

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département de Biologie



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par

BOURAHLA Nesrine

&

MIMOUNI Halima Esaadia

Thème :

Caractérisation du potentiel antagoniste de la flore Pseudomonas rhizosphérique vis - à - vis des phytopathogènes

Soutenue le 25/06/2023 devant le jury composé de :

| | | | |
|--------------------|--------------------------|------------|---------------------------------|
| Président | Mr BOUZNEB Ahcene | MCB | Université de Mostaganem |
| Encadreur | Mr HAMOUM Hakim | MCB | Université de Mostaganem |
| Examinateur | Mr ARABI Abed | MCB | Université de Mostaganem |

Année Universitaire : 2022/2023



Remerciement

Avant toute chose, nous remercions DIEU le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour nous pouvoir accomplir ce travail.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr Hamoum Hakim**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier aux membres de jurys **Mr. Bouzned A** et **Mr. Arabi A** pour avoir accepté d'évaluer notre travail*

*Nous remercions **Mr Aiat saada Dj** et **Mr Mkhaldi A.***

Nous remercions les personnels techniques des laboratoires.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, d'une façon ou d'une autre, à l'aboutissement de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail a

Ma mère et mon père mes sources de courage et de réussite, qui m'ont donné tout l'amour et le soutien moral dont j'avais besoin pour surmonter les obstacles et épreuves de la vie, la réalisation de ce travail est le témoignage sincère de ma gratitude ainsi que le fruit de leurs efforts.

A mes frères et mes sœurs qui m'ont soutenu dans les moments les plus difficiles.

À tous les membres de ma famille

A tous mes amis (es) et collègues de la promotion

Halima

Dédicace

Je dédie ce travail premièrement à mes chers parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur aide précieuse et leur soutien tout le long de mes études.

A :

Mon cher mari en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le réconfort.

Ma belle famille Mes très chers frères et ma sœur qui m'ont toujours encouragé à aller de l'avant

Toute ma famille Tous mes amis (es) et camarades de la promotion

Nesrine

Sommaire

| | |
|--|------|
| Remerciements | I |
| Dédicace | Ii |
| Sommaire | Iv |
| Liste des abréviations | Vi |
| Liste des tableaux | Vii |
| Liste des figures | viii |
| Résumé | Ix |
| Abstract | X |
| ملخص | Xi |
| Introduction | 01 |
| Chapitre I : revue bibliographique | |
| I.1. Rhizosphère | 04 |
| I.1.1. Rhizodéposition | 04 |
| I.1.2. communauté microbienne de rhizosphère | 05 |
| I.2. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes(PGPR) | 06 |
| I.2.1 Mécanismes d'action des PGPR | 06 |
| I.2.2 Mécanismes directs et indirects des PGPR | 06 |
| I.3. les maladies des plantes | 07 |
| I.3.1 Champignons phytopathogène | 08 |
| I.3.2 Les toxines | 08 |
| I.4. L'activité Antagoniste | 09 |
| I.4.1. Production de substances inhibitrices ou toxiques | 09 |
| I.5. <i>Les pseudomonas</i> : | 10 |
| I.5.1. caractéristiques métaboliques | 11 |
| I.5.2. Classification du genre <i>pseudomonas</i> | 11 |
| I.5.3. <i>Pseudomonas</i> comme PGPR | 12 |
| Chapitre II: matériels et méthodes | |
| II.1. Echantillonnage | 15 |
| II.2. Isolement des <i>Pseudomonas</i> | 16 |
| II.3. Purification et Conservation | 16 |
| II.4. Identification des isolats | 16 |
| II.4.1. Caractérisation macroscopique et microscopique | 16 |
| II.4.2 Caractérisation biochimique | 17 |

| | | |
|-----------|--|----|
| II.4.2.1. | test d'oxydas | 17 |
| II.4.2.2. | Type respiratoire | 17 |
| II.5. | Microorganismes phytopathogènes utilisés | 17 |
| II.6. | Test antagonisme | 17 |
| II.7. | Testes PGP | 18 |
| II.7.1. | Production d'acide indole acétique | 18 |
| II.7.2 | Solubilisation de phosphate | 18 |
| II.8. | Les activités enzymatiques | 18 |
| II.8.1. | Dégradation d'amidon | 18 |
| II.8.2. | Dégradation de Cellulose | 19 |
| II.8.3. | Dégradation de Pectine | 19 |

Chapitre III : résultats et discussion

| | | |
|----------|--|----|
| III.1. | Isolement des <i>Pseudomonas</i> | 21 |
| III.2. | Identification des isolats | 21 |
| III.2.1. | Caractérisation macroscopique et microscopique | 21 |
| III.2.2. | Caractères biochimiques | 22 |
| III.3. | Test d'antagonisme | 22 |
| III.4. | Activités enzymatiques | 24 |
| III.4.1. | Recherche d'amylase | 24 |
| III.4.2. | Recherche de cellulase | 24 |
| III.4.3. | Pectinase | 24 |
| III.5. | Testes PGP | 25 |
| III.5.1. | Solubilisation de phosphate | 25 |
| III.5.2. | La production d'acide indole acétique AIA | 26 |
| III.6. | Discussion | 28 |

Liste des abréviations

PGPR : plant growth promoting rhizobacteria (Bactéries promotrices de la Croissance des Plantes)

PGP : Plant Growth Promotion

PDA : Potato Dextrose Agar

PVK : Pikovskaya

GN : gélose nutritive

VF : viande-foie

AIA : acide indole acétique

LB : Luria-Bertani

DO : Densité optique

ES : Efficacité de solubilisation

HCN : de l'anglais « Hydro cyanidric acid »

CMC : carboxymethylcellulose

Liste des tableaux

| | | |
|-----------|--|----|
| Tableau 1 | Coordonnées cartographique des prélèvements | 16 |
| Tableau 2 | Activité d'antagonisme | 23 |
| Tableau 3 | Les activités enzymatiques et les testes PGP | 27 |

Liste des figures

| | | |
|-----------|---|----|
| Figure 1 | Site de production des différentes classes de rhizodépôts le long d'une racine. | 05 |
| Figure 2 | Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries | 10 |
| Figure 3 | Prélèvement des échantillons de sol | 15 |
| Figure 4 | Aspect macroscopique des isolats | 21 |
| Figure 5 | Aspect microscopique des isolats | 22 |
| Figure 6 | Activité antagoniste des isolats | 23 |
| Figure 7 | Production de cellulose et l'amylase par les isolats | 24 |
| Figure 8 | Les activités enzymatiques des isolats | 25 |
| Figure 9 | Efficacité de solubilisation du phosphate par les isolats | 25 |
| Figure 10 | Taux de production de l'acide indole acétique par les isolats | 26 |
| Figure 11 | Les activités PGP des isolats | 26 |

Résumé

Les bactéries de la rhizosphère jouent un rôle important dans la lutte contre les champignons phytopathogènes et dans l'amélioration de la croissance des plantes par une grande variété de mécanismes. Notre étude a porté sur la recherche et la sélection de ces bactéries, vingt-quatre isolats ont été isolés à partir de la rhizosphère des différentes plantes cultivées dans la région de Safsaf et Achâacha. Les isolats ont été testés pour évaluer leur pouvoir antagoniste à l'égard de dix champignons phytopathogènes. Ils ont également été testés pour leur capacité de produire les enzymes dégradant la paroi cellulaire (pectinase ; amylase ; cellulase) ainsi que les activités liées à la PGP (AIA et solubilisation de phosphate). Les résultats ont montré que la majorité des isolats présente une activité antagoniste vis-à-vis des champignons phytopathogènes. La plupart des isolats ont la capacité de production des enzymes hydrolytiques (cellulase et amylase), et pour l'enzyme pectinase les 24 isolats ont été incapables de produire cette enzyme. Quatre isolats ont été capables de solubiliser le phosphate. Huit isolats étaient productifs d'acide indole acétique. L'ensemble des caractères PGP des divers isolats étudiés dans la présente étude suggèrent que ces microorganismes peuvent favoriser la croissance des plantes.

Mots clés : rhizosphère, PGP, AIA, phosphate, pectinase, amylase, cellulase.

Abstract

Rhizosphere bacteria play an important role in controlling plant pathogenic fungi and enhancing plant growth through a wide variety of mechanisms. Our study focused on the research and selection of these bacteria, twenty-four isolates were isolated from the rhizosphere of different plants grown in the region of Safsaf and Achâacha. The isolates were tested to assess their antagonistic potency against ten phytopathogenic fungi. They are also tested for their ability to produce cell wall degrading enzymes (pectinase; amylase; cellulase) as well as PGP-related activities (AIA and phosphate solubilization). The results showed that the majority of isolates present antagonistic activity against phytopathogenic fungi. Most isolates have the ability to produce hydrolytic enzymes (cellulase and amylase), and for the enzyme pectinase all 33 isolates were unable to produce this enzyme. Four isolates were able to solubilize phosphate. Eight isolates were productive of indole acetic acid. The set of PGP characters of the various isolates studied in the present study suggest that these microorganisms can promote plant growth.

Keywords: rhizosphere, PGP, AIA, phosphate, pectinase, amylase, cellulase.

ملخص

تلعب بكتيريا Rhizosphere دوراً مهماً في السيطرة على الفطريات المسببة للأمراض النباتية وتعزيز نمو النبات من خلال مجموعة متنوعة من الآليات. ركزت دراستنا على البحث واختيار هذه البكتيريا، حيث تم عزل أربع وعشرين عزلة من ريزوسفير نباتات مختلفة في منطقة الصفصاف وعشاشة. تم اختبار العزلات لتقييم فاعليتها المضادة لعشرة فطريات ممرضة للنبات. تم اختبارها أيضاً لقدرةً على إنتاج الإنزيمات المحللة لجدار الخلية (البكتيناز، الأميليز، السليلولاز) بالإضافة إلى الأنشطة المتعلقة بـ PGP، حمض الاندولالخليك وإذابة الفوسفات. أظهرت النتائج أن غالبية العزلات لها نشاط مضاد للفطريات الممرضة للنبات. تمتلك معظم العزلات القدرة على إنتاج الإنزيمات (السليلاز والأميلاز)، وبالنسبة لإنزيم البكتيناز، لم تتمكن جميع العزلات الـ 33 من إنتاج هذا الإنزيم. تمكنت أربع عزلات من إذابة الفوسفات. ثمانية عزلات كانت منتجة لحمض الاندولالخليك. تشير مجموعة خصائص PGP للعزلات المختلفة التي تمت دراستها في هذه الدراسة إلى أن هذه الكائنات الدقيقة يمكن أن تعزز نمو النبات.

الكلمات المفتاحية: ريزوسفير، PGP، حمض الاندولالخليك، إذابة الفوسفات، البكتيناز، الأميليز

، السليلاز.



