



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



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : Sciences

DEPARTEMENT : des Sciences agronomiques

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : MOUNIR Aïcha

DOMAINE : Sciences de la nature et de la Vie

FILIERE : Sciences agronomiques

OPTION : Protection des Végétaux et d'environnement

Thème

**Isolement et caractérisation taxonomique de
Pseudomonas spp. fluorescents et l'effet de biostimulation
et de biocontrôle sur le blé**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Marfoua Meriem	MAA	Président
Rahmani Mokhtar Mohamed	MAA	Examineur
Ameur Djamilia	MAA	encadreur

Mounir Aicha

Isolement et caractérisation taxonomique de *Pseudomonas spp.* fluorescents et l'effet de biostimulation et de biocontrôle sur le blé

Résumé :

Notre objectif dans cette étude a été effectué pour l'identification des isolats de la rhizosphère des plantes spontanées dans la région EL-ASSAFIA qui ont été isolés en 2014. Nous avons obtenu 8 souches de *Pseudomonas* dont nous avons choisis six souches aléatoirement afin d'étudier leur effet sur la biostimulation de la croissance des plantes de blé et le biocontrôle des champignons phytopathogènes.

Nous avons pris trois souches (A2, A8, A12) pour étudier la stimulation de la germination des graines et la croissance des plantes de blé. Dans cette perspective, nous avons remarqué un effet significatif sur la bio-stimulation de la germination *in vitro* pour les quatre variétés du blé (Boussellem, Vitron, HD1120, MBB), et sur la bio-stimulation de la croissance des racines et des tiges concernant la variété Vitron.

Les six souches que nous avons choisies, ont une activité inhibitrice sur la croissance mycélienne de *Fusarium culmorum* et *Fusarium pseudogramineam in vitro* sur milieu KB et PDA.

Mots clés : Biocontrôle, Biostimulation, *Pseudomonas fluorescens*, la Rhizosphère, Germination, *Fusariumculmorum* , *Fusariumpseudogramineam*, Blé.

Mounir Aisha

Isolation and characterization of taxonomic *Pseudomonas spp.* fluorescent and effect of organic stimulation and organic control in wheat

Abstract

Our goal in this study was carried for the identification of the isolates of the spontaneous plants rhizosphere in area El-ASSAFIA which were insulated in 2014. We obtained eight strains of *Pseudomonas* which we selected six stocks arbitrarily in order to study their effect on the organic stimulation of the growth of the wheat plans and the organic control of the phytopathogenic fungi.

We took three strains (A2.A8.A12) to study the stimulation of the germination of seeds and the growth of the wheat plants from that point, we noticed a significant effect on organic-stimulation of the in vitro germination for four varieties of wheat (*Bousselem, Vitron, HD1120, MBB*), and on the organic stimulation of the roots and stem's growth regarding the Vitron variety.

The six stocks which we already have chosen have an inhibiting activity of the mycelia growth of the *Fusarium Culmorum* and *Fusarium Pseudograminirium* on medium KB and PDA.

Keywords: Organic control, Organic-stimulation, *Pseudomonas fluorescens*, Rhizosphere, Germination, *Fusariumculmorum*, *Fusariumpseudogramineam*, Wheat

عزل وتوصيف للتصنيف . الفلورسنت و تأثيرها على النمو الحيوي و المكافحة الحيوية في القمح

هدفنا من هاته الدراسة هو تحديد عزلات من الريزوزفير للنباتات البرية الموجودة في منطقة العسافية
ثمانية سلالات من البسودوموناس بحيث اخترنا عفويا ستة سلالات وذلك لدراسة تأثيرهم
التحفيز الحيوي لنمو القمح و التحكم الحيوي للفطريات الممرضة .

(A2, A8, A12) من اجل دراسة تحفيز انبات البذور و نمو نبات القمح. في هذا الإطار, لقد
لاحظنا وجود تأثير كبير على التحفيز الحيوي للانبات في المختبر بالنسبة للأربعة فصائل من القمح
(Boussellem, Vitron, HD1120 MBB)

و ايضا على تحفيز الحيوي لنمو الجذور و السيقان فيما يخص فصيلة الفيترون .

السلالات الستة الذي اخترناها لها نشاط مثبط على النمو الميسلياني *Fusarium culmorum* *Fusarium*
pseudogramineam في الوسط KB PDA

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas fluorescens*, التحكم الحيوي , التحفيز الحيوي, الريزوسفير, الانبات,
Fusarium pseudogramineam, *Fusarium culmorum* ,

Tables des matières

Résumé

Dédicace

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre I : Etude Bibliographique

I.	Le sol, constituants inertes et êtres vivants.....	4
	1. Le sol.....	4
	2. Importance de sol.....	4
	3. La biomasse vivante dans le sol.....	4
	4. Rhizosphère.....	5
	5. Les microorganismes de la rhizosphère.....	6
	5.1 Les actinobactéries.....	6
	5.2. Les champignons.....	6
	5.2 Les bactéries.....	6
	6. La nutrition des bactéries.....	7
	7. L'importance de Fer.....	7
	7.1. chez la plante.....	7
	7.1. Chez les bactéries	7
II.	Les Pseudomonas, caractères et classification	9
	1. Généralité sur les Pseudomonas.....	9
	2. Le rôle de <i>Pseudomonas SPP.</i> fluorescents.....	9
	2.1. Stimulation de la croissance des plantes.....	11
	2.1.1. Solubilisation des phosphates par les Pseudomonas spp. Fluorescents.....	11
	2.1.2. Synthèse de phytohormones.....	12

2.1.3. Dénitrification.....	13
2.1.4. l'absorption de fer par les <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents.....	13
2.5.Mécanismes d'antagonisme.....	14
2.5.1 Métabolites Secondaires possédant des propriétés de bio-contrôle.....	15
2.5.2. Quorum Sensing(QS).....	17
3. Caractéristiques du Genre <i>Pseudomonas</i>	17
4. Classification du genre <i>Pseudomonas</i>	20
4.1. Étapes de la classification.....	20
4.2. Méthodes de la classification.....	23
4.2.1. Classification contemporaine.....	23
4.2.2. Caractéristiques phénotypiques.....	23
4.2.3. Études chémo-taxonomiques.....	24

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Identification des isolats bactériens.....	26
1. L'origine des isolats.....	26
2. Régénération des isolats.....	26
3. Conservation des isolats.....	26
4. Identification des isolats.....	30
4.1 Test de KOH.....	26
4.2 Coloration de Gram.....	27
5. Teste oxydase	27
6. Identification par la galerie API 20 NE.....	28
II. Effet de biostimulation et de biocontrôle.....	30
II.1. Matériel biologique.....	30
II 1.1 Les souches bactériennes.....	30
II.1.2 Matériel végétale.....	30
II.1.3 Matériel fongique.....	30
II.2 Essais de biostimulation.....	30
II.2.2 Essai de germination in vitro.....	31

II.2.3 Désinfection des semences.....	31
II.2.4 L'inoculum bactérien.....	31
II.2.5 Bactérisation des semences.....	31
II.2.6 Dispositif expérimental.....	31
II.2.7 Les Paramètres étudiés.....	32
II.2.8 Analyse statistique.....	33
II.3 Essai de phyto-stimulation en végétation.....	33
II.3.1 Matériel végétal.....	33
II.3.1 Préparation du substrat.....	33
II.3.2 L'inoculation du substrat.....	33
II.3.3 Dispositif expérimental.....	34
II.3.4 Paramètres étudiés	35
II.3.5 Analyse statistique.....	35
II.4 Essai d'antagonisme in vitro	36

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Identification des isolats bactériens.....	39
I.1. Test KOH.....	39
I.2. Coloration de Gram.....	40
I.3. Test d'oxydase.....	40
I.4. Galerie API20NE.....	41
II. Effet de biostimulation et biocontrôle.....	43
II.1 essai de germination in vitro.....	43
II.2 essais de biostimulation de la croissance végétale in vitro.....	48
Conclusion.....	63

Références bibliographique

Annexe

Liste des tableaux

Tableau 01 : Production mondiale de la tomate en 2010.....	06
Tableau 03 : Matériel végétale utilisées	30
Tableau04 : Dispositif expérimentale de l'essai de la croissance végétale	35
Tableau 05 : Les résultats d'identification de la galerie API 20 NE	44
Tableau 06 : Résultats d'analyse du l'essai de germination <i>in vitro</i>	45
Tableau 07 : Résultat d'analyse de la variance	50

Liste des figures

Figure 1 : les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère.....	11
Figure 2 : Les principaux antibiotiques produits par les souches de	14
Figure 3 : Relations phylogéniques entre les différents groupes des protéobactéries	18
Figure 4 : La galerie API 20NE.....	33
Figure 5 : Dispositif expérimentale de l'essai de germination in vitro.....	37
Figure 6 : Technique de l'essai d'antagonisme in vitro.....	40
Figure 7 : Pigments jaune vert fluorescents.....	39
Figure 8 : Résultat du test KOH.....	40
Figure 9 : Des bacilles à Gram- sous microscope optique.....	40
Figure 10 : Résultat positive du test oxydase.....	41
Figure 11 : Identification de bactérie par la galerie API20NE.....	42
Figure 12 : Taux de germination par variétés.....	45
Figure 13 : Taux de germination facteur bactérie.....	46
Figure 14 : Taux de germination facteur temps.....	47
Figure 15 : Test de l'énergie de germination (%).....	48
Figure 16 : Effet de facteur substrat sur la longueur racinaire	50
Figure 17 : Longueur racinaire (cm) dans la deuxième coupe (facteur souche).....	51
Figure 18 : Hauteur de tige (cm) pour la deuxième coupe facteur substrat.....	52
Figure 19 : Hauteur de tige (cm) pour la deuxième coupe facteur souche.....	53
Figure 20 : Le taux d'inhibition sur deux milieux de culture PDA et KB.....	54
Figure 21 : Le taux d'inhibition de <i>Pseudograminearum</i> sur milieux de cultures.....	55

Liste des abréviations :

ACC : 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate.

AIA : Acide Indole -3- acétique.

Cm: centimètre.

cv : cultivar.

DO: densité optique.

FAO: Food and Agriculture Organisation.

h : heure.

HCN : acide cyanhydrique.

j: jours.

KB: king B

MADR : Ministère d'Agriculture et du Développement Rurale.

MBB: Mohamed Ben Bachir.

nm: nanomètre.

P.aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

P.chlororaphis : *Pseudomonas chlororaphis*.

P.fluorescens : *Pseudomonas fluorescens*.

P.putida : *Pseudomonas putida*.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria ou rhizobactéries stimulant la croissance des plantes.

RSI : résistance systémique induite.

Spp : plusieurs espèces.

Subs : substrat.

UFC/ml: unité formatrice de colonies par millilitre.

Introduction

La culture de blé est la plus répandue à travers le monde et en Algérie. Elle joue un rôle socio-économique important dans le développement du pays. En Algérie, c'est la culture la plus consommée (MADR, 2008).

Le blé est sujet à l'attaque par une multitude de microorganismes pathogènes. En effet, sa culture intensive a généré et a amplifié les problèmes phytosanitaires. Outre les champignons et les bactéries pathogènes entraînent une réduction importante de la qualité et du rendement de cette culture. Surtout les maladies racinaires et les micro-organismes peuvent survivre aussi dans le sol. En Algérie, toutes les zones de production de blé sont contaminées par ces agents pathogènes, dont la sévérité varie d'une région à l'autre (FAO, 2003).

Actuellement, ce sont essentiellement des produits chimiques qui sont utilisés pour lutter contre ces agents phytopathogènes. Mais, ces produits chimiques sont considérés répercussion sur la santé et l'environnement, la recherche et le développement de méthodes de lutte alternatives à la lutte chimique sont recommandés. La lutte biologique est une voie prometteuse et les nombreux travaux de recherche réalisés, un peu partout dans le monde, sur différents agents pathogènes ont abouti à des résultats encourageants. La lutte biologique par protection du système racinaire, en y introduisant des bactéries non pathogènes antagonistes (Kouassi 2001; Thakore 2006).

La rhizosphère est la zone d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes (Lynch, 1990). Au niveau de la rhizosphère les microorganismes influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phyto-pathogènes, la lutte se fait principalement via des bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium* et *Pseudomonas*.

La capacité des *Pseudomonas fluorescents* de coloniser rapidement cette rhizosphère fait de ces bactéries un groupe taxonomique de grand intérêt en lutte biologique. Weller et al. (1988). Qui 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 phyto-pathogènes *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 compétitionnée farouchement pour l'acquisition du fer. On note également pour certaines souches une capacité à induire les mécanismes de défense chez la plante (Kim 2004 et *al.*, Iavicoli 200 et *al.*). Mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène. Elles sont aussi connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore. Elles peuvent modifier la morphologie et la physiologie racinaire par la production de régulateurs de croissance comme les auxines.

L'objectif de ce travail est :

- ✓ Identifier et caractériser les isolats par des différents tests
- ✓ Tester l'effet de ces souches sur la germination des graines *in vitro* et sur la croissance des plantes de blé
- ✓ Et enfin, réaliser *in vitro* la compétence d'antagonisme contre des champignons phytopathogènes.

I. Le sol, constituants inertes et êtres vivants

1. Le sol

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

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

2. Importance de sol

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.

3. La biomasse vivante dans le sol

D'après MENESR (2008), Faugier (2011), il existe environ 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/m² dans des sols pauvres en matière organique alors qu'elle atteint plus de 1 000 individus/m² 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).

4. Rhizosphère

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "*rhizo*" ou "*rhiza*" signifiant "racine" et "sphère", le champ d'action ou d'influence. Hiltner (1904) a décrit la rhizosphère comme le lieu d'activités microbiennes autour des racines des légumineuses. Par la suite, cette définition a été étendue à toutes les plantes. Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de «**l'effet rhizosphère**» (Lemanceau, 1992 ; Whippe, 2001 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009). Dans la rhizosphère *sensu stricto* il faut distinguer : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface racinaire) et l'exorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005 ; Brimecombe *et al.* 2008).

5. Les microorganismes de la 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 et Berthelin 1998 *In* Perrier 2004).

5.1. 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).

5.2. 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).

5.3. 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 par leur 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_2), 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).

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^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Cl^- , ...) et d'une source d'énergie soit par photosynthèse (cas des bactéries photosynthétiques) soit par des réactions biochimiques d'oxydoréduction. (Meliani, 2012).

7. L'importance de Fer

7.1. chez la plante

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

7.2. Chez bactéries

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

II. Les Pseudomonas, caractères et classification

1. Généralité sur les Pseudomonas

Au sein de la population rhizosphériques, les pseudomonas spp fluorescent sont prédominants et peuvent constituer plus de 60% de la flore bactérienne (Digat et Gardan, 1987).

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, famille des Pseudomonaceae, ordre des Pseudomonales (Moore *et al.*, 2006).

Parmi les pseudomonas spp fluorescent les deux espèce les pseudomonas fluorescents et pseudomonas putida constituent un intérêt particulier en lutte biologique qui sont saprophyte a oxydase positive ces rhizobactéries font partie de l'ordre des Actionomycétales , de la famille des Pseudomonas et de genre de pseudomonas (Palleroni,1984)

2. Le rôle de *Pseudomonas SPP.* fluorescents

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 bio-contrôle, à l'encontre des phytopathogènes.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophyte sont les habitants type des sols agricoles et la rhizosphère des plantes, et sont impliqués dans de nombreuses interactions avec les plantes (Schroth *et al.*, 1992). 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 (Sakthivel et Gnanamanickam, 1987), le blé (Weller et Cook 1983), la pomme de terre (Kloepper *et al.*, 1980b), la canne à sucre (Suslow et Schroth 1982), le radis (Kloepper et Schroth 1978), le coton (Howell et Stipanovic, 1980) et le manioc (Hernandez *et al.*, 1986).

Différentes espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été rapportés à la fois comme PGPR (plant growth promoting rhizobactéria), et comme souches de bio-contrôle des champignons phytopathogènes (de Salmone *et al.*, 2001). *P. putida* (Scher et Baker, 1980),

P. aeruginosa (Bano et Musarrat, 2003), *P. chlororaphis* (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998) et *P. cepacia* (Cattelan *et al.*, 1999). Toutefois, les *Pseudomonas* spp. Fluorescents ne sont pas tous des antagonistes.

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 (Digat et Gardan, 1987). D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes (Sands et Rovira, 1971). Ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération *in situ* relativement court (Garbaye, 1994), leur capacité à utiliser les exsudats de plantes comme nutriments (Lugtenberg *et al.*, 2002), 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 (de Weger *et al.* 1994), produisent des antibiotiques (Garbaye, 1994 ; Natsch *et al.*, 1994), et des enzymes hydrolytiques (Lim *et al.*, 1991; Neilsen *et al.*, 1998; Neilsen et Sorensen, 1999).

Ces capacités antagonistes et PGPR, sont dues à des mécanismes directs et indirects (Fig.2). Les mécanismes indirects utilisés par ces *Pseudomonas* spp. fluorescents, comprennent la production d'antibiotiques contre des bactéries pathogènes (Thomashow *et al.*, 1990), la réduction de fer disponible pour les phytopathogènes présents dans la rhizosphère (Scher et Baker, 1982), la synthèse d'enzymes dégradant les paroi cellulaires fongiques et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante.

Les mécanismes directs concernent, la séquestration du fer pour les plantes par les sidrophores. la production de phytohormones ou encore par solubilisation de formes de phosphore insolubles, rendant ainsi le phosphore biodisponible (Salisbury, 1994), et diminuer les taux d'éthylène produits par la plante (Glick, 1995; Glick *et al.*, 1999). Ces bactéries sont capable d'induire une résistance systémique contre un pathogène donné, et porte le nom d'ISR (van Loon *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2001). Il est également reconnu que des bactéries de la mycorrhizosphère, encore appelées bactéries auxiliaires de la mycorrhization, stimulent sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Garbaye, 1994).

