



N° Ref :.....

Centre Universitaire

Abdelhafid Boussouf Mila

Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Science de Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

En : - Filière: Sciences biologiques

- Spécialité: Biologie appliquée et environnement: Biochimie et microbiologie appliquée

Thème:

**Activité antifongique des souches de
Pseudomonas spp. fluorescents isolées
d'un sol salé.**

**Préparé par : FELLAHI Meriem
REBAI Rana**

Soutenue devant le jury :

**- Président : BOUBENDIR Abdelhafid
- Examineur : HADEF Saoussen
- Promoteur : RABHI Nour El Houda**

**Grade: Maitre de conférence B
Grade: Maitre assistant A
Grade: Maitre assistant A**

Année universitaire: 2014/2015

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

*Nos Sincères remerciements et notre profonde gratitude vont à notre encadreur **RABHI Nour El Houda** qui, en tant que directrice de mémoire de fin d'étude, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nos remerciements vont tout droit à Mr **BOUBENDIR Abdelhafid** qui a fait l'honneur d'avoir accepté la présidence du jury de thèse*

*Nous remercions également Mme **HADEF Saoussen**.*

*Un remerciement très spécial à monsieur **REBAI Khalil** qui nous a donné l'aide et le soutien sans aucune hésitation.*

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tout le personnel de l'institut de science et technologie surtout les enseignants qui nous ont enseigné durant toutes nos années d'étude.

Nos chaleureux remerciements sont destinés à nos très chers parents, frères, sœurs qui nous ont encouragés, soutenu durant tout notre parcours. Enfin nous remercions toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'achèvement de ce travail.

Merci bien.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail et une très profonde gratitude

A mes parents: Mon cher papa et ma tendre maman pour leurs encouragements et leur soutien durant toute ma période d'étude et pour leur patience et leur amour qui je dois tout et sans qui je ne serais rien

A mes chers sœurs Houda, Assia, Rima et mon frère Khaled

A mon grand-père bien-aimé SADOUN Bouzid

A mes chers Iyed et Anes les fils de mes sœurs

A toute ma famille

A tous mes amis

Et à tous mes Enseignants.

MERJEM



Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude, mon plus grand respect et ma reconnaissance inestimable.

A mes très chers parents, pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué; avec tous les moyens et toutes les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard.

A mes chers frères et sœurs

A toute ma famille

A tous mes amis

Et à tous mes Enseignants.

RANA

Sommaire

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Revue bibliographique

I. Salinisation	3
1. Définition.....	3
2. Effets de la salinité sur les bactéries du sol.....	3
3. Classification des bactéries halophiles et halotolérantes	4
4. Osmorégulation chez les bactéries.....	5
II. Interactions microbes-plantes-sol	7
1. Rhizosphère	7
2. Rhizodéposition	7
3. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)	10
4. Effets bénéfiques des PGPR sur les plantes	10
4.1. Effets directs	10
4.1.1. Fixation biologique d'azote	10
4.1.2. Solubilisation des phosphates	11
4.1.3. Production de sidérophores.....	11
4.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale.....	12
4.1.5. Production d'acide 1-Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC désaminase)	12
4.2. Effets indirects	13
4.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments.....	13
4.2.2. Antibiose.....	13
4.2.3. Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance) ...	14
III. <i>Pseudomonas</i> spp. : bactéries du sol	16

1. Caractéristiques générales.....	16
2. Interactions de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents dans la rhizosphère	16
3. Mode d'action de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	17
4. <i>Pseudomonas</i> spp. face aux stress abiotiques	19
Matériels et méthodes	
I. Echantillonnage	21
II. Réactivation des souches	21
III. Conservation des souches	21
IV. Examen macroscopique et microscopique	22
1. Examen macroscopique	22
2. Examen microscopique.....	22
2.1. Gram et mobilité.....	22
V. Caractéristiques biochimiques	22
VI. Mise en évidence de l'halotolérance des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	22
VII. Activité antifongique	23
Résultats	
I. Examen macro et microscopique	25
1. Examen macroscopique	25
2. Examen microscopique	25
II. Caractéristiques biochimiques	25
III. Etude de l'halotolérance de souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents	29
IV. Activité antifongique	29
Discussion	
I. Halotolérance bactérienne	36
II. Activité antifongique	37
Conclusion	42
Résumé	44
Abstract	45
المخلص	46
Références bibliographiques	47
Annexes	61

Liste des tableaux

Tab. 1: Caractères morphologiques des souches de *Pseudomonas* isolées.....26

Tab. 2: Quelques caractères biochimiques de souches de *Pseudomonas* isolées.....28

Tab. 3: Densité optique des souches de *Pseudomonas* fluorescents avec des concentrations croissantes de NaCl dans un milieu minimum Davis.....31

Tab. 4: Diamètre des colonies de *F. oxysporum*, *A. niger*, *A. flavus* et *M. ramannianus* en présence des souches de *Pseudomonas* fluorescents.....33

Liste des figures

Fig. 1: Rhizodéposition de la rhizosphère09

Fig. 2: Effets bénéfiques des PGPR sur la croissance des plantes.....15

Fig. 3: Mécanismes de protection des plantes par les *Pseudomonas* fluorescents comme agents de biocontrôle20

Fig. 4: Fluorescence de quelques souches sous UV (365nm)..... 27

Fig. 5: Observation microscopique de quelques souches de *Pseudomonas* fluorescents (x100)27

Fig. 6: Appréciation de l’halotolérance des souches de *Pseudomonas* fluorescents en présence de NaCl dans un milieu minimum Davis.....30

Fig. 7: Pourcentage d'Inhibition de la croissance mycélienne des colonies de *F.oxysporum*, *A. niger*, *A. flavus* et *M. ramannianus* en présence des souches de *Pseudomonas* fluorescents.....32

Fig. 8: Activité antagoniste vis-à- vis *A. niger*.....34

Fig. 9: Activité antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas* vis-à- vis *F. oxysporum*.....34

Fig. 10: Activité antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas* vis-à-vis *M. ramannianus*.....35

Fig. 11: Activité antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas* vis-à-vis *A. flavus*.....35

%: pourcentage

°C: degré de Celsius

µl: micro litre

µm: micromètre

λ: longueur d'onde

ACC: acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

ACC désaminase: acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase

ADH: Arginine dihydrolase

ADN: acide désoxyribonucléique

ARNr: Acide ribonucléique ribosomal

BN: bouillon nutritif

C: carbone

Ca²⁺: calcium

Cd: cadmium

Na₃C₆H₅O₇: sodium de citrate

cm: centimètre

Cl: chlorure

CO₂: dioxyde de carbone

CO₃²⁻: carbonates

Cu: cuivre

DAPG: le 2,4- diacetylphloroglucinol

D.O: densité optique

dS/m: deci Siemens

EPS: Exo-poly saccharides

Fe³⁺: fer

g: gramme

GN: Gélose Nutritive

h: heure

H₂: gaz hydrogène

H₂PO₄⁻: dihydrogéo-phosphate

HCN: acide cyanhydrique

HPO₄⁻²: monohydrogéo-phosphate

HCO₃⁻: bicarbonates

IAA: acide indole-3-acétique

- ISR:** Résistance systémique induite
- K⁺:** potassium
- K₂HPO₄:** phosphate dipotasique
- KB:** King B
- KH₂PO₄:** phosphate monopotasique
- l:** litre
- LDC:** Lysine décarboxylase
- LPS:** lipopolysaccharides
- m:** mètre
- M:** molaire
- Mg²⁺:** magnésium
- MgSO₄.7H₂O:** sulfate de magnesium
- ml:** millilitre
- mm:** millimètre
- mM:** milimolaire
- N₂:** Azote
- Na⁺:** sodium
- Na₂CO₃:** bicarbonates de sodium
- Na₂SO₄:** sulfate de sodium
- NADH:** nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène
- NaCl:** chlorure de Sodium
- nb:** nombre
- NH₃:** ammoniac
- (NH₄)₂SO₄:** sulfate d'ammonium
- Ni:** nickel
- nm:** nanometer
- ODC:** Ornithine décarboxylase
- P:** phosphore
- Pb:** plomb
- PDA:** Potato Dextrose Agar
- PGPR:** rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes
- PGR:** régulateurs de la croissance végétale
- pH:** potentiel d'hydrogène
- q.s.p:** quantité suffisante pour

ROS: espèces réactives de l'oxygène

s: secondes

SO₄²⁻: sulfate

SST III: le système de sécrétion type III

TDA: Tryptophane désaminase

UV: ultra-violet

Zn: zinc

Introduction

L'agriculture soutenable est extrêmement importante dans le monde d'aujourd'hui parce qu'elle offre le potentiel de se réunir nos futurs besoins agricoles. La progression importante des infections microbiennes, les pertes économiques dues aux altérations des aliments d'origines microbiennes ne cessent d'augmenter au fil du temps (**Sing, 2013**).

Les méthodes de lutte contre les pathogènes telluriques sont basées généralement sur l'utilisation des pesticides synthétiques. Cependant un mauvais choix de ces composés peut mener à une écotoxicité de leurs résidus et leur utilisation irrationnelle conduit à une perte d'efficacité due à l'adaptation des microbes pathogènes visés aux agents antimicrobiens chimiques. D'autant plus les intoxications alimentaires ainsi que les épidémies qui en résultent posent de plus en plus de problèmes de santé publique à l'échelle mondiale. En outre, le coût croissant des pesticides, en particulier dans les régions les moins riches du monde, et la demande des consommateurs des aliments sans pesticides conduit à une recherche des substituts pour ces produits (**Compant et al., 2005**).

Comment diminuer l'utilisation des produits chimiques notamment les pesticides dans l'agriculture et quelles sont les alternatives ?

Une nouvelle stratégie de lutte biologique est donc émergée comme alternative phytosanitaire écologiquement compatibles. Elle consiste à utiliser du potentiel microbiologique du sol, particulièrement des PGPR contrôlant la microflore pathogène en vue de diminuer ou remplacer l'utilisation des pesticides chimiques. Ces rhizobactéries sont capables de produire des composés toxiques qui se décomposent facilement sans laisser des résidus dans l'environnement, très sélectifs et efficace en très petites quantité avec un prix compétitif (**Ali et al., 2009**).

Parmi les bactéries d'intérêt agricole, les *Pseudomonas* fluorescents font l'objet d'une attention particulière. Elles sont connues pour leur activités antagonistes contre les pathogènes des plantes, essentiellement par la production de beaucoup de métabolites secondaires tels que le cyanure d'hydrogène (HCN), des enzymes comme les chitinases et les exoprotéases, et des antibiotiques comme le 2,4-diacétyle-phloroglucinol (PHL) et divers phénazines et de sidérophores (**Haas et Défago, 2005**).

Malheureusement, l'efficacité de ces agents de biocontrôle se démontre rarement au champ. De ce fait l'exploitation des bactéries indigènes serait nécessaire pour protéger les plantes et donc améliorer leur rendement (**Sivasakthi *et al.*, 2014**).

L'objectif de ce travail est l'exploitation des souches indigènes halotolérantes de *Pseudomonas* fluorescents productrices de métabolites secondaires afin de les utiliser comme des agents de biocontrôles dans les régions affecté par la salinité.

La stratégie d'étude de ce travail consiste à déterminer la capacité d'halotolérance des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, et d'évaluer *in vitro* leur activité antagoniste envers des champignons phytopathogènes.

*Revue
bibliographique*

I. Salinisation

1. Définition

La salinisation est un terme générique qui caractérise l'augmentation progressive de la concentration du sel dans le sol sous l'influence de différents facteurs telle l'irrigation, l'aridité et le lessivage. Ces sels accumulés sont représentés par le calcium (Ca^{2+}), le magnésium (Mg^{2+}), le sodium (Na^+), le potassium (K^+), le chlorure (Cl^-), le sulfate (SO_4^{2-}) et les carbonates (HCO_3^- , CO_3^{2-}) (**Marlet et Job, 2006**). Un sol est considéré salin, lorsque sa conductivité électrique supérieure à 4 deci Siemens par mètre (4 dS/m), équivalent à 36 mM de NaCl dans un extrait saturé de sol à 25°C (**Bui, 2013**).

Les sols salins ou sols halomorphes appelés actuellement sols salsodiques couvrent une surface importante du globe terrestre. Ils se manifestent naturellement aussi bien sous les climats plus ou moins arides, que tempérés, maritimes ou continentaux: là où l'évaporation dépasse les précipitations pluviales (**Berrada, 2012**).

Il existe 2 catégories du sol salsodiques sous: les sols salins (Solontchaks) et les sols alcalins (Solonetz).

- les premiers sont caractérisés par la richesse non seulement en sels de sodium neutres, chlorure de Sodium (NaCl) et sulfate de sodium (Na_2SO_4), mais également en quantité appréciable des ions de chlorites (Cl^-), de sulfates (SO_4^{2-}), de sodium (Na^+), de calcium (Ca^{2+}) et de magnésium (Mg^{2+}). Ces sols sont généralement dominants dans les régions arides et semi-arides.
- Les second sont riches en sodium échangeable et pauvres en sels solubles principalement les carbonates et les bicarbonates de sodium (Na_2CO_3). Ils se trouvent plutôt dans les zones semi-arides et sub-humides (**Maillard, 2001**).

2. Effets de la salinité sur les bactéries du sol

Les effets du stress salin sur l'activité microbienne dans un sol sont complexes et imprévisibles du fait que plusieurs interactions peuvent avoir lieu entre les ions, les bactéries et les particules du sol (**kerbbab, 2012**). La membrane cytoplasmique des bactéries est perméable à l'eau mais constitue une barrière efficace vis-à-vis des solutés du milieu et des métabolites présents dans le cytoplasme (**Csonka, 1989**). Une diminution rapide de l'osmolarité du milieu extérieur (choc hypo-osmotique) provoque un afflux d'eau dans la cellule et par conséquent, une augmentation du volume cellulaire et de la pression de turgescence. Cependant l'augmentation brusque de l'osmolarité du milieu extérieur

(choc hyper-osmotique) entraîne un flux rapide d'eau vers l'extérieur de la cellule ; le volume du cytoplasme diminue conduira à la plasmolyse cellulaire (**Baliarda, 2003**). Dans le cas d'un choc hyper-osmotique sévère, la brusque diminution de l'activité de l'eau du cytoplasme inhibe certaines fonctions cellulaires comme l'adsorption de nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse de macromolécules (**Lucht et Bremer, 1994**).

3. Classification des bactéries halophiles et halotolérantes

Les bactéries survivent et prolifèrent dans des environnements de différentes salinités (**Pocard et al., 1994**) et selon leur exigence et leur tolérance au sel, elles sont classées en bactéries halophiles et bactéries halotolérantes (**Imhoff, 1986**). Le terme « halophile » est dérivé de deux mots grecs, "*halos*" et "*Philus*", qui signifie respectivement, «sel» et «aimer». Ces microorganismes nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En revanche, le terme « halotolérant » signifie que les microorganismes tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance.

La première classification fut proposée par **Larsen (1962)**. Selon la meilleure croissance obtenue en présence de concentrations connues en sel, les bactéries sont groupées comme suit :

- **Les non-halophiles:** croissance optimale à moins de 0,2 M NaCl. La plupart des eubactéries et les microorganismes d'eau douce.
- **Les halophiles faibles:** croissance optimale entre 0,2 et 0,5 M NaCl. Plusieurs microorganismes marins.
- **Les halophiles modérés:** croissance optimale entre 0.5 et 2.5 M NaCl.
- **Les halophiles extrêmes:** croissance optimale entre 2,5 et 5,2 M NaCl. Les halobactéries.

Les halotolérants: ce sont les non-halophiles qui peuvent tolérer le sel.