Introduction

Introduction

La quête constante de l'homme pour l'amélioration de la productivité et la réduction des coûts des produits agricoles ont eu des incidences négatives et à plusieurs niveaux. La qualité de l'environnement a été particulièrement touchée : contamination de l'eau par une utilisation intensive de produits phytosanitaires et d'engrais de synthèse, présence dans les aliments de résidus nocifs pour la santé, appauvrissement des sols, réduction de la biodiversité du fait de la présence de mono cultures de masse, et particulièrement la perturbation de la vie microbienne (**Mezaache; 2012**)

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants et constituent une importante part de la diversité génétique de la planète. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 10^{10} à 10^{11} bactéries (**Horner-Devine et al; 2003**), de 6000 à 50000 espèces bactériennes (**Curtis et al; 2002**) et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques (**Leake et al; 2004**). De plus, les microorganismes jouent un rôle clé et influencent un grand nombre des processus des différents écosystèmes incluant l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (**Pivato et al; 2009**), les cycles géochimiques comme celui de l'azote (**Kowalchuk et Stephen; 2001**) ou du carbone (**Högberg et al; 2001**) et la structure du sol (**Rillig et Mummey; 2006**). Cependant, leur impact sur la productivité et la diversité des plantes est encore mal compris. Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. (**Mezaache; 2012**)

La microflore rhizosphérique est naturellement constituée d'un assemblage complexe de microorganismes procaryotes et eucaryotes (**Cardon et Gage; 2006**). Parmi ces microorganismes, certains sont présents dans la rhizosphère sans que leur influence sur le développement des végétaux ne soit connue (microorganismes commensaux), certains sont favorables aux plantes (mutualistes) alors que d'autres ont des effets délétères sur les plantes (parasites et phytopathogènes).

La croissance, la santé des plantes et leur diversité sont donc influencées par la diversité des populations microbiennes présentes dans la rhizosphère (**Lemanceau; 1992; Bloemberg et Lugtenberg; 2001; Whipps; 2001; Weller et al; 2002; van der Heijden et al; 2008**). Les rhizodépôts jouent un rôle actif dans la régulation des interactions mutualistes et parasites/pathogènes, entre les plantes et les microbes du sol (**Hirsch et al; 2003**). Deux catégories d'effets bénéfiques des microorganismes sur les plantes peuvent être distinguées (**van der Heijden et al; 2008**) : (i) les effets directs via les organismes microbiens associés à la racine qui mettent en place des relations mutualistes avec les plantes et (ii) les effets

indirects via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère qui modifient les taux d'approvisionnement en éléments nutritifs et la répartition des ressources.

Parmi les microorganismes à effets bénéfiques indirects, il existe notamment des bactéries dont l'effet global favorise la croissance de la plante (**Lemanceau; 1992**). Le terme PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) désignant ces bactéries a été introduit par **Kloepper et Schroth (1978)**. Différents mécanismes sont à l'origine des effets PGPR des bactéries rhizosphériques. Par ailleurs, de nombreuses bactéries sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance saprophyte des microorganismes phytopathogènes. Certaines sont utilisées en agriculture comme agents de lutte biologique (**Bloemberg et Lugtenberg; 2001; Whipps; 2001**).

La microbiologie de la rhizosphère est rapidement devenue un domaine de recherche populaire après que l'on se soit rendu compte que certains genres bactériens tels que *Pseudomonas* a souvent été considérées comme des agents de lutte biologique efficaces contre les pathogènes végétaux du sol en raison de leur production de métabolites comme les antibiotiques, les sidérophores et le cyanure d'hydrogène (**O'Sullivan et O'Gara; 1992; Thomashow et Weller; 1996**).

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes. Des espèces de *Pseudomonas* sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui promouvaient la croissance des plantes. Ces bactéries sont aussi largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes. La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires et à induire l'ISR chez les plantes (**Bloemberg et Lugtenberg; 2001; Whipps; 2001; van Loon; 2007; Weller et al; 2002; 2007**).

Par conséquent, cette étude a pour objectif d'examiner des isolats de *pseudomonas* ayant une activité antagoniste vis-à-vis des phytopathogènes. Pour atteindre ces objectifs, le plan travail suivant a été réalisé :

1. Isolement des *pseudomonas* à partir de la rhizosphère.
2. Etude des caractères morphologiques et biochimiques des isolats.
3. Évaluation de l'activité antagoniste des isolats vis-à-vis des phytopathogènes
4. Évaluation des activités PGP des isolats.



Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1. Rhizosphère

Le terme « rhizosphère » fût utilisé pour la première fois par **Hiltner (1904)** pour désigner la zone des interactions entre bactéries et racines des légumes (**Durand et Knusden; 2002**). Plus tard, **Curl et Truelove (1986)** décrivent la rhizosphère comme « une zone étroite du sol sujette à l'influence des racines, suite à la perte ou à l'exsudation de substances affectant l'activité microbienne ». Ainsi, la rhizosphère (s'étendant à 5 mm en dehors de la surface racinaire) est formée de l'interaction de la plante, du sol adjacent à la racine et des micro-organismes associés (**Durand et Knusden;2002**). Globalement, il existe trois éléments distincts reconnus dans la rhizosphère : la rhizosphère, le rhizoplan, et la racine elle-même.

- La rhizosphère est la zone de sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats affectant l'activité microbienne.
- Le rhizoplan est la surface de la racine, comprenant les particules de sol adhérant fortement.
- La racine est elle-même une partie du système, car certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus des racines internes (**Bowen et Rovira;1999**).

Par leur activité et leurs exsudats, les racines sont qualifiées d'ingénieurs biologiques du sol. Elles permettent le maintien des communautés microbiennes (**Lawton et Jones;1995**).

I.1.1. Rhizodéposition

Selon **Whipps (1990) et Bais et al(2006)**, plus de 40% des photosynthétats de la plante passent au niveau du système racinaire sous forme de rhizodépôts (**Fig. 1**). Il s'agit de composés solubles de faible poids moléculaire tels les sucres ou des acides aminés, facteurs de croissance et des hormones, libérés par diffusion passive hors des cellules racinaires (**Rovira et al., 1979**). Les exsudats sont impliqués dans l'établissement des associations plantesmicroorganismes et déterminent essentiellement la structure des communautés microbiennes dans la rhizosphère en stimulant leur chimiotaxie (**Marschner et al., 2001; Whipps; 2001 ; Somers et al; 2004**).

La structure complexe des communautés microbiennes dépend de la composition des exsudats racinaires (**Yang et Crowley; 2000**), de l'âge de la plante, du type de racines et de la composition du sol (**Anderson et al; 1993 ; Chiariniet al; 1998**).

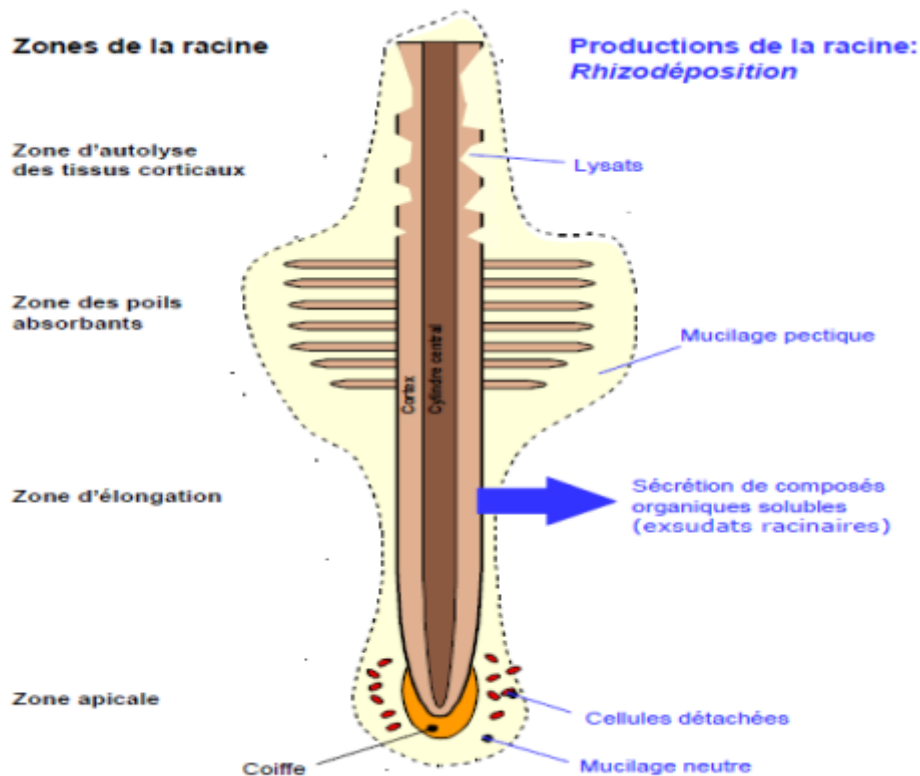


Figure. 1: Sites de production des différentes classes de rhizodépôts le long d'une racine (Gobat *et al.*; 2004).

I.1.2. Communauté microbienne de rhizosphère

Les populations microbiennes sont présentes dans diverses niches écologiques, y compris dans des environnements extrêmes présents à la fois dans la lithosphère et l'hydrosphère, où leurs capacités métaboliques jouent un rôle essentiel dans le cycle géochimique des nutriments (Aeronet *et al.*; 2011; Daniel; 2005; Jha *et al.*; 2011). Les populations bactériennes du sol, en particulier, ont la capacité de se développer rapidement et d'utiliser une très large gamme de substances différentes comme sources de nutriments. La flore bactérienne est dispersée dans le sol, souvent attachée aux particules du sol, et beaucoup interagissent avec les racines des plantes.

La rhizosphère est l'une de ces niches écologiques bien caractérisées qui comprend le volume de sol entourant les racines des plantes avec la population bactérienne la plus élevée qui est influencée par les exsudats des racines, comme l'a défini Hiltner (1904). Il est fréquent que la population bactérienne dans la rhizosphère soit 100 à 1 000 fois plus élevée que dans le sol. Cela s'explique par le fait que ces bactéries possèdent une polyvalence métabolique qui leur permet de s'adapter et d'utiliser efficacement les exsudats racinaires. En

outre, 15 % de la surface des racines est couverte par des populations microbiennes appartenant à plusieurs espèces bactériennes (Govindasamy *et al*;2011 ; Jha *et al*; 2010).

I.2. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes(PGPR) :

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) comprennent des bactéries qui résident dans la rhizosphère et améliorent la santé des plantes, contribuant ainsi à augmenter leur croissance. La majorité des PGPR appartient aux genres *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Pseudomonads* et *Bacillus*. (Glick; 1995 ; Vessey; 2003). Au cours des dix dernières années, le rôle de la rhizosphère en tant que niche écologique dans le fonctionnement de la biosphère a permis aux PGPR de gagner en importance, ce qui a finalement favorisé la recherche visant à comprendre les mécanismes des PGPR dans la rhizosphère. Une rhizobactérie putative est qualifiée de PGPR lorsqu'elle est capable de produire un effet positif sur la plante lors de l'inoculation, démontrant ainsi de bonnes capacités concurrentielles par rapport aux communautés rhizosphériques existantes.

En général, environ 2 à 5 % des bactéries de la rhizosphère sont des PGPR (Antoun&Prévost; 2006; Jha *et al*; 2010 ; Sgroy *et al*; 2009 ; Siddikeet *al*; 2010).