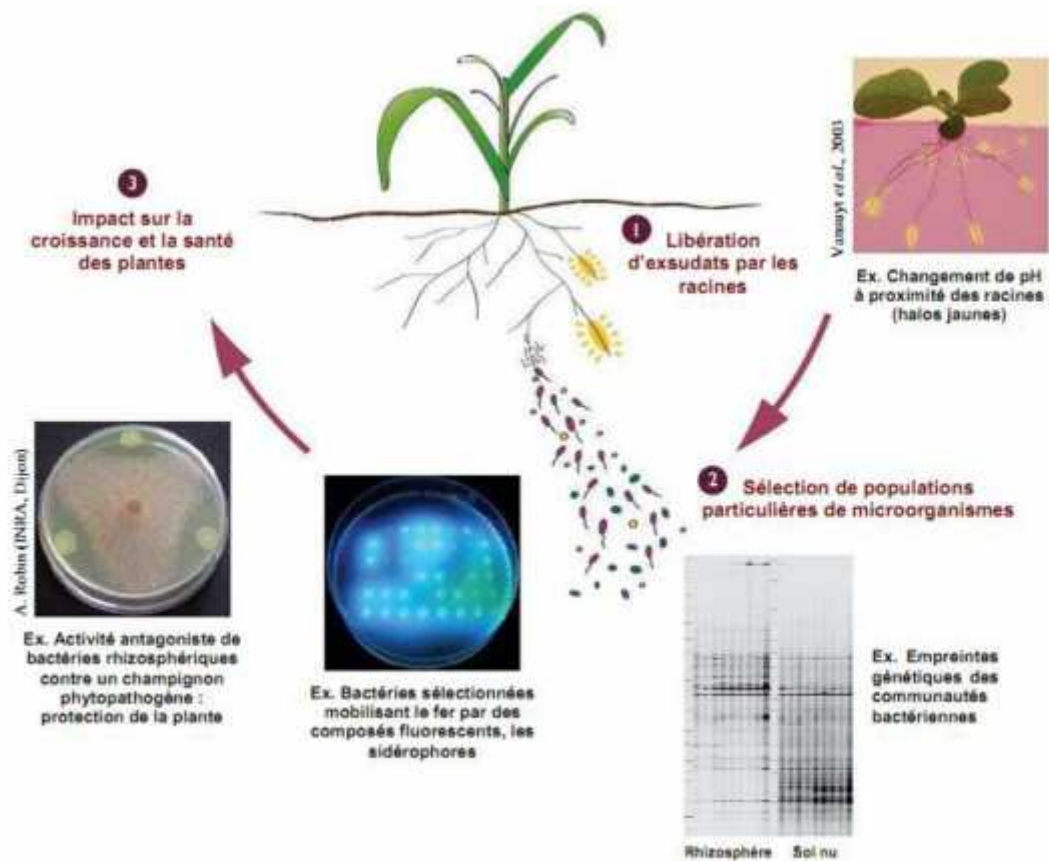


Figure 1. Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Lemanceau *et al.*, 2006).

2.1 Stimulation de la croissance des plantes

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

2.1.2. Synthèse de phytohormones

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 (Salisbury, 1994). Communément produite par les rhizobactéries (Barazani et Friedman, 1999). Les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante. Patten et Glick (2002), ont rapporté le rôle de l'AIA produit par *P. putida*, chez la plante hôte, dans le développement de son système racinaire.

b. Cytokinines

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

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 quel perturbation physique ou chimique des tissus (Salisbury, 1994). Parmi ses nombreux effets sur la croissance et le développement de la plante, la production d'éthylène peut causer l'inhibition de la croissance des racines. Glick *et al.* (1998) ont émis, une théorie selon laquelle 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.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs d'AAC-désaminase (Glick *et al.*, 1994). La transformation des *Pseudomonas* spp. par des gènes codant cette enzyme, permet à celles-ci de croître sur un milieu dont la seule source de carbone et d'azote est le AAC, et de stimuler l'élongation des racine (Shah *et al.*, 1998). Cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations

(Grichko et Glick, 2001), ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds (Burd *et al.*, 1998; Belimov *et al.*, 2001).

2.1.3. 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 (N₂), par des métallo-enzymes comme la nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont les dénitrifiants les plus communs des sols des régions tempérées (Gamble *et al.*, 1977). Les *Pseudomonas* spp. Fluorescents sont capable de s'adapter aux manque d'oxygène par l'utilisation des oxydes d'azote comme accepteurs alternatifs d'électrons (Stewart, 1988). La respiration sur nitrate et la réduction des nitrites sont impliquées dans la compétition des souches modèles de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol (Philippot *et al.*, 1995; Ghiglione, 2000).

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

2.5. Mécanismes d'antagonisme

Les *Pseudomonas* spp. Fluorescents produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant les parois 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 (Fig.3).

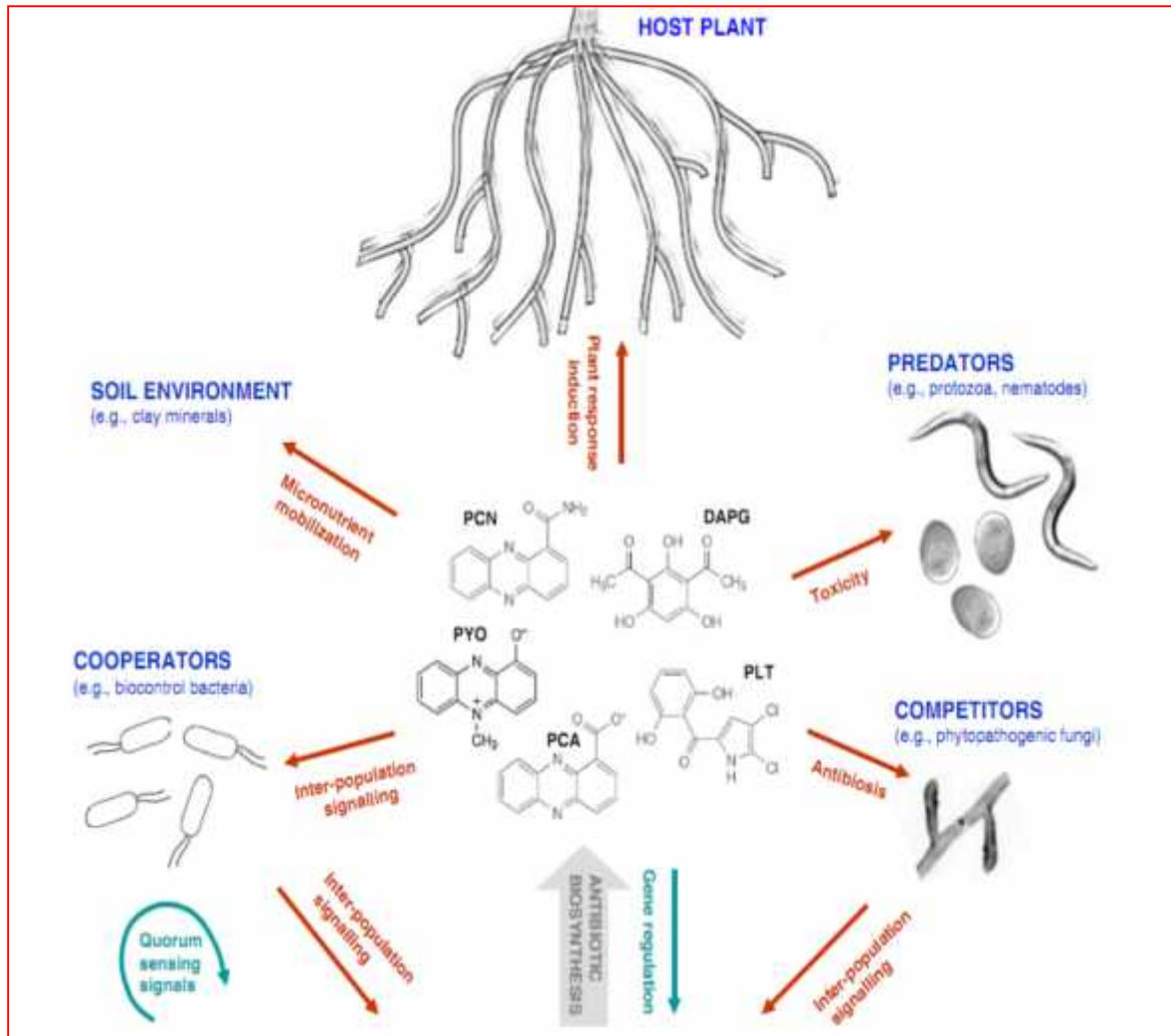


Figure 2. Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions : *Pseudomonas* de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol

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

2.5.1. Métabolites Secondaires possédant des propriétés de bio-contrôle

a. Les phénazines

Les phénazines sont des pigments hétérocycliques azotés intensément colorés, produits par différentes souches bactériennes (Leisinger et Margraff 1979; Budzikiewicz, 1993; Stevans *et al.*, 1994). Ces hétérocycles expriment un large spectre d'activité sur les bactéries et les champignons (Smirnov et Kiprianova, 1990). 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. fluorescens* (Gurusiddaiah *et al.*, 1986), *P. chlororaphis* (Pierson et Thomashow, 1992) et *P. aeruginosa* (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* (Gurusiddaiah *et al.*, 1986; Thomashow *et al.*, 1990).

La phénazine-1-carboxamide (PCN), a aussi été rapportée chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, tel que *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis* (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998; Mavrodi *et al.*, 2001). 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. aeruginosa* (Demange *et al.*, 1989). Cette phénazine de couleur bleue est toxique pour une large gamme de bactéries et champignons (Hassan et Fridovich, 1980). 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 (Howell et Stipanovic, 1979), *P. fluorescens* F113 (Fenton *et al.*, 1992), *P. fluorescens* CHAO (Keel *et al.*, 1992) et *P. fluorescens* Q2-87 (Bangera et Thomashow, 1996).

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 (Dwivedi et Johri 2003).

a. Pyrolnitrine (PRN)

La pyrrolnitrine (PRN) (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl) un composé pyrrole, est produite par les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. fluorescens* (Kirner *et al.*, 1998) et *P. chlororaphis* (Elander *et al.*, 1968). La pyrrolnitrine a trouvé son application comme composé à usage clinique pour le traitement des mycoses cutanées plutôt que fongicide agricole (Hammer *et al.* 1997, McSpadden Gardener et Fravel, 2002).

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* (Howell et Stipanovic 1979, Homma *et al.*, 1989).

c. 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 (Howell et Stipanovic 1980; Défago *et al.*, 1990; Maurhofer *et al.*, 1994). Cette molécule, isolée pour la première chez *P. aeruginosa*, est composée d'un anneau résocinol synthétisé par la voie de polycétide, relié à une partie pyrrole bichlorée (Nowak-Thompson *et al.*, 1997, 1999), possédant un pouvoir fongitoxique efficace contre les oomycètes, notamment *Pythium ultimum* (Maurhofer *et al.*, 1992).

d. Mupirocine

Plus connu comme l'acide pseudo Monique, 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 (El-sayed *et al.*, 2001). C'est un antibiotique largement utilisé dans les maladies tropicales (Carcanague, 1997).

e. Antibiotiques peptidique

Les antibiotiques peptidiques sont aussi bien produits par les bactéries à Gram positif (Katz et Demain, 1977) que celles à Gram-négatif (Dowling et O'Gara, 1994), par une synthèse multienzymatique non-ribosomique (Kleinkauf et Dohren, 1996). 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* (Nielsen *et al.*, 2000). La Viscosinamide un autre

lipopeptide cyclique produit par *P. fluorescens* DR54 (Nielsen *et al.*, 1999), est aussi actif sur *R. solani* par la réduction de la biomasse mycélienne et donc la formation de sclérotés (Thane *et al.*, 2000). 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).

f. 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; Nielsen et Sorensen, 1998; Picard *et al.*, 2000).

La lyse des parois cellulaires, par les enzymes dégradatives excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue du mycoparasitisme. La Chitinase, la α -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 α -1-6 glucane et les ponts glucosidiques (Schroth et Hancock, 1981; Chet, 1987; Lorito *et al.*, 1996). Les microorganismes excrétant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces (Ordentlich *et al.*, 1988; Inbar et Chet, 1991). Le contrôle biologique de *Fusarium solani*, se fait essentiellement via les activités des laminarinase et chitinase chez *P. stutzeri* YPL-1 (Lim *et al.*, 1991). *P. cepacia* produisant la α -1,3 glucanase, réduit l'incidence des maladies causées par *R. solani*, *P. ultimum* et *Sclerotium rolfsii* (Fridlender *et al.*, 1993). Nielsen *et al.* (1998) ont rapporté que dans la rhizosphère de la betterave à sucre, les *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibaient *R. solani* par production d'endochitinase.

2.5.2. 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 (Bassler, 1999). La molécule AHL du QS, est impliquée dans la régulation de la production d'antibiotiques chez: *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis* (Pessi et Haas, 2001). Les gènes des

facteurs *signa*, *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* (Whistler *et al.*, 2000). D'autres formes de régulation globale ont été rapporté: le répresseur transrationnel *phlF* (Delany *et al.*, 2000) et le régulateur de l'ARN (*PrrB*) sur la production de métabolites secondaires (Aarons *et al.*, 2000).

3. Caractéristiques du Genre *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), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Fig.3).

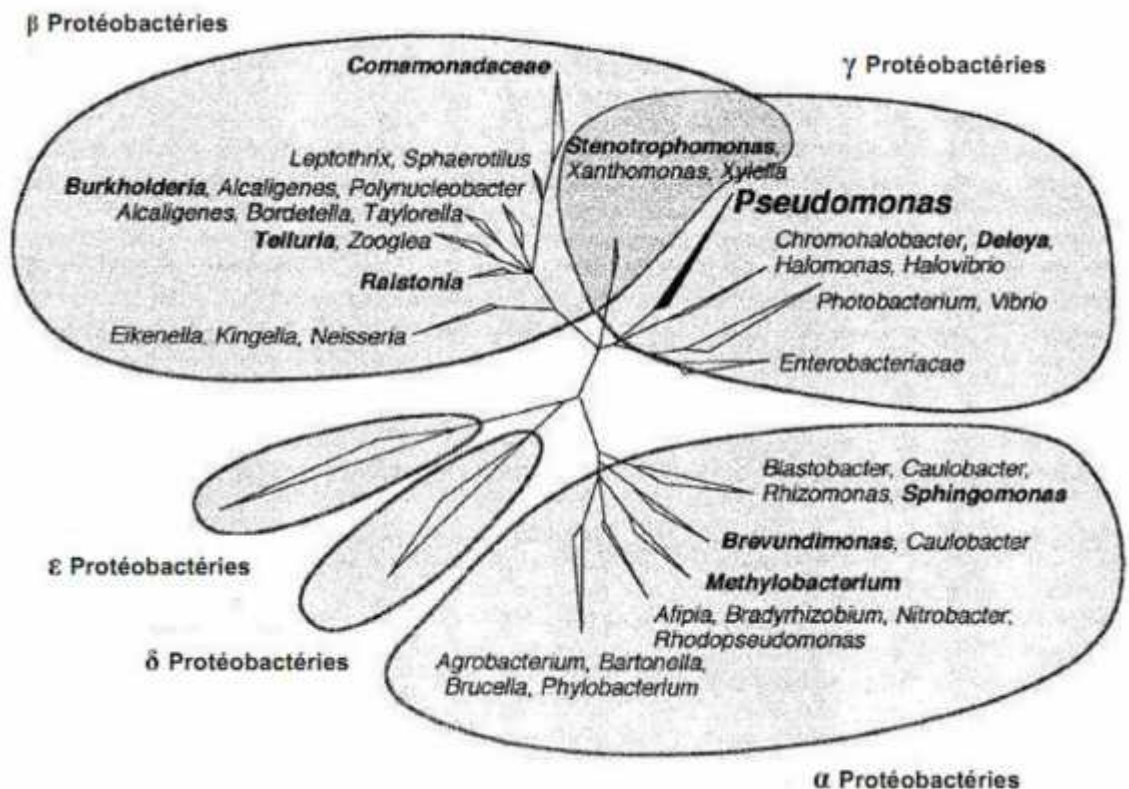


Figure 3. Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis *et al.*, 2000).

✓ **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 *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes possèdent tous une cytochrome oxydase c ayant un maximum d'absorption caractéristique à 552/554 nm, qui peut être mise en évidence par l'oxalate de N, N-diméthyl-paraphénylène-diainine (Lelliot *et al.*, 1966). Elles sont aussi catalase positive, mésophile chimio-organotrophe puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone.

Toutefois, certaines sont chimio organotrophes facultatives et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier. Elles peuvent utiliser des sources de carbones variables (versatilité nutritionnelle), et certaines ont la capacité de croître même dans l'eau (Stanier *et al.*, 1966).

La plupart étant saprophytes (Bossis *et al.*, 2000 ; Ramalho *et al.*, 2002). Quelques espèces comme *P. syringea*, sont phytopathogènes (Stanier *et al.*, 1966), et certaines peuvent causer des infections chez l'homme. Particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi *et al.*, 2001).

Les températures cardinales aux quelles les espèces se multiplient varient de 4° à 42°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 pH inférieur à 4.5, ni métaboliser le lactose sur Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer sont négatifs (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 -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).

