



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M<sup>lle</sup> BENAIED Rachida

M<sup>lle</sup> MEDDAH Khadidja

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE**

THÈME

**Etude de la tolérance au cuivre chez des  
isolats rhizosphériques de *Pseudomonas*  
fluorescents**

Soutenue publiquement le 01/07/2018

Devant le Jury

Président	Mr NEBBACHE Salim	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur	Mr DJIBAOUI Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Examineur	Mr ARABI Abed	Docteur	Université de Mostaganem
Co-encadreur	Mr IDDER Boubakeur	Doctorant	Université de Mostaganem
Membre Invité	Mr ZERHOUNI Mustapha	MCA	Université de Mostaganem

*Thème réalisé au niveau du Laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université de Mostaganem*

*Année universitaire 2017-2018*

# Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la santé de finaliser ce travail.

Nous devons l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes.

Un grand merci à **Mr. DJIBAOUI Rachid** Professeur à l'université de Mostaganem, pour avoir encadré ce travail, pour ces orientations et sa patience, ainsi que ses suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire.

Tous d'abord, nous remercions Mr. **NEBBACHE Salim** Maître de conférences B à l'université de Mostaganem pour l'honneur qu'il nous a fait en président ce jury, de nous avoir aidé à travailler sur ce thème intéressant.

Nous remercions **Mr. ARABI Abed** Docteur à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements vont aussi à **Mr. IDDER Boubaker** Doctorant à l'université de Mostaganem, pour l'honneur qu'il nous a fait en codirigeant ce travail.

Nous remercions profondément **Mr. ZERHOUNI Mustapha** à l'université de Mostaganem, qui nous a fait l'honneur de participer au jury de soutenance.

Un remerciement spécial s'adressé à tous le personnel de la bibliothèque et aussi au technicien du Laboratoire de Microbiologie Mr Djilali.

Nous n'oublions pas aussi d'exprimer nos remerciements à tous nos amis, nos collègues et à tout les personnes qui ont participés de près au de loin à la réalisation de ce travail.

*Rachida & Khadidja*

## *Dédicaces*

*Nullé œuvre n'est exaltante que celle réalisée avec le soutien moral et financier des personnes qui nous sont proches.*

*Nous dédions ce modeste travail :*

*A nos chers parents qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite*

*A nos frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour nous des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Nos professeurs de l'Université de Mostaganem qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.*

*Rachida & Khadidja*

# Table des matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

## Partie Bibliographique

### Chapitre I : Généralités sur les pesticides

<b>I.1 Définition des pesticides</b> .....	<b>2</b>
<b>I.2. Classification des pesticides</b> .....	<b>2</b>
<b>I.2.1. Classification chimique</b> .....	<b>2</b>
<b>I.2.1.1. Pesticides inorganiques</b> .....	<b>2</b>
<b>I.2.1.2. Pesticides organo-métalliques</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2.1.3. Pesticides organiques</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2.2. Classification biologique</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2.3. Classification selon l'usage</b> .....	<b>3</b>
<b>I.3. Impact des pesticides</b> .....	<b>4</b>
<b>I.3.1. Impact des pesticides sur la santé humaine</b> .....	<b>4</b>
<b>I.3.2. Impact sur l'environnement</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3.2.1. Eau</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3.2.2. Air</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3.2.3. Sol</b> .....	<b>5</b>
<b>I.4. Le cuivre</b> .....	<b>6</b>
<b>I.5. Toxicité du cuivre</b> .....	<b>7</b>
<b>I.5.1. Impacte du cuivre sur la plante</b> .....	<b>7</b>
<b>I.5.2. Impact du cuivre sur l'eau</b> .....	<b>8</b>
<b>I.5.3. Impact du cuivre Sur la santé humaine</b> .....	<b>8</b>

### Chapitre II. Généralités sur les PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria).

<b>II.1. Interactions rhizosphère-bactérie</b> .....	<b>10</b>
<b>II.2. Rôles des PGPR</b> .....	<b>11</b>
<b>II.2.1. Phytostimulation (effet direct)</b> .....	<b>11</b>
<b>II.2.1.1. Fixation d'azote</b> .....	<b>11</b>
<b>II.2.1.2. Solubilisation de phosphate</b> .....	<b>12</b>
<b>II.2.1.3. Production de sidérophores</b> .....	<b>13</b>
<b>II.2.1.4. Production de phytohormones</b> .....	<b>14</b>

II.2.2. Phytoprotection (effet indirect) .....	15
II.2.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments .....	15
II.2.2.2. Antibiose .....	16
I.3. Les <i>Pseudomonas</i> PGPR .....	16
II.3.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	18
II.3.2 <i>Pseudomonas putida</i> .....	18

### **Chapitre III : Interactions *Pseudomonas*-cuivre**

III.1. Généralité .....	19
III.2. Effet antibactérien du cuivre .....	20
III.3. Effet antifongique du cuivre .....	21
III.4. Mécanisme de toxicité de cuivre .....	22
III.5. Résistance des <i>Pseudomonas</i> au cuivre .....	23
III.5.1. Stratégies de résistances des <i>Pseudomonas</i> au cuivre .....	23
III.5.2. Mécanisme génétique de la résistance .....	24

## **Partie Pratique**

### **Chapitre IV : Matériel et Méthodes**

IV.1. Échantillonnage .....	26
IV.2. Isolement, purification et l'identification des <i>Pseudomonas</i> fluorescents .....	27
IV.2.1. Isolement .....	27
IV.2.2. Purification .....	27
IV.2.3. Identification .....	29
IV.2.3.1. Examens macro et microscopique .....	29
IV.2.3.2. Tests biochimiques .....	29
a. Recherche de l'oxydase .....	29
b. Recherche du Catalase .....	29
IV.2.3.3. Mise en culture des <i>Pseudomonas</i> à 4°C et 42°C .....	29
IV.3. Test de la résistance des <i>Pseudomonas</i> fluorescents au cuivre .....	30
IV.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre vis-à-vis les isolats testés .....	33
IV.5. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des <i>Pseudomonas</i> fluorescents .....	36
IV.6. Identification biochimiques des isolats sélectionnés (les plus résistants) par des galeries de type API 20NE .....	36

### **Chapitre V : Résultats et Discussion**

V.1. Isolement et purification des isolats .....	37
V.2. Identification des bactéries isolées et purifiées .....	37
V.2.1. Examen macroscopique .....	37
V.2.2. Examen microscopique .....	38

V.2.2.1. Examen à l'état frais .....	38
V.2.2.2. Coloration de Gram .....	38
V.2.3. Test biochimique .....	38
V.2.3.1. Recherche de l'oxydase .....	38
V.2.3.2 Recherche de la catalase .....	38
V.2.4. Mise en culture des Pseudomonas à 4°C et 42°C .....	39
V.3 Test de la résistance des Pseudomonas fluorescents au cuivre .....	41
V.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	43
V.5. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des Pseudomonas fluorescents .....	44
V.6. Identification des deux isolats les plus résistants au cuivre par des galeries API 20NE .....	47
Conclusion .....	48
Références bibliographiques .....	49
Annexes .....	54

## الملخص

تستخدم المبيدات في مكافحة الكائنات الحية الضارة ،و يعتبر النحاس العنصر الكيميائي الرئيسي والفعال لهذه المبيدات. و استعماله بشكل مستمر قد يؤدي إلى ظهور مقاومة لدى البكتيريا و التي تتجلى بعدة آليات.

يهدف هذا العمل إلى عزل بكتيريا تابعة للجنس *Pseudomonas* و تحديد خصائصها المورفولوجية والبيوكيميائية مأخوذة من جذور نبات إحدى النجيليات البرية ( *Hordeum murinum* ) (شعير الفأر) من منطقتي وادي الخير وسيدي لخضر من ولاية مستغانم. تم عزل أربعين عزلة بكتيرية 29 منها تابعة للنوع *Pseudomonas* التي تم إخضاعها لاختبار مقاومة النحاس.

تم اختبار هذه البكتيريا بجرعات مختلفة من كبريتات النحاس ( $5H_2O, CuSO_4$ ) (0.50 ، 1.2 ، 2.5 ، 3 ، 3.5 ، 4 ، 4.5 و 5 mM ) ،حيث أظهرت هذه الأخيرة مقاومة للنحاس خاصة العزلتين K و 14.

تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط (CMI) لكبريتات النحاس فيما يتعلق بالعزلات الأكثر مقاومة يشير إلى أن كلا من بكتيريا *Pseudomonas* (k و 14) يتم تثبيطها بتركيز 1.6 mM. تشير النتائج إلى أن تأثير كبريتات النحاس على نمو نوعين من *Pseudomonas fluorescens* المعزول في الوسطين المختلفين (King B و BN) على أن النحاس له تأثير مثبط للنمو يختلف بين الوسطين، كما أظهرت نتائج التصنيف بنظام ( API 20 NE ) إلى ان العزلتين تقتربان من نوع (*Pseudomonas fluorescens*).

**الكلمات المفتاحية :** *Pseudomonas fluorescens* , المقاومة , CMI , جذور النبات.

## Résumé

Les pesticides sont utilisés dans la lutte contre les organismes nuisibles. Le cuivre est le principal élément chimique actif des pesticides et son utilisation quotidienne peut favoriser l'apparition de résistance, chez la population microbienne, qui se traduit par plusieurs mécanismes.

Ce travail, a pour objectif d'isolement et de caractérisation morphologique et biochimique des bactéries à partir de la rhizosphère d'une plante graminée (l'orge des rat ; *Hordeum murinum*) de la région d'Oued El Kheir et de Sidi Lakhdar au willaya de Mostaganem . Quarante bactéries ont été isolées, dont 29 apparentant au genre *Pseudomonas* ont été soumises à un test de résistance au cuivre,

Ces bactéries ont été testées à différentes doses (0,50 ; 1,2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 et 5 mM) de sulfates de cuivre ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ), montrant une résistance au cuivre surtout pour les isolats K et 14.

La Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de sulfate de cuivre vis-à-vis les isolats les plus performantes indique que les deux bactéries de *Pseudomonas* fluorescent (k et 14) sont inhibées par la concentration de 1,6 mM.

La mise en évidence de l'effet de sulfate de cuivre sur la croissance des deux espèces de *Pseudomonas* fluorescent isolées dans les deux milieu différent (King B et BN) montre que le cuivre a un effet ralentisseur de croissance,

L'identification par les galeries biochimiques API 20 NE, montre que les deux isolats se rapprochent au *Pseudomonas fluorescens*.

**Mots clé :** *Pseudomonas fluorescens*, résistance, CMI, rhizosphère.

## **Abstract**

Pesticides are used in the fight against pests. Copper is the main active chemical component of pesticides and its daily use can promote the emergence of resistance in the microbial population, which results in several mechanisms.

This work aims to isolate and characterize morphological and biochemical bacteria from the rhizosphere of a grass plant (rat barley, *Hordeum murinum*) in the region of Oued El Kheir and Sidi Lakhdar. Forty bacteria were isolated, of which 29 *Pseudomonas*-like species were subjected to a copper resistance test,

These bacteria were tested at different doses (0.50, 1.2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 and 5 mM) of copper sulphates ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), showing resistance to copper especially for isolates K and 14.

The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of copper sulphate with respect to the best performing isolates indicates that the two fluorescent *Pseudomonas* bacteria (k and 14) are inhibited by the concentration of 1.6 mM.

Evidence of the effect of copper sulphate on the growth of the two species of fluorescent *Pseudomonas* isolated in the two different medium (King B and BN) shows that copper has a cross-hair retarder effect,

The identification by the API 20 NE biochemical galleries shows that the two isolates are close to *Pseudomonas fluorescens*.

**Key words:** fluorescent pseudomonas, resistance, MIC, rhizosphere.

## Liste d'abréviation

[C] : concentration

% : Pourcentage

°C : degré Celsius

AAC : Amino-cyclopropane-1-carboxylate

AB : Agriculture biologique

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFSSA : Agence française de sécurité  
sanitaire des aliments

AIA : Acide Indole-3-acétique

BN: bouillon nutritive

Cd<sup>2+</sup>: Ions de cadmium

Cu<sup>2+</sup> : Ions de cuivre

CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O : sulfate de cuivre  
pentahydraté

DO : densité optique

EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ERV : Entérocoques Résistants à la  
Vancomycine

FAO : Food Agriculture organisation

g : gramme

g/l : gramme par litre

GN: gélose nutritive

h : heure

ISR: Induced Systemic Resistance

min : minute

ml: millilitre

mM : milli-mole

NE : non-entérobactérie

nm : nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la santé

PGPR: Plant Growth Promoting

Rhizobacteria

pH : potentiel d'hydrogène

SARM : *Staphylococcus Aureus* Résistant  
à la Méthicilline

X : fois

Zn<sup>2+</sup> : Ions de zinc

λ; longueur d'onde

μl : microlitre

μm : micromètre

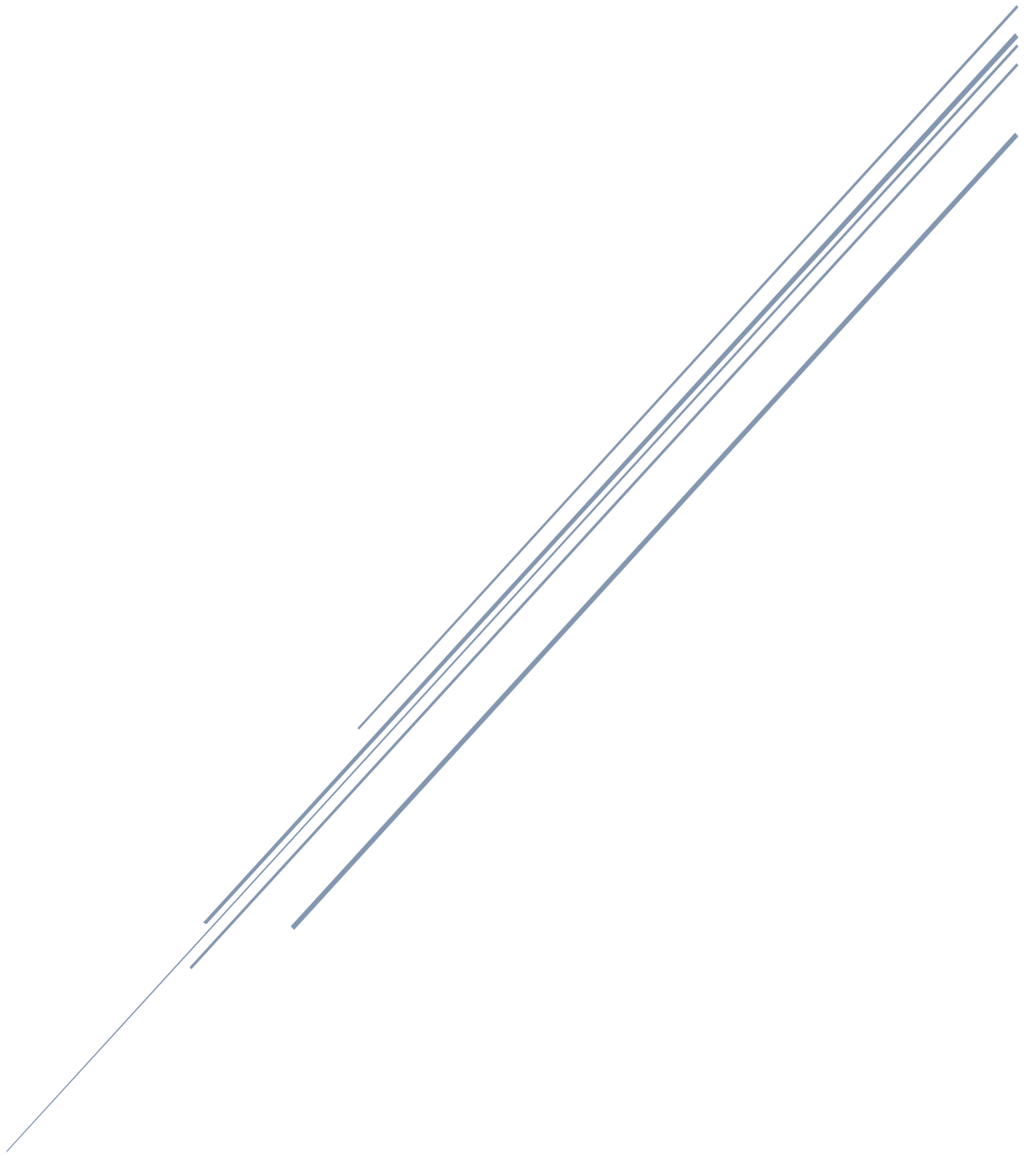
## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
<b>Tableau 01.</b>	Quelques fongicides homologués pour la lutte contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer en Cote d'Ivoire .....	<b>22</b>
<b>Tableau 02.</b>	Concentration finale de sulfate de cuivre.....	<b>33</b>
<b>Tableau 03.</b>	Caractères morphologique, biochimique des <i>Pseudomonas</i> fluorescents...	<b>40</b>
<b>Tableau 04.</b>	Effet du sulfate de cuivre sur la croissance des isolats de <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	<b>41</b>
<b>Tableau 05.</b>	Concentration minimale inhibitrice du cuivre vis-à-vis les deux isolats de <i>Pseudomonas</i> fluorescents étudiés.....	<b>43</b>
<b>Tableau 06.</b>	Résultats des tests biochimiques obtenus par des galeries API 20 NE.....	<b>47</b>

## Liste des figures

N°	Titre	Page
<b>Figure 01.</b>	Représentation schématique décrivant les interactions des plantes-microorganismes dans la rhizosphère.....	17
<b>Figure 02.</b>	Mécanismes de résistances bactériens aux métaux .....	24
<b>Figure 03.</b>	Transport du cuivre et résistance.....	25
<b>Figure 04.</b>	<i>Hordeum murinum</i> (l'orge des rats).....	26
<b>Figure 05.</b>	Champ de la vigne.....	26
<b>Figure 06 :</b>	Différentes étapes de l'isolement de <i>Pseudomonas</i> fluorescents à partir du sol rhizosphérique.....	28
<b>Figure 07.</b>	Détermination de la résistance des <i>Pseudomonas</i> fluorescents au sulfate de cuivre.....	31
<b>Figure 07 (suite).</b>	Détermination de la résistance des <i>Pseudomonas</i> fluorescents au sulfate de cuivre.....	32
<b>Figure 08.</b>	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des isolats de <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	34
<b>Figure 08 (suite).</b>	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des isolats de <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	35
<b>Figure 09.</b>	Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas</i> fluorescent sur gélose King B, isolé à partir du sol rhizosphérique.....	37
<b>Figure 10.</b>	Aspect microscopique de <i>Pseudomonas</i> fluorescent (X100).....	38
<b>Figure 11.</b>	Test de l'oxydase.....	39
<b>Figure 12.</b>	Test de la catalase.....	39
<b>Figure 13.</b>	Concentration minimale inhibitrice du sulfate de cuivre via-à-vis <i>Pseudomonas fluorecsens</i> en milieu solide.....	43
<b>Figure 14.</b>	Évaluation de l'effet de sulfate de cuivre sur la croissance de <i>Pseudomonas fluorecens</i> dans bouillon nutritif.....	45
<b>Figure 15.</b>	Évaluation de l'effet du sulfate de cuivre sur la croissance de <i>Pseudomonas fluorecens</i> dans le milieu King B liquide.....	45
<b>Figure 16.</b>	Evaluation de l'effet de sulfate de cuivre sur la croissance de <i>Pseudomonas fluorecens</i> dans deux milieux liquide (Bouillon nutritif et King B).....	46
<b>Figure 17.</b>	Évaluation de la croissance de <i>Pseudomonas fluorecens</i> dans deux milieux liquide (Bouillon nutritif et King B).....	46
<b>Figure 18.</b>	Galerie biochimique API 20 NE de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	47

# INTRODUCTION



## Introduction

La lutte contre les organismes nuisibles aux cultures, à certainement été de tous les temps une préoccupation des agriculteurs. Le traitement des cultures s'effectue en utilisant des insecticides, des fongicides, des herbicides, regroupés sous le nom de pesticides (Calvet *et al.*, 2005).

Le cuivre est le principal élément chimique actif des pesticides. Il est présent dans la nature sous forme libre ou lié ( $\text{Cu}_2\text{O}$  et  $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ). C'est un bactéricide le plus répandu en agriculture, c'est un oligoélément nécessaire au bon fonctionnement de certaines enzymes dans l'organisme.

L'utilisation fréquente des pesticides dans l'agriculture, notamment ceux qui contiennent du cuivre à un impact sur les microorganismes bénéfiques pour la plante tel que, les *Pseudomonas* qui jouent un rôle primordial dans le biocontrôle et la stimulation de la croissance végétale (ferret, 2012).

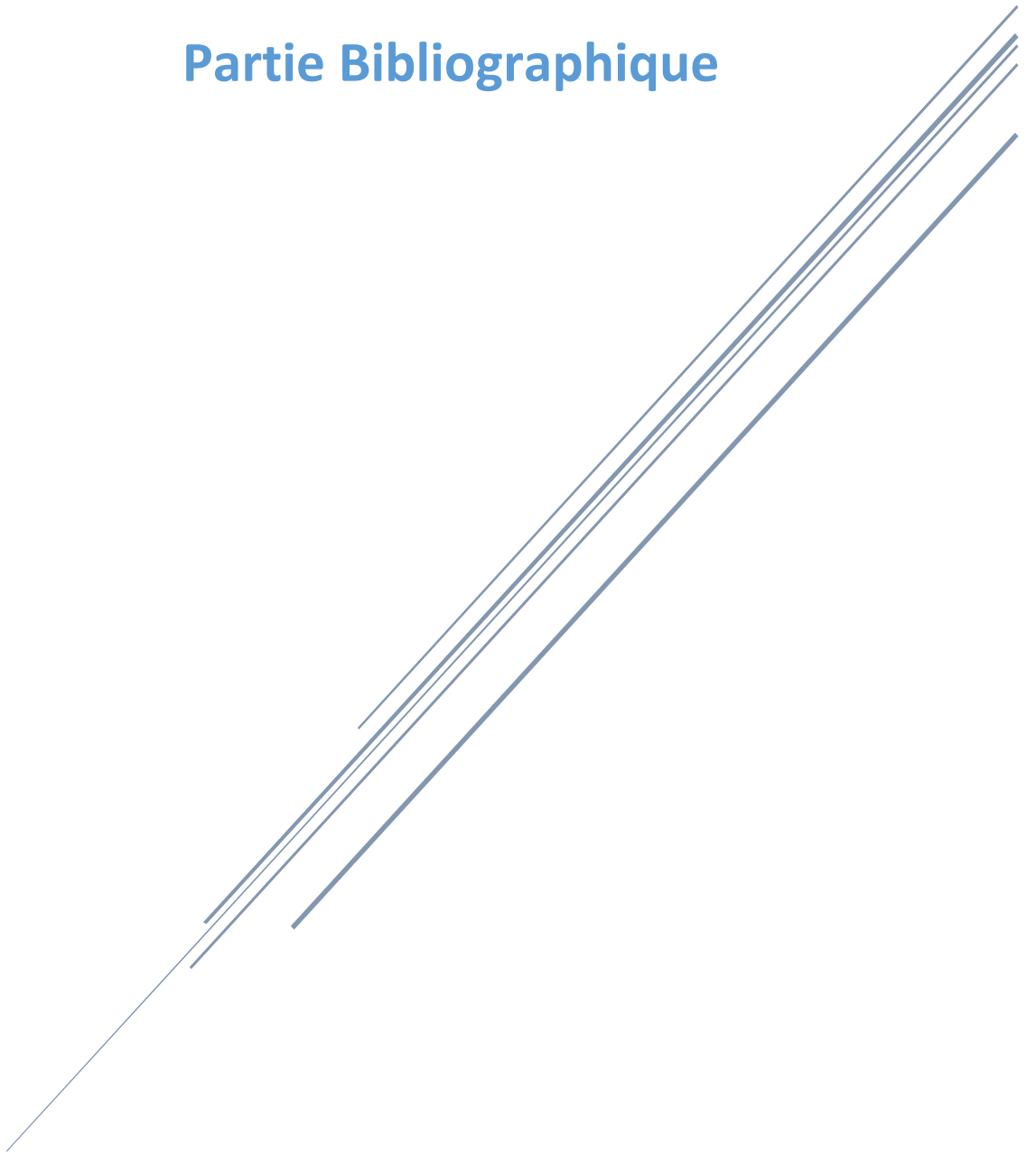
Les applications successives des pesticides et sans alternance, peuvent favoriser l'apparition de résistance chez les populations microbiennes, qui se traduit par plusieurs mécanismes notamment, l'exclusion par perméabilité membranaire, l'efflux actif, la séquestration intracellulaire, la détoxification enzymatique et la réduction de la sensibilité des cibles cellulaires.

Cependant, les *Pseudomonas* fluorescents ayant ces mêmes propriétés, ont été choisis pour réaliser ce travail qui se résume dans l'étude de l'effet du cuivre sur la croissance de ce groupe bactérien.

