz, le blé, la pomme de terre, la canne à sucre, le radis, le coton et le manioc (Palleroni, 2005).

Différentes espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents ont été rapportés à la fois comme PGPR (plant growth promoting rhizobactéria), et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes. *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* et *P. cepacia*. Toutefois, les *Pseudomonas spp.* fluorescents ne sont pas tous des antagonistes. (Cattelan *et al.*, 1999).

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas spp.* fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol. D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes. 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, leur capacité à utiliser les exsudats de plantes comme nutriments, et à chélater les ions ferriques (Garbaye, 1994).

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents sont connus pour leurs aptitude d'adhésion aux particules du sol et au rhizoplan, mais sont aussi mobiles et prototrophes, produisent des antibiotiques, et des enzymes hydrolytiques (Nielsen et Sorensen, 1999).

Ces capacités antagonistes et PGPR, sont dues à des mécanismes directs et indirects (Cf. figure 1). Les mécanismes indirects utilisés par ces *Pseudomonas spp.* fluorescents, comprennent la production d'antibiotiques contre des bactéries pathogènes, la réduction de fer

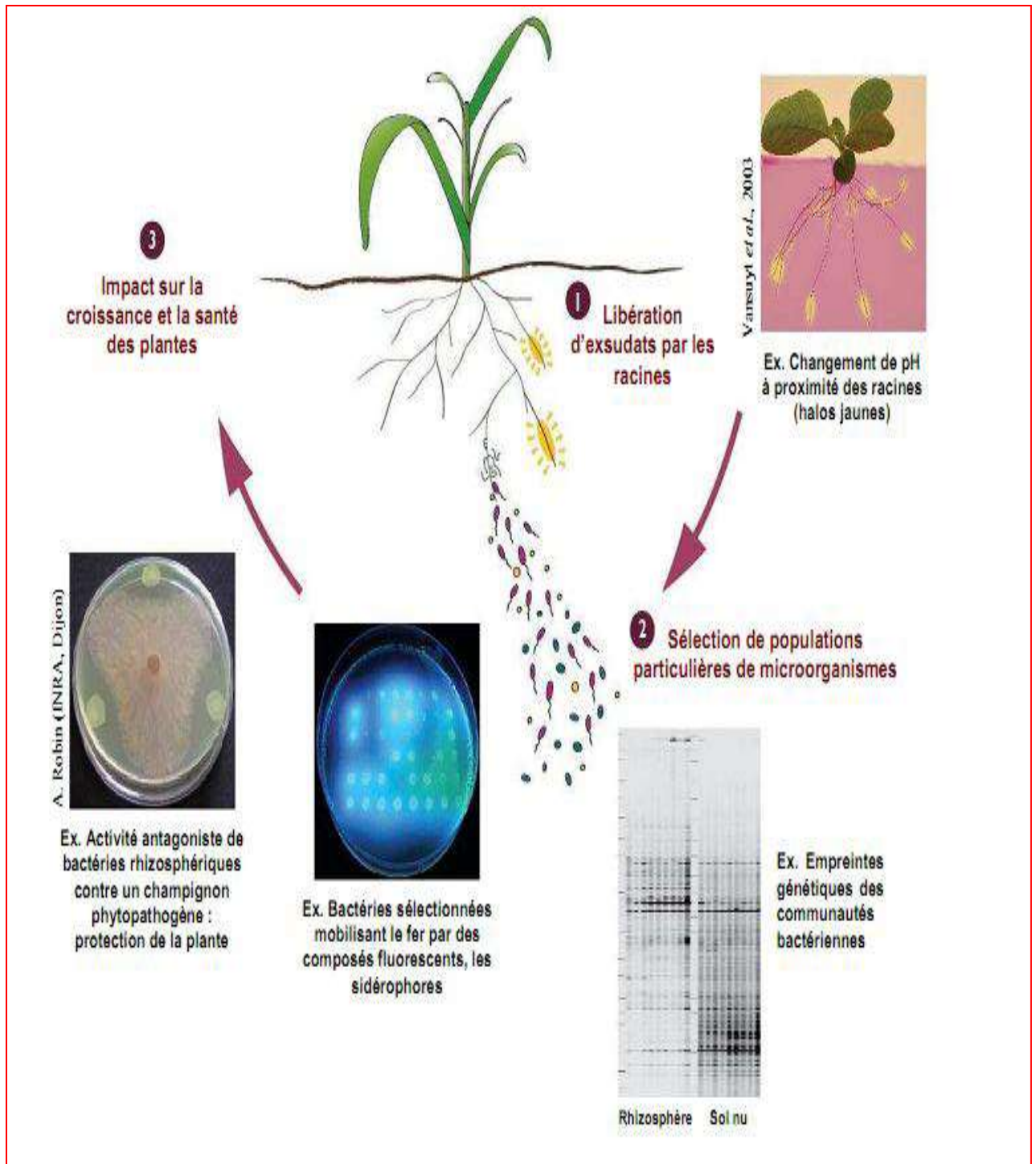
disponible pour les phytopathogènes présents dans la rhizosphère, la synthèse d'enzymes dégradant les paroi cellulaires fongiques et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante. (Scher et Baker, 1982).

Les mécanismes directs concernent, la séquestration du fer pour les plantes par les sidérophores. la production de phytohormones ou encore par solubilisation de formes de phosphore insolubles, rendant ainsi le phosphore biodisponible, et diminuer les taux d'éthylène produits par la plante. Ces bactéries sont capable d'induire une résistance systémique contre un pathogène donné, et porte le nom d'ISR. Il est également reconnu que des bactéries de la mycorrhizosphère, encore appelées bactéries auxiliaires de la mycorhization, stimulent sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Garbaye, 1994).

## **2. Stimulation de la croissance des plantes**

### **2.1. Solubilisation des phosphates par les *Pseudomonas spp. fluorescents***

Les bactéries solubilisant le phosphate sont communes dans la rhizosphère, cette dernière étant le siège de nombreuses interactions entre les plantes et les divers microorganismes associés. La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles de phosphore en formes disponibles pour les plantes. Les espèces de *Pseudomonas spp. fluorescents* comme *P. chlororaphis*, ont été identifiés comme rhizobacteries solubilisant le phosphate (Bano et Musarat, 2003).



Source : Lemanceau *et al.*, 2006.

Figure 1. Représentation schématique décrivant les interactions plantes- microorganismes dans la rhizosphère

**Tableau 2.** Quelques exemples récents d'agents de contrôle biologiques à base de *Pseudomonas* spp. fluorescents (depuis 2004).

Agens de contrôle	Plante	Pathogènes à contrôler	Références
<i>P. fluorescens</i> PSR21	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Ślusarski (2004)
<i>P. fluorescens</i>	Olivier	<i>Verticillium dahliae</i>	Mercado-Blanco <i>et al.</i> (2004)
<i>P. putida</i>	Olivier	<i>Verticillium dahliae</i>	Mercado-Blanco <i>et al.</i> (2004)
<i>P. fluorescens</i> Q8rl-96	Blé	Plusieurs champignons	Huang <i>et al.</i> (2004)
<i>P. putida</i> HF142	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Boudyach <i>et al.</i> (2004)
<i>P. fluorescens</i> HF22	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Boudyach <i>et al.</i> (2004)
<i>P. fluorescens</i> PGPR1-9	Cacahuète	Plusieurs champignons	Dey <i>et al.</i> (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cajanus cajan	Plusieurs pathogènes	Siddiqui <i>et al.</i> (2005)
<i>P. aeruginosa</i> PUPa3	Plusieurs plantes	Plusieurs champignons	Kumar <i>et al.</i> (2005)
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Plusieurs plantes	Divers phytopathogènes	Cirvilleri <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Plusieurs plantes	Divers champignons	Verma <i>et al.</i> (2007)
<i>P. CMR5c</i>	Le macabo	<i>Pythium myrotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> (2007)
<i>P. CMR12a</i>	Le macabo	<i>Pythium myrotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> (2007)
<i>P. corrugata</i>	Diverses plantes	<i>F. oxysporum</i> et <i>A. alternaria</i>	Trivedi <i>et al.</i> (2008)
<i>P. aeruginosa</i> CMG1055	Divers plantes	Divers champignons	Uzair <i>et al.</i> (2008)
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	Haricot vert	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Bardas <i>et al.</i> (2009)
<i>P. fluorescens</i> WCS365	Haricot vert	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Bardas <i>et al.</i> (2009)
<i>P. putida</i> PCL1760	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i>	Validov <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Canne à sucre	<i>Colletotrichum falcatum</i>	Mehnaz <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cotton	<i>Xanthomonas compestris</i>	Fallahzadeh <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aubergine	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Ramesh <i>et al.</i> 2009
<i>P. putida</i> strain P9	Pomme de terre	<i>Phytophthora infestans</i>	Andreote <i>et al.</i> (2009)
<i>P. fluorescens</i>	Tomate	<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Xu <i>et al.</i> (2010)
<i>P. fluorescens</i>	Riz	<i>Rhizoctonia solani</i>	Anitha et Arun-Das (2011)
<i>P. fluorescens</i> PCI2	Tomate	Plusieurs champignons	Pastor <i>et al.</i> (2010 et 2011)
<i>P. fluorescens</i>	Concombre	Phytophthora drechsleri	Maleki <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas</i> RFP 36	Fève	<i>R. solani</i> et <i>M. phaseolina</i>	Devi <i>et al.</i> 2011

## 2.2. Synthèse de phyto-hormones

### a. 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. Communément produite par les rhizobactéries. 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).

### b. Cytokinines

Les cytokinines forment une classe de phytohormones qui stimulent les divisions cellulaires, l'élargissement et le développement des tissus. 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* (Haas *et al.*, 2003).

### c. 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 quelle perturbation physique ou chimique des tissus. 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, le mode d'action de certains PGPR serait par l'intermédiaire d'une AAC-désaminase. Cette enzyme clive l'AAC précurseur immédiat de l'éthylène. L'AAC-désaminase diminuerait la production d'éthylène au niveau des racines de la plante hôte et résulterait en leurs allongements. (Glick *et al.* 1998)

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs d'AAC-désaminase (Glick *et al.*, 1998). 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 AAC, et de stimuler l'élongation des racines. Cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations, ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds (Belimov *et al.*, 2001).

## 2.3. Dénitrification

La dénitrification est un processus microbien dans lequel les oxydes d'azote sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons, pour la production d'énergie en absence d'oxygène. La dénitrification est composée de quatre réactions par lesquelles les nitrates sont réduits en di nitrogène (N<sub>2</sub>), par des métallo-enzymes comme la nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont les

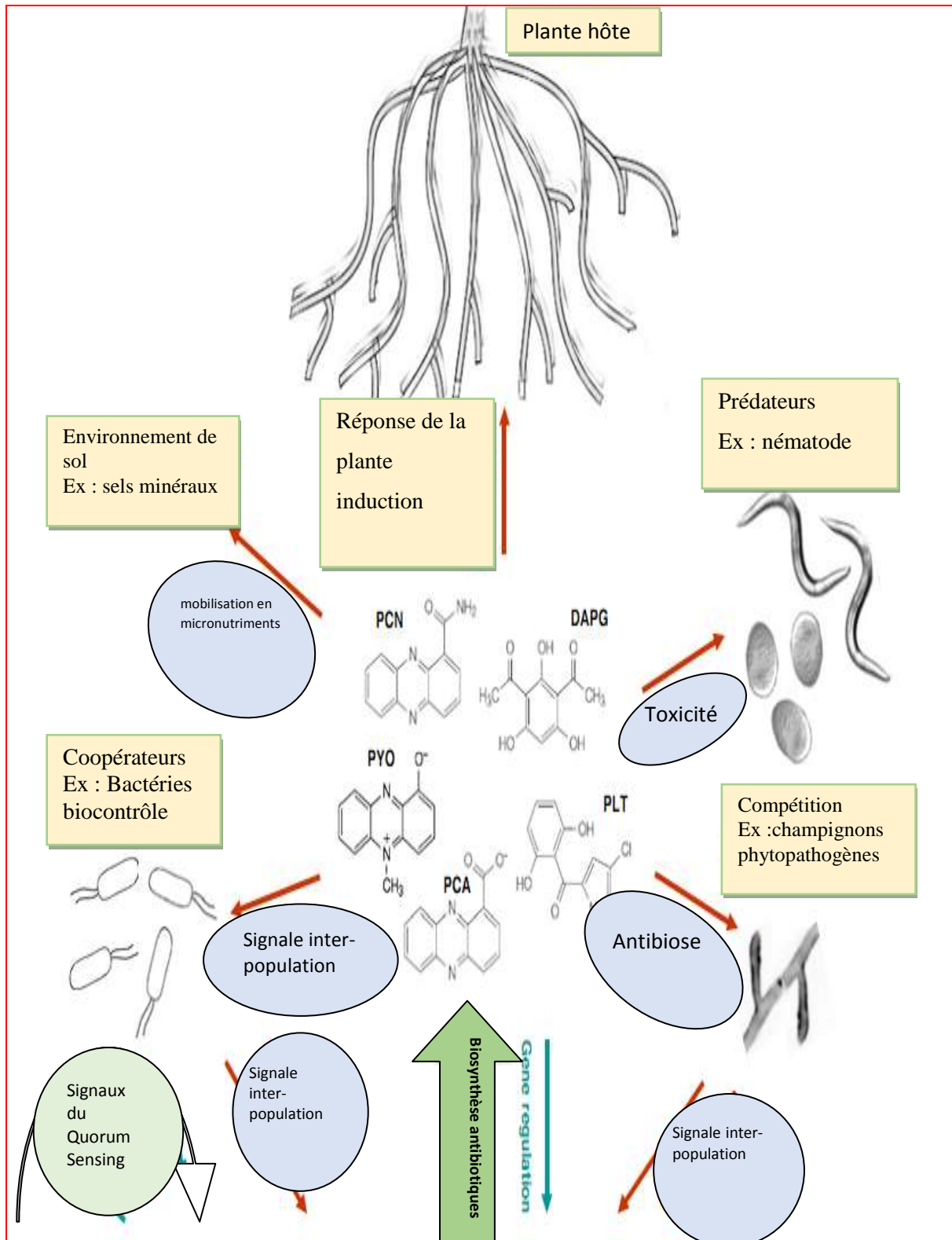
dénitrifiant les plus communs des sols des régions tempérées. Les *Pseudomonas spp.* fluorescents sont capable de s'adapter aux manque d'oxygène par l'utilisation des oxydes d'azote comme accepteurs alternatifs d'électrons. La respiration sur nitrate et la réduction des nitrites sont impliquées dans la compétition des souches modèles de *Pseudomonas spp.* fluorescents dans le sol (Ghiglione, 2000).