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

Ces bactéries contribuent donc, de façon significative, à la réduction des nitrates et des nitrites qui constituent des polluants des nappes phréatiques (Latour et Lemanceau, 1997). En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (Euzeby, 2008).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protègent 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 auxquels 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 Alcan Oates et d'alginates ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (Holloway, 1992).

4. CLASSIFICATION DU GENRE *PSEUDOMONAS*

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

4.1. Étapes de la classification

En 1960 Stanier *et al.*, dans une approche de clarification de la taxonomie du genre, ont publié un travail reportant les caractéristiques nutritionnelles de 267 isolats du genre ; basé

sur l'utilisation de 146 composés organiques, en plus d'autres tests considérés comme déterminants dans la classification du genre. Dans la même décennie, la découverte du caractère de renaturation de l'ADN par Marmur, a permis de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par les essais d'hybridation ADN/ADN (Colwell et Mandel, 1964; Colwell *et al.*, 1965; Johnson et Ordal, 1968).

Le plus grand succès de la classification des *Pseudomonas*, selon les caractères génotypiques fût atteint par Palleroni et ses collaborateurs. Qui ont classifiés ce groupe bactérien en cinq sous-groupes d'ARNr, sur la base d'homologies ARN/ADN (Palleroni *et al.*, 1973). Toutefois ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignés, et finalement seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas* (Peix *et al.*, 2009).

Pourtant dans l'édition de 1974 du Bergey's Manual, ces bactéries sont incluses dans la famille des *Pseudomonadaceae*. Leur classification repose sur des caractéristiques phénotypiques, seules la composition en G+C fût rajouté comme caractéristique génétique. Dans la première édition du Bergey's Manual, la classification basée sur les cette homologie ARN/ADN fût incluse, mais le nombre d'espèces et les caractéristiques phénotypiques ont été maintenu (Palleroni, 1984).

Les principaux changements dans la taxonomie viennent de Woese, qui proposa de les classifier et de les identifier en fonction de leurs ARN ribosomiaux (Woese *et al.*, 1984). Toutefois ce nouveau schéma d'identification n'a pas été pris en considération dans l'édition 1994 du Bergey's Manual. Pourtant, c'est la classification phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARNr 16S, établie par Woese *et al.*, (1984), qui a permis plus tard la subdivision par Kersters *et al.* (1996) des protéobactéries en 15 genres appartenant aux classes α , β et γ et proposé par Stackebrandt *et al.* (1987).

En même temps, *Pseudomonas acidovorans* et *P. testosteroni* inclus dans le groupe ARNr III sont reclassifiés en 1987 dans le genre *Comamonas* (Tamaoka *et al.*, 1987), alors que les espèces *P. flava*, *P. palleroni*, *P. taeniospiralis*, *P. pseudoflava* et *P. carboxydoflava* seront reclassifiés deux ans plus tard dans le genre *Hydrogenophaga* (Willems *et al.*, 1989).

Depuis 1990, le séquençage du gène codant ARNr 16S a débuté, et est appliqué pour toutes les bactéries connus. Partiel au début, mais plus tard des génomes entiers ont été séquencés et déposés dans les banques de données. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le développement des modèles mathématiques des arbres représentant les

similitudes des séquences ont permis une classification phylogénétique des procaryotes (Peix *et al.*, 2009). Et depuis, la reclassification des espèces initialement incluses dans les groupes ARNr de Palleroni continue.

Les espèces du groupe ARNr III comme *P. facilis*, *P. delafieldii* et d'autres isolats cliniques sont désormais reclassifiés dans le genre *Acidovorax* (Willems *et al.*, 1990), des espèces phytopathogènes comme *P. avenae* et *P. catleyae* ont aussi été reclassifiés dans ce genre (Willems *et al.*, 1992). En effet, ces nouveaux genres sont inclus dans la classe des beta-Proteobacteria, au même titre que *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992) et *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1995). Ces deux derniers genres proviennent de la reclassification des espèces du groupe ARNrII comme *P. cepacia* (designée comme espèce type du genre *Burkholderia*) *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. pickettii* et *P. solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1992, 1995).

Le groupe ARNr V, est phylogénétiquement le plus proche des vrais *Pseudomonas* (ARNr groupe I), *Xanthomonas maltophilia* reclassifié dans le genre *Stenotrophomonas* en 1993, mais appartenant à la classe des gamma-Proteobacteria (Palleroni et Bradbury, 1993).

Dans la première décennie du nouveau millénaire, la révision taxonomique la plus détaillée du genre *Pseudomonas* basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, fût entreprise par Anzai *et al.* (2000). En analysant les séquences de 128 espèces de *Pseudomonas* (certaines sont des souches de références), ils ont conclu que 57 seulement appartenaient aux groupe des *Pseudomonas sensu stricto*; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 classes :

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescens*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*.
- Et le groupe des *P. pertucinogena*.

Depuis l'an 2000, la reclassification continue toujours (Tableau I). Plusieurs espèces étant mal classées comme *P. aureofaciens* et *P. aurantiaca* qui sont désormais des sous espèces du groupe *P. chlororaphis* (Johnson et Palleroni, 1989; Peix *et al.*, 2007), qui compte actuellement trois sous espèces: *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov.;

Pseudomonas chlororaphis subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. et *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. (Peix *et al.*, 2007).

4.2. Méthodes de la classification

4.2.1. Classification contemporaine :

L'édition actuelle du Bergey's (Palleroni, 2005) compte de 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).

4.2.2. 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).

figure: Les espèces appartenant actuellement au genre *Pseudomonas* (d'après Euzéby, 2008 in Peix *et al.*,

<i>P. abietaniphila</i> ^a	<i>P. cuatrocienegasensis</i> ^b	<i>P. mandelii</i> ^a	<i>P. pseudoalcaligenes</i> ^a
<i>P. aeruginosa</i> ^a	<i>P. delhiensis</i> ^b	<i>P. marginalis</i> ^a	<i>P. psychrophila</i> ^b
<i>P. agarici</i> ^a	<i>P. duriflava</i> ^b	<i>P. marincola</i> ^b	<i>P. psychrotolerans</i> ^b
<i>P. alcaligenes</i> ^a	<i>P. extremorientalis</i> ^b	<i>P. mediterranea</i> ^a	<i>P. putida</i> ^a
<i>P. alcaliphila</i> ^b	<i>P. ficuserectae</i> ^a	<i>P. meliae</i> ^a	<i>P. reinekei</i> ^b
<i>P. amygdali</i> ^a	<i>P. flavescens</i> ^a	<i>P. mendocina</i> ^a	<i>P. resinovorans</i> ^a
<i>P. anguilliseptica</i> ^a	<i>P. flectens</i> ^a	<i>P. meridiana</i> ^a	<i>P. rhizosphaerae</i> ^b
<i>P. antarctica</i> ^b	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>P. migulae</i> ^a	<i>P. rhodesiae</i> ^b
<i>P. argentiniensis</i> ^b	<i>P. fragi</i> ^a	<i>P. mohnii</i> ^b	<i>P. sabulinigri</i> ^b
<i>P. aspleni</i> ^a	<i>P. frederiksbergensis</i> ^b	<i>P. monteilii</i> ^a	<i>P. salomonii</i> ^b
<i>P. avellanae</i> ^a	<i>P. fulva</i> ^a	<i>P. moorei</i> ^b	<i>P. savastanoi</i> ^a
<i>P. azotifigens</i> ^b	<i>P. fuscovaginae</i> ^a	<i>P. moraviensis</i> ^b	<i>P. segetis</i> ^b
<i>P. azotoformans</i> ^a	<i>P. gelidicola</i> ^a	<i>P. mosseli</i> ^b	<i>P. simiae</i> ^b
<i>P. balearica</i> ^a	<i>P. geniculata</i> ^a	<i>P. mucidolens</i> ^a	<i>P. straminea</i> ^a
<i>P. beteli</i> ^a	<i>P. gessardii</i> ^a	<i>P. multiresinivorans</i> ^a	<i>P. stutzeri</i> ^a
<i>P. borbori</i> ^b	<i>P. graminis</i> ^a	<i>P. nitroreducens</i> ^a	<i>P. synxantha</i> ^a
<i>P. boreopolis</i> ^b	<i>P. grimontii</i> ^b	<i>P. oleovorans</i> ^a	<i>P. syringae</i> ^a
<i>P. brassicacearum</i> ^b	<i>P. guineae</i> ^b	<i>P. orientalis</i> ^a	<i>P. taetrolens</i> ^a
<i>P. brenneri</i> ^b	<i>P. halophila</i> ^a	<i>P. oryzae</i> ^b	<i>P. thermotolerans</i> ^b
<i>P. caeni</i> ^b	<i>P. indica</i> ^b	<i>P. otitidis</i> ^b	<i>P. thivervalensis</i> ^b
<i>P. cannabina</i> ^a	<i>P. japonica</i> ^b	<i>P. pachastrellae</i> ^b	<i>P. tolaasii</i> ^a
<i>P. caricapayae</i> ^a	<i>P. jessenii</i> ^a	<i>P. palleroniana</i> ^b	<i>P. tremae</i> ^a
<i>P. cedrella</i> ^a	<i>P. jinjuensis</i> ^b	<i>P. panacis</i> ^b	<i>P. trivialis</i> ^b
<i>P. chloritidismutans</i> ^b	<i>P. klionensis</i> ^b	<i>P. panipotentis</i> ^b	<i>P. tuomierensis</i> ^b
<i>P. chlororaphis</i> ^a	<i>P. knackmussii</i> ^a	<i>P. parafulva</i> ^b	<i>P. umsongensis</i> ^b
<i>P. cichorii</i> ^a	<i>P. koreensis</i> ^b	<i>P. peli</i> ^a	<i>P. vancouverensis</i> ^a
<i>P. cissicola</i> ^b	<i>P. libanensis</i> ^a	<i>P. pertucinogena</i> ^a	<i>P. veronii</i> ^a
<i>P. citroneolensis</i> ^a	<i>P. lini</i> ^b	<i>P. pictorum</i> ^a	<i>P. viridiflava</i> ^a
<i>P. congelans</i> ^b	<i>P. lundensis</i> ^a	<i>P. plecoglossicida</i> ^b	<i>P. vranovensis</i> ^b
<i>P. corrugata</i> ^a	<i>P. lurida</i> ^b	<i>P. poae</i> ^a	<i>P. xanthomarina</i> ^b
<i>P. constantinii</i> ^b	<i>P. lutea</i> ^b	<i>P. pohangensis</i> ^b	<i>P. xiamenensis</i> ^b
<i>P. cremoricolorata</i> ^b	<i>P. luteola</i> ^a	<i>P. proteolytica</i> ^b	<i>P. xinjiangensis</i> ^b

2009).

a: espèces incluses dans le Bergey's Manual (Palleroni, 2005); b: espèces décrites après la publication du Bergey's Manual (2005) ; c: espèces décrites avant la publication du

Bergey's Manual (2005) qui n'ont pas été incluses dans cette édition mais dont les noms sont validés (d'après Euzéby, 2008 in Peix *et al.*, 2009).

4.2.3. Études 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).

I. Identification des isolats bactériens

Ce travail comporte deux principales parties, la première est l'identification de certains isolats de *Pseudomonas* spp. La deuxième est la mise en évidence de l'effet bactérien sur la croissance des plantes et le biocontrôle des agents phytopathogènes de blé.

I.1. L'origine des isolats

Les quatorze isolats utilisés dans cette partie ont été isolés en 2014 à Université Amar Telidji- Laghouat à partir des plantes spontanées de région d'Elassafia (Wilaya de Laghouat), mais ils ont été restés sans identification.

I.2. Régénération des isolats

Les quatorze isolats ont subi une régénération et une purification par repiquage successive sur milieu King B (Annexe 1), jusqu'à l'obtention des cultures pures. En se basant sur les caractéristiques phénotypiques (la production des pigments fluorescents, la forme circulaires et l'aspect plane et lisse de colonie), après une incubation de 24 à 96 heures à une température de 28 ± 2 °C.

I.3. Conservation des isolats

Nous avons conservé les isolats ainsi purifier dans des tubes contenant le milieu KB et après leur croissance à 28 ± 2 °C, ils ont été conservés à 04 ± 2 °C, pour les utilisées ultérieurement. (Boudmagh, 2007).

I.4. Identification des isolats

Ces isolats ont subi plusieurs tests pour les identifier : Test de KOH, Coloration de Gram, test oxydase et la galerie API 20 NE

I.4.1. Test de KOH

Cette méthode consiste à déterminer rapidement si une bactérie est une Gram positive ou négative sans passer par les étapes de coloration habituelle et sans utiliser le microscope. Il suffit simplement de mettre en contact (sur une lame pour microscope) une colonie bactérienne avec une goutte d'une solution de KOH à 3 %, à l'aide d'une anse de platine, en faisant un mouvement circulaire et en tirant le mélange vers le haut, si un

filament visqueux se forme entre la anse de platine et la lame, la bactérie est considéré Gram négatives. Si rien n'est entraîné par l'anse de platine, bactérie est une gram positives (Suslowet *al.*, 1980).

I.4.2. Coloration de Gram

La coloration a été effectuée selon la méthode classique. C'est une technique de base en Bactériologie, elle permet la classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des critères essentiels de la classification des bactéries (Schaad et al., 2001). Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration : la différence de composition chimique de bactéries et la différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool.

Sur une lame portant le code de chaque isolat testé, avec une anse de platine nous avons prélevé et étalé une couche mince de la colonie bactérienne d'une culture pure sur une goutte d'eau distillée stérile. Nous l'avons fixé par plusieurs passages sur bec Benzen.

Après séchage de la lame, nous avons ajouté le violet de gentiane et laissé agir une minute, puis nous avons jeté l'excès du colorant est rincé par l'eau distillée stérile.

Nous avons versé sur la lame quelque goutte de Lugol, et laissé agir 1 minute, puis nous avons incliné la lame et laissé tomber goutte à goutte l'éthanol pure jusqu'à ce qu'il s'écoule incolore à l'extrémité inférieure de la lame. Nous avons arrêté la différenciation par un lavage abondant à l'eau distillée, en suite recoloré par la fuschine et laissé agir pendant une minute. Puis Nous avons rincé à l'eau distillée, et séché la lame. En fin nous avons observé sous microscope optique, à (G: 10 x100x1.25).

La lecture de la coloration de Gram est basée sur le changement de couleur, où, les germes qui ont gardés la première coloration (couleur violette) sont des Gram positif. Ceux qui ont été décoloré par l'alcool, présente une couleur rose (coloré par la fuschine) sont des Gram négatif.

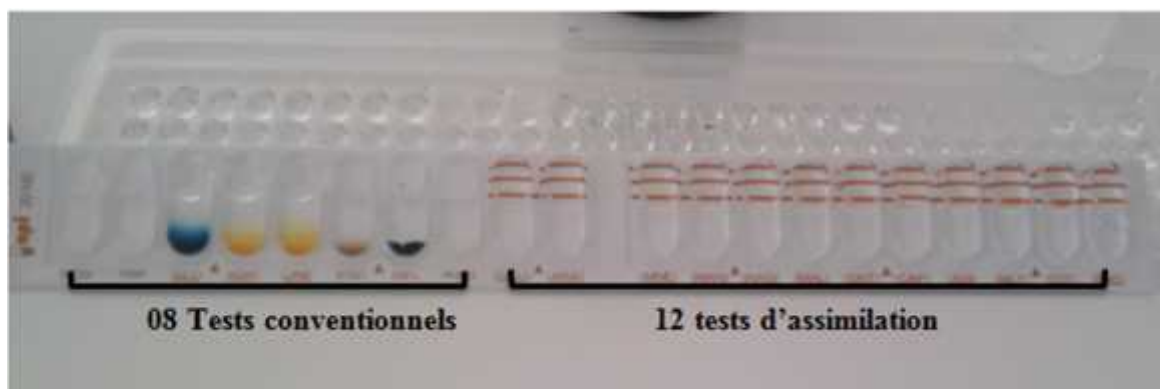
I.5. Test oxydase

Ce test est utilisé pour chercher la production de l'enzyme oxydase (cytochrome oxydase), Les bactéries possédant l'enzyme oxydase peuvent oxyder la N-diméthyl-paraphénylene diamine, ce qui donne des colorations violacés.

L'oxydase a été recherchée sur disque selon la technique de Kovacs (1956) : des isolats testés sont étalés sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine préalablement imbibé de l'eau distillée stérile. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur bleu violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

I.6. Identification par la galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bactéries non entérobactéries comme les Pseudomonas. Cette galerie comporte huit tests conventionnels liés à l'activité de divers enzymes (Nitrate réductase ou dénitrification, tryptophanase ou formation de l'indole à partir du tryptophane, fermentation du glucose, Arginine déshydrogénase ou formation de l'ammoniac à partir de l'arginine, uréase, Esculinase, gélatinase ou liquéfaction de la gélatine et la α -galactosidase) et 12 tests d'assimilation de sucres (Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, N-acétyl-D glucosamine, Maltose, Gluconate, Caprate, Adipate, Malate, Citrate et Phényl-acétate) fig. le 21ème test c'est le test oxydase qui est réalisé séparément, il s'agit de la recherche du cytochrome oxydase ou test de l'oxydase(cf : I-5).



Source: originale, 2015.