Pour effectuer cette étude nous avons réalisé les étapes suivantes :

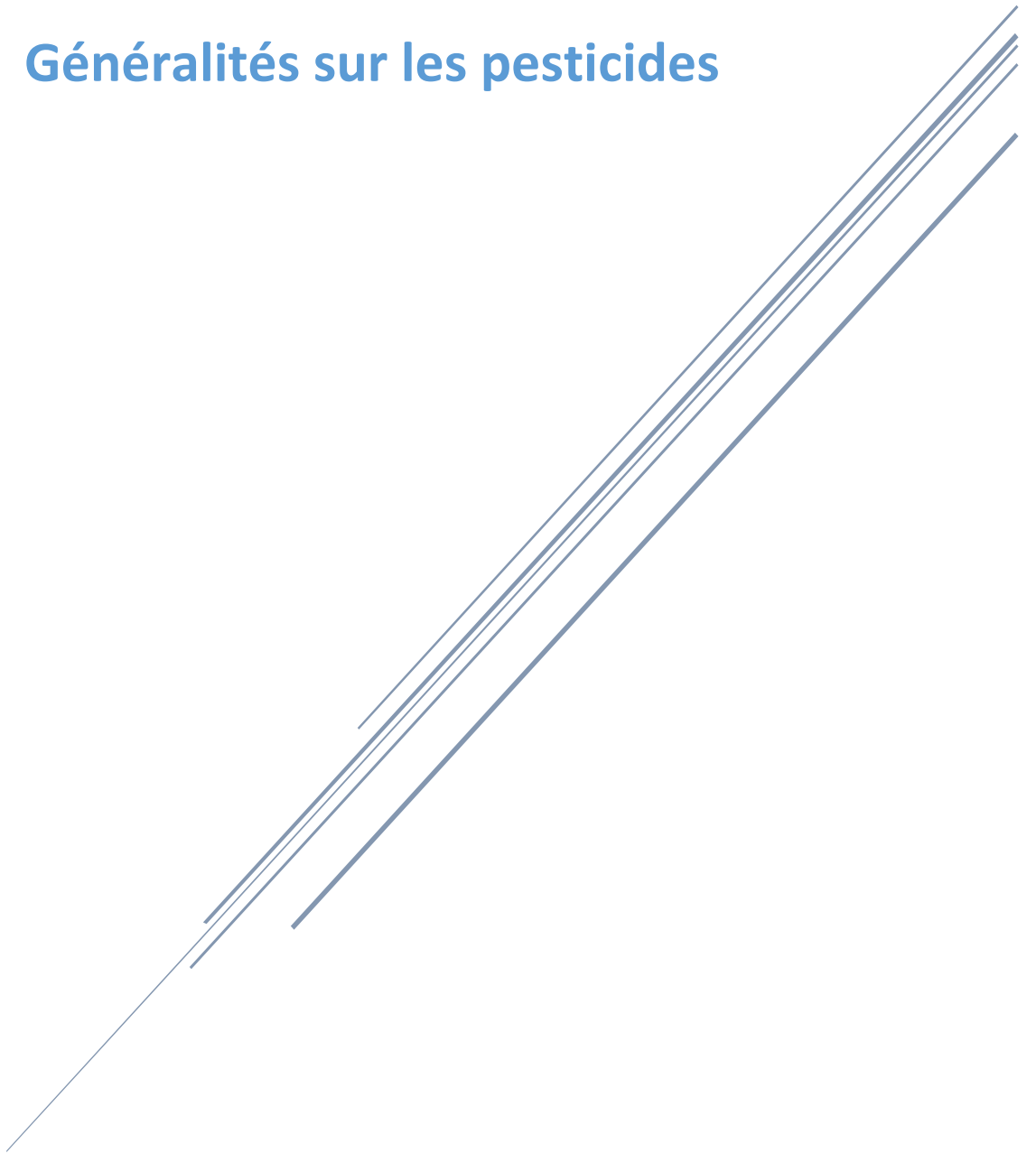
- Isolement des *Pseudomonas* fluorescents à partir du sol rhizosphérique.
- Mise en évidence du test de la résistance des *Pseudomonas* fluorescents au cuivre.
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre vis-à-vis les isolats testés
- Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des deux espèces de *Pseudomonas* fluorescent les plus résistantes.
- Identification des deux espèces par des galeries biochimiques API 20 NE.

## Partie Bibliographique



# CHAPITRE I

## Généralités sur les pesticides



## Chapitre I : Généralités sur les pesticides

### I.1 Définition des pesticides

La multiplicité des expressions qui définissent les produits phytosanitaires traduit l'évolution des usages qui leur ont été attribués. Ils ont été appelés successivement ou simultanément ; produit à usage anti parasites, produits de protection des plantes, produits agrosanitaires et produit agro pharmaceutique. Aujourd'hui, le terme consacré dans l'union Européenne est celui de produits phytopharmaceutiques. Mais le terme le plus utilisé dans le langage courant est le mot pesticide (Regnault et Roger, 2014).

Le mot « pesticide » est un terme générique, dérivé des termes latin « caedere » (tuer) et « pestis » (fléau), intégré à la langue anglaise dès 1940, puis à la langue française à la fin de 1950. Il fait aujourd'hui partie du vocabulaire courant et est défini par le petit Robert (2012) comme un produit chimique employé contre les parasites animaux et végétaux des cultures.

Ce terme utilisé aussi bien dans le langage courant que scientifique (Baldi *et al.*, 2012). L'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture FAO (2002), définit le terme « pesticide » comme toute substance ou association de substance qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs (y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales) et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux. Le terme inclut les substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance des plantes, défoliant, agent de dessiccation, agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée de ceux-ci, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport (Baldi *et al.*, 2012).

### I.2. Classification des pesticides

Il existe trois façons de classement des pesticides ; par leur usages, par les organismes vivants visés et par leurs caractéristiques chimiques. Les trois modes sont utiles mais ne répondent pas aux mêmes préoccupations (Calvet *et al.*, 2005).

#### I.2.1. Classification chimique

##### I.2.1.1. Pesticides inorganiques

Ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en très grandes quantités comme le soufre et le cuivre. Ce sont aussi des pesticides très anciens dont l'emploi est apparu bien avant les débuts de la chimie organique de synthèse. Il n'existe plus d'insecticides inorganiques sauf un seul herbicide qui est encore employé aujourd'hui comme désherbant total (le chlorate de sodium). Les principaux pesticides inorganiques sont des fongicides à base de soufre et de

cuiivre sous diverses formes, dont une des plus utilisées est la bouillie bordelaise ( $[\text{Cu}(\text{OH})_2]_x, \text{CaSO}_4$ ) employée pour traiter la vigne, les arbres fruitiers, la pomme de terre et de nombreuses cultures maraîchères (Calvet *et al.*, 2005).

### **I.2.1.2. Pesticides organo-métalliques**

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée d'un métal tel que le zinc ou le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate. Deux exemples de ces pesticides sont les mancozèbe (avec le zinc) et le manèbe (avec le manganèse) (Calvet *et al.*, 2005).

### **I.2.1.3. Pesticides organiques**

Ils sont nombreux et appartiennent aux diverses familles chimiques. On les appelle selon leur famille chimique, ou classe chimique suivant le manual des pesticides (1995), et c'est l'ensemble des molécules dérivées d'un groupe d'atomes qui constituent une structure de base.

## **I.2.2. Classification biologique**

Selon les organismes vivants visés, il existe plusieurs catégories de pesticides dont les principales sont :

- Les herbicides, pour lutter contre les adventices ou mauvaises herbes,
- Les fongicides, pour lutter contre les champignons et les moisissures,
- Les insecticides et acaricides, pour lutter contre les insectes et les acariens (Calvet *et al.*, 2005).

D'autres catégories comme les nématicides pour lutter contre les nématodes ravageurs des cultures sont de moindre importance en termes de volumes de vente et également en nombre de substance (Regnault et Roger, 2014).

### **I.2.3. Classification selon l'usage**

- a. **Pesticides des cultures** : ce sont les pesticides utilisés en agriculture pour maintenir un bon état sanitaire des sols et des végétaux, principalement des insecticides-acaricides, des fongicides et des herbicides.
- b. **Pesticides des bâtiments d'élevage** : il s'agit surtout d'insecticides et de bactéricides.
- c. **Pesticides des locaux de stockage des produits végétaux**, ce sont des insecticides et des fongicides.

- d. **Pesticides des zones non agricoles** : il s'agit principalement d'herbicides utilisés pour désherber les voies de circulation routière et ferrées, les aires d'aéroport et les aires industrielles.
- e. **Pesticides des bâtiments d'habitation** : ce sont des insecticides, des rodenticides, des bactéricides et des fongicides.
- f. **Pesticides de l'homme et les animaux** : il s'agit d'insecticides et de fongicides utilisés pour l'hygiène humaine et vétérinaire (Calvet *et al.*, 2005).

### **I.3. Impacts des pesticides**

L'utilisation accrue des différents types de pesticides dans le monde moderne, a conduit à beaucoup plus de risques de contaminations environnementales graves résultants de leurs utilisations. L'utilisation des pesticides soulève un certain nombre de préoccupations environnementales, y compris les risques pour la santé humaine et animale. Les aliments contaminés par des pesticides toxiques sont associés à de graves effets sur la santé humaine, car ils constituent la nécessité fondamentale aux fonctions primordiales à la vie humaine.

Plus de 98% des insecticides pulvérisés et 95% des herbicides, atteignent une destination autre que leurs espèces ciblées, y compris les espèces non ciblées ; l'air, l'eau et le sol. La toxicité des pesticides peut résulter de l'ingestion, de l'inhalation ou de l'absorption cutanée (Maksymiv, 2015).

#### **I.3.1. Impact des pesticides sur la santé humaine**

Les pesticides comprennent des douzaines de familles chimiques, avec des centaines d'ingrédients actifs, des milliers de formulations différentes et de nombreux effets indésirables connus ou soupçonnés sur la santé. En plus des ingrédients actifs, les pesticides contiennent également des composés chimiques connus sous le nom de « inertes » tels que les solvants, les surfactants et les conservateurs, qui peuvent avoir des effets toxiques sur la santé humaine (Blair *et al.*, 2014).

En principe tous les pesticides sont toxiques, mais leur degré de toxicité varie d'un produit à l'autre. Certaines études identifient une association positive entre l'exposition aux pesticides et la leucémie, le cancer du cerveau, le cancer de la prostate, le cancer du foie, le cancer pancréatique (Juc, 2008). D'autres recherches ont montré une morbidité et une mortalité significatives dans le monde entier à cause de la leucémie, les lymphomes, les sarcomes des tissus mous et les cancers du cerveau, des os et de l'estomac chez les agriculteurs, les pulvérisateurs et les travailleurs de la production des pesticides (Bolognesi et Merlo, 2011).

### **I.3.2. Impact sur l'environnement**

#### **I.3.2.1. Eau**

Comme il ne peut y avoir de vie sans l'eau, la présence des pesticides dans cette composante essentielle de tout être vivant est donc une préoccupation majeure. Il est parfois nécessaire de faire des applications directes des pesticides dans l'eau pour lutter contre la présence de larves de moustiques ou autre vecteurs et contre les mollusques. Cet usage contribue directement à la contamination de l'eau (Lund berg *et al.*, 1995).

A la surface des océans se trouve une mince couche de substances huileuse dans laquelle prolifèrent des bactéries, des algues, des protozoaires, des œufs de poissons et d'invertébrés marins. Les organochlorés ont tendance à s'accumuler dans cette zone, créant d'une part, des conditions toxiques pour tous les organismes qui y vivent, et d'autre part, contribuant aux conditions d'accumulation dans les chaînes trophiques. Les eaux de surface sont rarement polluées par un seul produit chimique, la pollution qui varie d'une zone à l'autre résulte en général de l'action conjuguée de divers produits chimiques. Ces produits peuvent interagir et leurs effets toxiques peuvent être cumulatifs ou synergiques. Il faut par conséquent, tenir compte de cet aspect complexe lors de l'évaluation du risque de contamination des eaux de surfaces par des pesticides (Lund berg *et al.*, 1995).

#### **I.3.2.2. Air**

L'air peut facilement être contaminé lors des opérations de pulvérisation. L'évaporation des gouttelettes pendant la pulvérisation d'émulsions peut provoquer la formation de particules microscopiques susceptibles d'être entraînées fort loin par les courants aériens. Selon Edwards (1986), il ne semble pas que l'exposition aux pesticides présents dans l'atmosphère entraîne de grave danger pour l'homme, sauf lorsque les pesticides sont utilisés dans un local fermé et non ventilé (OMS, 1991).

#### **I.3.2.3. Sol**

L'utilisation de pesticides au cours des années a permis d'augmenter les rendements des cultures et la production alimentaire. Cependant, l'utilisation intensive des pesticides entraîne certains problèmes environnementaux tels que la contamination des sols. Lorsque des pesticides sont appliqués pour détruire les ravageurs et les agents pathogènes, seulement 15% de la quantité appliquée atteint la cible, les 85% restants étant distribués dans les sols et l'air.

Les résidus de pesticides dans le sol peuvent se déplacer à partir de la surface lorsqu'ils se dissolvent dans les eaux de ruissellement, ou s'infiltrent dans le sol et finissent par atteindre les eaux souterraines (Erhunmwunse *et al.*, 2012).

#### **I.4. Le cuivre**

Le cuivre est présent dans la croûte terrestre à des concentrations comprises entre 25 et 75 mg/Kg, en moyenne 55 mg/Kg. Son modèle de l'abondance dans les roches montre la tendance à la concentration dans les roches ignées volcaniques et dans les sédiments argileux.

Le cuivre révèle une forte affinité pour le soufre, d'où ses principaux minéraux sont la chalcopryrite,  $\text{CuFeS}_2$  ; bornite,  $\text{CuFeS}_4$  ; chalcocite,  $\text{CuS}_2$  ; et covellite,  $\text{CuS}$ . Au cours de l'altération des sulfures de cuivre, Cu est incorporé dans l'oxyde et le carbonate de minéraux dans la cuprite,  $\text{Cu}_2\text{O}$  ; tenarite,  $\text{CuO}$  ; malachite,  $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$  ; et l'azurite,  $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$  sont les plus communs. Le cuivre est souvent associée à la sphalérite,  $\text{ZnS}$  ; pyrite,  $\text{FeS}$  ; et à la galène,  $\text{PbS}$ . Ses minerais sont généralement trouvés dans des roches ignées acides et divers dépôts sédimentaire (Hemeier, 2014).

Le cuivre est connu, extrait et utilisé par les humains depuis plus de 5.000 ans. C'est probablement le deuxième élément le plus important, après le fer, en ce qui concerne son utilité pour les humains. Les tuyaux de cuivre sont très répandus en plomberie, particulièrement pour les systèmes d'alimentation en eau domestique. Le cuivre est utilisé pour la production de fil électrique et dans la fabrication d'alliages comme le laiton et le bronze. Il est aussi employé pour l'électro-placage, en photographie, pour les toitures, comme catalyseur dans l'industrie chimique et pour l'élimination des mercaptans dans le raffinage du pétrole. Le cuivre est beaucoup utilisé dans les préparations de pesticides comme fongicide et comme agent antimicrobien, en particulier pour le traitement du bois et des sources d'approvisionnement en eau potable et en eau destinée à des fins récréatives (Massy *et al.*, 1973).

Le cuivre peut se présenter sous forme de métal, sous deux états d'oxydation : le cuivre (I) et le cuivre (II). Il existe également une forme instable du cuivre (III). En solution aqueuse, le cuivre se trouve surtout sous la forme de l'ion cuivre (II), selon le pH, la température, la présence de bicarbonate et de sulfure et la possibilité de former des ligands avec des espèces organiques comme les acides humiques, fulviques et aminés, certains polypeptides et des détergents (Perta, 2005).

## **I.5. Toxicité du cuivre**

Le cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) est un oligo-élément essentiel qui est vital pour la santé physique et mentale de l'homme. Mais en raison de la présence répandue de cuivre dans nos aliments, les tuyaux d'eau chaude, les comprimés de carences nutritionnelles et les pilules contraceptives augmentent les risques de toxicité de cet élément (Ashish *et al.*, 2013).

Le cuivre est un métal essentiel pour la croissance et le développement des plantes, bien qu'il soit également potentiellement toxique.

Au niveau cellulaire, le cuivre joue un rôle essentiel dans la signalisation des mécanismes de transcription des protéines, la phosphorylation oxydative et la mobilisation du fer. Cependant, à des concentrations élevées, la toxicité peut résulter l'inhibition d'activité enzymatique ou la fonction des protéines, l'induction d'une déficience des autres ions essentiels, et l'altération du processus de transport cellulaire (Yruela, 2005).

### **I.5.1. Impacte du cuivre sur la plante**

Le cuivre est essentiel pour la croissance des plantes et leurs processus métaboliques normaux, dont la formation de chlorophylle. Les plantes peuvent accumuler des quantités excessives de cuivre. Une accumulation peut entraîner une réduction du rendement des cultures, ainsi que des risques pour la santé des animaux et des humains. Dans le sol, une accumulation excessive de cuivre pourrait nuire à la microfaune et à la flore, inhibant ainsi les activités microbiennes bénéfiques à la croissance des plantes. La toxicité du cuivre chez les plantes ressemble aux symptômes décrits pendant la carence, c'est-à-dire le jaunissement du feuillage, la coloration anormalement foncée des racelles et la croissance rabougrie. Les concentrations de cuivre entre 5 et 20 mg/kg dans les tissus végétaux sont adéquates pour une croissance normale, tandis que les concentrations inférieures à 4 mg/kg sont considérées comme déficientes. Au-delà du seuil de toxicité supérieure à 20 mg/kg, le cuivre peut être phytotoxique (Oskarsson et Norrgren, 1998).

Les concentrations de cuivre dans les cellules doivent être maintenues à des niveaux bas car cet élément est extrêmement toxique en raison de ses propriétés redox élevées. La teneur moyenne en cuivre dans le tissu végétal est de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de poids sec, La concentration critique de cuivre libre dans les milieux nutritifs, varie de  $10^{-14}$  à  $10^{-16}$  M. Les plantes trouvent généralement un apport variable de cuivre dans le sol puisque les concentrations de sol varient

généralement de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  M, mais les plantes peuvent encore avoir besoin de solubiliser et de réduire ce métal (Yruela, 2005).

Chez des espèces des plantes sensibles comme le riz, le pourcentage de germination est affecté négativement et il n'y a plus que 20 % de germination pour une contamination de 2mM Cu.

### **I.5.2. Impact du cuivre sur l'eau**

Le seuil de tolérance en cuivre dans l'eau ne peut pas être solidement établi, mais il est recommandé généralement 1 à 2 mg/L. Les organismes aquatiques, surtout certaines espèces de crustacés, montrent la plus grande sensibilité à la toxicité par le cuivre. Les effets sur les poissons peuvent devenir significatifs à des teneurs aussi petites que 0.01 mg/L. L'apport de cuivre provenant des préparations pour nourrissons dépend fortement de la concentration de cuivre dans l'eau potable. Par exemple, la concentration de cuivre dans les préparations pour nourrissons sans apport d'eau du robinet était de 0,04 mg/L. Cependant, des effets gastro-intestinaux (à savoir ; nausées, vomissements, diarrhée et douleurs abdominales) ont été rapportés après exposition à des concentrations élevées de cuivre dans l'eau potable (Oskarsson et Norrgren, 1998).

La complication par des ligands organiques maintient des concentrations en ions  $\text{Cu}^{2+}$  libres aussi faibles que 10 à 13,5 M dans les eaux de surface côtières et océaniques, Plusieurs études montrent que des concentrations de cuivre libre dans l'intervalle de  $10^9$  à  $10^{12}$  M peuvent provoquer une inhibition de la croissance et un stress métabolique dans le phytoplancton estuarien, les cyanobactéries (Aydin et Tatlıdil, 2014).

Une valeur indicative provisoire de 31,48  $\mu\text{mol/l}$  (2 mg/mol) comme limite pour la concentration de cuivre dans l'eau potable a été proposée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme étant sûre, qui a déclaré également que pas plus de 10% de l'apport en cuivre devrait provenir dans l'eau potable (Olivars *et al.*, 1998).

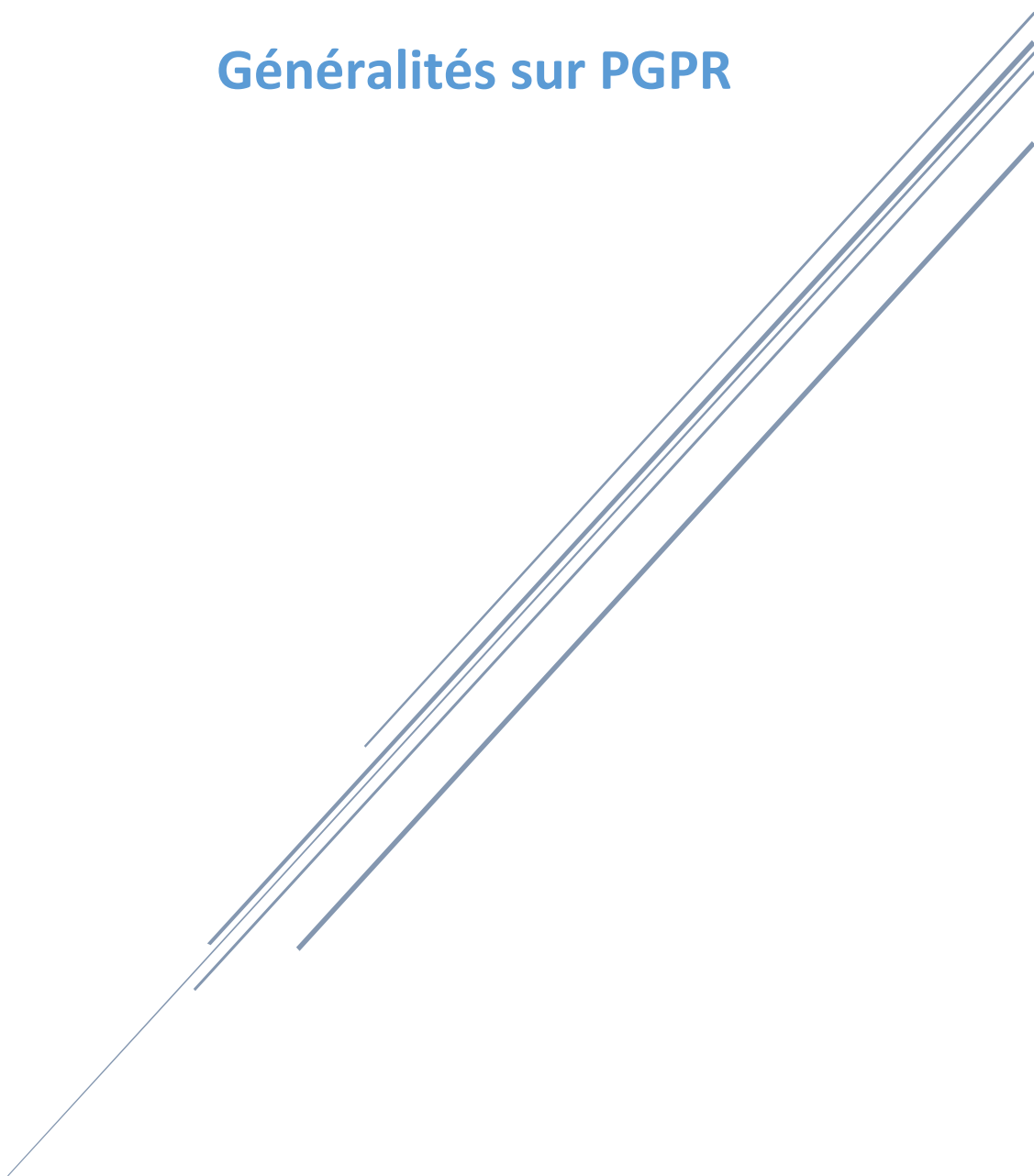
### **I.5.3. Impact du cuivre Sur la santé humaine**

Le principal effet de la toxicité du cuivre est supporté dans l'ordre par les érythrocytes, le foie puis les reins. L'hémolyse intra vasculaire apparaît 12 à 24 heures après l'ingestion de sulfate de cuivre. L'anémie hémolytique est causée par manque des hématies soit directement par endommagement de la membrane ou indirectement suite à une inactivation des enzymes (y compris la glutathion réductase) qui protègent contre le stress oxydatif. Les ions de cuivre

peuvent oxyder le fer de l'hémisphère pour former de la méthémoglobine. Ce sang perd sa capacité de transport d'oxygène. Dont une cyanose clinique et du sang brun chocolat peuvent être observés. Les patients avec cyanose montrent au moins 1/3 du sang à être la méthémoglobine (Ashish *et al.*, 2013).

# CHAPITRE II

## Généralités sur PGPR



## **Chapitre II. Généralités sur les PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria).**

### **II.1. Interactions rhizosphère-bactérie**

Le sol ne constitue pas un environnement homogène, mais une mosaïque d'habitats pour des populations microbiennes dont la rhizosphère représente un compartiment d'intérêt majeur (Marilley *et al.*, 2007).

La rhizosphère est un environnement où se passent des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes. 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 des activités microbiennes autour des racines des légumineuses (Rabhi, 2011). Elle a été définie comme une étroite zone de sol qui est influencée par des racines vivantes (Shekhar Nautiyal, 2008).

Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire. 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 ». Dans la rhizosphère « *sensu stricto* », existe ; 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) (Rabhi, 2011).

Dans le sol, l'activité microbienne est intense, en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol, les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines, sont nécessaires à leur métabolisme (sucres, acides aminés, acides organiques, hormones...). Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Adam, 2008).