Selon **Imhoff (1986)**, les limites supérieures de sel optimal toléré sont définies comme suit:

- 0,2 M pour les bactéries non halophiles.
- 1,0 à 1, 2 M pour les bactéries halophiles faibles.
- 2,0 à 2, 5 M pour les bactéries halophiles modérées.
- Au-delà de 2,5 M sont considérées comme halophiles extrêmes.

Actuellement, la classification établie par **Larsen (1986)** semble la plus adoptée. La

distinction est faite entre « tolérance au sel » et « exigence au sel ». Trois groupes peuvent être définis:

- **Groupe1:** microorganismes légèrement halophiles (optimum se situant entre 2 et 5%).
- **Groupe2:** microorganismes halophiles modérés (optimum se situant entre 5 et 20%).
- **Groupe3:** microorganismes halophiles extrêmes (optimum se situant entre 20 et 30%).

Selon une définition récente (**Da Costa et al., 1998**), un organisme est considéré comme halotolérant, s'il n'exige que des quantités minimales de Na^+ pour sa croissance et peut se développer (tolérer) à des teneurs en sel relativement faibles.

4. Osmorégulation chez les bactéries

Le terme osmoadaptation décrit l'ensemble des manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à un environnement de forte ou de faible osmolarité (**Galinski, 1995**). L'osmorégulation est le processus majeur d'osmoadaptation contrôlant l'afflux et l'efflux de solutés de la cellule (les mouvements d'eau étant considérés comme essentiellement passifs) lorsque cette dernière est placée dans des conditions de culture hyper ou hypo-osmotiquement stressantes (**O'Byrne et Booth, 2002**).

Les bactéries modérément halophiles tels *Flavobacterium halmephilum*, *Pseudomonas beijerinckii*, *Pseudomonas halophila*, *Rhodospirillum salexigens* et *Vibrio costicola* (**Ventosa, 1989**) et non halophiles tels *Haloarcula marismortui* et les Entérobactéries ont développé des mécanismes d'osmoadaptation leur permettant de survivre dans des habitats dont l'osmolarité peut fluctuer. Ici, les propriétés d'halophilie sont dépendantes des capacités de la bactérie à accumuler des molécules protectrices qui permettent de rétablir l'équilibre osmotique.

En situation de stress hyper-osmotique, la cellule restaure une pression de turgescence positive en accumulant du potassium (K^+) dans le cytoplasme (**réponse primaire**) et/ou des solutés compatibles (**réponse secondaire**) qui sont des molécules organiques de faible poids moléculaire très hydrosolubles possédant une charge nette nulle au pH physiologique tels les acides aminés et leurs dérivés (glutamate, proline, ectoine), les ammonium quaternaires (glycine betaine, carnitine) et les sucres (tréhalose, saccharose). Cette accumulation peut se réaliser par synthèse endogène ou bien par transport à partir du milieu extérieur (**Sleator et Hill, 2001**).

Les bactéries halophiles telles *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Halomonas*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Sporohalobacter* (**Chookietwattana, 2003**) se sont adaptées dans un environnement hyper salé en développant une machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations en ions dans le cytoplasme (**Sleator et Hill, 2001**).

II. Interactions microbes-plantes-sol

Le sol est un excellent siège de croissance de nombreux micro-organismes: protozoaires, mycètes, virus et bactéries (**Bouizgarne, 2013**). Des interactions très importantes et significatives ont été signalées entre les plantes, le sol, et les micro-organismes présents dans l'environnement du sol. Ces dernières peuvent être bénéfiques, nocives et/ou neutres, et peuvent de manière significative influencer la croissance et le développement des plantes (**Nadeem et al., 2013**).

Certains micro-organismes peuvent coloniser les racines entourant les plantes dans la rhizosphère (Fig. 01). Ils sont appelées les rhizobactéries (*e.g. Achromobacter, Arthrobacter, Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Enterobacter, Pseudomonas et Serratia*). Ces bactéries sont capables de se multiplier et de coloniser les racines des plantes à toutes les étapes de leurs croissances (**Bouizgarne, 2013**).

1. Rhizosphère

Le terme rhizosphère (du grec, “*rhizo*” ou “*rhiza*” signifiant “racine” et “sphère”) a été présenté la première fois par **Hiltner (1904)**, pour décrire la zone étroite du sol entourant les racines et affectée par les exsudats racinaires tels que les acides aminés, les acides organiques, les hydrates de carbone, les sucres, le mucilage et les protéines (**Zahir et al., 2004**). Cette zone est où la majorité des microorganismes du sol (des bactéries et des mycètes) résident pour utiliser les composés libérés par les racines comme une source d'énergie (**Reddy, 2014**). Dans la rhizosphère, il existe: l'ectorhizosphère (La couche du sol entourant les racines), l'endorhizosphère (la couche de racine colonisée ou potentiellement colonisable par des microorganismes) et le rhizoplan (la surface de la racine sépare les deux zones) (**Gray et Smith, 2005 ; Brimecombe et al., 2008**).

2. Rhizodéposition

Les racines des plantes libèrent des composés organiques tels que le carbone (C) dans leur environnement proche. Ce processus, nommé rhizodéposition (**Nguyen, 2002**), il recouvre:

➤ Exsudats racinaires

Les composés chimiques sécrétés par les racines dans les sols s'appellent généralement les exsudats racinaires (**Ahemad et Kibret, 2014**). Ils sont des composants solubles de faible poids moléculaire et sortent simplement de la racine par diffusion

passive. Ces exsudats comprennent des acides aminés, des acides organiques, des sucres, des composés phénoliques et d'autres métabolites secondaires (**Haichar *et al.*, 2014**).

➤ Mucilage

Le mucilage forme une couche gélatineuse qui entoure les bouts d'une racine. Il est l'un des rares signes visibles d'excrétion du carbone (C) organique par les racines (**Jones *et al.*, 2009**). Cette substance est principalement composée de polysaccharides, des protéines et des phospholipides. Il possède une vaste gamme d'avantages pour les plantes, telles que la protection du méristème de la racine contre les métaux toxiques, l'amélioration de la stabilité des agrégats du sol, qui dans le long terme, favorise l'aération du sol et la croissance des racines, empêche l'érosion du sol et maintient un flux d'eau continu vers le rhizoplan (**Read *et al.*, 2003**).

➤ Cellules de l'extrémité

Beaucoup de plantes peuvent produire un grand nombre de racines métaboliquement actives « cellules de l'extrémité », qui sont programmées pour séparer l'une de l'autre et d'être libérées de la coiffe racinaire dans l'environnement externe (**Stubbs *et al.*, 2004**).

➤ Gaz

Les racines des plantes libèrent le CO₂ dans l'environnement du sol par la respiration et la stimulation de carbohydate par le lumichrome, molécule d'exsudat bactérienne et végétal (**Phillips *et al.*, 1999**).

Le gaz hydrogène (H₂) stimule la communauté bactérienne du sol oxydant le H₂, ces bactéries peuvent stimuler la promotion de la croissance des plantes grâce à divers mécanismes tels que l'augmentation de l'élongation des racines qui diminuent les niveaux d'éthylène dans la plante hôte et leur présence est bénéfique aux plantes légumineuses et non légumineuses (**Golding *et al.*, 2012**).

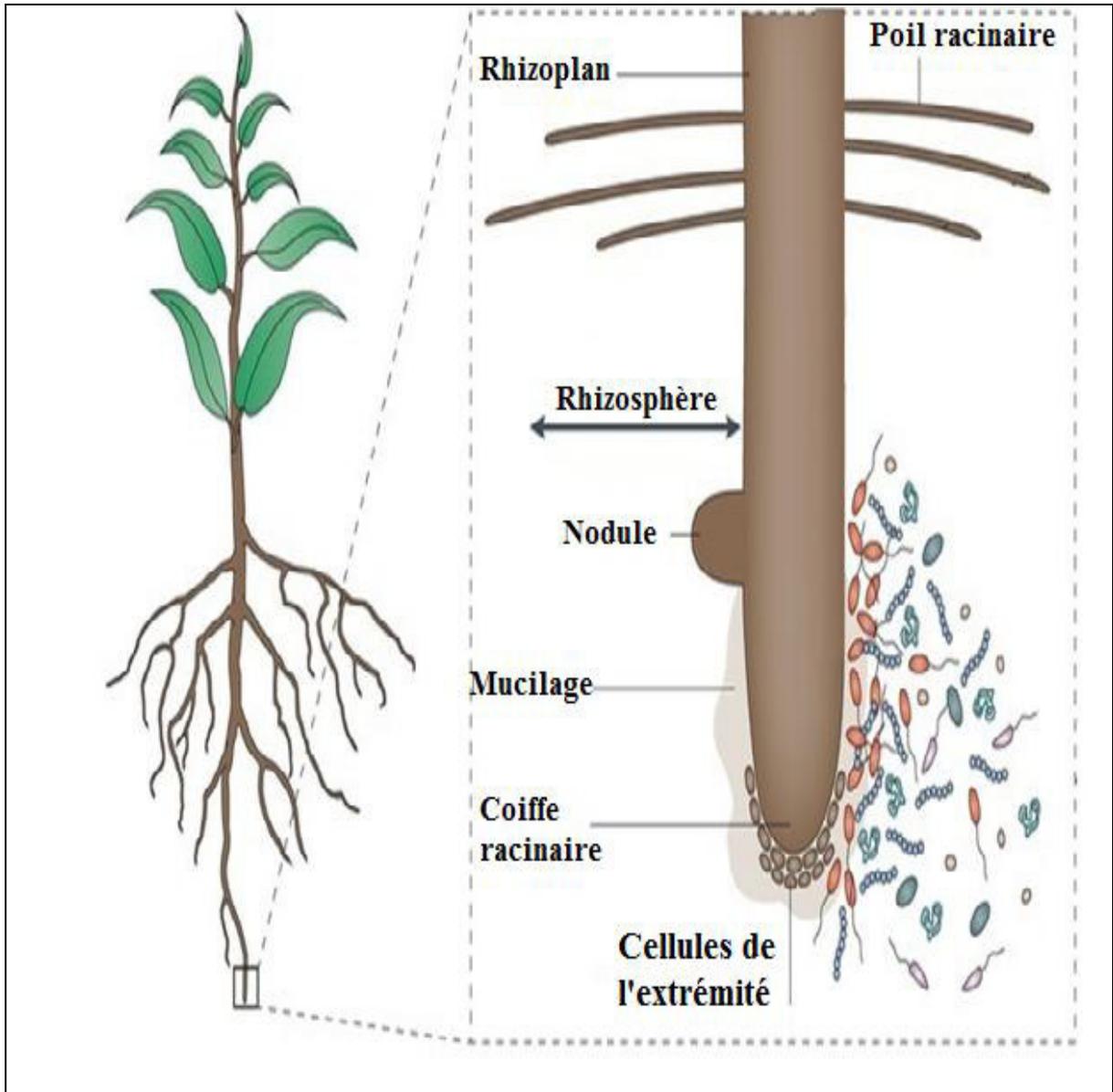


Fig. 1: Rhizodéposition de la rhizosphère (Philippot *et al.*, 2013).

3. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Les PGPR ou « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » sont des bactéries rhizosphérique colonisatrices des racines, ils sont capables de favoriser la croissance et d'augmenter le rendement des plantes (McMillan, 2007). La concentration élevée des bactéries autour des racines, dans la rhizosphère, se produit en raison de la présence des taux élevés des nutriments (particulièrement les acides aminés, les sucres et les acides organiques) qui sont exsudés des racines de la plupart des plantes, et peut alors être employée pour soutenir la croissance et le métabolisme bactériens (Glick, 2003).

Les bactéries PGPR tels: *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholdaria*, *Entérobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Pseudomonas* et *Rhizobium*. Elles peuvent être divisées en deux groupes selon leur rapport avec les plantes : bactéries symbiotiques et rhizobactéries libre-vivant (Sing, 2013). En outre, ils possèdent trois fonctions différentes: synthétisent des composés particuliers pour les plantes, facilitent la prise de certains nutriments de l'environnement, et diminuent ou empêchent les maladies des plantes (Zhuang *et al.*, 2007) (Fig. 02).

4. Effets bénéfiques des PGPR sur les plantes

Les bactéries associées aux plantes peuvent être classés dans les groupes bénéfiques, néfastes et neutres sur la base de leurs effets sur la croissance des plantes (Beneduzi *et al.*, 2012). Les PGPR affectent la croissance des plantes de deux manières différentes, directement ou indirectement (Glick *et al.*, 1999).

4.1. Effets directs

La promotion direct consiste soit de fournir à la plante un composé qui est synthétisé par la bactérie, par exemple les phytohormones ou de faciliter l'absorption de certains nutriments provenant de l'environnement (Gray et Smith, 2005).

4.1.1. Fixation biologique d'azote

L'Azote (N_2) est le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité des plantes (Stava *et al.*, 2015), une condition requise de base pour synthétiser les acides nucléiques, les protéines et d'autres composés organiques azotés (Reddy, 2014).

Bien que, il y ait environ de 78% de N_2 dans l'atmosphère, elle est indisponible aux plantes croissantes. La fixation biologique de l'azote (N_2) par les microorganismes

fixateurs d'azote converti le N_2 atmosphérique en ammoniac (NH_3) qui est un forme utilisable par les plantes par l'utilisation d'un système enzymatique complexe appelé le nitrogénase (**Ahemad et Kibret, 2014**).

Les PGPR sont capables de fixer directement l'azote atmosphérique (N_2) soit :

- **en symbiose** : *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*.
- **en non symbiose** : *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* et *Pseudomonas* etc. (**Reddy, 2014**).

4.1.2. Solubilisation des phosphates

Après l'azote, le phosphore (P) est le deuxième nutriment important limitant de la croissance des plantes (**Ahemad et Kibret, 2014**). Il est abondamment disponible dans les sols sous deux formes principales, inorganiques (l'apatite et le hydroxyapatite) et organiques (l'inositol-phosphate, les phosphomonoesters, les phosphodiesteres et les phosphotriesters). Ces formes sont indisponible pour les plantes dont elles capables d'absorber les mono et diabasique ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) (**Rath et Dangar, 2014**).

Différentes espèces bactériennes solubilisent le phosphate inorganique (e.g *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia*) (**Sivasakthi et al., 2014**). Elles peuvent aussi minéraliser le phosphate organique par la synthèse de phosphatases, qui catalysent l'hydrolyse des esters phosphoriques (**Rath et Dangar, 2014**).

4.1.3. Production de sidérophores

Le fer est un nutriment essentiel pour presque toutes les formes de la vie. Il se présente dans le sol sous forme oxydée (Fe^{3+}), ce qui le rend inaccessible aux plantes et aux micro-organismes (**Bashan et de-Bashan, 2004**). La plupart des bactéries: *Pseudomonas*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia chrysanthemi*, *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter cloacae*, *Rhizobium meliloti*, *Rhodococcus*, *Mesorhizobium* sp. et des mycètes associés aux plantes peuvent produire des chélateurs de fer, en réponse aux niveaux bas de ce dernier dans la rhizosphère, appelés les siderophores (**Rajkumar et al., 2012**). Ce sont des composés de faible poids moléculaire et servant de transporteur de l'ion ferrique Fe^{3+} à l'intérieur de la cellule microbienne (**Sing, 2013**).

Les sidérophores sécrétés par PGPR améliorent la croissance et le développement des plantes en augmentant l'accessibilité du fer dans le sol entourant les racines en empêchant la croissance des microbes pathogènes fongiques quand la concentration de Fe^{3+} est basse (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

4.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale

Les régulateurs de la croissance végétale (PGR) sont des composés organiques influencent le processus physiologique dans les plantes à des concentrations extrêmement faibles. Il existe cinq classes bien connues de PGR: les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir, 2004).

