

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI-CONSTANTINE

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département d'Écologie et de Biologie



N° ordre :

N° série :

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Filière : Biotechnologie Végétale

Spécialité : Génomique et Biotechnologie Avancés

**Sebihi Fatima Zohra**

Intitulée :

**Effet PGPR des souches de *Pseudomonas fluorescens* isolées de la rhizosphère du blé cultivé dans la région de Constantine**

Soutenu le 16/11/2016

Devant le jury :

**Président** : Mr Kitouni Mahmoud

Prof à Univ. Frères Mentouri Constantine

**Rapporteur** : Mr Benhizia Yacine

Prof à Univ. Frères Mentouri.Constantine

**Examineurs** : Mm Bekhouche Farida

Prof à Univ. Frères Mentouri Constantine

Mme Bendjemana katia

MCA à Univ Abbas laghrour Khenchela

Mr Halis Youcef

MCA à CRSTRA, Biskra

Mr Rouag Noureddine

MCA à Univ Ferhat abbes Setif 1

**2016/2017**

## *Dédicas*

*Je dédie ce travail à ma famille, mes parents, mes enfants ainsi que mes frères et ma sœur qui m'ont toujours soutenue et encouragée à poursuivre dans cette voie.*

*Je dois une profonde reconnaissance à mon époux MUSTAPHA. Je ne saurai lui témoigner assez ma gratitude, d'un soutien indéfectible, il a su trouver les mots pour m'aider et me soutenir.*

## Remerciements

*Je remercie Monsieur le professeur Benguedouar Ammar, mon premier rapporteur pour son aide et sa patience avec nous,*

*Je tiens à remercier tous les membres du jury.*

*Je tiens à remercier Monsieur le Professeur BENHIZIA Yacine, d'avoir été le directeur de cette thèse.*

*Je remercie, particulièrement, Monsieur KITOUNI Mahmoud de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Je suis également reconnaissante envers Madame le Professeur BEKHOUCHE Farida, Madame BENDJEMANA Katia, Monsieur HALIS Youcef, et Monsieur Rouag Nouredin, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*

*J'adresse ma profonde gratitude à Monsieur JOSE SANCHEZ, Professeur à l'université d'Almeria, Espagne, pour l'accueil chaleureux, son encadrement et de m'avoir donné les moyens pour réaliser ce travail.*

*En fin, je remercie tous ceux qui ont croisé ma route pendant ces années, et qui directement ou indirectement ont contribué à l'accomplissement de cette thèse.*

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	
<b>Abstract</b> .....	
<b>ملخص</b> .....	
Liste des abréviations .....	I
Listes des figures .....	II
Listes des tableau .....	III
Introduction.....	1
Synthèse bibliographiques .....	3
1. Rhizosphère .....	3
2. La microflore rhizosphérique .....	3
3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) .....	3
4. Mode d'action des PGPR (Interactions PGPR/plante).....	4
4.1. Promotion de la croissance de l'hôte.....	4
4.1.1. Fixation d'azote .....	5
4.1.2. Solubilisation des phosphates.....	5
4.1.3. Production des sidérophores .....	6
4.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale.....	7
4.2. Protection contre divers phytopathogènes .....	8
4.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments.....	8
4.2.2. Antibiose.....	8
4.2.3. Résistance systémique induite ou ISR.....	9
5. Les <i>Pseudomonas</i> Rhizosphériques.....	10
6. Les <i>Pseudomonas</i> ssp Fluorescents agent de biocontrôle.....	11
7. Mécanismes de défense chez la plante.....	12
Matériels et méthodes .....	15
Partie 1 : isolement et caractérisation des <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	15
1-1-Prélèvement des échantillons : .....	15
1-2-Isolement du <i>Pseudomonas fluorescens</i> : .....	15
1-3-Conservation des souches .....	15
1-4- Identification des isolats .....	15
1-4-1-Test de fluorescence.....	16
1-4-2- Caractères morphologiques.....	16

1-5- Etude des caractères biochimiques .....	16
1- 5-1-Recherche de l'Oxydase :.....	16
1-5-2- Test de Mobilité : .....	17
1-5-3-Croissance au 4°C et 41°C :.....	17
1-6 –Caractérisation moléculaire des souches de <i>Pseudomonas</i> .....	17
1-6-1-Extraction de L'ADN.....	17
1-6-2-Amplification de l'ADN .....	18
1-6-3- Séquençage.....	18
Partie 2 : Collection et étude des isolats pathogènes ( <i>Fusarium</i> ).....	19
2-1- Prélèvement des échantillons.....	19
2-2- Isolement et purification de l'agent pathogène .....	19
2-3-Identification des isolats pathogènes .....	19
2-4-Characterisation moléculaire.....	20
2-4-1- Extraction d'ADN Fongique (18s).....	20
2-4-2- Amplification et séquençage .....	20
Partie 3 : Mesure des activités promotrices de la croissance végétale .....	20
3-1- Production des siderophores : .....	20
3-1-1-Test Arnow.....	20
3-1-2-Test FeCl <sub>3</sub> .....	20
3-1-4-Quantification des siderophores sur milieu liquide .....	21
3-2-Solubilisation des phosphates .....	21
3-2-1-Sur Milieu Solide.....	21
3-2-2-Sur Milieu liquide.....	21
3-3-Production d'ammonium.....	22
3-4-Production d'HCN .....	22
3-5-Production de l'Acide Indole Acétique .....	22
3-6-Production d'enzyme.....	23
3-6-1- Catalase.....	23
3-6-2- Cellulase .....	23
3-6-3- Amylase.....	23
3-6-4- Lécithinase, Lipase et Lipoprotéine .....	23
3-6-5- Protéase .....	23
3-6-6- Pécétinase.....	23
3-6-7-Dégradation de la chitine.....	24

3-7-Activité antifongique in vitro : .....	24
Partie 4 : Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance du blé et l'inhibition du <i>Fusarium culmorum</i> et <i>Fusarium pseudograminearum</i> . .....	25
Partie 5 : Etude du mécanisme de résistance du blé .....	26
5-1- Expérience d'induction de la résistance : .....	26
5-2-Activité lipoxigénase (LOX) :.....	28
5-3- Activité phénylalanine-ammonia-lyase (PAL) : .....	28
5-4- L'activité peroxydase (PO) : .....	29
5-5- Activités chitinase et $\beta$ -1,3-glucanase :.....	29
Résultats et Discussions .....	30
Partie 1 : Isolement et caractérisation des <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	30
1-1- Caractérisation phénotypique des isolats :.....	30
Partie 2 : Etude des isolats pathogènes ( <i>Fusarium</i> ) .....	35
2-1- Caractérisation morphologique des isolats de <i>Fusarium</i> .....	35
2-2- Analyse moléculaire des isolats de <i>Fusarium sp.</i> .....	39
Partie 3 : Mesure des activités promotrices de la croissance végétale .....	41
3-1-Production des siderophores :.....	41
3-2-Solubilisation des phosphates : .....	44
3-3-Production d'ammonium :.....	47
3-4-Production d'HCN : .....	47
3-5-Production d'AIA :.....	49
3-6-Production d'enzymes impliqués dans la suppression : .....	50
3-7-Activité antagoniste in vitro :.....	53
Partie 4 : Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance du blé et l'inhibition du <i>Fusarium culmorum</i> et <i>Fusarium pseudograminearum</i> . .....	56
Partie 5 : Etude du mécanisme de résistance du blé .....	59
Discussion Générale .....	63
Conclusion Générale .....	68
Références bibliographiques .....	69
ANNEXES.....	92

## Résumé

Les *Pseudomonas fluorescens* peuvent supprimer diverses maladies d'origine tellurique, et leur efficacité est liée à la fois à leurs activités antagonistes et à leur compétitivité rhizosphérique. Cette étude a été conçue pour isoler des *Pseudomonas fluorescens* antagoniste à partir de la rhizosphère du blé et évaluer leurs traits PGPR. Cinquante-cinq souches antagonistes ont été isolées à partir du sol de blé, cultivé dans la région de Constantine (Algérie). Ces souches sont caractérisées morphologiquement, biochimiquement et moléculairement, et sélectionnées pour leurs traits de la promotion de croissance des plantes. Ces traits PGP sont la solubilisation du phosphate, acide indole acétique (IAA), la production des sidérophores, de l'ammoniac, du cyanure d'hydrogène (HCN), et la production d'enzymes impliquées dans la suppression de l'agent pathogène comme cellulase, pectinase, chitinase, et la protéase. A la fin, le contrôle biologique et le potentiel de la stimulation de la croissance de ces souches contre deux espèces de *Fusarium*: *F. culmorum*, et *F. pseudograminearum* ont été évalués in planta. Tous les isolats ont montré les caractéristiques biochimiques et morphologiques de *Pseudomonas fluorescens*. Dans des conditions in vitro, tous les isolats produisent de la cellulase et de la pectinase. Un pourcentage de 90,9% d'isolat produit des sidérophores de type hydroxamates, et 96,43% produit l'IAA. Un pourcentage de 96,36% des isolats ont produit une zone claire autour des colonies, présentant des différents index de solubilisation de phosphate (PSI), et 76,36% solubilisés le phosphate dans un milieu liquide. 51,78% d'isolat produisent la protéase, 48,21% produisent la lipase, 16,36% produisent la chitinase, et seulement 10,9% produisent l'HCN. Les souches sélectionnées ont inhibé la croissance de *Fusarium* et stimulé la croissance du blé lors de l'expérience en pot, avec extraction d'enzymes spécifiques. Neuf souches bactériennes qui ont montré un maximum de trait favorisant la croissance des plantes, et en utilisant l'identification moléculaire (avec le séquençage du gène de l'ADNr 16S), ont été identifiées comme *Pseudomonas fluorescens*. Cette étude conclut que les souches de *Pseudomonas fluorescens*, isolés à partir de la rhizosphère de blé rhizosphérique de la région de Constantine (Algérie), a montré une variation dans les caractéristiques favorisant la croissance des plantes de ces isolats, qui peuvent contribuer à la capacité de ces isolats à supprimer les maladies fongiques. Sur la base des résultats positifs de l'effet antagoniste des souches sélectionnées, il est intéressant d'utiliser les PGPR *Pseudomonas fluorescens* comme inoculant biofertilisant pour remplacer les engrais chimiques et les pesticides pour le blé.

**Mots-clés :** *Pseudomonas fluorescens*, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, *Fusarium*.

## Abstract

*Fluorescent pseudomonas* can suppress various soilborne diseases, and their efficacy related both; to their antagonistic activities and rhizosphere competitiveness. This study was designed to isolate antagonistic *Pseudomonas fluorescens* from Wheat rhizosphere and evaluate their Plant promoting traits. Fifty-five antagonistic strains were isolated from wheat soil, cultivated in Constantine region (Algeria), characterized morphologically, biochemically and molecularly, and screened for their Plant growth promoting traits. These PGP traits were analyzed by phosphate solubilization, indol acetic acid (IAA), the production of siderophore, ammonia, hydrogen cyanide (HCN), and the production of enzyme involved in the suppression of the pathogen like cellulase, pectinase, chitinase, and protease. At the end, the biocontrol capacity of these strains and growth promotion potential against two species of *Fusarium*: *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* were evaluated *in planta*. All the isolates showing a biochemical and morphological of *Pseudomonas fluorescens*. Under in-vitro conditions, all isolates produced cellulase and pectinase, 90.9% produced siderophore; hydroxamates type, 96.43% produced IAA. A 96.36% of isolates produced a clear zone around the colony, exhibiting different sorts of phosphate solubilizing index (PSI) and 76.36% solubilized the phosphate in liquid medium, 51.78% produced protease, 48.21% produced lipase, 16.36% produced chitinase, and only 10.9% produced HCN. The selected strains inhibited *Fusarium* sp growth and stimulated wheat growth with various extraction of enzymes when tested in pot experiments. Nine bacterial strains, which showed a maximum plant growth promoting traits using the molecular identification (16S rDNA gene sequence), were identified as *Pseudomonas fluorescens*. This study concludes that strains of *Pseudomonas fluorescens*, isolated from wheat rhizospheric soil from the region of Constantine (Algeria), showed variation in their plant promoting characteristics production that can contribute to the ability of these isolates to suppress fungal diseases. Based on the positive results of the antagonistic effect of selected strains, it is interesting to use the PGPR *Pseudomonas fluorescens* as inoculants biofertilizers to replace chemical fertilizers and pesticides for Wheat.

**Keywords:** *Pseudomonas fluorescens*, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, *Fusarium*

## ملخص:

يمكن للبكتيريا *Pseudomonas fluorescens* إزالة العديد من الأمراض التي مصدرها التربة، و مدى فعاليتها مرتبط من جهة إلى انشطتها العدائية و من جهة أخرى إلى قدرتها التنافسية الريزوسفيرية. لقد صممت هذه الدراسة لعزل *Pseudomonas fluorescens* من ريزوسفير القمح، و تقييم صفاتها الـ PGPR. تم عزل خمسة و خمسون سلالة عدائية من تربة القمح المزروع في منطقة قسنطينة – الجزائر – وقد تم تعيين خصائصها البيوكيميائية، المرفولوجية و الجزئية و اختيارها على أساس سيماتها المعززة لنمو النبات. صفات الـ PGPR هي: ذوبان الفوسفات، القدرة على إنتاج حمض AIA و إنتاج Siderophores، و الأمونيا، و سيانيد الهيدروجين (HCN). و إنتاج الأنزيمات المشاركة في إزالة مسبب المرض مثل السيليلوز، بكتيناز، كيتيناز، و البروتيناز. و في الأخير تقييم المكافحة البيولوجية و إمكانية تحفيز نمو النباتات بواسطة هذه السلالة ضد نوعين من *Fusarium*: *Fusarium pseudograminearum*، *Fusarium culmorum*. أظهرت النتائج أن جميع العزلات لها الخصائص البيوكيميائية و المرفولوجية لـ *Pseudomonas fluorescens*. في ظروف المختبر كل التغيرات أظهرت إنتاج السيليلوز و البكتيناز. نسبة 90.9% منها أنتجت Siderophores من نوع hydroxamate، 96.43% منها أظهرت منطقة واضحة حول الـ Colonie تشير إلى نتائج مختلفة في PSI لإدابة الفوسفات في وسط سائل، 51.78% من العزلات تنتج البروتيناز، 48.21% تنتج الليباز، و 16.36% تنتج الكيناز، 10.9% فقط تنتج HCN. العزلات المختارة منعت نمو الـ *Fusarium*، و عززت نمو القمح في تجربة الأصبص. 9 من بين هذه العزلات التي أظهرت عدد أكبر من الخصائص المحفزة لنمو النبات تم اختيارها لتعريفها جينياً باستعمال التسلسل الجيني (ADNr16s) و صنف *Pseudomonas fluorescens*. تخلص هذه الدراسة أن *Pseudomonas fluorescens* المعزولة من تربة القمح في ولاية قسنطينة – الجزائر – أظهرت الإختلاف في الخصائص لتعزيز نمو النبات، والتي يمكن أن تساهم في السيطرة على الأمراض الفطرية. و استناداً إلى النتائج الإيجابية لتأثير عدائية العزلات المختارة، فمن المثير للإهتمام استخدام الـ PGPR الـ *Pseudomonas fluorescens* كسماد حيوي ليحل محل الأسمدة الكيماوية و المبيدات الحشرية للقمح.

**الكلمات المفتاحية:** *Pseudomonas fluorescens*، الريزوبكتيريا المحفزة لنمو النباتات، *Fusarium*.

## Liste des abréviations

**AIA** : Acide indole acétique

**C-P.lyase**: Carbon phosphate lyase

**CAS**: Chrome zurol sulfate

**CMC**: Craboxyl Methyl Cellulose

**DTT**: Dithiothreitol

**DNS** : dinitrosalicylique

**FAO** : Organisation des nations unis pour l'alimentation et l'agriculture (foude and agricultur organisation of d unated nations)

**HCN** : Acide cyanhydrique

**ISR** : Résistance systémique induite

**KB**: King B

**LB**: Lauria bertani

**LOX** : Lipoxygénase

**LNA** : Acide linoléique

**NCBI** : National centre for biotechnology information

**nkat**: nano katal

**pkat** : pico katal

**PDA**: Potato dextrose agar

**P.V.K**: Pikovskaya

**PVPP**: Polyvinylpolyrrolidone

**PMSF**: Phénylméthylsulfonylfluoride

**PO** : Peroxydase

**PAL**: Phenylalanine amonialyase

**PGPR**: plant growth promoting rhizobacteria

**SAR** : Résistance systémique acquise

## Liste de figures

**Figure 1:** Promotion de la croissance des plantes par les PGPR (Ahmemad et Kibret, 2013)

**Figure 2:** Schéma représentatif des mécanismes des PGPR (Goswami et al., 2016)

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

**Figure 4 :** Identification des *Pseudomonas*.

**Figure 5 :** Observation microscopique des isolats après coloration de Gram (X100)

**Figure 6 :** Électrophorèse des produits de la PCR des bactéries sur gel d'agarose à 1%.

**Figure 7 :** Arbre phylogénétique des isolats basé sur les séquences d'ADNr 16s.

**Figure 8:** Observations macroscopique des isolats fongiques sur milieu PDA.

**Figure 9 :** Observation des isolats sous microscope optique (Olympus BX51) x40.

**Figure 10 :** Produit de la PCR des isolats fongiques.

**Figure 11 :** arbre phylogénétique des *Fusarium*. sp.

**Figure 12:** Production des siderophore.

**Figure 13 :** Diamètre de l'halo orangeâtre autour des colonies.

**Figure 14 :** Pourcentage de production des siderophore

**Figure 15 :** Colonies de *Pseudomonas* fluorescents avec halo de solubilisation

**Figure 16:** Solubilisation du Phosphate par les isolats sur milieu Pikovskaya solide

**Figure 17 :** Quantité de phosphate solubilisée par les souches de *Pseudomonas* fluorescents sur milieu liquide.

**Figure 18 :** Production d' $\text{NH}_3$

**Figure 19 :** Production du HCN sur milieu à la glycine.

**Figure 20 :** Production qualitative d'Acide indole acétique

**Figure 21 :** Production quantitative d'acide indole acétique.

**Figure 22 :** Production de la catalase

**Figure 23:** Production des enzymes hydrolitiques.

**Figure 24 :** Production des enzymes lipolitiques.

**Figure 25 :** a-Production de la protéase, b- production de la chitinase.

**Figure 26 :** Index d'inhibition des isolats *Pseudomonas* contre deux agents pathogènes

**Figure 27:** Activité antifongique.

**Figure 28 :** Effet de la bactérisation sur la croissance des plantes, après 3 semaines d'infection.

**Figure 29 :** Production de la lipoxygénase

**Figure 30 :** Stimulation de la voie de Peroxydase.

**Figure 31 :** Activité glucanase.

**Figure 32 :** Activité chitinasique

**Figure 33 :** activité phénylalanine - ammonia-lyase

## Liste de tableaux

**Tableau 1** : représente les différents traitements utilisés et leur composition

**Tableau 2** : Caractères morphologiques et biochimiques des isolats.

**Tableau 3** : Identification des isolats Bactériens sur la base du séquençage de l'ADN 16s

**Tableau 4** : Identification des isolats pathogènes basé sur le séquençage de l'ADN 18s.

**Tableau 5** : Résultats des tests de Neiland (1981), Arnow (1937) et le CAS (Schwyn et Neilands, 1987)

**Tableau 6** : Effet antagoniste des souches de *Pseudomonas fluorescens* contre *F.culmorum* et *F.pseudograminearum*

**Tableau 7** : Effet d'inoculation par les bactéries sur la croissance du Blé

## Introduction

Depuis plus d'un siècle, la compréhension des interactions plantes-microorganismes dans la rhizosphère a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. La rhizosphère est définie comme étant la zone de sol entourant la racine qui est directement ou indirectement influencée par cette dernière et qui présente une forte activité microbienne. Des recherches considérables ont montré que plusieurs microorganismes de diverses origines phylogénétiques sont capables de coloniser activement le système racinaire de la plante en présence d'une micro flore compétitive, et d'inhiber différents agents pathogènes et maladies. Le terme PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) est utilisé pour décrire les bactéries qui, lorsqu'ils sont introduits dans un sol contenant une microflore compétitive, ont un effet positif sur la croissance de la plante (Glick, 1995).

Ces rhizobactéries utilisent plus qu'un mécanisme pour la suppression des pathogènes et la réduction de l'incidence des maladies à savoir : la compétition, l'antibiose ou le parasitisme. Ils agissent en partie, par la sécrétion de substances antimicrobiennes ayant soit une activité antibactérienne soit une activité antifongique. L'un des groupes les plus importants parmi les PGPR est le genre *Pseudomonas*.

Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes (Höfte et de Vos, 2006), et sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes comme le blé (Weller et Cook 1983). Ces bactéries sont largement retrouvées parmi les agents potentiels de lutte biologique qui ont pour effet d'améliorer la santé des plantes et sont notamment connues pour leur effet antagoniste avec les phytopathogènes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001). Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores.

Le blé joue un rôle essentiel dans l'alimentation directe et également indirecte d'une très large fraction de l'humanité. C'est actuellement la céréale la plus cultivées dans le monde, avec une production annuelle dépassant 36 millions de tonnes (FAO 2015). Mais, cette plante peut être attaquée par de nombreuses maladies et moisissures toxiques à différents stades de son développement, ces attaques peuvent occasionner des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles et non traitées et les conditions de l'environnement sont favorables à l'expansion des maladies. Parmi les moisissures toxigènes qui contaminent de nombreuses plantes au champ, les plus préjudiciables appartiennent au genre *Fusarium*.

Les *Fusarium. sp* sont des champignons filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Ce genre comprend 50 à 70 espèces, dont plusieurs sont phytopathogènes

(Nelson et *al.*, 1983). Ces moisissures sont à l'origine de pertes considérables au niveau des récoltes et de la détérioration de la qualité des grains liée à des maladies connues sous le nom fusariose. La fusariose attaque les plantes de blé et se caractérise par une fonte des semis, nécrose des tissus végétaux et nécrose des épis. Lorsque la fusariose progresse dans l'espace et dans le temps précisément en cas d'une épidémie, les pertes économiques qui en découlent, liées aux diminutions de rendement sont souvent très lourdes. De plus, la majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage (Tabuc, 2007).