Les PGPR sont des microorganismes non pathogènes et bénéfiques pour la santé et la nutrition des plantes (Kloepper *et al.*, 1980). En 1978, Kloepper et Schroth sont les premiers qui ont défini les PGPR comme des bactéries qui colonisent les racines des plantes (Siddiqui, 2006 ;

Stanzin *et al.*, 2017). Chez certaines espèces de PGPR, la promotion de la croissance des plantes domine avec la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate et la production de phytohormones telles des auxines dont l'acide indole acétique (AIA), des cytokinines et des gibbérellines. En outre, les sidérophores chélatant le fer, les antibiotiques et les cyanures d'hydrogène, sont également susceptibles d'être produites par des souches de PGPR (Bhattacharyya et Dhruva, 2012).

De façon générale, les PGPR augmentent la surface d'échange par un développement global du système racinaire. Plus précisément, elles stimulent l'élongation des poils racinaires, augmentent le nombre et la taille des racines secondaires, mais peuvent réduire la taille de la racine primaire (Bresson, 2013).

## **II.2. Rôles des PGPR**

### **II.2.1. Phytostimulation (effet direct)**

#### **II.2.1.1. Fixation d'azote**

L'azote (N) est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes. Bien qu'il y ait environ 78 % de N<sub>2</sub> dans l'atmosphère, il n'est pas disponible pour les plantes en croissance (Muness, 2013).

Le processus de la fixation biologique d'azote par des interactions symbiotique ou non symbiotique entre le microbe et les plantes relève uniquement du domaine procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Rabhi, 2011 ; Sushanto *et al.*, 2017).

Les bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère sont de plus en plus utilisées dans les cultures non légumineuses comme la betterave sucrière, la canne à sucre, le riz, le maïs, et le blé. Parmi les bactéries non-symbiotiques fixatrices de l'azote les plus importantes appartiennent à plusieurs bactéries ; *Azoarcus* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter* (Cherif, 2014).

### II.2.1.2. Solubilisation de phosphate

Le phosphore (P), deuxième élément nutritif important pour la croissance des plantes après l'azote, est abondamment disponible dans les sols sous forme inorganique et organique. Le P insoluble est présent sous la forme d'un minéral inorganique tel que l'apatite ou sous forme de plusieurs formes organiques comprenant l'inositol phosphate, les phosphomonesters et les phosphotriesters. Pour surmonter la carence en P dans les sols, il existe des applications fréquentes d'engrais phosphatés dans les champs agricoles (Munees, 2013).

Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques. L'acide gluconique et l'acide-2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés. L'acide glycolique, l'acide oxalique, l'acide malonique et l'acide succinique, ont également été identifiés.

Certaines souches sont capables de produire en plus ces derniers d'acides lactique, l'acide isovalérique, l'acide isobutyrique et l'acide acétique. La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel de phosphate conduit à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique. La libération des groupements phosphates liés à la matière organique est assurée par l'action des phosphatases.

Parmi les communautés bactériennes du sol, les genres ; *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas* spp. *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. sircalmous* sont les plus performantes dans la solubilisation des phosphates (Cherif, 2014).

*Pseudomonas* spp. libèrent dans le sol l'enzyme phytase. Cette enzyme est responsable de la libération du phosphate, tel que l'inositol hexaphosphate. Dans des essais pratiqués au Québec en champ ouvert, l'inoculation des *Pseudomonas* a généré une augmentation du rendement du champ de maïs étudié. Dans un autre essai, cette même rhizobactérie a permis une augmentation du rendement des cultures de laitue de 18 % (Benmati, 2014).

### II.2.1.3. Production de sidérophores

Les sidérophores sont de petites molécules organiques produites par des microorganismes dans des conditions limitant le fer pour améliorer la capacité d'absorption.

Les recherches sur les sidérophores ont attiré beaucoup d'attention au cours des 10 dernières années en raison de leurs caractéristiques uniques d'extraction des ions de fer. Les *Pseudomonas sp.*, En tant que PGPR, utilisent les sidérophores produits par d'autres microbes présents dans la rhizosphère pour satisfaire leurs besoins en ions. Plus spécifiquement, *Pseudomonas putida* utilise des sidérophores hétérologues produits par d'autres microorganismes pour améliorer le niveau de fer disponible dans l'habitat naturel. Un sidérophore puissant joue un rôle important dans l'absorption de fer par les plantes en présence d'autres métaux, tels que le Nickel et le Cadmium. Comme les PGPR peuvent produire des sidérophores, ils constituent un atout majeur pour fournir à la plante la quantité de fer requise (Sushanto *et al.*, 2018).

Les plantes assimilent le fer des sidérophores bactériens au moyen de différents mécanismes, par exemple, l'absorption directe des complexes sidérophore-Fer, ou par une réaction d'échange de ligands. De nombreuses études sur la stimulation de la croissance des plantes vis-à-vis de l'absorption de Fer médiée par les sidérophores à la suite d'inoculations de rhizobactéries produisant des sidérophores ont été rapportées.

Crowley et Kraemer (2007) ont mis en évidence un système de transport du Fer-sidérophore dans les plants d'avoine et déduit que les sidérophores produits par les microorganismes rhizosphériques fournissent du fer à l'avoine, qui possède des mécanismes d'utilisation des complexes fer-sidérophore. De même, le complexe Fer-pyoverdine synthétisé par *Pseudomonas fluorescens* a été absorbé par *Arabidopsis thaliana*, ce qui a entraîné une augmentation du fer à l'intérieur des tissus végétaux et une amélioration de la croissance des plantes.

Récemment, Sharma *et al.* (2003) ont évalué le rôle de la souche de *Pseudomonas* productrice de sidérophores PGPR sur la nutrition du fer de *Vigna rayonnee*, après 45 jours, les plantes ont montré une diminution des symptômes chlorotiques et la teneur

en fer, en chlorophylle (a) et en chlorophylle (b) a augmenté dans les plantes inoculées avec la souche PGPR comparativement au témoin (Munees Mulugeta, 2014).

#### **II.2.1.4. Production de phytohormones**

Il existe des régulateurs de la croissance végétale telle que les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique. L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue. L'AIA joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants. Il est produit par un grand nombre des bactéries tels *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes piechaudii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., et *Comamonas acidovorans* spp. Les cytokinines et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation et le développement de la partie aérienne (Rabhi, 2012).

##### **a. Acide Indole-3-acétique (AIA)**

Cette phytohormone est impliquée dans l'initiation de la division cellulaire au niveau des racines, et de leurs élargissements. Communément produite par les rhizobactéries. Les rhizobactéries produisant l'AIA sont connues pour leurs capacités à augmenter la croissance et la longueur des racines. Cet effet résulte en une surface racinaire plus grande, et une accessibilité pour plus de nutriments pour la plante. Patten et Glick (2002), ont rapporté le rôle de l'AIA produit par *Pseudomonas putida*, chez la plante hôte, dans le développement de son système racinaire (Mezzache, 2012).

L'AIA bactérienne peut desserrer les parois des cellules végétales et, par conséquent, favorise une exsudation croissante des racines qui fournit des nutriments supplémentaires pour soutenir la croissance des bactéries de la rhizosphère. Puisque les communautés microbiennes endophytes proviennent du sol et de la rhizosphère, l'AIA bactérienne peut attirer plus de bactéries à la rhizosphère en augmentant la quantité d'exsudation racinaire. Étant donné que l'AIA bactérienne stimule le développement du système racinaire de la plante hôte, les isolats producteurs d'AIA peuvent améliorer l'aptitude des interactions plante-microbe (Hassan *et al.*, 2015).

## **b. Cytokinines**

Les cytokinines forment une classe de phytohormones qui stimulent la division cellulaire, l'élargissement et le développement des tissus. Ce sont des signaux impliqués dans la médiation du stress environnemental des racines en vers les parties supérieures de la plante (Mezzache, 2012).

## **c. L'éthylène**

L'éthylène est sous forme gazeuse, il est connu pour être lié aux des blessures, parceque sa production dans la plante peut être induite par n'importe quel perturbation physique ou chimique des tissus (Salisbury, 1994). Parmi ses nombreux effets sur la croissance et le développement de la plante, la production d'éthylène peut causer l'inhibition de la croissance des racines. Glick *et al.* (1998) ont émit une théorie selon laquelle le mode d'action de certains PGPR serait par l'intermédiaire d'une AAC-désaminase. Cette enzyme clive l'AAC (Amino-cyclopropane-1-carboxylate) précurseur immédiat de l'éthylène. L'AAC-désaminase diminuerait la production de l'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 destimuler l'élongation des racine. Cette stimulation de la croissance est aussi exprimée dans des situations de stress, tels que les inondations, ou encore dans les sols contaminés par les métaux lourds (Mezzache, 2012).

## **II.2.2. Phytoprotection (effet indirect)**

### **II.2.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments**

Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova *et al.*, 2005). Les PGPRs sont présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas, Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque et les autres propriétés comme la mobilité (présence des flagelles), le chimiotactisme, la capacité de

synthétiser des vitamines et des macromolécules et l'utilisation des composés excrétés par les racines renforçant la colonisation racinaire (Lugtenberg, Kamilova, 2009).

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les microorganismes ont la capacité de synthétiser des sidérophores. Ces composées ont une grande affinité pour le  $Fe^{3+}$ . En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour les champignons pathogènes (Adam, 2008).

#### **II.2.2.2. Antibiose**

L'antibiose consiste l'inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibactériens.

Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels  $\beta$ -1,3-gluconase, exo et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Rabhi, 2011).

Chez *Pseudomonas*, d'autres molécules antifongiques comme le HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliquées dans le biocontrôle. Une étude récente a démontré que l'espèce de la plante hôte a une influence significative sur la dynamique, la composition et l'activité des espèces antagonistes indigènes spécifiques de *Pseudomonas* spp. (Adam, 2008).

### **I.3. Les *Pseudomonas* PGPR**

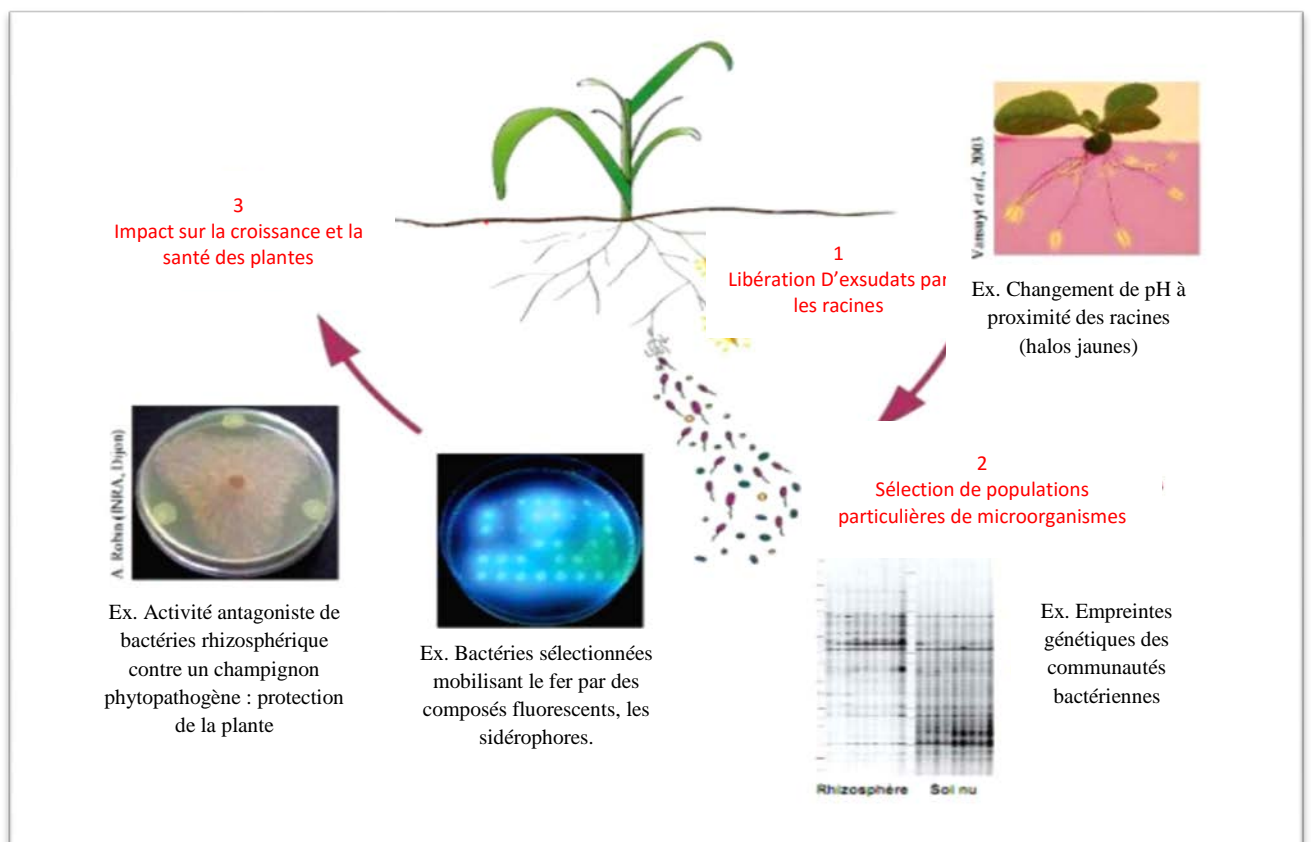
Les *Pseudomonas* font partie du phylum proteobacteria classe des Gamma proteobacteria, ordre des *Pseudomonales*. Ce sont des bacilles à coloration de Gram négative, droits et fins, aux extrémités arrondies d'une taille moyenne de 2 sur 0,5  $\mu$ m.

Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche ou lophotriche, elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère des plantes. Elles sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes, ce qui réduit les sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent leur croissance (Benmati, 2014).

Les PGPR du genre *Pseudomonas* sont considérés comme le groupe le plus important dans la promotion de la croissance et la lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes

(Saranraj *et al.*, 2014). Les *Pseudomonas* ont conféré plusieurs mécanismes primaires comme stratégies de biocontrôle, y compris la production d'antibiotiques et de métabolites secondaires, d'enzymes dégradant les parois cellulaires, ainsi que la production de cyanure d'hydrogène (HCN) et de sidérophores (Pankaj *et al.*, 2016). Dans des études récentes trois souches de *Pseudomonas* ont été identifiées comme PGPR ; *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* et *P. aeruginosa*.

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. Différentes espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescentes ont été rapportés à la fois comme PGPR, et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes. Ces capacités antagonistes de PGPR, sont dues aux mécanismes directs et indirects (fig.1) (Mezaache, 2012).



**Figure 01.** Représentation schématique décrivant les interactions des plantes-microorganismes dans la rhizosphère (Mezaache, 2012).

### II.3.1. *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* spp. passes parmi les espèces bactériennes favorisant la croissance des plantes. Des souches spécifiques de ce groupe ont récemment été utilisées comme inoculant de semences sur des plantes cultivées pour favoriser la croissance et augmenter les rendements. De plus, le genre *Pseudomonas*, colonisent rapidement les racines de la pomme de terre, de la betterave sucrière et du radis et provoquent un rendement statistiquement significatif, ainsi, ont montré une grande capacité de production d'AIA, de solubilisation du phosphate et de production de sidérophores (Saranraj *et al.*, 2014). *Pseudomonas fluorescens* peut produire des régulateurs de croissance des plantes (phytohormones) impliqués efficacement dans l'élongation des plantes. Le phosphore est également un élément limitant pour les plantes. Il ne peut être absorbé sauf si les formes solubles sont fournies par des rhizobactéries, comme les *Pseudomonas fluorescens*, soit par la minéralisation du phosphate (par les phosphatases), ou par l'effet des acides organique. Certains *Pseudomonas* produisent des enzymes lytiques, qui peuvent lyser une partie des parois cellulaires de certains champignons phytopathogènes. Les plus connus sont ; les chitinases, les cellulases, les protéases et les  $\beta$ -1,3 glucanases (Arif *et al.*, 2015).

### II.3.2 *Pseudomonas putida*

Les souches de *Pseudomonas putida* peuvent utiliser les sidérophores hétérologues produits par les microorganismes de la rhizosphère pour améliorer le niveau de fer disponible dans leur habitat naturel (Saranraj *et al.*, 2014). Ils ont été sélectionnés comme PGPR en raison de leurs capacités importantes à synthétiser les auxines, les sidérophores et à solubiliser le phosphate (Rojas-Tapias *et al.*, 2012). Meliani *et al.* (2012), ont indiqué que *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* produisent et libèrent de l'acide indole-3-acétique (AIA) avec des taux de 89  $\mu\text{g/L}$  et 116  $\mu\text{g/L}$  respectivement. Les quantités élevées d'AIA excrétées par *P. putida* étaient les plus constantes dans l'amélioration de la croissance des plantes à travers le calcul de l'indice Vigor. D'autre part, les consortiums d'inoculum mixtes de ces espèces ont

montré que *P. fluorescens* et *P. putida* présentaient une capacité de lutte biologique accrue contre *Fusarium oxysporum* f. sp (Meliani *et al.*, 2012).

## Chapitre III : Interactions *Pseudomonas*-cuivre

### III.1. Généralité

Les métaux lourds sont utilisés pour leur propriété anti-infectieuse. Ils sont capables à une certaine concentration de diminuer la charge des micro-organismes, parmi les quelles ; l'argent (Ag), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le mercure (Hg), le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) (Luc Masson, 2015).

Le cuivre l'un des premiers métaux utilisés pour fabriquer des outils et des armes. Certains sels de cuivre ont également employé comme agents thérapeutiques pendant plus de 2000 ans. Le sulfate de cuivre a servi médicalement d'émétique, mais constituait aussi une arme populaire en tant que poison. Il à joué également le rôle d'abortif en France au 19<sup>e</sup> siècle (Véronique, 2007).

Actuellement, le cuivre est utilisé en industrie pharmaceutique, dans des applications allant des antiseptiques et antifongiques aux produits de soins et d'hygiène (crèmes, ampoules d'oligo- éléments...) (Aurea, 2017).

Le cuivre, est un produit efficace homologué dans la lutte biologique contre le mildiou et la nécrose bactérienne. Il est également reconnu pour ses effets secondaires sur le black rot. Alors c'est un produit très précieux pour les viticulteurs en lutte biologique. Et donc il est pointé du doigt par l'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). Il est accusé de toxicité envers les micro-organismes du sol et les organismes aquatiques.

Dans l'attente d'une alternative aussi efficace, nous devons l'utiliser avec beaucoup de précaution. Nous verrons donc comment il est possible de réduire les doses tout en maintenant une protection efficace (Berriau, 2012).

Les produits à base de cuivre, sont utilisés pour lutter contre certaines mycoses causées par des ascomycètes (tavelure du pommier...) ou des oomycètes (mildious) (INRA, 2018).

Les surfaces faites de cuivre et son alliage offrent une nouvelle approche dans la réduction des contaminations bactériennes. Le cuivre métallique a démontré une activité antimicrobienne à large spectre. Bien que l'utilisation de cuivre pur provoque une extermination plus rapide des pathogènes, plusieurs de ses alliages constitués à au moins 60 % de cuivre (comme le laiton et le bronze) sont aussi efficaces et offrent une multitude de propriétés

améliorées, comme la force et la durabilité. Désignées collectivement « cuivre antimicrobien », les surfaces produites à partir de cuivre et ses alliages visent à fournir une action antimicrobienne supplémentaire entre les moments de nettoyage réguliers de l'environnement ou des surfaces à portée de mains. La plupart des détergents et des désinfectants utilisés en milieu hospitalier n'affecteront pas l'efficacité du cuivre antimicrobien, à l'exception des produits qui contiennent des chélateurs d'ion métallique, comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).

Des tests en laboratoire montrent que les surfaces de cuivre antimicrobiennes tuent 99,9% des bactéries spécifiques (incluant *staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, et Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). D'autres données laissent croire que le cuivre pourrait aussi être efficace contre d'autres bactéries, virus, et pathogènes fongiques (Agence canadienne des médicaments et des technologies de la santé, 2015).

### III.2. Effet antibactérien du cuivre

Le cuivre est considéré comme un métal lourd plus utilisé pour prévenir ou traiter des proliférations de microorganismes, en particulier dans des endroits souvent en contact avec la peau humaine, comme les poignées de porte. En raison de l'accès facile au cuivre, ce dernier est important pour prévenir l'infection des blessures crues, traitements des brûlures, les maladies de la peau, les marques cutanées sur le cou. D'ailleurs, il peut supprimer les pathogènes qui représentent un danger imminent pour la santé humaine. Il s'agit d'abord du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* ainsi que *Legionella* (Konieczny et Rdzawski, 2012).

La sécurité alimentaire est une question brillante en matière de santé humaine au cours des dernières décennies. Par conséquent, Les légumes sont la principale source d'exposition humaine aux métaux lourds contribuent à environ 90% de l'apport total de métal, tandis que les 10% restants proviennent des contacts cutanés et de l'inhalation de poussières contaminées (khan *et al.*, 2015).

Bien que les antibiotiques modernes aient largement remplacés les thérapeutiques à base de métaux lourds dans le traitement des infections, des recherches intenses ont été menées pour

l'utilisation des complexes contenant des métaux lourds (Platine, cuivre, zinc et argent) dans le traitement des cancers.

Les domaines dans lesquels peuvent agir pour diminuer le risque d'infections nosocomiales sont vastes. Particulièrement ; le traitement de l'air, le traitement de l'eau (CCBDA, 2007), la stérilisation du matériel médical, l'antisepsie du personnel et des visiteurs et la désinfection des surfaces environnementales, il peut être cité le mobilier, le sol, les accessoires comme les barres de maintien ou encore les murs. Celles-ci jouent un rôle important dans la transmission de pathogènes. C'est pourquoi les améliorations au niveau du nettoyage et de la désinfection ont pu diminuer le nombre de transmissions de ces microorganismes (Luc Masson, 2015).

### **III.3. Effet antifongique du cuivre**

Le cuivre est utilisé, dans l'agriculture et en particulier l'agriculture biologique (AB), pour contrôler diverses maladies fongiques, principalement sur la vigne, en productions fruitières et en cultures légumières. Il constitue la seule matière active à effet fongicide fort à large gamme d'action (INRA, 2018).

Le cuivre est utilisé dans les cultures biologiques de pommes de terre pour combattre le mildiou *Phytophthora infestans*, il agit par contact en empêchant la germination des spores (Jean, 2001).

La bouillie bordelaise, mélange de sulfate de cuivre hydraté et de chaux, est depuis sa découverte à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle classé comme le principal fongicide contre le mildiou de la vigne (Coulibaly *et al.*, 2017)

Dans les zones où les pertes annuelles dues à la pourriture brune sont supérieures à 25%, l'utilisation des fongicides peut renforcer l'efficacité sanitaires des récoltes. Pour lutter contre la maladie, utiliser au choix recommandé de l'un des fongicides indiqués dans le tableau (01).

**Tableau 01.** Quelques fongicides homologués pour la lutte contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer en Cote d'Ivoire (Coulibaly *et al.*, 2017).

Type de fongicide	Nom commercial	Matière active	Intervalle entre 2 traitements
<b>Fongicides de contact</b>	Callicuivre	Oxychlorure de cuivre	14jours
	Caocobre 50 WG	Oxyde de cuivre	
	Champion77 WP, Funguran-OH 50 WP, Kocide 2000, Metalms 72WP	Hydroxyde de cuivre	
	Nordox 75 WG	Oxyde de cuivre	
<b>Fongicides systémiques</b>	Callomil plus 72 WP	Oxydes de cuivre+ métalaxyl	21jours
	Ridomil Gold plus 65WP	Mefenoxam (Metaxyl- M)+hydroxyde de cuivre	

### III.4. Mécanisme de toxicité de cuivre

Lorsque la concentration en cuivre dans les organismes est trop importante, il interfère avec de nombreux processus physiologiques. Cette toxicité biochimique découle de la haute réactivité de cet élément. Il est capable de se lier fortement aux molécules riches en électrons, en raison de ses propriétés oxydo-réductrices. Cette réactivité peut entraîner par exemple une dépolarisation accompagnée d'un dysfonctionnement physiologique des récepteurs et des transporteurs moléculaires cellulaires, ou encore sa fixation sur des sites actifs de macromolécules

$$\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{OH} + \text{OH}^- \quad (\text{ADN...}) \text{ contenant des thiols}$$

(-SH), des carboxyles (-COO<sup>-</sup>), ou des noyaux imidazoles (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>) Ainsi, en se fixant aux groupements thiols des protéines des membranes cellulaires, il provoque la peroxydation des lipides insaturés. On peut également observer la production de radicaux libres suivant la réaction suivante (réaction de Fenton) :

La production excessive de ces radicaux libres peut entraîner des réactions d'oxydoréduction en chaîne (stress oxydant) qui aboutissent à la perte de l'intégrité cellulaire. Lors de la réaction de photosynthèse, l'excès de cuivre perturbe le photosystème II, soit par insertion dans la Phéo (molécule de chlorophylle sans atome central de magnésium), soit par substitution des ions Mg<sup>2+</sup> dans la chlorophylle elle-même (Thomas, 2011).

### **III.5. Résistance des Pseudomonas au cuivre**

#### **III.5.1. Stratégies de résistances des Pseudomonas au cuivre**

Les bactéries sont capables de réduire, oxyder, séquestrer, volatiliser ou dégrader les polluants. L'exploitation de leurs extraordinaires capacités métaboliques permet d'envisager leur utilisation dans des procédés efficaces et peu coûteux de bioremédiation des eaux ou sols contaminés, notamment par des métaux traces ou des radionucléides toxiques (Ferret, 2012).