- **L'acide indole-3-acétique (IAA)** de la famille d'auxine est le membre le plus important du groupe de phytohormones. Il est synthétisé par les bactéries associées aux plantes (Sivasakthi *et al.*, 2014) tels *Agrobacterium* spp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* spp., *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas*, *Rhizobium leguminosarum* et *Xantomonas* (Weyens *et al.*, 2010). Cette phytohormone possède un rôle très important dans la croissance et le développement des plantes, les réponses cellulaires telles que la division, la différenciation et le règlement des gènes (Sivasakthi *et al.*, 2014).
- **Les cytokinines** sont impliquées dans l'intégration de la racine et l'homéostasie de réglementation de phosphate et de sulfate (Lugtenberg et Leveau, 2007). Ainsi que dans la médiation du stress environnemental des racines vers les parties supérieures de la plante (Garcia *et al.*, 2001).
- **la gibbérelline** induit l'augmentation des taux de germination des graines, des croissances longitudinales et diamétrales des tiges et celles des surfaces foliaires des plantes (Lepengue *et al.*, 2012).

4.1.5. Production d'acide 1-Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC désaminase)

L'éthylène est une phytohormone produite de manière endogène par environ toutes les plantes. Elle est importante dans l'induction de multiples changements physiologiques chez les végétaux (Nadeem *et al.*, 2014). Dans des conditions de stress générés par la salinité, la sécheresse, les métaux lourds et la pathogénicité (Singh *et al.*, 2011), le niveau endogène de l'éthylène est considérablement augmenté, dû à une production accrue d'acide

1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), un précurseur immédiat de la voie de biosynthèse d'éthylène. Ce qui affecte négativement la croissance globale des plantes (**Ahemad et Kibret, 2014**).

L'abaissement du niveau de l'éthylène est l'un des principaux mécanismes induits par les PGPR (*Agrobacterium genomovars*, *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Rhodococcus*,) en synthétisant l'ACC désaminase qui peut dégrader ACC en ammoniac et en α -cétobutyrate (**Glick et al., 2007**).

4.2. Effets indirects

La promotion indirecte se produit quand les PGPR diminuent ou empêchent les effets délétères d'un ou plusieurs organismes phytopathogènes par la production des substances antagonistes ou la résistance aux pathogènes (**Beneduzi et al., 2012**).

4.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

Le premier type d'interaction mis en jeu entre les micro-organismes est le phénomène de compétition aussi bien pour l'espace que pour les éléments nutritifs. Ce phénomène a été considéré comme un mécanisme de biocontrôle (**Amkraz, 2013**).

La compétition pour les substrats carbonés des exsudats racinaires permet aux PGPR antagonistes de réduire les populations d'agents pathogènes au niveau des zones à forte exsudation. Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d'une souche sont la mobilité (présence d'un flagelle) (**Jofre et al., 2004**), le chimiotactisme et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d'azote (**Grover, 2004**).

4.2.2. Antibiose

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte (**Zahir et al., 2004**). Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques.

Les souches de *Bacillus subtilis* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants, par exemple: la zwittermycine-A, la kanosamine (**Bouizgarne, 2013**), des lipopeptides des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine et encore des enzymes hydrolytiques (β -1,3- gluacnase) qui peuvent dégrader les parois cellulaires fongiques (**Leelasuphakul et al., 2006**).

D'autre part Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques: L'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones et les tropolones sont impliquées dans le biocontrôle (**Haas et Keel, 2003**).

4.2.3. Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance)

L'interaction de certains rhizobactéries avec les racines peut conduire à la résistance des plantes contre les microorganismes pathogènes (bactéries, champignons et virus). Ce phénomène est appelé résistance systémique induite (ISR) (**Beneduzi et al., 2012**). De nombreux composants individuels bactériennes induisent ISR, tels que les lipopolysaccharides (LPS), les flagelles, les sidérophores et les lipopeptides cycliques (**Haas et Défago, 2005**).

L'ISR a été signalé comme l'un des mécanismes par lesquels les PGPR tels *Bacillus*, *Pseudomonas (fluorescens, putida, aeruginosa, syringae)* réduire les maladies des plantes qui modulent les propriétés physiques et biochimiques des plantes hôtes (**Pérez-Montano et al., 2014**).

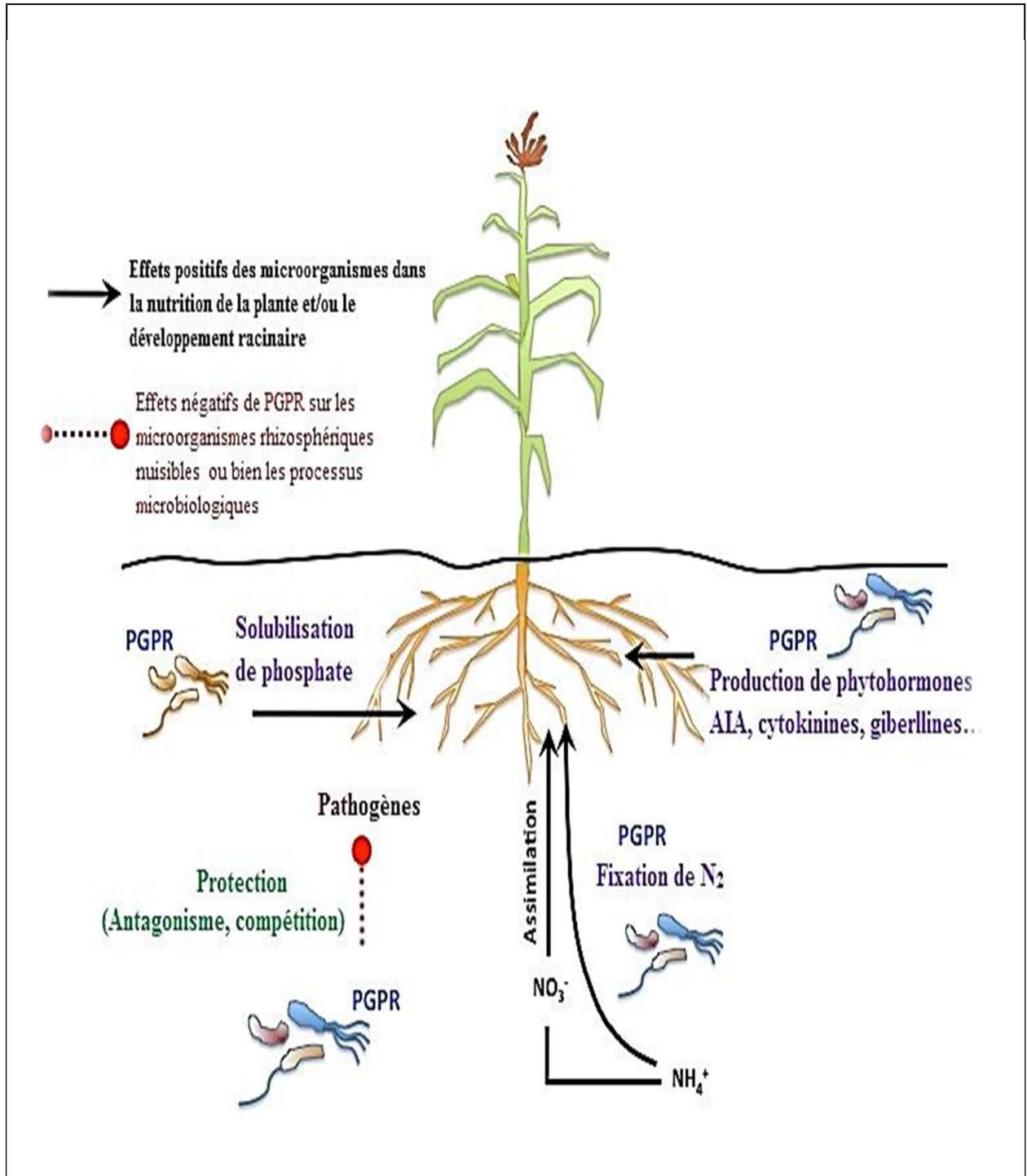


Fig. 2: Effets bénéfiques des PGPR sur la croissance des plantes (Prigent-Combaret et Moëgne-Loccoz, 2014).

III. *Pseudomonas* spp. : bactéries du sol

1. Caractéristiques générales

Les bactéries du genre *Pseudomonas* appartient à la sub-classe des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Pseudomonales*, famille des *Pseudomonaceae*. Ils sont des bacilles de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5µm de long, à coloration Gram négative, non sporulés, très généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires (Couillerot, 2009), aérobies à 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) et chimioorganotrophes (Mezaache, 2012).

Pseudomonas est un groupe bactérien très important, il comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires particulièrement abondantes dans les sols, les eaux, et souvent pathogènes des animaux et des végétaux (Palleroni et Moore, 2004). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. La plupart étant saprophytes, quelques espèces comme *P. syringae* sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'homme. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (Moore et al., 2006).

Dans les *Pseudomonas sensu stricto*, qui correspond au ARNr groupe I, les *P. fluorescents* incluent toutes les espèces possèdent la capacité de produire le sidérophore pyoverdine fluorescent: *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *P. putida* et *P. fluorescens* (Palleroni, 2008).

2. Interactions de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère et de former des associations intimes avec leurs hôtes. Ces associations peuvent mener à une maladie chez les plantes hôtes sensibles, comme par exemple de nombreux pathovars de *P. syringae* qui mettent en place des interactions pathogènes avec les plantes (Höfte et de Vos, 2006). Néanmoins, d'autres espèces sont capables de mettre en place des interactions mutualistes. Elles sont très largement représentées parmi les bactéries à effet PGPR qui ont un effet promoteur sur la croissance des plantes (Dubuis et al., 2007) 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).

La colonisation réussie par un *Pseudomonas* est une conséquence d'un équilibre complexe, continue et délicat entre un large éventail de facteurs biotique (la plante, le colonisateur bénéfique et d'autres micro-organismes, etc.) et abiotiques (type de sol, teneurs en eau et de minéraux, pH, température, composition des exsudats racinaires, la disponibilité des nutriments, etc.) (**Haas et Défago, 2005**). 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 (**Bais et al., 2004**).

Un des exemples les mieux étudiés est *P. fluorescens* WCS365. Cette souche provient de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et contrôle le piétin de racines de tomate qui est causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (**Couillerot, 2009**). Chez *P. fluorescens* WCS365 la mobilité flagellée, les lipopolysaccharides bactériens (LPS), en particulier l'antigène O, un taux élevé de croissance bactérienne, une capacité de synthèse de vitamine B₁, l'exsudation de NADH déshydrogénase et les acides aminés (leucine, l'arginine, l'histidine, la valine, l'isoleucine et le tryptophane) sont des facteurs contribuant à la colonisation des racines (**Haas et Défago, 2005**).

3. Mode d'action de *Pseudomonas* spp. fluorescents

De nombreux agents de lutte biologique de *P. fluorescens* et des espèces étroitement apparentées sont bien caractérisés par leur capacité de produire des composés antimicrobiens, y compris le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), les phénazines, le cyanure d'hydrogène et des agents tensioactifs (**Haas et Défago, 2005**). Ces métabolites secondaires inhibent différents phytopathogènes *in vitro*. Certains de ces métabolites ont été détectés dans la rhizosphère par des moyens chimiques (**Raaijmakers et al., 2002**).

En outre, le transfert de gènes codant pour la synthèse de ces composés antimicrobiens peut conférer ou accroître le potentiel de lutte biologique de *Pseudomonas* non-producteur et les souches producteur, respectivement (**Notz et al., 2002**). Certains métabolites secondaires antimicrobiens comme les DAPG produites par différentes souches de lutte biologique tels *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* et *Streptomyces* (**Rezzonico et al., 2007**) sont impliqués dans la protection des espèces végétales contre les phytopathogènes.

De nombreuses souches de *Pseudomonas* de biocontrôle produisent des enzymes extracellulaires lytiques comme la chitinase, le β -1, 3 Glucanase et le Cellulase (**Saraf et al., 2008**). Le système de sécrétion de protéines fonctionnelles de type III (SST III) par exemple chez *P. fluorescens* KD, il est décrit comme un système de micro-injection de facteurs de virulence et permet la sécrétion de protéines du cytosol bactérien directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes hôtes (e.g. *Pythium ultimum*) (**Viollet, 2010**) (Fig. 03).

La compétition pour les nutriments et la colonisation de la surface racinaire entre les souches de *P. fluorescens* et les pathogènes des racines a été proposée comme un trait important pour la lutte biologique. La concurrence peut concerner l'acquisition des substrats organiques libérés par les graines et les racines (**Kamilova et al., 2005**), ainsi que des micronutriments comme le fer soluble, qui est souvent en quantités limitant dans le sol. L'acquisition de fer entraîne la production de transporteurs de fer (les sidérophores) est l'un des plus importants mécanismes responsable de la suppression des agents pathogènes des plantes par *Pseudomonas* spp. (**Srivastava et Shalini, 2008**).

En plus de l'antagonisme et de la concurrence, les souches de lutte biologique de *P. fluorescens* et les espèces apparentées peuvent également agir directement sur la croissance, la physiologie et la santé de la plante qu'ils colonisent.

Tout d'abord, plusieurs souches peuvent induire une réponse ISR dans la plante, ce qui rend la plante plus efficace dans la lutte des agents pathogènes (**Bakker et al., 2007**). Dans *P. fluorescens* WCS 417r, l'ISR implique les phytohormones jasmonate et d'éthylène comme des signaux qui active les gènes des plantes impliqués dans les mécanismes de défense (**Pieterse et al., 2003**). ISR peut être déclenchée par le contact de la plante à certains composants de la surface cellulaire de souches de lutte biologique, telles que les lipopolysaccharides et les flagelles ou l'exposition aux métabolites de lutte biologique, y compris la pyoverdine et DAPG (**Pieterse et al., 2003**). Deuxièmement, la désamination du précurseur de l'éthylène, 1- aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), peut diminuer la synthèse de l'éthylène. D'un autre coté l'introduction de l'ACC désaminase dans la souche de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 améliore la suppression de la fonte des semis de concombre causée par *Pythium* (**Blaha et al., 2006**).

4. *Pseudomonas* spp. face aux stress abiotiques

Les PGPR participent par des modifications globales du fonctionnement des plantes à l'amélioration de la santé des plantes. Plus particulièrement, certaines PGPR induisent une amélioration des résistances des plantes à des stress biotiques comme les microorganismes pathogènes des plantes et les parasites (virus, bactéries, mycètes, insectes, nématodes, etc.) et abiotiques comprenant la salinité, la sécheresse, l'inondation, la température et les métaux lourds (**Bresson, 2014**).

Certaines espèces de *Pseudomonas* peuvent moduler la sensibilité des racines et la croissance des feuilles lors d'un déficit hydrique par modulation de l'éthylène (**Glick et al., 1998**) qui joue un rôle de signal lors d'un stress salin.

P. putida a la capacité de réduire la production d'éthylène par la dégradation de son précurseur l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) via une activité ACC-déaminase. Différentes familles de bactéries, y compris *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* et *Rhizobium* peuvent améliorer la croissance des légumineuses et des cultures dans des conditions de stress abiotique (**Egamberdieva et Kucharova, 2009**).

Les *Pseudomonas* peuvent induire des changements dans la composition et dans la plasticité des membranes des plantes, ce qui peut présenter une étape clé dans l'amélioration de la tolérance à la sécheresse (**Hirt, 2012**).