Les PGPR sont des outils potentiels pour l'agriculture durable et les tendances futures. L'un des mécanismes par lesquels les bactéries sont adsorbées sur les particules du sol est l'échange d'ions. On dit d'un sol qu'il est naturellement fertile lorsque les organismes du sol libèrent des nutriments inorganiques à partir des réserves organiques à un rythme suffisant pour assurer une croissance rapide des plantes.

I.2.1. Mécanismes d'action des PGPR

L'effet d'augmentation des PGPR se produit par le biais de divers mécanismes. Le rôle des PGPR n'est pas uniquement mis en œuvre par l'effet direct d'une seule souche bactérienne, mais par le dialogue moléculaire établi entre les micro-organismes du sol et la plante.

I.2.2. Mécanismes directs et indirects des PGPR

Une compréhension approfondie des mécanismes de promotion de la croissance des plantes (PGP) est inévitable pour manipuler la flore rhizosphérique afin de maximiser les processus qui enrichissent fortement la productivité des plantes. Les mécanismes PGP ont été traditionnellement regroupés en mécanismes directs et indirects. La différence entre les deux

n'est pas toujours évidente, les mécanismes indirects, en règle générale, sont ceux qui se produisent à l'extérieur de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement le métabolisme de la plante (**Antoun&Prévost; 2006 ; Glick; 1995 ; Siddikee *et al*; 2010 ; Vessey; 2003**).

Par conséquent, les mécanismes directs comprennent ceux qui affectent l'équilibre des régulateurs de croissance de la plante, soit parce que les micro-organismes eux-mêmes libèrent des régulateurs de croissance qui sont intégrés dans la plante ou parce que les micro-organismes agissent comme un puits d'hormones libérées par la plante, et ceux qui induisent le métabolisme de la plante conduisant à une amélioration de sa capacité d'adaptation (**Glick; 2014; Govindasamy *et al*; 2011**).

En revanche, les mécanismes indirects nécessitent la participation des processus métaboliques défensifs des plantes, qui répondent au signal envoyé par les bactéries influençant la plante. Deux mécanismes importants sont inclus dans ce groupe : l'induction d'une résistance systémique aux agents pathogènes de la plante (stress biotique) et le développement d'un système de défense de la plante et la protection contre les conditions environnementales malsaines (stress abiotique) (**Aeron *et al*; 2011 ; Glick; 2014 ; Jha *et al*; 2011; Ramos-Solano *et al*; 2008**).

I.3. Les maladies des plantes

Lors de leur cycle de vie, les plantes sont confrontées à des stress divers, de nature abiotique (chaleur, froid, sécheresse,..) et biotique (microorganismes, insectes ravageurs, herbivores) (**Mauch-Mani et Métraux, 1998**). Les agents pathogènes de plantes peuvent être classés en deux catégories : ceux qui tuent leur hôte et se nourrissent de son contenu (nécrotrophes) et ceux qui ont besoin d'un hôte vivant pour se nourrir et compléter leur cycle de développement (biotrophes). Cette classification est indépendante du fait que l'infection peut conduire éventuellement à la mort de la cellule hôte. Au champ, plantes et microorganismes pathogènes sont constamment en contact. Les barrières physiques et chimiques tels que la cuticule, la paroi cellulaire et les composés antimicrobiens produits constitutivement protègent la plante contre la majorité des tentatives d'intrusion des microbes.

Dans le cas où un agent pathogène est capable de passer ces barrières on distingue deux types d'interactions selon la réponse de la plante. Soit elle arrête le parasite après sa reconnaissance et on aura une interaction incompatible, la plante est dite résistante et

l'agresseur virulent; soit le développement du parasite s'effectue et on a une interaction compatible, la plante est alors sensible et le microorganisme pathogène est dit virulent (**Jones et Dangl; 2006**).

I.3.1. Champignons phytopathogène

Les champignons sont le plus important groupe de pathogène, l'infection se fait souvent par une ouverture naturelle, stomates, lenticelles, blessures, grâce à la synthèse d'enzymes hydrolytique. Dans l'hôte, le champignon émet des toxines multiples. Les champignons nécrotrophes (comme *Botrytis*), peu spécifiques, dégradent les parois de la cellule hôte. Les champignons biotrophes (comme *Plasmopora*), très spécifiques, développent un haustorium (=suçoir) au contact de la membrane plasmique de la cellule hôte vivante. D'autres espèces sont hémibiotrophes, (comme *Colletotrichum*) responsable de l'antracnose du haricot présentent typiquement une courte phase d'exploitation biotrophe suivi d'une phase d'exploitation nécrotrophe (**Lepoivre; 2003**).

I.3.2. Les toxines

Tout composé produit par un microorganisme, qui est toxique pour les plantes est une phytotoxine. Il joue un rôle causal et produit des symptômes de la maladie chez les plantes sensibles (**Wheeler et Luke; 1963**). Bon nombre de bactéries pathogènes des plantes et champignons produisent des phytotoxines dans la culture et à leurs hôtes (**Höhl et al; 1990**). Les toxines qui affectent les plantes sont divisés en deux catégories : des toxines hôte-sélectives (HST), affecte seulement les plantes hôtes de l'organisme producteur de la toxine, et des toxines non sélectives (NST), causant des symptômes non seulement sur les hôtes de l'agent pathogène, mais sur d'autres plantes. Ainsi HST est habituellement essentielle pour la pathogénicité, c'est-à-dire la capacité de causer la maladie. En conséquence, le rôle de HST dans la maladie est rarement contesté. En revanche, les NST ne sont pas essentielles pour la pathogénicité mais peuvent être contribué à la virulence (**strange; 2003**).

Les symptômes physiques causés par les toxines sur une plante infectée (le flétrissement, chlorose et nécrose) peuvent être facilement observés à l'œil nu dans de nombreux cas, mais la lésion primaire est habituellement biochimique, certains agents pathogènes produisent du matériel qui bloque la conductivité de l'eau de la plante en causant des embolies (**Hamid et Strange; 2000**).

I.4. L'activité Antagoniste

L'antagonisme est défini comme étant le phénomène par lequel un organisme inhibe le développement ou interfère avec les activités d'un autre organisme vivant par la création de conditions défavorables dans les milieux, ou par la production de substances antimicrobiennes. L'antagonisme est l'action d'opposition entre deux systèmes, deux substances, deux fonctions au deux organismes ; créant une situation néfaste pour l'un ou pour l'autre (Weller; 1988).

L'antagonisme stimule la formation des spores et provoque un développement de forme, de taille et de structure des hyphes, de la direction du développement, cessation complète du développement et raccourcissement des segments d'hyphes ou, parfois même lyse du mycélium fongique (Weller; 1988).

I.4.1. Production de substances inhibitrices ou toxiques

Une forme très fréquente d'antagonisme résulte de la production par une espèce microbienne de substances toxiques pour les espèces qui se trouvent à proximité. Ces substances peuvent ne présenter aucune spécificité : elles agissent sur un très grand nombre d'espèces microbiennes. Elles peuvent, au contraire, ne s'avérer toxiques que vis-à-vis de certains groupes ou certaines espèces sensibles. On dit qu'elles sont spécifiques.

L'effet de ces substances est très variable. On distingue en général :

- Un effet bactériostatique ou mycostatique (fongistatique), se traduisant par un arrêt de la croissance de la bactérie ou du champignon.
- Un effet bactéricide ou fongicide, se traduisant par la mort définitive de la bactérie ou du champignon.
- Un effet bactériolytique ou mycolytique, se traduisant par la désintégration ou la lyse des cellules bactériennes ou fongiques.

Les substances inhibitrices ou toxiques ont une structure chimique simple (acides minéraux, par exemple) ou complexe (antibiotiques ou enzymes lytiques) (Dommergues et Mangenot; 1970).

I.5. Les *Pseudomonas* :

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al*; 2000 ; Palleroni et Moore; 2004). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula; 1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Fig.2). Néanmoins, 188 espèces sont actuellement répertoriées sur le site internet <http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>.

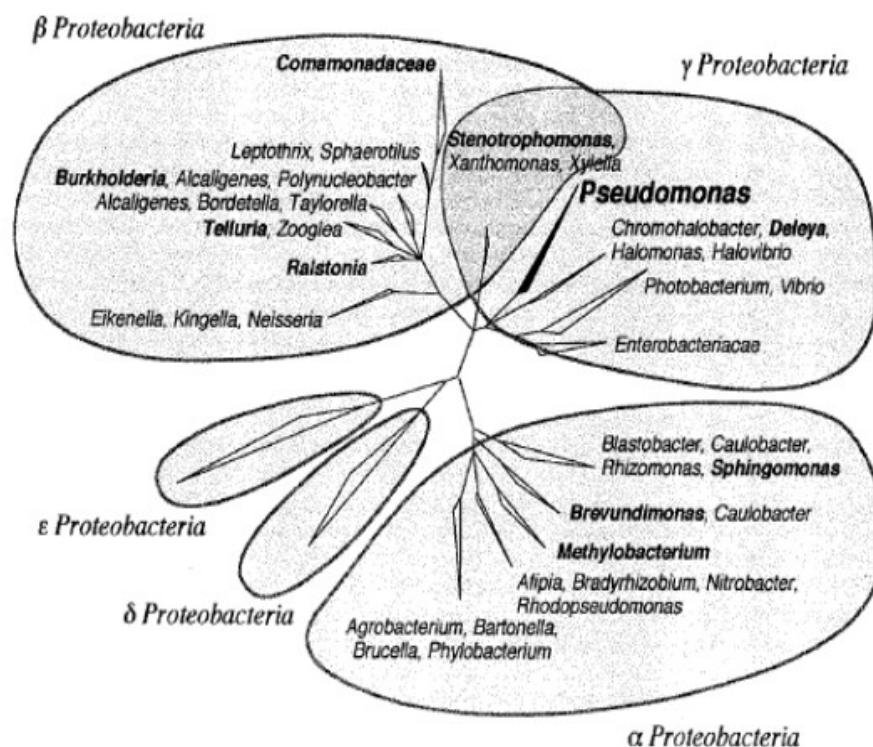


Figure. 2 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Kerstens et al., 1996).

I.5.1. Caractéristiques métaboliques

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose). Les *Pseudomonas spp.* Fluorescents saprophytes possèdent tous un cytochrome oxydase (**Lelliot et al; 1966**). Elles sont aussi catalase positive, mésophile chimio-organotrophe puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Toutefois, certaines sont chimio organotrophes facultatives et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie et n'ont pas besoin de facteurs de croissance pour se multiplier. Elles peuvent utiliser des sources de carbones variables (versatilité nutritionnelle), et certaines ont la capacité de croître même dans l'eau (**Stanier et al; 1966**). La plupart étant saprophytes (**Bossis et al; 2000 ; Ramalhoet al; 2002**).

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

Les températures cardinales aux quelles les espèces se multiplient varient de 4° à 42°C, cette dernière est caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*, alors que la température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5 (**Palleroni; 1984**).

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (**Palleroni; 1984**).