#### **2.4. Les médiateurs de l'absorption de fer par les *Pseudomonas spp.* fluorescents**

La majorité des espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents produisent des sidérophores. Un nombre important d'espèces de plantes peuvent assimiler les complexes Fe<sup>3+</sup>-sidérophore bactériens. Les sidérophores jaunes-verts sont noméspsyoverdines (PVDs) ou pseudobactines. A côté de la PVD, *P. aeruginosa* produit un autre sidérophore nommé pyocheline avec une affinité plus faible pour le Fe<sup>3+</sup>. Les espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents produisent aussi la pseudomonine (isoxazolidone) comme *P. fluorescens*, *P. stutzeri* et *P. putida* (Mercado-Blanco *et al.*, 2001).

#### **3. Mécanismes d'antagonisme**

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents produisent une gamme importante de métabolites secondaires (Cf. figure 2), en plus d'enzymes dégradant les paroi cellulaires. Les plus caractérisées de ces métabolites secondaires sont les: phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons. (Mezaache, 2012).



Source : Dubuis et al, 2007.

**Figure 2.** Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions : *Pseudomonas* de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol

PCA : phénazine-1-carboxylate, PYO : pyocyanine, PCN : phénazine-1-carboxamide, DAPG : 2-4, diacétylphloroglucinol, PLT : pyolutéorin

#### 4. Métabolites secondaires possédant des propriétés de biocontrôle

##### a. Les phénazines

Les phénazines sont des pigments hétérocycliques azotés intensément colorés, produits par différentes souches bactériennes. Ces hétérocycles expriment un large spectre d'activité sur les bactéries et les champignons. Les phénazines jouent aussi un rôle dans la compétition rhizosphérique, incluant la survie et la compétence des bactéries productrices (Mazzola et al., 1992).

La phénazine-1-carboxylate (PCA), a été rapporté chez les *Pseudomonas spp.* fluorescents, comme *P. chlororaphis* (Anjaiah et al., 1998).

L'efficacité de la PCA a été démontré contre un nombre de champignons phytopathogènes comme *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium sp.*, *Polyporus sp.*, *Rhizoctonia solani*, et les bactéries pathogènes comme *Actinomyces viscosus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia amylovora* (Thomashow et al., 1990).

La phénazine-1-carboxamide (PCN), a aussi été rapportée chez les *Pseudomonas spp.* fluorescents, tel que *P. chlororaphis*. La PCN diffère du PCA par la présence du groupement carboxamide (CONH) au lieu du groupement hydroxyle sur le carbone 1 du noyau phénazine. Cette molécule est plus stable que la PCA, et exprime ses activités antifongiques même à pH alcalin (Chin-A-Woeng et al., 1998).

La pyocyanine (1-hydroxy-5methyl-phénazine), est prédominante chez *P. chlororaphis*. Cette phénazine de couleur bleue est toxique pour une large gamme de bactéries et champignons. Mais c'est aussi un facteur de virulence dans les infections opportunistes humaines (Price-Whelan et al., 2006).

##### b. Phloroglucinols

Les phloroglucinols sont des antibiotiques à large spectre, produits par une large variété de souches bactériennes. Le 2,4-diacétyl phloroglucinol (DAPG) est aussi un antibiotique phénolique à large spectre d'action produit par *P. fluorescens Pf-5*, *P. fluorescens F113*, *P. fluorescens CHAO* (et *P. fluorescens Q2-87*) (Thomashow et al., 1990).

Cet antibiotique possède aussi une activité herbicide, ressemblant à l'acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique (2, 4-D), un herbicide de post-émergence, pour le contrôle des mauvaises herbes des céréales, de la canne à sucre et d'autres plantations. Le DAPG induit

aussi la résistance systémique chez les plantes, et joue donc le rôle d'un éliciteur des phytoaléxines. (Mazzola *et al.*, 1992)

#### **c. Pyrrolnitrine (PRN)**

La pyrrolnitrine (PRN) (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl) un composé pyrrole, est produite par les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. fluorescens* et *P. chlororaphis*. La pyrrolnitrine a trouvé son application comme composé à usage clinique pour le traitement des mycoses cutanées plutôt que fongicide agricole (Glick *et al.*, 1996).

La production de ce composé par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *R. solani*, *Verticillium dahliae*, *G. graminis* et *Fusarium oxysporum* (Homma *et al.*, 1989).

#### **d. Pyolutéorine (PLT)**

La pyolutéorine, un autre antibiotique produit par différents *Pseudomonas*. Les souches produisant la PLT sont à l'origine de la suppression de nombreuses maladies telluriques. Cette molécule, isolée pour la première fois chez *P. aeruginosa*, est composée d'un anneau résocinol synthétisé par la voie de polycétide, relié à une partie, possédant un pouvoir fongitoxique efficace contre les oomycètes, notamment *Pythium ultimum* (Maurhofer *et al.*, 1992).

#### **e. Mupirocine**

Plus connu comme l'acide pseudomonique, est un antibiotique polycétide naturellement présent chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents. La mupirocine produite par *P. fluorescens* NCIMB 10586, est d'une activité élevée contre *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries à Gram positif. C'est un antibiotique largement utilisé dans les maladies tropicales (Carcanague, 1997).

#### **f. Antibiotiques peptidique**

Les antibiotiques peptidiques sont aussi bien produits par les bactéries à Gram positif (que celles à Gram-négatif, par une synthèse multienzymatique non-ribosomique. Récemment, il a été démontré que des *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des lipopeptides cycliques (CLPs). La tensine produite par *P. fluorescens* 96.578, a montré un effet potentiel sur le basidiomycète *R. solani*. La Viscosinamide un autre lipopeptide cyclique produit par *P. fluorescens* DR54, est aussi actif sur *R. solani* par la réduction de la biomasse mycélienne et donc la formation de sclérotés. L'Oomycin A est un antibiotique produit par *P. fluorescens*

*HV37a*, est à l'origine de la suppression du damping-off du coton causé par *P. ultimum* (Guttererson *et al.*, 1988).

#### **g. Enzymes dégradant les parois fongiques**

L'excrétion d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques est fréquemment impliqué dans les attaques des champignons phytopathogènes (Martin et Loper, 1999).

La lyse des parois cellulaires, par les enzymes déprédatives excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue du mycoparasitisme. La Chitinase, la  $\beta$ -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  $\beta$ -1-6 glucane et les ponts glucosidiques. Les microorganismes excrétant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces. Le contrôle biologique de *Fusarium solani*, se fait essentiellement via les activités des laminarinase et chitinase chez *P. stutzeri* YPL-1. *P. cepacia* produisant la  $\beta$ -1,3 glucanase, réduit l'incidence des maladies causées par *R. solani*, *P. ultimum*. (Nielson *et al.* 1998).

#### **5. La régulation d'antibiotique (Quorum Sensing QS)**

La production d'antibiotiques chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents est soumise à une régulation complexe. Les facteurs clés dans cette régulation sont des facteurs globaux et le QS (communication cellulaire). La régulation globale est médiée par les gènes *gacS* et *gacA* qui codent pour un système régulateur à deux composés. Le QS implique la production de molécules signales de N-acyl-homoserine lactone (AHL). Le système régulateur *gacS* et *gacA* contrôle aussi le QS, illustrant ainsi la complexité de la régulation de la production des antibiotiques chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents. La molécule AHL du QS, est impliquée dans la régulation de la production d'antibiotiques chez: *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis*. Les gènes des facteurs signaux, *rpoD* et *rpoS* sont aussi impliqués dans le contrôle de la production de tels antibiotiques, et augmentent les activités antagonistes des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Des doses élevées du produit du gène *rpoD* peuvent stimuler directement ou indirectement la production d'antibiotiques chez *P. fluorescens*. D'autres formes de régulation globale ont été rapportées: le répresseur transcriptionnel *phlF* et le régulateur de l'ARN (*PrrB*) sur la production de métabolites secondaires (Inbar et Chet, 1991).

### **Conclusion**

A partir de ces dernières chapitres (stratégies de lutte; caractéristique et classification des *Pseudomonas*) nous avons extrais des idées sur les caractéristiques phénotypique et métaboliques, effets bénéfiques des *Peudomonas* spp. fluorescents, sur la promotions de la croissance des plante cultivé et ses pouvoirs dans la lutte biologique contre les agent phytopathogéne que nous pouvons les exploitée pondent le déroulement de nous tests.

## Matériels et méthodes

### I. Isolement et identification des *Pseudomonas*

#### 1. Prélèvements des échantillons

Les prélèvements ont été réalisés au mois de Mai 2014 dans la zone d'El Assafia (Wilaya de Laghouat). Nos prélèvements (Aléatoire) ont été effectués à des profondeurs de 15 à 20 cm au niveau de la zone rhizosphérique de trois plantes spontanées (Cf. tableau 3). Les échantillons (échantillon composé de 500 g de sol) ont été mis dans des sachets en plastique stérilisés, étiquetés puis ramenés au laboratoire de l'université.

Nous avons plusieurs sites (sources) des prélèvements, ont été définis dans le tableau 3.

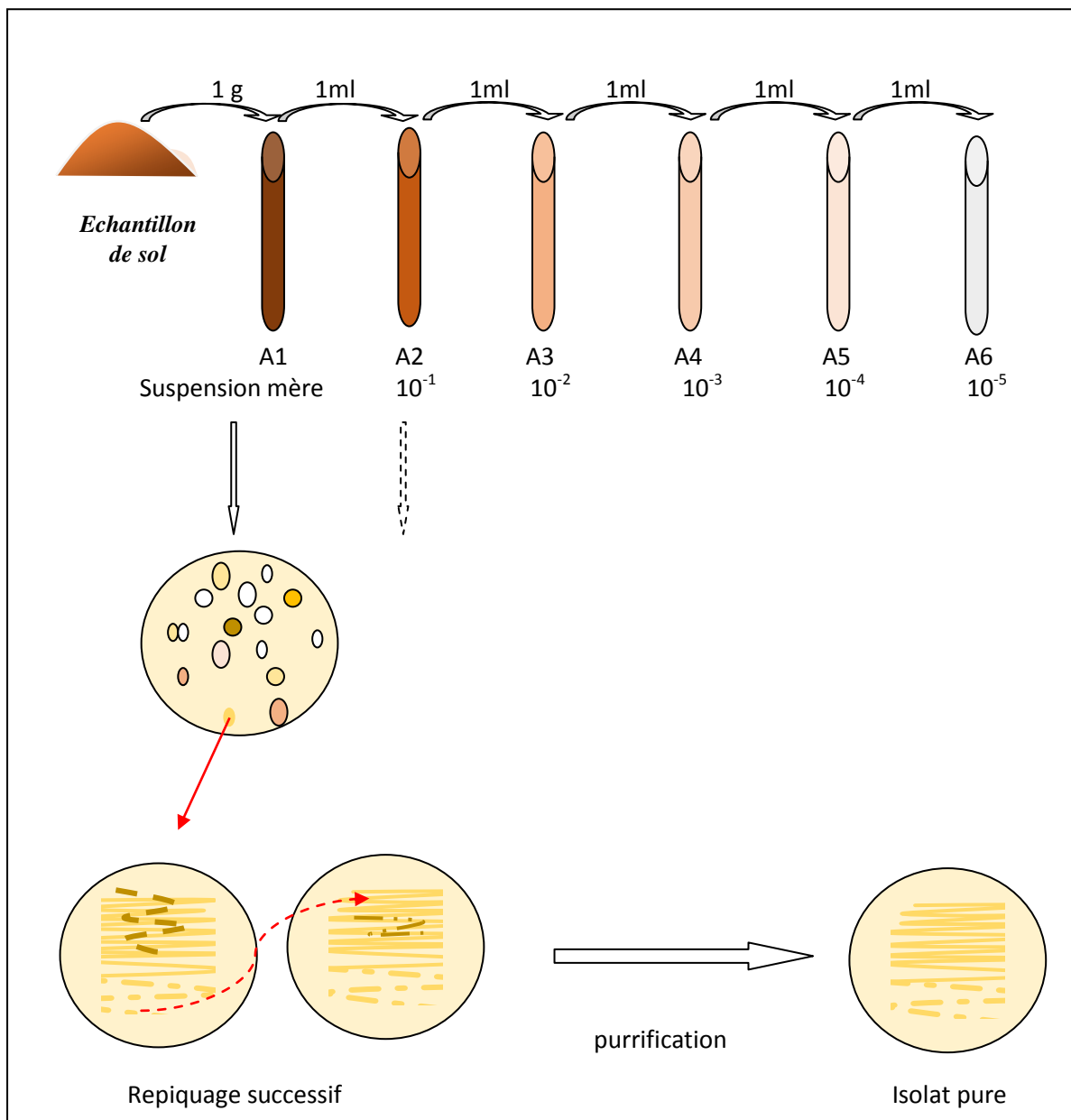
**Tableau 3.** L'origine des échantillons de sol

Les échantillons	Origine végétale	Code
Échantillon 1	Rhizosphère de <i>Retama raetam</i>	A
Échantillon 2	Rhizosphère de <i>peganum harmala</i>	B
Échantillon 3	Rhizosphère d' <i>Astragalus armatus</i>	C

#### 2. Méthode d'isolement

Pour l'isolement des bactéries appartenant aux *Pseudomonas* du sol rhizosphérique nous avons utilisé la méthode des suspensions-dilutions décrite par Klement *et al.*, 1990 ; Vidhyasekaran *et al.*, 1997. (Cf. figure 3).