Dans les feuilles de laitue, la co-inoculation de la souche *P. mendocina* Palleroni et un champignon mycorhizien arbusculaire augmenterait significativement l'accumulation de proline ainsi que l'activité d'enzymes détoxifiantes dont les peroxidases et les catalases lors de stress hydrique modéré et sévère (**Kohler et al., 2008**). Chez le maïs (*Zea mays*), l'inoculation de *Rhizobium* et de *Pseudomonas* induit une réaction de tolérance au sel se traduisant par une augmentation de la production de proline, un maintien de la teneur en eau dans les feuilles et une absorption sélective des ions K⁺ (**Bano et Fatima, 2009**). L'inoculation de *Hyoscyamus niger* (jusquiame noire) par deux PGPR *P. putida* et *P. fluorescens* induit une augmentation de multiples activités enzymatiques impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le stress hydrique (**Ghorbanpour et al., 2013**).

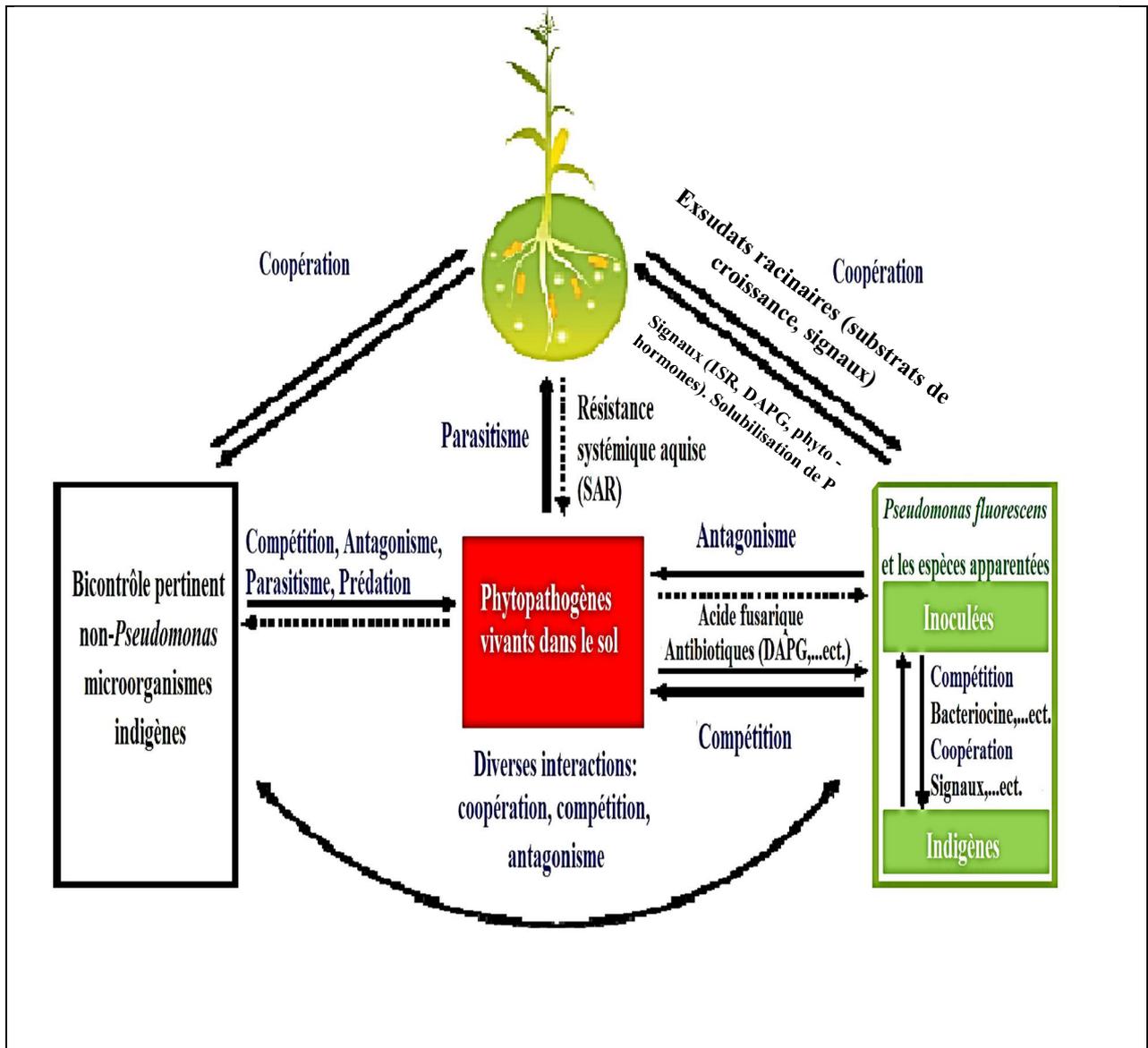


Fig. 3: Mécanismes de protection des plantes par les *Pseudomonas* fluorescents comme agents de biocontrôle (Couillerot, 2009).

Matériels
et
méthodes

I. Echantillonnage

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été isolées à partir de sol prélevé en Mars 2010 d'un champ d'orge moissonné situé à Chott El Beïdha dans la région de Hammam Essoukhna (Latitude 35°55'N et Longitude 05°45'E), au Sud-Est de Sétif.

Le site se compose de deux habitats particuliers (sujet à la convention RAMSAR):

- le premier est la sebkha, c'est un lac naturel, excessivement salin, temporaire et dépourvu de végétation. Il s'inonde en période pluvieuse et s'assèche en été formant des croutes blanchâtres de sel.
- le second est un chott ou prairie humide cernant la sebkha. Cette partie moins salinisée est aux halophytes.

Les terrains voisins sont, dans leur grande majorité, des exploitations agricoles où la céréaliculture est l'activité la plus répandue. Les sols entourant le site sont alcalins à structures dégradées, argileux plus ou moins hydromorphes (**Anonyme, 2005 ; Khaznadar et al., 2009**).

Les échantillons du sol sont prélevés aseptiquement en plusieurs parcelles de champ (nb=6) distantes d'environ 100 m du lac principal sur une profondeur de 0 à 30 cm, après avoir écarté la couche superficielle du sol. Ils sont transportés au laboratoire et maintenus à 4°C.

II. Réactivation des souches

Les souches *Pseudomonas* spp. fluorescents individualisées (P₁, P₂, P₃, P₄) et la souche de référence *P. fluorescens* CHA0 (ATCC) sont repiquées dans des tubes contenant 5ml de bouillon nutritionnel (Annexe 1) et incubé à 28°C/24h. La souche de référence *Pseudomonas fluorescens* CHA0 a été isolée pour la première fois à partir de la rhizosphère du tabac dans un sol résistant aux pourritures racinaires (**Keel et Défago, 1997**). Cette souche nous a été fournie par le Professeur Défago (Institute of plant sciences, Zurich, Zwitterland).

III. Conservation des souches

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents pures sont conservées après la croissance à 28°C dans milieu King B (**King et al., 1954**) (Annexe 2) additionné de glycérol (15 %) à -20°C. Le repiquage est effectué tous les 6 mois.

IV. Examen macroscopique et microscopique

1. Examen macroscopique

Les cinq souches de *Pseudomonas* sont cultivées sur un milieu KB pour déterminer leurs caractères morphologiques (forme de la colonie, taille, couleur, aspect, odeur et transparence). La production de pigment fluorescent jaune-vert est aussi recherchée. Après une incubation de 1/4 jours entre 27-28 °C, le développement du pigment fluorescent a été révélé à l'œil nu ou sous UV (365nm).

2. Examen microscopique

2.1. Gram et mobilité

La coloration de Gram est effectuée selon la méthode classique. Parallèlement, un test plus rapide d'hydroxyde de potassium (KOH 3%) est effectué.

La mobilité des bactéries a été étudiée par observation microscopique d'une culture bactérienne fraîche.

V. Caractéristiques biochimiques

Les tests biochimiques qui ont été réalisés sont: la fluorescence sur milieux de King A et B, la croissance à 4 et 42°C, le test de l'oxydase, de la catalase, de la gélatinase, de la protéase, de l'uréase, de l'arginine dihydrolase (ADH), de la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la tryptophane désaminase (TDA) et de la nitrate réductase. La voie d'attaque du glucose, la dégradation de citrate, la production d'indole et la réaction de Voges-Proskauer sont également réalisés. Les caractères phénotypiques et biochimiques des souches sont déterminés et comparés à ceux décrits dans le manuel de Bergey (Bergey's manual of determinative bacteriology, 9ème édition).

VI. Mise en évidence de l'halotolérance des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

L'étude de l'halotolérance des quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (P₁, P₂, P₃, P₄) est réalisée sur milieu minimum Davis (minérale) (Rangarajan *et al.*, 2002) (Annexe 3).

Le milieu minimum Davis est préparé avec les concentrations croissantes de sel (NaCl): 0,1 M (5,8g/l), 0,2M (11,72g/l), 0,3M (17,58 g/l) et 0,5 M (29,3 g/l). Un témoin sans sel est aussi préparé.

Un volume de 10 ml de milieu minimum Davis est ensemencé par 100 µl d'une culture fraîche (de 24h) de souches de *Pseudomonas*. Après incubation à 28°C/72h, la lecture de la densité optique (D.O) est réalisée à la longueur d'onde λ de 600 nm. La concentration maximale tolérée correspond à la plus forte concentration en NaCl permettant la croissance bactérienne. Ce test est réalisé en duplicata.

VII. Activité antifongique

Ce test est effectué pour vérifier l'existence d'une éventuelle action inhibitrice des souches de *Pseudomonas* isolées vis-à-vis de quatre agents phytopathogènes : *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Mucor ramannianus* (**Cattelan et al., 1999; Hariprasad et al., 2009 ; Sgroy et al., 2009**).

- *F. oxysporum* est responsable de diverses maladies chez les plantes, la principale étant le flétrissement vasculaire caractérisée par un flétrissement des plantes dû à l'envahissement des vaisseaux du xylème par le pathogène.
- *A. flavus* est un champignon du sol saprophyte qui infecte et contamine les cultures de semences pré-récolte et post-récolte (**Amaike et Nancy, 2011**).
- *A. niger* est l'une des espèces d'*Aspergillus* les plus communes responsables de la pourriture après la récolte des fruits frais.
- *M. ramannianus* est un agent phytopathogène qui provoque la pourriture des plantes.

Ils sont isolés par l'équipe de phytopathologie du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Université de Sétif).

Un cylindre de 3 mm de diamètre de chaque mycélium est prélevé à partir d'une culture fraîche de 6 jours à l'aide de l'emporte-pièce, puis placé au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Annexe 4). Ce milieu est inoculé avec 5µl de chaque culture bactérienne étudiée. Le témoin est inoculé uniquement par le champignon à tester (**Hariprasad et al., 2009**). Les boîtes sont incubées à 28°C/ 7 à 10 jours selon la température optimale du champignon pathogène.

Les résultats sont notés lorsque la croissance des mycelia dans les boîtes des témoins atteint les points d'inoculation des souches bactériennes (**Hariprasad et al., 2009**). La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de *Pseudomonas*, comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante:

$$I = [(T-C)/T] \times 100$$

I: pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

T: diamètre moyen de mycélium dans la boîte de témoin (mm).

C: diamètre moyen de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (mm).

Résultats

I. Examen macro et microscopique

1. Examen macroscopique

Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (P₁, P₂, P₃, P₄) cultivent rapidement (24h) sur milieu King B en donnant des colonies crème à blanchâtres, rondes pigmentées aux bords réguliers, des reliefs bombés et des surfaces lisses. La présence d'une odeur aromatique de seringat est assez caractéristique chez toutes les souches (Tab. 1).

Toutes les souches produisent un pigment jaune-vert (la pyoverdine) sur le milieu de King B, fluorescent sous UV (365nm) diffusible dans le milieu (Fig. 04).

2. Examen microscopique

L'observation microscopique des cinq souches a permis de distinguer des cellules bactériennes sous forme de bacilles à Gram négatif droits ou légèrement incurvés à bouts arrondis. Les cellules se présentent isolées ou groupées par deux. Elles sont mobiles et asporulées (Fig. 05).

II. Caractéristiques biochimiques

Toutes les souches ont été étudiées ainsi que la souche de référence, *Pseudomonas fluorescens* CHA0, sont oxydase⁺, catalase⁺, nitrate réductase⁺, protéinase⁺, ADH⁺, citrate⁺, et elles dégradent le glucose par voie oxydative. Par ailleurs, elles donnent une réponse négative aux LDC, ODC, TDA, indole, uréase, Voges-Proskauer, production d'H₂S (Tab. 2). Toutes les souches produisent un pigment soluble dans l'eau, la pyoverdine, sur le milieu de King B. Deux entre elles (P₁ et P₃) sont incapables de synthétiser, la pyocyanine, pigment soluble dans le chloroforme sur King A; elles ne cultivent pas à 42°C. Ces caractères orientent leur identification vers les espèces de *P. fluorescens* ou *putida*. En revanche, l'absence de gélatinase chez les souches P₁ et P₃ fait penser à *P. putida*. Le reste des souches (P₂, P₄) synthétisant la pyocyanine et cultivant à 42°C et non à 4°C sont identifiées comme des *P. aeruginosa*.

Tab. 1: Caractères morphologiques des souches de *Pseudomonas* isolées.

Souches	Forme	Taille (mm)	Élévation	Surface	Opacité	Pigment
P₁	Ronde	6	Bombée	Lisse brillante	Translucide	Vert, soluble
P₂	Ronde	4	Bombée	Lisse brillante	Opaque	Vert, soluble
P₃	Ronde	3	Bombée	Lisse brillante	Translucide	Vert, soluble
P₄	Ronde	6	Bombée	Lisse brillante	Opaque	Vert, soluble

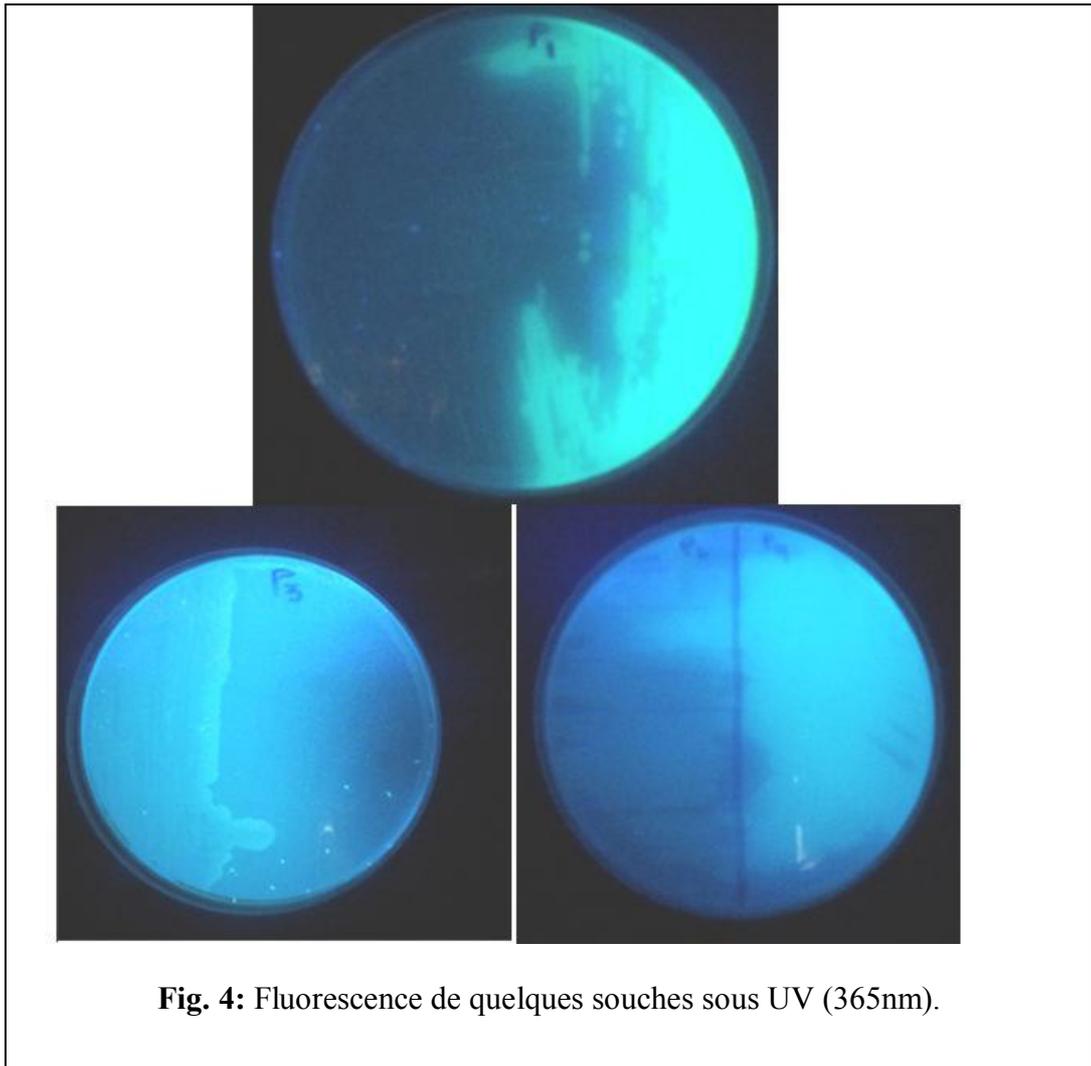


Fig. 4: Fluorescence de quelques souches sous UV (365nm).