La stratégie d'étude dans ce travail consiste à :

-Identifier et caractériser, à partir de la rhizosphère du blé de la région de Constantine, une population bactérienne spécifique *Pseudomonas fluorescens* ; a fin d'évaluer leurs contributions dans la croissance et la santé des plantes, par la mise en évidence des principaux déterminants de la suppression ou de la Pathogenicity.

-Isoler et identifier les agents responsables de la fusariose du blé dur cultivé dans la région de Constantine,

-Tester *in vivo* l'effet de l'inoculation par ces bactéries sur la croissance du blé dur, en présence de deux agents pathogènes d'une part, d'autre part la capacité de ces bactéries à stimuler les défenses naturelles du blé.

-Et à la fin, étudier les mécanismes de défense chez le blé dur, on cherchant les activités enzymatiques suivantes :

- 1- Activité lipoxygénase (LOX)
- 2- Activité phénylalanine-ammonia-lyase (PAL)
- 3- L'activité peroxydase (PO)
- 4- Activités chitinase et  $\beta$ -1,3-glucanase

## Synthèse bibliographiques

### 1. Rhizosphère

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

### 2. La microflore rhizosphérique

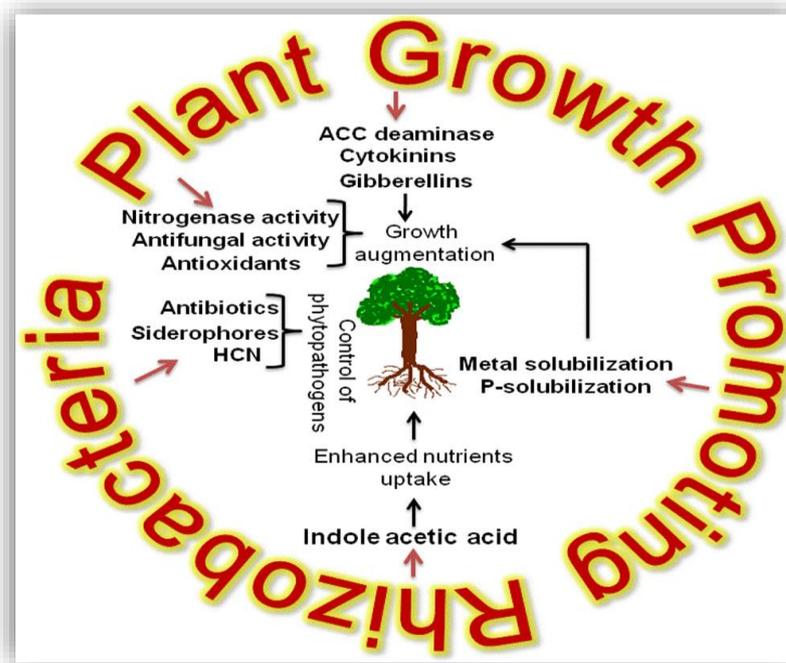
La composition de la microflore rhizosphérique est contrôlée par le génome de la plante. La démonstration a été apportée par les travaux de Neal en 1973 sur les blés de printemps. Dans la rhizosphère, la quantité de microorganismes est au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^9$  par gramme de sol (Davet, 1996). La densité des champignons est estimée à  $10^6$  par gramme de sol. Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^3$  par gramme de sol.

### 3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* (Gray et Smith, 2005) et *Streptomyces* spp. (Tokala et al., 2002) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (voie

indirecte) (Dommergues et Mangenot, 1970). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Figure 1).

La promotion indirecte de ces PGPR se produit lorsque ces bactéries empêchent ou diminuent les effets nocifs des microorganismes phytopathogènes par colonisation et production d'antibiotiques (Glick, 2012). La promotion directe consiste à améliorer la croissance des plantes. Elle se fait soit en fournissant à la plante des phytohormones favorisant la croissance végétale ou de faciliter l'absorption de certains éléments nutritifs de l'environnement par production de sidérophores ou par fixation d'azote (Doumbou *et al.*, 2001 ; O'Sullivan et O'Gara, 1992; Loper et Henkels, 1999), et de phytohormones (Frankenberger et Arshad, 1991), la solubilisation du phosphate (Kloepper *et al.*, 1989), l'inhibition des microorganismes pathogènes (Antoun *et al.*, 1980; Crawford *et al.*, 1993) et la détoxification du milieu (Beauchamp, 1993).



**Figure 1** : Promotion de la croissance des plantes par les PGPR (Ahmemad et Kibret, 2013)

#### 4. Mode d'action des PGPR (Interactions PGPR/plante)

##### 4.1. Promotion de la croissance de l'hôte

Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes tels que la fixation d'azote (N<sub>2</sub>) et la solubilisation d'oligoéléments tels que le phosphate (P) (Cakmakci *et al.*, 2006; Orhan *et al.*, 2006), l'inhibition de la synthèse d'éthylène par la plante,

la synthèse des phytohormones ou des vitamines (Dobbelaere *et al.*, 2003), et en diminuant la toxicité des métaux lourds (Burd *et al.*, 1998; Whipps 2001)(Figure2).

#### **4.1.1. Fixation d'azote**

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote. La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux (N<sub>2</sub>) inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyens *et al.*, 2010). Quelques bactéries fixatrices d'azote sont libres dans la rhizosphère (*Achromobacter*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*) (Tilak *et al.*, 2005).

#### **4.1.2. Solubilisation des phosphates**

En plus de la fixation biologique de l'azote, la solubilisation des phosphates est également importante. le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes qui sont capables seulement d'absorber ses formes solubles mono- et dibasiques (H<sub>2</sub>PO<sup>-4</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) (Ramos Solano *et al.*, 2008b ; Keneni *et al.*, 2010). Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologiquement disponible (Ezawa *et al.*, 2002). Même dans les sols riches la plupart du phosphore n'est pas disponible pour les plantes, une grande quantité se trouve sous forme insoluble.

Dans la rhizosphere il existe des bactéries solubilisant le phosphate, qui sont fréquentes et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (Vessey, 2003). *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus* spp. *Bradyrhizobium* spp. *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida* et *Rhizobium* spp. sont des exemples de bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate inorganique en produisant de l'acide gluconique et l'acide 2- céto gluconique (Khan *et al.*, 2009). Elles sont aussi capables de minéraliser le phosphate organique par l'excrétion des enzymes extracellulaires telles les phosphatases, et C-P lyases (Kim *et al.*, 1998, Weyens *et al.* 2010) .

Les microorganismes solubilisant les phosphates pourraient aussi faciliter la croissance et le développement des plantes par la production de nutriments essentiels, modifier la concentration des substances améliorant la croissance des plantes telles que l'AIA ou stimuler la fixation

symbiotique et non symbiotique de l'azote moléculaire. Ils peuvent jouer aussi un rôle dans la production des sidérophores, des antibiotiques et d'acide cyanhydrique (HCN) (Khan *et al.*, 2009).

Leur capacité à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPR. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source prometteuse comme agent biofertilisant dans l'agriculture.

#### **4.1.3. Production des sidérophores**

La compétition trophique s'exerce essentiellement pour les exsudats racinaires et pour le fer. En effet, le fer est un élément capital aussi bien pour les bactéries que les champignons et les plantes. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer ( $Fe^{3+}$ ) (Compant *et al.*, 2005) mais il demeure souvent un facteur limitant pour la croissance des bactéries et des plantes. La plupart des microorganismes ont donc développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores (ce sont des substances de faible poids moléculaire et servant de transporteur de l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  à l'intérieur de la cellule microbienne) (Jacques *et al.*, 1993), et des protéines membranaires réceptrices du complexe sidérophore/fer à leur surface. *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et de nombreux champignons sont capables de produire ces composés chélateurs de fer (Zahir *et al.*, 2004). Les sidérophores de bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes (O'sullivan et O'gara, 1992). Ils jouent également le rôle de chélateurs de métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes tels le Zn et Pb (Dimkpa *et al.*, 2009).

Les siderophores produits par des *Pseudomonas* fluorescents protègent les plantes de plusieurs maladies d'origine fongique ou bactérienne. Kloepper *et al.* (1980) ont été les premiers à prouver la synthèse d'un sidérophore (Pseudobactin) par une souche de *P. putida*. Ces auteurs ont pu démontrer la corrélation entre la synthèse de cette molécule et le potentiel antagoniste de cette souche contre les pathogène. Tel est le cas de l'inhibition de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* agent du piétin échaudage du blé avec les *Pseudomonas* spp. fluorescents est due à la production de sidérophores (Weller *et al.* 1988). Ce résultat a été authentifié par l'équipe de DeWeger (1988) qui a montré que la production du Pseudobactin 358 par la souche WC358 de *P. putida* est très influencée par la disponibilité du Fer dans le sol. L'ensemble de ces résultats confirme une fois de plus que la capacité de ces souches à inhiber la croissance du

pathogène est directement liée à leur pouvoir de produire des sidérophores dans des conditions de faible pH.

#### **4.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale**

La synthèse microbienne des phytohormones est connue depuis longtemps. Il est rapporté que 80% des micro-organismes isolés de la rhizosphère de diverses cultures possèdent la capacité de synthétiser et libérer des auxines comme métabolites secondaires (Patten et Glick, 1996).

Il existe cinq catégories des régulateurs de la croissance végétale : les auxines, les cytokinines, Gibbérellines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al.*, 2004). L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007). Cette Hormone est très couramment produite par PGPR (Barzani et Friedman, 1999). Il est produit par un grand nombre de bactéries tels *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter* (Karnwal., 2009). *Alcaligenes piechaudii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium* spp., et *Comamonas acidovorans* spp. (Weyens *et al.*, 2010). Généralement, l'AIA sécrétée par les rhizobactéries interfère avec les nombreux processus de développement de la plante, car le pool d'AIA endogène de la plante peut être modifié par l'acquisition de l'AIA qui a été sécrétée par les bactéries du sol (Glick, 2012; Spaepen *et al.*, 2007). De toute évidence, l'AIA agit également comme une molécule de signalisation réciproque affectant l'expression des gènes dans plusieurs micro-organismes. Par conséquent, AIA joue un rôle très important dans les interactions plantes-rhizobactéries (Spaepen et Vanderleyden, 2011). AIA a été impliqué dans pratiquement tous les aspects de la croissance des plantes et le développement, ainsi que les réactions de défense. Cette diversité de la fonction se traduit par l'extraordinaire complexité de l'AIA biosynthétique, le transport et les voies de signalisation (Santner *et al.*, 2009). Généralement, l'AIA affecte la division cellulaire des plantes, l'extension, et la différenciation ; stimule la germination des semences et tubercules ; augmente le taux de xylème et le développement des racines ; contrôle des processus de la croissance végétative ; affecte la photosynthèse, la formation de pigment, la biosynthèse de métabolites différents, et une résistance à des conditions stressantes. Ainsi, l'AIA rhizobactérienne est identifié comme étant une molécule effectrice dans les interactions microbiennes pour plantes, à la fois dans la pathogénèse et la phytostimulation (Spaepen et Vanderleyden, 2011).

## 4.2. Protection contre divers phytopathogènes

### 4.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et, par conséquent, leur croissance (Piano *et al.*, 1997).

Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova *et al.*, 2005). Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant la colonisation racinaire sont la mobilité (présence d'un flagelle), Le chimiotactisme, les lipopolysaccharides (LPS), la capacité de synthétiser des vitamines et des macromolécules et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

### 4.2.2. Antibiose

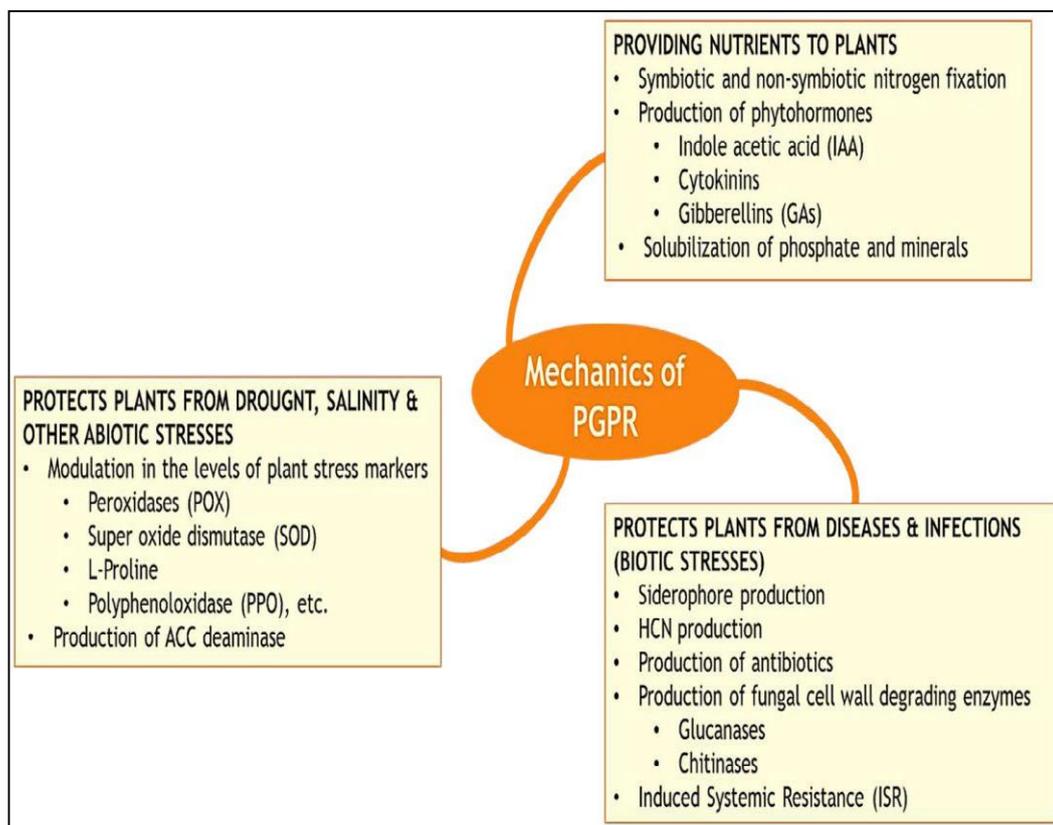
L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), qui est un métabolite secondaire dont la glycine est le précurseur. Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition. Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien (Zeller *et al.*, 2007). La production de HCN est une activité très commune chez *Pseudomonas* (88,89%) et *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphériques (Charest *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2008 ).

Certains rhizobactéries synthétisent la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993 ; de Souza *et al.*, 2003; Haas et Defago 2005). D'autre part l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine et la xanthobacine sont produites par *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. et *Stenotrophomonas* spp. (Milner *et al.*, 1996 ; Nakayama *et al.*, 1999).

D'autres souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels  $\beta$ -1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001).

#### 4.2.3. Résistance systémique induite ou ISR

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène. Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (van Loon *et al.*, 2005 ; Jourdan *et al.*, 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés incluant des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartenant au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcesens*, *plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).



**Figure 2** : Schéma représentatif des mécanismes des PGPR (Goswami *et al.*, 2016)

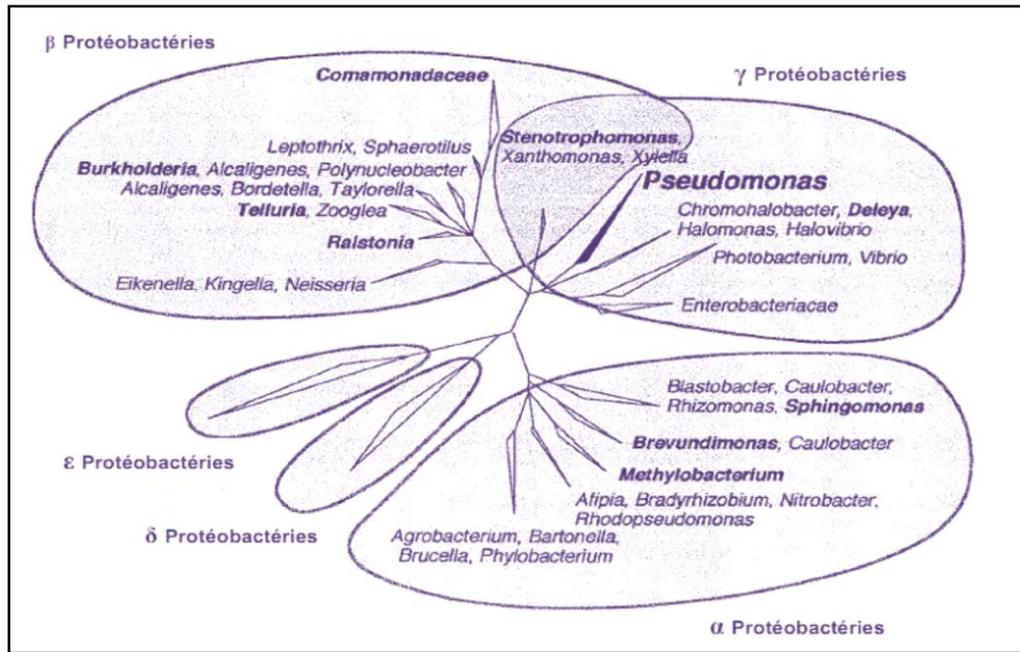
## **5. Les *Pseudomonas* Rhizosphériques**

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires rencontrées dans différentes niches écologique comme les sols, les racines des végétaux, sur les plantes en pot, ainsi que dans les eaux douces et marines. Ses exigences nutritionnelles minérales et sa capacité à survivre dans des conditions hostiles font qu'il s'adapte facilement à une large variété de situation, voir sur des substrats particuliers (Leclerc, 2003). Ce genre couvre le groupe écologique le plus significatif des groupements bactériens. Cette distribution écologique est due probablement à mi remarquable degré de diversité et d'adaptation génétique.

Les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes (Bossis *et al.*, 2000).

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe  $\gamma$  des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis *et al.*, 2000 ; Palleroni et Moore, 2004).

Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Figure 3).



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

## 6. Les *Pseudomonas* ssp Fluorescents agent de biocontrôle

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* spp fluorescents sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Digat et Gardan, 1987). D'où leur application comme agents de contrôle biologique grâce à leurs abondance dans les sols naturels et les racines des plantes (Sands et Rovira, 1971). Les *Pseudomonas*, principalement l'espèce *P. fluorescens*, sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires dans certains champs, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*.

*Pseudomonas fluorescens* est une bactérie Gram négatif, oxydase positive, en forme de bâtonnet appartenant au genre des *Pseudomonas*. Elle est mobile grâce à des multiples flagelles. De plus, elle tient la deuxième partie de son nom (fluorescens) du fait qu'elle est fluorescente. Cette fluorescence est due à la production d'un pigment appelé fluorescéine. Sa température de croissance optimale se situe entre 20°C à 30°C. Sa croissance à 42 est négative ; ce point est important pour la différencier de *Pseudomonas aeruginosa* (Eyquem *et al.*, 2000).

L'espèce *P. fluorescens* compte parmi les espèces qui présentent une forte hétérogénéité phénotypique et génotypique. En 2000, Bossis *et al* ont rassemblé des informations concernant les différentes études taxonomiques entreprises au sein de l'espèce *P. fluorescens*.

L'espèce comprend maintenant 5 biovars, dont l'appartenance repose sur l'assimilation de différents éléments carbonés. L'utilisation de clés dichotomiques (Bossis *et al* 2000), ainsi que le sidérotypage permettent de déterminer avec précision l'appartenance d'une souche bactérienne à un biovar donné. Toutefois, la désignation de cette espèce est encore controversée car elle ne correspond pas à la définition génotypique actuelle de l'espèce bactérienne. Les pourcentages d'hybridation ADN/ADN entre souches de la même espèce, et dans certains cas du même biovar, sont fréquemment inférieurs à 50%. La diversité de la structure du génome apparaît plus grande que la diversité physiologique (Ginard *et al.*, 1997).'

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connus pour leurs aptitude d'adhésion aux particules du sol et au rhizoplan, mais sont aussi mobiles et prototrophes (de Weger *et al.*, 1994), produisant des antibiotiques (Garbaye, 1994 ; Natsch *et al.*, 1994), et des enzymes hydrolytiques (Lim *et al.*, 1991; Neilsen *et al.*, 1998; Neilsen et Sorensen, 1999) .

Ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération *in situ* relativement court (Garbaye, 1994).

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

*Pseudomonas fluorescens* diminuent la sévérité de la maladie et stimulent la croissance des plantes comme le riz (Sakthivel et Gnanamanickam, 1987), la pomme de terre (Kloepper *et al.*, 1980) , et le blé (Weller et Cook, 1983).

## **7. Mécanismes de défense chez la plante**

En réponse aux parasites, les plantes ne se défendent pas de la même façon en fonction du type d'agent pathogène qui tente de les infecter et il existe différentes stratégies que les plantes pourront utiliser et que nous allons brièvement développer dans les paragraphes suivants.

**Défense passive** : Les plantes, au cours de leur évolution, ont mis en place des barrières protectrices contre les bioagresseurs : cuticule, paroi pectocellulosique..... Ces barrières

mécaniques leur confèrent une résistance constitutive, notamment face aux agents pathogènes (Kauffmann *et al.*, 2001). Mais si ceux-ci réussissent à les franchir, ils ont affaire aux mécanismes de défense active.

**Défense active** : Les mécanismes de défense active peuvent débuter par la réaction d'hypersensibilité (HR). C'est une réaction spécifique basée sur le concept gène pour gène de Flor, dans laquelle le produit du gène d'avorulence du pathogène est reconnu par le produit du gène de résistance de la plante (Klarzynskiet *al.*, 2001). Cette réaction intense et violente se manifeste par la mort de la cellule hôte qui, avant de s'autodétruire, aura émis des signaux d'alerte vers les cellules voisines pour créer une zone de résistance locale acquise. Il s'ensuit la synthèse de molécules de défense antimicrobienne à action directe ou indirecte. Ces premières lignes de défense sont très efficaces pour confiner le pathogène et retarder son invasion dans l'organisme. La propagation des signaux et la synthèse des molécules de défense peuvent se généraliser à la plante entière : il s'agit de la résistance systémique acquise (SAR). Ce type de résistance est certes moins intense mais plus durable : la plante est préparée à une nouvelle attaque du pathogène ou d'un autre agresseur et pourra y répondre plus rapidement (Kauffmann *et al.*, 2001). Proche de la SAR, la SRI est une forme de résistance stimulée spécifiquement par des rhizobactéries bénéfiques « PGPR » Comme il est mentionné plus haut, ces rhizobactéries sont capables de réduire une maladie à travers la stimulation de mécanismes de défense inductibles chez la plante (Van Loon *et al.*, 1998). L'induction d'une telle capacité de défense est systémique : le traitement des racines par des PGPR produit des effets protecteurs sur d'autres parties de la plante sans migration des bactéries induisant l'ISR au travers du système vasculaire de la plante ou à travers les tissus (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Bent 2005).