Les bactéries ont développé différentes stratégies de résistances (fig. 02) face à des concentrations toxiques de métaux :

##### **a. L'exclusion par perméabilité membranaire**

Les bactéries forment naturellement un « revêtement » de polysaccharides extracellulaires, absorbant les ions métalliques et les empêchant d'interagir avec les composés cellulaires vitaux. *Pseudomonas putida* peut ainsi lier 100% du Cd<sup>2+</sup> ajouté dans le milieu de culture, à une concentration de 2,5 mg.L<sup>-1</sup>.

##### **b. L'efflux actif**

Il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé par les microorganismes. Ils utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'ion Cu<sup>2+</sup> est exporté par un mécanisme impliquant 4 protéines séquestrant le cuivre dans le périplasme.

##### **c. La séquestration intracellulaire**

Elle permet la séquestration des métaux au sein du cytoplasme pour éviter l'exposition des métaux au sein du cytoplasme afin d'éviter l'exposition des composant cellulaire essentiels aux métaux. Les ions  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  sont les métaux les plus fréquemment séquestrés. Cette stratégie a été mise en évidence chez *Pseudomonas putida* pour le  $\text{Cd}^{2+}$  par la synthèse de trois protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines.

#### d. La détoxification enzymatique

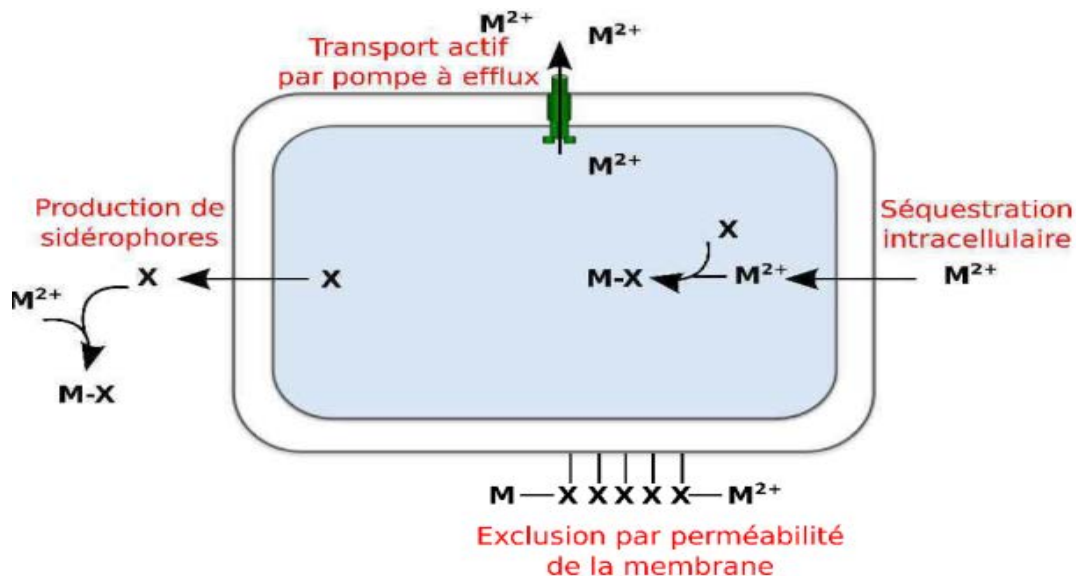
Elle fait appel à des gènes impliqués dans la réduction des composés métalliques.

#### e. La réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des métaux

Cette protection se déroule par mutation, sans altérer les fonctions de bases de la cellule.

#### f. La production de sidérophores

En liant le métal dans le milieu extracellulaire, le sidérophore diminue la concentration en métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité. Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* produisant la pyoverdine et la pyochéline apparait plus résistante aux métaux qu'une souche ne synthétisant pas de sidérophore (Ferret, 2012).



**Figure 02.** Mécanismes de résistances bactériens aux métaux (Haferburg, Kothe, 2007).

**X** : constituants cellulaires interagissant avec les cations métalliques.

**M** : cations métalliques.

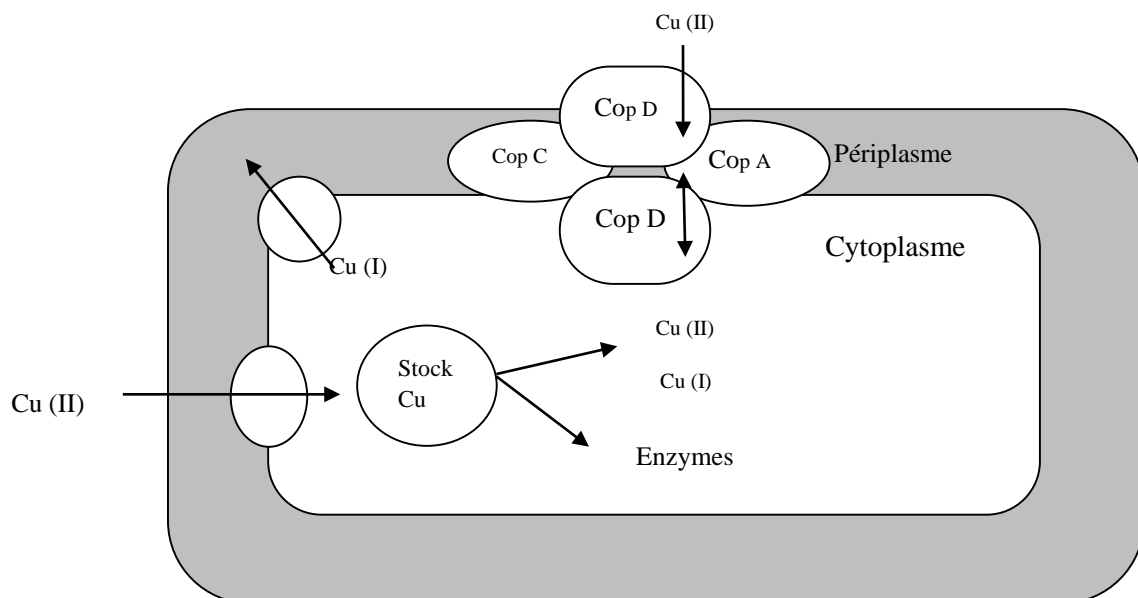
### III.5.2. Mécanisme génétique de la résistance

*Pseudomonas syringae* renferme un groupe de pathogènes des plantes cultivées, produisant des taches et des auréoles sur les feuilles. L'emploi courant d'agents antifongiques

contenant du cuivre comme la bouillie de bordelaise a facilité l'apparition d'espèces résistantes au cuivre. Une des premières études détaillées a concerné un *Pseudomonas syringae* isolé de culture de tomates et porteur du plasmide Ppt23D. La résistance au cuivre des espèces bactériennes est souvent conférée par un plasmide de porteur de gènes qui se retrouvent sous une forme très similaire dans les *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et autres. Les gènes de structure sont dans l'opéron *cop ABCD* accompagné des deux gènes n'ont rien à voir avec ceux de la résistance au cuivre décrits chez *E. hirae* (Pelmont, 2005).

Les quatre protéines Cop A, B, C, D fabriquées grâce au plasmide viennent en renfort des facteurs déjà codé par la bactérie sur son chromosome, spécialisés dans le transport du cuivre et son stockage éventuel à l'intérieur du cytoplasme. Les gènes plasmidiques sont groupés en opéron *cop ABCD*. La protéine Cop D est membranaire, CopA et CopC sont périplasmiques, Cop B serait associée à la membrane externe.

La figure (03) résume le transport du cuivre de façon hypothétique, qui mis en jeux des facteurs membranaires de transport et de stockage codés par le chromosome, et l'appareil de résistance Cop codé par le plasmide (Pelmont, 2005).



**Figure 03.** Transport du cuivre et résistance.



## Chapitre V : Résultats et Discussion

### V.1. Isolement et purification des isolats

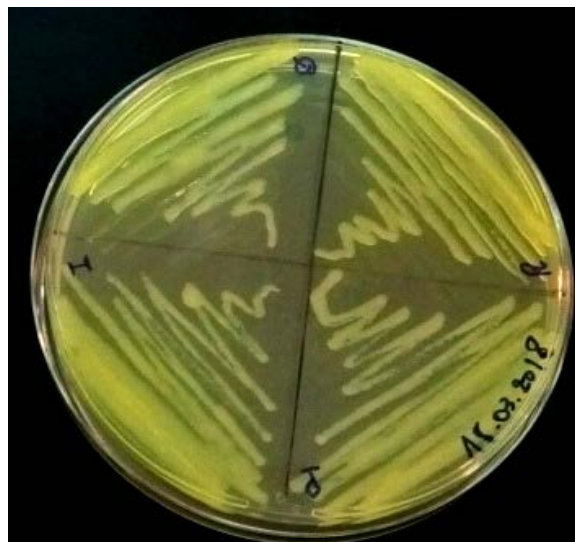
Dans ce travail nous avons examiné deux échantillons de sol rhizosphérique. Les méthodes de caractérisation bactériologique décrites ont permis une identification préliminaire des isolats des biotopes cités (sol + racines de l'orge des rats « *Hordeum murinum* »). La sélection basée sur la production d'un pigment jaune - vert fluorescent. La production de ce dernier et les caractères macromorphologiques sur le milieu King B, nous ont permis d'obtenir 40 isolats bactériens.

Les résultats obtenus après une purification, ont permis de retenir 29 isolats de *Pseudomonas* fluorescents repartis en deux groupes (groupe 01 ; 16 isolats du site d'Oued El Kheir et groupe 02 ; 13 isolats du site de Sidi Lakhdar).

### V.2. Identification des bactéries isolées et purifiées

#### V.2.1. Examen macroscopique

Sur le milieu gélosé King B la présence des colonies de 0,6 - 1 mm de diamètre de forme renflée, foncée, circulaire, muqueuse et homogène, avec une pigmentation fluorescente de couleur jaune verdâtre (fig. 09). Ces mêmes caractéristiques ont été constatées chez les *Pseudomonas* fluorescent par Idder (2013).



**Figure 09.** Aspect macroscopique de *Pseudomonas* fluorescent sur gélose King B, isolé à partir du sol rhizosphérique.

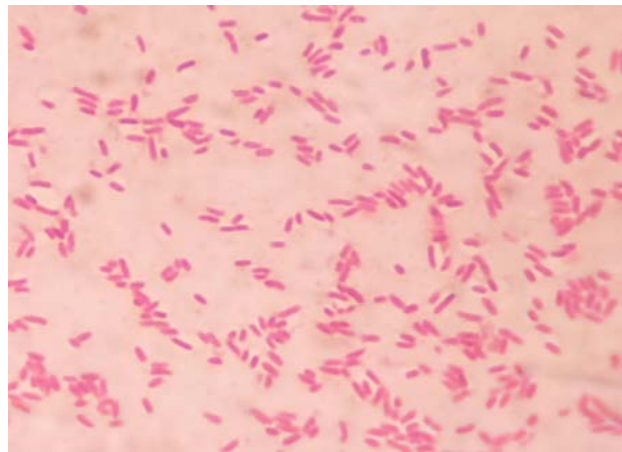
## V.2.2. Examen microscopique

### V.2.2.1. Examen à l'état frais

Les bactéries examinées à l'état frais, apparaissent mobiles sous microscope (tableau 03). La présence des flagelles polaires permet à ces bactéries de se déplacer facilement dans leurs environnements (Stanzin, 2017).

### V.2.2.2. Coloration de Gram

Sous microscope optique et à émergence au grossissement X100, la coloration de Gram réalisée à partir des colonies distinctes, montrent la présence des cellules de forme bacillaire et de couleur rose est donc a coloration de Gram négative (fig. 10).



**Figure 10.** Aspect microscopique de *Pseudomonas fluorescens* (X1000).

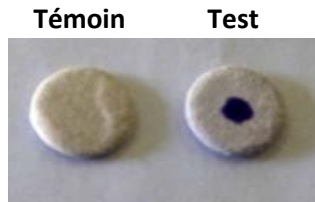
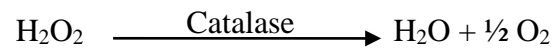
## V.2.3. Test biochimique

### V.2.3.1. Recherche de l'oxydase

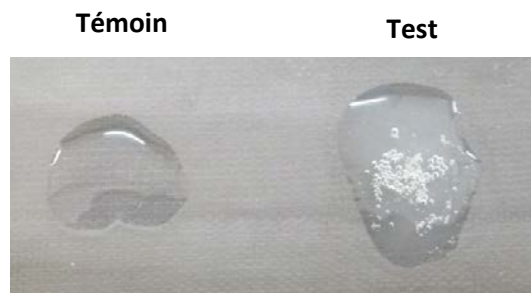
La mise en évidence d'un cytochrome oxydase qui oxyde le cytochrome c présent dans la chaîne respiratoire, grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction (N-méthylé du paraphénylène diamine), montre que les bactéries testées sont oxydase positive (fig. 11) se traduit par l'apparition d'une couleur violette très foncée (Delarras, 2014).

### V.2.3.2 Recherche de la catalase

Chez les bactéries isolées, le dégagement du gaz sous forme de bulles d'air, dû à la dégradation de l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène comme indique la formule (Delarras, 2014) citée ci-dessous, montre la présence d'une catalase positive (fig.12) :



**Figure 11.** Test de l'oxydase.



**Figure 12.** Test de la catalase.

#### V.2.4. Mise en culture des *Pseudomonas* à 4°C et 42°C

La culture positive des boîtes soumises à une incubation à 4°C indique que tous les isolats appartiennent au genre *Pseudomonas* fluorescents (tableau 03). Les *Pseudomonas* fluorescents ne poussent pas à la température 42°C mais se développent facilement dans à 4°C (Djibaoui et Bensoltan, 2005).

**Tableau 03.** Caractères morphologique, biochimique des *Pseudomonas* fluorescents.

Isolats	Coloration de Gram	forme	mobilité	oxydase	catalase	Croissance à 42°C	Croissance à 4°C
A	-	Bâtonnet	+	+	+	-	+
B	-		+	+	+	-	+
E	-		+	+	+	-	+
G	-		+	++	+	-	+
H	-		+	+	+	-	+
I	-		+	++	+	-	+
J	-		+	++	+	-	+
K	-		+	++	+	-	+
L	-		+	+	+	-	+
N	-		+	+++	+	-	+
Q	-		+	+++	+	-	+
R	-		+	+	+	-	+
S	-		+	++	+	-	+
1	-		+	+	+	-	+
2	-		+	+	+	-	+
3	-		+	-	+	-	+
9	-		+	+	+	-	+
10	-		+	++	+	-	+
11	-		+	++	+	-	+
12	-		+	-	+	-	+
14	-		+	+	+	-	+
15	-		+	+	+	-	+
17	-		+	+	+	-	+
19	-		+	+	+	-	+
21	-		+	+	+	-	+
22	-		+	++	+	-	+
25	-		+	+	+	-	+
26	-		+	-	+	-	+
28	-	+	+	+	-	+	

(-) : négative

(+) : positive

(++) : Fortement positive

(+++): extrêmement positive

### V.3 Test de la résistance des *Pseudomonas* fluorescents au cuivre

Les résultats de la croissance des *Pseudomonas* sur gélose nutritive additionnée de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à différentes concentrations (0,5 - 5 mM) sont indiqués dans le tableau 04.

**Tableau 04.** Effet du sulfate de cuivre sur la croissance des isolats de *Pseudomonas* fluorescents

Isolats	Concentrations du sulfate de cuivre (mM)									
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
A	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
I	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
L	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
N	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
G	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
R	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
S	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
2	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
12	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
14	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
15	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
21	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
22	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
25	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) absence de la croissance ; (+) : Faible croissance ; (++) : croissance abondante.

Tous les isolats ont poussés abondamment dans le milieu de culture à 0,5 mM, dont 19 bactéries ont été développées sur la gélose nutritive additionnée de 1 mM de sulfate de cuivre hydraté. A cette même concentration d'autres bactéries étudiées (10 isolats), ont montrées une faible croissance sur ce milieu. Par ailleurs à la concentration de 1,5 mM, nous avons constaté le développement des isolats K et 14.

Des travaux scientifiques réalisés par Andersen *et al.* (1991) ont montrés que les souches de *Pseudomonas syringae* tolères des concentrations de cuivre allons de 0,3 mM jusqu'au 1,2 mM. Par ailleurs, Aillo *et al.* (2015) ont montré que les souches sensibles se développaient uniquement sur de milieu additionné de 0,40 - 0,80 mM de sulfate de cuivre : (de faible résistance avec 1 - 1,6 mM), (résistantes avec, 1,8 - 2,4 mM) et (très résistants avec 2,6 - 3,2 mM).

Dans notre expérimentation les isolats les plus résistants au cuivre montrent une couleur Jaune très intense.

Cependant, des études de recherche réalisées par Ramos et Rosato (1996) montrent que la souche *Xanthomonas* (484) présentait une couleur ocre plus intense, lorsqu'elle était cultivée sur du milieu additionné de cuivre, ce qui suggérait une accumulation de ce métal.

Selon Altimira *et al.* (2012), cinq bactéries isolés à partir de sols pollués au cuivre ont montré une résistance élevée au cuivre et une résistance à d'autres métaux lourds. Cette résistance est due à la présence du gène Cop A dans les plasmides de ces bactéries.

Des travaux de Huseyin *et al.* (2005), montrent que des mutations au niveau du gène ORF5 ont entraînés un phénotype de résistance au cuivre.

Francisco *et al.* (2014) suggèrent que la sélection de souches résistantes au cuivre pourrait être une raison majeure pour les échecs de contrôle de gestion des bactéricides composés de cuivre. La plupart des isolats résistants au cuivre abritaient des plasmides, bien que la majorité d'entre eux contienne un plasmide de 62 kb qui a était également présent dans les souches sensibles au cuivre. Les plasmides de 62 kb ont été différenciés par analyse d'enzymes de restriction et hybridation à l'ADN copABCD. Le type de plasmide résistant au cuivre le plus fréquemment trouvé était transférable par conjugaison. Les hybridations par transfert de Southern ont montré, que des déterminants génétiques partiellement homologues de copABCD étaient présents dans toutes les souches résistantes au cuivre examinées et

étaient habituellement associés à des plasmides, ces déterminants n'ont pas été détectés dans les souches sensibles au cuivre.

#### V.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la plus faible concentration des échantillons testés où l'absence de croissance a été enregistrée (ARABI, 2018). La CMI de cuivre a été déterminée à des concentrations de 1,5 - 2 mM. Les valeurs de la CMI mentionnée dans le tableau 05, indique que les deux isolats de *Pseudomonas* fluorescents (K et 14) ont révélées une résistance importante au sulfate de cuivre, sachant que les deux bactéries tolèrent la concentration du sulfate de cuivre jusqu'au 1,5 mM. Cependant la valeur de la CMI elle est de l'ordre de 1,6 mM (tableau 05) pour les deux isolats étudiés (fig. 13). D'autres études montrent que *Pseudomonas putida* CZ1 ont enregistré une valeur de CMI de au 1 mM pour le cuivre et 3 mM pour le zinc (Chen *et al.*, 2006).

D'après Virender *et al.* (2010) la CMI de cuivre chez les souches *Pseudomonas* testés, est située entre 180 et 300 µg/ml. Cette même valeur est constatée par Rajbhansi (2008).

**Tableau 05.** Concentration minimale inhibitrice du cuivre vis-à-vis les deux isolats de *Pseudomonas* fluorescents étudiés.

Isolats	Concentration du sulfate de cuivre (mM)					
	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2
<b>14</b>	++	-	-	-	-	-
<b>K</b>	++	-	-	-	-	-

(-) : négative

(+) : positive



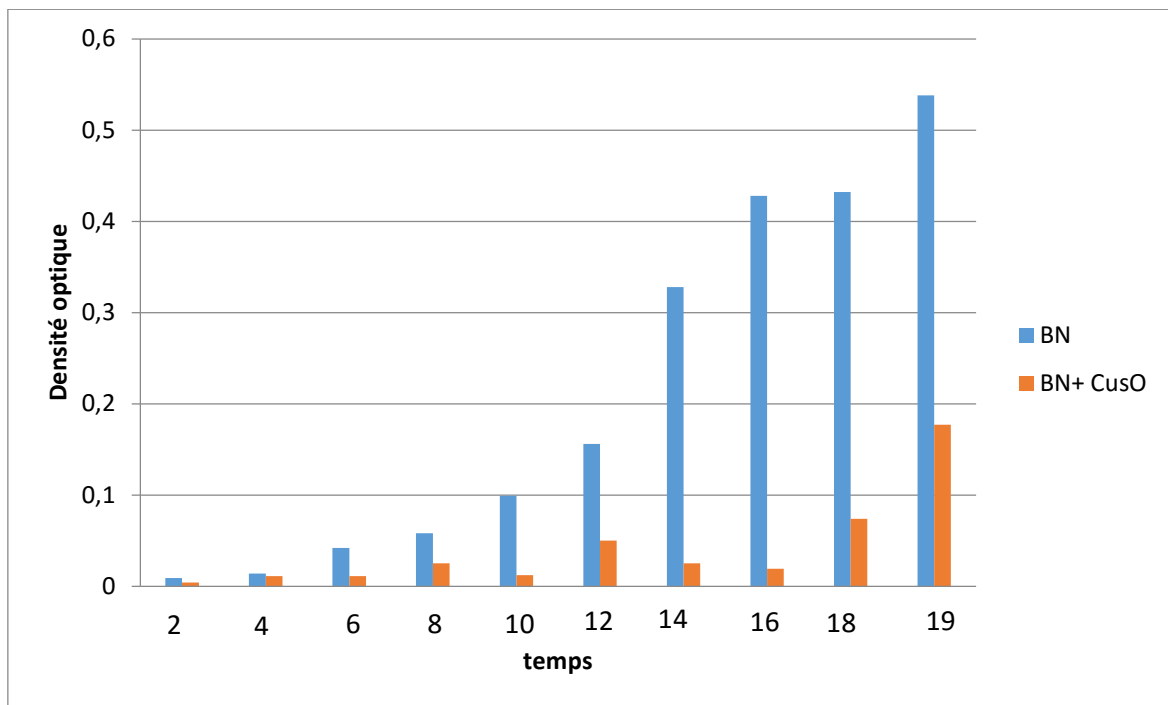
**Figure 13.** Concentration minimale inhibitrice du sulfate de cuivre vis-à-vis *Pseudomonas fluorescens* en milieu solide.

### **V.5. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des *Pseudomonas* fluorescents**

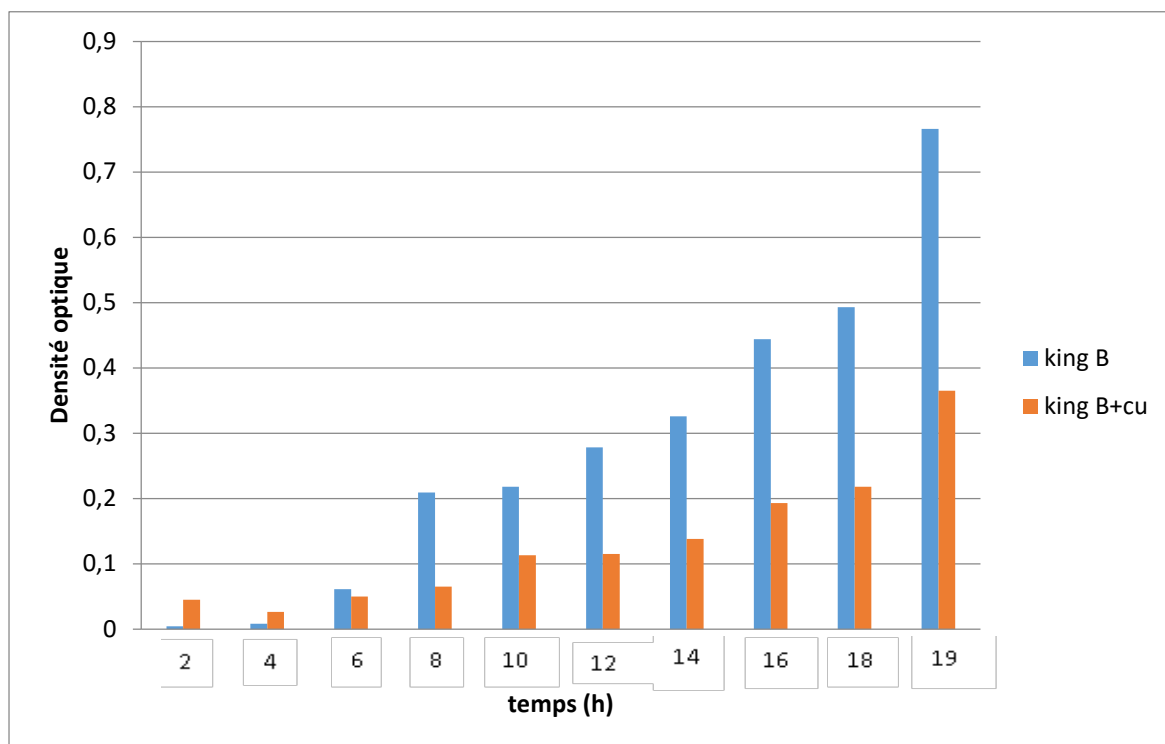
Pour évaluer l'effet de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas* fluorescents, des cultures ont été réalisées en milieu liquide. La croissance est déterminée par la mesure de la densité optique chaque 2 heures pendant 24 heures.