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

I.5.2. Classification du genre *pseudomonas*

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à

métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. Mais cette définition ne permet pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (**Palleroni; 2008**).

I.5.3. *Pseudomonas* comme PGPR

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents associés aux plantes incluent des souches pathogènes et des souches bénéfiques. Les souches influençant avantageusement l'hôte végétal sont désignées sous le terme « plant- probiotic fluorescent *Pseudomonas spp.* » (**Höfte et Altier;2010**). Elles sont connues comme promotrices de la nutrition et la croissance des plantes par la solubilisation de minéraux comme le phosphore, par la production de sidérophores ou par la production de régulateurs de croissance comme les auxines (**Lemanceau; 1992**). Elles peuvent également augmenter le niveau de résistance des plantes aux maladies diverses que le piétin échaudage des céréales, les pourritures des tubercules de pomme de terre, les fusarioses des racines et du collet de la tomate (**Bell-Perkins et Lynch; 2002**).

Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer les effets bénéfiques de *Pseudomonas spp.* fluorescents. Ces bactéries s'attachent d'abord à la racine et sont donc distribuées de façon passive. Puis elles se multiplient et colonisent de façon active la rhizosphère (**Lemanceau; 1992; Brimecombe et al; 2008**). Les exsudats racinaires, et en particulier les sucres et les acides aminés, attirent les bactéries par chimiotactisme à la surface des racines. Ils stimulent notamment la mobilité flagellée des bactéries, ce qui permet à ces dernières de coloniser la rhizosphère (**Weert et al; 2002**). Chez *P. fluorescens* WCS417 les chaînes lipopolysaccharides latérales constituant l'antigène O des LPS bactériens jouent un rôle important dans la colonisation racinaire (**Mercado-Blanco et Bakker; 2007**). L'adsorption des bactéries à la racine résulte d'interactions physico-chimiques et biologiques entre les bactéries et la racine (**Lemanceau; 1992**). Cette seule colonisation peut entraîner une occupation de sites suffisantes pour empêcher la croissance des pathogènes (**Kamilova et al; 2005**).

Les espèces de *Pseudomonas* fluorescents ont un grand pouvoir de chélation du fer et pourraient rendre l'ion ferrique inaccessible aux autres microorganismes. Elles peuvent aussi reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent (**Mercado-Blanco et Bakker; 2007**). D'autres métabolites produits par les *Pseudomonas spp.* fluorescents peuvent

également interférer avec la croissance des phytopathogènes. Le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et les différents dérivés de la phenazine jouent un rôle très important dans son activité antagoniste contre *Gaeumannomyces graminis* (agent de la piétine échaudage). La production de HCN par la souche de *P. fluorescens* CHA0 réduit la pathogénicité des champignons tels *Thielaviopsis basicola*, agent de la pourriture noire du tabac (**Mercado-Blanco et Bakker; 2007**).

Les espèces de *Pseudomonas* affectent également la croissance des plantes en améliorant leur alimentation minérale. *Pseudomonas striata*, *P. cissicola*, *P. fluorescens*, *P. pinophilum*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. aeruginosa*, *P. putrefaciens* et *P. stutzeri* isolées à partir de la rhizosphère du pois chiche, du maïs, du soja et d'autres céréales solubilisent efficacement les phosphates (**Tilak et al; 2005**). D'autre part, la production de l'acide indole-3-acétique (AIA) par *Pseudomonas putida* GR12-2 améliore le rendement du colza (**Patten et Glick; 2002**). La stimulation du métabolisme hormonal de la plante via la sécrétion de phytohormones telles les auxines, les cytokinines et les gibbérellines favorisent le développement racinaire et par conséquent la croissance végétale (**Sandhya et al; 2010**).



Chapitre II :
Matériel et
méthodes

II. matériels et méthodes

II.1. Echantillonnage

Des échantillons de sol ont été prélevés à partir de deux sites de culture situés à Achaâcha et Safsaf à Mostaganem en durant le mois de mars 2023 (**fig. 3**). Les coordonnées cartographique des échantillons sont mentionnés dans le tableau 1. Les sites de prélèvement ont été choisis dans la zone intérieure du champ, le sol supérieur contenant de la matière sèche a été retiré. A l'aide d'équipements stériles, le système racinaire entier ainsi que le sol de la rhizosphère ont été collectés en creusant jusqu'à 15 cm de profondeur. Ces échantillons ont ensuite été placés dans des sacs en plastique stériles puis transporté au laboratoire jusqu'à ce qu'ils soient analysés (**Kennedy et Smith; 1995**).



Figure. 3: Prélèvement des échantillons de sol

Tableau 1: Coordonnées cartographique des prélèvements.

| Echantillons | Coordonnées cartographique (DD''MM'SS'') | Plantes de prélèvement |
|--------------|--|------------------------|
| A | 36° 14' 28.35''N 0° 37' 05.93''E | Fève |
| B | 36° 14' 28.35''N 0° 37' 05.93''E | Pomme de terre |
| C | 36° 14' 28.35''N 0° 37' 05.93''E | Petit pois |
| D | 36° 04' 32.99''N 0°25' 41.73''E | Oignon vert |
| E | 36° 04' 32.99''N 0°25' 41.73''E | Pomme de terre |
| F | 36° 04' 32.99''N 0°25' 41.73''E | Petit pois |
| G | 36° 04' 32.99''N 0°25' 41.73''E | Salade |
| H | 36° 04' 32.99''N 0°25' 41.73''E | Fève |

II.2. Isolement des *Pseudomonas*

L'isolement a été effectué à partir de sol fortement adhérent aux racines. 10 g de sol de chaque échantillon ont été pesé et homogénéisé dans un Flacon contenant 90 ml d'eau physiologique par un vortex. Puis les solutions mère de chaque échantillon ont été utilisé pour préparer des dilutions décimales ainsi des aliquotes de 0,1ml des trois dernières dilutions (10^{-3} ; 10^{-4} et 10^{-5}) ont été utilisés pour ensemercer en surface des boites de pétri contenant le gélose King B, ensuite les boites ont été incubés à 30°C pendant 24 à 48 (**Annexe 1**) (**Liu et al; 2011**).

II.3. Purification et Conservation

La purification des isolats a été effectuée selon la méthode de stries simple sur gélose nutritif GN (**Annexe 1**) et incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures, ensuite les isolats purs obtenues ont été conservées à 4 °C après 24 heures d'incubation à 30°C dans des tubes de gélose nutritif incliné (**Bouras ;2018**).

II.4. Identification des isolats

II.4.1. Caractérisation macroscopique et microscopique

Selon **Holt et al (1994)** et **Bossis et al (2000)**, l'identification préliminaire des isolats de *Pseudomonas* produisant le pigment fluorescent, est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques (morphologie cellulaire), la coloration de Gram, la mobilité,

la recherche de la catalase et de l'oxydase, voie d'utilisation du glucose, ainsi que l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques.

La coloration de Gram est une coloration de base en pratique bactériologique (**Annexe 3**) qui permet de distinguer les bactéries à Gram positif, des bactéries à Gram négatif sur la base de la structure de leur forme et leur caractéristiques, cet examen a été fait sur des frottis minces préparés à partir de colonies de chaque isolat obtenu. Ces frottis sont colorés, puis observée à l'aide d'un microscope optique à grossissements (x100), les bactéries Gram-positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram-négatif sont colorées en rose (**Haichour; 2017**).

II.4.2. caractérisation biochimique

II.4.2.1. Test d'oxydase

Le test d'oxydase a consisté à mettre sur une lame de verre bien nettoyée, un disque préimprégné d'un réactif incolore (la NNdiméthyl-paraphénylène diamine). Ensuite, avec une pipette Pasteur, une colonie a été prélevée puis déposée doucement sur le disque. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rose violacé (**Anne Marie et al; 2018**).

II.4.2.2. Type respiratoire

À l'aide d'une pipette Pasteur, nous avons ensemencée les isolats par piqûre central dans des tubes contenant la gélose viande foie VF (**Annexe 1**), puis incubée à 30°C pendant 24- 48h, le mode de croissance indique le type respiratoire de la bactérie (**Delarras; 2014**). Elle peut être : aérobie stricte : elle a besoin d'oxygène pour vivre et se développer ; micro-aérophile : elle a besoin d'une concentration en oxygène spécifique (inférieure à celle de l'air) ; aéro-anaérobie facultative : la présence d'oxygène en petite quantité est préférable pour le développement de la bactérie mais elle peut s'en passer; anaérobie stricte : la présence d'oxygène est létale pour la bactérie (**Haichour; 2017**).

II.5. Microorganismes phytopathogènes utilisés

Dix champignons phytopathogènes ont été utilisés pour le test d'antagonisme, ils ont été fournis par le laboratoire de microbiologie et biologie végétale. Université de Mostaganem.

II.6. Test d'antagonisme

Les isolats obtenus ont été testés pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis 10 champignons. Un cylindre de 3 mm de diamètre de culture fraîche (6 jours) de chaque champignon a été prélevé et déposé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu Potato

Dextrose Agar (PDA) (**Annexe 1**) (**Rabhi; 2011**), puis inoculée en strie par les cultures bactériennes à tester (à une distance approximative de 2 cm de la souche fongique), quatre isolats ont été ensemencés sur chaque boîte. Les boîtes inoculées ont été incubées à 25°C (selon la température optimale de croissance des espèces fongiques) pendant 7 jours (**Arif; 2015**).

II.7. Testes PGP

II.7.1. Production d'acide indole acétique

La production d'acide indole acétique (IAA) a été testée sur milieu LB supplémenté de 0.2 g/L de tryptophane (**Annexe 1**). Le milieu a été inoculé avec 1ml de culture bactérienne de chaque isolat et incubé à 30 °C pendant 4 jours sous agitation à 160 rpm. Un test colorimétrique a été réalisé selon la méthode de **Loper et Scroth (1986)**. Les cultures ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 20 min ; 1 mL de surnageant a été mélangé avec 2 mL de réactif de Salkowski (**Annexe 2**). Après 30 min, la DO a été mesurée à 530 nm. Les concentrations d'AIA ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage préparée à partir d'une solution d'AIA (**Annexe 4**).

II.7.2. Solubilisation de phosphate

La capacité des isolats à solubiliser les phosphates a été testée sur gélose Pikovskaya (PVK) (**Annexe 1**) contenant du phosphate tricalcique (Ca_3HPO_4) comme seule source de phosphate. Un volume de 10 μL de culture bactérienne de 24h a été déposé sur la surface de la gélose comme décrit par **Gaur (1990)**. Après incubation à 30 °C pendant 7 jours, les diamètres du halo et des colonies ont été mesurés.

L'efficacité de solubilisation a été calculé selon la formule suivante (**Sadiqet al; 2014 ; Sharma et al; 2014**)

$$ES = \frac{\text{diamètre de solubilisation} + \text{diamètre de croissance}}{\text{diamètre de croissance}} \times 100$$

II.8. Les activités enzymatiques

II.8.1. Dégradation d'amidon

Les isolats bactériens ont été ensemencés sur des boîtes de gélose à l'amidon (**Annexe 1**) et incubées à 37°C pendant 48 heures. Après incubation, les boîtes ont été immergés dans une solution de Lugol, l'activité amylolytique a été confirmée par la présence d'une zone claire autour de la croissance bactérienne (**Jan- Mar; 2013**).