Figure.04 la galerie API 20 NE

✓ Préparation de l'inoculum

Des cultures jeunes âgées de (24 h) des bactéries à identifier ont été préparées sur milieu de culture King B (annexe 1) pour inoculer les galeries, en suivant les indications et les recommandations du fabricant (bio Merieux).

a- L'inoculum A

Le premier inoculum a été préparé en mettant 1-4 colonies dans 2 ml de l'eau physiologique stérile (NaCl 0.9%). Les tubes des huit tests conventionnels (du test NO₃ au test PNP) ont été remplis avec cette suspension à l'aide d'une pipette Pasteur, les cupules des tests Glu, ADH et URE sont couvertes de l'huile de paraffine en format un ménisque convexe.

b- L'inoculum B

Le deuxième inoculum a été préparé en mettant un volume de 200 µl de l'inoculum A dans une ampoule du milieu API AUX (fourni avec la galerie) et homogénéiser en évitant la formation des bulles.

Les cupules et les tubes des tests d'assimilation (du test Glu à PAC) ont été remplis avec ce mélange en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe mais jamais concave. En effet, des cupules incomplètement ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.

Le fond et le couvercle de chaque boîte d'incubation sont réunis et 5 ml d'eau distillée stérile a été réparti dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Les galeries ainsi inoculées ont été incubées à 30 ± 2°C pendant 24 h. Après incubation, tous les tests se révèlent spontanément sauf les tests TRP et NO₃ qui sont rapidement obtenus après addition de réactifs appropriés, la lecture des résultats a été faite en se référant au (annexe 15) de lecture recommandé par biomérieux est. L'identification réalisée avec l'aide d'un logiciel d'identification (identification microbienne via les API Microsoft Excel)

II. Effet de biostimulation et de biocontrôle

II.1. Matériel biologiques

II.1.1. Les souches bactériennes

A partir des résultats de l'identification des isolats bactériens, nous avons obtenu huit souches appartenant aux *Pseudomonas*. six parmi eux ont été choisis au hasard et utilisés dans cette partie

II.1.1. Matériel végétale

Nous avons utilisé quatre variétés de blé (*Triticum*) trois variétés de blé dure (*Triticum durum*) et une de blé tendre (*Triticum aestivum*) :

Tableau 02: Matériel végétale utilisées

Variété	Origine des variétés utilisées	L'année de récolte
Boussellem (Blé dure)	Bordj Bou Arreridj	2014
Vitron (Blé dure)	ITGC Alger	2013
Mohamed Ben Bachir (MBB) (Blé dure)	Bordj Bou Arreridj	2014
HD 1220 (Blé tendre)	Bordj Bou Arreridj	2014

II.1.2. Matériel fongique

Nous avons utilisé deux champignons phytopathogènes : *Fusariumculmorum* et *Fusarium pseudogramineam* causant la fusariose de blé, récupéré au laboratoire de mycologie de l'université de Amar Thlidji- Laghouat.

II.2. Essais de biostimulation de la croissance

Pour étudier l'effet des souches de *Pseudomonas* sur la stimulation de la croissance, nous avons réalisé deux essais, le premier sur la germination *in vitro* et la deuxième sur la croissance végétale.

II.2.1. Essai de germination *in vitro*

Pour stimuler la germination *in vitro* nous avons utilisé les quatre variétés du blé Boussellem, Vitron, Mohamed Ben Bachir (MBB), HD1220, et trois souches bactériennes, la souche A2, la souche A8 et la souche A12.

II.2.2. Désinfection des semences

La désinfection superficielle des semences de blé a été effectuée par trempage dans d'hypochlorite de sodium dilué à 2% pendant 5 min, suivie de trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile pour éliminer le reste de l'agent désinfectant suivi d'un séchage sur papier buvard stérile.

II.2.3. L'inoculum bactérien :

A partir des cultures bactériennes jeunes âgées de 24h, nous avons préparé des inoculums bactériens à une concentration d'environ 10^7 UFC/ ml, à l'aide d'un spectrophotomètre à une densité optique DO à 620nm. En fin, nous avons préparé trois suspensions bactériennes.

II.2.4. Bactérisation de semence :

La bactérisation des semences a été réalisée par les trois suspensions bactériennes déjà préparées, chacune des quatre variétés que nous avons utilisé s'est répartie en quatre lots, dans 100graine/lots de chaque variété, chacun des trois lots a été mis dans son inoculum bactériennes correspondant pendant 5 min, le quatrième lot a été mis dans l'eau distillée stérile, suivi d'un séchage sur un papier buvard stérile.

II.2.5. Dispositif expérimental :

La germination des graines a été effectuée dans des boîtes de Pétri contenant du papier buvard imbibé d'eau distillée stérile à raison de vingt graines par boîte donc 5 répétitions pour chaque traitement. En suite ces boîtes ont été laissées à $(27 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C})$ pour la germination les boîtes ont été maintenues humides par addition de 3 ml d'eau distillée stérile quotidiennement, pendant sept 7 jours.

Le dispositif choisi pour cet essai est celui d'une randomisation totale (fig.05), présente par trois 03 facteurs

- ✓ **Facteur 01** : correspond aux variétés de blé, avec quatre variétés (quatre 04 niveau).
- ✓ **Facteur02** : représenté par les souches bactériennes, avec trois souches bactériennes, en plus le témoin (quatre 04 niveau).
- ✓ **Facteur 03** : représente les jours période de la germination (sept 07 niveau).



B : Boussellem H : HD1220 T : Témoin V : Vitron, M : Mohamed ben Bachir (MBB)
 12 : suspension de la souche A12 02 : suspension de la souche A2 08 : suspension de la souche A8

Figure.05 Dispositif expérimentale de l'essai de germination *in vitro*

II.2.6. Les Paramètres étudiés :

Des lancement de l'essais, nous avons réalisé des observations visuelles quotidiennement en notant les graines germés, jusqu'à le septième jour (Hultberget *al.*, 2000). L'évaluation de la germination a été effectuée sur les paramètres suivants :

- ✓ **La faculté de germination :**

la faculté de germination a été révélé selon l'équation suivante :

$$FG\% = \frac{\text{numberdesgraines germées}}{\text{nombertotaledesgraines}} \times 100$$

✓ **L'énergie de germination :**

L'énergie de germination a été estimée selon l'équation suivante :

$$EG\% = \frac{\text{germination mediane}}{\text{nombre de germination}} \times 100$$

II.2.7. Analyse statistique :

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée en considérant l'essai aléatoire (= 5%). La mise en évidence des différences significatives concerne l'effet de chaque facteur contrôlé (J : les jours, V : les variétés, B : les différentes suspensions bactériennes,) et de leurs interactions.

II.3. Essai de phyto-stimulation en végétation:

En se basant sur les résultats obtenus de l'essai de germination *in vitro*, nous avons choisi la variété Vitron et nous avons utilisé les mêmes souches bactériennes utilisées dans l'essai de germination *in vitro*.

La semence a subi la même méthode de désinfection utilisée dans l'essai de germination *in vitro* (cf : II.2.2.)

II.3.1. Préparation du substrat :

Pour cet essai, nous avons utilisé deux types de substrat le premier (S1) est un sol sableux, le deuxième (S2) est un mélange de (1/3 tourbe et 2/3 de sable). Les substrats ainsi préparé ont subi une stérilisation par autoclavage à une température de 120 °C pendant 20 minutes. Les substrats désinfectés ont été conditionné dans des pots blancs (8 cm de long x 5 cm de diamètre).

II.3.2. L'inoculation du substrat :

L'inoculum bactérien a été préparés avec les souches bactériennes (A2, A8 et A12) et de la même façon que celle appliquée dans l'essai précédant (cf : II.2.3.)

L'inoculation du substrat a été réalisé par irrigation à raison de 20 ml/pot, en deux périodes : le premier apport a été fait 24h avant le semis, un rappelle a été faite sept (07) jours après.

II.3.3. Dispositif expérimental :

Dans cet essai nous avons opté pour un dispositif en bloc aléatoire complet à trois répartitions, représenté par deux facteurs :

- ✓ **Facteurs 1** : correspond au substrat **S1** et **S2** (02 niveaux).
- ✓ **Facteurs 2** : représenté par les différentes souches bactériennes et le témoin (04 niveaux).

Nous avons huit 08 traitements avec deuze 12 répétitions par bloc

Les traitements en question sont :

T1 : S1 (sable) sans suspension bactérienne (témoin)

T2 : S2 (sable +terreau) sans suspension bactérienne (témoin)

T3 : S1 (sable) traité par suspension bactérienne de l'A2

T4 : S2 (sable +terreau) traité par suspension bactérienne de l'A2

T5 : S1 (sable) traité par suspension bactérienne de l'A8

T6 : S2 (sable +terreau) traité par suspension bactérienne de l'A8

T7 : S1 (sable) traité par suspension bactérienne l'A12

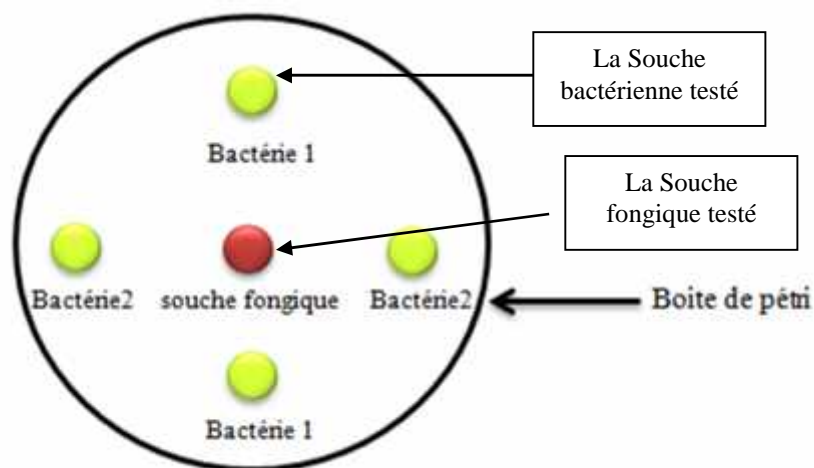
T8 : S2 (sable +terreau) traité par suspension bactérienne de l'A12

Après la mise en place de notre dispositif, nous avons semé trois graines dans chaque pot ensuite déposé ces pots dans une chambre de culture dans les conditions de développement ambiantes.

II.4.Essai d'antagonisme *in vitro* :

Le pouvoir antagoniste des six souches de *Pseudomonas fluorescens* (A6, A2, A3, A8, A12etA9) a été testé pour inhiber la croissance mycélienne de deux isolat cryptogamiques *Fusarium culmorum* et *Fusarium pseudogramineam*, sur deux milieux de culture solides : le PDA (annexe1) et KB (annexe 2) avec deux répétition.

Dans cet contexte nous avons choisi la méthode des spots décrite par Becker et Cook 1998, c'est une confrontation directe qui consiste à déposer 4 spots bactériens à la périphérie de la boîte de Pétri, après 24 h d'incubation a 28 ± 2^0 nous avons déposé un disque mycélien de 5 mm de diamètre du champignon testé, au centre de boîte de Pétri et la ré incubé à 25 ± 2^0 C.



Source: originale, 2015.

Figure.06 Technique de l'essai d'antagonisme *in vitro*.

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

La lecture des résultats des boîtes testées se fait en comparaison avec la croissance du témoin après cinq jours d'incubation, le taux d'inhibition est calculé selon la formule de Hmouniet *al* (1996), l'activité antagoniste est révélée par la présence d'une zone d'inhibition.

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

I: taux d'inhibition;

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

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

✓ **Analyse statistique :**

L'analyse de variance était effectuée à l'aide du logiciel (Statbox végétale) a été réalisée en considérant ($\alpha = 5\%$), La mise en évidence de différences significative concerne l'effet de chaque facteur contrôlé.

Résultats

I. Identification des isolats bactériens

Les isolats non identifiées en 2014 isolés à partir des plantes spontanées de région d'Elassafia, ont fait l'objet d'une régénération et d'une purification, nous avons remarqué l'apparition des pigments jaune vert fluorescents visible à l'œil nu sur le milieu King B pour 11 isolats parmi les 14 testés (tableau 04)



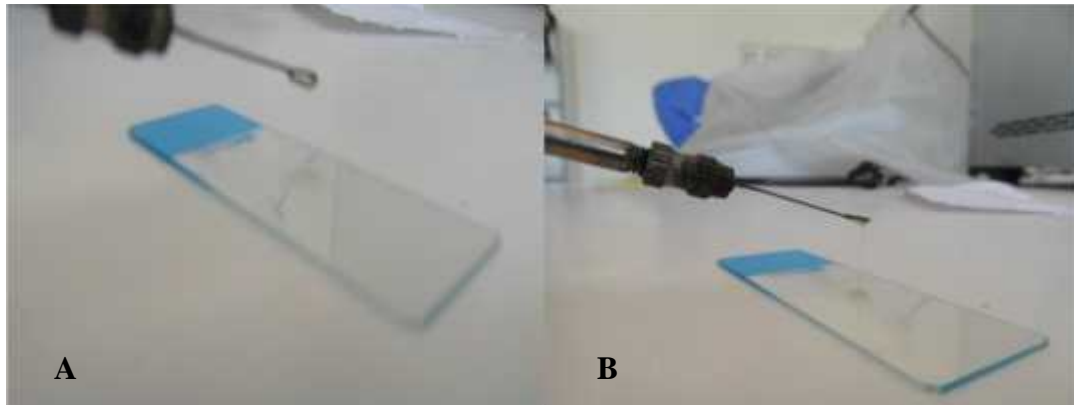
Source: originale, 2015.

Figure 07. Pigments jaune vert fluorescents

I.1. Test KOH

Pour le test KOH, nous avons observé une viscosité pour 13 isolats, ces isolats sont des bactéries à Gram négative. Par contre l'isolat A10 n'a présenté aucune viscosité, c'est une bactérie à Gram positives tablx(04).

Selon Schaad *et al*, 2001, la solution de KOH devient visqueuse en présence des bactéries à gram négative. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 5 secondes.



Source: originale, 2015.
A : pas de formation fil visqueux

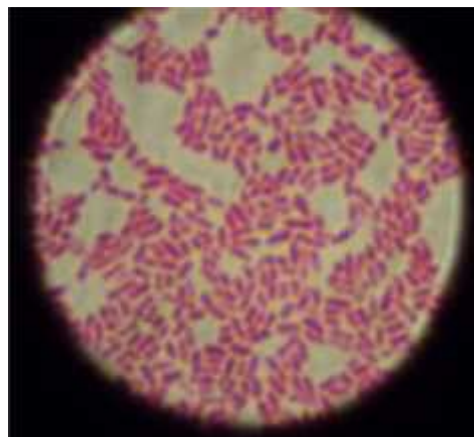
Source: originale, 2015.
B: La formation d'un fil visqueux

Figure. 08 résultat du test KOH

I.2. Coloration de Gram

Les résultats du test KOH sont confirmées par les résultats de la coloration de Gram nous avons observé la forme des cellules qui ont la forme bacille (fig.09) (tablx 04)

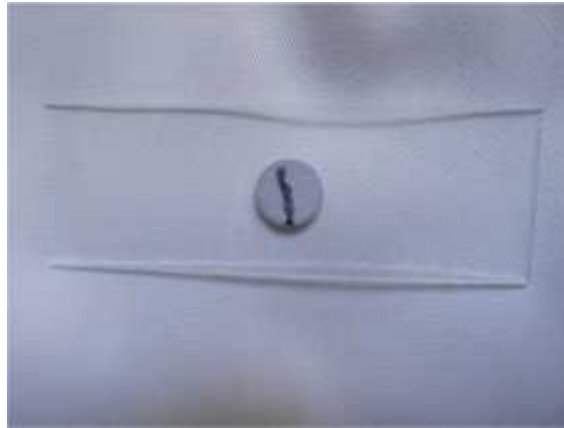
D'après Chaabi (2010) et Mezaache (2012), les *Pseudomonas* sont des bacilles à gram négative, droite et fins, à l'extrémité arrondie d'une taille moyenne de 0.5 à 2 μm .



Source: originale, 2015.
Figure 09 : des bacilles à Gram⁻ sous microscope optique (G10x100x1.5)

I.3. Test d'oxydase

Nous avons observé l'apparition d'une coloration bleu violette sur les disques oxydase pour les 13 isolats testées, avec ces bactéries sont d'oxydase positive (+) (fig. 10) (tab 04)



Source: originale, 2015.

Figure 10: Résultat positive du test oxydase.

Tableau 04. Résultats des tests d'identification

Teste Isolats	Pigment fluorescents	KOH	Coloration de gram	Oxydase
A1	(-)	+	G ⁻ B	+
A2	++	+	G ⁻ B	+
A3	+++	+	G ⁻ B	+
A4	(-)	+	G ⁻ B	+
A5	++	+	G ⁻ B	+
A6	+++	+	G ⁻ B	+
A7	+++	+	G ⁻ B	+
A8	++	+	G ⁻ B	+
A9	+++	+	G ⁻ B	+
A10	(-)	-	/	/
A11	++	+	G ⁻ B	+
A12	++	+	G ⁻ B	+
A13	+	+	G ⁻ B	+
A14	+	+	G ⁻ B	+

G⁻B : bactérie de Gram négatif Bacille. **G⁺** : bactérie de Gram positif. + : réaction positive. - : réaction négative.

/ : Éliminé par le résultat précédent. +++ : Très fluorescent. ++: Moyennement fluorescent.

+ : faiblement fluorescent. (-) pas de fluorescent

I.4. Galerie API20NE

La lecture de galerie API 20 NE effectuée après 24h et 48h pour les 13 isolats testés figure11, en se référant au Tableau de Lecture (annexe15) et plus au logiciel d'identification (identification microbienne via les API Microsoft Excel) Les résultats obtenus des tests de Galerie API 20 NE (annexe 16)



Figure11: Identification de bactérie par la galerie API20 NE
A) galerie ensemencée, **B)** galerie ensemencée par bactérie et incubée pendant 24 h et
C) lecture des résultats (profil numérique de la bactérie).