Les résultats obtenus, montrent que la croissance est légèrement ralentie dans le milieu contenant le cuivre par rapport à celle du témoin (fig. 14, 15). Ce ralentissement est probablement dû à la phase d'adaptation des bactéries aux conditions de la culture. Tandis que le cuivre à des concentrations inférieures à 1,6 mM n'inhibe pas les bactéries mais fait ralentir leurs croissances.

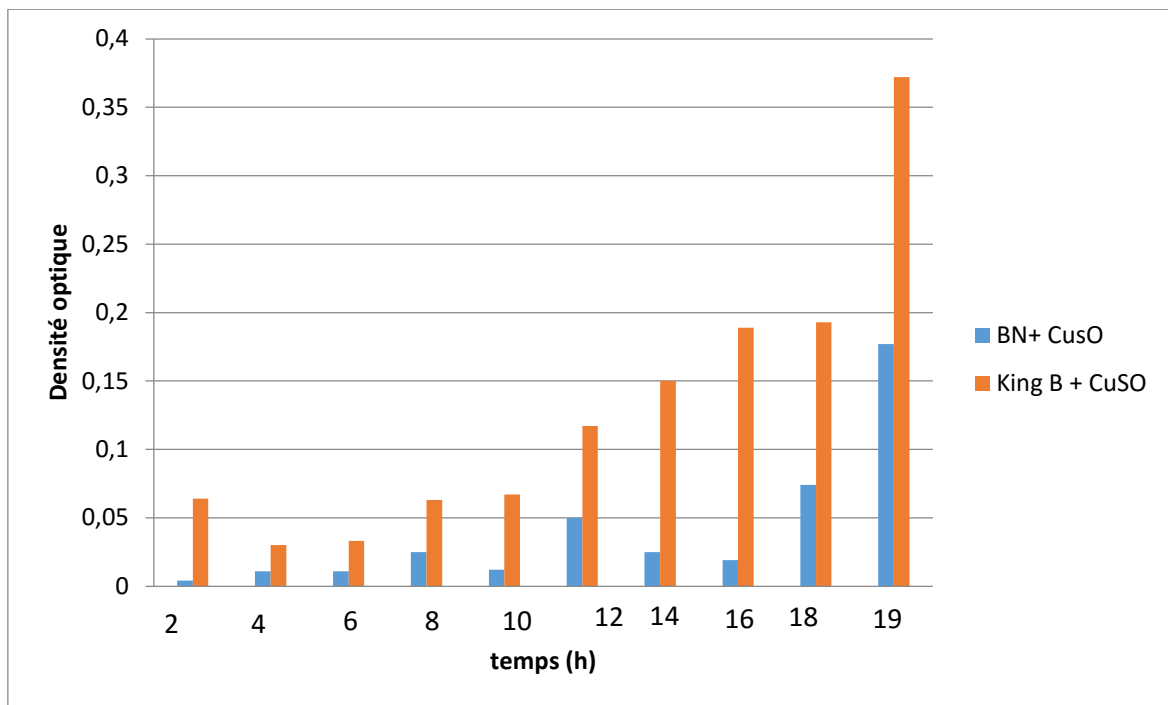
Bien que, les bactéries cultivées en milieu King B liquide se développe mieux dont celui qui contient du cuivre (fig. 16, 17), contrairement aux témoins pour les deux isolats étudiés, ce qui explique la manière avec la quelle la bactérie se défendu aux agents toxiques, et cela est déjà justifié par la pigmentation intense sur les milieux gélosés.



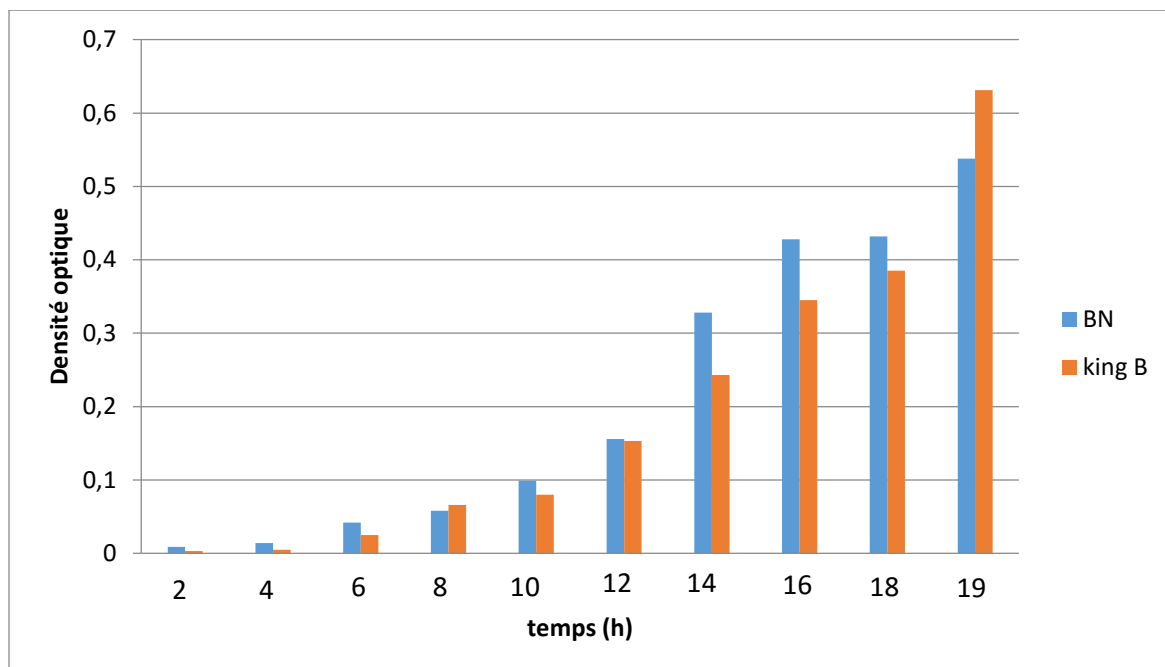
**Figure 14.** Évaluation de l’effet de sulfate de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans bouillon nutritif.



**Figure 15.** Évaluation de l’effet du sulfate de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans le milieu King B liquide.



**Figure 16.** Evaluation de l’effet de sulfate de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans deux milieux liquide (Bouillon nutritif et King B).



**Figure 17.** Évaluation de la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans deux milieux liquide (Bouillon nutritif et King B).

### V.6. Identification des deux isolats les plus résistants au cuivre par des galeries API 20NE

Des galeries biochimiques de type API 20NE (fig. 18), ont été utilisées pour identifier les bactéries (k et 14) les plus performantes, c'est-à-dire résistantes à des concentrations modérément élevées. Les résultats de ces examens biochimiques obtenus (tableau 06) permettent d'identifier les deux isolats étudiés comme *Pseudomonas fluorescens*. Ces mêmes caractéristiques biochimiques ont été révélées par Leyral et Joffin (1998).

**Tableau 06.** Résultats des tests biochimiques obtenus par des galeries API 20 NE.

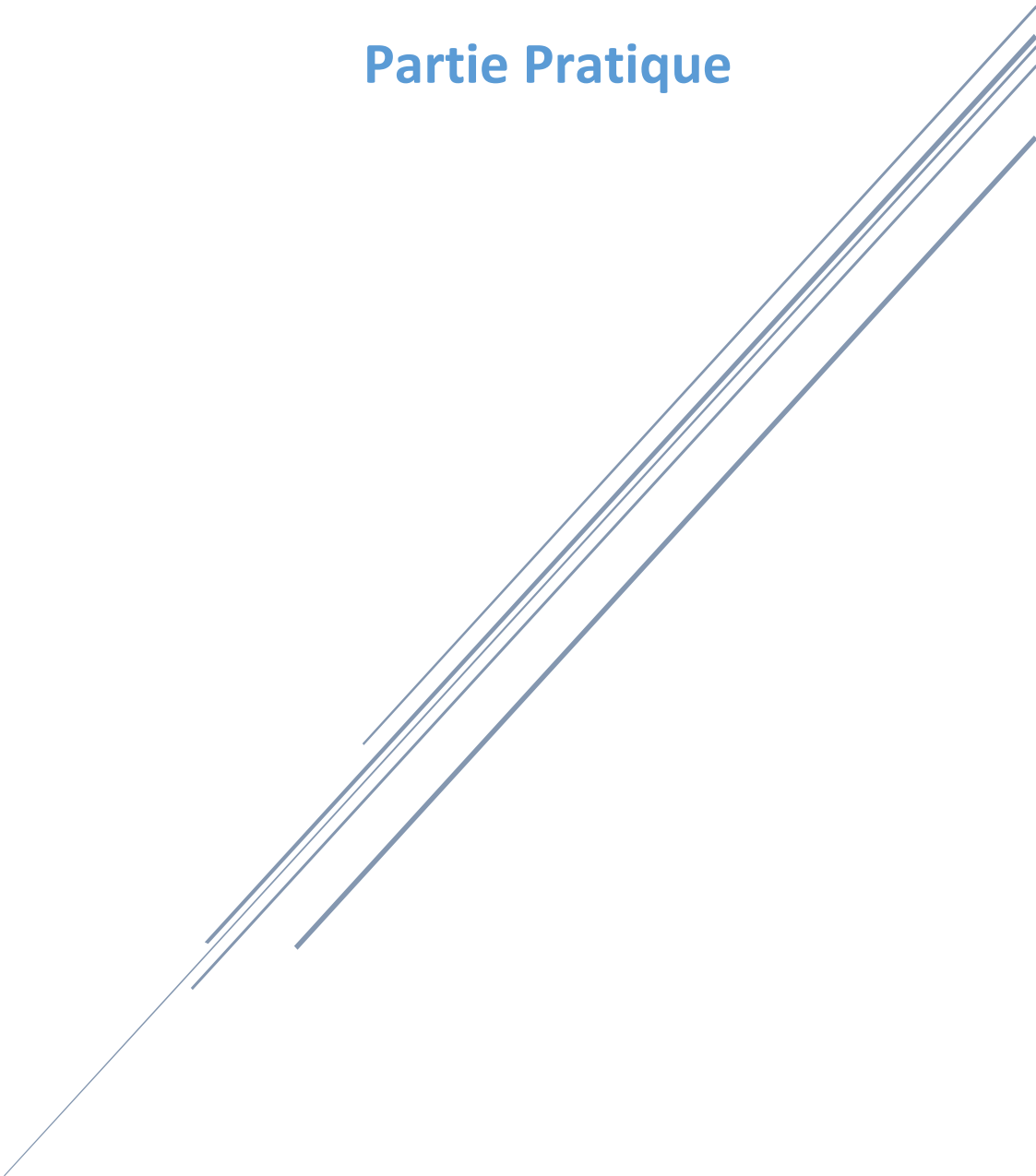
Tests	Isolat (K)	Isolat (14)
NO3	-	-
TRP	-	-
GLU	-	-
ADH	-	+/-
URE	-	-
ESC	-	-
GEL	+	+
PNPG	-	-
GLU	+	-
ARA	+	+
MNE	+	+
MAN	+	+
NAG	+/-	+
MAL	-	+/-
GNT	+	+
CAP	+	+
ADI	-	-
MLT	+	-
CIT	+	+
PAC	-	-
OX	+	+

(-) : négative, (+) : positive, (+/-) : plus au moins



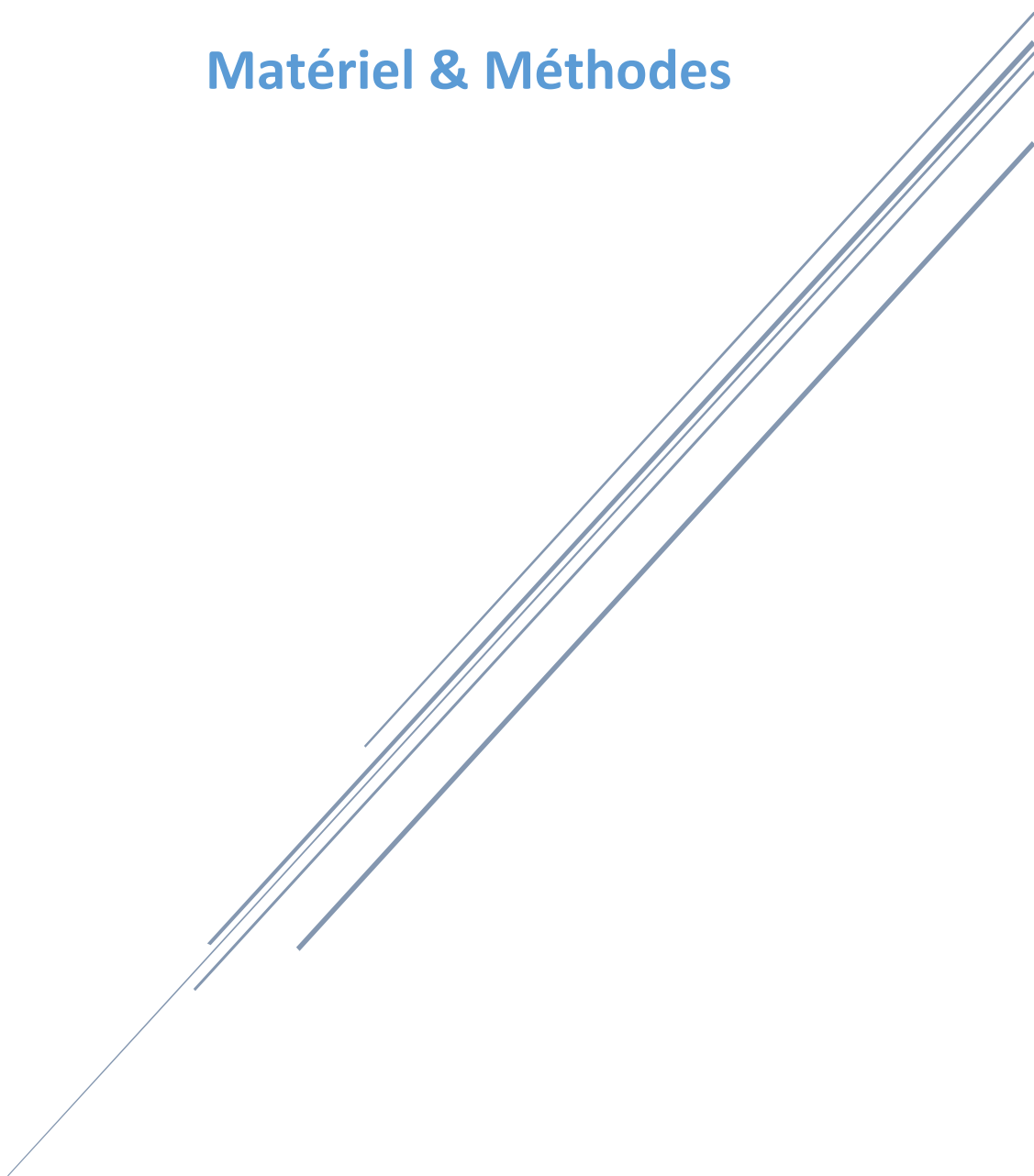
**Figure 18.** Galerie biochimique API 20 NE de *Pseudomonas fluorescens*.

# Partie Pratique



# CHAPITRE IV

## Matériel & Méthodes



## Chapitre IV : Matériel et Méthodes

### IV.1. Échantillonnage

L'échantillonnage des bactéries du groupe de *Pseudomonas* fluorescents a été effectué à partir de la zone rhizosphérique des plantes. Les échantillons, à savoir le sol et les racines de l'orge des rats (*Hordeum murinum*, fig. 04), ont été prélevés au niveau des champs de la vigne (fig. 05) de deux régions situées à la wilaya de Mostaganem (Oued El Kheir et Sidi Lakhdar).

À l'aide d'une pioche carrée, une plante de blé sauvage a été prélevée complètement avec ses racines et son sol rhizosphérique, cette opération a été effectuée dans des conditions aseptiques. L'ensemble est introduit dans un sachet stérile et transporté rapidement au laboratoire.



**Figure 04.** *Hordeum murinum* (l'orge des rats).



**Figure 05.** Champ de la vigne

## **IV.2. Isolement, purification et identification des *Pseudomonas* fluorescents**

### **IV.2.1. Isolement**

L'isolement des bactéries du genre *Pseudomonas* fluorescent du sol rhizosphérique à été effectué par la méthode de la suspension - dilution selon Vidhyasekaran *et al.* (1997).

Un échantillon de 10 g de sol adhère aux racines à été suspendu dans 90 ml d'eau physiologique stérile (fig. 06) et soumis à une agitation contenue pendant 15 min.

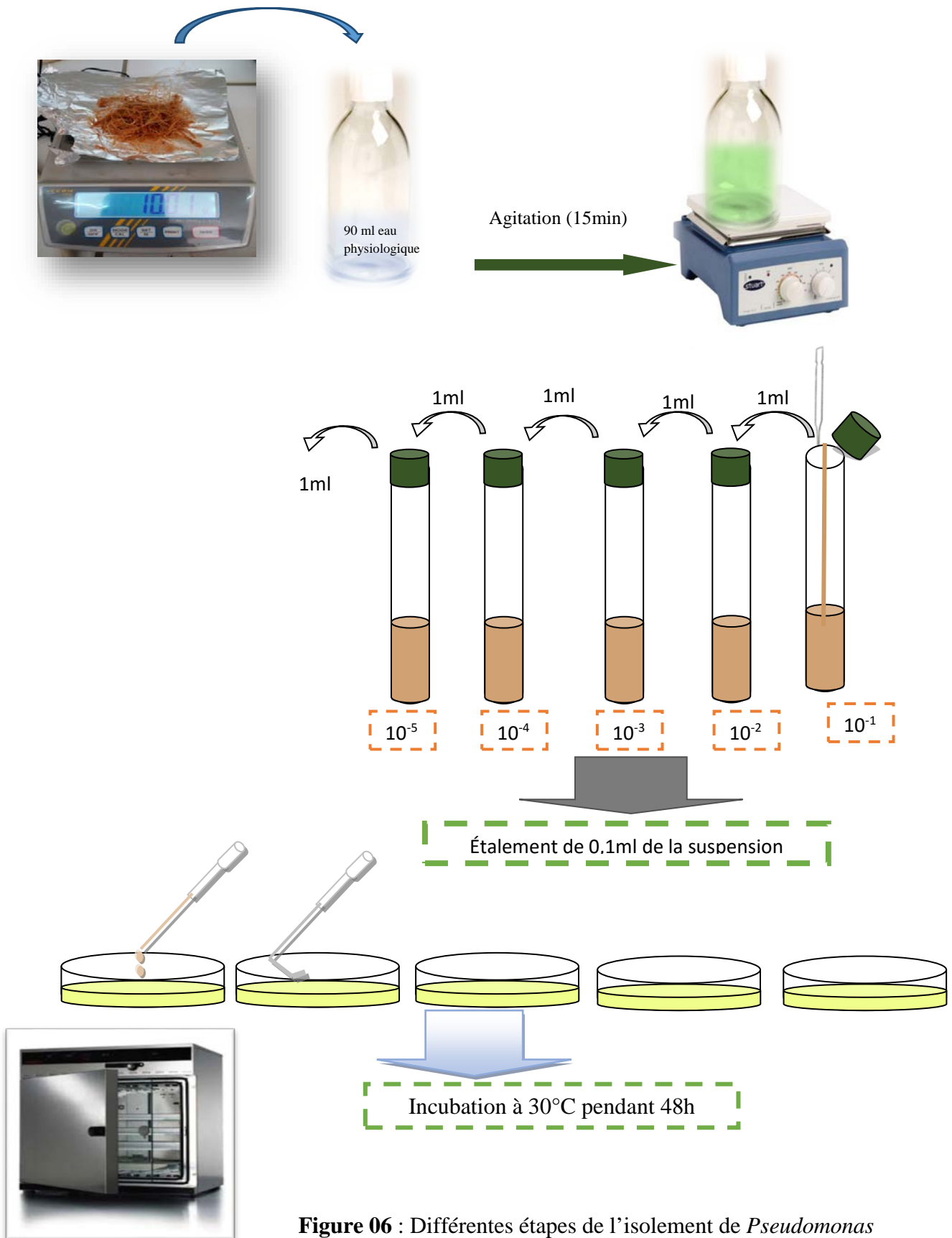
Une série de dilution décimale à été réalisée allons de  $10^{-1}$  jusqu'au  $10^{-5}$ , puis un volume de 0,1ml de chacune de ces dilutions à été étalé sur gélose King B, les boites ensemencés sont incubés à 30°C pendant 48 h.

Après 48 heures d'incubation, les colonies qui caractérisent le genre *Pseudomonas* fluorescent (pigmentation jaune - verdâtre) ont été purifiées sur gélose King B et incubées par la suite à 30°C pendant 48 h.

### **IV.2.2. Purification**

L'étape de purification des cultures permet d'obtenir des cultures pures à partir des différents isolats obtenus.

La sélection des isolats est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre et l'opacité. Une colonie de chacun des isolats à été prélevé et ensuite purifié par des repiquages successifs selon la méthode de stries (Martinneau, 1996).



**Figure 06 :** Différentes étapes de l'isolement de *Pseudomonas* fluorescents a partir du sol rhizosphérique.

### IV.2.3. Identification

#### IV.2.3.1. Examens macro et microscopique

##### a. Examen macroscopique

L'examen macroscopique consiste à étudier à l'œil nu l'aspect, la taille, la forme et la couleur des colonies

##### b. Examen microscopique

L'observation microscopique permet d'étudier l'aspect morphologique de la cellule microbienne, donc examiner les bactéries à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivante) et après la coloration de Gram (Annexe 01).

#### IV.2.3.2. Tests biochimiques

##### a. Recherche de l'oxydase

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à coloration de Gram négative.

Le test de l'oxydase consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxydé un réactif incolore (NN-diméthyle - paraphylène diamine) (Annexe 02) en un dérivé rose violacée.

Le test est réalisé par mise en contact d'une culture avec un disque d'oxydase.

##### b. Recherche du Catalase

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à coloration de Gram positif.

Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact avec le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Annexe 03). Les bactéries qui possèdent la catalase, dégradent le peroxyde d'hydrogène en oxygène et dioxygène, visible par la formation des bulles d'air.

#### IV.2.3.3. Croissance des *Pseudomonas* à 4°C et 42°C

A partir des cultures jeunes, des boites de Pétri contenant le milieu de culture GN ont étéensemencés. La mise en culture à été réalisée à deux températures différentes (4°C et 42°C) pendant 48h. La lecture s'effectue par la présence de la culture bactérienne dans les boites incubées à 4°C et 42°C.

### IV.3. Test de la résistance des *Pseudomonas fluorescents* au cuivre

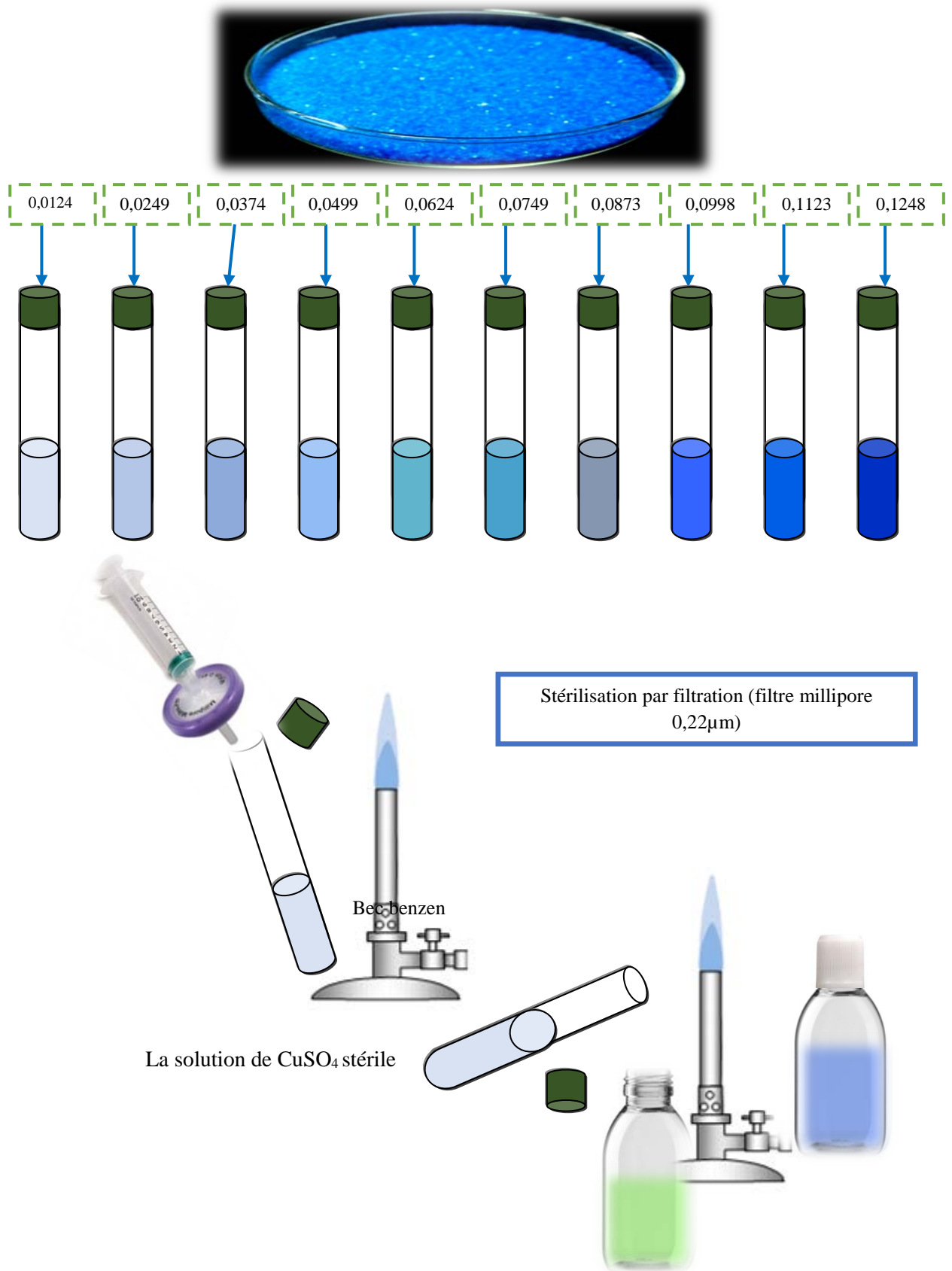
Le test de la résistance au cuivre est réalisé au milieu solide selon Andersen *et al.* (1991). La préparation de la série des concentrations consiste à dissoudre des quantités de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ) à raison de 0,0124 ; 0,0249 ; 0,0374, 0,0499 ; 0,0624 ; 0,0749 ; 0,0873 ; 0,0998 ; 0,1123 et 0,1248 g dans 10 ml d'eau distillée. Les solutions préparées ont été stérilisés par filtration à l'aide d'un filtre millipore (Millipore Millex-GN, Nylon, 0,22 $\mu\text{m}$ ). Cette méthode de stérilisation est destinée pour les produits thermosensibles vue que la stérilisation par chaleur humide à 120°C (autoclavage) provoque une complexation du cuivre avec les composants du milieu.