II.8.2.Dégradation de Cellulase

La capacité cellulolytique des bactéries a été évaluée en utilisant le milieu de Mandels et Reese (**Mandels et Reese; 1957**) (**Annexe 1**) contenant du sel CMC. Toutes les boîtes inoculées ont été colorées avec une solution de rouge Congo à 1 % pendant 15 minutes après une incubation à 28 °C pendant 48 heures, et distraites avec une solution de NaCl à 1 M pendant 15 minutes (**Teather et Wood; 1982**). Les zones claires de dégradation autour des bactéries étaient positives pour la production de cellulose.

II.8.3.Dégradation dePectine

Le milieu pectine agar (**Annexe 1**) a été utilisé pour la sélection des isolats bactériens productrices de la pectinase. Après incubation à 30°C pendant 48h, les boîtes ont été inondées par une solution d'acétate de cuivre à 75% pendant 10 minutes. Un résultat positif se traduit par un halo clair autour des colonies. A l'inverse, un résultat négatif se manifeste par l'absence de zone d'hydrolyse (**Benkahoulet *al*; 2017**).



Chapitre III :
Résultats et
discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Isolement des *Pseudomonas*

Après purification sur gélose nutritif, nous avons obtenu vingt- quatre (24) isolats purs dont 14 proviennent du sol rhizosphérique de fèves ; 6 de pomme de terre ; 2 de petit pois ; 1 de salade et 1 de l'oignon vert et tous ces isolats ont été conservé sur gélose inclinés.

III.2. Identification des isolats

III.2.1 caractérisation macroscopique et microscopique

L'examen macroscopique des isolats est le premier examen effectué pour l'identification, il nous a montré la présence des colonies de forme rondes, tailles différentes et de consistance crémeuse et certains ont été sèches (fig. 4).

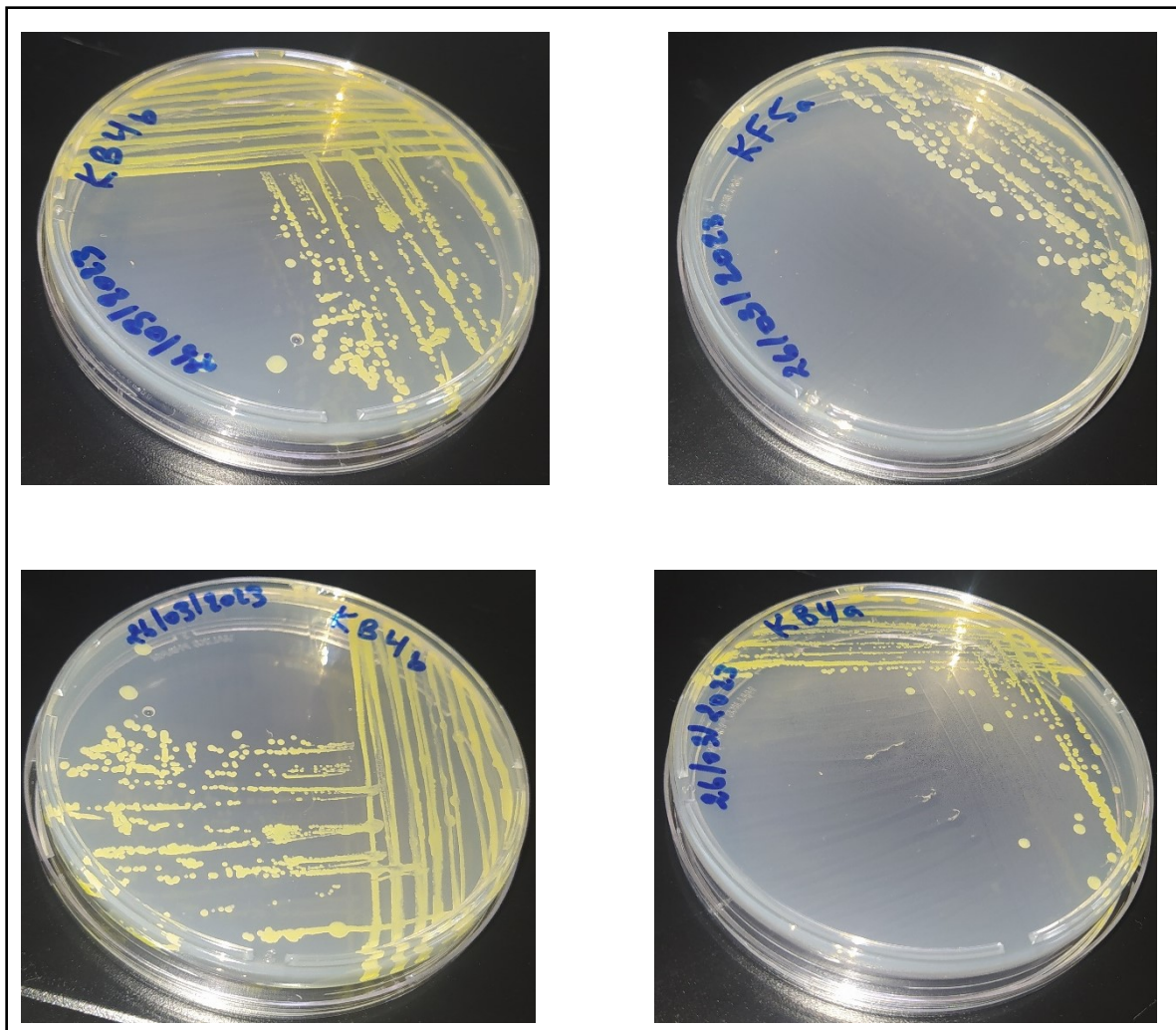


Figure. 4 :Aspect macroscopique des isolats

L'observation microscopique a été faite après coloration de Gram qui nous a permis de différencier les bactéries selon leur forme et leur coloration, le différent isolat rhizosphérique apparait sous forme de bacille fine coloré en rose (gram négatif) (**fig. 5**).

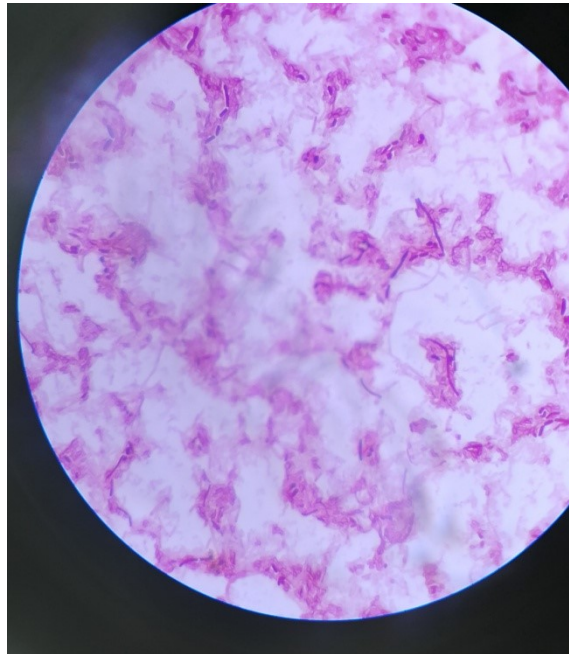


Figure. 5: Aspect microscopique des isolats

III.2.2. Caractères biochimiques

Les 24 isolats ont été inoculée sur des tube contenant la gélose VF pour savoir leur type respiratoire par rapport à leur mode de croissance autour de tube, après incubation la croissance est présenté dans la partie supérieure du tube à essai ce qui explique que les isolats sont des aérobies stricts.

La recherche d'oxydase(changement de couleur à violet sur les disques d'oxydase) est parmi les tests biochimiques d'identification des isolats. Ce teste étaient positive pour l'ensemble des isolats.

III.3. Test d'antagonisme

Le test de l'activité antagoniste des isolats bactériens vis-à-vis les dix champignons montre des résultats positifs pour 12 isolats contre différents champignons(**fig. 6**).

Pour le champignon 10, deux isolats avaient un effet inhibiteur (KG2a, KB3a). Huit isolats contre le champignon 6 (KB3a, KE2, KE5, KB3b, KG10, KG2a, KG4, KA2). Et un seul isolat contre les deux champignons 5 et 4 parles deux isolats KA5b KB3b respectivement (**tab.2**).



Figure. 6 : Activité antagoniste des isolats

Tableau 2: résultats du test d'antagonisme

| Isolats/champignons | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| KB3a | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + |
| KF5b | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KE2 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| KE5 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| KB3b | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - |
| KG9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KG8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KG6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KG2a | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + |
| KG10 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| KG7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KA5b | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| KA2 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| KG11 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KG4 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| KA9b | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KA1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KC5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KB2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KA7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KF5a | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KA9a | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KG2b | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KC4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+ : résultat positif

- : résultat négatif

III.4. Activités enzymatiques

Ces tests ont été réalisés dans le but de déterminer la capacité des isolats obtenue à produire les enzymes nécessaires à la dégradation des sucres complexes telles que la cellulase, la pectinase et l'amylase.

III.4.1. Recherche d'amylase

Les résultats s'expriment par l'apparition d'un halo d'éclaircissement autour des colonies, observé après addition d'une solution de Lugol (**tab.2**).

Des résultats positifs ont été observés chez trois isolats (KB3a, KB3b, KA1) qui s'est traduit par l'apparition d'une zone claire autour des colonies (**fig. 7**), prouvant la dégradation de l'amidon, des résultats négatifs pour le reste des isolats, le reste des isolats étaient négatifs pour le test (**fig. 8**).

II.4.2. Recherche de cellulase

Le pouvoir hydrolytique de cellulose par les isolats est révélé également par la production de cellulases (**fig. 7**). Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (**Verma et al;2007**) (**tab. 1**). Un total de onze isolats étaient producteurs de cellulase ; KB3a ; KE5 ; KB3b ; KG9 ; KG8 ; KG6 ; KG10 ; KG7 ; KA2 ; KA9b et KA1, le reste des isolats étaient négatifs pour le test (**fig.8**).

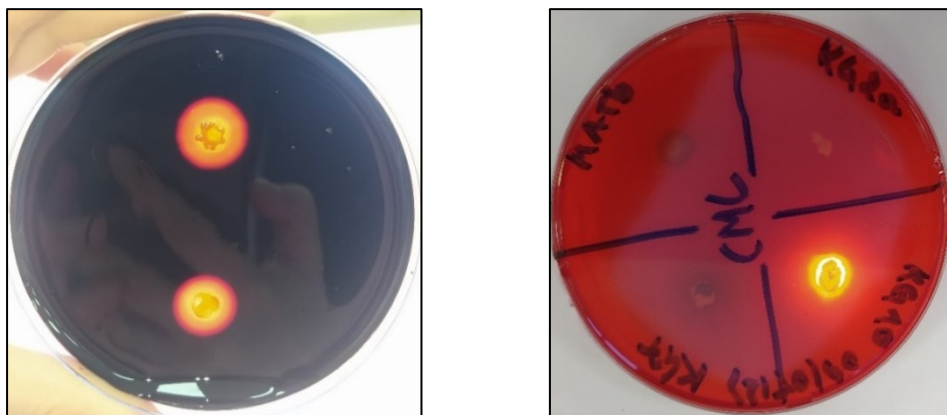


Figure. 7: Production de cellulase et l'amylase par les isolats.