Pour la lecture des deux tests NO_3 et le test TRP :

Dans la cupule NO_3 nous avons ajoutées une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2. L'apparition d'une couleur rouge ou rose après 5 min indique une réaction positive. Si nous avons obtenu une réaction négative, cela peut être due à la production d'azote directement (N_2). ou la non dégradation de NO_3 , Pour cela Nous avons ajoutés 2-3 mg de réactif Zn, Après 5 min. le tube restée incolore cela indiqué une réaction positive. C'est à dire que, les souches bactériennes ont dégradé la NO_3 jusqu'à sa phase final

Pour la lecture du test TRP nous avons ajouté une goutte de réactif JAMES dans la cupule du test TRP, nous n'avons pas observé de couleur rose diffusant dans tout le tube (une réaction positive).

D'après logiciel d'identification, nous obtenu des huit isolats identifie comme étant des *Pseudomonas fluorescens* avec des probabilités différente, les autre reste que ne sont pas des *Pseudomonas fluorescens*.

Tableau (05) : Les résultats d'identification de la galerie API 20 NE

Les souches	Souche (taxon le plus probable)	Remarque	Indice de typicité	Probabilité
A2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon	-0.28	51.6%
A3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon	-0.32	40%
A4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon	-0.2	94%
A6	<i>Pseudomonas fluoresces</i>	Pas bon	-0.03	67%
A8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon	-0.08	99.3%
A12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon	0.12	49.5%
A9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pas bon	0.06	96.5%
A1	<i>Chryseomonas spp</i>	bon	0.34	51%
A5	<i>Aeromonas spp</i>	Pas bon	-0.28	99.3%
A7	<i>Chryseomonas lutealns spp</i>	Pas bon	0.09	67.9%
A11	<i>Aromonas spp</i>	Pas bon	0.11	59%
A13	<i>Orchrobacterum anthropi spp</i>	Pas bon	-0.43	48%
A14	<i>Burkhardios sépacion spp</i>	Pas bon	-0.31	69%

II. Effet de biostimulation et de biocontrôle

II.1.essai de germination *in vitro*

Dans cet essai nous avons testé l'effet de 03 souches sur la faculté germinative de quatre variétés de blé (Vitron, MBB, HD1220, Boussellem). Les paramètres étudiés sont le taux de germination et énergie de germination.

L'analyse statistique, des résultats obtenue, nous a révélé un effet significatif pour l'ensemble des facteurs étudiées à l'exception de facteur Bactérie pour le paramètre énergie de germination, ainsi que toutes les interactions sont non significative (Tableau06).

Tableau 06: Résultats d'analyse du l'essai de germination *in vitro*

Paramètre de germination	Facteurs étudiés	Faculté de germination%
Taux de germination	Facteur variété	
	Boussellem	68.32 (B)
	Vitron	76.21 (A)
	Mohamed Ben Bachir(MBB)	55.00 (C)
	HD1220	71.78 (B)
	Facteur bactérie	
	A2	68.92 (A)
	A8	71.82 (A)
	A12	65.57 (B)
	Témoin	65.00 (B)
	Facteur temps/J	
	J1	0.00 (D)
	J2	56.68 (C)
J3	72.25 (B)	
J4	85.43 (A)	
J5	86.81 (A)	
J6	86.81 (A)	
J7	86.81 (A)	
Energie de germination	Facteur variété	
	Boussellem	71.50 (A)
	Vitron	83.00 (A)
	MBB	56.50 (B)
	HD1220	76.75 (A)
	Facteur bactérie	
	A2	72.00
A8	81.00	
A12	70.00	
Témoin	64.75	

Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

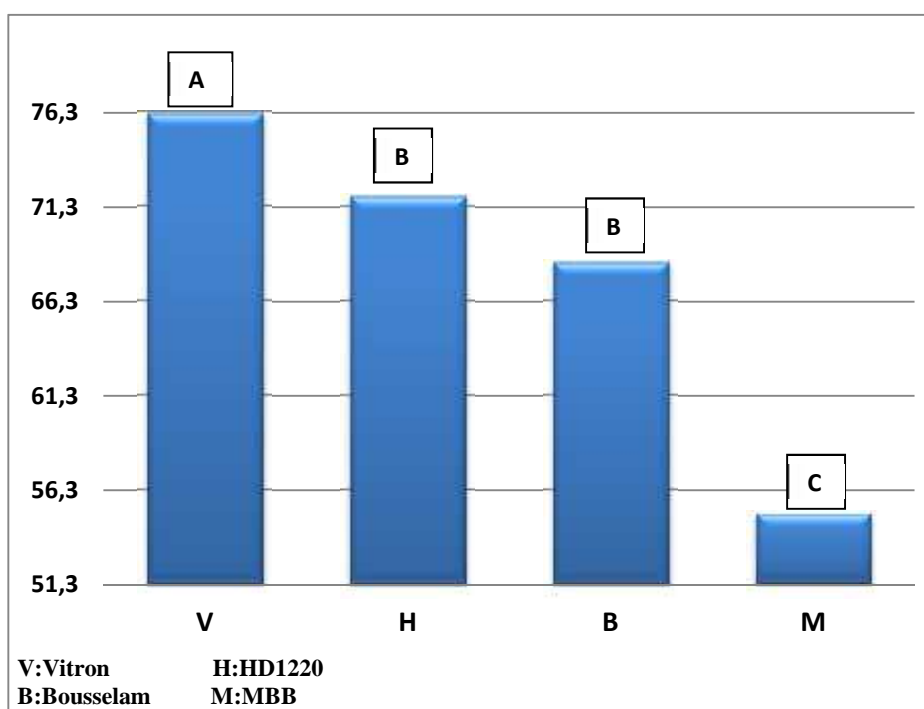
II.1.1. Taux de germination (%)

D'après, l'analyse de la variance obtenue pour le taux de germination les trois facteurs facteur variétés facteur des bactéries et facteur de temps sont significatifs.

✓ Facteur variétés

Le début de la germination a été signalé aux deuxièmes jours pour toutes les variétés. D'après les analyses de la variance (annexe 04), la variété Vitron classé dans le groupe homogène (A) est arrivée à un taux de germination finale de 76.21%, suivi par la variété Boussellem et HD1220 qui sont classé dans le groupe homogène (B) avec un taux

successivement 68.3% et 71.78%, la variété MBB avec un faible taux de germination de 55% est classé groupe homogène (C) (fig.12).

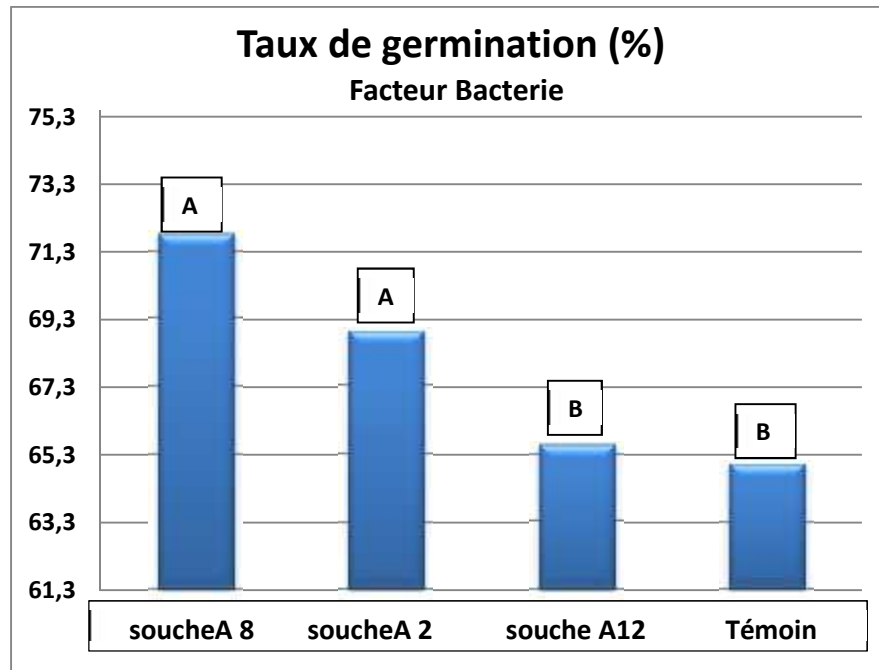


Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

Figure. 12 : Taux de germination par variétés.

✓ Facteur bactérie

Les résultats de l'analyse de variance (Annexe 04) ont a révélé une différence significative pour facteur bactérie, les deux bactéries la souche A8 et la souche A2 ont donné les meilleur taux de germination été classé dans le groupe homogène (A) avec respectivement 71.82% et 68.92 % la souche A12 et le témoin classé dans le même groupe homogène (B) qui ont noté respectivement 65.57% et 65.00 %



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

Figure. 13Taux de germination facteur bactérie

✓ **Facteur temps**

Les résultats de l'analyse de variance (Annexe 04) ont a révélé une différence significative pour facteur de temps et ils ont montré que la meilleur activité de la germination a débuté le quatrième jusqu'à le septième jour ils ont été classé dans le groupe homogène (A) (fig14).



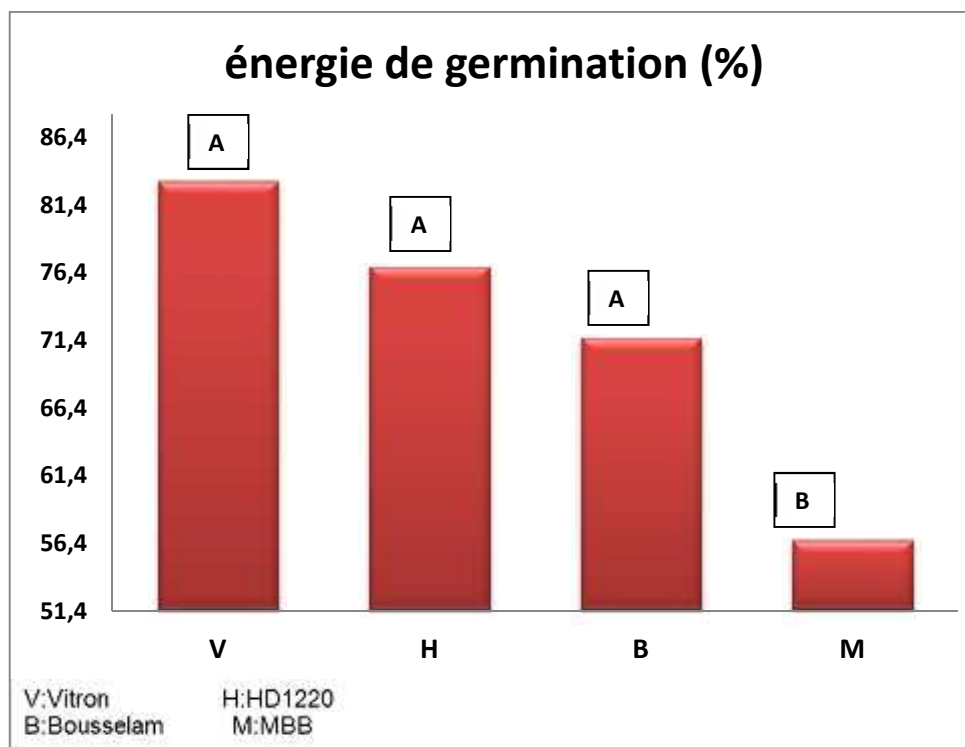
Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

Figure. 14 Taux de germination facteur temps

II.1.2. Energie de germination (%)

Pour l'énergie germinative, l'analyse de la variance (Annex04), a révélé que l'effet des variétés est significatif, (tableau06) (fig15).

Les variétés Vitron Bousellem et HD 1220 qui comprend la plus haute énergie sont classé dans le groupe homogène (A) par des valeurs respectivement de 83.00 % ,71.50% et76.75%, suivi par la plus faible énergie de germination enregistré par la variété HD1220 avec une valeur de 56.75% .



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls (= 5%).

Figure 15 : Test de l'énergie de germination (%).

II.2. Essai de biostimulation de la croissance végétale *in vivo*

Dans cet essai nous avons étudié quatre (04) paramètres de croissance : longueur de tige et de racine, poids frais de tige et de racine en deux périodes qui correspondent à deuze (12) jours après le semis (coupe 1) et vingt-quatre (24) jours de la culture après semis (coupe2).

Les analyses statistiques, des résultats de la première coupe ont montré une différence significative pour le paramètre de la longueur racinaire pour les deux facteurs étudiés (substrat et souche bactérienne) lors des deux coupes, la hauteur de tige est significative pour les deux facteurs, pour les autre paramètres étudiés les résultats sont non significatif (tableau07).

Tableau07: Résultat d'analyse de la variance pour les paramètres étudiés selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$) :

Paramètre de croissance	Facteurs étudiés		Coupe 1 (12j)	Coupe 2 (24j)
Longueur racinaire	Facteur substrat	S1	12.23 (A)	13.45 (A)
		S2	11.579 (B)	12.60 (B)
	Facteur bactérie	A2	12.09 (B)	12.28 (C)
		A8	13.37 (A)	14.89 (A)
		A12	11.85 (C)	13.33 (B)
Témoin	10.30 (D)	11.68 (D)		
Poids frais de la racine	Facteur substrat	S1	0.16	0.07
		S2	0.14	0.15
	Facteur bactérie	A2	0.16	0.19
		A8	0.16	0.07
		A12	0.16	0.08
Témoin	0.13	0.08		
Hauteur de la tige	Facteur substrat	S1	22.62	30.21 (A)
		S2	20.93	28.39 (B)
	Facteur bactérie	A2	21.09	27.6 (B)
		A8	22.19	28.0 (B)
		A12	23.13	34.5 (A)
Témoin	20.70	27.00 (B)		
Poids frais de la tige	Facteur substrat	S1	0.24	0.27
		S2	0.22	0.27
	Facteur bactérie	A2	0.23	0.29
		A8	0.24	0.25
		A12	0.25	0.28
Témoin	0.22	0.26		

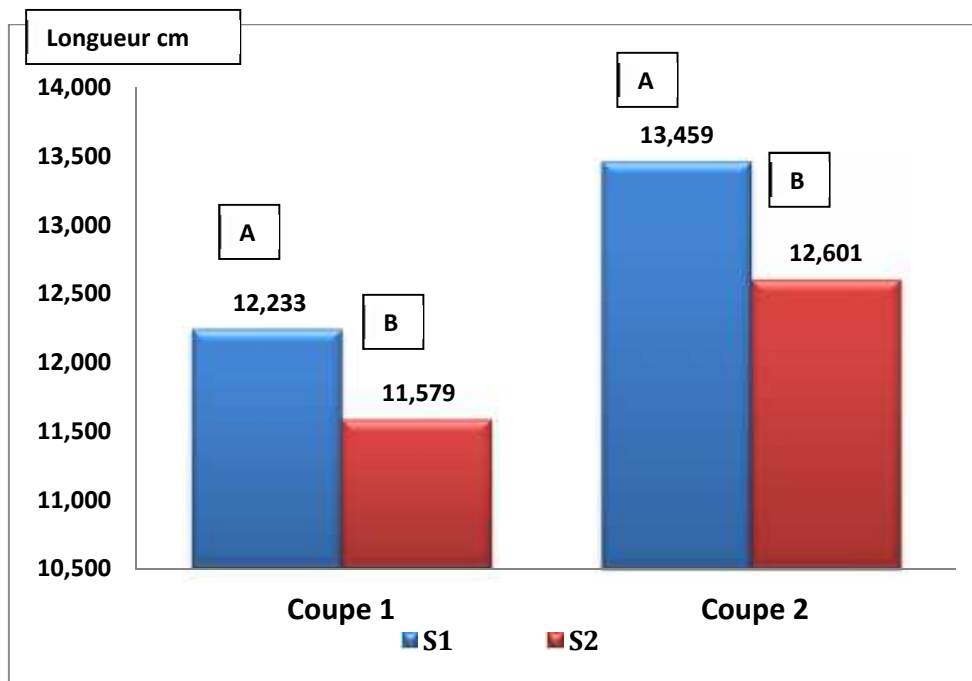
S1 : Sol Sableux ; **S2** : Sable+Tourbe ; Témoin : Sans bactérie

II.2.1. Longueur racinaire

✓ Facteur substrat

L'analyse de la variance, pour ce facteur a donné une différence significative pour le facteur substrat dans les deux coupes.

Dans la première et la deuxième coupe, Le substrat S1 (sable) se classe dans le groupe homogène (A) avec des moyenne 12.23 et 13.459 cm respectivement. Et pour le substrat S2 (tourbe +sable), se classe le groupe homogène (B) dans les deux coupes avec des moyennes 11.57 et 12.60cm respectivement. (Fig.16).