Chaque tube de la série de dilutions à été versé dans un flacon contenant 90 ml de gélose nutritive en surfusion (50°C) préalablement stérilisée à l'autoclave pendant 20 min à 120°C, après homogénéisation, le milieu est coulé dans des boites de Petri de 90 mm à raison de 15ml par boite, laissés solidifié, ensuite les boites sont ensemencées par un volume de 10  $\mu\text{l}$  de chacune des suspensions bactériennes standardisées (fig. 07). Des boites de Pétri ne contient que la gélose nutritive (sans  $\text{CuSO}_4$ ) ont été ensemencés, font l'objet d'un témoin.

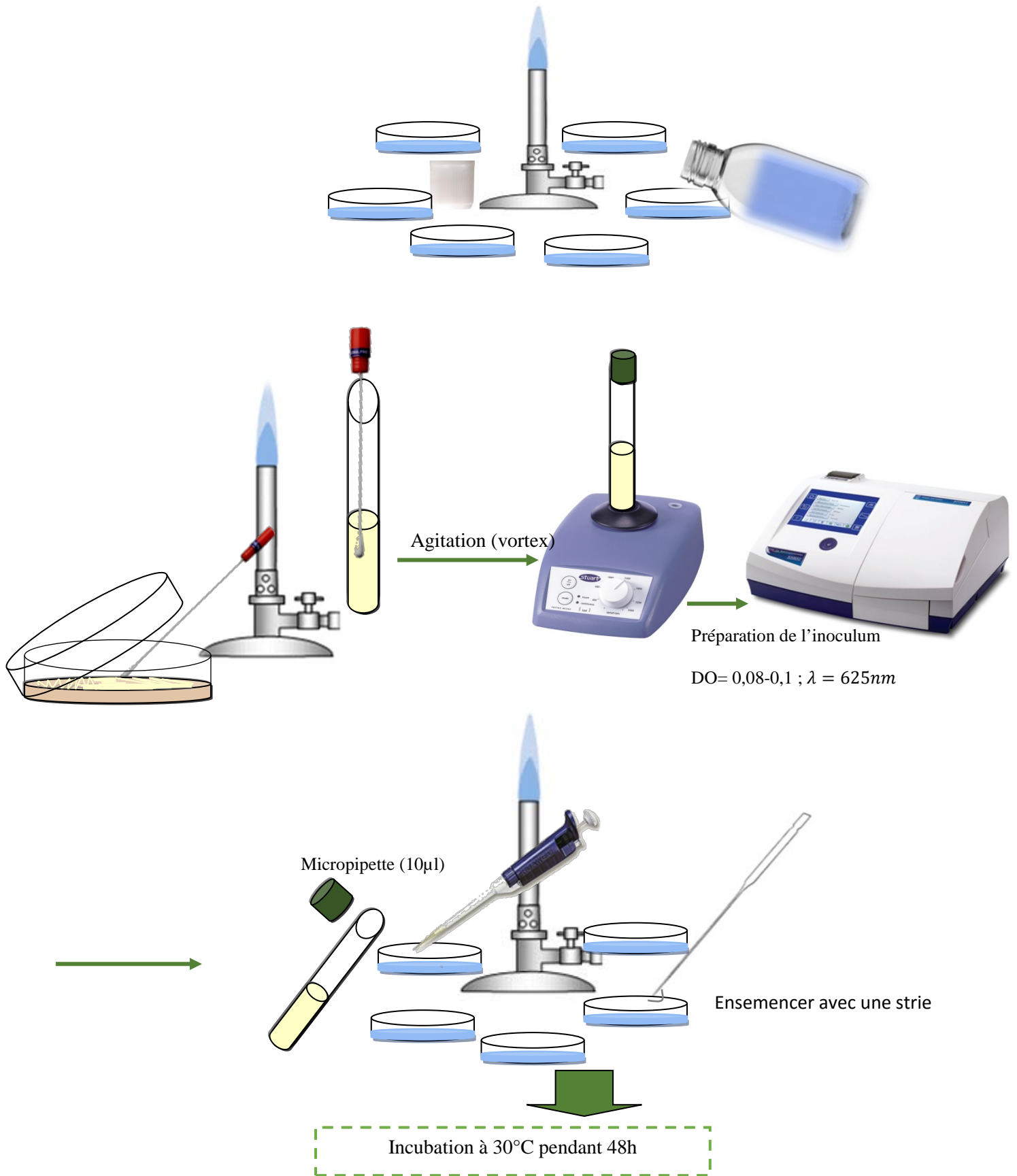
La densité optique des inoculas préparés est ajustée à 0,08 - 0,1 à l'aide d'un spectrophotomètre (67 15 UV/Vis. Spectrophotometre ; multi- cell changer ; JENWAY) dans une longueur d'onde égal à 625nm.

Les boites ensemencées ont été incubées en aérobiose dans une étuve à 30°C pendant 48 h.

La lecture des résultats à été effectués par la mise en évidence de la présence ou l'absence de la croissance bactérienne par rapport au témoin.



**Figure 07.** Détermination de la résistance des *Pseudomonas* fluorescents au sulfate de cuivre.



**Figure 07 (suite).** Détermination de la résistance des *Pseudomonas* fluorescents au sulfate de cuivre.

#### IV.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cuivre vis-à-vis les isolats testés

La détermination de la concentration minimale inhibitrice de cuivre vis-à-vis les bactéries testées a été réalisée en milieu solide.

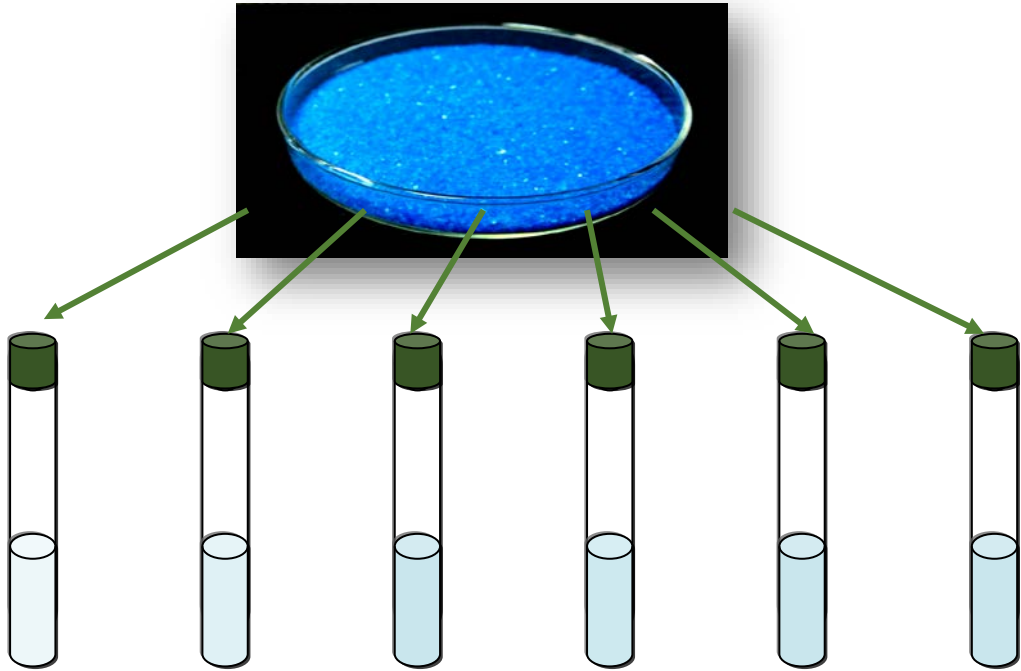
Les solutions de sulfate de cuivre ont été préparées allant de 0,0374 - 0,0499 g dans 10 ml d'eau distillée.

Après filtration des solutions préparées, un volume de 10 ml de chacune d'elles a été versé dans un flacon contenant 90 ml de la gélose nutritive en surfusion (50°C). Ensuite versées dans des boîtes de Petri vides à raison de 15ml par boîte (fig. 08), les concentrations finales en cuivre ou sulfate de cuivre sont de l'ordre de 1,5 ; 1,6 ; 1,7 ; 1,8 ; 1,9 ; 2 mM (tableau 02). Des contrôles négatifs (témoins) ne contenant que le milieu gélosé (GN), ont été également préparés.

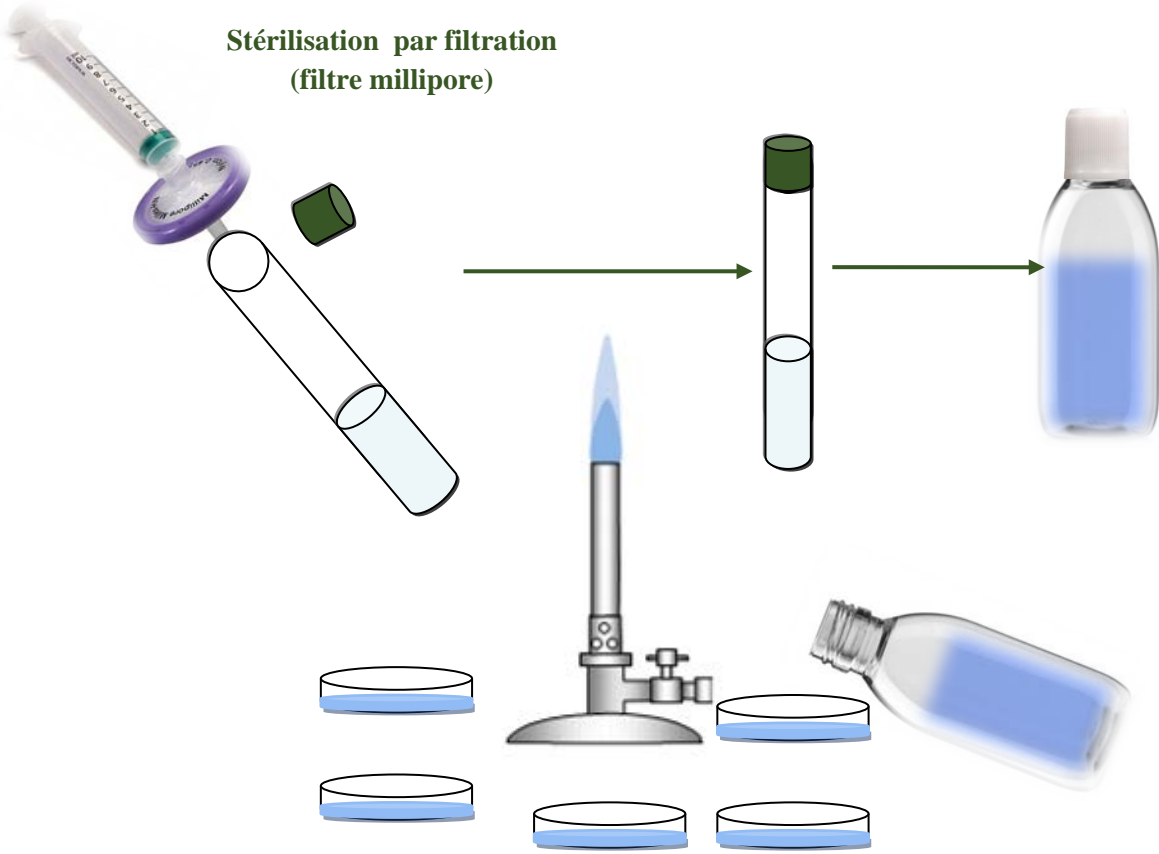
Les boîtes préparées font l'objet d'un ensemencement des bactéries testées à l'aide d'une anse calibrée de 10µl (dans la densité des suspensions sont ajusté de la même manière précédente), après incubation à 30°C pendant 48 h, dans des conditions d'aérobiose la concentration minimale inhibitrice (CMI) est représentée par les concentrations des boîtes qui ne contiennent pas de culture.

**Tableau 02.** Concentration finale de sulfate de cuivre.

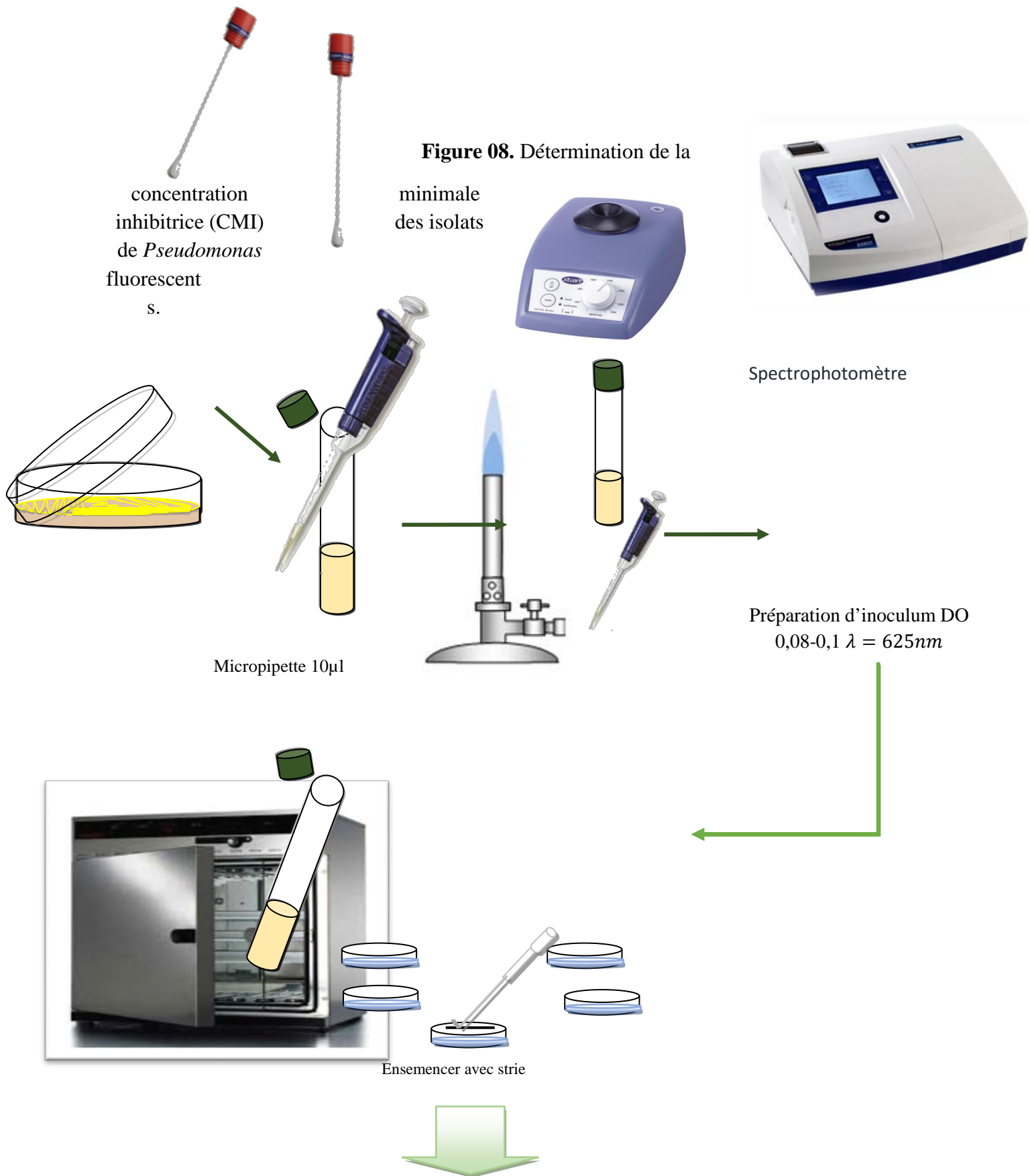
N°	Masse de sulfate de cuivre (g)	Volume d'eau distillée (ml)	[C] de la solution série de dilution (g/10 ml)	[C] finale	
				g/l	mM
1	0,03745	10 ml	0,003745	0,3745	1,5
2	0,0399		0,00399	0,399	1,6
3	0,0424		0,00424	0,424	1,7
4	0,0449		0,00449	0,449	1,8
5	0,0474		0,00474	0,474	1,9
6	0,0499		0,00499	0,499	2
7 (témoin)	0		0	0	0



**Stérilisation par filtration  
(filtre millipore)**



Couler les boites et laisser solidifier



**Figure 08.** Détermination de la  
minimale  
des isolats

concentration  
inhibitrice (CMI)  
de *Pseudomonas*  
fluorescent  
s.

Spectrophotomètre

Micropipette 10µl

Préparation d'inoculum DO  
0,08-0,1  $\lambda = 625nm$

Ensemencer avec strie

Incubation à 30°C pendant 48 h

**Figure 08 (suite).** Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des isolats de *Pseudomonas fluorescents*.

#### **IV.5. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des *Pseudomonas fluorescents***

Les isolats les plus résistants, sont sélectionnés dans ce test de résistance font l'objet d'un test de croissance sur deux milieux liquides différents (king B, Boullion nutritif) avec ou sans cuivre, dont la concentration est égale à 1,5 mM (la valeur située juste avant celle de la CMI). Deux séries de tubes à essai contenant 9 ml de chaque milieu utilisé, sont par la suite ensemencés par 1ml de la suspension bactérienne standardisées. L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 24 h, et la lecture se fait par la mesure de la densité optique chaque 2 heures. Les tubes sans cuivre représentent les témoins.

#### **IV.6. Identification biochimiques des isolats sélectionnés (les plus résistants) par des galeries de type API 20NE**

La galerie API 20 NE, est un système standardisé combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation, pour l'identification des bacilles à coloration de Gram négative non entérobactéries et non fastidieux (Leyral et Noël Joffin, 1998).

Des cultures jeunes (de 18 à 24h) de deux isolats à identifier ont été utilisées pour la préparation des suspensions bactériennes, dont la densité optique est ajustée à 0,08-0,1 à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde égale à 625nm.

Cinq millilitres d'eau physiologique ont été répartis dans les alvéoles de la boîte pour créer une atmosphère humide.

Les tubes de huit tests conventionnels du test NO<sub>3</sub> au test ONPG sont remplis avec les suspensions préalablement préparées en utilisant des pipettes jetables de 1 ml. Pour les autres tests (GLU à PAC), un volume de 200 µl de suspension a été mélangé au API-medium et homogénéisé en évitant la formation des bulles.

Les tubes et les cupules des tests (Glu à PAC) sont 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. Les cupules des tests GLU, ADH et URE sont couvertes d'huile de paraffine pour former une ménisque convexe. Les galeries inoculées sont incubées à 30°C pendant 24 h. Après l'incubation tous les tests se révèlent spontanément, sauf les tests TRP et NO<sub>3</sub> qui sont rapidement obtenus après l'addition des réactifs (JAMES et NIT 1, NIT 2 respectivement).

# CHAPITRE V

## Résultats & Discussion



## Chapitre V : Résultats et Discussion

### V.1. Isolement et purification des isolats

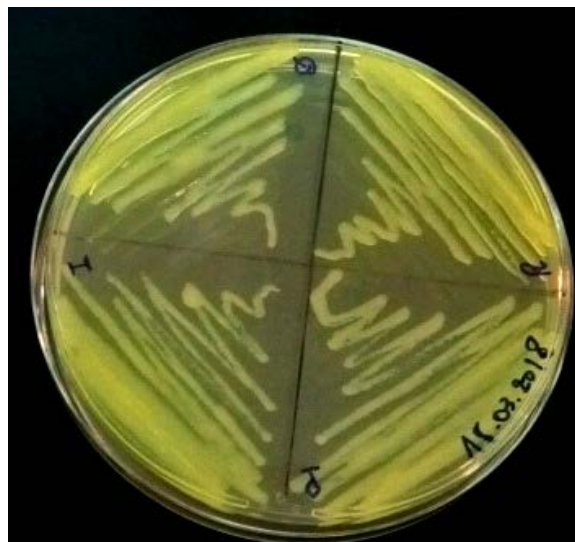
Dans ce travail nous avons examiné deux échantillons de sol rhizosphérique. Les méthodes de caractérisation bactériologique décrites ont permis une identification préliminaire des isolats des biotopes cités (sol + racines de l'orge des rats « *Hordeum murinum* »). La sélection basée sur la production d'un pigment jaune - vert fluorescent. La production de ce dernier et les caractères macromorphologiques sur le milieu King B, nous ont permis d'obtenir 40 isolats bactériens.

Les résultats obtenus après une purification, ont permis de retenir 29 isolats de *Pseudomonas* fluorescents repartis en deux groupes (groupe 01 ; 16 isolats du site d'Oued El Kheir et groupe 02 ; 13 isolats du site de Sidi Lakhdar).

### V.2. Identification des bactéries isolées et purifiées

#### V.2.1. Examen macroscopique

Sur le milieu gélosé King B la présence des colonies de 0,6 - 1 mm de diamètre de forme renflée, foncée, circulaire, muqueuse et homogène, avec une pigmentation fluorescente de couleur jaune verdâtre (fig. 09). Ces mêmes caractéristiques ont été constatées chez les *Pseudomonas* fluorescent par Idder (2013).



**Figure 09.** Aspect macroscopique de *Pseudomonas* fluorescent sur gélose King B, isolé à partir du sol rhizosphérique.

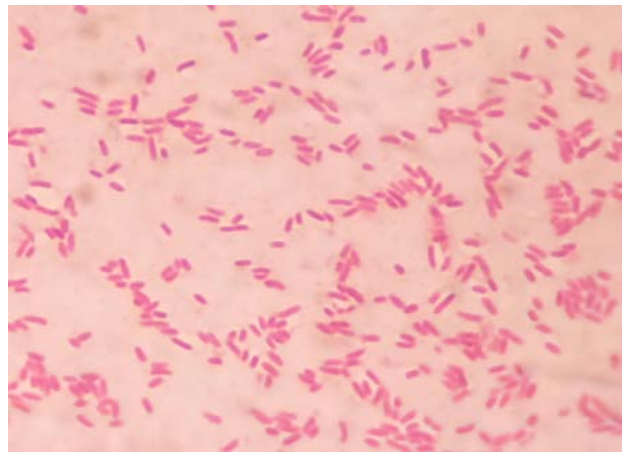
## V.2.2. Examen microscopique

### V.2.2.1. Examen à l'état frais

Les bactéries examinées à l'état frais, apparaissent mobiles sous microscope (tableau 03). La présence des flagelles polaires permet à ces bactéries de se déplacer facilement dans leurs environnements (Stanzin, 2017).

### V.2.2.2. Coloration de Gram

Sous microscope optique et à émergence au grossissement X100, la coloration de Gram réalisée à partir des colonies distinctes, montrent la présence des cellules de forme bacillaire et de couleur rose est donc a coloration de Gram négative (fig. 10).



**Figure 10.** Aspect microscopique de *Pseudomonas fluorescens* (X1000).

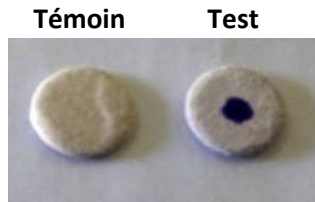
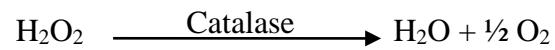
## V.2.3. Test biochimique

### V.2.3.1. Recherche de l'oxydase

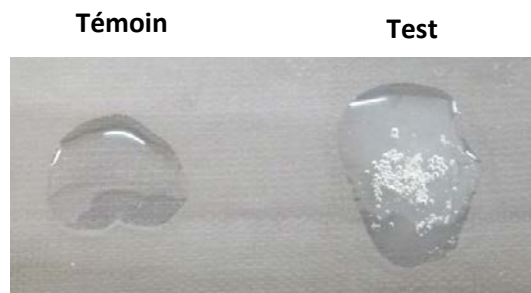
La mise en évidence d'un cytochrome oxydase qui oxyde le cytochrome c présent dans la chaîne respiratoire, grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction (N-méthylé du paraphénylène diamine), montre que les bactéries testées sont oxydase positive (fig. 11) se traduit par l'apparition d'une couleur violette très foncée (Delarras, 2014).