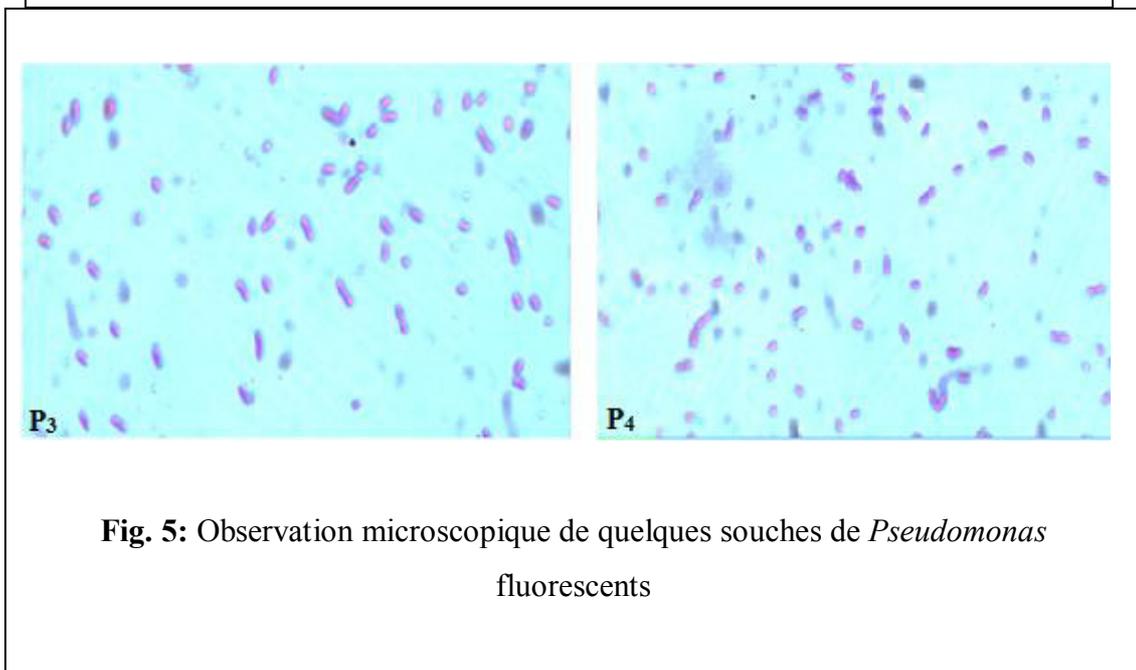


Fig. 5: Observation microscopique de quelques souches de *Pseudomonas* fluorescents

Tab. 2: Quelques caractères biochimiques de souches de *Pseudomonas* isolées

Tests	Souches				
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	CHA0
Coloration de Gram	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Gélatinase	-	+	-	+	+
Protease	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+
Croissance sur King A	-	+	-	+	-
Croissance sur King B	+	+	+	+	+
Uréase	-	-	-	-	-
Lysine	-	-	-	-	-
Décarboxylase (LDC)	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase (ADH)	-	-	-	-	-
Ornithine décarboxylase (ODC)	-	-	-	-	-
Tryptophane désaminase (TDA)	-	-	-	-	-
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+
Production d'acide à partir du glucose	-	+	-	+	-
Croissance à 42C°	+	+	+	+	-
Croissance à 4C°	-	-	-	-	+

+ : Positif

- : Négatif

III. Etude de l'halotolérance de souches de *Pseudomonas fluorescents*

Les quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (P₁, P₂, P₃, P₄) sont cultivées dans un milieu minimum Davis préparé avec des concentrations croissantes de sel. Après 72h d'incubation à 28°C, la mesure de la densité optique (D.O_{600nm}) révèle que l'absorbance diminue lorsque la concentration de NaCl augmente dans le milieu (Tab. 3).

Cependant toutes les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (P₁, P₂, P₃, P₄) tolèrent jusqu'à 0,5M/NaCl (Fig. 06).

IV. Activité antifongique

Au terme de 10 jours d'incubation à 28°C, toutes les souches manifestent une action inhibitrice vis-à-vis de *F. oxysporum*, *A. niger*, *A. flavus* et *M. ramannianus* à l'exception de P₂, P₃ et CHA0 envers *A. niger* (Fig. 07, Tab. 4).

En présence de souche antagoniste de *Pseudomonas* fluorescents P₁ (53%), le diamètre des colonies mycéliennes de *A. niger* est réduit fortement (en comparaison au témoin non inoculé par contre l'activité inhibitrice envers *F. oxysporum*, *A. flavus* et *M. ramannianus* est moyenne, elle est de l'ordre de 16, 24 et 22% respectivement.

De même chez P₄ l'action inhibitrice vis-à-vis de *A. niger* et *M. ramannianus* est forte (Fig. 08). Elle est de l'ordre de 51 et 70%. Cette action est moyenne envers les autres champignons *F. oxysporum* et *A. flavus* (24%).

Les autres souches de *Pseudomonas* P₂, P₃ et CHA0 ont révélé une activité inhibitrice moyenne envers *M. ramannianus* (22 %), faible contre *F. oxysporum* et *A. flavus* (3 et 10%) et absente contre *A. niger* (0%).

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum*, *A. niger*, *A. flavus* et *M. ramannianus* est observé chez les deux souches P₁ et P₄ est le plus fort par rapport les autres souches P₂ et P₃ et *P. fluorescens* CHA0. Donc l'action antagoniste la plus forte est estimée à 70% pour P₄, 53% pour P₁ et 22% pour P₂, P₃ et CHA0 (Fig. 09, 10, 11).

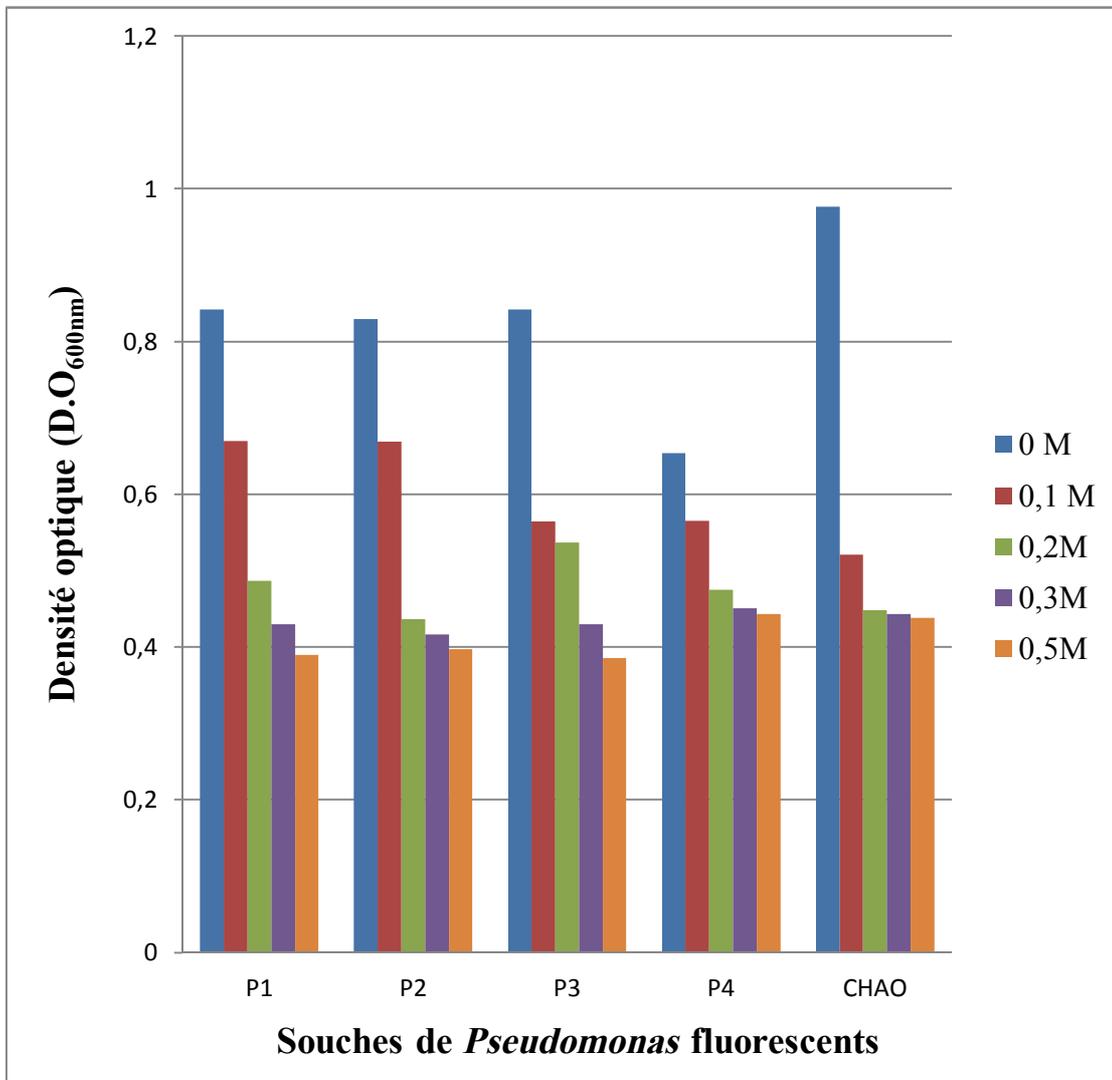


Fig. 6: Appréciation de l'halotolérance des souches de *Pseudomonas* fluorescents en présence de NaCl dans un milieu minimum Davis.

Tab. 3: Densité optique des souches de *Pseudomonas* fluorescents avec des concentrations croissantes de NaCl dans un milieu minimum Davis.

concentrations souches	0 M	0,1 M	0,2M	0,3M	0,5M	Densité optique (D.O_{600nm})
P₁	0,842	0,67	0,487	0,43	0,39	
P₂	0,83	0,669	0,437	0,417	0,398	
P₃	0,842	0,565	0,537	0,43	0,386	
P₄	0,654	0,566	0,475	0,451	0,444	
CHAO	0,977	0,521	0,449	0,444	0,439	

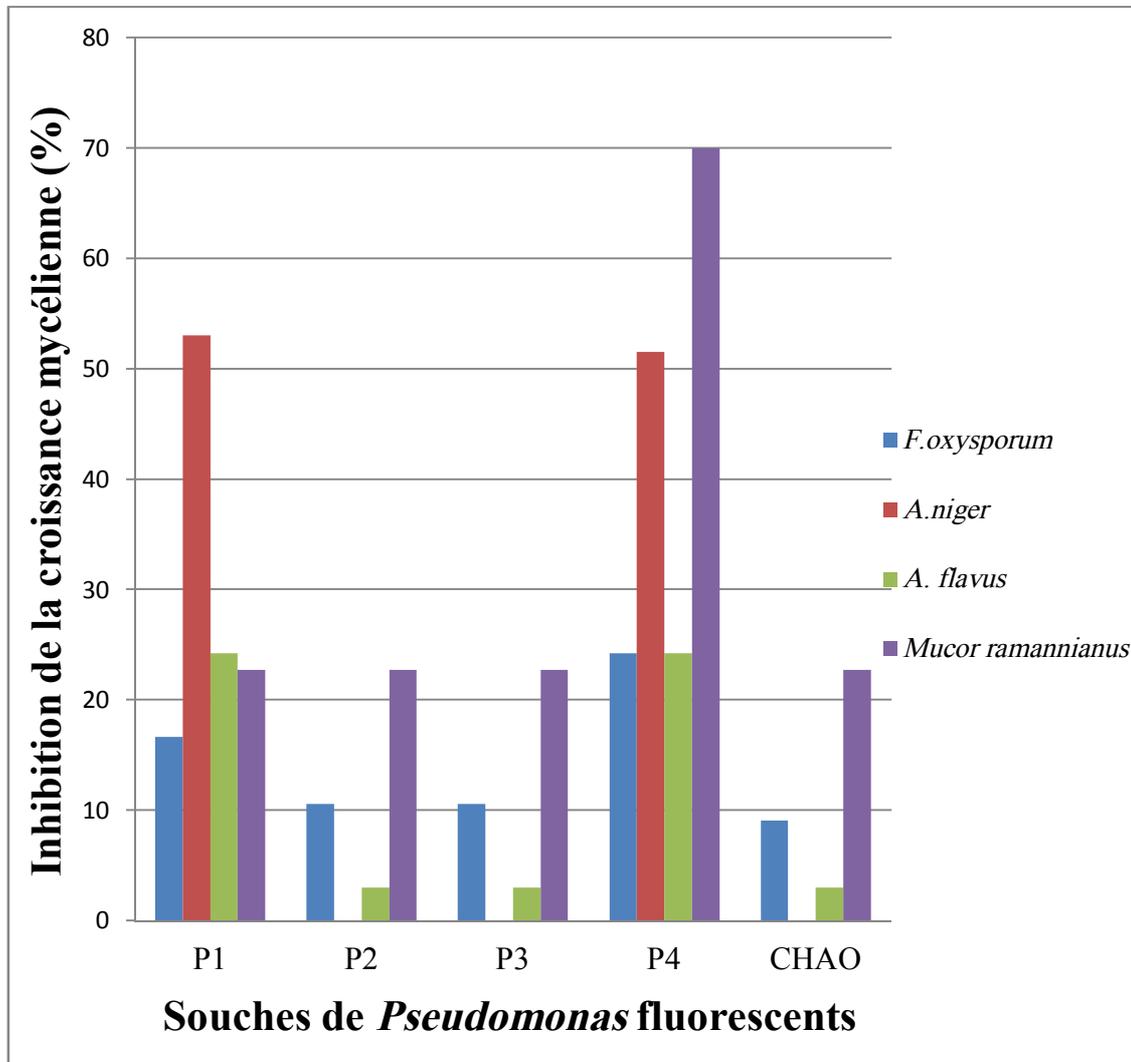


Fig. 7: Pourcentage d'Inhibition de la croissance mycélienne des colonies de *F.oxysporum*, *A. niger*, *A. flavus* et *M. ramannianus* en présence des souches de *Pseudomonas* fluorescents.