II.4.3. Pectinase

L'activité pectinolytique a été estimée sur gélose à la pectine. Après 48 h d'incubation à 30°, toutes les boîtes ensemencées par les différents isolats avaient une coloration d'acétate de cuivre en bleu indiquant une activité de pectinase négative (**fig. 8**).

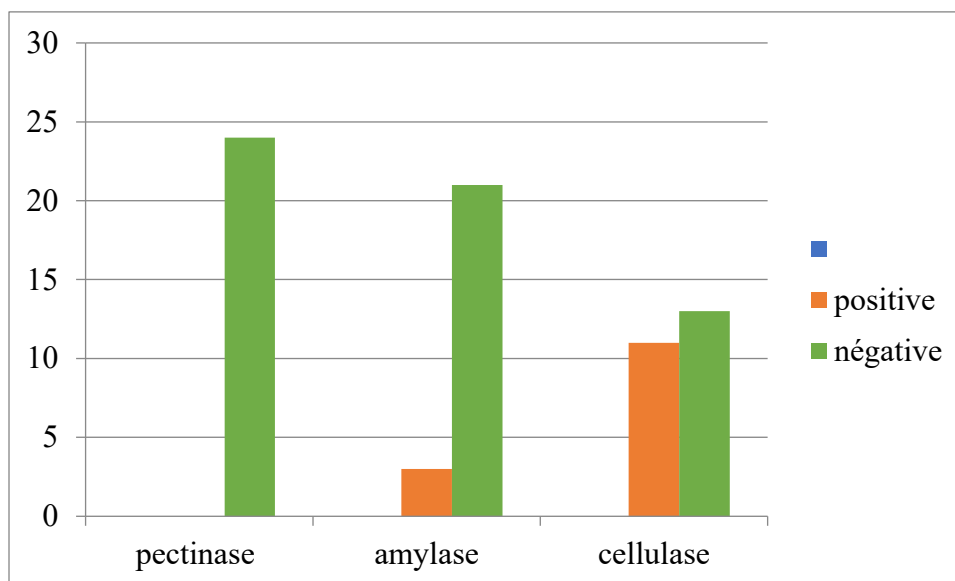


Figure. 8 :les activités enzymatiques des isolats

III.5. Testes PGP

III.5.1. Solubilisation de phosphate :

La capacité de différents isolats à solubiliser le phosphate a été testée sur milieu PVK(Pikovskaya) selon la méthode de **Gaur (1990)** en mesurant l'efficacité de solubilisation en fonction de différents diamètres des colonies et des halos transparents autour des colonies après 7 jours d'incubation à 30°C (**fig. 11**). En effet, seulement quatre isolats (KC4, KA9a, KA9b, KE2) ont produit une zone claire autour de la colonie ce qui signifie une solubilisation de $Ca_3(PO_4)_2$ (**fig. 9**).

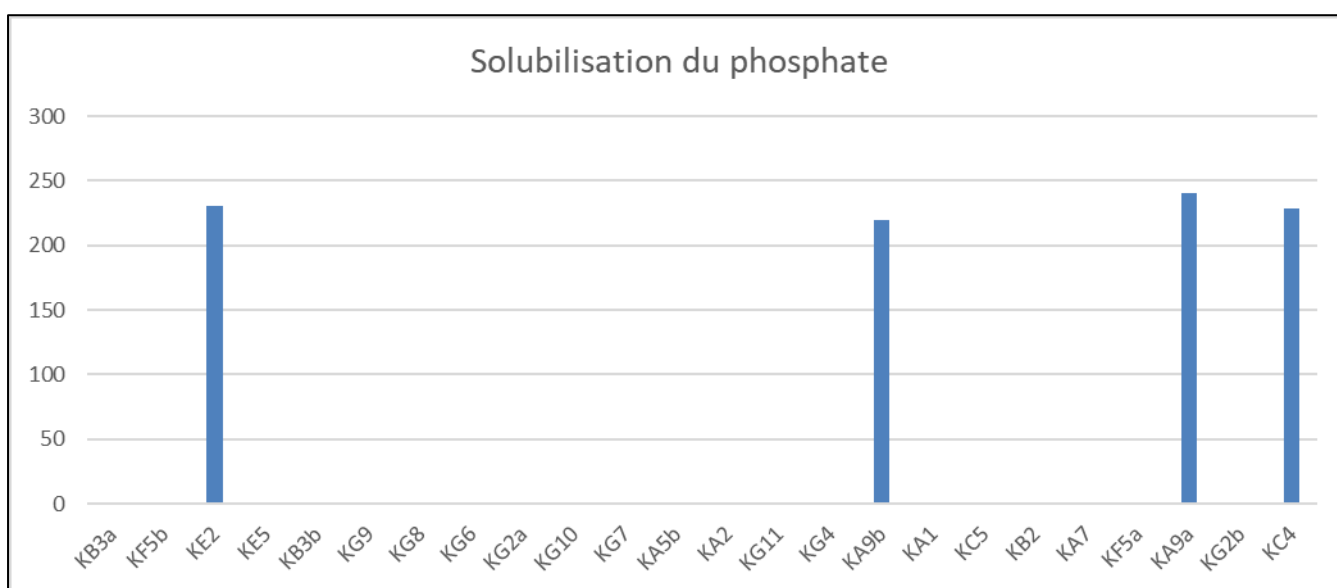


Figure. 9 : Efficacité de solubilisation du phosphate par les isolats

III.5.2. La production d'acide indole acétique AIA:

La mise en évidence de la production d'AIA est réalisée sur bouillon LB additionné de tryptophane(**tableau 3**).

Les résultats montrent que les isolats de pseudomonas capables produire l'acide indole acétique (AIA) à différents concentration(**fig. 11**), allant de production forte chez les isolats (KF5b,KE5,KG2b,KA1),et 8 isolats ont la capacité de moyenne production d'AIA (KB3a, KB3b,KG8,KG6,KG7,KG11,KC5,KC4),chez les autres isolats, une faible production (**fig. 10**).

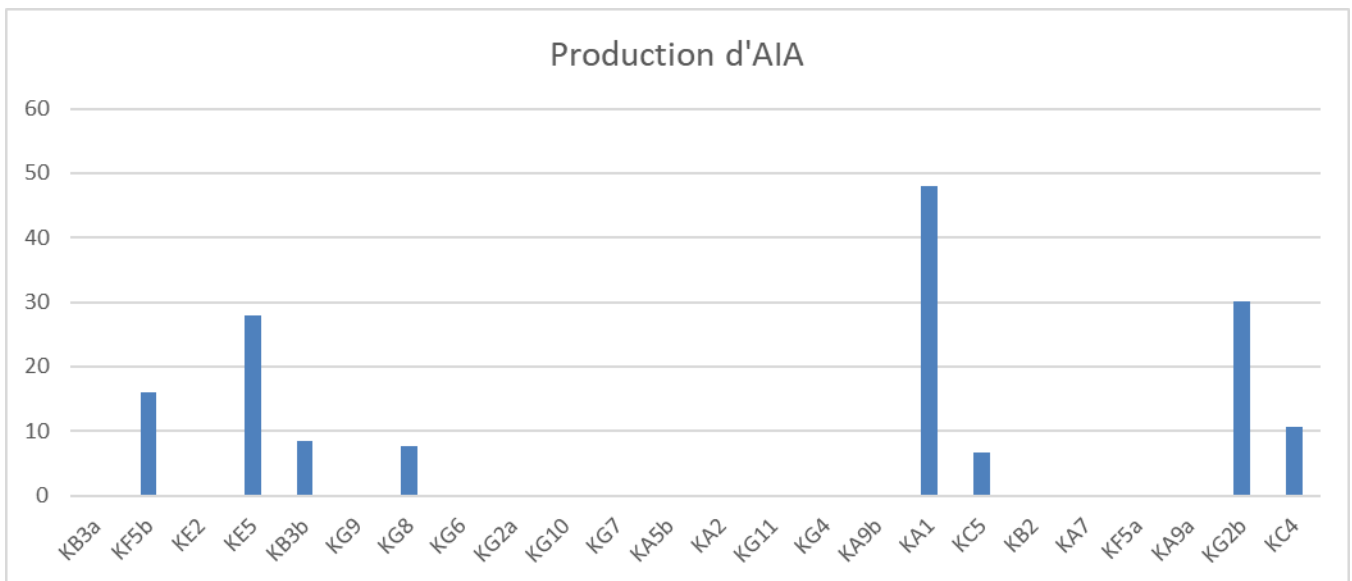


Figure. 10: Taux de production de l'acide indole acétique par les isolats

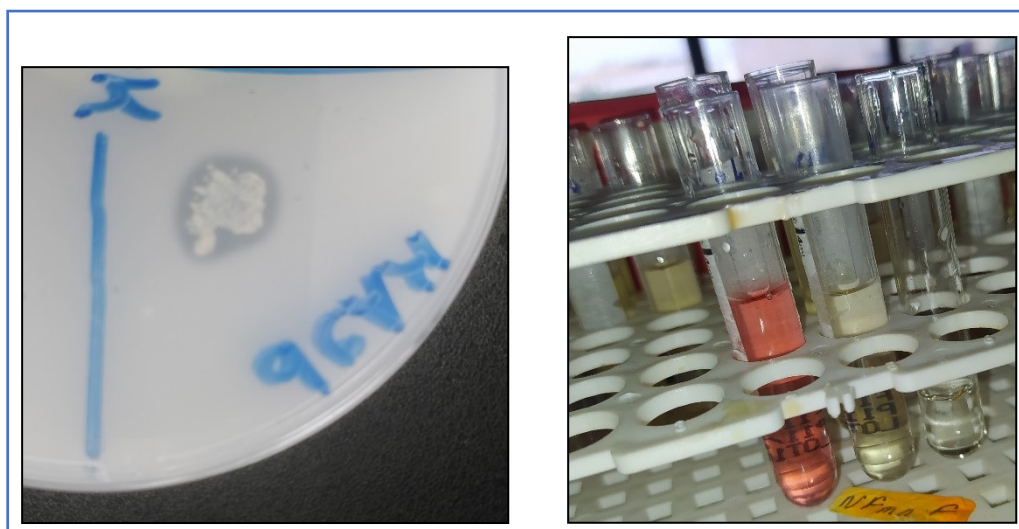


Figure. 11 : les activités PGP des isolats

Tableau 3: Résultats des activités enzymatiques et tests PGP

| Isolats | Amylase | Pectine | Cellulase | Phosphate | AIA |
|---------|---------|---------|-----------|-----------|-------|
| KB3a | + | - | + | - | 0,126 |
| KF5b | - | - | - | - | 0,396 |
| KE2 | - | - | - | + | 0,017 |
| KE5 | - | - | + | - | 0,686 |
| KB3b | + | - | + | - | 0,216 |
| KG9 | - | - | + | - | 0,075 |
| KG8 | - | - | + | - | 0,196 |
| KG6 | - | - | + | - | 0,145 |
| KG2a | - | - | - | - | 0,090 |
| KG10 | - | - | + | - | 0,096 |
| KG7 | - | - | + | - | 0,127 |
| KA5b | - | - | - | - | 0,089 |
| KA2 | - | - | + | - | 0,024 |
| KG11 | - | - | - | - | 0,111 |
| KG4 | - | - | - | - | 0,032 |
| KA9b | - | - | + | + | 0,028 |
| KA1 | + | - | + | - | 1,166 |
| KC5 | - | - | - | - | 0,173 |
| KB2 | - | - | - | - | 0,066 |
| KA7 | - | - | - | - | 0,082 |
| KF5a | - | - | - | - | 0,080 |
| KA9a | - | - | - | + | 0,068 |
| KG2b | - | - | - | - | 0,739 |
| KC4 | - | - | - | + | 0,268 |