### V.2.3.2 Recherche de la catalase

Chez les bactéries isolées, le dégagement du gaz sous forme de bulles d'air, dû à la dégradation de l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène comme indique la formule (Delarras, 2014) citée ci-dessous, montre la présence d'une catalase positive (fig.12) :



**Figure 11.** Test de l'oxydase.



**Figure 12.** Test de la catalase.

#### V.2.4. Mise en culture des *Pseudomonas* à 4°C et 42°C

La culture positive des boîtes soumises à une incubation à 4°C indique que tous les isolats appartiennent au genre *Pseudomonas* fluorescents (tableau 03). Les *Pseudomonas* fluorescents ne poussent pas à la température 42°C mais se développent facilement dans à 4°C (Djibaoui et Bensoltan, 2005).

**Tableau 03.** Caractères morphologique, biochimique des *Pseudomonas* fluorescents.

Isolats	Coloration de Gram	forme	mobilité	oxydase	catalase	Croissance à 42°C	Croissance à 4°C
A	-	Bâtonnet	+	+	+	-	+
B	-		+	+	+	-	+
E	-		+	+	+	-	+
G	-		+	++	+	-	+
H	-		+	+	+	-	+
I	-		+	++	+	-	+
J	-		+	++	+	-	+
K	-		+	++	+	-	+
L	-		+	+	+	-	+
N	-		+	+++	+	-	+
Q	-		+	+++	+	-	+
R	-		+	+	+	-	+
S	-		+	++	+	-	+
1	-		+	+	+	-	+
2	-		+	+	+	-	+
3	-		+	-	+	-	+
9	-		+	+	+	-	+
10	-		+	++	+	-	+
11	-		+	++	+	-	+
12	-		+	-	+	-	+
14	-		+	+	+	-	+
15	-		+	+	+	-	+
17	-		+	+	+	-	+
19	-		+	+	+	-	+
21	-		+	+	+	-	+
22	-		+	++	+	-	+
25	-		+	+	+	-	+
26	-		+	-	+	-	+
28	-	+	+	+	-	+	

(-) : négative

(+) : positive

(++) : Fortement positive

(+++): extrêmement positive

### V.3 Test de la résistance des *Pseudomonas* fluorescents au cuivre

Les résultats de la croissance des *Pseudomonas* sur gélose nutritive additionnée de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à différentes concentrations (0,5 - 5 mM) sont indiqués dans le tableau 04.

**Tableau 04.** Effet du sulfate de cuivre sur la croissance des isolats de *Pseudomonas* fluorescents

Isolats	Concentrations du sulfate de cuivre (mM)									
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
A	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
H	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
I	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
L	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
N	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
G	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
R	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
S	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
1	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
2	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
12	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
14	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
15	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
21	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
22	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
25	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
28	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) absence de la croissance ; (+) : Faible croissance ; (++) : croissance abondante.

Tous les isolats ont poussés abondamment dans le milieu de culture à 0,5 mM, dont 19 bactéries ont été développées sur la gélose nutritive additionnée de 1 mM de sulfate de cuivre hydraté. A cette même concentration d'autres bactéries étudiées (10 isolats), ont montrées une faible croissance sur ce milieu. Par ailleurs à la concentration de 1,5 mM, nous avons constaté le développement des isolats K et 14.

Des travaux scientifiques réalisés par Andersen *et al.* (1991) ont montrés que les souches de *Pseudomonas syringae* tolères des concentrations de cuivre allons de 0,3 mM jusqu'au 1,2 mM. Par ailleurs, Aillo *et al.* (2015) ont montré que les souches sensibles se développaient uniquement sur de milieu additionné de 0,40 - 0,80 mM de sulfate de cuivre : (de faible résistance avec 1 - 1,6 mM), (résistantes avec, 1,8 - 2,4 mM) et (très résistants avec 2,6 - 3,2 mM).

Dans notre expérimentation les isolats les plus résistants au cuivre montrent une couleur Jaune très intense.

Cependant, des études de recherche réalisées par Ramos et Rosato (1996) montrent que la souche *Xanthomonas* (484) présentait une couleur ocre plus intense, lorsqu'elle était cultivée sur du milieu additionné de cuivre, ce qui suggérait une accumulation de ce métal.

Selon Altimira *et al.* (2012), cinq bactéries isolés à partir de sols pollués au cuivre ont montré une résistance élevée au cuivre et une résistance à d'autres métaux lourds. Cette résistance est due à la présence du gène Cop A dans les plasmides de ces bactéries.

Des travaux de Huseyin *et al.* (2005), montrent que des mutations au niveau du gène ORF5 ont entraînés un phénotype de résistance au cuivre.

Francisco *et al.* (2014) suggèrent que la sélection de souches résistantes au cuivre pourrait être une raison majeure pour les échecs de contrôle de gestion des bactéricides composés de cuivre. La plupart des isolats résistants au cuivre abritaient des plasmides, bien que la majorité d'entre eux contienne un plasmide de 62 kb qui a était également présent dans les souches sensibles au cuivre. Les plasmides de 62 kb ont été différenciés par analyse d'enzymes de restriction et hybridation à l'ADN copABCD. Le type de plasmide résistant au cuivre le plus fréquemment trouvé était transférable par conjugaison. Les hybridations par transfert de Southern ont montré, que des déterminants génétiques partiellement homologues de copABCD étaient présents dans toutes les souches résistantes au cuivre examinées et

étaient habituellement associés à des plasmides, ces déterminants n'ont pas été détectés dans les souches sensibles au cuivre.

#### V.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la plus faible concentration des échantillons testés où l'absence de croissance a été enregistrée (ARABI, 2018). La CMI de cuivre a été déterminée à des concentrations de 1,5 - 2 mM. Les valeurs de la CMI mentionnée dans le tableau 05, indique que les deux isolats de *Pseudomonas* fluorescents (K et 14) ont révélées une résistance importante au sulfate de cuivre, sachant que les deux bactéries tolèrent la concentration du sulfate de cuivre jusqu'au 1,5 mM. Cependant la valeur de la CMI elle est de l'ordre de 1,6 mM (tableau 05) pour les deux isolats étudiés (fig. 13). D'autres études montrent que *Pseudomonas putida* CZ1 ont enregistré une valeur de CMI de au 1 mM pour le cuivre et 3 mM pour le zinc (Chen *et al.*, 2006).

D'après Virender *et al.* (2010) la CMI de cuivre chez les souches *Pseudomonas* testés, est située entre 180 et 300 µg/ml. Cette même valeur est constatée par Rajbhansi (2008).

**Tableau 05.** Concentration minimale inhibitrice du cuivre vis-à-vis les deux isolats de *Pseudomonas* fluorescents étudiés.

Isolats	Concentration du sulfate de cuivre (mM)					
	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2
<b>14</b>	++	-	-	-	-	-
<b>K</b>	++	-	-	-	-	-

(-) : négative

(+) : positive



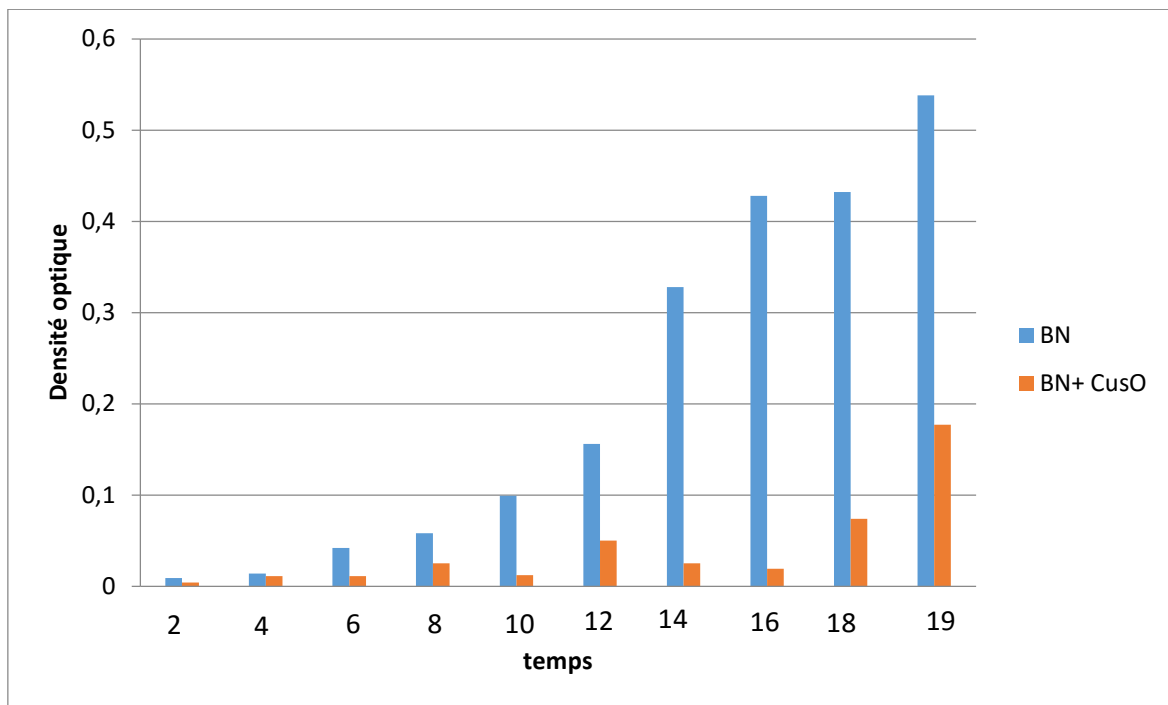
**Figure 13.** Concentration minimale inhibitrice du sulfate de cuivre vis-à-vis *Pseudomonas fluorescens* en milieu solide.

### **V.5. Mise en évidence de l'effet du cuivre sur la croissance des *Pseudomonas* fluorescents**

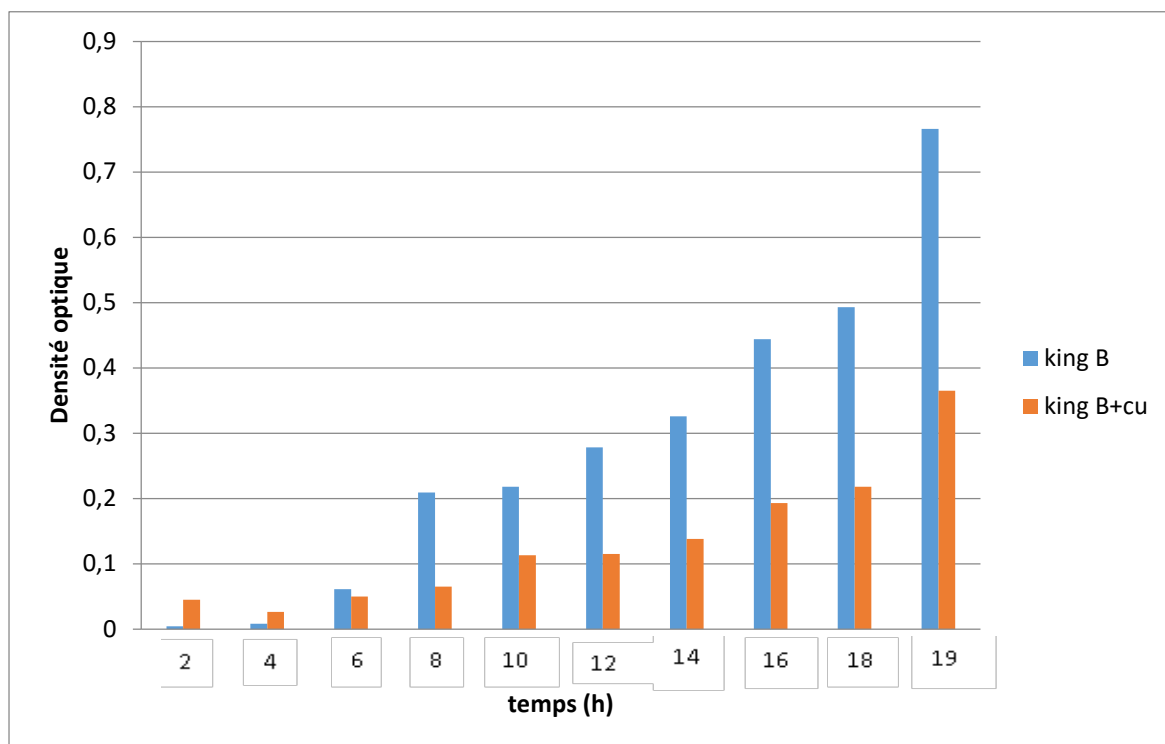
Pour évaluer l'effet de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas* fluorescents, des cultures ont été réalisées en milieu liquide. La croissance est déterminée par la mesure de la densité optique chaque 2 heures pendant 24 heures.

Les résultats obtenus, montrent que la croissance est légèrement ralentie dans le milieu contenant le cuivre par rapport à celle du témoin (fig. 14, 15). Ce ralentissement est probablement dû à la phase d'adaptation des bactéries aux conditions de la culture. Tandis que le cuivre à des concentrations inférieures à 1,6 mM n'inhibe pas les bactéries mais fait ralentir leurs croissances.

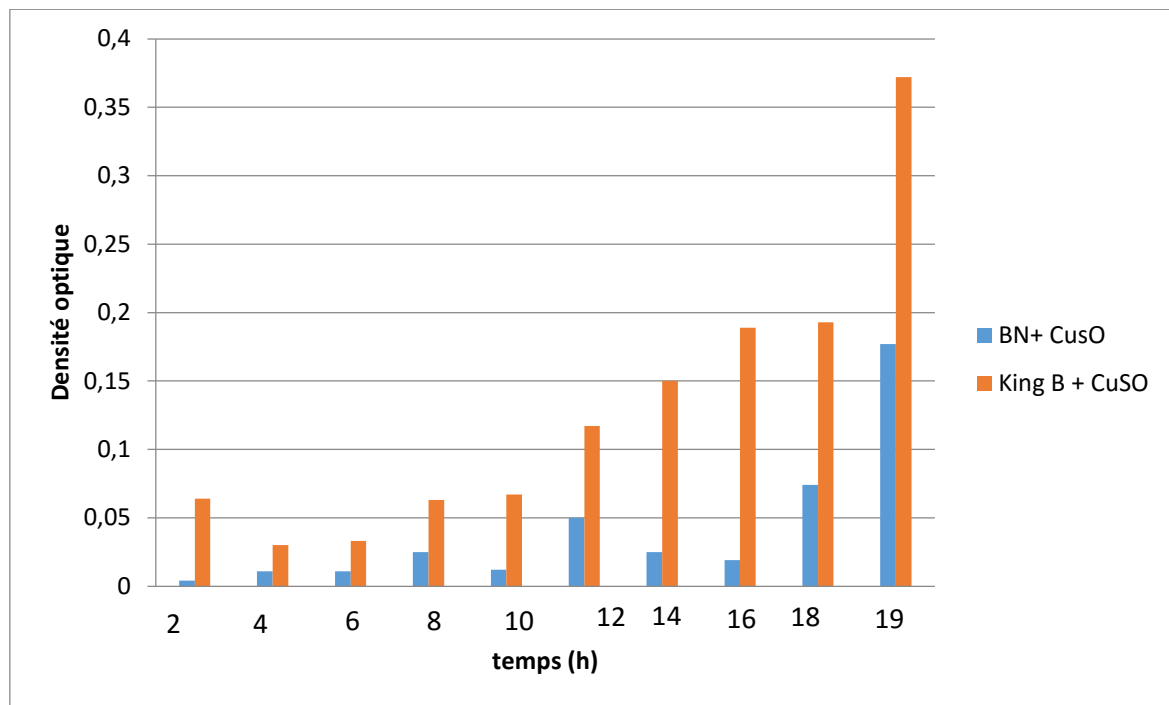
Bien que, les bactéries cultivées en milieu King B liquide se développe mieux dont celui qui contient du cuivre (fig. 16, 17), contrairement aux témoins pour les deux isolats étudiés, ce qui explique la manière avec la quelle la bactérie se défendu aux agents toxiques, et cela est déjà justifié par la pigmentation intense sur les milieux gélosés.



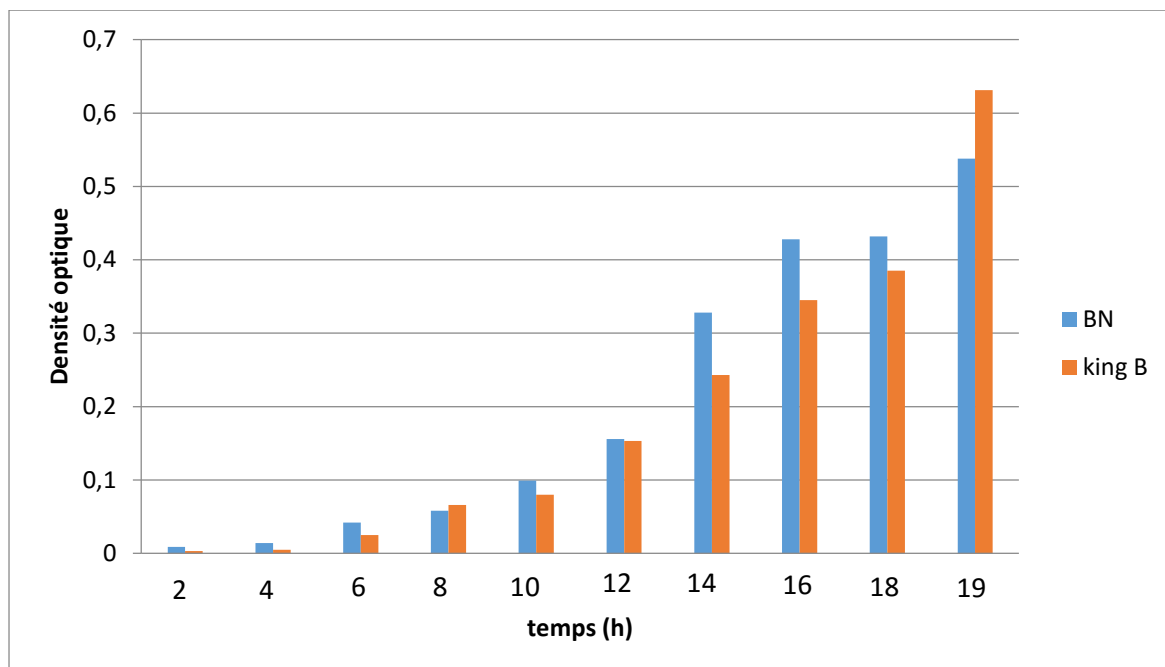
**Figure 14.** Évaluation de l'effet de sulfate de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans bouillon nutritif.



**Figure 15.** Évaluation de l'effet du sulfate de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans le milieu King B liquide.



**Figure 16.** Evaluation de l'effet de sulfate de cuivre sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans deux milieux liquide (Bouillon nutritif et King B).



**Figure 17.** Évaluation de la croissance de *Pseudomonas fluorescens* dans deux milieux liquide (Bouillon nutritif et King B).

### V.6. Identification des deux isolats les plus résistants au cuivre par des galeries API 20NE

Des galeries biochimiques de type API 20NE (fig. 18), ont été utilisées pour identifier les bactéries (k et 14) les plus performantes, c'est-à-dire résistantes à des concentrations modérément élevées. Les résultats de ces examens biochimiques obtenus (tableau 06) permettent d'identifier les deux isolats étudiés comme *Pseudomonas fluorescens*. Ces mêmes caractéristiques biochimiques ont été révélées par Leyral et Joffin (1998).

**Tableau 06.** Résultats des tests biochimiques obtenus par des galeries API 20 NE.

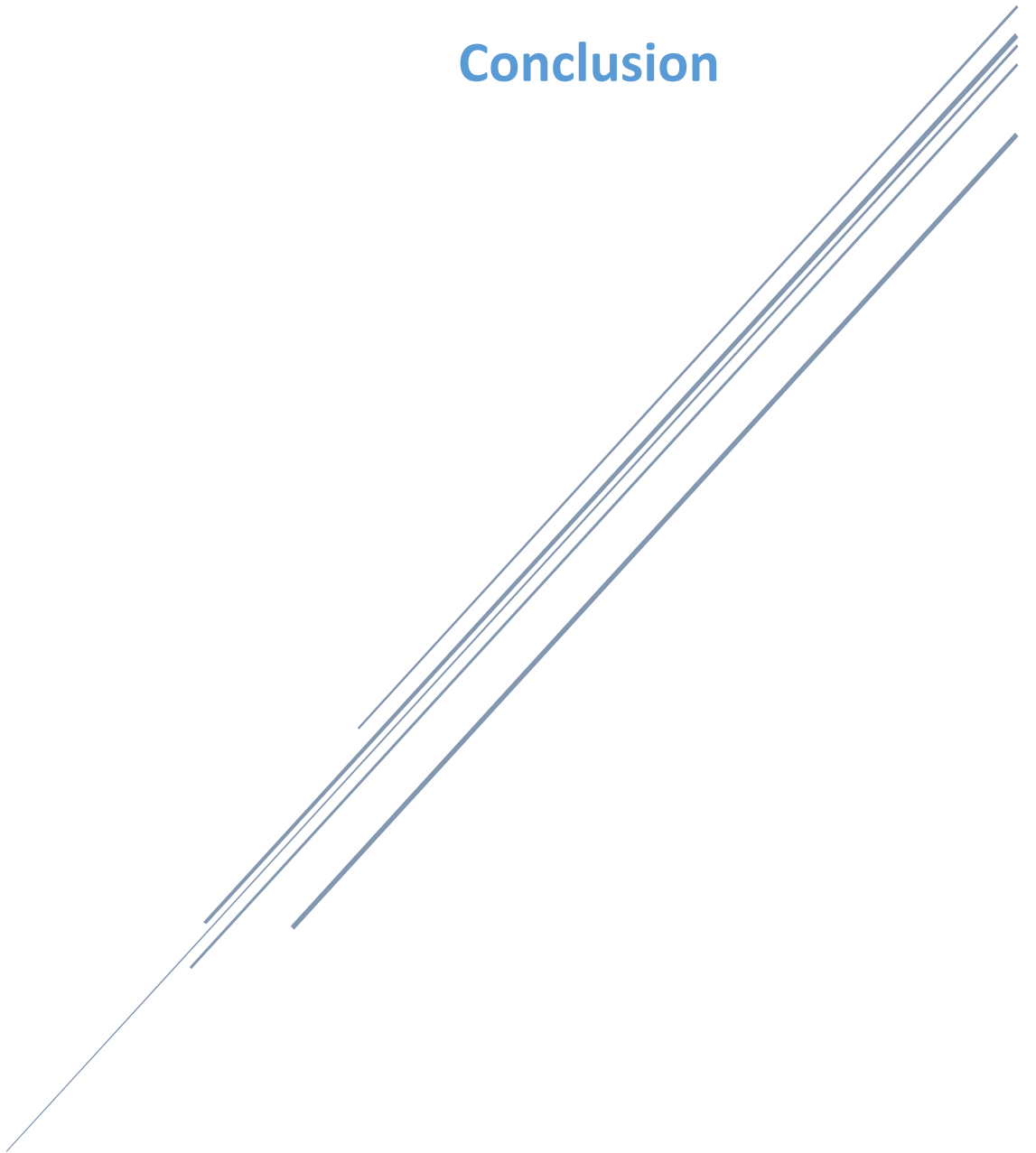
Tests	Isolat (K)	Isolat (14)
NO3	-	-
TRP	-	-
GLU	-	-
ADH	-	+/-
URE	-	-
ESC	-	-
GEL	+	+
PNPG	-	-
GLU	+	-
ARA	+	+
MNE	+	+
MAN	+	+
NAG	+/-	+
MAL	-	+/-
GNT	+	+
CAP	+	+
ADI	-	-
MLT	+	-
CIT	+	+
PAC	-	-
OX	+	+

(-) : négative, (+) : positive, (+/-) : plus au moins



**Figure 18.** Galerie biochimique API 20 NE de *Pseudomonas fluorescens*.

## Conclusion



## Conclusion

A la lumière des résultats obtenus, l'utilisation des pesticides dans l'agriculture comme traitement antimicrobien plus particulièrement contre des bactéries a un impact sur l'environnement, peuvent affecter les fonctionnalités primordiales de la bactérie tel que la fixation d'azote et la production de siderophores nécessaires pour maintenir la plante en bonne santé.

Il à été clairement vu que les isolats étudiés montent une résistance au cuivre, mais ils ne s'expriment pas de la même manière. Les valeurs de la CMI obtenues indiquent d'une part, que les *Pseudomonas* fluerescents ayant le pouvoir de résister au cuivre et même de l'accumuler à des concentrations inférieur ou égale 1,5 mM, d'autre part représente une croissance stimulée par ces métaux lourds.

Nous avons aussi démontré que le type de milieu de culture utilisé joue un rôle important dans la croissance de *Pseudomonas* fleuorescent et même celui qui contient le cuivre.