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

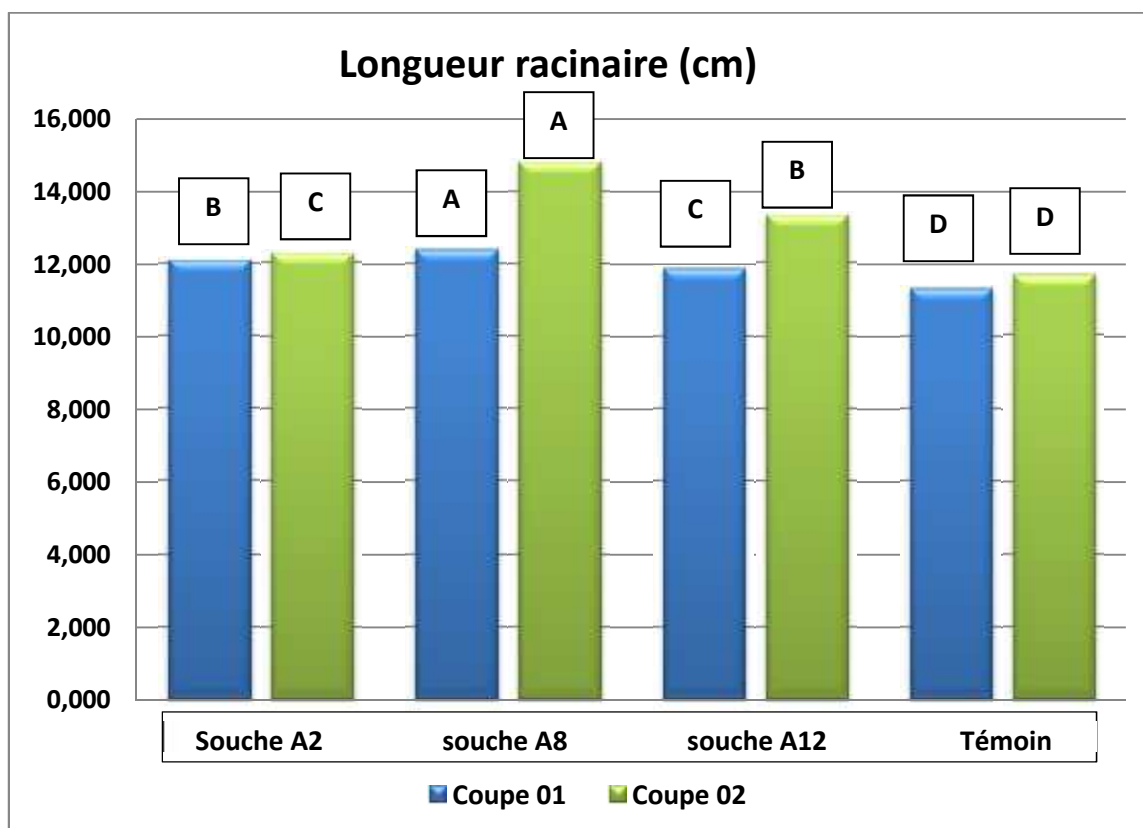
Figure. 16 effet de facteur substrat sur la longueur racinaire (cm)

✓ Facteur souche

L'analyse de la variance (annexe09), réalisé sur la longueur racinaire a montré que le facteur des souches bactériennes a une différence significative lors de la première et la deuxième coupes avec quatre groupe homogène

La souche A8 a donné l'effet le plus élevé dans la première et la deuxième coupe qui est classé dans le groupe homogène (A) avec des moyennes respectivement de 13.37cm et

14.8cm. pour la souche A2 qui a été classé dans le groupe homogène (B) dans la première coupe avec un moyenne 12.09cm dans la deuxième coupe est classé dans le groupe homogène (C), alors que le classement la souche A12 est dans le groupe homogène (C) dans première coupe avec un moyenne de 11.85cm au groupe (B) avec un moyenne de 13.33 cm correspondant deuxième coupe et le témoin est classé dans le groupe homogène (D) par les deux coupe (fig.17)



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

Figure : 17 Longueur racinaire (cm) dans les deux coupes (facteur souches).

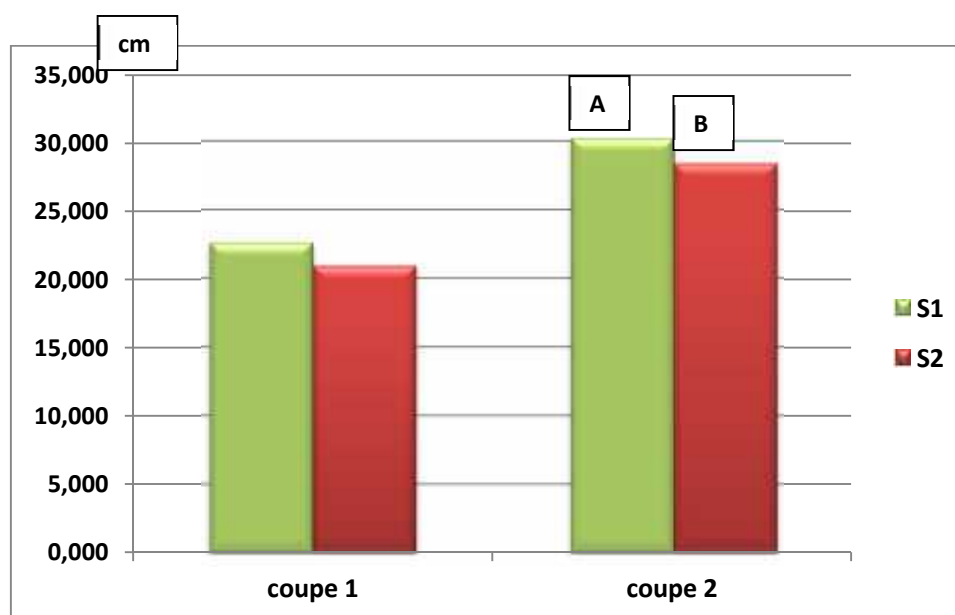
II.2.2. Hauteur de tige

L'analyse de la variance (annexe11) réalisé sur les résultats de la hauteur de tige a montré que les deux facteurs ont une différence significatif dans la deuxième coupe. et non significatif pour la première coupe.

✓ Facteur substrat

Pour le facteur substrat l'analyse de la variance, effectué sur la hauteur de tige a révélé un effet significatif pour la deuxième coupe avec une moyenne de 30.21 cm pour le

substrat S1 classé dans le groupe homogène (A), et pour le substrat S2 classé dans le groupe homogène (B) avec une moyenne de 28.398 cm. (Tabl.07) (Fig.18).

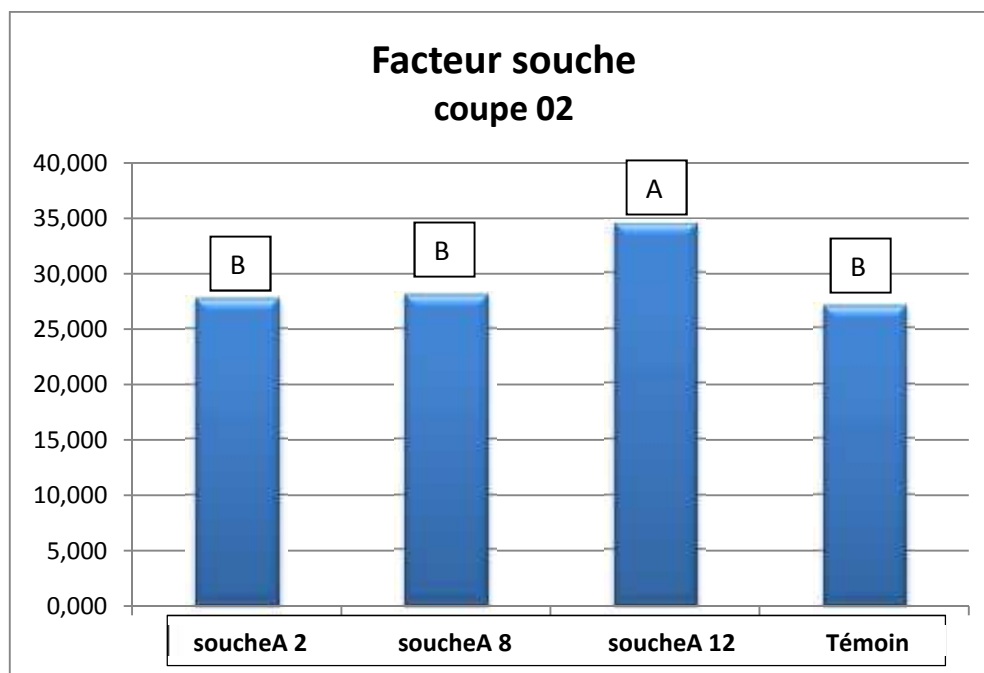


Les valeurs suivies de la même lettre appartiennent au même groupe homogène, selon le test de Newman-Keuls ($\alpha = 5\%$).

Figure : 18 Hauteur de tige (cm) pour les deux coupes facteur substrat

✓ Facteur souche

Le facteur souche a montré une différence significative pour la deuxième coupe et les rasants ont été classés en deux groupes homogènes selon l'analyse de la variance avec une hauteur de tige de 34.50 cm enregistré par la souche A12 (groupe A) (tabl.07). Cependant les deux autres souches A2 et A8 ont le même effet que le témoin et ont été classées en même position que ce dernier dans le groupe homogène (B) avec des moyennes respectivement de 27.69 cm, 28.03 cm et 27.00 cm (fig.19.)



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls ($\alpha = 5\%$).

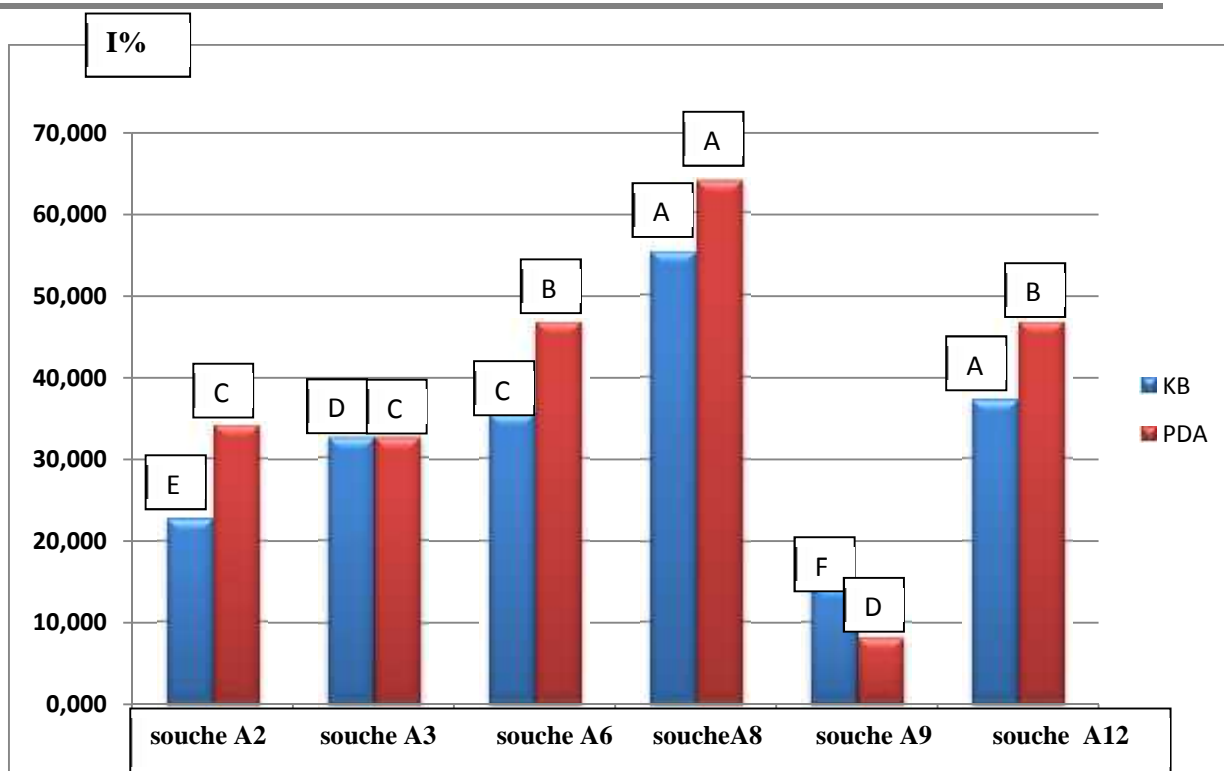
Figure. 19 Hauteur de tige (cm) pour la deuxième coupe facteur souche

III. Essai d'antagonisme *in vitro*

Selon Hibar *et al.*, (2005) l'étude du phénomène d'antagonisme *in vitro* a été effectuée selon la méthode de confrontation directe sur milieu PDA et KB. L'évaluation de l'inhibition exercée par six 06 souches bactériennes identifiées comme *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis des deux champignons (*Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*) est estimée par le calcul du taux d'inhibition de la croissance mycélienne ; les résultats présente (fig.20), et (fig.21)

✓ Le champignon *Fusarium culmorum*

L'analyse de la variance (Annexe) a révélé une différence significative dans les deux milieux de culture PDA et KB



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls (= 5%).

Figure20 : le taux d’inhibition sur deux milieux de culture PDA et KB

✓ **Selon le KB**

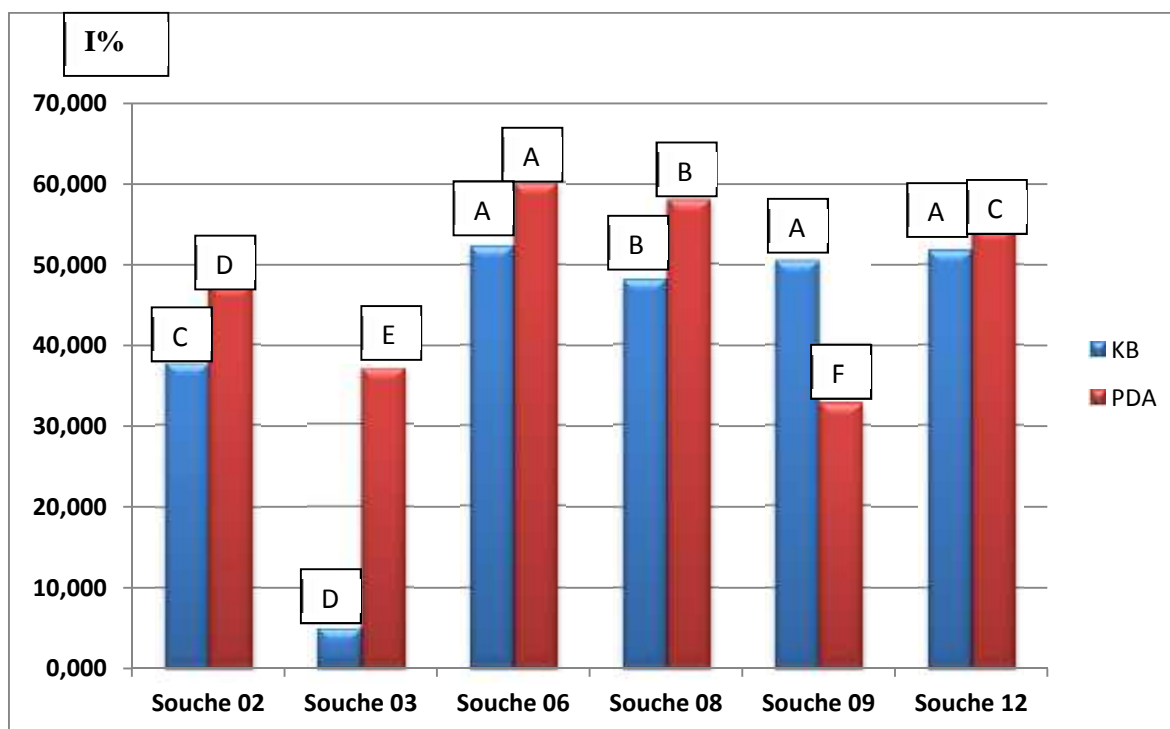
D’après les analyses statistiques de variance, (annexe13) montrent que la souche A8, a une bonne réponse d’inhibition et elle est classé dans le groupe homogène (A) avec un pourcentage d’inhibition 55.33% et les souches A12,A6,A3,A2 et A9 sont classées dans les groupes homogènes B ,C ,D ,E et F respectivement .

✓ **Selon le PDA**

L’analyse de la variance (annexe13), a montré que la souche A8, elle a une très forte inhibition par rapport aux autres souches testées, Qui est classée dans le groupe homogène (A.) Avec un taux d’inhibition de 63.99% et les souches A6 et A12 se sont montré similaire dans le groupe homogène (B), les souches A2et A3 classés dans le groupe homogène(C) et la souche A9 a marqué un faible taux d’inhibition, classée dans le groupe homogène (D) avec un pourcentage 8.14 %

✓ **Le champignon *Fusarium pseudograminearum***

L'analyse de la variance (Annexe14) a révélé une différence significative dans les deux milieux de culture PDA et KB



Les valeurs suivies de la même de la lettre appartient au même groupe homogène, selon le test de Newman-keuls (= 5%).

Figure.21 : le taux d'inhibition sur deux milieux de culture PDA et KB

✓ **Selon le KB**

D'après les analyses statistiques de variance, (annexe14) montrent qu'il y a la présence une bonne réponse d'inhibition pour les souches A6,A9 et A12, elles sont montrés similaires dans le groupe homogène (A) avec un taux d'inhibition de 52.26%, 51.754% et 50.386 % respectivement. et les souches A8, A2 et 03 sont classées dans les groupes homogènes B, C et D respectivement.

✓ **Selon le PDA**

L'analyse de la variance (annexe14), a montré que la souche A6, elle a une très forte inhibition par rapport aux autres souches testées, qui est classée dans le groupe homogène (A.) Avec un taux d'inhibition de 60.08%, et concernant les souches A8,A12, A2, A3, et A9 elles sont classées dans le groupe homogène B, C, D, E et F respectivement.

Discussion

Nous visant par ce travail la mise en évidence de l'effet bénéfique de *Pseudomonas fluorescens* sur la croissance des plantes cultivée et le biocontrôle d'agent pathogène de blé.