Les mécanismes exacts au moyen desquels ces PGPR contribuent à réduire l'incidence des maladies racinaires sont encore assez mal connus. Bien que des effets antimicrobiens directs sur les populations pathogènes soient responsables de la protection accrue décrite par plusieurs auteurs, la possibilité que les PGPR puissent aussi induire des effets indirects en sensibilisant la plante à se défendre contre l'attaque microbienne par l'activation des gènes de défense a été prouvée dans les années 1990, ouvrant ainsi une nouvelle voie de recherche (Kloepper 1993; Wei *et al.*, 1994). Ce concept de la résistance systémique induite par les PGPR trouvait sa justification dans certaines études biochimiques indiquant que la protection des plantes traitées avec des PGPR était associée à de profonds changements métaboliques incluant la production de phytoalexines (Van Peer *et al.*, 1991), l'accumulation de protéines de stress (Zdor et Anderson 1992) et la déposition de polymères structuraux (Albert et Anderson 1987). C'est en

1996 que Benhamou *et al.*, (1996a, b, c) ont montrés, pour la première fois, que les PGPR se multiplient activement à la surface racinaire et ne colonisent que quelques espaces intercellulaires des cellules épidermiques et corticales de la plante. Lorsque ces plantes sont inoculées avec un champignon pathogène, le microorganisme ne parvient pas à se multiplier et à se propager dans les tissus comme il le fait chez les plantes témoins (non traitées avec les PGPR). Bien qu'une action antifongique directe ait été détectée à la surface racinaire, probablement en relation avec des antibiotiques produits par les rhizobactéries, la progression des quelques hyphes pathogènes ayant réussi à pénétrer le système racinaire semblait retardée, voire arrêtée par plusieurs réactions de défense élaborées par la plante. Ces réactions incluent non seulement la formation de barrières structurales, mais aussi l'accumulation de composés phénoliques à potentiel antifongique direct. (Benhamou et Rey, 2012).

## **Matériels et méthodes**

### **Partie 1 : isolement et caractérisation des *Pseudomonas fluorescens***

#### **1-1-Prélèvement des échantillons :**

Dans un but de l'obtention de souches de *Pseudomonas fluorescens* de la zone rhizosphérique du blé, les échantillons de sols sont collectés à partir de champs cultivés de blé dur dans la région de Constantine, localisés dans le sud de la wilaya (Ain El bey).

Les systèmes racinaires des plantules de blé ont été récupérés avec la masse de sol rhizosphérique adhérente, les prélèvements ont été effectués de manière aléatoire selon la méthode décrite par Pepper et Gerba (2004).

#### **1-2-Isolement du *Pseudomonas fluorescens* :**

L'isolement des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* du sol rhizosphérique a été effectué par la méthode des suspensions-dilutions. 10 g de sol ont été placés et mis en suspension dans un Erlen Meyer contenant 90 ml d'eau physiologique stérile, et puis agités pendant 30 mn. On réalise une série de dilutions décimales dans une solution d'eau physiologique (0,85g/l NaCl) stérile, à partir de ces suspensions 0,1ml de chaque dilution est étalé sur le milieu de culture sélectif King B(KB) (King *et al.*, 1954).

Après 48h d'incubation à 28°C, on a repéré les souches fluorescentes ; Ces bactéries apparaissent fluorescentes sur ce milieu soit à l'œil nu, soit sous UV à 365 nm avec une fluorescence qui varie du bleu vers le jaune verdâtre selon l'espèce bactérienne. Les souches sélectionnées sont purifiées par culture en strie sur KB (annexe1).

#### **1-3-Conservation des souches**

Les souches bactériennes individualisées fluorescentes sont repiquées dans des tubes contenant un milieu KB additionné de glycérol (50%) à -20 C.

#### **1-4- Identification des isolats**

Une identification approfondie a été réalisée, on suivant une approche taxonomique qui consiste à tester la production des pigments fluorescents sur KB ; étudier les caractères

morphologiques ; réalisation des tests biochimiques, voire la capacité de croissance à 41° et à 4° C, puis identification par l'utilisation des Galeries API 20 NE.

#### **1-4-1-Test de fluorescence**

Selon (Bultreys et Gheysens, 2000, Olmar *et al.*, 2001), c'est le premier test a réalisé pour une sélection préliminaire des isolats. La production du pigment fluorescent est mise en évidence sur milieu KB, est révélé par UV (360nm) dans une chambre noire a UV, ceci après une incubation de 24 à 96 heures à 28° C.

#### **1-4-2- Caractères morphologiques**

Cette étude été basé sur des observations macroscopiques et microscopiques permettant de différencier le type de Gram, les coques et les bacilles. L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après (Joffin et Leyral, 2006) les éléments d'identification macroscopiques sont :

- la forme des colonies : ronde,
- la couleur des colonies : blanchâtre à crème,
- la taille des colonies par mesure du diamètre : comprise entre 1 et 3 mm.

L'observation microscopique, nous permet de faire une étude morphologique des cellules bactériennes, par coloration de Gram.

#### **1-5- Etude des caractères biochimiques**

Les tests biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Tortora *et al.*, 2003). Grâce à cette étude, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme bactérien.

Dans cette étude, nous avons utilisé les galeries API 20NE pour identifier nos isolats. La galerie API 20NE, se compose de 20 micro-tubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée.

##### **1- 5-1-Recherche de l'Oxydase :**

La recherche de l'oxydase est le test de base pour l'identification des bactéries á Gram négatif, permet la détection du cytochrome oxydase, enzyme entrant dans divers couples

d'oxydoréduction. La phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé, est capable d'oxyder le N diméthyl paraphénylène diamine, et former un composé violet.

#### **1-5-2- Test de Mobilité :**

Le milieu Mannitol mobilité est utilisé pour chercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries (Marchal et Bourdon, 1982).

#### **1-5-3-Croissance au 4°C et 41°C :**

Pour ce test, il est important d'identifier les souches bactériennes qui poussent à ces deux températures, car seul *Pseudomonas aeruginosa* peut supporter une température allant jusqu'à 42°C.

### **1-6 –Caractérisation moléculaire des souches de *Pseudomonas***

Neuf souches ayant les meilleures activités PGPR sont sélectionnées pour une caractérisation moléculaire, par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, afin de déterminer la fiabilité de l'appartenance à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

L'identification moléculaire des souches a été réalisée au laboratoire de biologie moléculaire, université d'Almeria, Espagne, et l'extraction de l'ADN a été réalisée à l'unité de botanique, laboratoire de Biologie et Géologie de l'université d'Almeria (Espagne), selon les étapes suivantes :

#### **1-6-1-Extraction de L'ADN**

L'ADN est préparé par des méthodes standard de références (Marmur 1961; Maniatis *et al.*, 1982; Weisburg *et al.*, 1991), après une croissance de 24h dans un bouillon Luria Bertani (LB)(annexe1), l'absorbance est déterminée à 600 nm (Ausubel *et al.*, 1991).

La méthodologie appliquée utilise le kit DNeasy Blood and tissue de QIAGEN (pour la purification de l'DNA total à partir du sang et des tissus des animaux et à partir de cellules, des levures, des bactéries ou des virus), contenant les différents tampons pré préparés, en suivant les instructions d'utilisation.

### **1-6-2-Amplification de l'ADN**

L'amplification de l'ADN a été réalisée au laboratoire d'Acide Nucléique, Service Technique, à l'Université d'Almeria, Espagne.

Les essais d'amplification sont réalisés avec un thermo-cycleur programmable (GenAmp PCR System 9700, Applied Biosystems), avec les amorces universelles décrites par Weisburg *et al.*, (1991) :

- 27f (forward) : 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'.

- 1492r (reverse) : 5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'.

Ces amorces permettent d'amplifier le gène 16SrDNA (1.5 Kb). Approximativement 50ng (5µl) d'ADN génomique sont amplifié dans 25µl de solution réactionnelle, et dont le programme est le suivant :

-Dénaturation initiale : 5 sec à 94°C

35 cycles (1sec à 94°C, 1sec à 55°C, 1sec à 72°C).

-Extension final a 72°C pour 7min.

	Concentration Finales	Vol pour réaction en µl
H <sub>2</sub> O ultra pure (LP)		6.66
Tampon (x5 Gren Go taq)		5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5
dNTPs	10mM	0.64
Amorce1	5µM	3
Amorce2	5µM	3
Taq polymérase	5U/ml	0.2
ADN génomique	50µg	5

Les produits de cette amplification ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

### **1-6-3- Séquençage**

Les produits PCR ont fait l'objet de séquençage automatisé par un séquenceur (Genetic Analyser 3500, Applied System, HITACHI) ; une purification des fragments d'ADN amplifiés est effectuée. Par la suite, les échantillons sont réamplifiés et marqués, le volume du milieu réactionnel est de 20µl qui se compose de : Taq polymérase, dNTP, ddNTP marqués, une des

deux amorces utilisés dans la PCR, selon le programme suivant : 1mn à 96°C, puis 25 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 4 mn à 60°C (amplification) et un cycle à 4°C (refroidissement).

Les séquences obtenues sont alors comparées avec celles du NCBI Blast-contig et ce en utilisant le programme blast (Altschul *et al.*, 1997).

## **Partie 2 : Collection et étude des isolats pathogènes (*Fusarium*)**

### **2-1- Prélèvement des échantillons**

De nombreuses prospections réalisées dans la région de Constantine au cours de l'année 2012 par le groupe de recherche de l'INPV de Constantine, et qui ont permis de collecter plusieurs échantillons de plantes présentant des symptômes caractéristiques de la fusariose à savoir le flétrissement unilatéral des feuilles et le brunissement de leurs bordures.

### **2-2- Isolement et purification de l'agent pathogène**

Les prélèvements sont coupés à l'aide d'un sécateur stérile, désinfectés par de l'éthanol durant 10 sec, puis de l'hypochlorite de Na pendant 30min. Après désinfection, les échantillons lavés à l'eau distillée stérile puis séchés sous une hotte à flux laminaire et enfin placés sur une boîte de Pétri contenant du PDA et incubés à 28°C.

Après incubation, des filaments mycéliens apparaissent autour des petits fragments, et afin de purifier les souches résultantes, des repiquages successifs sur d'autres boîtes de Pétri contenant du PDA sont effectués. Néanmoins, les cultures obtenues risquent d'être contaminées par des bactéries et par des champignons qui sont parfois invisibles et afin d'éviter ce risque, le procédé le plus simple et le plus sûr reste celui de la culture monospore (Rappily, 1968), qui est réalisée comme suit : à partir des cultures de 7 jours, des suspensions de spores sont préparées selon la méthode de dilution dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile. Un étalement à partir des deux dernières suspensions est effectué sur PDA. Après 48h d'incubation et à l'aide d'une loupe binoculaire, un prélèvement de filament mycélien est effectué, puis repiqué sur les boîtes contenant le milieu PDA (annexe1). Les boîtes sont mises en incubation pendant 7 jours à température ambiante.

### **2-3-Identification des isolats pathogènes**

L'identification des espèces de *Fusarium* spp est basée sur les critères établis par Lesslie et Summerell (2006) :

- La taille et la forme des macroconidies,
- La présence ou l'absence des microconidies,
- L'aspect et la coloration du mycélium sur milieu PDA,
- La présence ou l'absence de chlamydozoospores.

## **2-4-Characterisation moléculaire**

### **2-4-1- Extraction d'ADN Fongique (18s)**

Pour extraire le DNA fongique, on a utilisé le Kit E.Z.N.A.Fungal DNA Mini Kit (Omega, bio-tek), contenant les différents tampons, selon le protocole de Lee et Taylor (1990) modifié.

### **2-4-2- Amplification et séquençage**

La PCR et le séquençage sont effectués dans les mêmes conditions que ceux effectués avec l'ADN bactérien, mais avec des amorces standard ITS1 et ITS4 dont les séquences sont les suivants :

ITS 1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS 4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC

## **Partie 3 : Mesure des activités promotrices de la croissance végétale**

### **3-1- Production des siderophores :**

On a effectué différents tests, visant à déterminer la présence ou l'absence des siderophores et la nature de ces derniers.

**3-1-1-Test Arnow** (Arnow, 1937) pour la détection du groupement spécifique Catéchols. A 1ml d'une culture fraîche, 0.1 ml de 5 M/l HCl, et 0.5ml d'ammonium molybdate (10 g of NaNO<sub>2</sub> et 10 g of Na<sub>2</sub>Mo 2H<sub>2</sub>O diluer dans 50 ml d'eau distillé) sont ajoutés. Lorsqu'une couleur jaune est apparue, 0.1 ml de 10 N de NaOH sont ajoutées. L'apparition d'une couleur rose indique la présence des Catéchols.

**3-1-2-Test FeCl<sub>3</sub>** (Neilands, 1981) pour la détection des Hydroxamates. A 1 ml de la culture bactérienne, une solution de fer chlorure (1 à 5 ml de FeCl<sub>3</sub> à 2%) est ajoutée. La formation d'une couleur rouge pourpre indique la présence des Hydroxamates.

### 3-1-3-Production des siderophores sur CAS solide :

La détection de la synthèse des siderophores a été réalisée dans le milieu CAS (Chrome Azurol Sulfate) selon la méthode modifiée et décrite par Pérez-Miranda *et al.*, (2007).

Les isolats ont été inoculés dans du King B liquide pendant 24 heures, puis 10 µl de chaque culture sont déposés en spot sur le milieu de détection de la production de siderophore Chrome Azurol Sulfate ou CAS proposé par Schwyn et Neilands, (1987) (annexe1). Ce milieu de couleur bleu, permet la visualisation de la production de siderophore, grâce à la formation d'un halo orange autour de la colonie productrice. Le diamètre de ce halo est mesuré.

### 3-1-4-Quantification des siderophores sur milieu liquide :

La quantification consiste à inoculer 100µl de chaque suspension bactérienne dans 10ml du King B et incubé à 30 °C pendant 48 heures. Les cultures bactériennes sont ensuite centrifugées à 5000 g pendant 20 minutes, puis 500µl du surnageant est mélangé avec 500µl de la solution CAS et incubé pour 30min à l'obscurité et à température ambiante.

La couleur change du bleu vers l'orange selon le pourcentage des siderophores produites. La DO est mesurée par spectrophotométrie (Heyios E thermo spectronic) à 630 nm. Le pourcentage des siderophores est calculé en utilisant la formule suivante (Gokan, 2010) :

$$\% = (S_t - S_e) / S_t \times 100 \quad , \text{ avec :}$$

$S_t$ : DO de la solution CAS de la couleur bleu intense (contrôle).

$S_e$ : DO de la solution d'échantillon de couleur moins bleu à orange selon l'intensité de la production.

### 3-2-Solubilisation des phosphates :

Ce test permet d'évaluer la capacité de nos isolats à solubiliser les phosphates sur milieu de Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948), ce milieu contient du  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme seule source de phosphate (annexe1).

#### 3-2-1-Sur Milieu Solide :

Les isolats sont déposés sous forme de spots sur le milieu PVK solide. Après incubation à 28°C/10 jours, le diamètre total (diamètre du halo + diamètre de la colonie) est mesuré. Le diamètre du halo de solubilisation pour chacune des souches est déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie du diamètre total.

#### 3-2-2-Sur Milieu liquide :

Pour une estimation quantitative du phosphate solubilisé, 100µl d'une culture bactérienne sont inoculés dans 5ml de milieu PVK liquide puis incubés à 30°C pendant 11 jours sous agitation continue. À la fin de l'incubation, les cultures sont ensuite centrifugées à 1000 g pendant 20 min.

La quantité du phosphate soluble est mesurée dans le surnagent selon la méthode colorimétrique de John (1970). 2 ml de surnagent est mélangé avec 8 ml d'une solution réactionnelle, et l'absorbance est lue à 880nm après 10 min. Pour la préparation du mélange réactionnel, 1.5 g d'acide ascorbique sont ajoutés à 100ml de la solution stocké préparé comme suit : 450 ml de 10N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 100 ml de 5% Tartarate d'antimoine et de potassium sont ajoutés petit à petit sous agitation sur 300 ml eau distillé contenant 20 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O ; la solution obtenue est diluée à 1L puis stocké dans une bouteille sombre.

L'intensité de la couleur bleu est directement proportionnelle à la concentration des phosphates dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est réalisée avec une solution de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (annexe2).

### **3-3-Production d'ammonium :**

La production de NH<sub>3</sub> est testée sur eau peptonée selon la méthode de Capuccino et Sherman, (1992). Elle consiste à inoculé 100 µl de la culture bactérienne dans les tubes contenant l'eau peptonée, puis incubé à 30°C pendant 48h. L'addition de 0.5 ml du réactif de Nessler (annexe3) donne une couleur jaune à marron qui indique la production de NH<sub>3</sub>.

### **3-4-Production d'HCN :**

La capacité de nos souches à produire l'acide cyanhydrique (HCN) est effectuée selon la méthode de Bakker et Schipperes, (1987), sur le milieu King B additionnée de glycine (4,4g/l). Les isolats sont ensemencée par stries sur la gélose en boîtes de Pétri. Un disque de papier Whatman N1 de 9 cm de diamètre imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) est déposé au fond du couvercle de la boîte. Celle-ci est scellée avec du papier parafilm et incubée à 30°C/96 h. Le résultat positif se traduit par le virage du papier Whatman du jaune vers une couleur orange à marron indiquant la production de HCN volatile.

### **3-5-Production de l'Acide Indole Acétique :**

La production d'AIA est effectuée selon la méthode décrite par Brik *et al.*, (1991) et modifié par Ahmad *et al.*, (2008). Qui consiste à ensemencé avec 500µl d'une culture fraîche des tubes contenant 5ml de King B additionné de 0.1% de tryptophane. Après incubation à 30°C/ 96h sous agitation, on effectue un dosage colorimétrique selon la méthode de Gorden et Weber, (1951). Les cultures sont centrifugées à 11 000 g pendant 15min à 4°C. 2 ml de surnageant est additionné de 4ml de réactif de Salkowski (1 ml de 0.5 M FeCl<sub>3</sub> dans 50 ml de 35% HClO<sub>4</sub>) et quelques gouttes d'acide ortho-phosphorique. La DO est mesuré à 530 nm après

30 min d'incubation à l'obscurité à 28°C. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage standard d'AIA (Fluka).

### **3-6-Production d'enzyme :**

#### **3-6-1- Catalase**

Ce test est réalisé selon la méthode décrite par Schaad, (1992), quelque gouttes de peroxyde d'hydrogène sont déposées sur des colonies bactériennes en culture sur gélose ; une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène.

#### **3-6-2- Cellulase**

La production de cellulases est déterminée selon la méthode décrite par Cattelan *et al.*, (1999). Les isolats sont ensemencés sur le King B additionné avec 1% de CMC (Craboxyl Methyl Cellulose). Après incubation à 30°C pendant 5 jours, les boîtes sont inondées par une solution de rouge Congo (1% w/v) pour 20 min, suivit d'un lavage avec une solution de NaCl 1N. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive.

#### **3-6-3- Amylase**

La recherche d'Amylase est effectuée par la mise en culture des isolats sur une gélose nutritive additionnée de 1% d'amidon (Delarras, 2014). Après incubation à 30°C pendant 5 jours, les boîtes de Pétri sont inondées par une solution d'iode. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Holt *et al.*, 1994).

#### **3-6-4- Lécithinase, Lipase et Lipoprotéine**

En microbiologie systématique l'étude du métabolisme lipidique intervient dans la différenciation des espèces, à l'intérieur de plusieurs genres ; et dont le but d'explorer l'activité lipolytique de nos isolats, on a utilisé la gélose au jaune d'œuf, et la méthode utilisée est celle décrite par Delarras, (2014).

#### **3-6-5- Protéase**

La production de la protéase a été déterminée par un halo clair formé au tour des colonies poussant sur une gélose au lait écrémé, obtenue en mélangeant 1g d'agar suspendue dans 50ml d'eau distillé avec 5g du lait écrémé en poudre dilué dans 50ml d'eau distillé (Chaiarn *et al.*, 2008).

#### **3-6-6- Pectinase**

La pectinase a été recherché sur milieu king B additionné de 0.5 % de pectine. Les boîtes ensemencées sont incubées pendant 48h, puis inonder avec une solution d'iode pendant 30 min. L'apparition d'un halo claire au tour des colonies indique une réaction positive (Delarras, 2014).

### 3-6-7-Dégradation de la chitine

Avant de tester la production de la chitine, il est nécessaire de préparer la chitine colloïdale.

**3-6-7-1-Préparation de la chitine colloïdale :** elle a été préparée à partir de la chitine commerciale (chitin from shrimp shells, Sigma). La préparation a été effectuée selon le protocole modifié de Berger and Reynolds, (1958) ; 40g de la chitine (sigma) ont été dissous dans 400ml d'HCL concentré et laissé avec agitation dans une hotte chimique pendant 1 heure à 30°C. Traité ensuite avec 2 l d'eau distillé glaciale pour permettre la précipitation de la chitine colloïdale ; ceci a été incubé pendant une nuit à 4°C. Le précipité a été filtré à travers 3 couches du papier filtre logé dans un entonnoir, puis environ 3 litres d'eau distillé ont été utilisés pour le rinçage de cette chitine colloïdale jusqu'à ce que le pH du filtrat augmente à 7,0. La chitine colloïdale obtenue a été pressée entre deux papier filtres pour éliminer l'humidité supplémentaire, puis placés dans un bûcher en verre de 100ml, recouvert avec deux couches de papier aluminium et stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 min. La chitine autoclavée a été stockée à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure sous forme humide selon le protocole de Gomez Ramirez *et al.*, (2004)

**3-6-7-2-Production de la chitinase.** La capacité de nos isolats à décomposer la chitine colloïdale a été testée sur milieu à la chitine, dont la composition par litre est : 4 g de chitine colloïdale, 1.1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001 g FeSO<sub>4</sub>, 0.001 g MnSO<sub>4</sub>, 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 15 g d'agar ; et le pH est ajusté à 8± 0.2 (Ronald M Atlas. 2010). Les isolats sont inoculés en spots et incubés à 30°C pendant 10 jours. L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique un résultat positif (Roberts and Selitrennikoff, 1988).