Tab. 4: Diamètre des colonies de *F. oxysporum*, *A. niger*, *A. flavus* et *M. ramannianus* en présence des souches de *Pseudomonas* fluorescents.

Souches	Diamètre de croissance (mm)			
	<i>F.oxysporum</i>	<i>A.niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>M. ramannianus</i>
P₁	27,5	15,5	25	25,5
P₂	29,5	33	32	25,5
P₃	29,5	33	32	25,5
P₄	25	16	25	10
CHAO	30	33	32	25,5
Témoin	33	33	33	33

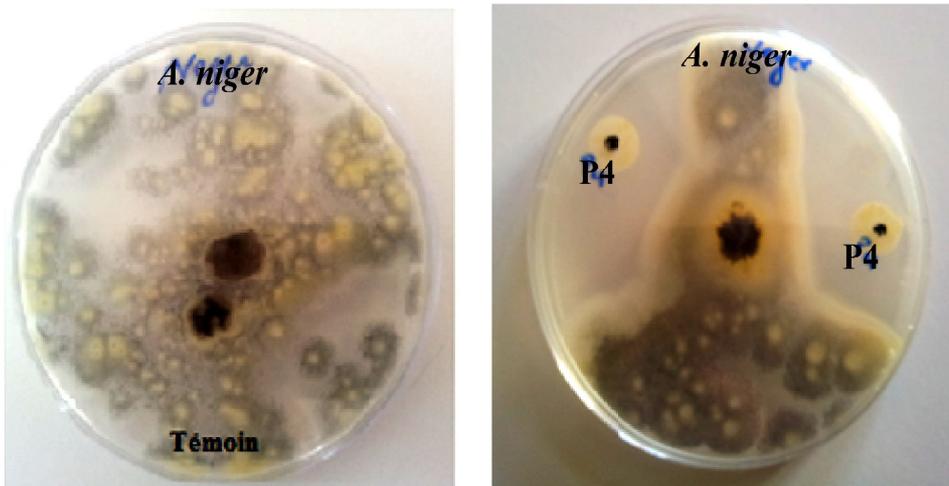


Fig. 8: Activité antagoniste vis-à- vis *A. niger*

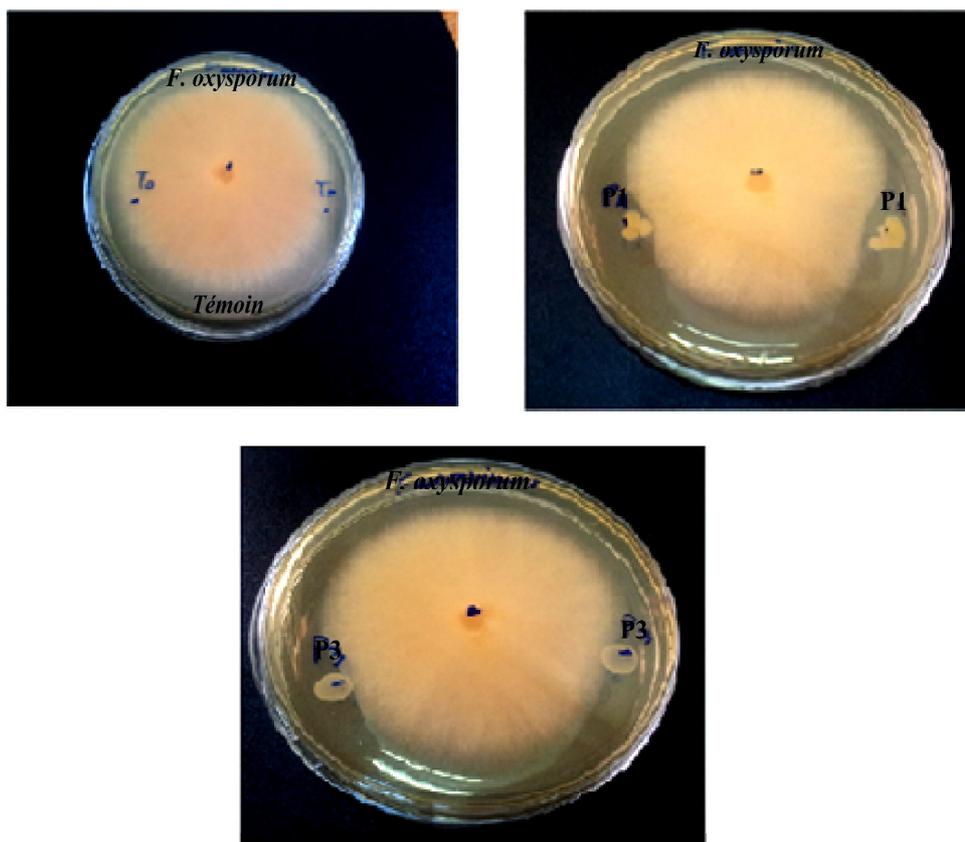


Fig. 9: Activité antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas* vis-à- vis *F. oxysporum*

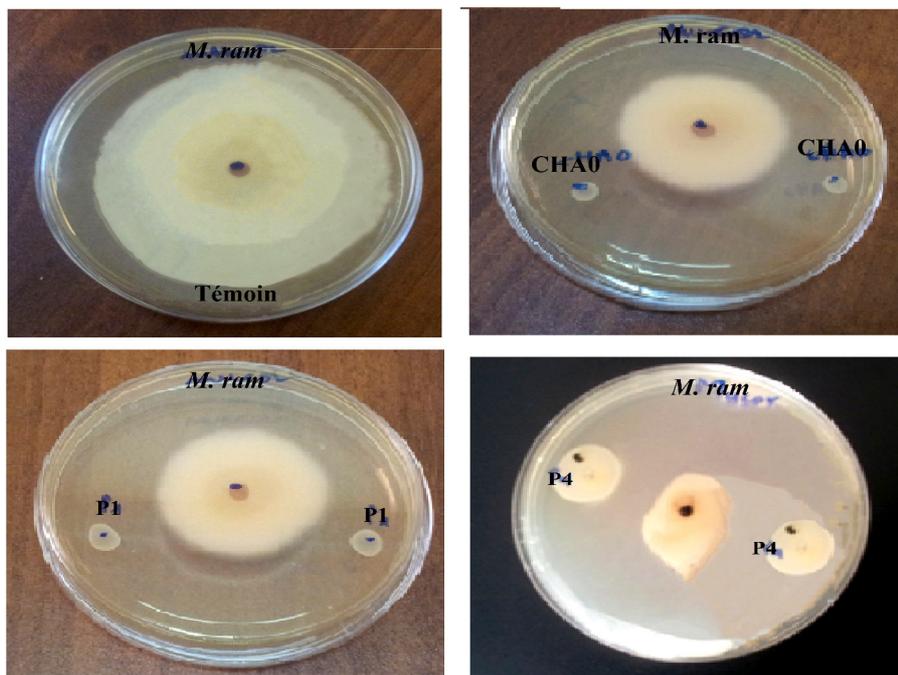


Fig. 10: Activité antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas* vis-à-vis *M. ramannianus*

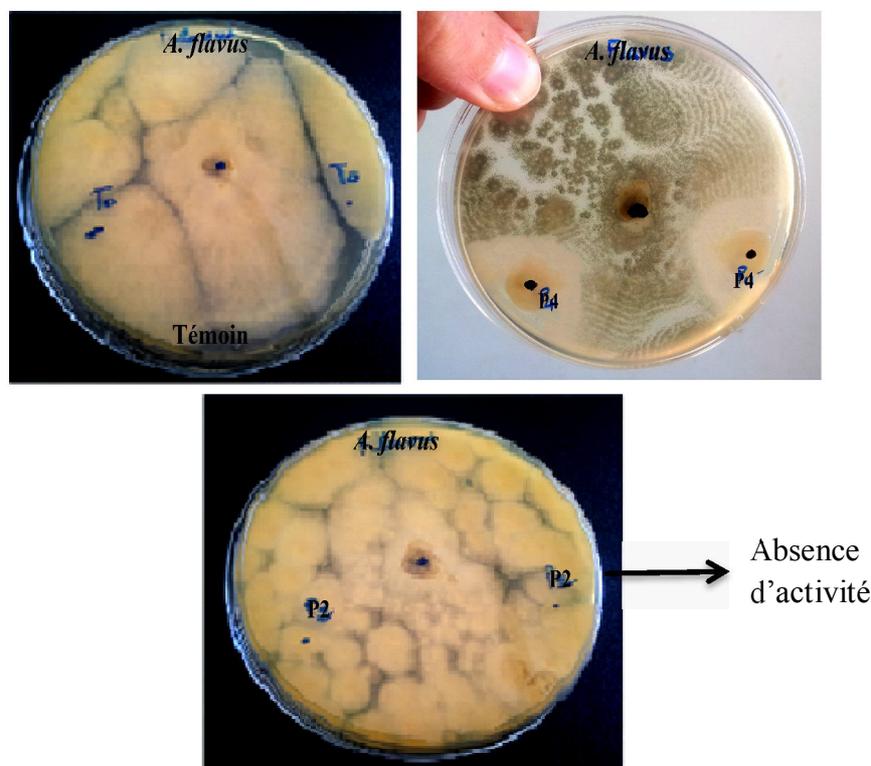


Fig. 11: Activité antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas* vis-à-vis *A. flavus*

Discussion

I. Halotolérance bactérienne

La capacité d'halotolérance des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents cultivées en milieu minimum Davis réduite avec l'augmentation de la concentration en NaCl.

Dans ces essais, les souches de *Pseudomonas* (P₁, P₂, P₃, P₄) sont particulièrement résistantes au sel. Elles peuvent tolérer jusqu'à 0,5M/NaCl en milieu minimum Davis. Ceci reflète leur capacité intrinsèque de tolérance.

L'intensité de la résistance au sel serait liée à la possibilité de synthèse cellulaire. La tolérance vis-à-vis du sel est donc un caractère propre à chaque souche, elle est souche dépendante ; chacune possède un contenu protéique donné et présente, par conséquent, un niveau de résistance au stress létal différent. L'halotolérance intrinsèque ne permet cependant qu'une adaptation limitée au stress osmotique.

Les souches de *Pseudomonas* peuvent conserver une forte capacité de croissance en présence de sel (0,5M/NaCl). Ceci est exclusivement dû à l'accumulation, par synthèse endogène, d'une variété de solutés compatibles. Ces dernières permettent de restaurer une pression de turgescence cellulaire compatible avec les fonctions cellulaires.

En similitude avec d'autres bactéries, les souches de *Pseudomonas* accumulent des ions K⁺ et du glutamate puis des petites molécules organiques si le choc augmente en intensité. Le dipeptide NAGGN et l'osmoprotecteur majeur chez *P. aeruginosa* alors que le taux de tréhalose est mineur. D'autres solutés compatibles tels le O- α -glucopyranosyl- α (1,2)- glycérol (glucosylglycérol) et l' α -glycérolglucoside ont été rapportés chez *P. mendonica* et *P. pseudoalcaligenes* (**Pocard et al., 1994**). Les cellules de *P. fluorescens* soumises à un stress osmotique synthétisent le tréhalose, le NAGGN, et le glycosylglycérol comme osmolytes endogènes majeurs. Le mannitol est accumulé chez *P. putida* (**Bonaterra et al., 2007**).

Les valeurs finales de D.O_{600nm} des souches diminuent lentement pour des concentrations en NaCl inférieures à 0,5 M. La présence d'une telle concentration dans le milieu réduit les taux de croissance et allonge le temps de latence. De plus, elle pourrait provoquer un choc hyperosmotique modéré conduit à une plasmolyse transitoire, ceci entraîne des modifications de la physiologie des bactéries, particulièrement les fonctions cellulaires telles l'absorption de nutriments du milieu, la réplication de l'ADN et la biosynthèse de macromolécules (**Lucht et Bremer, 1994**).

En général, les quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (P₁, P₂, P₃, P₄) halotolérantes ainsi que la souche de la référence *Pseudomonas fluorescens* CHA0 cultivées en milieu minimum Davis salé dépourvu de sources d'osmoprotecteurs présentent sensiblement les mêmes caractéristiques de croissance et d'adaptation à la salinité.

Le facteur sigma était important dans l'adaptation des *P. fluorescens* dans des conditions de haute osmolarité et les concentrations élevées du NaCl ou du sorbitol ont stimulé l'expression d'algU dans les deux *Pseudomonas* (*fluorescens* et *Syringae*). Puisque des *Pseudomonas* associées aux plantes peuvent être exposées aux sécheresses et des conditions osmotiquement dures dans la rhizosphère, la capacité de s'adapter à ces conditions est susceptible d'être importante pour la colonisation de ces surfaces des plantes (**Schnider-Keel et al., 2001**).

Enfin, les écosystèmes fluctuants (faible a_w , forte salinité) favorisent le développement de bactéries présentant une bonne tolérance au stress osmotique, ceci suppose l'existence d'une pression de sélection exercée par le milieu naturel. Ces constatations confirment donc le lien étroit entre l'halotolérance des souches et leur origine.

II. Activité antifongique

Un effet antagoniste, *in vitro*, vis-à-vis de quatre champignons phytopathogènes: *F. oxysporum*, *A. niger*, *A. flavus*, *M. ramannianus* a été observé pour quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents P₁, P₂, P₃, P₄ et la souche de référence *P. fluorescens* CHA0.

Les effets majeurs ont été obtenus contre *M. ramannianus* et *A. niger* qui se présentent comme les plus sensibles. L'action antagoniste de ces souches ne semble pas être spécifique de l'agent pathogène et elle peut être à large spectre, agissant sur presque tous les agents phytopathogènes testés.

Andreote et al. (2009) ont prouvé l'efficacité de *P. putida* strain P9 dans la suppression de *Phytophthora infestans* agent pathogène de la pomme de terre. Ils ont obtenu une diminution des lésions de l'ordre de 45% après cinq jours de l'infection par *Ph. infestans*. L'importance de la suppression dépend du cultivar utilisé et semble être associée à une modification des communautés bactériennes associées aux racines de cette plante.

Mercado-Blanco *et al.* (2004) ont pu isoler des bactéries appartenant aux espèces *P. fluorescens* et *P. putida* à partir des sols entourant les racines des oliviers. Ces bactéries ont été utilisées pour contrôler le champignon *Verticillium dahliae*. Les résultats de trois expériences ont indiqué que le traitement des racines avec certains des isolats de *P. fluorescens* a considérablement retardé l'apparition des symptômes (31 à 82%), et a réduit l'incidence de la maladie et sa sévérité finale (73 à 96%) respectivement, par rapport au témoin non traité, et ce sous conditions de sévère verticilliose (**Mercado-Blanco *et al.*, 2004**).

Les souches P₁ et P₄ sont les plus efficace contre les champignons phytopathogènes par rapport aux autres souches P₂, P₃ et la souche de référence *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Cette variabilité dans l'expression de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* suggère une diversité dans les mécanismes impliqués dans le biocontrôle.

La forte activité antifongique est exercée par les souches de *Pseudomonas* fluorescents P₁ et P₄ à l'encontre de *A. niger* et *M. ramannianus* (taux d'inhibition étend de 51 à 70%), ses performances peuvent être corrélés à son pouvoir métabolique, notamment secondaire ou pourrait associer à l'implication de sidérophores. La diffusion de ses molécules a accentué le déficit en fer au voisinage de la colonie bactérienne, en conduisant à l'inhibition de la croissance mycélienne à sa proximité.

Kloepper *et al.* (1980) ont été les premiers à mettre en évidence l'effet direct d'une souche de *P. fluorescens* sur la croissance de certains pathogènes. Cette action directe se fait, en présence de l'agent pathogène. Elle conduit à une modification des équilibres microbiens dans la rhizosphère à l'encontre des pathogènes. Les mécanismes mis en jeu sont :

- L'antibiose par la production d'antibiotiques et de molécules toxiques (la pyrrolnitrine, la pyolutéorine, l'acide cyanhydrique, DAPG...)
- La compétition pour l'espace et les éléments nutritifs (le fer et les composés carbonés).