+ : résultat positif

- : résultat négatif

III.6.Discussion

Dans notre étude, l'isolement des pseudomonas a été effectué à partir de la rhizosphère de différentes plantes pendant lequel un totale de 24 isolats bactériens est obtenus. **Collin M et al (2015)** ont rapporté l'isolement de 19 isolats de *Pseudomonas* à partir de la rhizosphère

de *Populusdeltoides* avec une variété de caractères morphologiques. Généralement, les *Pseudomonas* sont spécialement communs dans la rhizosphère. Ils sont à propagation rapide, capables d'utiliser aussi bien des acides-aminés que des sucres hydrosolubles, et sont généralement résistants aux antibiotiques. (Mezaache ; 2012).

Dans ce travail, les résultats montrent que les isolats obtenus ont une activité antifongique plus au moins faible contre les champignons phytopathogènes testés. Manoj kumar (2014) a isolé des *Pseudomonas fluorescens* où il a montré une activité antagonistes faible contre *Alternariachlamydospora*, par contre dans notre étude, la majorité des *Pseudomonas* isolés ont montré une activité inhibitrice moyenne vis-à-vis les dix champignons testés. A ce propos, vandenbergh *et al* (1983) et Rmmoorthy *et al* (2002) ont rapporté que *Pseudomonas fluorescens* stimulait les mécanismes de défense des plantes en améliorant leur résistance aux différents phytopathogène.

Les rhizosphères favorisant la croissance des plantes (PGPR) ont divers modes d'action tels que la modification des hormones végétales, la sécrétion des composés organiques, l'augmentation de la tolérance au stress abiotique chez les plantes et l'amélioration de la disponibilité et de l'absorption des nutriments (Wang *et al*; 2020). Le phosphore, est le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote. En plus les $\frac{3}{4}$ du phosphore apporté par les fertilisants appliqués au sol précipitent en des formes insolubles, augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément (Goldstein; 1986).

Les bactéries solubilisant le phosphore secrètent des acides organiques et des phosphatases, qui convertissent les formes insolubles de phosphates en ions de phosphates soluble monobasique ($H_2PO_4^-$) et dibasique (HPO_4^{2-}). Ce phénomène est attribué à la solubilisation minérale du phosphate. Dragana *et al* (2014) ont rapporté des résultats similaires chez 4 isolats de *pseudomonas* isolés de la rhizosphère.

La production d'AIA est une activité importante dans la sélection des isolats de *Pseudomonas* comme agents de lutte biologique (Dragana Josic *et al*; 2015). Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le Tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son adjonction est nécessaire à la production. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager *et al.*, 2010). L'AIA est synthétisé dans la présente étude par huit isolats. La production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Miraza *et al.*, 2001).

Les enzymes pectinase, cellulase et amylase sont ces enzymes jouent un rôle dans la prévention de l'infection des plantes par des agents pathogènes. La pectinase c'est un groupe d'enzymes connues pour catalyser la substance pectique par une réaction de dépolymérisation, il est produit en haut pourcentage (**Reetha et al; 2014**) tandis que le résultat obtenu montre qu'il n'y a aucun isolat productrice de l'enzyme.

Pseudomonas fluorescens ont la capacité de produire l'enzyme cellulase, ces enzymes ont la capacité de dégrader la paroi cellulaire des champignons, ce qui constitue un mécanisme important d'inhibition des champignons (**Gupta; 2003**). Dans la présente étude onze isolats ont montré une faible production de l'enzyme. Les amylases sont des macromolécules appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases de la classe des hydrolases qui agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. Elles catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et différents gluco-oligosaccharides de longueur variables. Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie actuelle (**Gupta, 2003**). Jan-Mar; (**2013**) a rapporté dans ces travaux une grande production de la cellulase et faible production de l'amylase ce qui au contraire aux résultats obtenus dans la présente étude.



Conclusion

Conclusion

Dans le cadre des études menées sur les plantes, les biologistes se sont intéressés et s'intéressent toujours aux interactions symbiotiques qui surviennent au sein de leurs rhizosphères. Pour notre part, nous avons porté notre attention sur les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR), un autre type de bactéries phyto-bénéfiques, qui utilisent les exsudats racinaires comme substrats nutritifs pour agir soit directement ou indirectement sur le développement de la plante. Des connaissances récentes sur les bactéries PGPR ont montré que certains de ces bactéries ne se comportent pas seulement en tant qu'antagonistes des pathogènes mais sont capables d'induire des mécanismes de défense chez les plantes mises en contact avec les bactéries.

Notre étude a permis d'isoler des bactéries à partir des sols rhizosphériques de différents échantillons. Elles ont été soumises à une identification préliminaire par des examens macroscopique et microscopique et tests biochimiques, cette identification a montré des isolats à gram négative, et de type respiratoire aérobie stricte et oxydase positive, ils comprennent des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*.

Tous les isolats ont été ensuite évalués pour estimer leurs différentes activités PGP, quatre isolats ont été capables de solubiliser le phosphate avec des efficacités de solubilisation allant de 220 à 240. Huit isolats étaient productifs d'acide indoleacétique, à différentes concentrations, allant de 0,173 µg/ml jusqu'à 1,116 µg/ml.

Pour l'activité antifongique, les isolats KG2a et KB3a ont développé un meilleur effet d'inhibition vis-à-vis le phytopathogène 10 par rapport aux autres isolats contre les autres phytopathogènes, qui ont permis d'obtenir un taux d'inhibition variant entre 33% et 25% sur le champignon 10. La plupart des isolats ont la capacité de production des enzymes hydrolytiques (cellulase et amylase), et pour l'enzyme pectinase les 24 isolats ont été incapables de produire cette enzyme.

L'ensemble des caractères PGP des divers BSP étudiés dans la présente étude suggèrent que ces microorganismes peuvent favoriser la croissance des plantes par plus d'un mécanisme notamment en biocontrôle et que ces activités pourraient être mieux exploitées. De plus, il serait intéressant d'étudier d'autres activités PGP comme l'ACC désaminases, production d'ammoniac, production des sidérophores, et d'identifier les isolats avec l'utilisation de la biologie moléculaire.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- **Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P., & Maheshwari, D. K; 2011.** Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiology. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiology: Crop ecosystems* (pp. 1–36). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-18357-7_1
- **Anne Marie Koua ABE1 , Justine Bomo ASSANVO1* , Moussa SANOGO2 et Kouamé Mathias KOFFI1; 2018.**Caractérisation phénotypique de 52 souches des Bacillus isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d’Ivoire, *Original Paper*, 12, 5(1-10)
- **Antoun, H., & Prévost, D; 2006.** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In Z. A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 1–38). Springer Netherlands. doi:10.1007/1-4020-4152-7_1
- **Arif F; 2015**-Effets du stress salin et d’osmoprotecteurs naturels sur la germination de blé dur (*Triticum durum*) inoculé par *Pseudomonas fluorescens*, thèse de doctorat en sciences, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 155 p.
- **Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy et J. M. Vivanco; 2006.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:233–266.
- **Bell-Perkins, L. J., et J.M. Lynch; 2002.** Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- **Benkahoul ,M., Talhi, A., Boulefkhad, M; 2017.** Bactéries des environnements chauds Algériens : isolement et mise en évidence de la production d’hydrolases. *Sciences & Technologie*, N°45, pp.25-35.
- **Bloemberg, G. and Lugtenberg, B; 2001.** molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* 4: 343-350.
- **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L; 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- **Bouras,F,Z; 2018.**microorganismes producteurs de métabolites secondaires et enzymes .thèse de doctorat,universitédjillaliliabès,sidi bel abbès.
- **Bowen, G. et A. Rovira; 1999.** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv.Agron.*, 66, 1-102. *Can. J. Microbiol.*, 12: 531-537.
- **Curl, E.A. et B. Truelove; 1986.** The rhizosphere. 288 pp. Springer-Verlag (Ed.). Berlin.
- **Curtis, T.P., Sloan, W.T. and Scannell, J.W., 2002.** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 10494-10499.
- **Daniel, R; 2005.** The metagenomics of soil. *Nature ReviewsMicrobiology*, 3, 470–478. doi:10.1038/nrmicro1160
- **Delarras (C); 2014,** Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures-moisissures, Céline Poiteaux, Lavoisier, Paris, 772p. Diego. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- **DommerguesY., Mangenot F; 1970.** Ecologie microbienne du sol, Masson et CIE, Editeurs, Paris,796p.

- **Durand, L. M. C. et G. R. Knusden; 2002.** Sampling microbes from the rhizosphere and phyllosphere, pp. 516- 526. In Hurst, C. J., R. L. Crawford, G. R. Knusden, M. J. Mc Inerney and L. D. Stetzenbach (eds.), Manual of environmental microbiology. ASM Press, Washington.
- **Euzeby, J.P; 2008.** List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- **Gaur, A.C; 1990.** Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizers. 1st Edn., Omega Scientific Publishers, New Delhi, India, ISBN: 81-85399-09-3.
- **Glick, B. R; 1995.** The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 41, 109–117. doi:10.1139/m95-015
- **Glick, B. R; 2014.** Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research, 169, 30–39. doi:/10.1016/j.micres.2013.09.009
- **Gobat, J-M., M. Aragno et W. Matthey; 2004.** The living soil. Fundamentals of soil science and soil biology. pp: 82- 85. Science Publishers (Ed.), U.S. A.
- **Gordonr E., Haynesw C., Pang c.H.N; 1973.** The Genus Bacillus (Agricultural Handbook no. 427). Washington DC: United States Department of Agriculture.
- **Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., & Annapurna, K; 2011.** Bacillus and Paenibacillus spp.: Potential PGPR for sustainable agriculture. In D. K. Maheshwari (Ed.), Plant growth and health promoting bacteria (pp. 333–364). Berlin: Springer-Verlag.
- **Haichour N; 2017,** Travaux pratiques de microbiologie générale au Laboratoire de Microbiologie Appliquée, université de Sétif , Algérie , 1-19.
- **Hamid K. and Strange R. N; 2000.** Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues. *Physiol.and Mol. Plant Pathol.*, 56, 235–244.
- **Hiltner, L; 1904.** About recent experiences and problems the field of soil bacteriology with special Consideration of green manure and fallow. *Arbeiten der DeutschenLandwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59–78.
- **Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B. and Yoder, J.I; 2003.** Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecol.* 84: 858-868.
- **Höfte, M., et N. Altier; 2010.** Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* 161: 464-471
- **Högberg, P., Nordgren, A., Buchmann, N., Taylor, A.F.S., Ekblad, A., Hogberg, M.N., Nyberg, G., Ottosson-Löfvenius, M. and Read, D.J; 2001.** Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature.* 411: 789-792.
- **Höhl B., Pfautsch M., and Barz W; 1990.** Histology of disease development on resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* (Berlin) 129: 31–45.
- **Holt, J. G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley et S.T. Williams; 1994.** Bergey’s manual of determinative bacteriology. 9 th Ed. Williams &Wilkins, Baltimore, MS, USA.
- **Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. and Bohannon, B.J.M; 2003.** Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.* 6: 613-622.