### 3-7-Activité antifongique in vitro :

Ce test est effectué pour vérifier l'existence d'une éventuelle action inhibitrice de nos isolats bactériens vis-à-vis deux isolats phytopathogènes : Fus 1 : *Fusarium culmorum* et Fus 7 : *Fusarium pseudograminiarum*. Le test d'antagonisme fongique a été réalisé sur le milieu de culture solide (PDA) selon la méthode décrite par Vincent *et al.*, (1991). Les isolats sélectionnés sont étalés sur une moitié d'une boîte gélosée, alors qu'un disque fongique de 4 mm provenant d'une culture d'au moins cinq jours est déposé à l'opposé sur l'autre moitié.

Les boîtes sont incubées à 25 et à 28°C et/ou 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 isolats 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).

#### **Partie 4 : Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance du blé et l'inhibition du *Fusarium culmorum* et *Fusarium pseudograminearum*.**

Les *Pseudomonas* spp identifiés ont été utilisés dans les essais d'antagonisme in vivo. 11 isolats ont été retenus sur la base de leurs production de métabolites secondaires, qui pourraient jouer un rôle dans la biostimulation, notamment : l'AIA, l'HCN et les phosphatases ; ainsi que dans l'antagonisme notamment par production de siderophores, d'enzymes de dégradation, et principalement sur leur pouvoir antagoniste de ces isolats, qui a été étudié *in vitro* contre *Fusarium culmorum* et *Fusarium pseudograminearum*. Les souches bactériennes sont cultivées à 30°C/ 24 h sur bouillon nutritif. Les cultures sont ajustées à une densité voisine de 10<sup>8</sup> bactéries/ml pour chaque souche. Les suspensions fongiques sont préparées à partir des cultures âgées de 7 jours et inoculées dans le PDA liquide.

-Les graines de blé dur de la variété GTA (Geta-dur) sont stérilisées en surface avec l'éthanol 96% pour 1 min puis avec une solution d'hypochlorite de sodium (2%) pendant 15 min et rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Les graines sont laissées à germer sur du papier filtre placé au fond des boîtes de Pétri imbibé avec l'eau distillée stérile.

-Le sol utilisé pour les essais *in situ* a été prélevé à partir d'un champ de blé cultivé à la région de Ain el bye, Constantine, ce dernier a été stérilisé à l'autoclave (à 120° C pendant 1h, et l'opération étant répétée 3 fois après refroidissement) (Chao *et al.*, 1986).

-Le sol stérile a été réparti dans des pots en plastique, préalablement désinfecté par l'éthanol. Les graines germées sont semées à une profondeur de 1cm de la surface, et l'inoculation se fait par la suspension bactérienne à raison de 2ml pour chaque graine (on dépose trois graines par pot). Les graines non inoculées (témoin) sont inoculées par de l'eau distillée stérile (4 répétitions ont été réalisées).

A partir de cette étape deux différentes expériences ont été alors réalisées :

**-La première** vise à tester le pouvoir antagoniste des isolats bactériens contre deux agents pathogènes isolés, Fus1 : *Fusarium culmorum* et Fus7 : *Fusarium pseudograminearum*.

Pour cela après une semaine de plantation, les plantes sont infectées par 5ml de la suspension fongique par pot. Deux témoins sont utilisés : l'un traité uniquement avec Fus1 et l'autre traité avec Fus7. Elle a été conduite pendant 45 jours, avec 96 pots utilisés, dans une chambre de croissance (phytotron) avec une moyenne de températures diurnes/ nocturnes de 26° C et 16° C respectivement et une photopériode 16 h d'éclairage. L'évaluation des symptômes est réalisée en se basant sur une échelle de notation de symptômes proposée par Vakalounakis et Fragkiadakis, (1999) et qui comprend quatre valeurs allant de zéro à trois :

- Zéro : plante saine,
- Un : léger jaunissement, légère pourriture des racines et pourriture du collet,
- Deux : jaunissement important des feuilles avec ou sans flétrissement, pourriture sévère des racines, pourriture importante du collet,
- Trois : mort de la plante.

Sur la base de ces notations, on a calculé l'indice de mortalité qui correspond à la moyenne des valeurs attribuées aux dix plants (nombre de répétition par traitement élémentaire). De plus le pourcentage des plants qui ont une notation des symptômes supérieure ou égale à deux.

**-La deuxième expérience** comprend le test de la stimulation de la croissance. Les plantes ont été inoculées uniquement avec la suspension bactérienne. Le témoin a été traité uniquement par l'eau distillée stérile. L'expérience a été menée dans les mêmes conditions que la première, avec 48 pots. Les caractéristiques morphologiques de chaque plante ont été retenues tel que : la hauteur de la plante, la longueur de la racine, le poids frais de la partie supérieure, et de la racine, ainsi que le poids sec des deux.

## **Partie 5 : Etude du mécanisme de résistance du blé**

### **5-1- Expérience d'induction de la résistance :**

La méthode est pratiquement identique aux deux précédentes, après stérilisation, les graines de blé ont été plantées dans des pots contenant du terreau stérile, puis inoculées avec 2ml d'une suspension bactérienne/graine (ici nous avons utilisé 6 souches bactériennes sélectionnées : Ps 8, Ps17, Ps47, Ps53, Ps65, et Ps66) à raison de 3graines par pot. Le témoin est inoculé avec de l'eau distillée stérile.

L'infection a lieu sur des plants âgés de 10 jours, l'infection se pratique sur la partie racinaire des plantes à raison de 2ml de la suspension fongique par plante (nous avons testé deux champignons Fus1 et Fus7). Les différents traitements sont maintenus en 3 répétitions et sont illustrés dans le tableau N1 suivant :

**Tableau 1** : représente les différents traitements utilisés et leur composition

Numéro du Traitement	Détail du traitement
T <sub>0</sub>	Témoin (sans bactérie et sans champignon)
T <sub>1</sub>	Ps8
T <sub>2</sub>	Ps17
T <sub>3</sub>	Ps47
T <sub>4</sub>	Ps53
T <sub>5</sub>	Ps65
T <sub>6</sub>	Ps66
T <sub>7</sub>	<i>Fusarium culmorum</i> (Fus1)
T <sub>8</sub>	Ps8 + Fus1
T <sub>9</sub>	Ps17 + Fus1
T <sub>10</sub>	Ps47 + Fus1
T <sub>11</sub>	Ps53 + Fus1
T <sub>12</sub>	Ps65 + Fus1
T <sub>13</sub>	Ps66 + Fus1
T <sub>14</sub>	<i>Fusarium pseudograminearum</i> (Fus7)
T <sub>15</sub>	Ps8 + Fus7
T <sub>16</sub>	Ps17 + Fus7
T <sub>17</sub>	Ps47 + Fus7
T <sub>18</sub>	Ps53 + Fus7
T <sub>19</sub>	Ps65 + Fus7
T <sub>20</sub>	Ps66 + Fus7

Quatre jours après l'infection, le matériel végétal, c'est-à-dire les plantes saines et les plantes infectées, est récolté en vue d'être analysé. Aussitôt après avoir été prélevées, les plantes sont gelées dans de l'azote liquide et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , et sont ensuite broyées dans un mortier refroidi à l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

### **5-2-Activité lipoxygénase (LOX) :**

Le broyat est mélangé avec du tampon phosphate de sodium (50mM, pH=6.5) contenant 1mM de phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF), 1% (p/p) de polyvinylpyrrolidone (PVPP) et de 0.25% (v/v) de triton X-100 à raison d'1 ml de tampon pour 250 mg de tissu. L'extrait est centrifugé 30min à 4° C à 20000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et constitue l'extrait enzymatique. Le dosage de l'activité LOX s'effectue par spectrophotométrie, le principe de ce dosage repose sur l'absorbance des hydroperoxydes à 234 nm. Le test consiste à mesurer l'augmentation de l'absorbance à 234 nm, ce qui indique l'apparition des hydroperoxydes produits par la LOX.

Le substrat utilisé pour le dosage est l'acide linoléique (LNA). Le substrat est préparé en solubilisant de l'acide linoléique et du tween 20 (1/1 v/v) dans du tampon de dosage dégazé aux ultrasons. 10 à 20 µl de soude (1M) sont ajoutées afin d'éliminer le trouble qui aurait pu se former dans le substrat.

Dans une cuvette en quartz de 3 mL, 50 µl de surnageant enzymatique sont ajoutés à 2,90 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6.0, puis 50 µl d'acide linoléique 10mM sont ensuite ajoutés et l'apparition des hydroperoxydes à 234 nm est mesurée pendant 3 minutes. L'activité est calculée en se basant sur la variation maximale de l'absorbance en une minute. La concentration des hydroperoxydes dans l'échantillon est déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert avec un coefficient d'extinction molaire des hydroperoxydes est égal à 25000 m<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

### **5-3- Activité phénylalanine-ammonia-lyase (PAL) :**

Le broyat est mélangé avec du tampon phosphate potassique (100 mM, pH = 8) contenant 1,4 mM de β-mercaptoéthanol et de 1% (p/p) de PVPP à raison d'1 ml de tampon pour 250 mg de tissus. L'extrait est centrifugé 15 minutes à 4°C à 13 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et constitue l'extrait enzymatique. L'activité PAL est mesurée par spectrophotométrie selon la méthode de Tanaka *et al.*, (1974) en mélangeant 450 µl de tampon Tris-HCl (100 mM, pH = 8,8), 200 µl de L-phénylalanine (40 mM) et 150 µl d'extrait enzymatique. Le substrat est préparé en solubilisant la L-phénylalanine dans un volume donné de tampon de dosage (tampon Tris-HCl). La réaction est suivie pendant 30 minutes à 37°C puis est stoppée par ajout d'acide trichloroacétique (TCA) à 25% (p/v). Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 4°C à 10 000 g et l'absorbance du surnageant est lue à 280 nm. L'augmentation de l'absorbance est due à la production de l'acide cinnamique

consécutives à la dégradation de la L-phénylalanine par la PAL. L'activité a été exprimée comme la quantité d'acide cinnamique produit en (pKat) par mg de protéine.

#### **5-4- L'activité peroxydase (PO) :**

Pour cet activité, 100 mg du broyat été homogénéisé dans 1ml de phosphate potassique 0.1M, pH=7.0, contenant 4% de PVPP. L'extrait est centrifugé 30 minutes à 4°C à 10 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et constitue l'extrait enzymatique.

Le dosage de l'activité PO a été réalisée selon la procédure décrite par Hammerschmidt et al 1982, le mélange réactionnel est composée de 2,5 ml de mélange contenant 0.25 % (v/v) de gaiacol dilué dans le tampon sodium phosphate 0,01 M, pH = 6 et le peroxyde d'hydrogène 0,1 M. L'extrait enzymatique (0,1 ml) a été ajoutée pour débiter la réaction, qui a été suivie par colorimétrie à 470 nm. L'activité a été exprimée en (nKat mg<sup>-1</sup>).

#### **5-5- Activités chitinase et $\beta$ -1,3-glucanase :**

Pour l'extraction des protéines de défense : les chitinases et les  $\beta$ -1,3-glucanases, le matériel végétal broyé à l'azote liquide en premier lieu à l'aide d'un mortier, puis une seconde fois broyé dans un tampon d'extraction d'acétate de sodium (50 mM, pH = 5) contenant 1 mM de dithiothreitol (DTT) ; 0,2% (p/v) de PMSF et 1% (p/p) de PVPP à raison d'1 ml pour 250 mg de tissus à 4°C. Les extraits sont ensuite centrifugés 5 min à 4°C à 9 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires et le surnageant est récupéré et constitue l'extrait enzymatique pour les deux activités.

Le dosage de l'activité chitinase s'effectue par spectrophotométrie selon la technique décrite par Molano *et al.*, (1977), et modifier par El-Katatny *et al.*, (2001). Le mélange réactionnel du dosage contient 1 ml de chitine colloïdale (en suspension dans le tampon acétate 50 mM pH 5.2,) et 1 ml d'extrait enzymatique. Le mélange a été incubé pendant 7 h à 37 ° C sous agitation, et la réaction a été arrêtée par centrifugation (7000 g) pendant 10 min et par l'addition de 1 ml de réactif dinitrosalicylique (DNS).

Pour le dosage de l'activité  $\beta$ -1,3- Glucanase a été testée de façon similaire en incubant 500 ul de 5 % (P/v) de laminarine dans 50 mM de tampon acétate (pH 4,8) avec 200 ul d'extrait enzymatique à 45 ° C pendant 30 min et la détermination de la réduction de sucres détecter avec DNS. La quantité de sucres réducteurs libérés était calculée à partir des courbes d'étalonnages enregistrés pour la N-acétylglucosamine et de glucose, et les activités chitinase et  $\beta$ -1,3-glucanase ont été exprimées en pkat (pmol s<sup>-1</sup>) et nkat (nmol s<sup>-1</sup>), respectivement.

## Résultats et Discussions

### Partie 1 : Isolement et caractérisation des *Pseudomonas fluorescens*

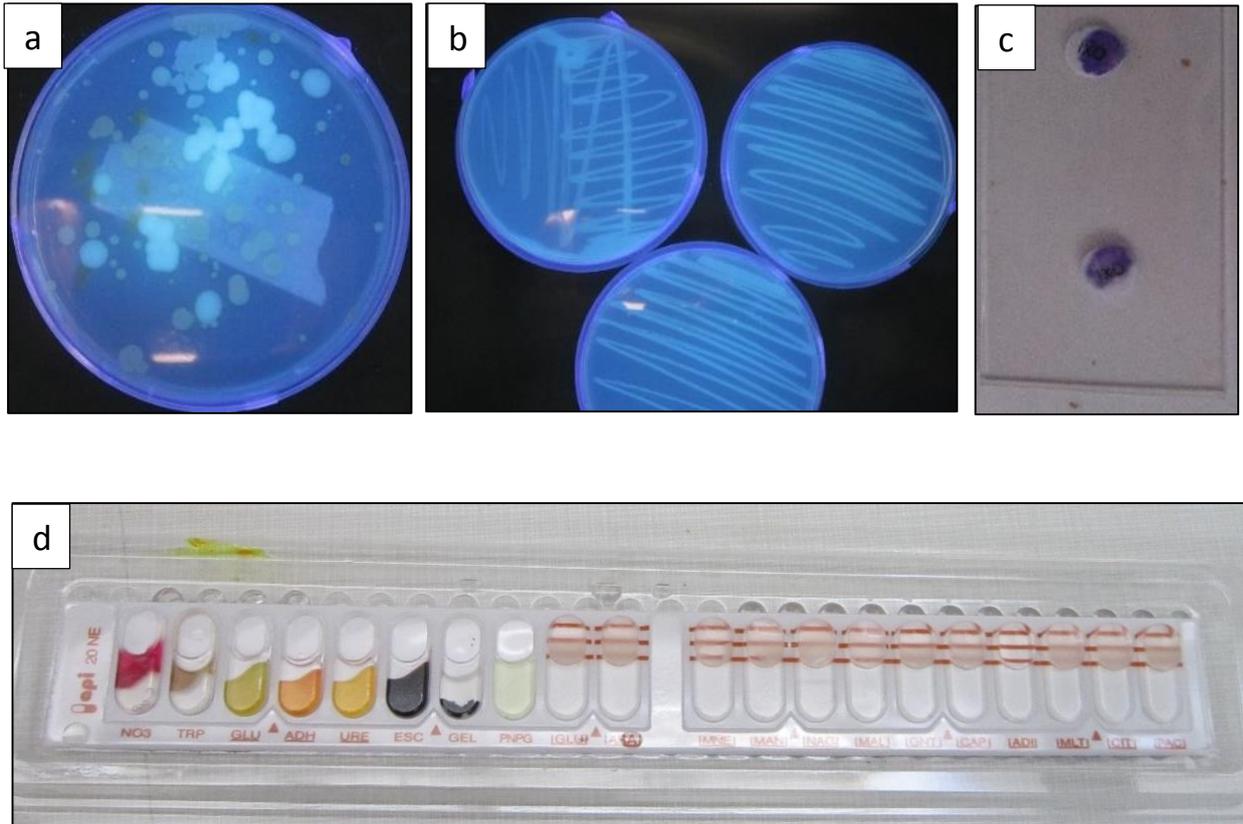
#### 1-1- Caractérisation phénotypique des isolats :

La sélection basée sur la production de pigment fluorescent et les caractères morphologiques sur le milieu KB, ont permis la collection de 55 souches bactériennes fluorescentes, dont les colonies sont crème à blanchâtres avec formes rondes, bords réguliers, des reliefs bombés et des surfaces lisses et avec taille de 1 à 3mm (Figure 4a et b). La coloration de Gram, a fait ressortir des souches de forme bacillaire et à Gram négatif (Figure 5).

**Tableau 2 :** Caractères morphologiques et biochimiques des isolats.

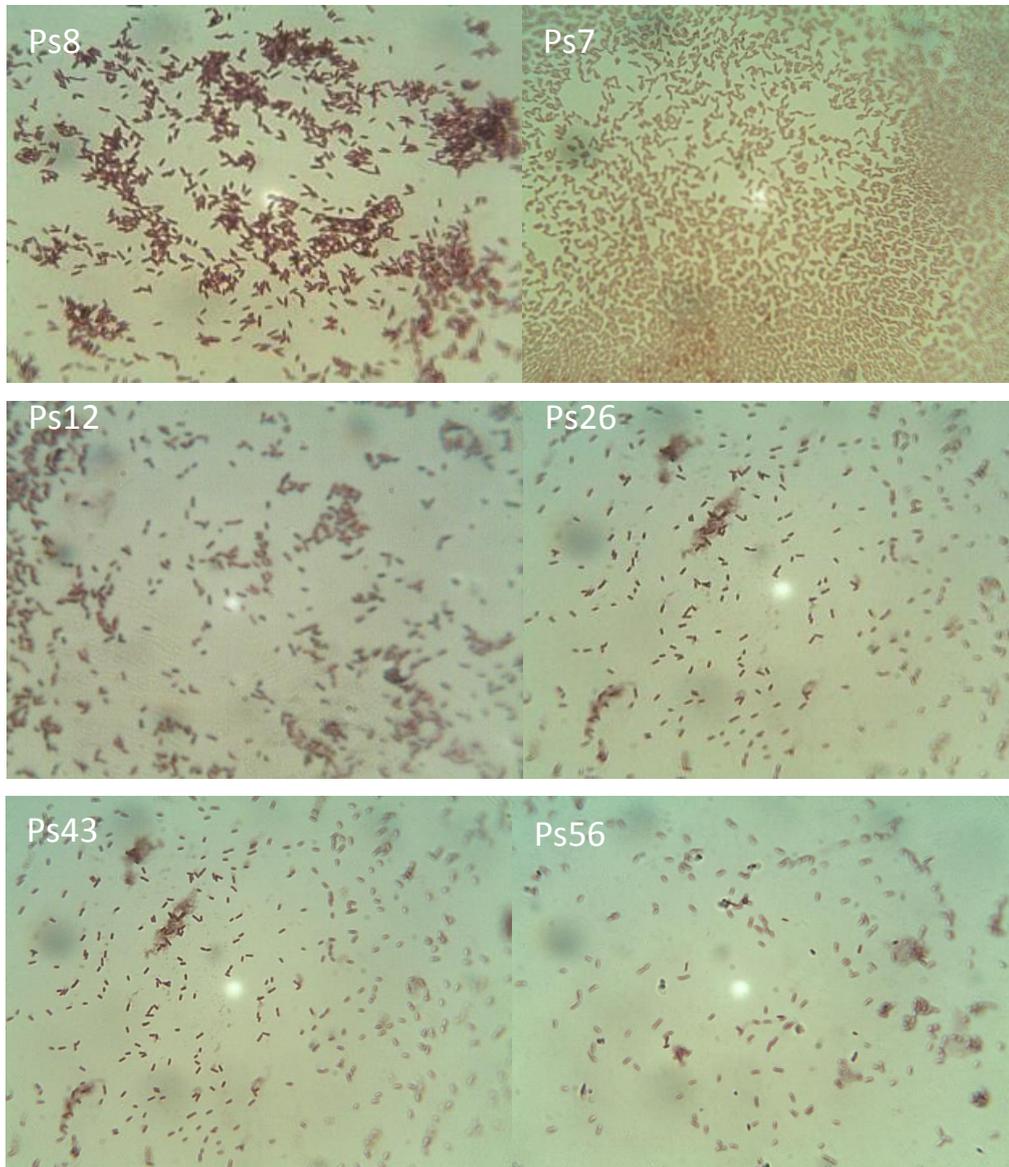
Caractères biochimiques	Réactions
Test de Gram	Négatif
Forme de Cellule	bacille
Pigment Fluorescent	jaune verdâtre
Test d'Oxidase	+
Croissance a 4°C	+
Croissance a 42°C	-
Mannitol	73.21%
Mobilité	+

Le test de l'oxydase considéré comme caractère taxinomique permettant de discriminer aisément les *Pseudomonas fluorescens*, a été pratiqué sur toutes les souches de la collection (Palleroni *et al.*, 1984 ; Jacques, 1994; Bossis, 1995) (Figure 4c). La fermentation du mannitol a été observée chez toutes les souches. Ainsi la croissance des souches à 4°C, et leur incapacité à se cultiver à 41°C confirme leur appartenance à l'espèce *P. fluorescens* (Tableau 2). L'identification phénotypique a été complétée par l'utilisation des galeries API 20 NE, qui ont révélé un métabolisme strictement respiratoire oxydatif (Figure 4d).