Ces mêmes auteurs ont été les premiers à prouver la synthèse d'un sidérophore (Pseudobactin) par une souche de *P. putida* et ont pu démontrer la corrélation entre la synthèse de cette molécule et le potentiel antagoniste de cette souche contre les pathogènes; ceci grâce à l'utilisation de souches mutantes dont le gène responsable de la synthèse de Pseudobactin a été supprimé.

De manière similaire, Becker et Cook (1988) ont montré que 5 souches de *Pseudomonas* fluorescents déficientes pour la synthèse des sidérophores, suite à une mutation par le N méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, deviennent incapables d'inhiber la croissance de *Pythium ultimum*. L'importance de cette compétition vis-à-vis du fer a été confirmée par Weller et al. (1988) qui ont montré que la suppression de la pourriture des racines du blé, à cause de *G. graminis var. tritici.*, par les *Pseudomonas* spp. fluorescents est due à la production de sidérophores. Cette production dépend de la concentration du fer dans le milieu de culture.

Weller et Cook (1983) avaient auparavant rapporté, que malgré l'importance de la production de sidérophores dans le biocontrôle, ce n'est probablement pas le seul mécanisme impliqué dans l'antagonisme.

La plupart des *Pseudomonas* spp. fluorescents dont l'efficacité a été prouvée dans le biocontrôle des maladies de plantes, produisent un ou plusieurs antibiotiques autre que les sidérophores. Le rôle attribué à ces antibiotiques dans le biocontrôle des pathogènes telluriques, vient de la corrélation de leurs production et de l'inhibition des pathogènes *in vitro*, et de la suppression de la maladie *in vivo*. Parmi ces composés antibiotiques, six ont prouvé leur efficacité dans le biocontrôle des maladies racinaires. Les phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine et les lipopeptides cycliques sont diffusible, alors que l'acide cyanhydrique est volatile (**Haas et Défago, 2005**).

Alternativement, les phénazines sont des antibiotiques oxydo-réducteurs de pointe agissant vis-à-vis du pathogène *F. oxysporum* par l'accumulation de radicaux d'oxygène toxiques. Le mode d'action de la pyolutéorine n'a pas encore été élucidé alors que la pyrrolnitrine a été décrite comme inhibitrice des chaînes respiratoires fongiques (**Mavrodi et al., 2006**).

Plusieurs auteurs ont pu isoler, purifier et identifier plusieurs molécules antibiotiques. Howell et Stipanovic (1980) ont mis en évidence la synthèse de deux antibiotiques, la Pyrrolnitrine et la pyolutéorine, par la souche Pf5 de *P. fluorescens*. Ces antibiotiques inhibent in-vitro la croissance de *Pythium ultimum* (agent causal de la fonte des semis et de la pourriture du collet des plantes) et de *rhizoctonia solani* (agent de la fonte des semis et de la pourriture des racines des plantes).

Ces mêmes auteurs ont rapporté que ces antibiotiques purifiés protègent les plantes du coton de manière analogue à celle obtenue par la souche Pf5 elle-même. Des études très récentes rapportent que ces deux antibiotiques sont le support de l'activité biologique de plusieurs souches de *P. fluorescens* envers une multitude d'agents pathogènes (**Rosas *et al.*, 2011**).

Plusieurs travaux ont succédé et ont mis en évidence la production d'autres substances antibiotiques qui entrent dans le contrôle biologique des pathogènes des plantes. Ainsi, Thomashow et Weller (1988) indiquent que le mutant Tn5 de la souche 2-79 de *P. fluorescens*, incapable de produire des quantités détectables de l'antibiotique phénazine-1-carboxylique (PCA), perd sa capacité d'inhiber la croissance de *G. graminis var. tritici in vitro* ainsi que sa capacité de contrôler la fonte des semis du blé. Ces résultats suggèrent fortement que l'action de cette souche est due principalement à l'acide Phénazine-1-carboxylique.

Ramette *et al.* (2011) évoquent aussi que *Pseudomonas protegens* produit le 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) un antibiotique à vertu antifongique impliqué dans le contrôle biologique de plusieurs pathogènes.

L'activité inhibitrice de P₂, P₃ et CHA0 exercent un effet antagoniste moindre vis-à-vis de *F. oxysporum*, *A. flavus* et *M. ramannianus* (taux d'inhibition étend de 3 à 22%) par rapport aux autres souches de *Pseudomonas* s'expliquerait par la quantité faible de production des antibiotiques ou des sidérophores.

Dans le cas de *F. oxysporum*, Albouvette *et al.* (1998) ont été constatés que la suppression de la croissance radiale de ce champignon est induite par une compétition du fer par les *Pseudomonas* spp. fluorescents. Donc à partir de nos résultats, l'effet antagoniste moindre peut être corrélé à une faible compétition du fer.

Alors que l'activité inhibitrice quasiment inexistante de ces souches envers *A. niger* pourrait s'expliquerait par le non spécificité des antibiotiques et des sidérophores produisent ou ce champignon implique des mécanismes de résistante contre l'intensité antagoniste mis en œuvre par les *Pseudomonas* P₂, P₃ et CHA0.

De nombreux travaux ont pu mettre en évidence des souches modèles, toutefois il faut garantir la stabilité et la reproductibilité des effets bénéfiques de ces rhizobactéries à l'échelle de pratiques agronomiques. Et bien que des biopesticides à base de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont déjà commercialisés en Europe et en Amérique, leurs application à grande échelle n'est pas encore concrétisée. Les difficultés de formulation et d'utilisation, ainsi que des problèmes relatifs à la manutention et principalement le cout de ces microorganismes sont parmi les obstacles ayant retardé leur vulgarisation.

Conclusion
et
perspectives

Ce travail se proposait d'étudier l'halotolérance de souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées d'un sol salin et de tester leur capacité à croître dans un milieu minimum Davis. Ainsi que leur activité antifongique et la capacité d'inhiber la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes.

Le comportement d'halotolérance des *Pseudomonas* fluorescents diminue graduellement avec l'augmentation de NaCl. La capacité de résister au sel est manifestée par toutes les souches de *Pseudomonas* fluorescents et la souche de référence *P. fluorescens* CHA0. Leur halotolérance atteint 0,5M/NaCl en milieu minimum Davis.

La résistance aux concentrations élevées en sel représenterait pour les souches de *Pseudomonas* un caractère important pour leur survie et pour leur reproduction en conditions de salinité et de sécheresse qui présentent des caractéristiques physiologiques peuvent contribuer à leur survie dans les environnements salins.

Le contrôle biologique des maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à l'utilisation des substances chimiques.

Nous avons pu tester l'activité antifongique de quatre souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents à l'encontre de quatre champignons phytopathogènes (*F. oxysporum*, *A. niger*, *A. flavus* et *M. ramannianus*). Les souches P₁ et P₄ possèdent un énorme pouvoir antagoniste *in vitro* vis-à-vis *A. niger* et *M. ramannianus*.

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées sont en faveur de leur utilisation pour les essais d'inoculation des plantes ceci fait l'objet d'explorations suppressives des maladies et l'amélioration des rendement agricole par antagonisme direct entre la bactérie et les phytopathogènes du sol.

Comme perspectives, on pourrait dans un futur proche, procéder à quelques essais et applications simples des connaissances acquises à travers ce travail ; on cite en particulier :

- Etudier l'effet de la salinité sur l'activité antifongique des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.
- Etudier quelques activités promotrices de la croissance végétale (solubilisation des phosphates, production d'HCN, production de séderophores ...).

- Confirmer l'identification des souches de *Pseudomonas* par des tests chimiotaxonomiques et des analyses phylogénétiques.
- évaluer l'efficacité de biocontrôle *in vivo* de *Pseudomonas* (en pots sous serre et dans les conditions de production).
- Identifier les substances actives responsables de l'action antagoniste.

Résumés

Quatre souches de *Pseudomonas* fluorescents (P₁, P₂, P₃ et P₄) qui ont été isolées du rhizoplan de l'orge cultivée dans un champ affecté par la salinité (EC : 8dS/m), dans la région de Hammam Essoukhna, au Sud-Est de Sétif. Ces souches ont été testées pour leur capacité d'halotolérance en milieu minimum et pour leur activité antifongique envers quatre champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Mucor ramannianus*). Toutes les souches tolèrent jusqu'à 0.5M/NaCl. Les souches (P₁ et P₄) exercent une forte activité antagoniste envers *A. niger* (51%) et *M. ramannianus* (70%). Les souches (P₂, P₃) ont révélé une activité inhibitrice moyenne envers *M. ramannianus* (22%), faible envers *F. oxysporum* et *A. flavus* (3 et 10%). Ces souches halotolérantes de *Pseudomonas* fluorescents pourraient être utilisées comme agents de biocontrôle dans les régions affectés par la salinité.

Mots clés: *Pseudomonas* fluorescents, halotolérance, activité antifongique.

Four fluorescent Pseudomonads strains (P₁, P₂, P₃ and P₄) were isolated from barley rhizoplane grown in a field affected by salinity (EC: 8dS /m) in the area of Hammam Essoukhna, South-Est of Setif. These strains were tested for their capacity of halotolerance in minimal medium and for their antifungal activity against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Mucor ramannianus*). Strains tolerate up to 0.5M/NaCl in minimal medium. All strains (P₁ and P₄) show strong antagonistic activity towards *A. niger* (51%) and *M. ramannianus* (70%). However (P₂, P₃) revealed an average inhibiting activity against *M. ramannianus* (22%) and weak against *F. oxysporum* (3%) and *A. flavus* (10%). These halotolerant strains of the fluorescent Pseudomonads could be used as biocontrôle agents in the areas affected by salinity.

Key words: fluorescent Pseudomonads, halotolerance, antifungal activity.

تم عزل أربع سلالات من بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* من سطح جذور نبتة الشعير المزروع في حقل متضرر من الملوحة (درجة الملوحة 8 dS/m) الواقع بمنطقة حمام السخنة جنوب شرق سطيف ، وقد اختبرت قدرة هذه السلالات على تحمل الملوحة في وسط معدني ، وكذلك نشاطها ضد أربع فطريات (*Mucor ramannianus* و *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus niger* ، *Fusarium oxysporum*) . كل السلالات أظهرت قدرة على تحمل الملوحة 0.5M/NaCl . السلالتين (P₁ و P₄) تملك نشاط مضاد قوي ضد *A. niger* (51%) و *M. ramannianus* (70%). السلالتين (P₂ و P₃) نشاط تثبيطي معتدل ضد *M. ramannianus* (22%) وضعيف ضد *F. oxysporum* (3%) و *A. flavus* (10%). هذه السلالات *Pseudomonas fluorescens* القادرة على تحمل الملوحة يمكن إستخدامها كمضاد حيوي في المناطق المتأثرة بالملوحة.

الكلمات المفتاحية : *Pseudomonas fluorescens*، تحمل الملوحة، نشاط مضاد للفطريات

*Références
bibliographique*

Références Bibliographiques

A

Ahemad, M., et M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. Sci.* **26:** 1-20

Albouvette, C., B. Schippers, P. Lemanceau, et P.A.H.M. Bakker. 1998. Biological control of *Fusarium* wilts, p. 15-36. In G.J. Boland., L. D. Kuykendall (ed.), Plant-microbe interactions and biological control. *Marcel Dekkar, INC.* New York

Ali, S.k.Z, V. Sandhya, M. Grover, N. Kishore, L.V. Rao, et B. Venkateswarlu. 2009. *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. *Biol. Fert. Soils.* **46:** 45–55

Amaike, S., et N.P. Keller. 2011. *Aspergillus flavus*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **49:** 107-133

Amkraz, N. 2013. Utilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des plantes aromatiques et médicinales contre *Clavibacter michiganensis* sub sp. *michiganensis*, agent du chancre bactérien de la tomate. Thèse de Doctorat. Université Ibn Zohr-Agadir. Maroc

Andreote, F.D., W.L. de Araújo, J.L. de Azevedo, J.D. van Elsas, U.N. da Rocha, et L.S. van Overbeek. 2009. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities. *Applied environ. Microbiol.* **75 (11):** 3396-3406

Anonyme. 2005. Fiche descriptive sur les zones humides RAMSAR. Ministère de l'agriculture et du développement rural direction générale des forets. Algérie

B

Bais, H.P., P. Sang-Wook, T.L. Weir, R.M. Callaway, et J.M. Vivanco. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* **9**: 26-32

Bakker, P.A.H.M., C.M.J. Pieterse, et L.C. van Loon. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.* **97**: 239-243

Baliarda, A. 2003. Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse de Doctorat. Université bordeaux 1. France

Bano, A., et M. Fatima. 2009. Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Boil. Fert. Soils.* **45**: 405-413

Bashan, Y., G. Holguin, et L.E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* **50**: 521-577

Bashan, Y., et L.E. de-Bashan. 2004. Plant Growth-Promoting. Chapter 2. p. 103-147. In Hillel, D., C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, et D. Sparks (ed.), Encyclopedia of soil in the environment. Vol1. Columbia University, USA

Becker, J.O., et R.J. Cook. 1988. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth of wheat by fluorescent *Pseudomonad*. *Phytopathol.* **78(6)**: 778-782

Beneduzi, A., Ambrosini, et L.M.P. Passaglia. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Gene. Mol. Biol.* **35**, 4(suppl): 1044-1051

Blaha, D., C. Prigent-Combaret, M.S. Mirza, et Y. Moënne-Loccoz. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**: 455-470

Bonaterrea, A., J. Cabrefiga, J. Camps, et E. Montensinos. 2007. Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **61**: 185-195

Bresson, J. 2014. Interaction plante-microorganismes: Implication de la rhizobactérie *Phyllobacterium brassicacearum* dans les réponses d'*Arabidopsis thaliana* au stress hydrique. Université Montpellier II. France

Brimecombe, M.J., F.A. De Leij, et J.M. Lynch. 2008. Rhizodeposition and microbial population, p. 74-98. In R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri (ed.), The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. CRC Press. New York

Bui, E.N. 2013. Soil salinity: A neglected factor in plant ecology and biogeography. *J. Arid Envi.* **92**: 14 -25

C

Cattelan, A.J., P.G. Hartel, et J.J. Fuhrmann. 1999. Screening for Plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 1670-1680

Chookietwattana, K. 2003. Diversity of halophilic bacteria in saline soil at Nong bo reservoir, mahasarakham province, Thailand. Thèse de Doctorat. Suranaree University of Technology. Thailand

Couillerot, O. 2009. Compatibilité des bactéries phytobénifique *Azospirillum* et *Pseudomonas* dans la rhizosphère. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard. Lyon 1. France

Csonka, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147

D

Da Costa, M.S., H. Santos, et E.A. Galinski. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea, p. 118-153. *In* G. Antranikian (ed.), biotechnology of extremophiles. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg

Dubuis, C., C. Keel, et D. Haas. 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads, p. 311-328. *In* P. Lemanceau, P.A.H.M. Bakker, J.M. Raaijmakers, G. Bloemberg, M. Höfte, et B.M. Cooke (ed.), New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. Springer, Pays-Bas

E

Egamberdieva, D., et Z. Kucharova. 2009. Selection for root colonizing bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Boil. Fert. Soil.* **45**: 563-571

Estrada de los Santos, P., M.R. Bustillos-Cristales, et J. Caballero Mellado. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2790-2798

F

Fuentes-Ramirez, L.E., R. Bustillos-Cristales, et A. Tapia Hernandez. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov., and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1305-1314