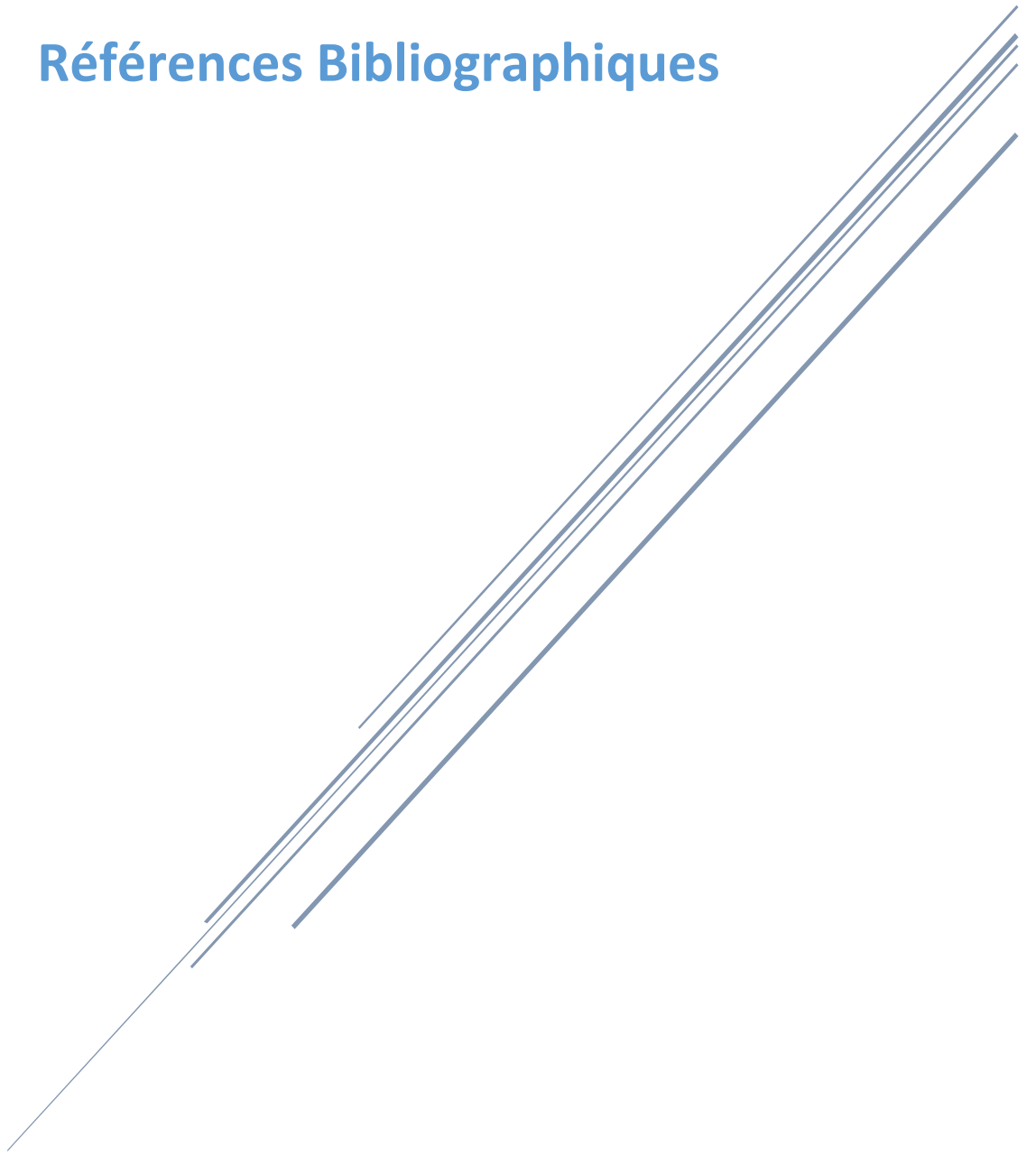
Toutefois, ces deux bactéries identifiées font partis de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

Comme l'objectif de ce travail été d'évaluer le comportement de *Pseudomonas* fluorescent qui se trouve dans un milieu contient de cuivre. Cependant, il est conseiller de diminuer ou bien minimiser l'utilisation de ce genre de traitement agricole dans la culture de la vigne qui influe par conséquence d'une façon négative sur la plante et de réfléchir à l'exploitation de ces bactéries PGPR et en même temps résistantes aux pesticides.

En perspectives, la poursuite de ce travail peut être élargie aux points suivants :

- Déterminer les mécanismes de résistance de *Pseudomonas fluorecsens* au cuivre.
- Vérifier est ce que *Pseudomonas fluorecsens* à une résistance vis-à-vis d'autres métaux lourds.
- Appliquer (*in situ*) les *Pseudomonas* comme PGPR et accumulateurs de métaux.

## Références Bibliographiques



## Références bibliographiques

A

- **Adam A.** 2008. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de Doctorat., université de liège, Belgique : 165.
- **Agence canadienne des médicaments et des technologies de la santé,** 2015. Surfaces de cuivre antimicrobiennes pour réduire les infections associées aux soins de santé dans le contexte des unités de soins intensifs, N° 133 :12
- **Aiello D, Vitale A, Ferrante P, Polizzi G.** 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in sicily and occurrence of copper-resistant strains. Journal of Plant Pathology, vol **97** (2), 273-282.
- **Altimira F, Yáñez A, Vergara M G, Rojas A L.** 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile, Article in BMC Microbiology, 12
- **Andersen G L, Menkissoglou O, Lindow S E.** 1991. Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae*. Isolated from fruit trees in California, Ecology and Epidemiology, vol **81**(6), 648-656.
- **Arabi A,** 2018. Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine. Thèse de Doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie, 158.
- **Arif F, Silini A, Cherif S H, Ghoul M.** 2015. Plant Growth Promoting and antagonistic traits of indigenous Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Isolated from wheat rhizosphere and *A. Halimus* Endosphere. European Scientific Journal August 2015 edition, vol **11**(24), 1857- 7431
- **Ashish B, Neeti K, Himanshu K.** 2013. Copper toxicity: A comprehensive study. Research Journal of Recent Sciences, Vol **2**, 58-67.
- **Aurea,** 2017. Conséquences des excès de cuivre dans les sols et les végétaux.
- **Aydin G S. Tatlidil E.** 2014. The effects of a copper mining on environment changes and human living with in the concern of EU policy. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, vol **11** (3), 60-66.

## B

- **Baldi I. Cordier S. Coumoul X. Elbaz A. Gamet L. LE Bailly P. Multigner L. Rahmani R. Spinosi J. Van Maele-Fabry G.** 2012. Pesticides : effets sur la santé. Inserm.
- **Benmati M.** 2014. PGPR, paranodules, stimulation de la croissance et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : Aspects moléculaires et génétiques. Thèse de Doctorat, Université Constantine 1. Alger 181.
- **Berriau G.** 2012. L'utilisation du cuivre en viticulture : réduction de doses, seuil de toxicité et réglementation. Synthèse bibliographique des essais menés par l'ITAB, l'IFV, l'INRA de Dijon, les Chambres d'agriculture du Val de Loire. N°115.
- **Bhattacharyya P, Dhruva K.** 2012. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. World journal Microbiologie and Biotechnologie, vol 28:1327-1350
- **Bisone S.** 2012. Décontamination de sol contaminé par du cuivre du zinc et des HAP provenant de déchets métallurgiques. Thèse de Doctorat, université de Québec.
- **Blair A, Wesseling C, Freeman L.B.** 2014. Pesticides and human health, Article in Occupation and Environmental Medicine.
- **Bolognesi C, Merlo D.F.** 2011. Pesticides: Human health effects. Journal of Nriagu, Ed., Encyclopedia of Environmental Health, 438- 453.
- **Bresson J.** 2014. Interaction plante micro- organisme : implication de la rhizobactérie *Phyllobacterium Brassicacearum* dans les réponses d'*Arabidopsis thaliana* au stress hydrique. Thèse de Doctorat, Université montpellier II. 220.

## C

- **Calvet R, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, Charnay M P, Coquet Y.** 2005. Les pesticides dont le sol (conséquence agronomique et environnementale). Edition France Agricole. paris, 628.
- **Canadian Copper & Brass Development Association (CCBDA).** 2007. Les surfaces antimicrobiennes en cuivre N° 155.
- **Chen x, Shi j, Chen Y, Xu X, ShengYou X, Wang Y.** 2006. Tolerance and biosorption of copper and zinc by *Pseudomonas putida* CZ1 isolated from metalpolluted soil, Canadian Journal Microbiology, Vol 52: 308–316.

- **Coulibaly K, Kébé B.I, Aka A.R. Kouakou K, N'Guessan W, Tahi G.M, Kassin K E,**

*D*

- **Delarras C.** 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire. 2<sup>e</sup> ED, TEC & DOC. Paris, 743.
- **Djibaoui R, Bensoltane A.** 2005. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*, African Journal of Biotechnology, Vol 4 (7), 697-702.

*E*

- **Erhunmwunse N.O, Dirisu A, Olomukoro J.O.** 2012. Implication of pesticides usage in Nigeria, Tropical Freshwater Biology, vol 21 (1) 15- 25.

*F*

- **Ferret C.** 2012. Role des pseudomonas fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse de Doctorat, université de Strasbourg.333.
- **Francisco M. C, Eva A, Ane S, Alejandro P G, Juan C , Jesús M, Antonio V.** 2002. Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* Strains Isolated from Mango Is Encoded Mainly by Plasmids, Vol 92 (8), 909-916

*G*

- **Glick B.R, D.M. Karaturovic, P.C. Newell.** (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting Pseudomonads. Canadian Journal of Microbiology 41: 533-536.
- **Guiraud S B, Assi M E, Koné B, N'Guessan K F.**2017. Bien lutter contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer en Côte d'Ivoire, Centre National De RECHERCHE agronomique.

*H*

- **Haas D, Defago G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat. Rev. Microbiol. 3(4):307-319.

- **Haferburg G, Kothe E** 2007 Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*, vol 47, 453–467.
- **Hemier A.** 2014. Effet des métaux lourds (cuivre et zinc) sur les paramètres chimiques morphologiques et biométriques de la tomate (*Lycopersicon esculentum*). Mill. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie.
- **Huseyin B, Gerald V M, Robert E S, Jaw-Fen W, Savita Sh, Jeffrey B J.** 2005. Characterization of a Unique Chromosomal copper resistance gene Cluster from *Xanthomonas campestris* pv. Vesicatoria, *Environmental microbiology*, Vol 71(12),8284–8291

## I

- **IDDER B.** 2013. Effet de la salinité et des pesticides sur l'interaction plante-*Pseudomonas* spp : Cas de la fève (*Vicia faba* L.). Thèse de magister, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, Algérie, 103.
- **Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).** 2018. Résumé de l'expertise scientifique collective, 7.
- *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol 6(7), 1335-1344.

## J

- **Jean L P.** 2001. Tout cuivre or not tout cuivre. *Les quatre saisons* N°126 : 29.
- **Juc L.** 2008. Etude des risques liés à l'utilisation des pesticides organochlorés et impact sur l'environnement et la santé humaine. Thèse de Doctorat, université Claude Bernard - Lyon I.184.

## K

- **Khan A, Khan S, Khan M A, Qamar Z, Waqas M.** 2015. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol 22(18), 13772-13799.
- **Konieczny J, Rdzawski Z.** 2012. Antibacterial properties of copper and its alloys. *International scientific journal*, Vol 56(2),53-60.

## L

- **Leyral Guy, Joffin Jean-Noël.** 1998. Microbiologie technique 2, CRDP d'Aquitaine, 304.
- **Luc Masson J.** 2015. Le cuivre sur les surfaces en milieux de sante pour lutter contre les infections nosocomiales. Thèse de Doctorat, Université de lorraine. 88.
- **Lugtenberg B, Kamilova F.** (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology, 63, 541–556.

## *M*

- **Maksymiv I.** 2015. PESTICIDES: BENEFITS AND HAZARDS. Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University, Vol 2 (1), 70-76.
- **Martineau B.** 1996. Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. ED, DECLARIE, Montréal.
- **Massy A G. Thompson N R. Johnson B F G. Davis R.** 1973. The chemistry of copper silver and Gold . First edition. Germany: 186.
- **Meliani A, Belaouni H A, Bensoltane A.** 2012. Comparative studies of plant growth promotion and IAA secretion with *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Quirama ,Medellín – Colombia, 94
- **Mezaache S.** 2012. Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de Doctorat, université Ferhat Abbas Sétif : 141

## *O*

- **Olivars M. Pizarro F. Speiksy H. Lonnerdal B. Uauy R.** 1998. Value for copper content of drinking water. Copper in Infant Nutrition: Safety of World Health Organization Provisional Guideline. Journal of pediatric Gastroenterology and nutrition, 26:251.
- **Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** 1991. Utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique, 145.
- **Oskarsson A. Norrgren L.** 1998. Copper pipes as a source of copper exposure in man and environment, environ: Rev, vol 6: 193-150.

## *P*

- **Pankaj K, Dubey R C, Maheshwari D K et Bajpai V K.** 2016. Isolation of plant growth promoting *Pseudomonas* sp. PPR 8 from the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L, vol 68(2):363-374
- **Pelmont J.** 2005. Biodégradations et métabolismes, EDP science. France.798
- **Petra H.** 2005. Evaluation du comportement du cuivre et du zinc dans une matrice de type sol à l'aide de différentes méthodologies. Thèse de Doctorat. Institut National des sciences appliquées de lyon. 161.

## R

- **Rajbanshi A.** 2008. Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Sewage Treatment Plant, Central Department of Microbiology, Vol 6: 52-57
- **Ramos A et Rosato B.** 1996. Copper accumulation in *Xanthomonas campestris* pv. *Visicatoria*. Brazilian journal of Genetics, Vol 19(4). 551-554.
- **Regnault – Roger C.** 2014. Produits de protection des plantes. Tec & Doc. Paris, 330.
- **Rojas-Tapias D F, Bonilla R, Dussán J.** 2011. Effect of Inoculation with Plant Growth Promoting Bacteria on Growth and Copper Uptake by Sunflowers. 223:643–654.

## S

- **Saranraj P.** 2014. Biocontrol potentiality of Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) – *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: AR: African journal of agricultural research. vol 9(16): 1265-1277.
- **Siddiqui Z A.** 2006. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer. India, 300.
- **Sindy G M.** 2006. Les métaux (Cd, Cu, Pb et Zn) dans la production des microalgues sur différents milieux de culture : biodisponibilité, bioaccumulation et impact physiologique. Thèse de Doctorat, Université de Nantes. 231.
- **Stanzin D. Disket D. Richa Sh.** 2017. Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*.

## T

- **Thomas L.** 2011. Mécanismes de rétention du cuivre dans les sols : évaluation statistique des approches macroscopiques et spectroscopiques. Thèse de Doctorat, Université de grenoble. 265

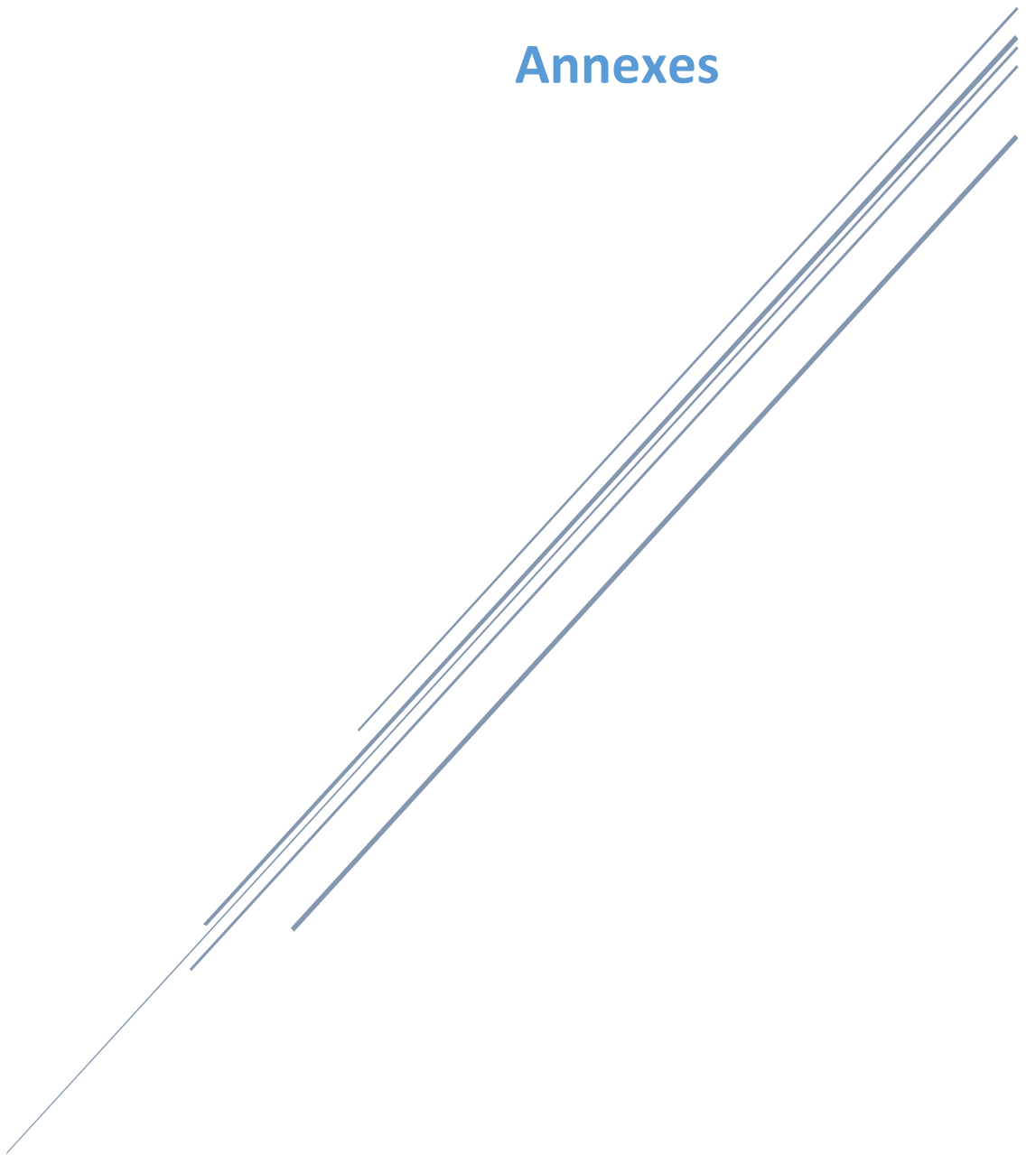
## V

- **Véronique S.** 2007. Homéostasie et résistance au cuivre chez *cupriavidus metallidurans* ch34 : la protéine coph et les transporteurs membranaires cusa et czca. Thèse de Doctorat. Université Joseph fourier – Grenoble I. 325.
- **Vidhyasekaran P, Rabindran R, Muthamilan M, Nayar K, Rajappan K, Subramanian N, Vasumathi K** 199). Development of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. *Plant Pathology*, 46: 291-297.
- **Virender S, Chauhan P K, Rohini K, Tejpal D , Vinod K.** 2010. Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to Heavy metals contaminants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* , Vol 3(2), 164-167

y

- **Yruela I.** 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal, Plant physiology*, 17(1):145-156.

## Annexes



### **Coloration de Gram**

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50 - 60° (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1mm.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.  
Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°. Les lames doivent être parfaitement sèches.
- Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

## L'OXYDASE

### 1. Intérêt

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram -.

### 2. Principe

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.



### 3. Technique

- placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque



#### Remarques :

- Ne pas utiliser l'anse métallique pour prélever les bactéries. En effet, le métal peut être recouvert d'un oxyde et donner un résultat faussement positif.
- Le milieu solide ne doit pas contenir d'indicateur de pH, ni de glucides

### 4. Lecture

Pas de lecture avant 30 secondes environ

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :
Oxydase +	Oxydase -

#### Causes d'erreurs :

- réalisation du test sur un milieu glucidique (une fermentation peut cocher une respiration)
- humidification trop importante du disque, entraînant une élimination du réactif
- quantité de bactéries insuffisante
- réactif périmé (l tester avec une souche oxydase + et une souche oxydase -)
- utilisation d'un instrument « oxydase + »
- lecture trop tardive : au delà de 30 secondes

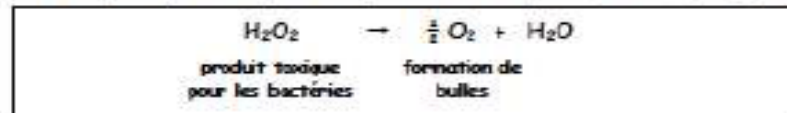
## LA CATALASE

### 1. Intérêt

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

### 2. Principe

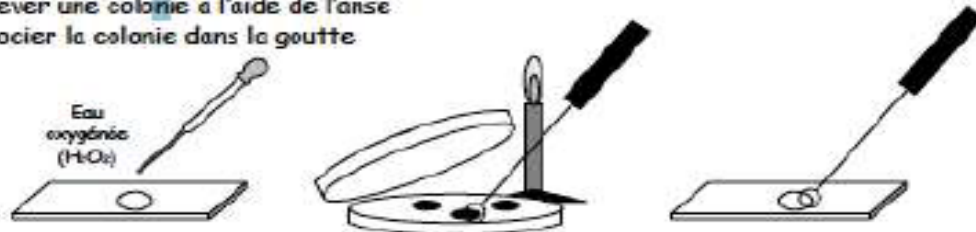
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

### 3. Technique

- déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- prélever une colonie à l'aide de l'anse
- dissocier la colonie dans la goutte



**Remarque :** l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

### 4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + <span style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 30px; height: 30px; vertical-align: middle; text-align: center; margin-left: 10px;">O<sub>2</sub></span>	Catalase - <span style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 30px; height: 30px; vertical-align: middle; text-align: center; margin-left: 10px;">○</span>

#### Causes d'erreurs :

- o réalisation du test sur un milieu contenant la catalase  
**Exemple :** réalisation du test à partir de colonies prélevées sur gélose au sang (l'hémoglobine possède une activité catalasique pouvant donc donner des résultats faussement positifs)
- o quantité de bactéries insuffisante
- o eau oxygénée périmée (la tester avec une souche catalase +)

## Milieux de culture

### Gélose nutritive

Extrait de viande...	1,0g
Extrait de levure.....	2,0 g
Peptone.....	5,0g
Chlorure de sodium.....	15,0 ml
Agar .....	15,0 g
Eau distillée.....	100 g
pH.....	7,4

### milieu BN liquide

Peptone de caséine .....	20 g
Sulfate de magnésium .....	1,5 g
Phosphate bi-potassique.....	1,5 g
Glycérol .....	10 ml
Eau distillée QSP.....	1000 ml
pH :.....	7,2

### King B solide

Peptone de caséine .....	20 g
Sulfate de magnésium .....	1,5 g
Phosphate bi-potassique.....	1,5 g
Glycérol .....	10 ml
Agar .....	20 g
Eau distillée QSP.....	1000 ml
pH :.....	7,2



## API 20 NE – SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES BACILLES À GRAM NÉGATIF NON ENTÉROBACTÉRIES

d'après bioMérieux sa

**TABLEAU DE LECTURE**

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	nitrate de potassium	réduction des nitrates en nitrites	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u>	
		réduction des nitrates en azote	incolore	rose-rouge
TRP	tryptophane	formation d'indole	<u>Zn / 5 min</u>	
			rose	incolore
GLU	glucose	fermentation	<u>JAMES / immédiat</u>	
ADH	arginine	arginine dihydrolase	incolore vert pâle / jaune	rose
URE	urée	uréase	bleu à vert	jaune
ESC	esculine	hydrolyse (β-glucosidase)	jaune	orange / rose / rouge
GEL	gélatine (à l'encre de chine)	hydrolyse (protéase)	jaune	orange / rose / rouge
PNPG	p-nitrophényl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	jaune	gris / marron / noir
[GLU]	glucose	assimilation	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
[ARA]	arabinose	assimilation	incolore	jaune
[MNE]	mannose	assimilation	transparence	trouble
[MAN]	mannitol	assimilation	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	assimilation	transparence	trouble
[MAL]	maltose	assimilation	transparence	trouble
[GNT]	gluconate	assimilation	transparence	trouble
[CAP]	caprate	assimilation	transparence	trouble
[ADI]	adipate	assimilation	transparence	trouble
[MLT]	malate	assimilation	transparence	trouble
[CIT]	citrate	assimilation	transparence	trouble
[PAC]	phényl-acétate	assimilation	transparence	trouble
OX	tétraméthyl-p-phenylène diamine	cytochrome-oxydase	<u>OX / 1-2 min</u>	
			incolore	violet

**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /  
TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE**

% de réactions positives après 24-48 h à 30°C / % of positive reactions after 24-48 hrs at 30°C /  
% der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 30°C /  
% de las reacciones positivas después de 24-48 h a 30°C / % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 30°C

API 20 NE	V6.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100
<i>Brevundimonas vesicularis</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Comamonas acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Comamonas testosteroni/Ps.alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Chryseomonas luteola</i>		78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Flavimonas oryzae</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99
<i>Shewanella putrefaciens</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingomonas paucimobis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	99	4	95	70	0	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99
<i>Aer.salm.ssp masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100	100
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Alcaligenes denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	100
<i>CDC gr. IV C-2</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	12	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Moraxella spp</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella haemolytica</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio hollisae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	17	0	99	50	0	0	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100