**Figure 4** : Identification des Pseudomonas.

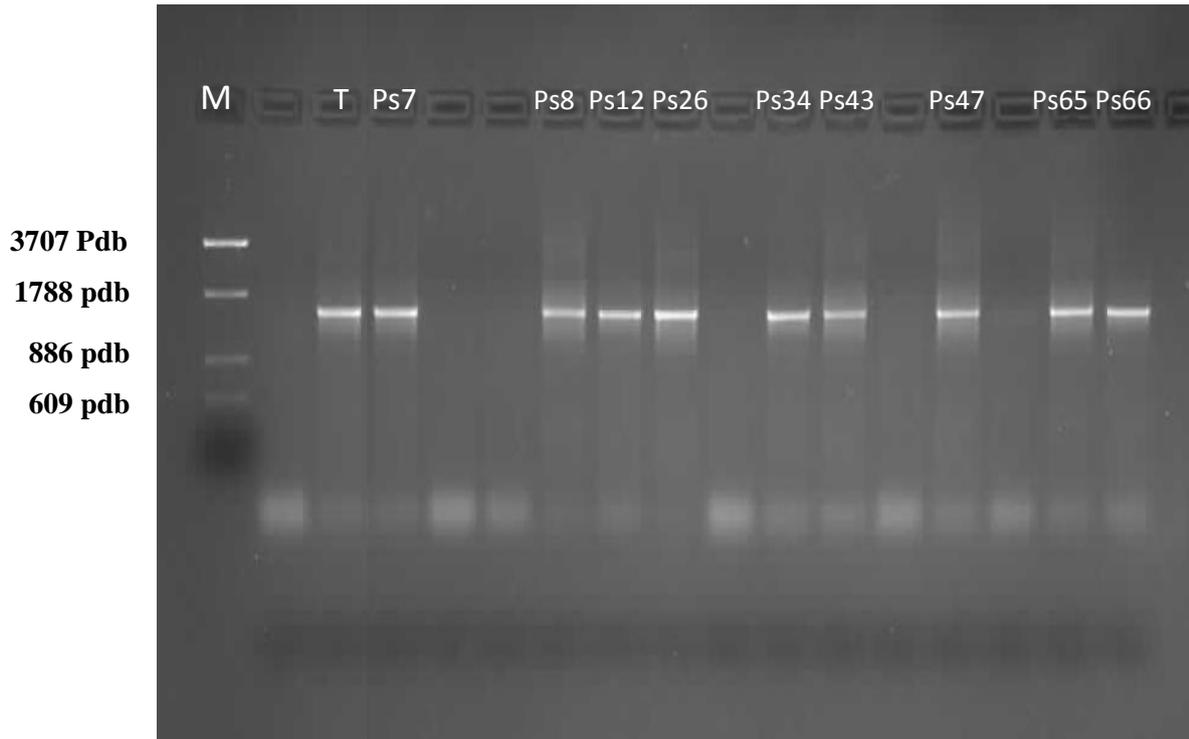
**a,b**-Photos d'isolement et de purification des bactéries fluorescentes sur King B sous chambre noir.**c**- resultat de l'oxydase, **d**- identification des *P. fluorescens* par les API 20 NE.



**Figure 5 :** Observation microscopique des isolats après coloration de Gram (X100)

### **1-2- Caractérisation moléculaire :**

Les produits de l'amplification par PCR ont fait l'objet d'une migration électrique sur gel d'agarose à 1%, ainsi présentant des fragments à vitesse de migration égale, et avec une taille inférieure à 1700 pb (Figure 6).



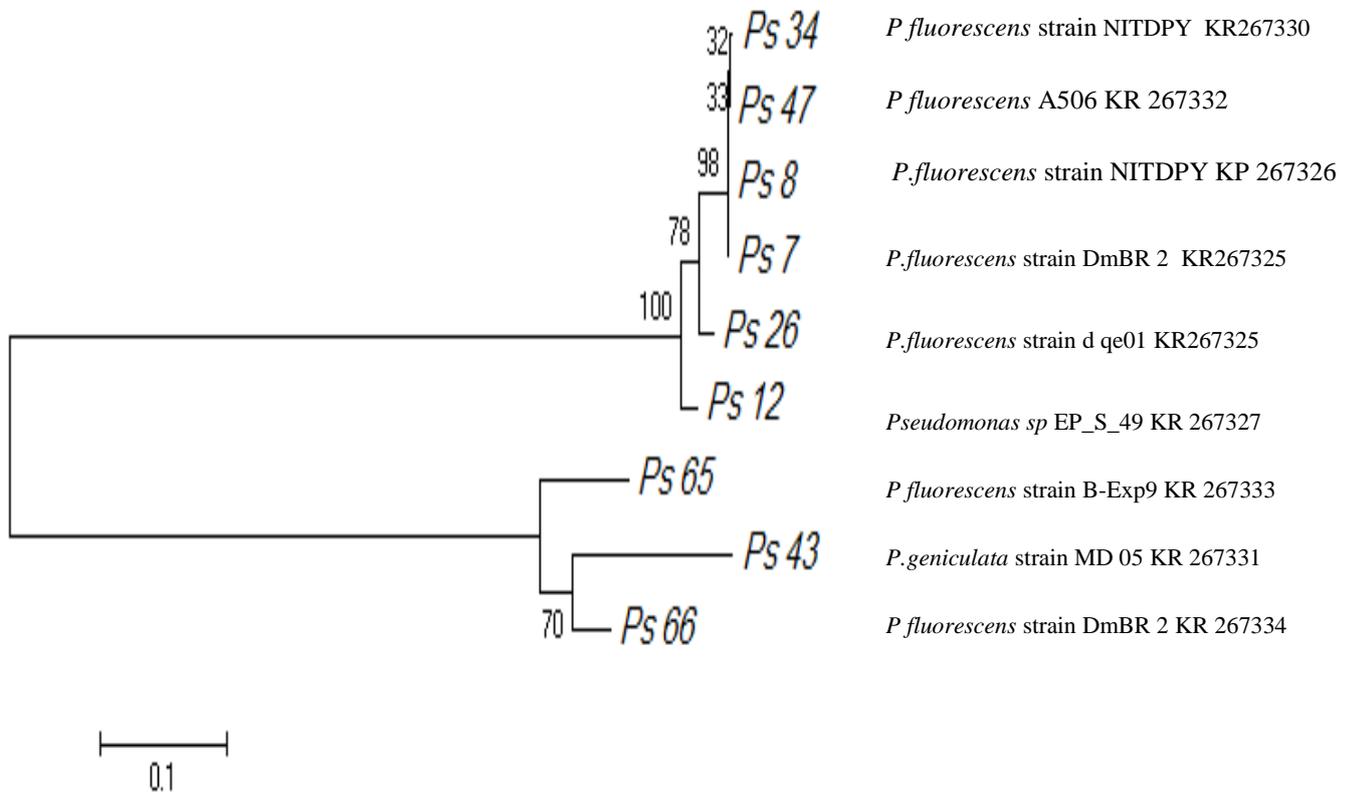
**Figure 6 :** Électrophorèse des produits de la PCR des bactéries sur gel d’agarose a 1%.

M- marqueur du poids moléculaire, T- *Pseudomonas fluorescens* (souche de référence du laboratoire)

L’analyse phylogénétique a été effectuée par le séquençage partiel du gène de l’ARNr 16S. L’analyse des BLAST pour la recherche de l’homologie avec les espèces similaires existant dans les banques de données (GenBank), est utilisée pour la construction de l’arbre phylogénétique par le logiciel cluster, et les résultats sont dans le tableau 3 .

**Tableau 3 :** Identification des isolats Bactériens sur la base du séquençage de l’ADN 16s

Isolats	Taxon	% similarité	Accession number	Espèces
Ps26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%	KR267328	<i>P.fluorescens</i> strain d qe01
Ps7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	KR267325	<i>P.fluorescens</i> strain DmBR 2
Ps8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	KR267326	<i>P.fluorescens</i> strain NITDPY
Ps12	<i>Pseudomonas sp</i>	98%	KR267327	<i>Pseudomonas sp</i> EP_S_49
Ps34	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	KR267330	<i>P fluorescens</i> strain NITDPY
Ps47	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	KR267332	<i>P fluorescens</i> A506
Ps66	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%	KR267334	<i>P fluorescens</i> strain DmBR 2
Ps43	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	94%	KR267331	<i>P.geniculata</i> strain MD 05
Ps65	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	89%	KR267333	<i>P fluorescens</i> strain B-Exp9



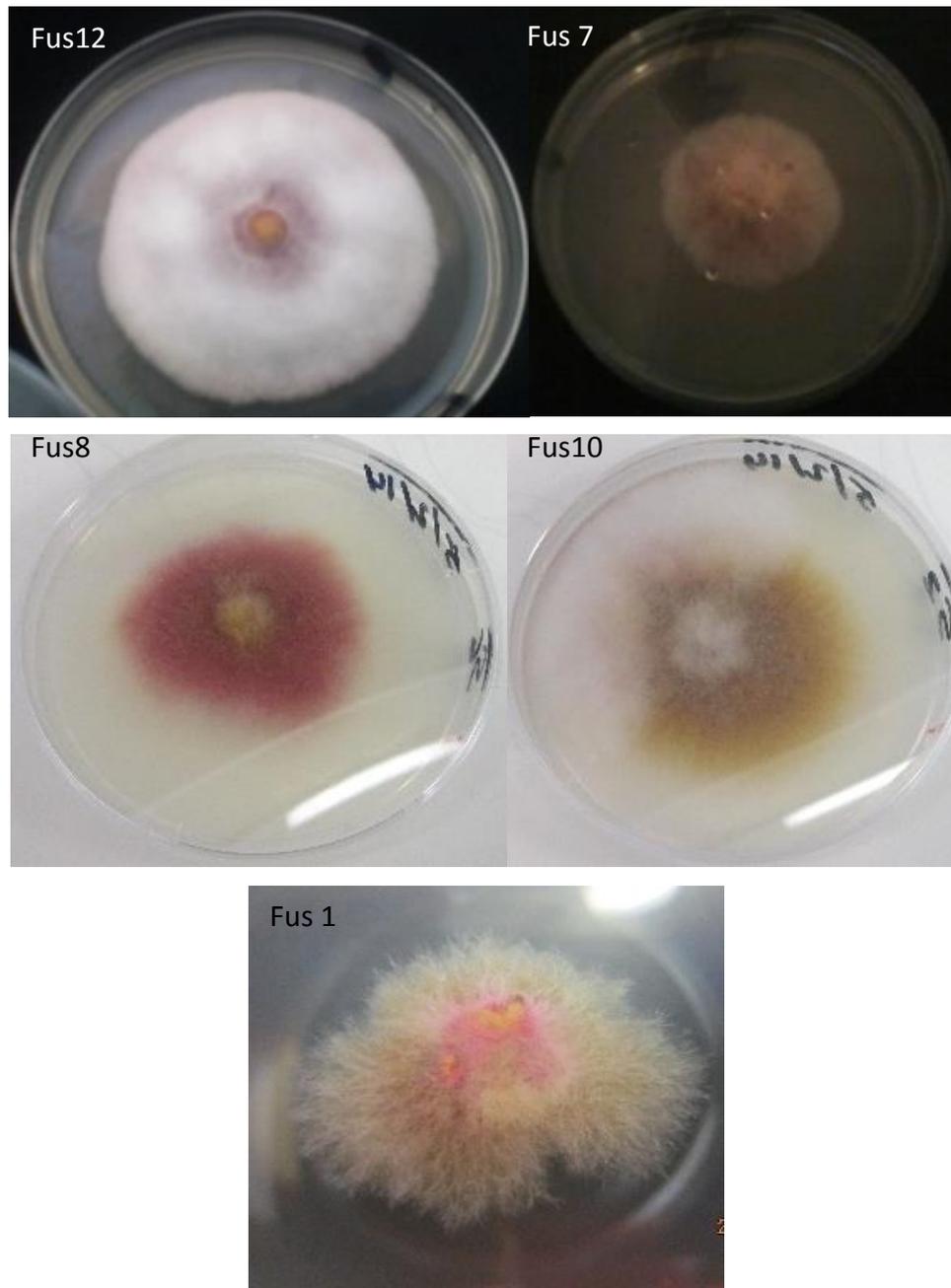
**Figure 7 :** Arbre phylogénétique des isolats basé sur les séquences d'ADNr 16S.

## **Partie 2 : Etude des isolats pathogènes (*Fusarium*)**

### **2-1- Caractérisation morphologique des isolats de *Fusarium***

Les résultats obtenus au bout de 7 jours d'incubation après isolement, on a relevé un développement de 12 mycéliums dominants et dense rasant, de couleurs différentes : rouge, rose, marron ou blanchâtre sur le milieu de culture PDA, et leur identification à l'aide d'une clé de détermination suggèrent que nous sommes bien en présence du champignon d'intérêt (*Fusarium*).

Les espèces de *Fusarium* produisent des macroconidies composées de 3 à plusieurs cellules. Leur forme est variable, typique avec une cellule apicale plus ou moins pointue. La forme des macroconidies est un des critères d'identification du genre *Fusarium* représentant ; pour beaucoup d'espèces on observe une cellule basale en forme de pied (Seifert, 2001).



**Figure 8:** Observations macroscopique des isolats fongiques sur milieu PDA.

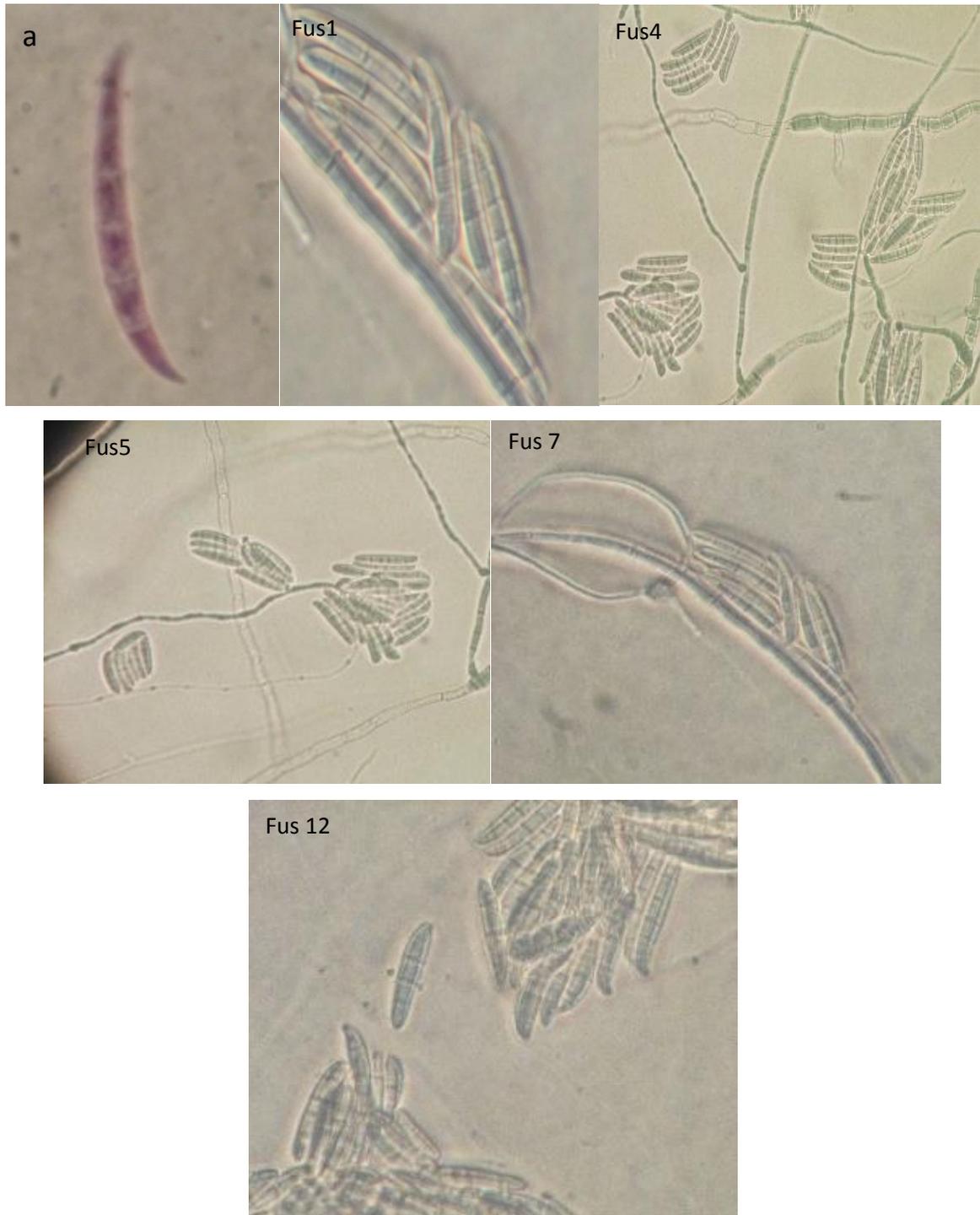
Les isolats Fus2, Fus3 Fus4, Fus5, Fus6, Fus7, Fus8 et Fus 10, sur milieu PDA donnent des colonies de couleur rouge. Le mycélium est dense de couleur qui varie du blanc rose, orange au marron et devient rouge au contact de l'agar avec des reflets plus au moins jaunes dans sa partie aérienne (Figure 8). Les macroconidies sont hyalines, droites ou légèrement arquées, Ayant de 3-5 cloisons, la cellule apicale est faiblement allongée et fortement courbée près du bout (Figure 9). Les microconidies sont absentes, les chlamydozoospores sont rares en culture.

Cette description correspond à l'espèce *Fusarium graminearum* selon Tousson et Nelsson,(1976), Zillinsky,(1983) et Leslie et Summerell, (2006).

L'isolat Fus1 donne des colonies de couleur qui vire du blanc vers le rose, le mycélium est aérien abondant et devient rouge au contact de l'agar (Figure 8). Les macroconidies sont épaisses et faiblement arquées, la cellule apicale pointue, et nettement pédicellée à la base. Les conidies comportent en général trois à cinq cloisons (Figure 9). La présence de chlamydospores portées par les macroconidies est également observée, les microconidies sont absentes. Cette description correspond à l'espèce *Fusarium culmorum* selon Tousson et Nelsson, (1976), Zillinsky, (1983) et Leslie et Summerell, (2006).

Les isolats Fus9 et Fus12 caractérisés par un mycélium blanc. Les macroconidies sont abondantes avec 3 à 4 cloisons de forme ovale à cylindrique. Les chlamydospores sont produites en abondance. Cette description correspond à l'espèce *Fusarium redolens* selon Tousson et Nelsson , (1976), Zillinsky ,(1983) et Leslie et Summerell , (2006).

Pour l'isolat Fus11 caractérisé par un mycélium cotonneux sur PDA avec le revers grisâtre. Les macroconidies sont présentes avec 3 à 4 cloison, mais on n'arrive pas à le situer parmi les autres espèces. Pour cela l'identification moléculaire est utilisée pour confirmer l'appartenance d'un isolat à une espèce donnée, et affirmer leur description morphologique.

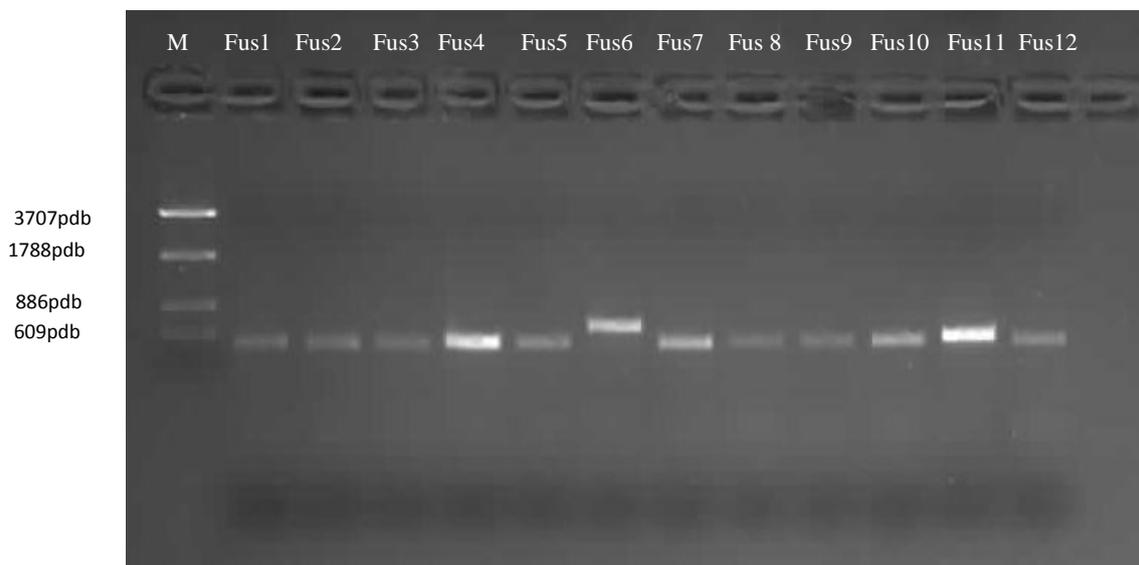


**Figure 9 :** Observation des isolats sous microscope optique (Olympus BX51) x40.  
a- une macroconidie sous microscope x100.

## 2-2- Analyse moléculaire des isolats de *Fusarium sp.*

Sur la base des données obtenues à partir de l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, les amplifications des régions ADNr de nos isolats par les amorces ITS1 et ITS4, ont données des séquences de poids moléculaire inférieur à 609 pdb (Figure 10). Ces séquences correspondent aux séquences ITS I et ITS2 régions complètes ; la partie 5'du gène (18S, 5.8S) et la séquence de l'extrémité 3'du gène (28S).

L'identification de *Fusarium, sp* a été confirmée par les séquences ITS I et ITS2 et les séquences complètes de 5.8S de l'ADN ribosomal amplifié (White *et al.*, 1990).