G

Galinski, E.A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 273-328

Garcia, M.G., J.E. O'Connor, L.L. Garcia, S.I. Martinez, E. Herrero, et A.L. del Castillo. 2001. Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to URA3, coding

for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae* aft1 mutation. *Yeast*. **18**: 301-311

Ghorbanpour, M., M. Hatami, et K. Khavazi. 2013. Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish J. Biol.* **37**: 350-360

Glick, B.R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* **21**: 383-393

Glick, B.R., Z. Cheng, J. Czarny, et J. Duan. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 329-39

Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin, et D.M. Penrose. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial College Press. London

Glick, B.R., D.M. Penrose, J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68

Golding, A., Y. Zou, X. Yang, B. Flynn, et Z. Dong. 2012. Plant growth promoting H₂-oxidizing bacteria as seed inoculants for cereal crops. *Agric. Sci.* **3**: 510-516

Gray, E.J., et D.L. Smith. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol. Bioch.* **37**: 395-412

Grover, J.P. 2004. Predation, competition and nutrient recycling: a stoichiometric approach with multiple nutrients. *J. Theor. Biol.* **229**(1): 31-43

H

Haas, D., et G. Défago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Rev. Microbiol.* **3**: 307-319

Haas, D., et C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 117-153

Haichar, F.Z., C. Santaella, Th. Heulin, et W. Achouak. 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol. Bioch.* **77**: 69-80

Hariprasad, P., H.M. Navya, S. Chandranayaka, et S.R. Niranjana. 2009. Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biol. Control.* **50**: 307-316

Hirt, H. 2012. Des microbes bénéfiques peuvent aider des plantes à acquérir une tolérance aux stress environnementaux. Académie d'agriculture de France. p.1-8

Höfte, M., et P. deVos. 2006. Plant pathogenic *Pseudomonas* species, p. 507-533. In S.S. Gnanamanickam (ed.), Plant-associated bacteria, part. 3. Springer, Pays-Bas

Howell, C.R., et R.D. Stipanovic.1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol.* **70**: 712-715

I

Imhoff, J.F. 1986. Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 57- 66

J

Jofre, E., A. Lagares, et G. Mori. 2004. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **231(2)**: 267-275

Jones, D., C. Nguyen, et D.R. Finlay. 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil root interface. *Plant Soil.* **321**: 5-33

K

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

Keel C, et G. Défago.1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. *In* Gange, A.C., V.K. Brown (eds.) Multitrophic interactions in terrestrial system. Oxford: Blackwell Science. **27-47**

Kerbab, S. 2012. Les actinomycètes d'un sol salé: rôle des osmoprotecteurs naturels. Thèse de magister. Université de Sétif. Algérie

Khaznadar, M., I.N. Vogiatzakis, et G.H. Griffiths. 2009. Land degradation and vegetation distribution in Chott El Beida wetland, Algeria. *J. Arid. Environ.* **73**: 369-377

Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze, et M.N. Schroth. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current microbiol.* **4(5)**: 317-320

Kohler, J., F. Caravaca, L. Carrasco, A. Roldan. 2006. Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregates stabilization and promotion of biological properties in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil Use Manage.* **22**: 298-304

Kohler, J., J.A. Hernandez, F. Caravaca, et A. Roldan. 2008. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biol.* **35**: 141-151

L

Larsen, H. 1962. Halophilic and halotolerant microorganisms: an overview and historical perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 3-7

Leelasuphakul, W., P. Sivanunsakul, et S. Phongpaichit. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of [β]-1,3-glucanase and antibiotic extract

from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol.* **38(7)**: 990-997

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

Lepengue, A.N., A.M. Kalenda, K. Daouda, S. Ake, J.Y. Kouadio, M. Zouzou, et B. M'batchi. 2012. Action de l'acide gibbérellique sur la croissance de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* l. var. *sabdariffa*) au Gabon. *J. Applied Biosci.* **49**: 3435-3443

Lucht, J.M., et E. Bremer. 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbial. Rev.* **14**: 3-20

Lugtenberg, B., et J. Leveau. 2007. Biocontrol of Plant Pathogens: Principles, Promises, and Pitfalls. Chapter 10. In R. Pinton, Z. Varanini, et P. Nannipieri (2^{ème} ed.), the rhizosphère Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. CRC Press is an imprint of the Taylor and Francis Group. London, New York

M

Maillard, J. 2001. Le point sur l'irrigation et la salinité des sols en zone aride : Risques et recommandations. Handicap International

Marlet, S., et J.O. Job. 2006. Processus et gestion de la salinité des sols. In Tiercelin, J.R. (2^{ème} ed.), Traité d'irrigation. Tec. et Doc. Lavoisier. ISBN-13: 978-2743009106

Mavrodi, D.V., W. Blankenfeldt, L.S. Thomashow, et M. Mentel. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 417-445

McMillan, S. 2007. Promoting growth with PGPR. The Canadian Organic Grower. p. 32-34

Mercado-Blanco, J., D. Rodriguez-Jurado, A. Hervas, et R.M. Jime'nez-Diaz. 2004. Suppression of Verticillium wilts in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol. Control.* **30**: 474-486

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. Sétif. Algérie

Moore, E.R.B., B.J. Tindall, V.A.P. Martins Dos Santos, D.H. Pieper, J.L. Ramos, et N.J. Palleroni. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*, p.646-703. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), *Prokaryotes*, Springer, USA

N

Nadeem, S.M., M. Ahmad, Z.A. Zahir, A. Javaid, et M. Ashraf. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol. Adv.* **32**: 429-448

Nguyen, Ch. 2002. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agro. Environ.* **23**: 375-396

Notz, R., M. Maurhofer, H. Dubach, D. Haas, et G. Défago. 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 *In vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2229-2235

O

O'Byrne, C.P., et I.R. Booth. 2002. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *Int. J. Food. Microbiol.* **74(3)**: 203-16

P

Palleroni, N.J. 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*, p.1-18. In P. Cornelis (ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology* Hethersett. UK: Caister Acad Press

Palleroni, N.J., et E.R.B. Moore. 2004. Taxonomy of Pseudomonads: experimental approaches. In J. L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*, vol. 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, pp. 3-44

Pérez-Montano, F., C. Alías-Villegas, R.A. Bellogín, P. del Cerro, M.R. Espuny, I. Jiménez-Guerrero, F.J. López-Baena, F.J. Ollero, et T. Cubo. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Research*. **169**: 325-336

Petriccione, M., D. Di Patre, P. Ferrante, S. Papa, G. Bartoli, A. Fioretto, et M. Scortichini. 2013. Effects of *Pseudomonas fluorescens* Seed Bioinoculation on Heavy Metal Accumulation for *Mirabilis jalapa* Phytoextraction in Smelter-Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut*. **224**: 1645

Philippot, L., J.M. Raaijmakers, Ph. Lemanceau, et W.H. van der Putten. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Rev. Microbiol.* Doi: 10.1038/nrmicro3109. 1-11

Phillips, D.A., C.M. Joseph, G.P. Yang, E. Martinez-Romero, J.R. San-born, et H. Volpin. 1999. Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **22**: 12275-12280.

Pieterse, C.M.J., J.A. van Pelt, B.W.M. Verhagen, J. Ton, S.C.M. van Wees, K.M. LeonKloosterziel, et L.C. van Loon. 2003. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis*. **35**: 39-54

Pocard, J.A., L.T. Smith, G.M. Smith, et D. Le Rudulier. 1994. A prominent role for glucosyl glycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J. Bacteriol.* **176**: 6877-6884

Prigent-combaret, C., et Y. Moëgne-locco. 2014. Rhizosphère. Université Claude Bernard. Écologie microbienne, Lyon.

R

- Raaijmakers, J.M., M. Vlami, et J.T. de Souza. 2002.** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Anton Leeuwenhoek.* **81:** 537-547
- Rajkumar, M.S., Sandhya, M.N.V. Prasad, et H. Freitas. 2012.** Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* **30:** 1562-1574
- Ramette, A., M. Frapolli, M.F.L. Saux, C. Gruffaz, J.M. Meyer, G. Défago, et Y. Moëgne-Loccoz. 2011.** *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plantprotecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. applied microbial.* **34 (3):** 180-188
- Rangarajan, S., L.M. Saleena, S. Nair. 2002.** Diversity of *Pseudomonas* spp. Isolated from Rice Rhizosphere Populations Grown along a Salinity Gradient. *Microb. Ecol.* **43:** 280-289
- Rath, J., et T.K. Dangar. 2014.** Osmotolerant Microbial Resources of Saline Ecologies of India: Dynamics and Potential. Chapter 11. *In* D.K. Maheshwari (ed.), Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture, Sustainable Development and Biodiversity1. Doi: 10.1007/978-3-319-05936-5-11, Springer International Publishing, Switzerland
- Read, D.B., A.G. Bengough, P.J. Gregory, J.W. Crawford, D. Robinson, C.M. Scrimgeour, I.M. Young, K. Zhang, et X. Zhang. 2003.** Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytol.* **157:** 315-321
- Reddy, P.P. 2014.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection. Doi: 10.1007/978-81-322-1973-6 Springer. India
- Rezzonico, F., M. Zala, C. Keel, B. Duffy, Y. Moëgne-Loccoz, et G. Défago. 2007.** Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection. *New Phytol.* **173:** 861-872

Rosas, S.B., N.A. Pastor, L.B. Guiñazú, J.A. Andrés, E. Carlier, V. Vogt, et M. Rovera. 2011. Efficacy of *Pseudomonas chlororaphis* sub sp. *aurantiaca* SR1 for Improving Productivity of Several Crops. *Crop Production Technologies*, 978953307787-1, *InTech*. 199-210

S

Sadeghi, A., E. Karimi, P.A. Dahaji, M.G. Javid, Y. Dalvand, et H. Askari. 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1503-1509

Sandhya, V., Sk.Z. Ali, Grover, M., G. Reddy, et B.Venkateswarlu. 2009. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain P45. *Biol. Fertility Soil.* **46**: 17-26

Saraf M., A. Thakker, B.V. Patel. 2008. Biocontrol activity of different species of *Pseudomonas* against phytopathogenic Fungi *In vivo* and *In vitro* conditions. *Inter. J. Biotechnol. Bioch.* 4 (Suppl 3 et 4)

Sgroy, V., F. Cassán, O. Masciarelli, M. Florencia Del Papa, A. Lagares, et V. Luna. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopisstrum bulifera*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Doi: 10.1007/s00253-009-2116-3

Schnider-Keel, U., K.B. Lejbølle, E. Baehler, D. Haas, et C. Keel. 2001. The Sigma Factor AlgU (AlgT) Controls Exopolysaccharide Production and Tolerance towards Desiccation and Osmotic Stress in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied. Enviro. Microbiol.* **67**: 5683-5693

Sing, J.S. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Potential Microbes for Sustainable Agriculture. *General article.* p. 275-281

Singh, J.S., V.C. Pandey, et D.P. Singh. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agri., Ecos. Environ.* **140**: 339-353

Sivasakthi, S., G. Usharani, et P. Saranraj. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *African J. Agri. Research.* **9(16)**: 1265-1277

Sleator, R.D., et C. Hill. 2001. Bacterial osmoadaptation : the role of osmolytes bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71

Srivastava, R. et Shalini. 2008. Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. *Elect. J. Environ., Agri. Food Chemi.* **7(4)**: 2789-2796

Stava, S.S., D. Egamberdieva, et A.Varma. 2015. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants: The State of the Art. Chapter 1. Springer Inter. Publishing. Switzerland

Stubbs, V.E., D. Standing, O.G. Knox, K. Killham, A.G. Bengough, et B. Griffiths. 2004. Root border cells take up and release glucose-C. *Ann. Bot. Lond.* **93**: 221-224

T

Tank, N., et M. Saraf. 2010. Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *J. Plant Interact.* **5**: 51-58

Thomashow, L.S., et D.M. Weller. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *J. microbiol.* **170(8)**: 3499-3508

V

Ventosa, A., M.C. Gutierrez, M.T. Garcia, et F. Ruiz-Berraquero. 1989. Classification of *Chromohalobacter marismortui* in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 382-386

Viollet, A. 2010. Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne. France

W

Weller, D.M., W.J. Howie, et R.J. Cook. 1988. Relationship between *in vitro* inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by Fluorescent Pseudomonads. *Phytopathol.* **78(8)**: 1094-1100

Weller, D.M., et R.J. Cook. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* **73(3)**: 463-469

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

Z

Zahir, Z.A, M. Arshad, et W.T. Frankenberger. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Adv. Agro.* **81**: 97-168

Annexes

Annexe 1**Bouillon nutritionnel**

Peptone 5g/l

Extrait de bœuf 3g/l

pH final 6.8±0.2

Annexe 2**Milieu de King B (Flucka) (King *et al.*, 1954)**

Peptone de caséine 10g

Peptone de viande 10g

MgSO₄.7H₂O 1, 5 g

K₂HPO₄ 1, 5 g

Agar agar 12 g

Eau distillée q.s.p 1000 ml

Annexe 3**Milieu minimum Davis (Rangarajan *et al.*, 2002)**

Glucose 1g

(NH₄)₂SO₄ 1 g

K₂HPO₄ 7g

KH₂PO₄ 2g

C₆H₅Na₃O₇ 0.5 g

MgSO₄.7H₂O 0,1g

Eau distillée q.s.p 1000ml

Le pH: 7,0

Annexe 4

PDA (Potato Dextrose Agar)

Extrait de pomme de terre		200g
Glucose		20g
Agar-agar		15g
Eau distillée	q.s.p	1000ml
pH final: 5,2		

Activité antifongique des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées d'un sol salé.

Préparé par: FELLAHI Meriem

Promoteur: RABHI Nour El Houda

REBAI Rana

Résumé

Quatre souches de *Pseudomonas* fluorescents (P₁, P₂, P₃ et P₄) qui ont été isolées du rhizoplan de l'orge cultivée dans un champ affecté par la salinité (EC : 8dS/m), dans la région de Hammam Essoukhna, au Sud-Est de Sétif. Ces souches ont été testées pour leur capacité d'halotolérance en milieu minimum et pour leur activité antifongique envers quatre champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Mucor ramannianus*). Toutes les souches tolèrent jusqu'à 0.5M/NaCl. Les souches (P₁ et P₄) exercent une forte activité antagoniste envers *A. niger* (51%) et *M. ramannianus* (70%). Les souches (P₂, P₃) ont révélé une activité inhibitrice moyenne envers *M. ramannianus* (22%), faible envers *F. oxysporum* et *A. flavus* (3 et 10%). Ces souches halotolérantes de *Pseudomonas* fluorescents pourraient être utilisées comme agents de biocontrôle dans les régions affectés par la salinité.

Mots clés: *Pseudomonas* fluorescents, halotolérance, activité antifongique.

Abstract

Four fluorescent Pseudomonads strains (P₁, P₂, P₃ and P₄) were isolated from barley rhizoplane grown in a field affected by salinity (EC: 8dS /m) in the area of Hammam Essoukhna, South-Est of Setif. These strains were tested for their capacity of halotolerance in minimal medium and for their antifungal activity against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Mucor ramannianus*). All strains tolerate up to 0.5M/NaCl in minimal medium. Strains (P₁ and P₄) show strong antagonistic activity towards *A. niger* (51%) and *M. ramannianus* (70%). However (P₂, P₃) revealed an average inhibiting activity against *M. ramannianus* (22%) and weak against *F. oxysporum* (3%) and *A. flavus* (10%). These halotolerant strains of the fluorescent Pseudomonads could be used as biocontrôle agents in the areas affected by salinity.

Key words: fluorescent Pseudomonads, halotolerance, antifungal activity.