Ce travail comporte trois parties, la première est l'identification des certains isolats bactériens, la deuxième est l'étude l'effet des souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents identifiées sur la biostimulation de la croissance des plantes et en fin test de leur capacité antagoniste, *in vitro* sur les agents phytopathogènes de blé. Pour l'identification des isolats, la régénération et la purification des quatorze isolats bactériens sur le milieu de KB, l'étape initiale, a été montrée les caractères macromorphologiques de *P. fluorescens*. Selon (Höfte et Altier 2010), ces caractéristiques se distinguent par la production de pigments jaune-vert fluorescents dans des conditions de carence en Fer. (Bultreys et Legheysen 2000; Olmar *et al* 2001 et Mezaache 2012).

Le test de KOH est un caractère clé pour la différenciation entre les isolats de Gram – et les isolats de Gram +, la solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatif. Dans notre travail, nous avons observé la formation d'un fil visqueux pour 13 isolats.

La coloration de Gram, a été un caractère clés pour classer des bacilles à Gram négatif et confirmer les résultats du test de KOH. Pour les résultats de la coloration de Gram tous les isolats qui sont étudiés sont des bacilles à Gram négatif à l'exception d'une seule souche. A partir de ces deux tests nous avons sélectionné 13 isolats.

Pour les 13 isolats nous avons lancé le test d'oxydase, Les résultats sont positifs pour l'ensemble. Selon Avril *et al* (1992) les *Pseudomonas* spp. Fluorescents possèdent un cytochrome oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du cytochrome C par l'oxygène moléculaire. Le cytochrome oxydase oxyde le cytochrome C qui va, à son tour, oxyder le tétraméthyl-1, 4- phénylène diamine, substrat qui prend une coloration bleu violète.

Après les résultats d'oxydase pour les 13 isolats bactériens, nous avons réalisé la galerie API 20 NE. Ils ont montré que huit 08 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescence puis ce que les *pseudomonas* sont des bactéries bacilles à Gram négatif, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. peuvent généralement être

distinguées visuellement des autres *Pseudomonas* par leur aptitude à produire un pigment jaune vert (Chaad *et al.*, 2001; Amkraz, 2013).

A partir des résultats d'identification par galerie API 20 NE par le logiciel, 08 isolats ont été identifiés comme des *Pseudomonas* spp. fluorescents avec probabilité différente. Nous avons choisi aléatoirement 06 souches (A2, A3, A6, A8, A9 et A12) pour être utilisées dans les tests de la phytostimulation et l'antagonisme *in vitro*.

Le test de phytostimulation se divise en deux parties : phytostimulation de germination *in vitro* et phytostimulation de la croissance végétale. D'après l'analyse de la variance de test de germination *in vitro*, nous avons enregistré des résultats significatifs pour tous les facteurs étudiés à l'exception du facteur souche qui est non significatif au paramètre de l'énergie de germination.

Pour le facteur de variété, d'après les résultats de taux de germination et l'énergie de germination finale la variété Vitron est la meilleure et qui est classée dans le groupe homogène (A). Pour le facteur souche nous avons noté que le taux de germination le plus élevé est remarqué par la souche A8 et la souche A2 qui sont classées dans le groupe homogène (A) par toutes les variétés testées avec un taux de 71.821% et 68.929 % successivement.

Cela signifie que les souches (A8-A2) sont capables de sécréter une phytohormone qui stimule légèrement la germination des graines. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs d'AAC-désaminase (Glick *et al.*, 1994). L'AAC-désaminase est une phytohormone capable de lever la dormance des graines.

Rajkumar *et al.* (2008), ont démontré que les *Pseudomonas* fluorescents (SE21 et RD41) appliqués aux graines de poivron rouge, diminuaient considérablement l'incidence de la maladie due à *R. solani*, et stimulaient la germination des graines par rapport à un témoin non traité. Sous serre et dans un sol naturellement, (Leeman *et al.* 1995) ont montré la capacité de suppression du flétrissement et l'augmentation du rendement de radis par *P. fluorescens*.

D'après les résultats de l'essai de germination *in vitro* nous avons choisi la variété Vitron pour être utilisée dans le test de biostimulation de la croissance végétale.

D'après l'analyse de la variance du test de biostimulation de la croissance végétale, nous avons enregistré des résultats significatifs pour le paramètre de la hauteur de tige et la longueur de la racine et les autres paramètres étudiés ne présentent aucun effet significatif.

Pour le facteur substrat, les résultats obtenus dans les deux paramètres, ont montré que le substrat influe sur les paramètres étudiés : la longueur tige et racine, aussi la bactérisation influe sur les paramètres déjà cités. Le facteur bactérisation obtenu des résultats significatifs sur deux (02) paramètres, la longueur racinaire dans les deux coupes et longueur de la tige dans la deuxième coupe.

Pour le facteur de substrat S1 (sable) a enregistré les meilleurs résultats pour le facteur substrat au contraire le substrat S2 (sable + tourbe) par ce que la bactérie devient plus active dans les conditions où le sol est pauvre en nutriments

D'après l'analyse de la variance, nous avons noté que la souche A8 a donné un effet significatif remarqué dans le paramètre de la longueur racinaire lors de la première coupe et la deuxième coupe qui est classé dans le groupe homogène (A). Cela signifie que les bactéries sécrètent des substances qui affectent la longueur des racines. Et nous avons remarqué que la souche A12 a montré un effet significatif dans le paramètre de la hauteur de tige lors de la deuxième coupe et signifie que la bactérie sécrète des substances qui affectent la croissance.

Les PGPR sont des micro-organismes rhizosphériques intervenant dans la stimulation de la croissance de la plante. Il existe cinq catégories des régulateurs de la croissance végétale : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al.* 2004). L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.* 2007). Il est produit par un grand nombre de bactéries tels, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Rhizobium* (Karnwal, 2009). Les cytokinines et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de développement de la partie aérienne (van Loon, 2007).

La production de régulateurs des plantes par les microorganismes est un mécanisme important souvent associé à la stimulation de la croissance (Vessey, 2003). La balance entre la croissance végétative et reproductrice est contrôlée par un signal hormonal à

l'intérieur de la plante et pourrait être hautement influencé par celle-ci (Taiz et Zeiger, 1991). Lorsque les concentrations d'auxines naturelles comme l'AIA sont très faibles, elles stimuleraient la germination et l'induction des racines (production de poils racinaires et des racines latérales) (Arshad et Frankberg, 1991), mais lorsque celles-ci sont élevées par contre réduiraient l'élongation de ces dernières (Tanimoto, 2005). Pour la plante ceci résulterait en une augmentation d'assimilation ionique (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Abbass et Okon (1993), ont constaté que l'AIA ainsi que d'autres phytohormones seraient responsables de l'augmentation de la croissance de canola du blé et de la tomate.

L'AIA est impliqué dans le développement de la tomate, spécialement durant la phase finale du développement du fruit (Srivastava et Handa, 2005). Des études préalables, ont démontré que la production d'auxines est souvent associée avec la stimulation de croissance par les microorganismes, incluant des souches tel que *P. putida* (Xie *et al.*, 1996; Patten et Glick, 2002). Gravel *et al.* (2007), ont montré que la croissance des semis augmentait avec l'augmentation de la concentration de L-tryptophane. Ceci suggère que la synthèse d'AIA dépendante du tryptophane par *P. putida* sous-groupe B affecterait la croissance des semis de tomate.

Dans la partie d'antagonisme *in vitro* nous avons étudié l'efficacité des souches de *Pseudomonas* dans la lutte biologique.

D'après l'analyse de la variance pour le test d'antagonisme *in vitro*, toutes les souches ont révélé une action d'antagonisme contre les deux (02) champignons phyto-pathogènes *F.culmorum* et *F.pseudograminearum*.

La souche la plus antagoniste contre le *F.culmorum* selon les analyses de variances est la souche A8 qui est classée dans le groupe homogène (A) dans les deux milieux de culture par inhibition (55.33%) dans KB ; 63.99 % dans PDA.

En outre, les souches A6, A9 et A12 sont considérées comme les plus inhibitrices contre le mycélium de *F.pseudograminearum* qui est aussi classé dans le groupe homogène (A) dans le milieu de culture KB. Dans le milieu de culture PDA, la souche 06 est considérée comme la plus inhibitrice contre le *F.pseudograminearum*.

D'après nos résultats sur milieu PDA, qui ne favorisent pas la production du pigment fluorescent, les souches se caractérisent par des activités antagonistes importantes, ceci peut s'expliquer par l'implication d'autres mécanismes d'action, en montrant que la

fluorescences, signée de synthèse des sidérophores, n'est pas subordonnée obligatoirement à l'activité antagoniste des constations par plusieurs travaux avec des essais en milieu non carencés en Fer (Digat, 1983).

Les PGPR peuvent également agir dans la protection de la plante par la production de métabolites secondaires (antibiotiques, HCN, sidérophores) (Tarnawski, 2004). Ramamoorthy *et al.*, 2002 ont établi que *P. fluorescens* stimulait les mécanismes de défense des plantes en améliorant leur résistance à différents phyto-pathogènes

Donc les *Pseudomonas* spp fluorescents possèdent d'autre mécanisme inhibiteur dans leur pouvoir d'antagonismes qui peuvent être attribuer à la synthèse des antibiotiques et d'autres types de métabolites à effet d'antibiose

Par ailleurs, ces bactéries peuvent acquérir le fer en utilisant des sidérophores hétérologues appartenant à d'autres bactéries et champignons (Poole et McKay, 2003) Les sidérophores font partie du métabolisme primaire car le fer est un élément essentiel. Par la même occasion ces métabolites jouent un rôle d'antibiotiques, ces derniers sont des métabolites secondaires (Haas et Défago, 2005).

Certain *P. fluorescens* produisent de l'acide salicylique, en plus de la pyoverdine. La pyochéline est un sidérophore ayant pour précurseur l'acide salicylique (Serino *et al.*, 1995). Malgré son affinité plus faible pour le Fe³⁺, la pyochéline est un bon chélateur des ions bivalents de cuivre et de Zinc; privant ainsi les champignons de ces éléments. Cet exemple montre que la distinction entre les sidérophores et les antibiotiques typiques n'est pas claire (Cuppels *et al.*, 1987; Visca *et al.*, 1992)

La biosynthèse de métabolites secondaires tel que l'HCN a été démontré chez un petit nombre d'espèces bactériennes, comme *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Chrobacterium violaceum* (Askeland et Morrison, 1983; Knowles et Bunch, 1986). La cyanogénèse est maximale durant la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Castric *et al.*, 1979; Askeland et Morrison, 1983) ; et est influencée par plusieurs facteurs environnementaux incluant le fer, le phosphate et les concentrations en oxygène (Knowles et Bunch, 1986). Le fer est un stimulateur de la cyanogénèse chez les trois bactéries citées (Askeland et Morrison, 1983; Voisard *et al.*, 1989). Askeland et Morrison (1983), ont démontré une relation linéaire entre la production d'HCN et la concentration en fer (3 à 300 µM) chez *P. fluorescens*.

Alors que son rôle dans la physiologie bactérienne reste obscur, la cyanogénèse possède un rôle écologique. C'est le cas de la bactérie bénéfique colonisant les racines *P. fluorescens* CHAO (Voisard *et al.*, 1989), qui protège de nombreuses plantes des maladies racinaires fongiques (Voisard *et al.*, 1994; Schnider *et al.*, 1995). La production d'HCN par la souche CHAO est en partie responsable de ses capacités de biocontrôle, comme la suppression de la pourriture noire du tabac causée par *Thielaviopsis basicola* (Voisard *et al.*, 1989; Laville *et al.*, 1998). Et le fer est à la fois indispensable pour la production d'HCN et la suppression de la maladie (Keel *et al.*, 1989 ; Voisard *et al.*, 1989).

L'HCN étant volatile, d'autres substances volatiles pourraient être produites par nos isolats, mais n'ont pas été identifiées. La production de substances volatiles inhibitrices pourrait augmenter le taux de survie des bactéries dans le sol, par l'élimination de compétiteurs potentiels pour les nutriments (Mackie et Wheatley, 1999). Ces substances volatiles bactériennes ont pour rôle de promouvoir la croissance des plantes, exemple le 2,3-Butadienol inhibe la croissance d'*Erwinia carotovora* (Ryu *et al.*, 2003a), et stimule *Arabidopsis thaliana* (Ryu *et al.*, 2003b).

Les autres métabolites qui peuvent intervenir dans l'antagonisme microbien peuvent être la compétition pour les nutriments (Weller *et al.*, 1988), et pour l'espace (Lemanceau, 1992), ainsi que l'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu de culture a induit une réduction des taux d'inhibition de certains champignons, selon les travaux de Mohamed et Gautier (1993).

En plus de la production de sidérophores et d'HCN, quelques-uns de nos isolats produisent de l'AIA, des phosphatases et autres enzymes hydrolytiques; augmentant ainsi leurs capacités d'antagonistes.

Conclusion

Nous avons projeté de mettre en évidence l'effet bénéfique de certain PGPR, les *Pseudomonas* spp. Fluorescents sur la stimulation de la croissance du blé et le biocontrôle de ses agents pathogènes.

Dans ce travail, des isolats ont été étudiés la capacité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la bio-stimulation de la croissance des plantes de blé et de l'activité d'antagonisme. Après l'identification de quatorze isolats qui ont été isolés de la Rhizosphère à partir des plantes spontanées de la région El ASSAFIA. Nous avons effectué l'étude sur six souches (A2, A8, A3, A6, A9 et A12) pour tester leur habileté de promotion de la croissance végétale et leur capacité d'antagonistes.

Les résultats ont montré après l'analyse de variance, Pour le test de germination *in vitro* du taux de germination des graines de quatre variétés de blé, toutes les souches ont une activité sur la germination de la semence du blé. Mais la meilleure activité germinative a été enregistrée par les souches A2 et A8 avec des taux supérieurs à 68%.

Pour l'essai de la biostimulation végétale nous avons noté une activité plus élevée des bactéries testées dans le substrat S1 (sable) par rapport au substrat S2 (sable + terreaux). Un effet significatif pour le paramètre longueur des racines pour les coupes réalisées et la souche A8 présente l'effet le plus élevé c'est à dire maintient un niveau élevé de production des substances qui augmentent la croissance des racines. Et pour le paramètre d'angle de tige la souche A12 présente un effet plus élevé ce qui signifie sa capacité de sécréter des substances augmentent la croissance de tige.

Pour l'essai de confrontation direct *in vitro* avec deux champignons phytopathogènes *Fusarium culmorum* et *Fusarium pseudogramineum* ont été mis sur deux milieux de culture différents PDA et KB, la souche A8 a révélé une inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène testé et elle a marqué le pourcentage le plus élevé par rapport aux autres souches testées.

Nous pouvons conclure que nos souches ont une capacité à stimuler la croissance des plantes et la protéger contre les agents pathogènes et que la souche A8 a des potentiels

plus que les autres, que soit pour stimuler et aussi l'antagonisme et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspectives :

- ✓ Nous conseillons d'utiliser les tests génétiques pour déterminer les caractères génétiques de nos souches.
- ✓ Appliquer la souche A8 pour l'antagonisme *in vivo*, et pour améliorer la croissance, et la santé des plantes sur les plants agricoles comme des biofongicides ou biopesticide dans les cultures agricoles.
- ✓ Étudier l'effet de d'autres souches sur la germination des graines, dans un essai de biostimulation de la croissance des plantes cultivées et dans l'antagonisme.
- ✓ Étudier les métabolites sécrétés *in vivo* de ces souches.

Référence bibliographique

- Belimov, A.A., N. Hontzeas, V.I. Safronova, S.V. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bullitta, et B.R. Glick. 2005.** Cadmium tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol. Biochem.* **37**: 241–250
- Bell-Perkins, L. J., et J.M. Lynch. 2002.** Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- 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.
- Bleecker, A.B., et H. Kende. 2000.** Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 1-18
- 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.
- Chabbi, R.** 2009. *Caractérisation des bactéries isolées à partir du genre Trigonella L. (Légumineuses) poussant dans différents écosystèmes de l'Est algérien.* Thèse de magster : Université de Mentouri Constantine. 126 p.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, et E. Ait Barka. 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4951-4959
- Defago, G. 1993.** 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* **42**: 311–312
- Dimkpa, C., I. Tanjaweinad, et F. Asch. 2009.** Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x. p 1-13

- 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.
- FAO,** 2013. Manuels sur l'application du système de l'analyse des risques-points critiques pour leur maîtrise (HACCP) pour la prévention et le contrôle des mycotoxines. Rome 2003, 88p
- 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.
- Glick, R.B., Z. Cheng, et J. Czarny.** 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminas-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 329-339
- Gray, E. J., et D.L. Smith.** 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 395- 412
- Haas, D., et G. Defago.** 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 307-319
- 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.
- Hernandez-Lucas, C., Royo, J., Paz-Ares, J., Ponz, F., Garcia-Olmedo, F. and Carbonero, P.,** 1986. Polyadenylation site heterogeneity in mRNA encoding the precursor of the barley toxin a-hordothionin. *FEBS Lett.* **200**: 103-105.
- 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.
- Jacques, P., P. Delfosse, M. Ongena, P. Lepoivre, P. Cornélis, N. Koedam, L. Neirinckx, et P. Thonart.** 1993. Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agric.* **2** : 301-307
- Jourdan, E., M. Ongena, et P. Thonart.** 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **12**: 437-449

Kamilova, F., S. Validov, T. Azarova, I. Mulders, et B. Lugtenberg. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1809–1817

Kamilova, F., S. Validov, T. Azarova, I. Mulders, et B. Lugtenberg. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1809–1817

Karnwal, A. 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* **91**: 61-63

Keneni, A., F. Assefa, et P.C. Prabu. 2010. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *faba bean* of Ethiopia and their abilities on solubilization insoluble phosphates *J. Agr. Sci. Tech.* **12**: 79-89

Kennedy, A. C., et L.Z . de Luna. 2004. Rhizospher, p. 399-409. *In* D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), *Encyclopedia of soil in the environment*. Vol03. Columbia University, USA

Khan, A. A., G. Jilani, M.S. Akhtar, S. M. S. Naqvi, et M. Rasheed. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *J. agric. biol. sci.* **11**: 48-58

Kim, K.Y., D. Jordan, et G. A. McDonald. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil Soils.* **26**: 79-87

Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *In: 4th Int. Conf. Plant Pathogen. Bacteria.* Angers France, **2**: 879-882.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth., M.N., 1980b. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr. Microbiol.* **4**: 317–320.