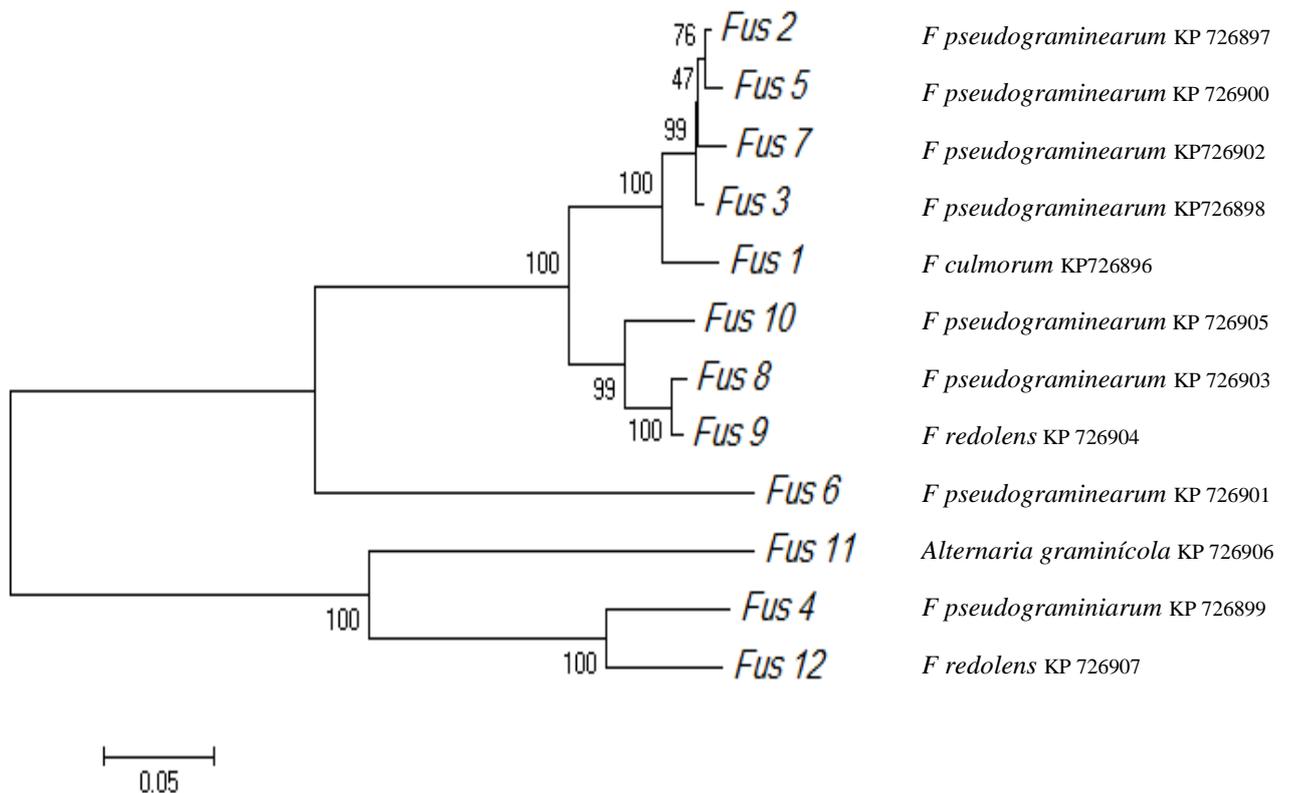


**Figure 10 :** Produit de la PCR des isolats fongiques.

Dans le cadre de la recherche des ressemblances génétiques, les séquences obtenues par le séquençage de nos isolats a été comparée aux séquences de la banque de données (NCBI-GenBank). (Tableau 4). L'analyse des BLAST pour la recherche de l'homologie avec les espèces similaires existant dans les banques de données (GenBank), est utilisée pour la construction de l'arbre phylogénétique par le logiciel Cluster (Figure 11).

**Tableau 4 :** Identification des isolats pathogènes basé sur le séquençage de l'ADN 18s.

Isolats	Taxon	% similarite	Accession number
Fus4	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	99%	KP726899
Fus1	<i>Fusarium culmorum</i>	98%	KP726896
Fus2	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	98%	KP726897
Fus3	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	98%	KP726898
Fus5	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	98%	KP726900
Fus7	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	98%	KP726902
Fus8	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	98%	KP726903
Fus9	<i>Fusarium redolens</i>	98%	KP726904
Fus10	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	98%	KP726905
Fus11	<i>Alternaria graminicola</i>	98%	KP726906
Fus12	<i>Fusarium redolens</i>	98%	KP726907
Fus 6	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	94%	KP726901

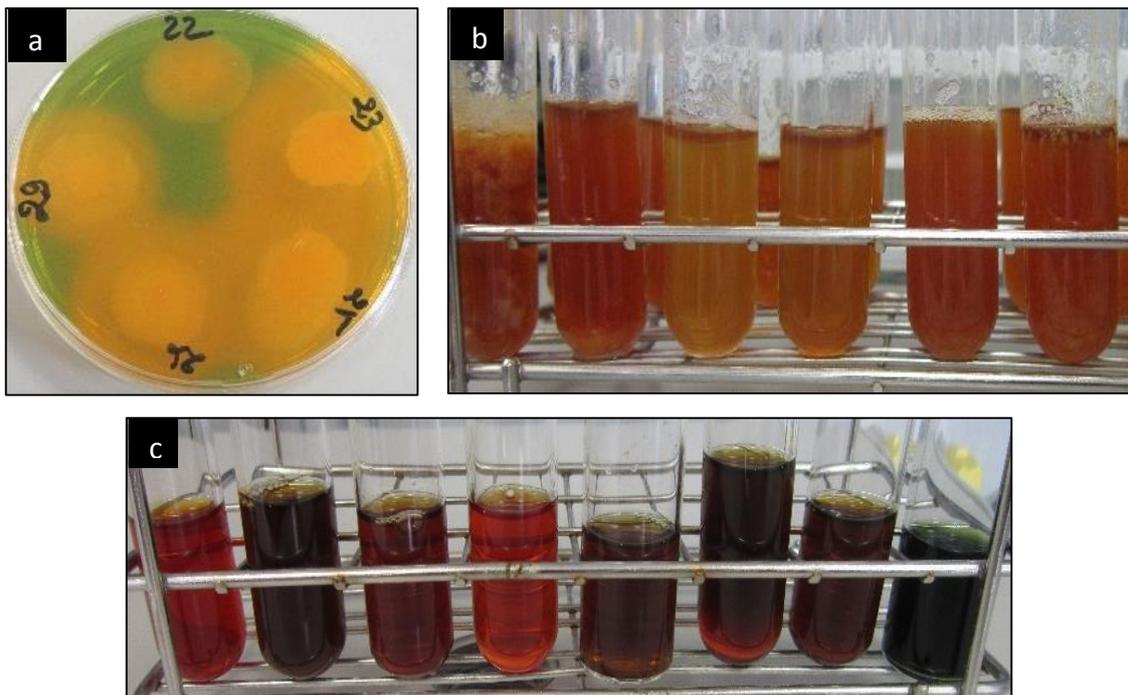


**Figure 11 :** Arbre phylogénétique des *Fusarium. sp.*

### Partie 3 : Mesure des activités promotrices de la croissance végétale

#### 3-1-Production des siderophores :

L'examen de la nature chimique des siderophores a révélé que tous les isolats fluorescents analysés produisent des siderophores de type Hydroxamates selon le test décrit (figure 12b). Les résultats de cette caractérisation sont illustrés dans le tableau 5.



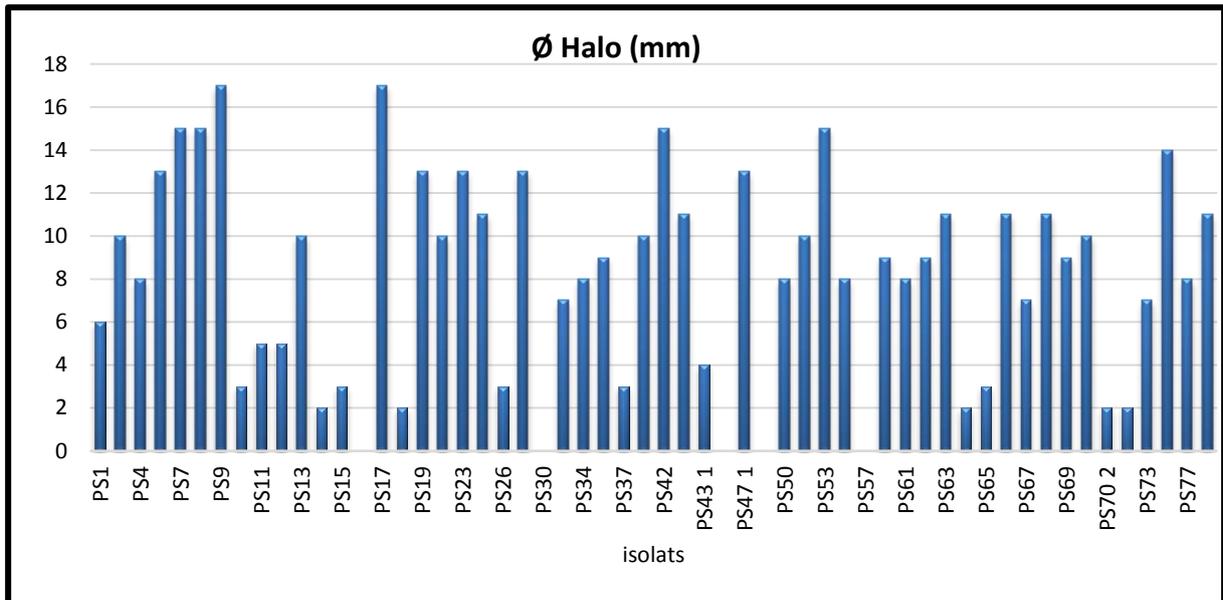
**Figure 12:** Production des siderophore.

**a-**Halo orange autour des colonies, caractéristique de la production de sidérophores sur gélose au CAS, **b-** Résultat positive sur milieu Neiland (1981).**c-** Résultats positive pour la quantification des siderophores.

La production qualitative de sidérophores effectuée sur milieu KB qui est connu par sa composition exempte de fer, permettant ainsi la libération des sidérophores dans le milieu. Les souches déjà sélectionnées sur la base de la synthèse d'un pigment fluorescent diffusible sur le milieu KB, ont montrées un halo orangeâtre net sur le milieu CAS indiquant la production de siderophores (Figure 12a). A l'exception de quatre souches Ps16, Ps30, Ps45, et Ps47<sub>2</sub> qui ne produisent pas d'halo autour des colonies, avec un maximum observé pour les souches Ps9 et Ps17 avec un halo de 17mm de diamètre, suivi par les souches Ps7, Ps8, Ps 42, et Ps53 avec un halo de 15mm (Tableau 5, Figure 13).

**Tableau 5** : Résultats des tests de Neiland, (1981), Arnow, (1937) et le CAS (Schwyn et Neilands, 1987).

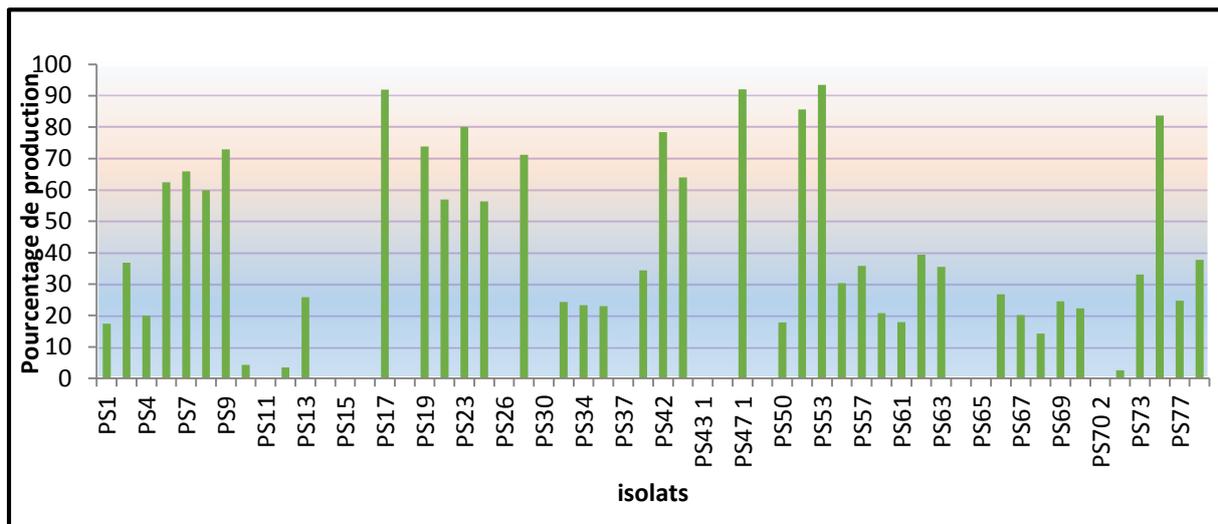
Souches	CAS	Arnow	Neiland	Souches	CAS	Arnow	Neiland
PS1	+	-	+	PS42	+	-	+
PS2	+	-	+	PS43	+	-	+
PS4	+	-	+	PS43 <sub>1</sub>	+	-	+
PS6	+	-	+	PS45	-	-	+
PS7	+	-	+	PS47 <sub>1</sub>	+	-	+
PS8	+	-	+	PS47 <sub>2</sub>	-	-	+
PS9	+	-	+	PS50	+	-	+
PS10	+	-	+	PS52	+	-	+
PS11	+	-	+	PS53	+	-	+
PS12	+	-	+	PS56	+	-	+
PS13	+	-	+	PS57	-	-	+
PS14	+	-	+	PS60	+	-	+
PS15	+	-	+	PS61	+	-	+
PS16	-	-	+	PS62	+	-	+
PS17	+	-	+	PS63	+	-	+
PS18	+	-	+	PS64	+	-	+
PS19	+	-	+	PS65	+	-	+
PS22	+	-	+	PS66	+	-	+
PS23	+	-	+	PS67	+	-	+
PS25	+	-	+	PS68	+	-	+
PS26	+	-	+	PS69	+	-	+
PS29	+	-	+	PS70	+	-	+
PS30	-	-	+	PS70 <sub>2</sub>	+	-	+
PS31	+	-	+	PS71	+	-	+
PS34	+	-	+	PS73	+	-	+
PS35	+	-	+	PS74	+	-	+
PS37	+	-	+	PS77	+	-	+
PS40	+	-	+	PS78	+	-	+



0

**Figure 13** : Diamètre de l’halo orangeâtre autour des colonies.

La quantification et la caractérisation de la production des sidérophores ont été faites avec toutes les souches de *Pseudomonas*. La production maximale des sidérophores a été observée chez la souche Ps53 avec un pourcentage de production de 93.46% (Figure 14), alors qu’elle est absente chez les souches Ps11, 14, 15, 16, 18, 26, 30, 37, 43<sub>1</sub>, 45,47<sub>2</sub>, 64, 65, et Ps70<sub>2</sub> ; qui ont montrés un halo orangeâtes sur milieu CAS solide ( Figure 12a,c).



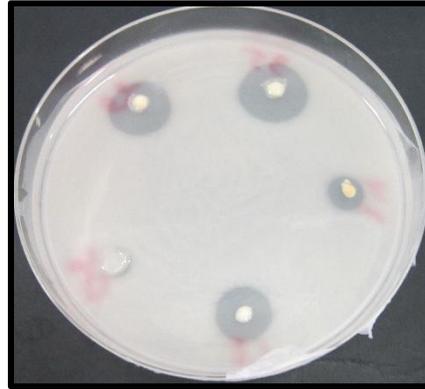
**Figure 14** : Pourcentage de production des siderophore

Les souches de *Pseudomonas* sont connues par leur capacité à produire des sidérophores tels que pyoverdines et pseudobactines qui donne une couleur et une fluorescence jaune-vert sous lumière UV (Sharma et Johri, 2003). Lors de l'examen de la production des sidérophores, tous les isolats étaient capables de produire des sidérophores de type hydroxamates. Un résultat similaire a été obtenu par (Bholay *et al.*, 2012, Mezzache, 2012, Omidvani *et al.*, 2010), qui ont conclu que *Pseudomonas fluorescens* a montré la formation de sidérophore type Hydroxamate.

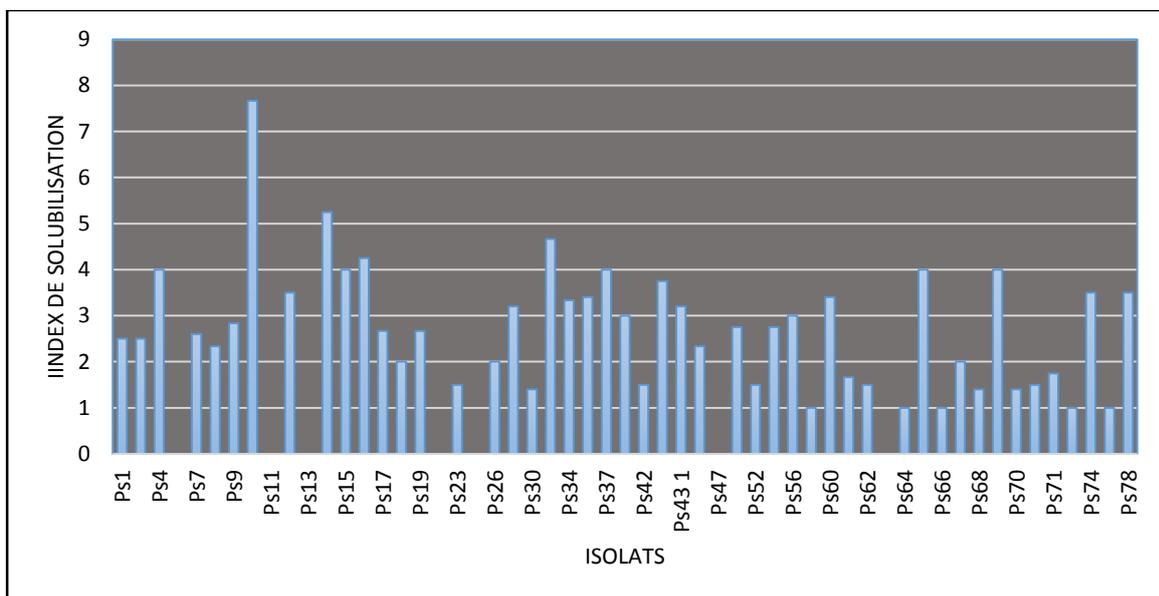
En raison de la forte affinité des sidérophores aux ions ferriques, qui les rend inaccessible aux micro-organismes phytopathogènes autour des racines (Sreedevi *et al.*, 2014, Bagnasco *et al.*, 1998; Bholay *et al.*, 2012; Deshwal, 2012). De plus, ils inhibent la germination des spores de champignons pathogènes (Raajmakers *et al.*, 1995), tels que *Fusarium oxysporium*, *Rhizoctonia solani* et *Phytophthora aphanidermatum* (Sahu et Sindhu, 2011). L'implication dans la promotion de la croissance des plantes de ces composés a été également démontrée sur le blé. Sayyed *et al.*, (2005) ont rapporté une augmentation du taux de germination, de la longueur de la racine et du blé inoculés avec des souches de *Pseudomonas* produisant des sidérophores. Ainsi, ces espèces indigènes pourraient être exploitées dans l'agriculture pour améliorer la croissance et de préserver la santé des plantes.

### **3-2-Solubilisation des phosphates :**

Les 55 souches de *Pseudomonas* fluorescents retenues ont été testées pour leur capacité de solubiliser le phosphate inorganique sur un milieu Pikovskaya solide contenant le phosphate tricalcique  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comme seule source de phosphore. Après 10 jours d'incubation à 28°C, 48 souches ont produit une zone claire autour de la colonie, qui traduit une solubilisation de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Figure 15). 20 souches avec un index de solubilisation dans un intervalle de [3 - 7.66] semblent être les plus efficaces (Figure16). 28 souches solubilisent modérément le phosphate et l'index de solubilisation varie de 1 à 2.83. Le halo est absent chez Ps6, Ps11, Ps14, Ps22, Ps25, Ps47 et Ps63.

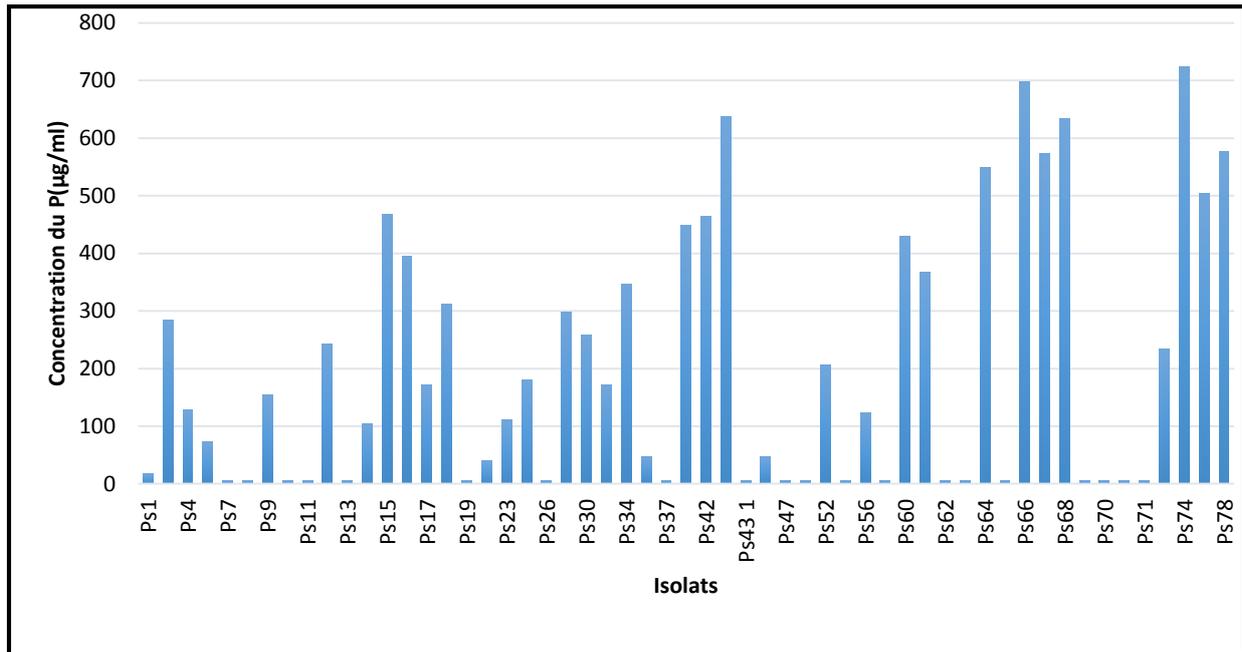


**Figure 15 :** Colonies de *Pseudomonas fluorescens* avec halo de solubilisation



**Figure 16:** Solubilisation du Phosphate par les isolats sur milieu Pikovskaya solide

L'estimation quantitative du phosphate soluble sur milieu Pikovskaya liquide est déterminée après 11 jours d'incubation à 28°C. La quantité de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  solubilisée par les souches varie de 6.54 à 723.3  $\mu\text{g/ml}$ . Bien qu'aucun halo de solubilisation n'ait été observé autour des colonies des souches Ps25, Ps14, et Ps22 sur milieu solide, ces dernières solubilisent le Phosphate à des quantités de 179.72, 104.96, et 40 $\mu\text{g/ml}$  respectivement sur milieu liquide (Figure 17).