- **Jan-Mar; 2013**; Production of Amylase by using *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Garden Soil, *IJAPBC*, 1, 2, 50-56.
- **Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., & Saraf, M; 2011.** Enterobacter: Role in plant growth promotion. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiology: Plant growth responses* (pp. 159–182). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- **Jha, C. K., Patel, D., Rajendran, N., & Saraf, M; 2010.** Combinatorial assessment on dominance and informative diversity of PGPR from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. *Journal of Basic Microbiology*, 50, 211–217. doi:10.1002/jobm.200900272
- **Jha, C. K., Patel, D., Rajendran, N., & Saraf, M; 2010.** Combinatorial assessment on dominance and informative diversity of PGPR from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. *Journal of Basic Microbiology*, 50, 211–217. doi:10.1002/jobm.200900272
- **Jones J.D.G. and Dangl J.L; 2006.** The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329.
- **Kamilova. F., S. Validov, T. Azarova, I. Mulders, et B. Lugtenberg; 2005.** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809–1817
- **Kennedy, A.C. and Smith, K.L; 1995.** Soil microbial diversity and the sustainable agricultural soils. *Plant and Soil*, 170, 75 – 86
- **Kloepper, J.W. and Schroth, M.N; 1978.** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: 4th Int. Conf. Plant Pathogen. Bacteria. Angers France, 2: 879-882.
- **Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R; 2001.** Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55: 485-529.
- **Latour, X. and Lemanceau, P; 1997.** Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp., *Agronomie*, 17: 427–443.
- **Lawton, J.H. et C. G Jones; 1995.** Linking species and ecosystems: organisms as ecosystems engineers. pp: 141- 150. In Jones C. G and J. H. Lawton (Eds), *Linking species and ecosystems*. Chapman and Hall. London.
- **Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. and Read, D.J; 2004.** Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82: 1016-1045
- **Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C; 1966.** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470–489.
- **Lemanceau, P; 1992.** Beneficial effects of rhizobacteria on plants :exemple of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 12: 413-437.
- **Lepoivre P; 2003.** *Phytopathologie*, De Boeck and Larcier eds.513 P.
- **LIU H, WU X , REN J H and YE JR; 2011.** Isolation and Identification of Phosphobacteria in Poplar Rhizosphere from Different Regions of China , *Pedosphere* , 1 , 90- 97 .
- **Loper, J. E. et M. N. Schroth; 1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopath.*, 76: 386-389.
- **Mandels M, Reese ET; 1957.** Induction of cellulose in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol* 73(2):269–278
- **Marschner, P., C. H. Yang, R. Lieberei et D. E. Crowley; 2001.** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1437-1445.

- **Mauch-Mani B., Métraux J.P; 1998.** Salicylic Acid Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. *Annals of Botany*. 82: 535-540.
- **Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S; 2001.** Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35–43.
- **Mercado-Blanco, J., et P.A.H.M. Bakker; 2007.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek*. 92: 367-389
- **MezaacheS; 2012-LOCALISATION DES DÉTERMINANTS DE LA SUPPRESSION DE QUELQUES SOUCHES DE PSEUDOMONAS ISOLÉES DE LA RHIZOSPHERE DE LA POMME DE TERRE,** thèse de doctorat en sciences, Université Ferhat Abbas Sétif, 141 p.
- **Palleroni, N.J. and Moore, E.R.B; 2004.** Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, pp. 3-44.
- **Palleroni, N.J; 1984.** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- **Palleroni, N.J., 2008.** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.
- **Patten, C.L., et B.R. Glick; 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801
- **RABHIN.H; 2011.** Isolement de *Pseudomonas* spp. Fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels, Magistère, Université Ferhat Abbas, Setif.
- **Ramalho, R., Cunha, J., Teixeira, P. and Gibbs, P. A; 2002.** Modified pseudomonas agar: new differential medium for the detection/ enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. *J. Microbiol. Meth.* 49: 69–74.
- **Ramos-Solano, B., Barriuso, J., & Gutiérrez-Mañero, F. J; 2008.** Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In I. Ahmad, J. Pichtel, & S. Hayat (Eds.), *Plant–bacteria interactions: Strategies and techniques to promote plant growth* (pp. 41–54). Weinheim: Wiley VCH. doi:10.1002/9783527621989.ch3
- **Rillig, M.C. and Mummey, D.L; 2006.** Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171: 41-53.
- **Rovira, A. D., R. C. Foster et J. K. Martin; 1979.** Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere, pp: 1-4. In Harley, J. L. et R. S Russel (Eds.). *The soil Root interface*. Academic Press, London.
- **Sadiq HM, Jahangir GZ, Nasir IA, Iqtidar M, Iqbal M; 2014.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil. *Biotech Biotech Equip* 27:4248–4255
- **Sandhya, V., S.K.Z. Ali, B. Venkateswarlu, G. Reddy, et M. Grover; 2010.** Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp. *Arch. Microbiol.* 192: 867-876

- **Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M. F., Lagares, A., & Luna, V; 2009.** Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 371–381. doi:10.1007/s00253-009-2116-3
- **Sharma P, Kunawat KC, Kaur S, Kaur N; 2014.** Assessment of zinc solubilization by endophytic bacteria in legume rhizosphere. *Ind J Appl Res* 4:439–441
- **Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Han, G. H., & Sa, T; 2010.** Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 1577–1584. doi:10.4014/jmb.1007.07011
- **Somers E., J. Vanderleyden et M. Srinivasan; 2004.** Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30: 205-240.
- **Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M; 1966.** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271
- **Strange R.N; 2003.** *Introduction to Plant Pathology*. 464 p. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- **Teather RM, Wood PJ; 1982.** Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 43(4):777–780
- **Thomashow, L.S. and Weller, D. M; 1996.** Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: *Plant-microbe interactions*, vol. 1. G. Stacey and N. T. Keen (ed.), Chapman and Hall, London, United Kingdom, p. 187–236.
- **Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, Shilpi Mittal, A.K. Tripathi, et B.N. Johri; 2005.** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89: 136-150
- **Van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. and van Straalen N.M; 2008.** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11: 296-310.
- **Van Loon, L.C; 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
- **Vessey, J. K; 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571–586. doi:10.1023 /A:1026037216893
- **Weller D.M; 1988.** Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with Bacteria, *Annual Revue Phytopathology*. 26: 379–407.
- **Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. and Thomashow L.S; 2007.** Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biol.* 9: 4-20.
- **Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden-Gardener, B B. and Thomashow, L S; 2002.** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 309–348.
- **Wheeler H.E., Luke H.H; 1963.** Report and Abstract of the Annual Meeting of the Southern Division of the American Phytopathological Society.44: p.334.

- **Whipps, J. M; 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, 52: 487- 511.
- **Yang, C. H. et D. E. Crowley ; 2000.** Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 345- 351.



Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

1. Milieu King B:

| | |
|---------------------------------------|------|
| Peptone..... | 20g |
| Glycérol | 10ml |
| MgSO ₄ | 1,5g |
| K ₂ HPO ₄ | 1,5g |
| Agar..... | 20g |
| Eau distillée..... | 1L |
| pH=7,2 | |

2. Milieu Gélose nutritif (GN) :

| | |
|-------------------------|-----|
| Peptone | 10g |
| Extrait de viande..... | 3g |
| Extrait de levure | 3g |
| NaCl..... | 5g |
| Agar..... | 18g |
| Eau distillée..... | 1L |
| pH=7 | |

3. Milieu PDA :

| | |
|---------------------|------|
| Pomme de terre..... | 200g |
| Glucose | 20g |
| Agar | 20g |
| Eau distillé | 1L |
| pH=5,6 | |

2. Gélose PVK :

| | |
|--|--------|
| Glucose | 10g |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ ·H ₂ O..... | 5g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.5g |
| KCl..... | 0.2g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O..... | 0.1g |
| MnSO ₄ ·7H ₂ O..... | 0.002g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O..... | 0.002g |
| NaCl..... | 0.2g |
| Extrait de levure | 0.5g |
| Agar..... | 20g |
| Eau distillée | 1L |

pH=7

3. Milieu CMC :

| | |
|---------------------------------------|----|
| Extrait de levure..... | 2g |
| KH ₂ PO ₄ | 1g |
| MgSO ₄ | 5g |
| Cellulose | 5g |
| Eau distillée..... | 1L |

pH=7

4. Bouillon LB tryptophane :

| | |
|------------------------|------|
| Peptone..... | 10g |
| Extrait de levure..... | 5g |
| NaCl..... | 10g |
| Tryptophane..... | 0,2g |
| Eau distillée..... | 1L |

pH=7

5. Milieu pectine-agar :

| | |
|------------------------|-----|
| Pectine..... | 5g |
| Extrait de levure..... | 5g |
| Agar..... | 20g |
| Eau distillée..... | 1L |

pH=5

6 .Milieu gélose à L'amidon :

| | |
|------------------------|------|
| Amidon soluble | 10g |
| Extrait de viande..... | 1g |
| Extrait de levure..... | 2,5g |
| Peptone | 5g |
| NaCl..... | 5g |
| Agar | 20g |
| Eau distillée..... | 1L |

pH=7,2

7. gélose viande-foie (VF) :

| | |
|-----------------------|-----|
| Base viande foie..... | 20g |
| Glucose..... | 2g |
| Agar..... | 6g |
| Eau distillée..... | 1L |

pH=7,4

Annexe 2 :

1.Réactif Salkowski :

Acide perchlorique (HClO₄) à 35%50ml

FeCl₃.....1ml

Annexe 3 : protocole de coloration de gram :

-A partir d'une colonie de 24h, nous avons préparé un frottis est fixé à la chaleur.

-Recouvrir par le violet de Gentiane pendant une minute, rincer à l'eau distillée.

-Ensuite il est éliminé par l'ajout du Lugol pendant une minute.

-Le frottis est ensuite décoloré avec de l'éthanol pendant 5 à 10 min, rincer à l'eau distillée.

- Recolorer avec de la safranine pendant une minute, rincer à l'eau distillée.

- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen.

Annexe 4: la courbe d'étalonnage :