Nous avons mis un g de sol dans un tube à essais contenant 9 ml de l'eau distillée stérilisée, après une agitation orbitale de 120 rpm durant quelques minutes, nous avons prélevé un ml de cette suspension et mis dans un autre tube contenant la même proportion d'eau distillée stérilisée, une série de dilution a été réalisée jusqu'à  $10^{-5}$ . Nous avons étalé 0.1 ml de chaque dilution sur le milieu sélective King B (Cf. annexe 1) en boîtes de Pétri avec deux répétitions pour chaque dilution, l'incubation a été effectuée pendant 24-48 heures à une température de  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .



Source: auteur, 2014.

**Figure 3.** Technique de suspensions-dilutions

### 3. Purification

La sélection des colonies de *Pseudomonas* fluorescents a été basé principalement sur des caractères morphologiques : la production des pigments fluorescents, la forme circulaire et l'aspect plane et lisse des colonies. (Mezaache, 2012).

Après le choix des colonies ciblées par les caractères précédant, nous sommes passés à la purification qui consiste à ensemencer répétitivement les bactéries sur milieu King B (Cf. figure 3). Ainsi nous avons obtenus des souches pures après la 5<sup>ème</sup> purification. (Boudmagh, 2007; Chabbi, 2009).

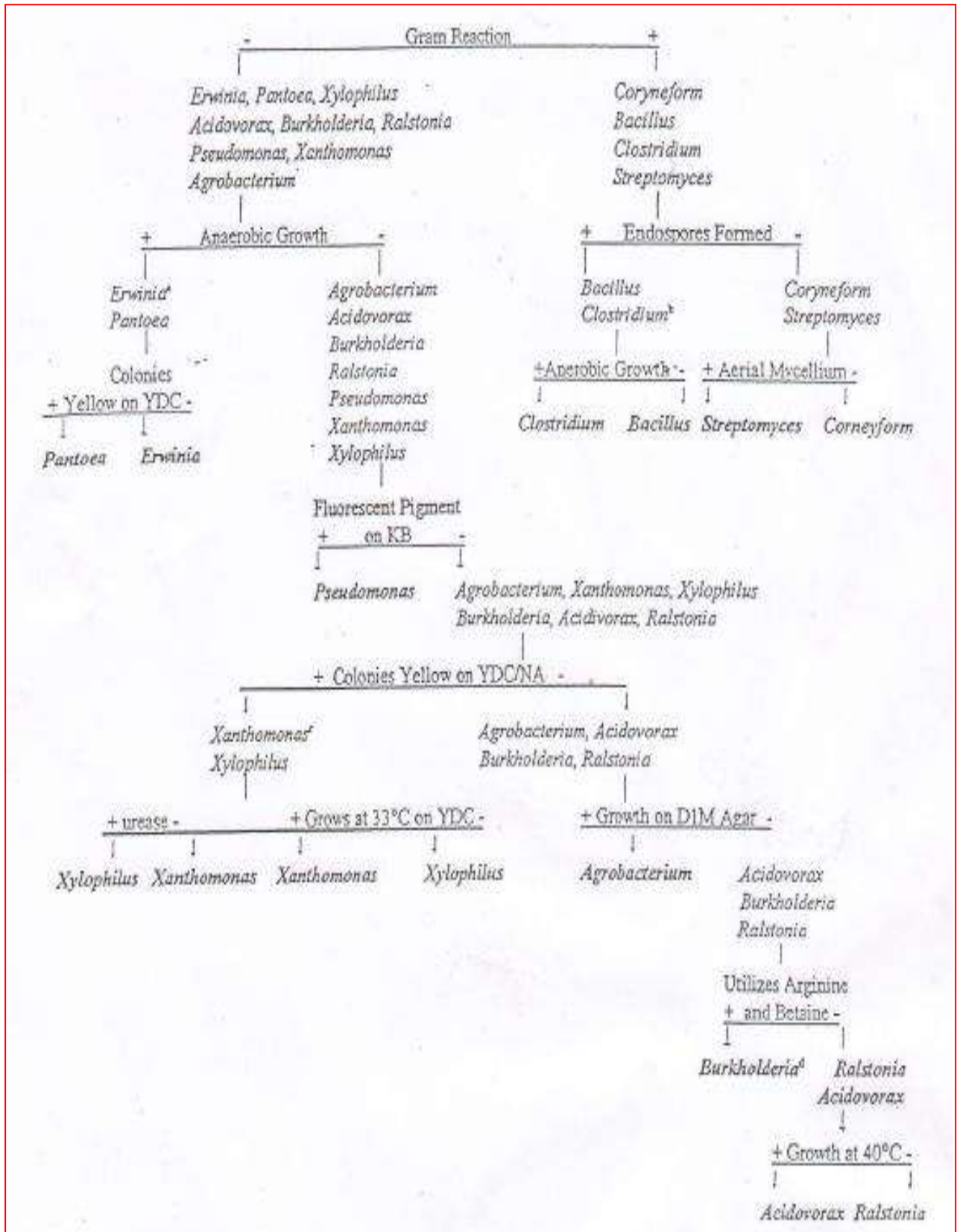
#### 4. Conservation des isolats

Après la purification des souches bactériennes individualisées fluorescentes, nous avons repiqués ces isolats dans des tubes contenant un milieu KB (inclinées) additionné de glycérol (25%), après croissance à  $28 \pm 2$  °C, ont été conservés à  $04 \pm 2$  °C, afin de les utilisées ultérieurement. (Boudmagh, 2007).

#### 5. Identification et caractérisation taxonomique des souches

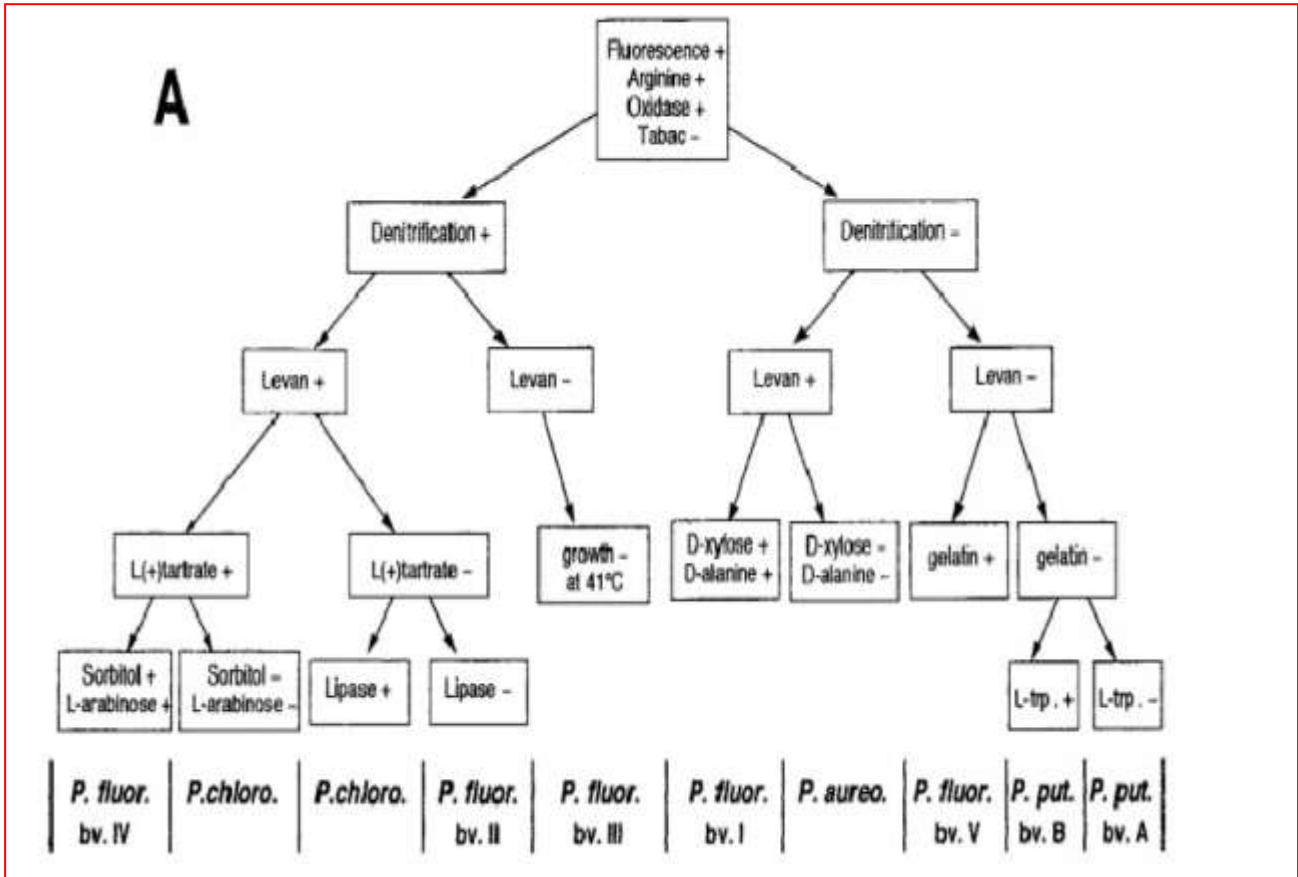
L'identification préliminaire des espèces de *Pseudomona* spp. fluorescent, est essentiellement basée sur :

- Les caractéristiques morphologiques (morphologie cellulaire), la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de l'oxydase, arginine dihydrolase, voie d'utilisation du glucose, ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques selon Franzetti et Scarpellini, 2007;
- Le diagramme de Chaâd *et al.*, 2001 (Cf. figure 4) et les clés A et B (Cf. figure 5 et 6) proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes.



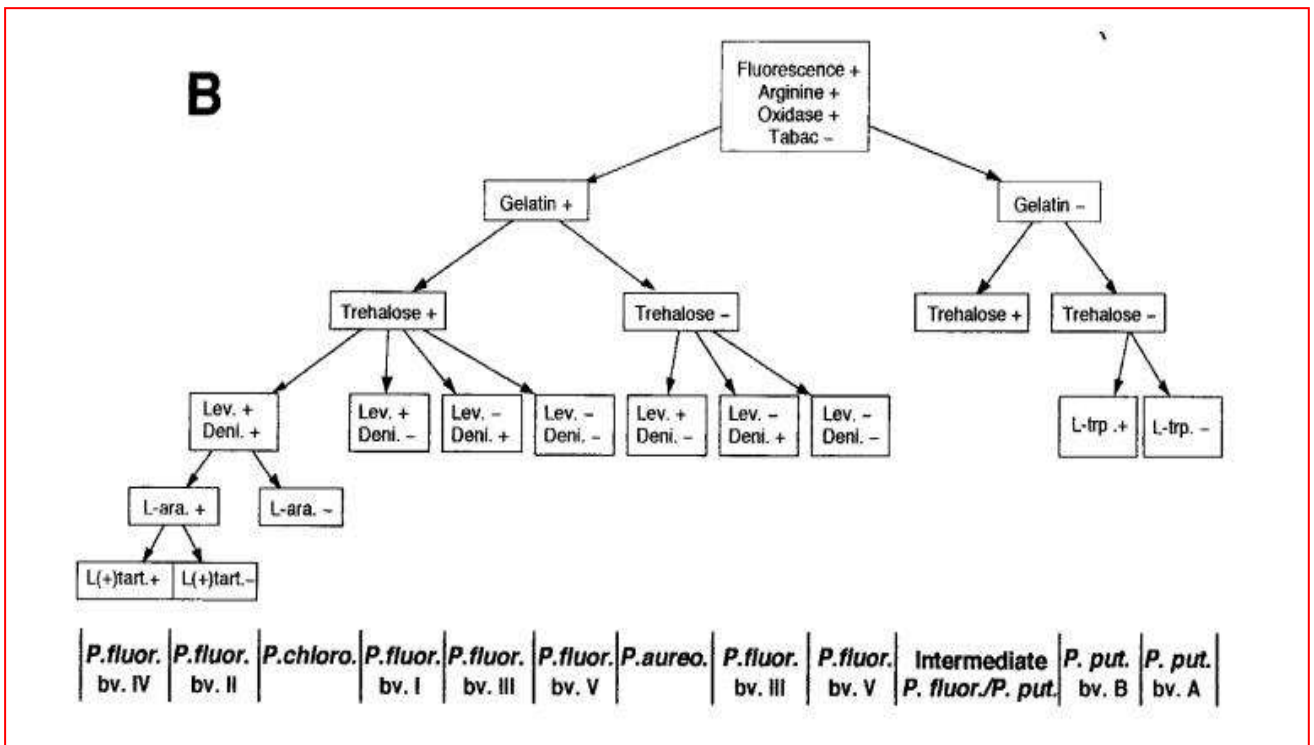
Source: Schaad, 2001.