**Figure 17 :** Quantité de phosphate solubilisée par les souches de *Pseudomonas* fluorescents sur milieu liquide.

Les résultats confirment clairement la capacité de nos isolats à utiliser  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  disponibles en milieu PKV. Cela reflète la même fonction réalisée par ces espèces dans leur habitat naturel. Effectivement, les rhizobactéries peuvent solubiliser le phosphore organique du sol par l'action de phosphatase ou phosphore inorganique par la libération d'acides organiques avec un faible poids moléculaire (Klopper *et al.*, 1989), tels que l'acide citrique (Reys *et al.*, 2001) et de l'acide gluconique (Fenice *et al.*, 2000).

Arif *et al.*, (2015) ont montré que *P. fluorescens* RB13 solubilise une quantité importante (187,9 µg / ml), cependant, malgré l'absence d'halo de solubilisation sur milieu solide, *P. aeruginosa* EH4 a montré une activité importante (168.45µg / ml), statistiquement équivalent à celle de *P. aeruginosa* RB5 (169,86 ng / ml). Les résultats de Schoebitz *et al.*, (2013) sur les *P. fluorescens* isolé à partir de la rhizosphère du blé montrent leur capacité à solubilisé les phosphates dans la gamme de 89-93 µg / ml.

Malgré l'absence d'un halo autour des colonies Ps25, pourrait solubiliser efficacement le phosphore en milieu liquide (183,3 µg/ ml). Ce résultat confirme les résultats de Arif *et al.*, (2015), qui montre que *P. fluorescens* RB13 solubilise le phosphore a des quantités significatives en milieu liquide (187.9 µg / ml), malgré l'absence d'halo du solubilisation sur milieu solide, *P. aeruginosa* EH4 est capable de solubiliser le phosphore en milieu liquide a des quantités de 168.45µg/ml.

En fait, les acides organiques sécrétés pour solubiliser les phosphates circulent avec difficulté sur un milieu solide. Il est évident d'après les tests *in vitro*, que la solubilisation du phosphore inorganique et l'activité de la phosphatase (minéralisation) peuvent coexister dans les mêmes bactéries. Tao *et al.*, (2008) ont déjà rapportés cette coexistence des deux capacités en une seule bactérie. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Vakalounakis et Fragkiadakis, (1999).

### **3-3-Production d'ammonium :**

Après l'addition du réactif de Nessler sur les suspensions bactériennes, un précipité jaune- marron a été formé pour tous les isolats indiquant la production d'ammonium (Figure 18 et annexe 4).



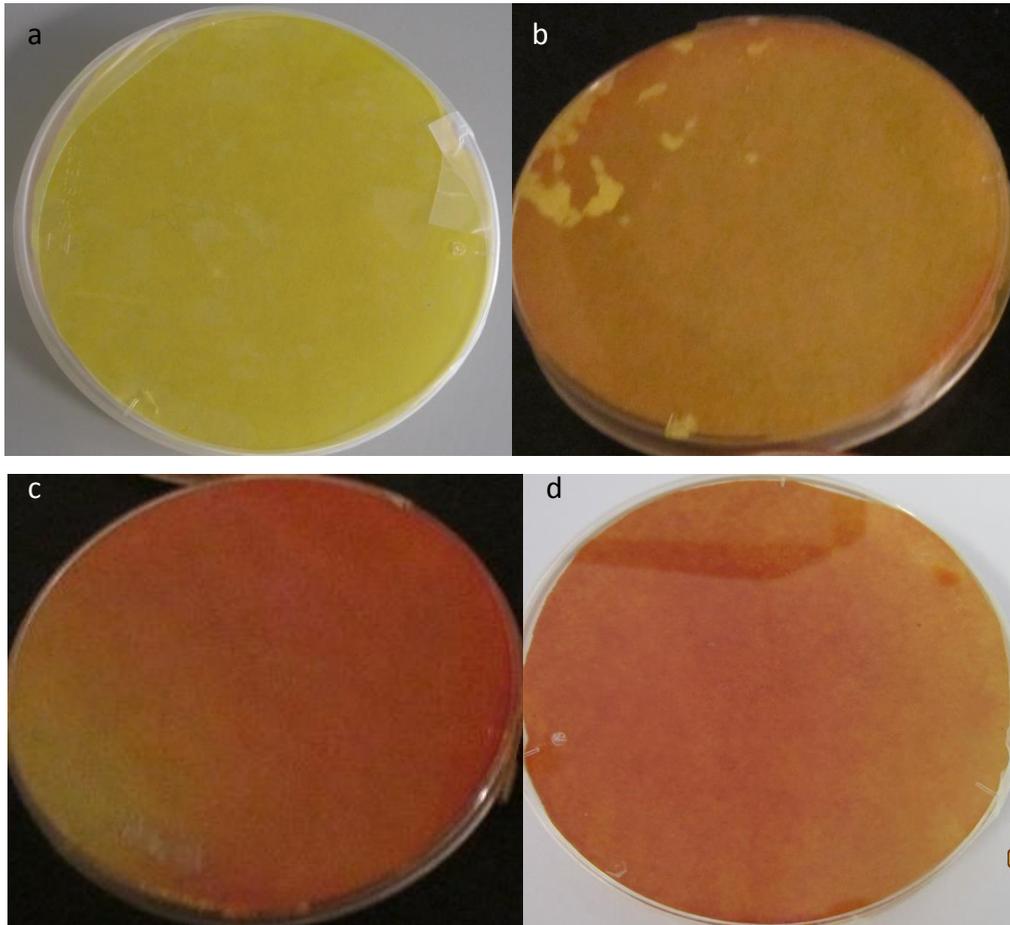
**Figure 18 :** Production d' $\text{NH}_3$

La production d'ammoniac est considéré comme un élément important des rhizobactéries en améliorant indirectement la croissance des plantes (Joseph *et al.*, 2007) et en assurant un rôle dans la signalisation lors de l'interaction plante-rhizobactéries (Becker *et al.*, 2002). Il est bien établi que l'ammoniac libéré par les bactéries accélère l'activité de la glutamine synthétase (Sood *et al.*, 2002).

### **3-4-Production d'HCN :**

Production de l'HCN a été révélé par la formation de couleur rouge sur papier filtre imprégné d'acide picrique. La production du HCN était exprimé chez 11 % des isolats testés,

avec une production intense chez observé avec les souches PS18, PS26 et PS 65 (Figure 19, et annexe 4).



**Figure 19** : Production du HCN sur milieu à la glycine.

a- Temoin, b- production faible, c,d- forte production.

La variabilité de l'expression des gènes (*hcnA*, *hcnB* et *hcnC*) expliquerait la différence dans la production de HCN entre les souches de *Pseudomonas* testées (Ramette *et al.*, 2003). Cette variabilité permet la classification des bactéries en deux groupes : les producteurs faibles et les producteurs forts (Figure 19b, c et d). L'enzyme synthétase HCN est une flavoprotéine de la membrane qui catalyse la formation de HCN et CO<sub>2</sub> de la glycine (Ramette *et al.*, 2003). La production de HCN par *Pseudomonas* est impliqué dans la suppression de divers agents pathogènes, en particulier des champignons (Verma *et al.*, 1989). Ce composé volatil agit directement sur les cellules en bloquant la cytochrome C oxydase dans la chaîne respiratoire. Elle contribue également à la capture de certains ions métalliques en formant des complexes avec eux (Blumer et Haas, 2000) et peut agir comme un inducteur de résistance végétale (Kumar *et al.*, 2012).

### 3-5-Production d'AIA :

Selon les données obtenues sur la capacité de production de l'AIA testée sur milieu KB additionné de tryptophane (1g/l), 53 isolats synthétisent l'AIA, révélé par le développement d'une couleur rose après l'addition du réactif du Salkowski, à des taux très variés (Figure 20). Ces variations s'étendent de 0,92 µg/ml (Ps43) à 28,87µg/ml (Ps6). Les deux isolats Ps11, et Ps47<sub>2</sub>, ne montrent aucune production d'AIA (Figure 21). Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux de (Brik *et al.*, 1991), qui ont montré la présence de l'AIA chez les *Pseudomonas*.

L'AIA est une phytohormone connue pour être impliquée dans l'élongation de la racine, la division cellulaire et l'élargissement de la cellule (Salisbury, 1994). Cette Hormone est très couramment produite par PGPR (Barazani et Friedman, 1999).

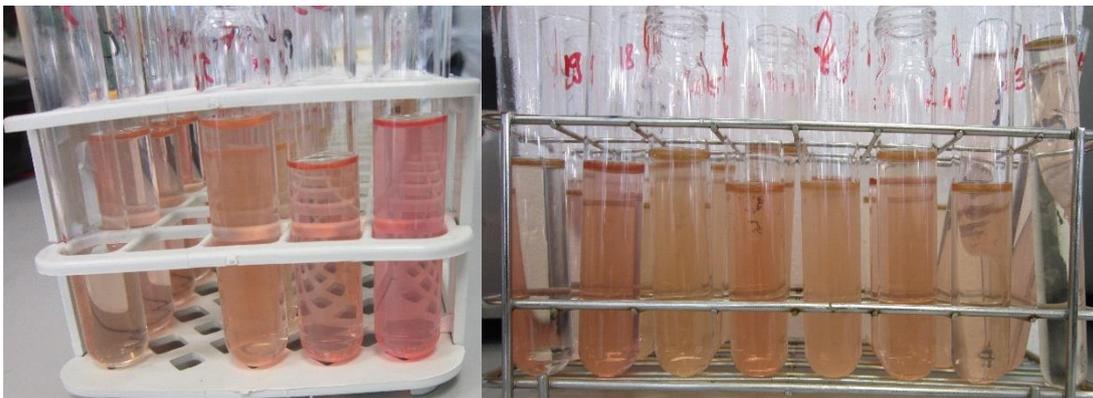


Figure 20 : Production qualitative d'Acide indole acétique

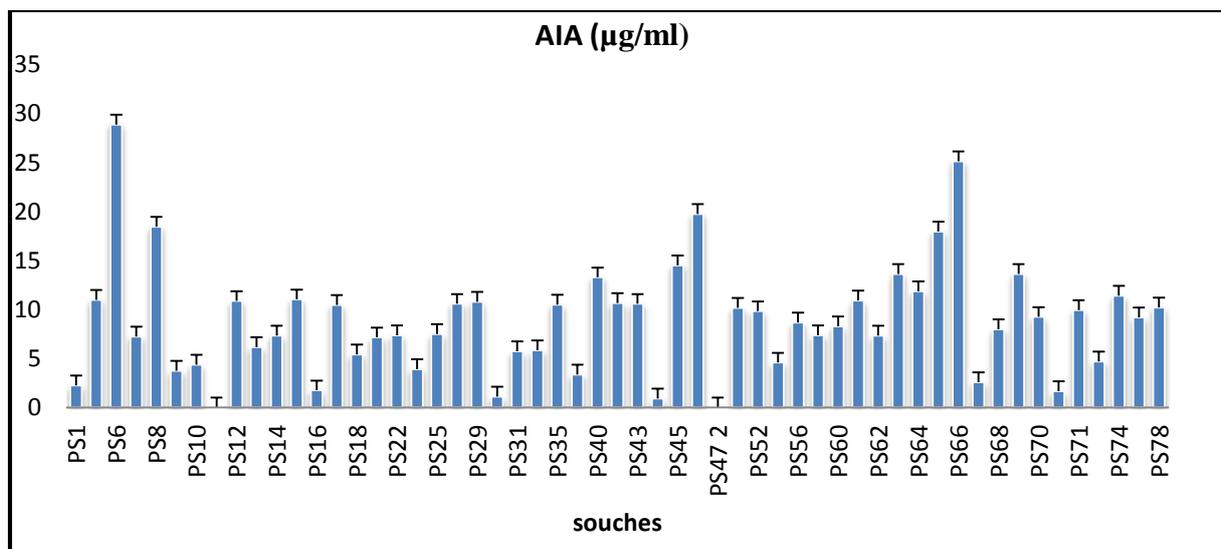


Figure 21 : Production quantitative d'acide indole acétique.

### 3-6-Production d'enzymes impliqués dans la suppression :

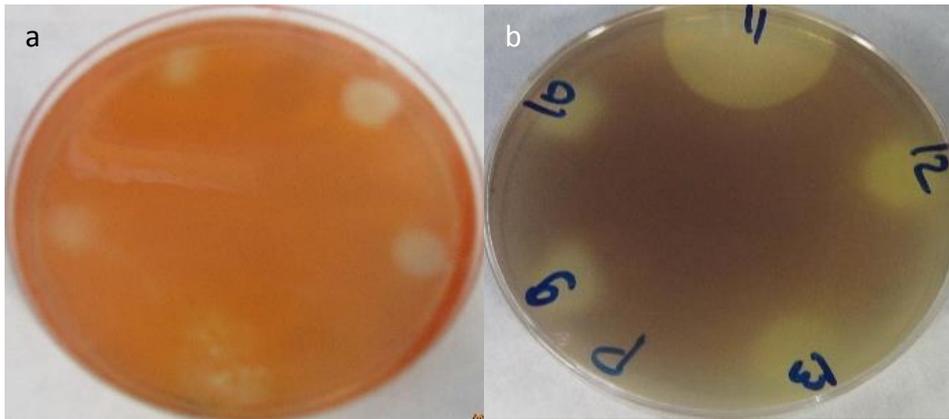
La catalase a été produite par tous les isolats testés dans cette étude (Figure 22). La catalase est une enzyme commune dans presque tous les organismes vivants exposé à l'oxygène ; elle catalyse la décomposition de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. La présence de catalase chez les micro-organismes est utile dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives à l'oxygène (ROS). Ainsi, des souches présentant une activité catalasique doivent être hautement résistantes au stress mécanique et chimique de l'environnement.



**Figure 22 :** Production de la catalase

Les isolats sur milieu à la CMC montrent des zones de dégagement clair autour des colonies montrant la production de cellulase (Figure 23a). La production de Cellulase a été démontrée chez tous les isolats. Des résultats similaires ont été trouvés avec Sweta Kachhap *et al.*, 2015 qui montrent que la production maximale a été affichée chez *Pseudomonas spp* avec (85%) suivie par *Acetobacter spp.* (75%), *Azotobacter spp.* (61,5%) et *Enterobacter spp.* (41,2%) (annexe 4).

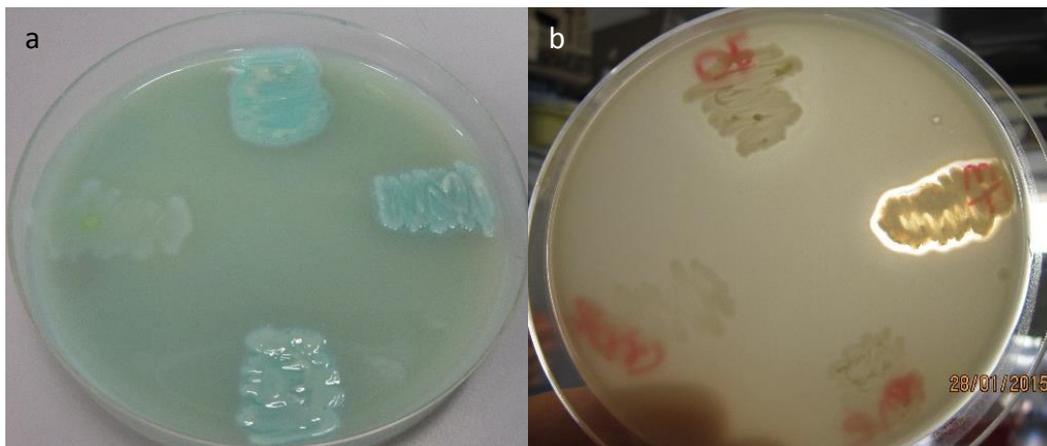
Cependant, sur milieu à la pectine, tous les isolats montrent leur capacité à produire la pectinase qui a été révélée par des zones de dégagement clair autour des colonies (Figure 12b).



**Figure 23:** Production des enzymes hydrolitiques.

a- la cellulase, b- pectinase.

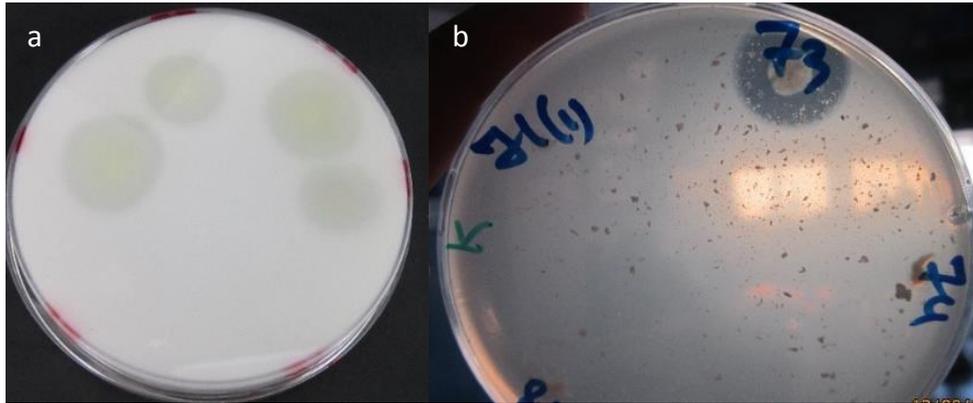
Pour ce qui concerne les deux activités la production de la lipase et la lécithinase, effectuées sur le même milieu de culture au jaune d'œuf, nos isolats montrent des résultats positifs avec 27 souches pour la lipase et 28 souches pour la lécithinase.



**Figure 24 :** Production des enzymes lipolitiques.-Production de la lipase, b-la Lécithinase

Nous avons noté l'absence de la production de l'Amylase pour tous les isolats, sauf la souche Ps11 qui montre un halo de dégagement claire autour de la colonie.

Un total de 28 isolats présentant une activité protéasique révélée par l'apparition des zones claire autour des colonies (Figure 25 a).



**Figure 25** : a-Production de la protéase, b- production de la chitinase.

La production de la chitinase a été révélée uniquement chez 9 isolats testés avec l'apparition d'un halo claire autour des colonies avec un diamètre de 15 à 25 mm (Figure 25 b).

Dans le présent travail, les isolats de *Pseudomonas* présentent une différence dans leur capacité à produire des enzymes comme la cellulase, la pectinase, la lipase la protéase et la chitinase (annexe 4). Ils peuvent être utilisés comme agent de lutte biologique, qui sont des mécanismes d'action indirects de PGPR impliquant l'élimination des micro-organismes nuisibles via la production d'antibiotiques ou/et d'enzymes lytiques (protéases, amylase), HCN ou catalase (Twisha et Desai, 2014).

*Pseudomonas fluorescens* a la capacité de produire deux mécanismes important d'inhibition, la cellulase qui dégrade la paroi cellulaire fongique, et la pectinase qui est connu pour catalyser la substance pectique par la réaction de dépolymérisation. Ces enzymes ont un rôle dans la prévention de l'infection de la plante provoquée par des agents pathogènes (Reetha *et al.*, 2014). La production de divers enzymes hydrolytiques pourrait jouer un rôle important dans la fertilité des sols. Ils hydrolysent les polysaccharides complexes et des protéines en une forme plus simple, et en les ajoutant à nouveau au sol, améliorent la fertilité des sols (Pidwirny, 2006). Dunne *et al.*, (1997) ont démontré que la lutte biologique contre *Pythium ultimum* dans la rhizosphère de la betterave à sucre est due à la production de protéase extracellulaire par des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* W81. La souche PUP6 des *Pseudomonas* produirait des protéases ayant une activité CWDE (Cell wall degrading enzymes) (Naik et Sakyhivel, 2006). *Pseudomonas fluorescens* CHA0 synthétise une protéase extracellulaire active contre le nématode phytopathogène *Meloidogyne incognita* (Siddiqui *et al*, 2005).

Les souches bactériennes possédant une catalase sont supposés être très résistant aux diverses contraintes environnementales, mécanique et chimique (Kumar *et al.*, 2012).

Le parasitisme et/ou la lyse des champignons par les bactéries de la rhizosphère est facilitée par la production d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les parois des cellules fongiques. Les chitinases, sont des enzymes hydrolytiques d'importance majeure, puisque la chitine (polymère linéaire de  $\beta$ -(1,4)- N-acétylglucosamine) est le constituant des parois cellulaires des champignons phytopathogènes (Kishore *et al.*, 2005).

Une activité antifongique a été rapportée pour l'activité chitinolytique de *Pseudomonas* spp. souche PUP6 (Naik et Sakthivel, 2006), et des souches de *Pseudomonas* spp. (Verma *et al.*, 2007), et les chitinases purifiées de *Bacillus subtilis* AF1 (Manjula *et al.*, 2004), *Serratia marcescens* (Kishore *et al.*, 2005), *Serratia plymuthica* (Frankowski *et al.*, 2001) sont hautement antifongiques.