Kouassi, M. (2001). La lutte biologique: une alternative viable à l’utlisation des pesticides?

Lemanceau, P. 1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie.* **12**: 413-437

- Lugtenberg, B., et F. Kamilova. 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541-56
- Lugtenberg, B., et F. Kamilova. 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541-56
- Lynch, J. M., 1990.** Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Lynch JM (ed) *The rhizosphere*. Wiley, Chichester, pp 1-10.
- Mayak, S., T. Tirosh, et B.R. Glick. 2004 a.** Plant growth- promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. *Plant Sci.* **166**: 525-530
- Mayak, S., T. Tirosh, et B.R. Glick. 2004b.** Plant growth- promoting bacteria confer resistance in to tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 565-572
- 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.
- 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.
- 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.
- Milner, J.L., L. Silo-Suh, J.C. Lee, H. He, J. Clardy, et J. Handelsman. 1996.** Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3061-3065
- Nakayama, T., Y. Homma, Y. Hashidoko, J. Mizutani, et S. Tahara. 1999.** Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4334-4339
- Palleroni N. (1984).** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In Krieg N et al. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I.* Williams and Wilkins Co. Baltimore. USA. P.141-171.

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.

Pujic, P., et P. Normand. 2009. La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur.* **298**: 26-29

Ramos Solano, B., J. Barriuso Maicas, et F.J. Gutiérrez Mañero. 2008 a. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), p. 41- 52. *In* : I. Ahmad, J. Pichtel et S. Hayat(ed.), *Plant-bacteria interactions.* Wiley -Vch, Weinheim.

Ramos Solano, B., J. Barriuso Maicas, et F.J. Gutiérrez Mañero. 2008 a. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), p. 41- 52. *In* : I. Ahmad, J. Pichtel et S. Hayat(ed.), *Plant-bacteria interactions.* Wiley -Vch, Weinheim.

Ramos Solano, B., J. Barriuso Maicas, M.T. Pereyra de la Iglesia, J. Domenech, et F. J. Gutiérrez Mañero. 2008 b. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology.* **98**: 451-457

Reed, M. L. E., et B.R. Glick. 2005. Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.* **51**: 1061-1069

Sakthivel, N. and Gnanamanickal, S.S., 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for Suppression of Sheath Rot Disease and for Enhancement of Grain Yields in Rice (*Oryza sativa* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(9):2056-2059.

Schroth, M.N., Hildebrand, D.C. and Panopoulos, N., 1992. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. *In: The Prokaryotes* (MP Balows, ed), Springer-Verlag, New York, pp. 3104-3131.

Spaepen, S., J. Vanderleyden, et R. Remans. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 425-448

Suslow, T.V. and Schroth, M.N., 1982. Rhizobacteria of sugar beet: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathol.* **72**:199-206.

- Thakore, Y.** (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*.
- Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, Shilpi Mittal, A.K. Tripathi, et B.N. Johri.** 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* **89**: 136-150
- Tokala, R. K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford., H. Salove, L.A. Deobald, F.J. Bailey, et M.J. Morra.** 2002. Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *S. lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2161-2171
- van Loon, L.C.** 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254
- van Loon, L.C.** 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254
- van Loon, L.C., et P.A.H.M. Bakker.** 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, p. 39-66. *In* Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer Science Dordrecht, The Netherlands
- Vertigo*. **2**(2).
- Wang, C., E. Knill, B.R. Glick, et G. Defago.** 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.* **46**: 898-907
- Weller, D. M., 1988.** Biological control of soil borne pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol.* **26**:379–407.
- Weller, D.M. and Cook, R.J., 1983.** Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* **73**: 463–469.
- Weyens, N., S. Monchy, J. Vangronsveld, S. Taghavi, et D. Vander Lelie.** 2010. Plant-Microbe Partnerships, p. 254-2564 . *In* K.N. Timmis (ed.), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Weyens, N., S. Monchy, J. Vangronsveld, S. Taghavi, et D. Vander Lelie. 2010. Plant-Microbe Partnerships, p. 254-2564 . *In* K.N. Timmis (ed.), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Whippes, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot.* **52:** 487-511

Whippes, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot.* **52:** 487-511

Zahir, Z. A, M. Arshad, et W.T. Frankenberger, Jr. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria : application and perspectives in agriculture. *Adv. Agro.* **81:** 97-198

📌 **Annexe 1 : Milieu de King B**

- ✓ Peptone 20g
- ✓ MgSO₄.7H₂O 1,5 g
- ✓ K₂HPO₄ 1,5 g
- ✓ Agar agar 15 g
- ✓ Eau distillée 1000 ml

📌 **Annexe 2 : Milieu de PDA (potato dextrose agar)**

- ✓ Extrait de pomme de terre 200g
- ✓ Glucose 20g
- ✓ Agar-agar 15g
- ✓ Eau distillée 1000ml

📌 **Annexe 03 : taux de germination :**

		variété vitron						
		taux de germination /jour						
		jour 01	jour 02	jour 03	jour 04	jour 05	jour 06	jour 07
suspension 02		0	64	77	94	94	94	94
suspension 08		0	75	93	97	97	97	97
suspension 12		0	69	89	97	97	97	97
T		0	66	73	94	94	94	94

variété Bousselem							
taux de germination /jour							
	jour	jour	jour	jour	jour	jour	jour
	01	02	03	04	05	06	07
suspension 02	0	70	80	88	88	88	88
suspension 08	0	61	78	91	91	91	91
suspension 12	0	58	80	85	85	85	85
T	0	34	48	72	92	92	92

variété HD 1220							
taux de germin /jour							
	jour	jour	jour	jour	jour	jour	jour
	01	02	03	04	05	06	07
suspension 02	0	71	77	87	87	87	87
suspension 08	0	74	84	97	97	97	97
suspension 12	0	31	65	91	91	91	91
T	0	67	81	90	90	90	90

variété MBB							
taux de germin /jour							
	jour	jour	jour	jour	jour	jour	jour
	01	02	03	04	05	06	07
suspension 02	0	39	54	79	81	81	81
suspension 08	0	37	69	75	75	75	75
suspension 12	0	34	46	68	68	68	68
T	0	57	62	62	62	62	62

© **Annexe 04 : Analyse de variance Taux de germination (essai de germination *in vitro*) :**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	111625.77 7	111	1005.638		
Var.FACTEUR 1	98170.089	6	16361.682	297.83 4	0.000
Var.FACTEUR 2	7022.241	3	2340.747	42.609	0.000
Var.FACTEUR 3	846.955	3	282.318	5.139	0.003
Var.INTER F1*2	1279.696	18	71.094	1.294	0.229
Var.INTER F1*3	571.982	18	31.777	0.578	0.900
Var.INTER F2*3	768.295	9	85.366	1.554	0.153
VAR.RESIDUEL LE 1	2966.518	54	54.936		

Facteur 01 : les jours

Id	Modalité	Moyenn e	Groupes homogènes			
5	J5	86.813	A			
6	J6	86.813	A			
7	J7	86.813	A			
4	J4	85.438	A			
3	J3	72.250		B		
2	J2	56.688			C	
1	J1	0.000				D

Facteur 02 : Variété :

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes		
1	Vitron	76.214	A		
3	HD	71.786		B	
2	Bousselam	68.321		B	
4	MBB	55.000			C

Facteur 03 : Souches bactérienne :

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes		
2	S8	71.821	A		
1	S2	68.929	A	B	
3	S12	65.571		B	
4	ST	65.000		B	

📍 Annexe 05 : Analyse de longueur racinaire (coupe 01) :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	17.618	23	0.766		
Var.FACTEUR 1	2.565	1	2.565	5.257	0.036
Var.FACTEUR 2	3.702	3	1.234	2.529	0.099
Var.INTER F1*2	3.056	3	1.019	2.087	0.147
Var.BLOCS	1.464	2	0.732	1.501	0.256
VAR.RESIDUELLE 1	6.831	14	0.488		
				Coef. variation %	5.867

Facteur 01 : substrat :

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes	
1	S1	12.233	A	
2	S2	11.579		B

Facteur 02 : bactérie :

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes
1	08	13.372	A
2	02	12.095	B
3	12	11.852 ()	C
4	témoin	10.305	D

📍 Annexe 06 : analyse de variance de poids frais de la racine (coupe 01) :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0.012	23	0.001		
Var.FACTEUR 1	0.001	1	0.001	2.374	0.143
Var.FACTEUR 2	0.003	3	0.001	2.391	0.111
Var.INTER F1*2	0.000	3	0.000	0.402	0.756
Var.BLOCS	0.002	2	0.001	2.418	0.124
VAR.RESIDUELLE 1	0.006	14	0.000		
				Coef. variation %	13.065

Facteur 01 : substrat :

Id	Modalité	Moyenne
1	(S1)	0.161
2	(S2)	0.148

Facteur 02 : bactérie :

	Moyenne
1 (B1)	0.161
2 (B2)	0.162
3 (B3)	0.160
4 (B4)	0.135

📍 Annexe 07 : analyse de variance d'hauteur tige (coupe 01) :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	130.136	23	5.658		
Var.FACTEUR 1	17.207	1	17.207	3.775	0.070
Var.FACTEUR 2	21.865	3	7.288	1.599	0.234
Var.INTER F1*2	3.764	3	1.255	0.275	0.843
Var.BLOCS	23.487	2	11.743	2.576	0.110
VAR.RESIDUELLE 1	63.814	14	4.558		
			Coef. variation %	9.802	

Facteur 01 : substrat :

Id	Modalité	Moyenne
1	sable	22.628
2	Sable+tourbe	20.934

Facteur 02 : bactérie :

Id	Modalité	Moyenne
1	(B1)	21.096
2	(B2)	22.191
3	(B3)	23.137
4	(B4)	20.700

🌀 Annexe 08 : Analyse de variance de poids frais de la tige (coupe 01) :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0.013	23	0.001		
Var.FACTEUR 1	0.002	1	0.002	3.522	0.079
Var.FACTEUR 2	0.002	3	0.001	1.566	0.241
Var.INTER F1*2	0.000	3	0.000	0.265	0.850
Var.BLOCS	0.002	2	0.001	2.418	0.124
VAR.RESIDUELLE 1	0.006	14	0.000		

Facteur 01 : substrat :

Id	Modalité	Moyenne
1	Sable	0.245
2	Sable+substrat	0.228

Facteur 02 : bactérie :

Id	Modalité	Moyenne
1	(B1)	0,052
2	(B2)	0,042
3	(B3)	0,052
4	(B4)	0,048

Annexe 09 : Analyse de la variance de longueur racinaire (coupe 02) :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	41.958	23	1.824		
Var.FACTEUR 1	4.415	1	4.415	23.594	0.000
Var.FACTEUR 2	33.721	3	11.240	60.062	0.000
Var.INTER F1*2	0.731	3	0.244	1.303	0.313
Var.BLOCS	0.471	2	0.235	1.257	0.315
VAR.RESIDUELLE 1	2.620	14	0.187		
			Coef. variation %	3.320	

Facteur 01 : substrat :

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes	
1	S1	13.459	A	
2	S2	12.601		B

Facteur 02 : bactérie :

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes			
2	B2	14.809	A			
3	B3	13.338		B		
1	B1	12.288			C	
4	BT	11.685				D

 **Annexe 10 : analyse de variance de poids frais racinaire (coupe 02) :**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0.493	23	0.021		
Var.FACTEUR 1	0.036	1	0.036	1.661	0.216
Var.FACTEUR 2	0.060	3	0.020	0.932	0.453
Var.INTER F1*2	0.057	3	0.019	0.883	0.476
Var.BLOCS	0.039	2	0.019	0.900	0.431
VAR.RESIDUELLE 1	0.302	14	0.022		

Facteur 01 : substrat :

Id	Modalité	Moyenne
1	sable	0.073
2	Sable+tourbe	0.150

Facteur 02 : bactérie :

Id	Modalité	Moyenne
1	1 (B1)	0.198
2	2 (B2)	0.079
3	3 (B3)	0.089
4	4 (B4)	0.081

📌 **Annexe 11 : analyse de variance de la hauteur tige (coupe 02) :**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	278.992	23	12.130		
Var.FACTEUR 1	19.823	1	19.823	13.755	0.002
Var.FACTEUR 2	219.247	3	73.082	50.712	0.000
Var.INTER F1*2	1.586	3	0.529	0.367	0.780
Var.BLOCS	18.160	2	9.080	6.301	0.011
VAR.RESIDUELLE 1	20.176	14	1.441		
				Coef. variation %	4.096

✓ **Facteur 01 : Substrat :**

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes
1	Sol sableux	30.216	A
2	tourbe	28.398	B

✓ **Facteur 02 : bactérie :**

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes
1	1 (B1)	27.691	B
2	2 (B2)	28.033	B
3	3 (B3)	34.503	A
4	4 (BT)	27.002	B

Annexe 12 : analyse de la variance du poids frais de tige :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0.013	23	0.001		
Var.FACTEUR 1	0.004	1	0.004	9.791	0.007
Var.FACTEUR 2	0.002	3	0.001	1.383	0.289
Var.INTER F1*2	0.001	3	0.000	0.547	0.661
Var.BLOCS	0.002	2	0.001	0.909	0.087
VAR.RESIDUELLE 1	0.005	14	0.000		
Coef. variation % : 19.472					

✓ **Facteur : substrat :**

Id	Modalité	Moyenne
1	Sol sableux	0.275
2	Sable+tourbe	0.273

✓ **Facteur : bactérie**

Id	Modalité	Moyenne
1	1 (B1)	0.294
2	2 (B2)	0.259
3	3 (B3)	0.280
4	4 (B4)	0.260

📌 **Annexe I3 : analyse de variance d'antagonisme *F.pseudograminearum* :**

Sur le KB :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VarTOTALE	3392.079	11	308.371		
Var.FACTEUR 1	3389.079	5	677.816	1355.632	0.000
VAR.RESIDUELLE 1	3.000	6	0.500		
Coef. variation %	1.730				

✓ **Facteur : bactérie**

Id	Modalité	Moyenne
1	1 (B1)	37.786
2	2 (B2)	4.918
3	3 (B3)	52.267
4	4 (B4)	48.191
5	5 (B5)	50.386
6	6 (B6)	51.754

Sur PDA :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VarTOTALE	1278.118	11	116.193		
Var.FACTEUR 1	1275.118	5	255.024	510.047	0.000
VAR.RESIDUELLE 1	3.000	6	0.500		

✓ **Facteur : bactérie**

Id	Modalité	Moyenne
1	1 (B1)	47.467
2	2 (B2)	37.073
3	3 (B3)	60.087
4	4 (B4)	57.996
5	5 (B5)	32.803
6	6 (B6)	54.441

📍 **Annexe I4 : analyse de variance d'antagonisme *F.culmorum*:****Sur le PDA :**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	1278.118	11	116.193		
Var.FACTEUR 1	1275.118	5	255.024	510.047	0.000
VAR.RESIDUELL E 1	3.000	6	0.500		

✓ **Facteur : bactérie**

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes
1	1 (B1)	47.467	A
2	2 (B2)	37.073	A
3	3 (B3)	60.087	B
4	4 (B4)	57.996	C
5	5 (B5)	32.803	D
6	6 (B6)	54.441	E

Sur KB :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	3392.079	11	308.371		
Var.FACTEUR 1	3389.079	5	677.816	1355.632	0.000
VAR.RESIDUELL E 1	3.000	6	0.500		
Coef. variation %	1.730				

✓ **Facteur : bactérie**

Id	Modalité	Moyenne	Groupes homogènes
1	B3	52.267	A
2	B6	51.754	A
3	B5	50.386	A
4	B4	48.191	B
5	B1	37.786	C
2	B2	4.918	D

📌 **Annexe 15:** table de lecture de la galerie API20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO₃	nitrate de potassium	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 +NIT 2 / 5 min	
				Incolore	Rose rouge
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min	
				Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptOPhane)	JAMES / immédiat	
				vert pâle	Rose
				jaune	
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	Jaune	orange rose rouge
URE	Urée	0,76	UREase	Jaune	orange rose rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (-glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris Marron Noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- D-galactopyranoside	0,22	-galactosidase (Para-NitroPhényl - D- Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	1,56	Assimilation glucose	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1,4	Assimilation arabinose	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1,4	Assimilation mannose	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1,36	Assimilation mannitol	Transparence	Trouble
NAG	N-acetyl-glucosamine	1,28	Assimilation N-acétyle-glucosamine	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1,4	Assimilation maltose	Transparence	Trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	Assimilation potassium gluconate	Transparence	Trouble
CAP	acide caprique	0,78	Assimilation acide caprique	Transparence	Trouble
ADI	acide adipique	1,12	Assimilation acide adipique	Transparence	Trouble
MLT	acide malique	1,56	Assimilation acide malique	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	Assimilation trisodium citrate	Transparence	Trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	Assimilation acide phénylacétique	Transparence	Trouble

Source : Bio Mérieux

 **Annexe 16** : Les résultats de la galerie API 20 NE

Les souches Les teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14
NO3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ADH	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
URE	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ESC	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
GEL	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
PNG	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ARA	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GNT	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADI	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
MLT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PAC	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+