Figure 4: Schéma de détermination des différents genres bactériens.



Source: Jacques, 1994.

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



Source: Bossis, 1995.

Figure 6. Clé dichotomique (B) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

### 5.1. Production de pigment fluorescent

Selon Bultreys et Legheysen 2000 ; Mezaache, 2012, l'étape initiale pour l'identification de *P. fluorescens* est la mise en évidence d'une activité fluorescente des isolats obtenus. La fluorescence est observée (après une incubation de 24 à 96 heures entre 27-28°C) soit à l'œil nu ou par exposition des boîtes contenant des colonies bactériennes sous une lampe Ultra Violette à une longueur d'onde égale 366 nm.

### 5.2. Tests de gram

#### 5.2.1. Coloration de Gram

D'après Schaad *et al.* 2001, cette coloration permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de classer les bactéries en deux grands groupes : bactéries dites Gram + et bactéries dites Gram -. Dont les étapes sont les suivantes.

##### ✓ Réalisation de frottis

A l'aide d'une anse de platine nous avons déposé une colonie bactérienne isolée avec une goutte d'eau distillée sur une lame propre, puis nous avons étalé cette colonie et fixé à la chaleur (veilleuse d'un bec bunzen).

##### ✓ La coloration

Dans cette étape, nous avons utilisé plusieurs colorantes où nous avons commencé par le violet de gentiane, puis nous avons laissé agir pendant 30 secondes à une minute, puis nous avons rincé à l'eau distillée. Avec le lugol (solution d'iode iodo-ioduré) nous avons traité notre lames pendant une même durée que le violet de gentiane, puis nous avons rincé avec de l'eau distillée. Après ces opérations nous avons lancé une décoloration (rapide) à l'alcool, c'est l'étape la plus importante de la coloration (versez goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement), jusqu'à l'obtention d'un filet clair.

Nous avons rincé abondamment avec de l'eau distillée (pour stopper la décoloration). En suite nous avons recoloré par la fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute. En fin nous avons lavée doucement à l'eau distillée et séchée la lame.

La lecture de résultats de ce test est effectuée par une observation avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement  $\times 1000$ ).

#### 5.2.2. Test KOH

En parallèle de la coloration de Gram, un test plus rapide a été effectué, qui permet de distinguer entre Gram positif et Gram négatif, sur une lame propre deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 3%), sont mises en contact avec une crème

bactérienne en effectuant un mouvement circulaire. La solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatifs. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30 secondes (Bourgault et Lamothe, 1988) (la formation d'une file observable à l'œil nue). Pour une réaction négative aucune viscosité n'est observée, donc les bactéries sont des grams positifs.

### 5.3. Croissance en anaérobiose

Le milieu Hugh et Leifson (Cf. annexe 1) permet de distinguer entre les deux processus. La dégradation d'un glucide s'accompagne d'une acidification du milieu: lors de la respiration le glucide est oxydé en CO<sub>2</sub>, par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral) ; lors de la fermentation le glucide est oxydé en acide, alcool, qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement. Toutes les voies fermentatifs ne sont cependant pas également acidifiantes (Schaad *et al*, 2001).

Nous avons préparé des tubes contenant d'huit (8) ml de milieu Hugh et Leifson, puisensemencé la bactérie par piqûre centrale, avec un fil de platine. Pour réaliser une condition anaérobie nous avons ajouté un (01) cm d'huile de paraffine stérile, incubé à une température 28± 2°C pendant 24 à 48h.

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

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

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

### 5.4. Catalase

La catalase est un enzyme permettant la transformation de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau (H<sub>2</sub>O) et dioxygène (O<sub>2</sub>). Pour mettre en évidence cette activité nous avons mis la crème bactérienne en contact avec de l'eau oxygénée pendant une durée déterminée. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suivi par un dégagement gazeux d'oxygène (Reynolds; Richland, 2011).

Selon Njomen 2006; Qujeq et Rezvani 2007, la technique et la lecture des résultats de catalase sont réalisées de manière suivante :

Sur une lame propre et sèche nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes, puis nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée sur la lame, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, nous avons ajouté l'inoculum bactérien, le contacte entre la colonie et le réactif permet d'observer des bulles (observation immédiatement).

Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène: **catalase +**, par contre l'absence des bulles : **catalase –** (Reynolds et Rechland, 2011).

### 5.5. Tests de LOPAT

Dans cette étape nous avons 5 tests. Selon Schaad *et al.*, (2001), ces tests sont utilisés pour éliminer l'espèce de *P. putida* (test de levane) et les isolats pathogènes (Oxydase, pectinase et hypersensibilité sur tabac).

#### 5.5.1. Production de levane sucrase

La recherche de levane sucrase a été effectuée sur milieu Levane. Après ensemencement du milieu, et incubation de 3 à 5 jours à température ambiante, le développement de colonies blanchâtres, convexes et brillantes indique la présence de levane sucrase (Esawy *et al.*, 2005).

#### 5.5.2. Oxydase

L'oxydation de N-diméthyle paraphénylène diamine par la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase intracellulaire et l'oxygène moléculaire donné une couleur bleu violète, ce qui indique que les bactéries sont des oxydases positifs (+) (Confida, 2011).

La recherche de l'oxydase peut se faire selon plusieurs méthodes. L'une des plus couramment utilisée consiste à placer un disque d'oxydase sur une lame porte-objet, à l'imbiber avec une goutte d'eau distillée stérile puis à déposer un à deux colonies pures fraîchement sur le disque. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

#### 5.5.3. Pouvoir pectinolytique

Des tubercules de pomme de terre sont débarrassés de résidu de terre en les passant sous le l'eau. Ensuite, elles sont désinfectées (10 mn). Après un passage dans une solution alcoolique (éthanol à 70%), et une seconde solution contenant de l'hypochlorite de sodium. Après rinçage à l'eau distillée stérile, les tubercules sont ensuite tranchés et déposés dans des boîtes de pétri contenant de l'eau physiologique stérile, quelques gouttes d'une suspension bactérienne en phase de croissance sont déposées sur les tranches. Après 7 à 14 jours, la réaction est considérée positive par l'apparition de pourriture qui s'accompagne d'une forte odeur (Schaad *et al.*, 2001).

#### 5.5.4. Arginine dihydrolase

Complexe enzymatique capable de dégrader l'arginine en anaérobiose, agissant selon deux types de réaction envisageables. La première réaction, est une transformation de l'arginine en citrulline et ammoniacque par son activité dihydrolase. La seconde est une décarboxylation de la citrulline en ornithine et ammoniacque. Certains *Pseudomonas* spp. sont capables de

dégrader l'arginine. Des tubes contenant le milieu arginine inoculés ont été recouverts d'une couche d'huile de paraffine et incubés à 28°C pendant 5 jours. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration jaune suite à l'alcalinisation du milieu dû à la présence de l'ammoniaque (HL, 2011).

#### **5.5.5. Test d'hypersensibilité sur tabac**

Le test d'hypersensibilité (HR) a été effectué avec des suspensions bactériennes en eau physiologique stérile. L'inoculation de la face inférieure des feuilles de tabac, par infiltration, à l'aide d'une seringue hypodermique. Les plants de tabac inoculés ont été déposés dans le laboratoire, à la température 20-25 °C. Le témoin négatif est inoculé avec de l'eau physiologique stérile. Le développement de collapse au niveau des zones inoculées, deux à trois jours après, traduit une réaction d'hypersensibilité positive. (Klement *et al*, 1990; Vézina et Lacroix, 2013).

#### **5.6. Test gélatinolyse**

Les tubes contenant le milieu gélatine ont étéensemencés avec une crème bactérienne de 24 heures et incubés pendant 72 heures à 25° C. Les tubes inoculés ainsi que le tube témoin sont misent à une température de (5 °C) pour vérifier la liquéfaction de la gélatine. La protéolyse se traduit par la liquéfaction du milieu, par comparaison à un témoin négatif (nonensemencé) qui doit rester solide (Lelliot et Stead, 1987).

#### **5.7. Dénitrification**

Nous avons utilisé des tubes contenant le milieu EPN (Eau Peptonée Nitratée) pour vérifier la dénitrification, selon la méthode décrite de Gamble *et al.* (1977), nous avonsensemencé des bactéries jeunes âgée de 24h, par piqure centrale, et les incubés à une température de 28±2°C. Après 5 jours d'incubation nous passons à la vérification la réduction des nitrates à l'aide des réactifs NIT1 et NIT2.

Pour vérifier la réduction des nitrates en nitrites, nous avons ajouté deux gouttes de NIT1 et NIT2, si le résultat est positive le milieu devient rose-rouge, cependant s'il reste incolore, ceci indique un résultat négative. En cas du résultat négatif, nous avons vérifié la capacité de réduction des nitrates en azote, en ajoutant deux à trois mg de Zinc (Zn) dans les tubes, si le milieu reste incolore (après 5 minutes) ceci traduit un résultat positive (+). Par contre si le milieu devient rose, ceci traduit un résultat négatif.

### 5.8. Test de croissance à la température (4 et 41<sup>0</sup>C)

Quelques espèces sont mésophiles cultivées à 41<sup>0</sup>C comme *P. aeruginosa* et d'autres sont psychotrophes et se développent même à 4<sup>0</sup>C comme *P. fluorescens*. (christian et Jean yves, 1996; schaad *et al.*, 2001).

Nous avons préparé des boîtes de pétris contenant le milieu de culture King B, puis ensemencés par les bactéries jeunes. Ces boîtes ont été mises à une température de 41<sup>0</sup>C, et d'autres à une température 4<sup>0</sup>C et cependant 48 heures. Nous avons réalisé deux répétitions pour chaque isolat.

## II. Recherche d'antagonistes

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent une gamme importante de métabolites secondaires, parmi ces métabolites on peut citer : phénazines, phloroglucinols, pyolutéorines, pyrrolnitrines, lipopeptides et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites sont actifs vis-à-vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (Amkraz, 2013). Dans ce contexte, nous avons testé l'activité antagoniste de 14 souches contre deux champignons pathogènes :

### a. Souches bactériennes utilisées

- ✓ 5/14 (A2P1, A5P3, B3P1, B4P5 et C5P1) souches issues de notre isolement;
- ✓ 1/14 (M23 E1) issues de travaux de fin d'études de Mr Benamor (2014);
- ✓ 4/14 (A23, A24, S1 et S4) issues de travaux de fin d'études de Mlle Hamdaoui (2013);
- ✓ 4/14 (L17, C3, A11 et B24) issues de travaux de fin d'études de Mr Amairache (2014).

### b. Isolats cryptogamiques

Les deux champignons sont:

- ❖ *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* (FOA);
- ❖ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL).

Les deux espèces de champignons utilisés ont été isolées et identifiées respectivement par M<sup>m</sup> El houaiti et M<sup>m</sup> Touati au niveau de laboratoire de microbiologie (université de Laghouat).

Ces tests sont accompagné par des témoins (des boîtes de pétris contenant que les champignons).

### III. Sélection des souches antagonistes

La sélection des souches bactériennes antagonistes a été réalisée selon la méthode des spots décrite par Baker et Cook (1998), la mettre consiste à déposer 4 spots bactériennes a la périphérie de la boîte de Pétri puis mise en incubation a une température de  $28 \pm 2$  °C. Après 24 heures, nous avons déposé un disque mycélien de 5 mm de diamètre (champignon étudiée), dans le centre de la boîte de Pétri.

Nous avons testé les 14 souches sur deux milieux de culture King B et PDA avec deux répétitions pour chaque souche contre les deux champignons phytopatogènes.

Pour estimer l'activité antifongique de nos isolats, nous avons déposé un disque de champignon testé comme des témoins sur d'autres boîtes dans les mêmes conditions d'incubation.

L'évaluation de l'activité antagoniste de souches testées a été réalisée par deux voies:

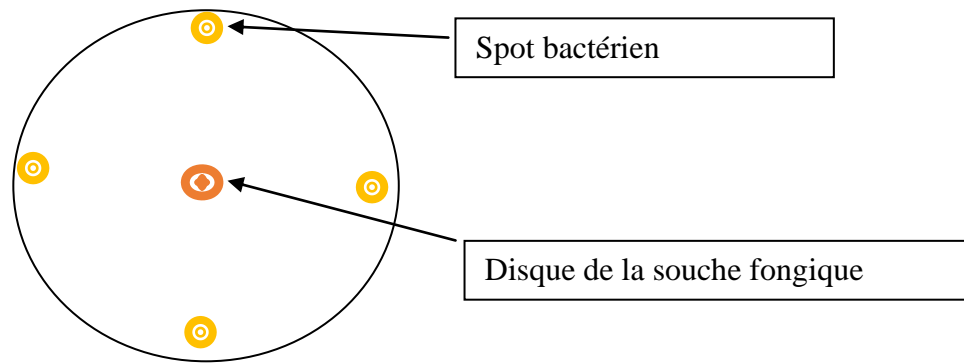
- Utilisation d'une échelle pour estimer les réponses de souches testées
  - ✓ 0 : 0 mm;
  - ✓ 1: 1 à 7 mm;
  - ✓ 2: 7 à 14 mm;
  - ✓ 3: 14 à 21 mm.
- La lecture des résultats à été fait en comparaison avec la croissance de témoin, le taux d'inhibition est calculé selon la formule de Hmouni *et al.*, (1996), l'activité antagoniste est révélée par la présence de zone d'inhibition.

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

I: taux d'inhibition;

$C_n$  : diamètre moyen de la croissance de pathogène en présence d'antagoniste;

$C_o$  : diamètre moyen de la croissance de pathogène en absence d'antagoniste.



Source : Baker et Cook, 1998.

Figure 7. Technique du test d'antagonisme *in vitro*.

## Résultats

### 1. Isolement

A partir de 03 échantillons de sol rhizosphérique de plantes spontanées *Retama reatam*, *Astragalus armatus* et *Piganum harmala*, nous avons pu isoler et purifier 22 souches qui ont des caractéristiques de *Pseudomonas* ssp. *Fluorescants*. La sélection a été basée sur les caractères marcomorphologiques : les colonies de petites tailles, circulaires, régulières, lisses et plates, la brillance et les pigment jaune-vert visible à l'œil nu sur le milieu King B.

### 2. Identification des isolats bactériens

#### 2.1. Production du pigment fluorescent

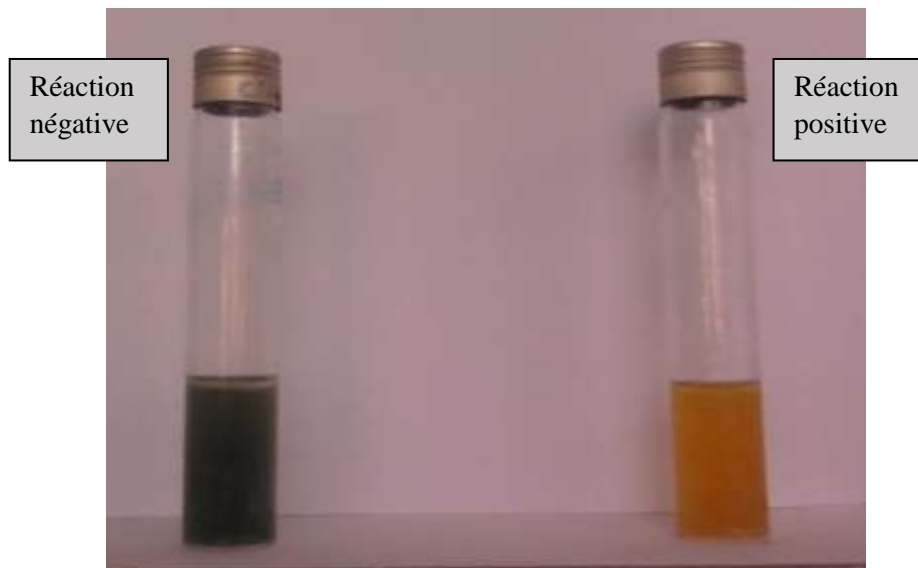
Nous avons obtenu une pigmentation jaune vert fluorescents pour l'ensemble des isolats (Cf, tableau 5), avec des intensités variables.

#### 2.2. Résultats de croissance en anaérobiose

Après 48 à 72 heures d'incubation nous avons observé une réaction négative pour les (16) souches où le tubes restent verts (Cf. figure 8). Les autres isolats (06 tubes) ont un résultat positif (le contenu du tube viré au jaune). (Cf. tableau 4).

D'après ces résultats, nous pouvons dire que les 16 isolats sont des bactéries aérobies strictes non fermentatives.

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



Source: auteur, 2014.

**Figure 8.** Photo de résultats de croissance en anaérobiose

### **2.3. Résultats de production de catalase**

Selon Reynolds et Richland (2011), une réaction catalase positive se traduit par l'apparition des bulles suite au dégagement gazeux d'oxygène. (Cf. tableau 5).

Nous avons observé immédiatement des bulles pour 16 isolats (catalase positive), et une réaction négative pour les 06 autres isolats.

### **2.4. Tests de gram**

Après la coloration de Gram nous avons éliminé 09 isolats (Cf. tableau 4) parce que ce sont des gram positif (couleur violet) et les autres (07) sont des bacilles à gram négatif (couleur rose).

D'après Chaabi 2010 et Mezaache 2012, les *Pseudomonas* sont des bacilles à gram négative, droite et fins, aux extrémités arrondies d'une taille moyenne de 0.5 à 2  $\mu\text{m}$ .

Ces tests sont confirmés par le teste KOH, où nous avons observé une viscosité pour les sept souches. Selon Bourgault et Lamothe 1988 In Benamor 2014, la solution de KOH devient visqueuse en présence des bactéries à gram négatif. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 5 secondes.

**Tableau 4.** Résultats des tests d'identification

Tests Isolats	Pigment fluorescents	Hugh et leifson	Catalase	Coloration de gram	KOH
A2P1	++	-	+	G-	+
A5P1	+	-	+	G+	-
A5P2	+	-	+	G+	-
A5P3	++	-	+	G-	+
B1P1	+	+	-	/	/
B3P1	++	-	+	G-	+
B4P1	+	-	+	G+	-
B4P2	+	-	+	G+	-
B4P3	+	-	+	G+	-
B4P4	+	-	+	G+	-
B4P5	+++	-	+	G-	+
B4P6	+	-	+	G-	+
B5P1	+	+	-	/	/
B6P1	+	+	-	/	/
B6P2	+	+	-	/	/
B6P3	+	+	-	/	/
C1P1	+	+	+	G+	-
C1P2	+	+	-	/	/
C3P1	+	-	+	G-	+
C3P2	+	-	+	G+	-
C5P1	+++	-	+	G-	+
C5P2	+	-	+	G+	-

G- : bactérie de Gram négatif. G+ : bactérie de Gram positif. + : réaction positive. - : réaction négative.

/ : Éliminé par la résultat précédent. +++ : Très fluorescent. ++ : Moyennement fluorescent. + : faiblement fluorescent.

## 2.5. Tests de LOPAT

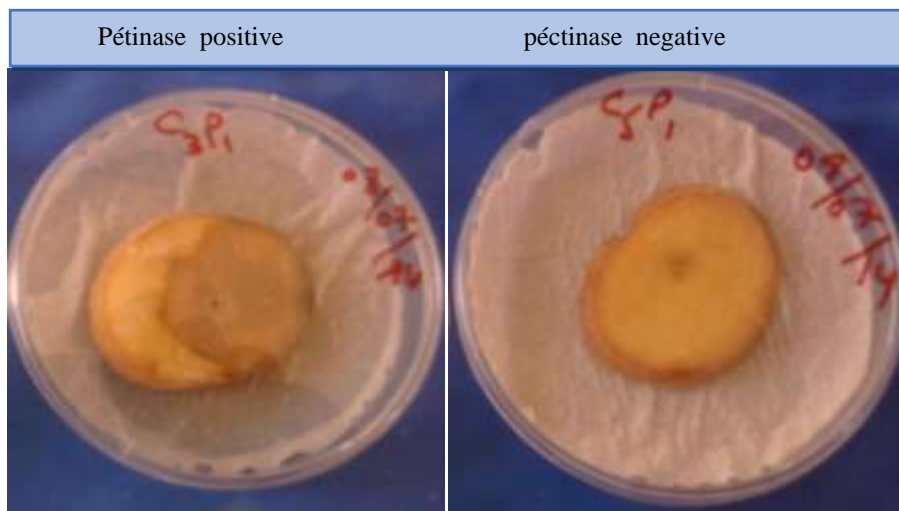
Ce sont des tests pour déterminer les caractères métaboliques de *Pseudomonas spp.* fluorescents, nos résultats pour ce test sont représentés dans le tableau (5).

### 2.5.1. Production Levane sucrase

Après 5 jours d'incubation, nous avons observé une réaction positive où nous avons observé des colonies blanchâtres et brillantes pour 06 isolats (Cf. tableau 5), ce qui traduit par une polymérisation du fructose en poly-fructose. Pour la 7<sup>ème</sup> souche (C3P1), nous avons observé une réaction négative, c'est-à-dire aucune activité de dégradation n'a été produite.

### 2.5.2. Test de Pectinase

Après 14 jours d'incubation, pour 05 isolats nous n'avons pas observé de changement de la couleur des tranches de pomme de terre (Cf. figure 09), ainsi que de leur odeur, ces isolats sont incapables de dégrader le pectine, selon Schaad *et al.* (2001) ce sont des pectinases négatives. La réaction positive détermine la présence de pectinase (substrat utilise l'acide polygalacturonique) par la bactérie, ce qui indique la dégradation de pectinase et donne une odeur et une zone pourrie de couleur marron à noir comme le cas des deux autres isolats testés (C3P1 et B4B6).



Source: auteur, 2014

Source: auteur, 2014

**Figure 09.** Photo de résultat du test pectinase.

### 2.5.3. Test d'hypersensibilité sur Tabac

Les plants de tabac inoculés ont été déposés dans une salle, Le témoin négatif est inoculé avec de l'eau distillée stérilisée. deux à trois jours après, nous avons observé un brunissement sans assèchement (Cf. figure 10), donc nous avons une réaction négative pour tous les isolats (05 isolats).

Un jaunissement ou un brunissement sans assèchement de la zone foliaire inoculée n'est pas une réaction positive. (Vézina et Lacroix, 2012).



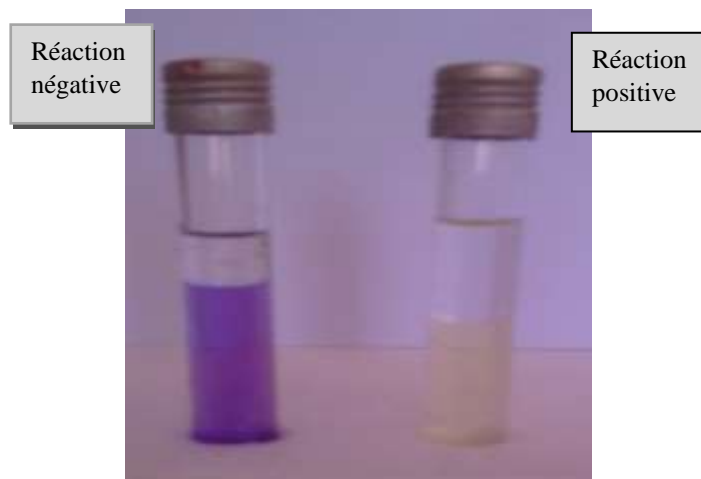
Source: auteur 2014.

**Figure 10.** Photo représente les résultats de test d'hypersensibilité sur tabac.

#### 2.5.4. Test d'arginine déshydrolase

Le test sert à déterminer si la bactérie transforme l'arginine (un acide aminé) à l'aide de l'enzyme arginine déshydrolase. Une réaction positive indique qu'il y a eu transformation de l'arginine par l'enzyme arginine déshydrolase (coloration jaune).

Après 5 jours d'incubation, les résultats obtenus indiquent que les 05 isolats ne sont pas capables de transformer l'arginine car la coloration du milieu reste violet (Cf. figure 11)

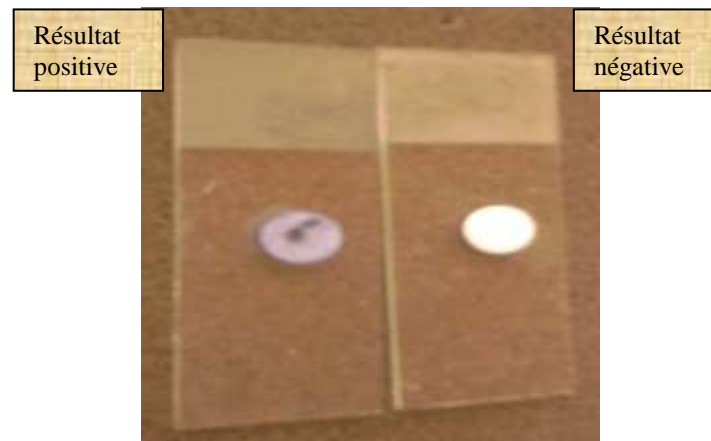


Source: auteur 2014.

**Figure 11.** Photo de test d'arginine déshydrolase.

#### 2.5.5. Production d'oxydase:

Les 5 souches ont donné une réaction positive par une coloration bleu violet (Cf. figure 12) en contact avec les disques d'oxydase, ce qui signifié que les 5 souches sont des oxydases positifs.



Source: auteur 2014.  
Figure 12. Photo de Test d'oxydase.

Tableau 5. Les résultats de tests LOPAT.

Tests Isolats	Levane	Péctinase	Hypersensibilité sur Tabac	Arginie Déshydrolase	Oxydase
A2P1	+	-	-	+	+
A5P3	+	-	-	+	+
B3P1	+	-	-	+	+
B4P5	+	-	-	+	+
B4P6	+	+	/	/	/
C3P1	-	+	/	/	/
C5P1	+	-	-	+	+

. + : réaction positive. - : réaction négative / : Éliminé par la résultat précédant.

## 2.6. Test gélatinolyse

Après 10 jours d'incubation à une température de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , puis une autre incubation à température de  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 10 minute, nous avons observé la liquéfaction du contenu des tubes (pour 5 isolat). Par contre les 2 tubes témoins ont un résultat négatif.

## 2.7. La réduction des nitrates

Après 5 jours d'incubation, nous avons ajouté une goutte de réactif NIT1 et une goutte de NIT2, Après 5 minute aucune changement n'a été observé sur le milieu, ce la indique qu'il n'est y a pas de réduction des nitrates en nitrite mais ils peuvent être transformé en azote. Pour ce la nous avons ajouté deux mg du Zinc (Zn), après 5 minute le contenu des tubes reste incolore, ce résultat montre que les bactéries sont capablent de réduire le nitrate en azote. Nous avons obtenu ces résultats pour tous les isolats (05). (Cf. tableau 7).

### 2.8. Croissance à des températures de 4 et 41°C

Les résultats de cette expérience montrent que les 5 isolats sont capables de croître dans la température de 4 °C, mais incapables de croître à la température de 41 °C.

### 3. Résumé des résultats

D'après les tests précédents nous avons trouvé, parmi les 22 isolats, 5 isolats présentant des caractéristiques de *Pseudomonas* spp. fluorescents, ces résultats sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Résultats globaux des tests biochimiques et physiologiques pour les 05 isolats retenus.

Isolats		A2P1	A5P3	B3P1	B4P5	C5P1
Tests						
Pigment fluorescents		++	++	++	+++	+++
Hugh et leifson		-	-	-	-	-
Catalase		+	+	+	+	+
Coloration de gram		G-	G-	G-	G-	G-
KOH		+	+	+	+	+
Tests de LOPAT	Levane	+	+	+	+	+
	Péctinase	-	-	-	-	-
	Hyp-s-tabac	-	-	-	-	-
	Arginine déshydrolyase	+	+	+	+	+
	Oxydase	+	+	+	+	+
Test gélatinolyse		+	+	+	+	+
La réduction des nitrates		+	+	+	+	+
Croissance à 41°C et 4°C	4°C	+	+	+	+	+
	41°C	-	-	-	-	-

G- : gram négatif, + : réaction positive, - réaction négative. ++ : Moyennement fluorescente.  
+++ : Très fluorescente

### 4. Résultat de recherche de l'antagoniste

Les résultats des tests préliminaires, de détection d'activités antagonistes des 14 souches bactériennes identifiées comme des *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis de deux espèces de *Fusarium*, montre une très grande variabilité dans les intensités de réponses. Les réponses obtenues indiquent des spectres de réponses, allant de l'absence d'action jusqu'à des activités importantes (Cf. tableau 7).

Nous avons utilisé deux milieux de culture différents KB et PDA pour sélectionner les souches inhibitrices et estimé l'effet des souches antagonistes sur la croissance des deux champignons par rapport aux témoins.

#### 4.1. Sur le milieu King B

Les résultats d'antagonisme de nos souches dans le milieu King B sont représentés dans le tableau 7

**Tableau 7.** L'activité antagoniste des souches bactériennes vis-à-vis des deux champignons (KB)

Les 2 champignons	Type de Réponse (unité)	Nombre des Souches	Les souches Bactériennes
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (FOA)	0	0	/
	1	10	M23E1, A5P3, B3P1, B4P5, C5P1, A24, A2P1, B24, A23, et C3.
	2	2	S1, S4 et A11
	3	1	L17
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	0	0	/
	1	5	S1, C5P1, B24, S4 et C3.
	2	7	M24E1, B3P1, B4P5, A11, A23, A2P1 et A24
	3	2	L17 et A5P3

Les intensités d'inhibition de la croissance mycélienne des deux champignons testés représentés par le tableau 7 montrent une action inhibitrice non négligeable des métabolites des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents testées. En présence des métabolites de la souche L17, nous avons une bonne réponse d'inhibition (3 unités). Par contre les souches C3, B24 et C5P1 ont une faible réponse (1 unité) contre les agents pathogènes testés. Les autres souches ont des actions entre ces deux valeurs.

#### 4.2. Sur le milieu PDA

D'après le tableau 10, nous pouvons dire que l'intensité d'inhibition de croissance mycélienne des champignons testés des souches A5P3, A24, S4 et C3 sont nuls. Par contre, L17 présente une intensité très importante (3 unités). Les autres souches ont des intensités entre ces deux valeurs.

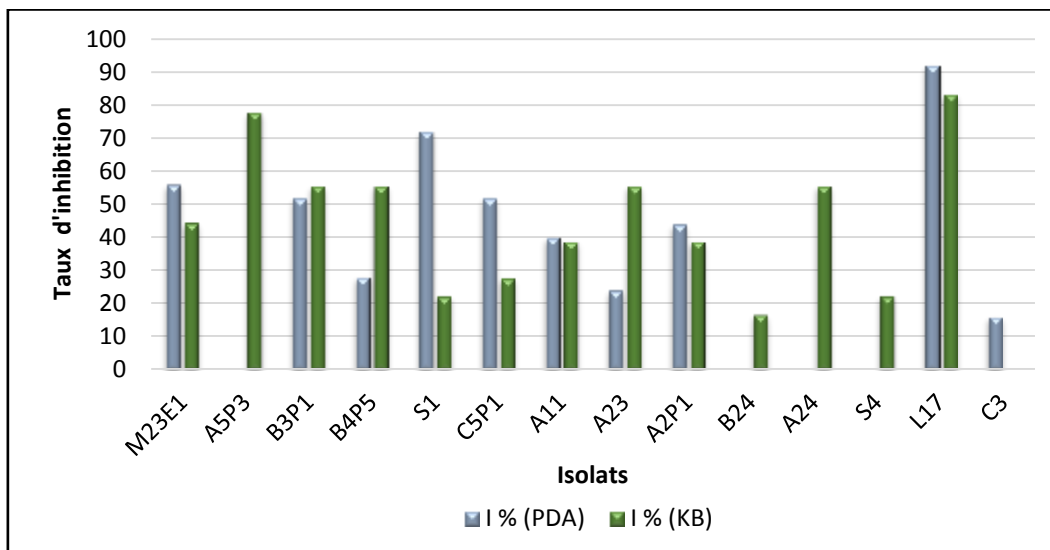
Le plus remarquable en cas de comparaison entre la réponse de ces souches contre les deux champignons testés, est la différence entre l'intensité d'inhibition contre le *Fusarium*

*oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA) et le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (FOL1), chez le premier (FOA) est plus importante que le deuxième (FOL). (Cf. tableau 7 et 8).

**Tableau 8.** L'activité antagoniste des souches bactériennes vis-à-vis des deux champignons (PDA).

Les 2 champignons	Type de Réponse (unité)	Nombre des Souches	Les souches Bactériennes
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> (FOA)	0	5	A5P3, S1, A24, S4 et C3.
	1	5	M23E1, B3P1, B4P5, A11 et A23.
	2	3	A2P1, C5P1 et B24.
	3	1	L17.
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopercisi</i> (FOL1).	0	5	A5P3, B24, A24, S4 et C3.
	1	1	C5P1.
	2	5	B3P1, B4P, A11, A23 et A2P1.
	3	3	M23E1 et L17.

Les résultats obtenus après les calculs des taux d'inhibition dans les deux milieux PDA et KB selon la formule de Hmouni *et al.*, (1996), montrent quel que soit le milieu utilisé le taux d'inhibition varié de 0 a 95 % (Cf. figure 13 et 14).

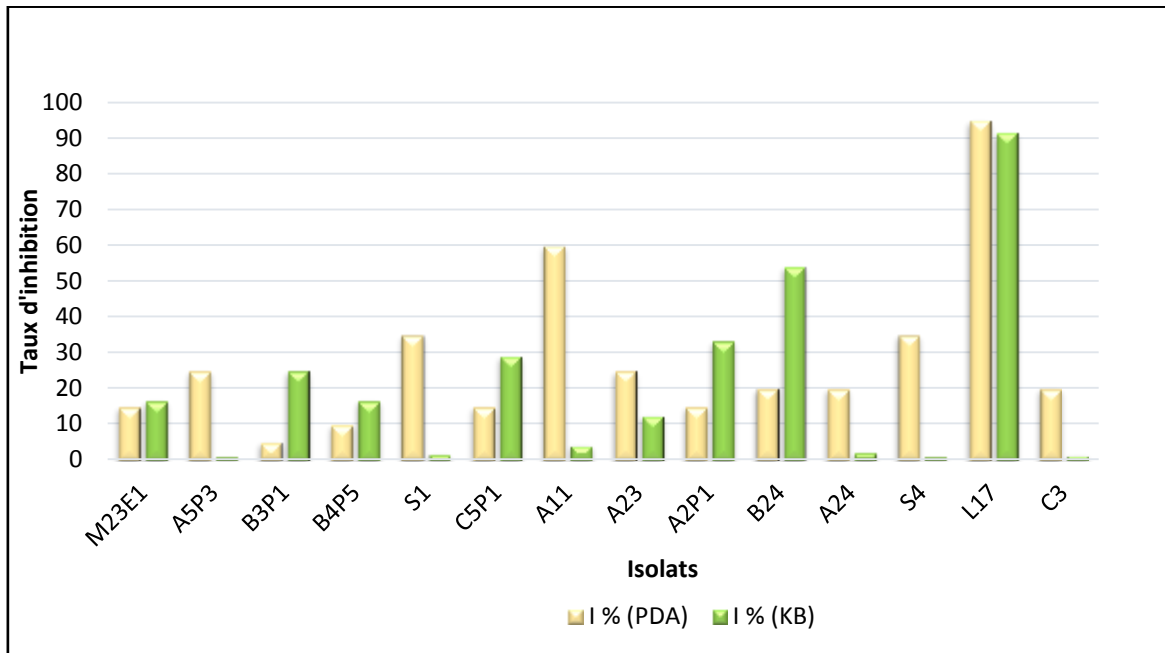


Source: auteur, 2014.

**Figure 13.** Le taux d'inhibition des souches testés vis-à-vis le *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA).

D'après la figure 13, le taux d'inhibition (I %) des isolats dans le milieu KB est plus importante que l'autres milieu (PDA), de plus, nous avons enregistré que le I % de la souche L17 est plus important dans les deux milieux dont elle a une valeur rapproché au 95 %, par

contre la souche B24 à un taux de moins de 20 % dans le milieu KB et aucune activité dans le milieu PDA.



Source: auteur, 2014.

**Figure 14.** Le taux d'inhibition des souches vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopercisi*.

D'après la figure 14, le taux d'inhibition (I %) des isolats est moins importante que dans le cas de premier champignon, le I % de la souche L17 présente la aussi avec une valeur importante dans les deux milieux dont elle à une valeur rapproche au 95 %, par contre la souche B4P5 à un taux de moins de 20 % dans le milieu KB et moins de 10 % dans le milieu PDA.

## Discussion

L'objectif principal est l'isolement et la identification taxonomiques des *Pseudomonas spp.* fluorescents à partir de la rhizosphère de trois plantes spontanées (*Astragalus armatus*, *Retama raetam* et *Peganum harmala*) ainsi que la mise en évidence de leurs activités antagonistes contre deux champignons (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albédinis* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*).

L'identification préliminaire des espèces de *Pseudomonas* produisant le pigment fluorescent est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques et l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques (la coloration de Gram, la recherche de la catalase et de l'oxydase, arginine dihydrolase, voie d'utilisation du glucose...etc.). (Schaad *et al.*, 2001; Vézina et Lacroix, 2012).

L'isolement effectué sur nos échantillons a permis la sélection de 22 isolats, présentant des caractéristiques morphologiques des *Pseudomonas*.

Concernant le test de croissance en anaérobiose, nous avons utilisé le milieu Hugh et Leifson qui possède un indicateur d'acidification (le bleu de bromothymol), ce dernière devient jaune pour les bactéries actives, (la dégradation du glucide qui libère des acides et éventuellement des gazes). Parmi les 22 isolats, 16 ont donné des résultats négatifs sur le test Hugh et Leifson en condition d'anaérobiose (le milieu reste vert) et le reste (06) donne des résultats positifs (le milieu devienne jaune).

Les résultats obtenus dans le test de catalase montre que 16 isolat ont une réaction positive ce qui indique une destruction de peroxyde d'hydrogène et la libération d'oxygène (Reynolds et Richland 2011). Par contre nous avons 06 isolats dont la réaction négative c'est-à-dire que ces bactéries n'ont pas un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes.

Après la coloration de Gram, nous avons gardé sept (07) isolats qui correspondent à des bacilles à Gram négatif de couleur rose, 09 isolats de couleur violet ont été éliminés, qui correspondent au Gram positif, ces dernières possèdent une paroi épaisse à deux couches de peptidoglycane qui empêche la dégradation du violet de gentiane par l'alcool, donc les germes gardant la couleur violet. Par contre les bactéries de Gram négatif possèdent une paroi mince permettant la dégradation par l'alcool et la recoloration par la fuschine. Ces résultats ont été confirmés par le test KOH.

La comparaison entre le test de catalase et la croissance en anaérobiose montre que ces deux tests ont des résultats dans le même sens et identique puisque ces deux tests ont permis de sélectionner 16 isolats (souches catalases positives et aérobies strictes).

Après la coloration de gram sur ces 16 isolats, nous avons sélectionné 07 souches (A2P1, A5P3, B3P1, B4P5, B4P6, C3P1 et C5P1) bacilles à gram négatif avec une confirmation par le test de KOH. Ces résultats confirment que ces 07 isolats sont des *Pseudomonas*, puis que les *Pseudomonas* sont des bactéries bacilles à Gram négatif, aérobies à métabolisme strictement respiratoires et chimio-organotrophes. Ils peuvent généralement être distingués visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert. Ces résultats permettent de confirmer que nos isolats sont des *Pseudomonas* (schaad *et al.*, 2001; Amkraz, 2013).

Suite à ces tests (coloration de gram, croissance en anaérobiose, Production du pigment fluorescent et test de catalase) nous avons lancé les tests LOPAT (test Levane sucrase, oxydase, pectinase, arginine et hypersensibilité sur tabac) pour distinguer, au sein du groupe, les espèces non pathogènes et les espèces phytopathogènes. (Lelliott *et al.*, 1966 In Benamor, 2014; Vézina et Lacroix, 2012). D'après ces tests on peut dire :

La production de levane sucrase extracellulaire, et est présente chez tout les pathovars de *P. syringae*, chez *P. chlororaphis*, quelques biovars de *P. fluorescens*, mais cependant elle est absente chez *P. putida* (Jacques, 1994; Bossis, 1995). Cette enzyme catalyse la synthèse de levane à partir du sucrose, mais catalyse aussi l'hydrolyse du levane en monosaccharides, et le saccharose un diholoside non-réducteur (Mezaache, 2012 et Amkraz, 2013).

Le test péctolytique montre que 5 isolats (A2P1, A5P3, B3P1, C3P1 et C5P1) sont des bactéries saprophytes puisque nous n'avons pas observé des pourritures au niveau des boîtes de pétri. Par contre pour les deux autres boîtes on a observé des pourritures dès les premiers jours d'incubation.

Le test d'hypersensibilité sur tabac indique que nos isolats testés (05), ne sont pas des souches pathogènes, puisque on a observé un brunissement sans assèchement (réaction négative d'après Vézina et Lacroix, (2012).

L'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matières organiques. Elle constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose. La complexité du catabolisme de l'arginine révèle l'intérêt de ce substrat pour les microorganismes. Il existe quatre voies distinctes d'assimilation de l'arginine chez *P. putida* et au moins trois d'entre elles existent chez les autres espèces de *Pseudomonas spp* fluorescents. Ces voies mettent en jeu d'autres acides aminés comme la citrulline, l'ornithine, la proline ou le 4-aminobutyrate.

Elles sont largement indépendantes les unes des autres et sont différemment utilisées selon les besoins bactériens. La voie de l'arginine déiminase est une caractéristique des *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophytes. Elle fonctionne uniquement en absence d'O<sub>2</sub> et sous conditions non-dénitrifiantes, c'est-à-dire lorsque la chaîne respiratoire est totalement bloquée. C'est la seule voie fermentative connue chez ces bactéries (Latour et Lemanceau, 1997).

D'après le test d'oxydase nous avons trouvé que toutes les souches testés (05) pouvant donner une réaction positive, ce sont donc des microorganismes hétérotrophes qui ont l'aptitude d'utiliser une gamme étendue de composés organiques (Latour et Lemanceau, 1997). Contrairement aux espèces oxydase-négatives qui sont toutes phytopathogènes. (Palleroni, 1984).

Après les tests LOPAT, nous avons entamé d'autres tests dont le but d'identifier nos isolats, nous avons commence par le teste de réduction de nitrates, les résultats de cette expérience montrent que (05) isolats sont capables de réduire le nitrate en azote. Nous avons obtenu ces résultats pour tous les isolats.

Lorsque l'oxygène n'est plus disponible en quantité suffisante, certaines espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents font appel aux oxydes d'azote. La réduction des nitrates ( $\text{NO}_3^- + 2 e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$ ) se fait à l'intérieur de la cellule au niveau de la membrane interne grâce au nitrate réductase. Elle est généralement inhibée en aérobiose, les électrons de la chaîne respiratoire étant alors préférentiellement orientés vers l'oxygène. Les nitrites formés sont ensuite rejetés dans le milieu. Dans certains cas, ils interviennent eux mêmes comme accepteurs d'électrons et sont réduits en composés gazeux tels que les oxydes nitriques (NO) et nitreux (N<sub>2</sub>O) et l'azote (N<sub>2</sub>). Il s'agit de la dénitrification dissimulatrice. La réduction de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO et N<sub>2</sub>O est sous le contrôle de réductases plus ou moins liées à la membrane plasmique et elle s'exprime côté péri plasmique. La respiration sur nitrates et la dénitrification présentent un rendement énergétique plus faible que la respiration sur oxygène. (Chabbi, 2010).

Concernant le test de gélatinolyse nous avons trouvé que nos 05 isolat pouvant dégradées le gélatine, ceci traduit que nos isolats sont pas des *P. putida*.

Le test de croissance dans le cas de 4°C, montre que ces isolats (05) sont capables de se croitre. Dans l'autre cas de 41 °C, nous avons obtenu un résultat négatif pour toutes les souches.

La croissance des *Pseudomonas spp.* fluorescents est possible entre 4°C et 41°C. Ce test réalisé pour éliminer les *Pseudomonas aeruginosa* qui ne sont pas capables de croitre à une température de 4°C, mais capable de croitre à une température de 41°C (Schaad *et al.*, 2001).

Selon la clé A et B proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995) et diagramme de Schaad *et al*, 2001, pour l'identification des *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophytes, et les résultats obtenus dans ces derniers tests nous pouvons dire que ces 5 isolats (A2P1, A5P3, B3P1, B4P5 et C5P1) sont des *Pseudomonas spp.* fluorescents.

Quels que soient la clé utilisée, nos isolats pourrait être soit *P. chlororaphis* soit des *P. fluorescens* biovar IV ou biovar II, cette classification est basé sur le test de dénitrification (+) et le test de Levane (Levane +) pour la clé A, et sur les tests de gélatine (+), Levane (Levane +) et dénitrification (+) pour la clé B.

Concernant les tests d'antagonistes nous avons enregistré différents résultats, certaines souches ont des résultats très importantes au terme de lutte biologique comme le cas de souche L17 avec un taux d'inhibition de 95 %, d'autres souche ont une réponse antagoniste moyenne comme les souches B3P1, A11 et A2P1 et en fin des souches ont un taux d'inhibition peu important comme le cas des isolats C3, B24, qui ont un taux d'inhibition moins de 15 %.

La différence d'intensité en pouvoir inhibiteur des ces isolats pourraient être liées à la nature et à la qualité des substances actives secrétées par les souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents Des chercheurs ont indiqué que la composition en nutriments a un effet sur la production des antibiotique (Harir, 2010).

Sur le milieu King B, nous avons remarqué:

- Une bonne réponse des souches contre la croissance mycélienne des champignons testés, de plus on a enregistré une activité antagoniste importante contre le *Fusarium oxysporum f. sp. albédinis* par rapport à la réponse du 2<sup>ème</sup> champignon ;
- Ces souches produisent des sidérophores à couleur verte jaune pour acquisition le fer et un effet de compétition.

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

Donc les *Pseudomonas spp.* fluorescents possède d'autre mécanismes inhibiteurs dans leur pouvoir d'antagonisme qui peuvent être attribuer à la synthèse des antibiotiques et d'autres types des métabolites à effet d'antibiose (Mezaache, 2012).

Le principal mécanisme mise en cause dans l'effet d'antagonisme des souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents est celui de la chélation du fer ferrique par des siderophores produite sous l'influence de l'environnement et les conditions de culture *in vitro* (Digat et Garden, 1987).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant les paroi cellulaires. Les plus caractérisées de ces métabolites secondaires sont les: phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons. (mezaache, 2012).

## Conclusion générale

Au terme de notre étude portant sur l'isolement et l'identification taxonomiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents à partir de la rhizosphère de trois plantes spontanées (*Astragalus armatus*, *Retama raetam* et *Peganum harmala*) et la mise en évidence de leurs activités antagonistes contre deux champignons (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albédinis* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*). Nous pouvons dire que :

L'isolement et la purification, ont permis de sélectionner 22 isolats bactériens selon les ses caractères morphologiques. L'utilisation des tests physiologiques et biochimiques classiques (coloration de gram, test de catalase, d'oxydase.....etc.), et les clés A et B proposées par Jacques (1994) et Bossis (1995) pour l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, ont permis de sélectionner 05 souches (A2P1, A5P3, B3P1, B4P5 et C5P1) comme des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Cette identification reste préliminaire nous suggérons d'utilisée la galerie API (20 NE, 50 CH...etc.), pour plus de précision nous pouvons s'orienté vers des études chimio-taxonomiques et génétiques.

Après l'identification et la sélection de ces 05 souches, nous avons entamé des tests d'antagonisme pour 14 souches (nos souches plus 9 souches issue des travaux de fin d'étude master 2013-2014) contre deux espèces fongiques du *Fusarium* phytopathgènes.

Les isolats testés ont montré une activité antagoniste appréciable, *in vitro*, contre la croissance des formes spéciales de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (FOA), et *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopercisi*. Les résultats de ces tests montre que la souche L17 (taux d'inhibition égale 95%) a une activité antagoniste plus importants doit être pris en considération dans les futures travaux sur la lutte biologique, ainsi dans la promotion de croissance des plantes cultivée d'un point de vu fixation d'azote atmosphérique et productions des enzymes qui favorisent l'assimilation de fer et de phosphore inaccessible.

D'après nos résultats sur le milieu PDA qui ne favorisent pas la production des pigments fluorescents, les souches bactériennes se caractérisent par des activités antagonistes importantes. Ceci peut s'expliquer par l'implication des autres mécanismes d'action, en montrant que la fluorescence signe de synthèse des siderophores, n'est pas subordonnée obligatoirement à l'activité antagoniste. Donc les *Pseudomonas* spp. fluorescents possède d'autre mécanismes inhibiteurs dans leur pouvoir d'antagonisme qui peuvent être attribuer à la synthèse des antibiotiques et d'autres types des métabolites à effet d'antibiose. (Mezaache, 2012).

Le principal mécanisme mise en cause dans l'effet d'antagonisme des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents est celui de la chélation du fer ferrique par des siderophores produite sous l'influence de l'environnement et les condition de culture *in vitro* (Faugier, 2011)

## Références bibliographiques

1. **Ait-Tayeb, L.A., Ageron, E., Grimont, F. and Grimont, P.A.D., 2005.** *Molecular phylogeny of the genus Pseudomonas based on rpoB sequences and application for the identification of isolates.* *Res. Microbiol.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250805000574>
2. **Amkraz, N.** 2013. *Utilisation des Pseudomonas spp. fluorescents et des plantes aromatiques et médicinales contre Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis, agent du chancre bactérien de la tomate.* Thèse de doctorat : Université de Zohr. Agadir: Maroc. 263p.
3. **Ammar, W.** 2011. *Etude des interactions entre les souches rhizobiennes par production des substances inhibitrices "Bacteriocines".* Thèse magister. Université d'Oran Es-senia. 94 p.
4. **Anjaiah, V., Koedam, N., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., Hofte, M., Tambong, J. T. et Cornelis, P., 1998.** *Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of Pseudomonas aeruginosa PNA1 and Tn5derivatives toward Fusarium spp. and Pythium spp.* *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:847–854.
5. **Bano N. et Musarrat J., 2003.** *Characterization of a new Pseudomonas aeruginosa strain NJ-15 as a potential biocontrol agent.* *Cur. Microbiol.* 46: 324-328.
6. **Belimov, A. A., Safronova, V. I., Sergeyeva, T. A., Egorova, T. N., Matveyeva, V. A., Tsyganov, V. E., Borisov, A. Y., Tikhonovich, I. A., Kluge, C., Preisfeld, A., Dietz, K. J. et Stepanok, V.V., 2001.** *Characterisation of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase.* *Can. J. Microbiol.* 47: 642–652.
7. **Benamor, M.** 2014. *Isolement et caractérisation taxonomiques des Pseudomonas SPP Fleuressens a partir des rhizosphère des plantes spontanés.* Mémoire de master : Université Amar Téliidji de Laghouat. 79 p.
8. **Benizri, E., Baudoin, E et Guckert, A. 2001.** *Root colonization by inoculated plantgrowth rhizobacteria.* *Biocontrol Science and Technology.* 11: 557-574.
9. **Bossis E., Lemanceau P., Latour, X., Gardan, L. 2000.** *The taxonomy of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida : current status and need for revision.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://www.agronomyjournal.org/articles/agro/abs/2000/01/A0108/A0108.html>.
10. **Boudmagh, A.** 2007. *Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives.* Thèse de doctorat : Université de Mentouri Constantine. 144 p.
11. **Campbell, J., Jacobsen, C, S et Sorensen, J. 1995.** *Species variation and plasmid incidence among fluorescent Pseudomonas strains isolated from agricultural and industrial soils.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00163.x/abstract>.
12. **Carcanague, D.R., 1997.** *Novel derivatives of pseudomonic acid.* *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.* 7(21): 2805-2808.
13. **Cattelan, A.J., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J., 1999.** *Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth.* *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670–1680.
14. **Chabbi, R.** 2009. *Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre Trigonella L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien.* Thèse de magister : Université de Mentouri Constantine. 126 p.

15. **Chin-A-Woeng, T. F., Bloemberg, G. V. et Lugtenberg, B. J.** 2003. *Phenazines and their role in biocontrol by Pseudomonas bacteria*. *New. Phyto.* **157** : 503-523.
16. **Confida, 2011.** *Disque d'identification Oxydase*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=>
17. **Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Segonds, C., Berche, P., Nassif, X. et Ferroni, A., 2008.** *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014] <http://link.springer.com/article/10.1007/s10096-011-1263-5>
18. **Djigal, D.** 2003. *Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes*. Thèse de Doctorat. Cheikh Anta Diop de Dakar. 166p.
19. **El-Sayed, A.K., Hothersall, J. et Thomas, C.M.,** 2001. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiol.* **147**: 2127-2139.
20. **Eyi Ndong, H, C.** 2009. *Etude des champignons de la forêt dense humide consommés par les populations du nord du Gabon*. Thèse de doctorat: Université de Ouagadougou. 265 p.
21. **Ezawy, T; Mona, A; Mahmoud, R; Doaa, A; Ahmed, A.** 2005. Synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://link.springer.com/article/10.1007/s00284-005-0111>
22. **Faugier, A.** 2011. *Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires « the rare biosphere »*. Thèse de Doctorat. L'école Centrale de Lyon. 174p.
23. **Florence, M.** 2006. *Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures: analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation*. Thèse de Doctorat. L'Université de Grenoble. 278 p.
24. **Favet, M.** 2013. *Intérêt des méthodes d'analyse modernes en écologie microbienne*. Séminaire de Bactériologie 4. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. [https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.unige.ch%2Funi3%2FAteliers%2FSeminaireBacteriologie%2FPolycop4.pdf&ei=SW3\\_U5vsKJDBaOrtgpN&usg=AFQjCNET0pV5FsRkm0PL7ysndPWipPSdLw&bvm=bv.74035653,d.d2s](https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.unige.ch%2Funi3%2FAteliers%2FSeminaireBacteriologie%2FPolycop4.pdf&ei=SW3_U5vsKJDBaOrtgpN&usg=AFQjCNET0pV5FsRkm0PL7ysndPWipPSdLw&bvm=bv.74035653,d.d2s)
25. **Franzetti, L et Scarpellini, M.** 2007. *Characterisation of Pseudomonas spp. isolated from foods*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. (document en anglais). <https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0CGAQFjAJ&url=http%3A%2F%2Fwww.ajol.info%2Findex.php%2Fajb%2Farticle%2Fdownload%2F92350%2F81804&ei=6rcAVLOkK8am0QWzqoGACw&usg=AFQjCNE4uPPUTJxtcX3EyJVc2luSElZrQQ&bvm=bv.74115972,d.bGQ>
26. **Garbaye, J., 1994.** *Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis*. *New Phytol.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x/abstract>
27. **Ghiglione, J.F., Gourbiere, F., Potier, P., Philippot, L. and Lensi, R.,** 2000. *Rôle of respiratory nitrate reductase in ability of Pseudomonas fluorescens YT101 to colonize the rhizosphere of maize*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4012–4016.

28. **Glick, B.R., Patten, C.L, Holguin, G. and Penrose, D.M., 1999.** *Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria*. Imperial College Press, London, UK, 267 p.
29. **Gurtler, V. et Stanisich, V.A., 1996.** *New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12934.x/full>.
30. **Gutterson, N., Ziegle, J.S., Warren, G.J. and Layton, T.L., 1988.** Genetic determinants for catabolite induction of antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* HV37a. *J. Bacteriol.* 170: 380-385.
31. **Haas, D. et Keel, C. 2003.** *Regulation of antibiotic production in root-colonizing Pseudomonas spp. and relevance for biological control of plant disease*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>
32. **Harir, M. 2010.** *Effet antagoniste enter les souches d'actinomycètes et Verticillium dahliae kleb agent de la verticilliose de l'olivier*. Thèse de Magister: l'Université d'Oran. 272 p.
33. **Himedia laboratoire, 2011.** L'Arginine dihydrolase medium, Modified. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. (document en anglais). <https://www.google.dz/url?sa=t&rct>
34. **Homma, Y., Kato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H. et Suzui, T., 1989.** *Production of antibiotics by Pseudomonas cepacia as an agent for biological control of soilborne plant pathogens*. *Soil Biol. Biochem.* 21:723-728.
35. **Howell, C.R. and Stipanovic, R.D., 1980.** Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol.* 70: 712-715.
36. **Inbar, J. and Chet, I., 1991.** Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 23: 973-978.
37. **Institu Technique de l'Agriculture Biologique. 2002.** *Activités biologiques et fertilité des sols: Intérêts et limites des méthodes analytiques disponibles*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://www.itab.asso.fr/downloads/com-agro/acti-bio-ferti-sol-8-novembre-2002.pdf>
38. **Institut national de la recherche agronomique (France). 2009.** *La rhizosphère interface sol-plante*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. [https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.als.uhp Nancy.fr%2Fconference%2F2009%2FGuckert\(12-11-09\).pdf&ei=NwryU4TOEMLZ0QXqiIHwnCw&usq=A F QjCNFme4Kb9xn\\_A1I4F2o-4YWoFaNM5g](https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.als.uhp Nancy.fr%2Fconference%2F2009%2FGuckert(12-11-09).pdf&ei=NwryU4TOEMLZ0QXqiIHwnCw&usq=A F QjCNFme4Kb9xn_A1I4F2o-4YWoFaNM5g)
39. **Kampfer, P., Falsen, E. et Busse, H.J., 2008.** *Reclassification of Pseudomonas mephitica Claydon*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014] <http://ijs.sgmjournals.org/content/58/1/136.short>.
40. **Kim, M., Vasiljeva, L., Zhelkovsky, A., Moore, C et buratowski, S. 2004.** *Distinct mechanisms for snoADN and mARN termination*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://tfiib.med.harvard.edu/pubs/Kim.pdf>.
41. **Latour, X et Lemanceau, P. 1997.** *Carbon and energy metabolism of oxidase positive saprophytic fluorescent Pseudomonas spp.*, *Agronomie*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/88/58/56/PDF/hal-00885856.pdf>
42. **Le calvez, T. 2009.** *Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond*. Thèse de doctorat: Université de Rennes1. 270 p.

43. **Lehr, N-A., Schrey, S-D., Hampp, R et Tarkka, M-T. 2008.** *Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x/full>
44. **Lepoivre, P. 2003.** *Phytopathologie: bases moléculaires de biologiques des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte.* De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux, Brussels, Belgium. p. 275-309.
45. **Martin, F. N. and Loper, J. E., 1999.** Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:111-181.
46. **Matuszewski, C. 2009.** *Evaluation de la carte Vitek® 2 ANC pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries d'intérêt médical.* Thèse de Doctorat: l'Université de Henri Poincaré – Nancy I. 112 p.
47. **Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. et Défago, G., 1992.** Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathol.* 82(2): 190–195.
48. **Mazzola, M., Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M et Pierson, L.S.III, 1992.** Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2616-2624.
49. **Meksem, A. 2010.** *Etudes structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB-dépendants de bactérie à gram négatif.* Thèse de doctorat: université de Strasbourg. 256 p.
50. **Meliani, A. 2012.** *Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des Pseudomonas fluorescens.* Thèse de Doctorat: l'Université d'Oran. 272 p.
51. **Mercado-Blanco, J., van der Drift, K. M.G.M., Olsson, P.E., Thomas-Oates, 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.
52. **Mezaache, M. 2012.** *Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre.* Thèse de Doctorat: l'Université de Ferhat AbbaS Sétif. 221 p.
53. **Ministère nationale d'enseignement supérieur et de recherche (France). 2008.** *Le sol est vivant.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved>
54. **Misaghi, I et Grogan, R. G. 1969.** *Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads.* *Phytopathol.*
55. **Nader, M. 2008.** *Assimilation du fer chez les Pseudomonas aeruginosa: Etude du mécanisme de transport de pyoverdine à travers la membrane externe.* Thèse de doctorat: université de Strasbourg. 216 p.
56. **Nielsen, M.N. et Sørensen, J., 1999.** Citinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 217-227.
57. **Nielsen, M.N., Sørensen, J., Fels, J. and Pedersen, H.C., 1998.** Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563–3569.
58. **Njomen, G, N. 2006.** *Mise au point d'une technique de dosage de l'activité de la catalase dans les tissus.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014].

- [http://www.memoireonline.com/02/12/5336/m\\_Mise-au-point-dune-technique-de-dosage-de-l-activite-de-la-catalase-dans-les-tissus1.html](http://www.memoireonline.com/02/12/5336/m_Mise-au-point-dune-technique-de-dosage-de-l-activite-de-la-catalase-dans-les-tissus1.html)
59. **Palleroni N.J.** 1984. *Pseudomonas (Migula)*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://ijs.sgmjournals.org/content/56/9/2153.full>
  60. **Palleroni, N, J.** 1993. *Stenotrophomonas, a new bacterial genus for Xanthomonas maltophilia*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://ijsb.sgmjournals.org/content/50/2/711.full.pdf>.
  61. **Palleroni, N,J et Moore, E, R, B.** 2004. Taxonomy of pseudomonads: *experimental approaches*. In "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, pp. 3-44.
  62. **Palleroni, N.J.** 2005. *Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-9086-0\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-9086-0_1)
  63. **Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. and Velázquez, E.,** 2009. *Historical evolution and current status of the taxonomy of genus Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>
  64. **Perrier, T.** 2004. *Etude théorique et expérimentale du comportement biogéochimique de l'Américium-241 en conditions rhizosphériques simplifiées. Application dans un sol agricole calcaire*. Thèse de Doctorat: l'Université Henri Poincaré Nancy I. 337p.
  65. **Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. et Newman, D. K.,** 2006. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat. Chem. Biol.* 2: 71–78. [PsoAVOiRAemp0QWh2YDoBA&usg=AFQjCNHEPPCx8ABVIU5xTFDO9C1YC\\_576A&bvm=bv.74115972,d.ZGU](http://www.nature.com/nchembio/090506/576A&bvm=bv.74115972,d.ZGU)
  66. **Qujeq, D et Rezvani, T.** 2007. *Catalase (antioxydant enzyme) activity in streptozotocin-induced diabetic rats*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. (document en anglais). [https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0CDAQFjAC&url=http%3A%2F%2Fijod.uaeu.ac.ae%2Fiss\\_1501%2Fpdf&ei=E74AVOHIAuO70QW1jYCwAg&usg=AFQjCNEKOU1peCWtpxDONf2WnRBb7HJr8A&bvm=bv.74115972,d.bGQ](https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0CDAQFjAC&url=http%3A%2F%2Fijod.uaeu.ac.ae%2Fiss_1501%2Fpdf&ei=E74AVOHIAuO70QW1jYCwAg&usg=AFQjCNEKOU1peCWtpxDONf2WnRBb7HJr8A&bvm=bv.74115972,d.bGQ).
  67. **Rabhi, N.** 2011. *Isolement de Pseudomonas spp. fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels*. Thèse de Magister: l'Université de Ferhat Abba Sétif. 130 p.
  68. **Rahman, M-S., ANO, T., SHODA, M.** 2007. Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127(3), p. 503-507.
  69. **Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffac, C., Meyer, J.M., Défago, G., Sutra, L. et Moëgne-Loccoz, Y.,** 2011. *Pseudomonas protegens sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin*. *Syst. Appl. Microbiol.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202011000294>
  70. **Reynolds, J. Richland, C.** 2011. *Teste de catalase*. [en ligne]. [consulté en Aout 2014]. <https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0CC0QFjAD&url=http%3A%2F%2Fansm.sante.fr%2Fcontent%2Fdownload%2F29240%2F385373%2Fversion%2F%2Ffile%2Frlp-101101-Oxydase-Biorad.pdf&ei=>
  71. **Rocher, F.** 2004. *Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phléomienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réaction de défense*. Thèse de doctorat : université de poitiers (France). 163p.

72. **Fatmi, M., Schaad, N. W., 2002.** Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.* 51: 149–154.  
[S1567134809001853.](#)
73. **Scher, F.M et Baker, R., 1982.** *Effect of Pseudomonas putida and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens.* *Phytopathol.* 72:1567–1573.
74. **Schroth, M.N., Hildebrand, D.C. et Panopoulos, N., 1992.** *Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads.* Springer-Verlag, New York, pp. 3104-3131.
75. **Snoussi, S-A. 2010.** *programme regional de gestion integree des ravageurs pour le proche-orient (projet gtfs/rem/070/ita) : rapport de mission : étude de base sur la tomate en Algérie.* Ed. Rome : FAO.
76. **Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. et Pierson, L.S., 1990.** *Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent Pseudomonas species in the rhizosphere of wheat.* *Appl. Environ. Microb.* 56: 908-912.
77. **Vézina, L et Lacroix, M. 2012.** *Tests biochimiques classiques pour l'identification des pectobacterium (Erwinia pectinolytiques) et des Pseudomonas fluorescents.* [en ligne]. [consulté en Aout 2014].  
<https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=j&q=&esrc=s&source>
78. **Visca, P. 2007.** *List of Prokaryotic Names with Standing.*  
<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2013/11/15/nar.gkt1111.short>

## Les annexes

## Annexe 1. Les milieux de cultures utilisés

**1. LPGA**

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

**2. King B**

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

**3. Hugh et Leifson**

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

**4. Gélatine Gélatinase**

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

**5. EPN**

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

**6. PDA**

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

**7. Levane**

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

**8. Arginine**

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