### **3-7-Activité antagoniste in vitro :**

Le pouvoir antagoniste des isolats de *Pseudomonas* a été testé sur milieu PDA envers deux isolats cryptogamiques du blé, Fus1 : *Fusarium culmorum* et Fus7 : *Fusarium pseudograminearum* a fourni les résultats suivants :

Un totale de 38 souches de *Pseudomonas fluorescens* ont inhibé la croissance de Fus1, avec un maximum d'index d'inhibition marqué pour la souche Ps4 qui atteint 39.22%. Alors que, 48 souches bactériennes ont pu inhiber la croissance de Fus7, et le maximum d'index observé chez Ps34 suivit par PS15 et Ps11, dont l'index est 45.33%, 43.11% et 41.78% respectivement. (Figure 26).

Nous avons remarqué la présence de deux types de zones d'inhibition. Ainsi, ces zones peuvent présenter un aspect net et bien défini ou alors mal délimité et progressif (Figure 27c, et b). Cette différence peut être expliquée par la production, par les antagonistes, de molécules différentes dans le milieu et ayant des modes d'action différents vis-à-vis du pathogène. Ce test d'inhibition a montré que le Fus 7 est le plus sensible à l'action des bactéries antagonistes.

Les *Pseudomonas* antagonistes sont en effet connues pour être productrices d'une panoplie de molécules inhibitrices tel que les siderophore, l'H<sub>2</sub>CN et la protéase, qui leur confèrent leurs caractères d'agents potentiels de contrôle biologique de plusieurs phytopathogènes et agents délétères des cultures. Cette production des molécules inhibitrices impliquées dans l'antibiose *in vitro* constitue le premier critère ciblé dans un travail de

recherche et de screening des rhizobactéries agents potentiels du contrôle biologique de divers pathogènes (Amkraz, 2013).

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 (Haas et Défago, 2005).

L'activité antifongique de nos souches de *Pseudomonas fluorescens* contre les deux isolats de *Fusarium* pourrait être fortement liée aux substances inhibitrices telles que les sidérophores, du HCN et de la protéase produite. La production des sidérophores par les souches de *Pseudomonas* testées accentue la carence en fer dans le voisinage des colonies de bactéries, ce qui entraîne l'inhibition de la croissance mycélienne. Yuan *et al.*, (2012) ont noté que les composés volatils produits par les bactéries a réduit la croissance du mycélium et inhibé la germination des spores de *F. oxysporum*. Les souches bactériennes ont montré une forte activité contre ce champignon, bien que Notz *et al.*, (2002) ont rapporté que l'acide fusarique modifie le gène responsable de la synthèse de la 2, 4-diacétylphloroglucinol (DAPG) de *P. fluorescens* CHA0, in vitro et dans la rhizosphère du blé. L'effet antagoniste peut être dû à la synthèse d'autres antibiotiques tels que la phénazine carboxylique, la pyrrolnitrine et pyolutéorine (Haas et Defago, 2005). La variabilité dans l'inhibition observée entre les souches, peut être expliquée par la quantité et l'efficacité de l'antibiotique produit.

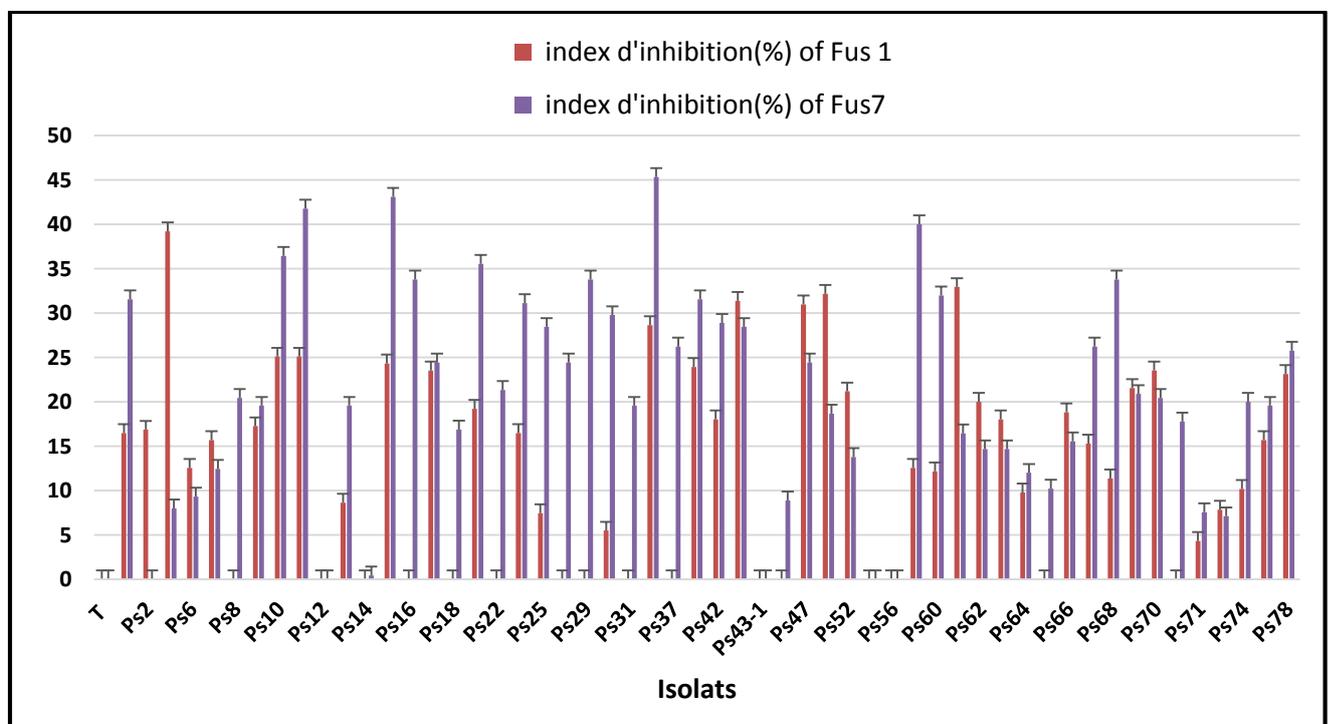
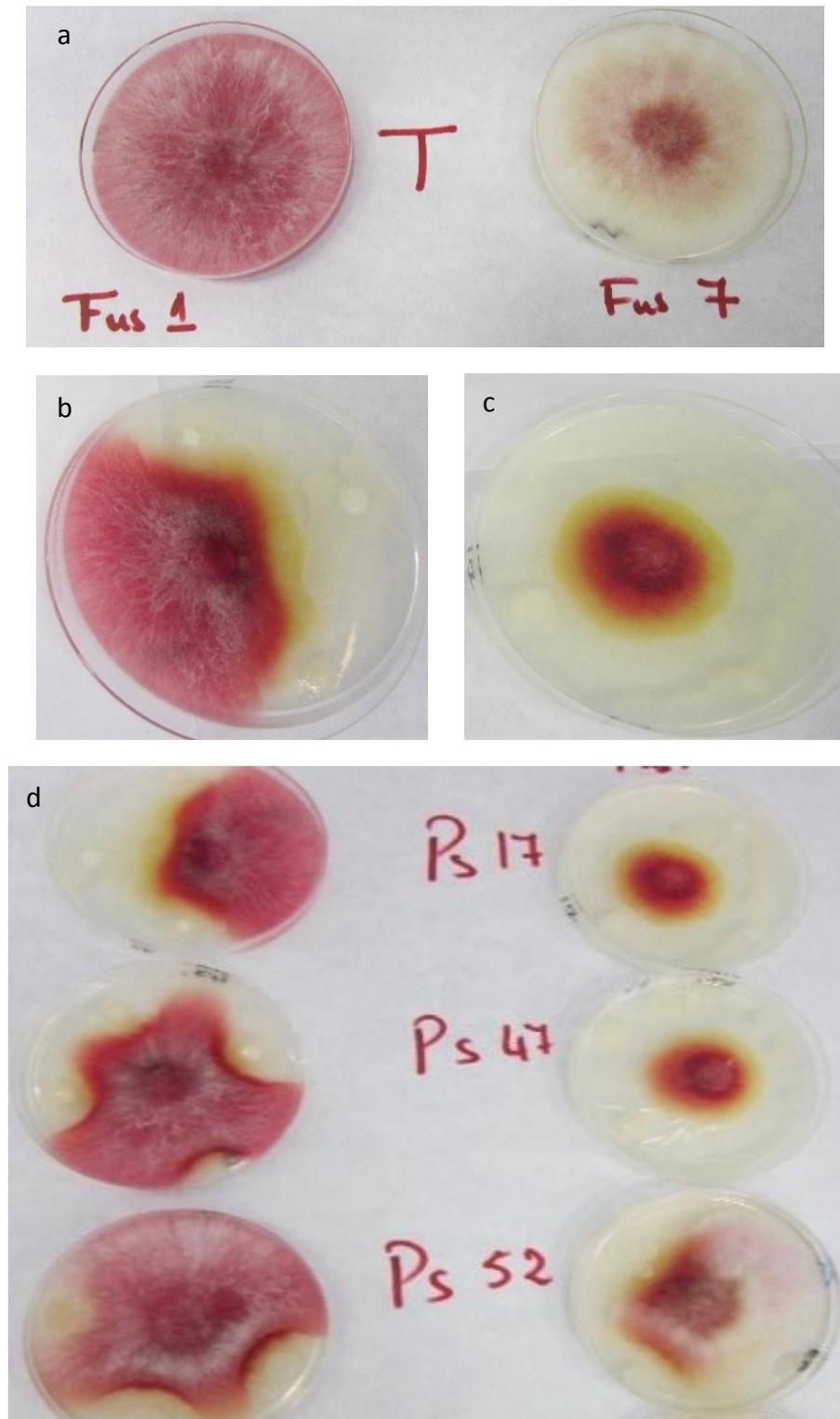


Figure 26 : Index d'inhibition des isolats *Pseudomonas* contre deux agents pathogènes



**Figure 27:** Activité antifongique.

a- Les deux agents pathogènes témoins en culture sur PDA, b- action antagoniste de quelques souches de *Pseudomonas*, c- inhibition avec zone délimitée, d- inhibition avec zone diffuse .

**Partie 4 : Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance du blé et l'inhibition du *Fusarium culmorum* et *Fusarium pseudograminearum*.**

L'inoculation de plants de blé avec des isolats de *Pseudomonas fluorescens*, suivie par une infestation par des souches fongiques, a généré une faible attaque d'agents pathogènes. Cependant, le pourcentage de plants inoculés uniquement par *F.culmorum* ayant un score de symptômes  $\geq 2$  a été observée sur 90% de plantes par rapport à ceux inoculés avec *F.pseudograminearum* uniquement ; le pourcentage observé était de 70%. Lorsque les cultures bactériennes ont été appliquées au sol, elles ont amélioré différemment l'attaque de la plante contre l'agent pathogène (*F. culmorum* ou *F. pseudograminearum*) (Tableau 6).

**Tableau 6.** Effet antagoniste des souches de *Pseudomonas fluorescens* contre *F.culmorum* et *F.pseudograminearum*.

Traitements	Indice de Mortalité	
	Avec <i>F.culmorum</i>	Avec <i>F.pseudograminearum</i>
<b>Control</b>	2,3 (90)	1,9 (70)
<b>Avec Ps 7</b>	1,5 (50)	0,3 (00)
<b>Avec Ps 8</b>	0,2 (10)	0,5 (20)
<b>Avec Ps 12</b>	0,5 (00)	0,2 (00)
<b>Avec Ps 14</b>	0,9 (20)	0,4 (00)
<b>Avec Ps 17</b>	1,3 (30)	0,9 (10)
<b>Avec Ps 47</b>	1 (30)	0,4 (10)
<b>Avec Ps 52</b>	1,2 (20)	0,4 (00)
<b>Avec Ps 53</b>	0,2 (00)	0,5 (20)
<b>Avec Ps 65</b>	0,9 (00)	0,3 (00)
<b>Avec Ps 66</b>	0,9 (20)	0,4 (10)
<b>Avec Ps 68</b>	0,7 (30)	0,4 (00)

**NB:** les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage des plants qui ont eu une notation des symptômes  $\geq 2$ .

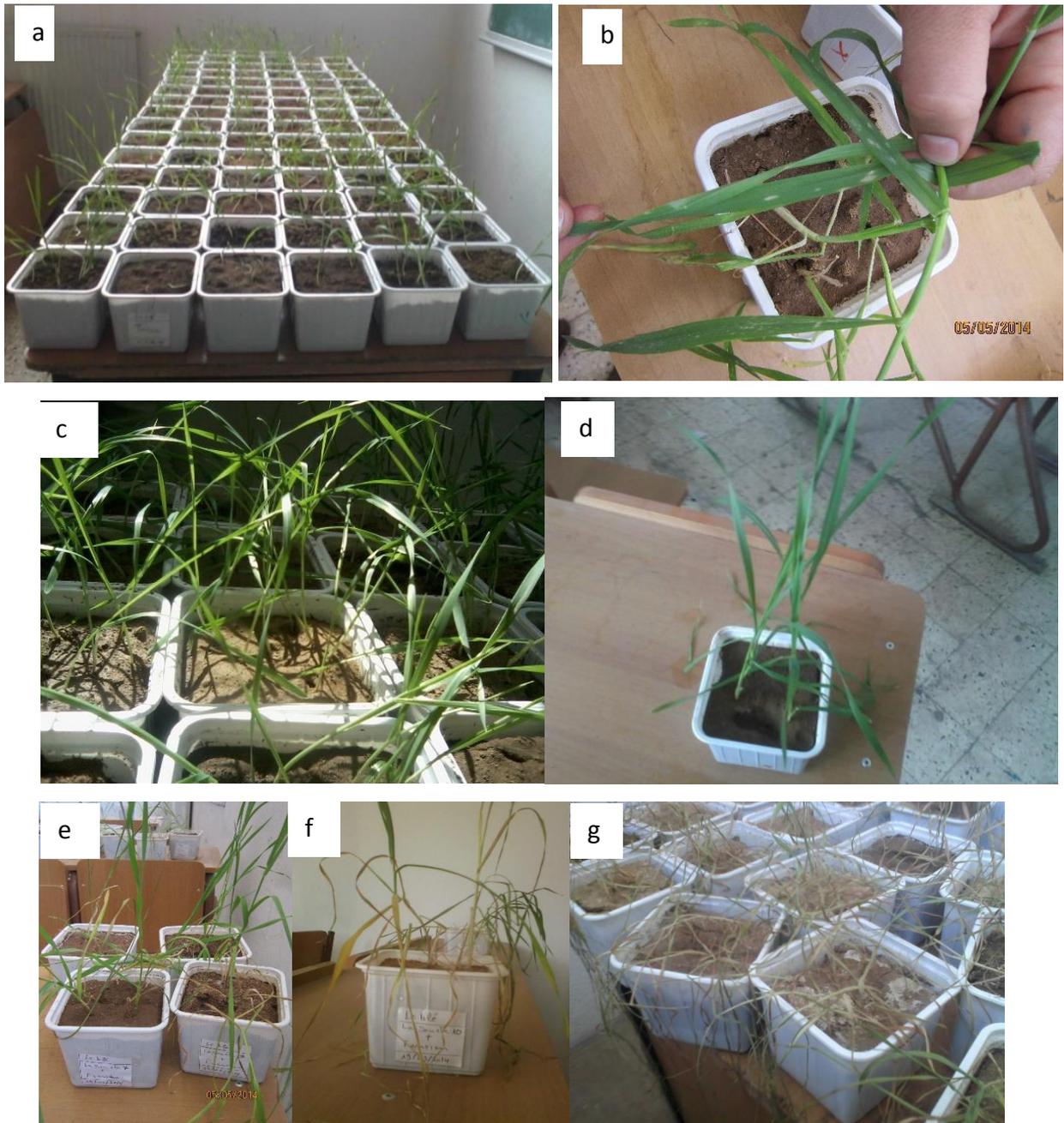
La symptomatologie observée après deux semaines de l'inoculation du pathogène, a montré que les plants infestés par *Fusarium .sp* avaient développé des nécroses foliaires en

plus du flétrissement (Figure 28b). L'évolution du taux d'infection a été très rapide chez les plantes non bactérisés (témoin inoculé avec le champignon), tandis que pour les plantes bactérisés avec les isolats de *Pseudomonas*, les taux d'infection sont moindres.

L'évolution de la maladie a été ensuite rapide pour les plantes bactérisés avec Ps7, Ps17, et Ps52, pour atteindre un niveau de symptomatologie de l'ordre de 2 au bout de la troisième semaine (Figure 28e et f) ; de même que pour le témoin positif. Par contre, pour les plants bactérisés avec les isolats Ps8, Ps53, et Ps65, une stabilité des symptômes a été observée à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine (Figure 28c). La bactérisation des plants a induit une bio protection des plants *in situ*, révélatrice d'un pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de *Fusarium* sp. Ces résultats concordent avec ceux du Mezzache, (2012).

L'induction de la stimulation de la croissance, par bactérisation des graines après germination et plantation, a été plus marquante en comparaison avec le témoin non traité. En effet, les plantes ont mieux poussées, où l'on a remarqué que la stimulation la plus élevée est obtenue avec l'isolat Ps12 suivi de près par les isolats Ps8, Ps14, Ps47, Ps17, Ps53, Ps66, et Ps 68. Cependant l'isolat Ps52 a montré une croissance moindre que celle marqué par le témoin. (Tableau 7) .

Les souches bactériennes sélectionnées ont améliorées de manière significative tous les paramètres de croissance par rapport au témoin (tableau 7, Figure 28). A 30 jours, la hauteur des plantes dans tous les traitements était meilleur et plus grande que les non inoculés, sauf un traitement avec la souche Ps 52 ; qui était plus petite que le contrôle. Les mêmes plantes traitées ont montré une variation dans le poids frais et sec par rapport au témoin. Comme on pouvait s'y attendre, la réduction de la maladie par des traitements PGPR est accompagnée d'une augmentation de la croissance des plantes. Cependant, les mesures de croissance réalisées sur les plantes du témoin ont indiqué également dans ce test que les souches de *Pseudomonas* testé, ont la capacité de promouvoir la croissance du blé en fournissant un meilleur flux de nutriments à la plante hôte qui a entraîné l'augmentation de la biomasse végétale.



**Figure 28** : Effet de la bactérisation sur la croissance des plantes, après 3 semaines d'infection.

a : Test s'antagonisme, b : Bonne stimulation de la croissance, c : Témoin négatif, d : Nécroses foliaires après 30 jours d'inoculation, e : Symptomologie du niveau 1, f : Symptomologie du niveau 2, g : Mort des plantes.

**Tableau 7.** Effet d'inoculation par les bactéries sur la croissance du Blé.

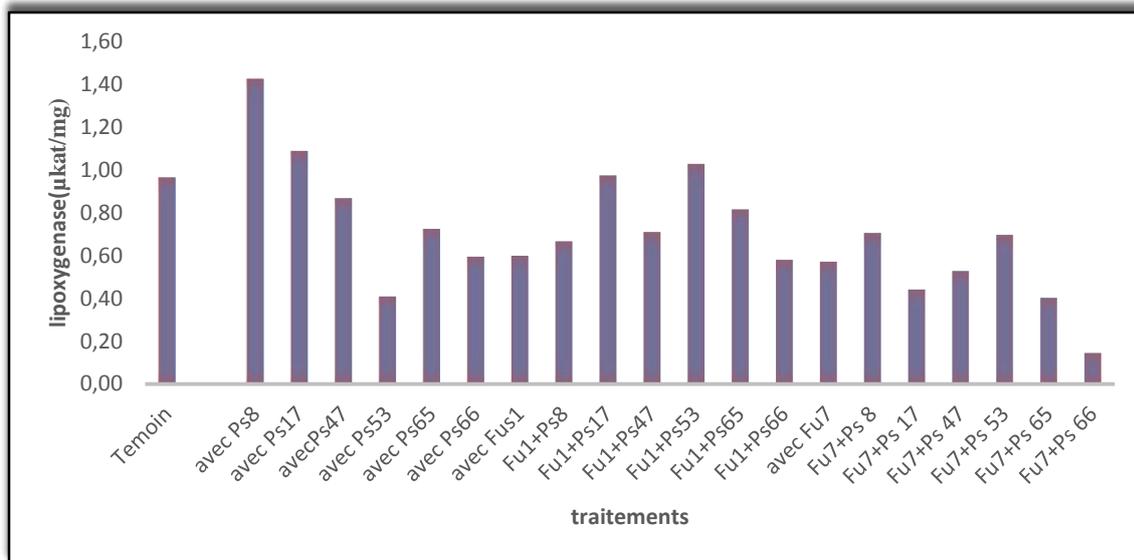
Traitements	Moyenne de la longueur (mm)		Moyenne du poids frais (cg)		Moyenne du poids sec (mg)	
	Tige	Racine	Tige	Racine	Tige	Racine
Control	28,8±0,78 <sup>c</sup>	31±2 <sup>c</sup>	31,1±0,73 <sup>d</sup>	14±0,81 <sup>g</sup>	29,6±0,69 <sup>e</sup>	29,8 ±0,42 <sup>d</sup>
Ps 7	28,60±0,51 <sup>d</sup>	28,1±0,73 <sup>e</sup>	23,6±0,69 <sup>g</sup>	23,5±0,52 <sup>a</sup>	19,7±0,48 <sup>i</sup>	29,4±0,84 <sup>d</sup>
Ps8	32,6±1,17 <sup>b</sup>	33,4±0,51 <sup>b</sup>	41,2±0,78 <sup>a</sup>	19,5±0,67 <sup>d</sup>	39,6±0,51 <sup>b</sup>	29,6±0,69 <sup>d</sup>
Ps12	33,7±1,15 <sup>a</sup>	23,1±0,87 <sup>g</sup>	32,8±0,78 <sup>c</sup>	18,7±0,67 <sup>e</sup>	29,8±0,42 <sup>e</sup>	32,3±1,49 <sup>c</sup>
Ps14	32,3±0,48 <sup>b</sup>	26,6±0,51 <sup>f</sup>	17±0,66 <sup>h</sup>	11,8±0,63 <sup>h</sup>	29,6±0,69 <sup>e</sup>	27,6±1,26 <sup>ef</sup>
Ps 17	29,6±0,51 <sup>c</sup>	22,4±0,51 <sup>g</sup>	24,9±0,73 <sup>f</sup>	10,6±0,51 <sup>i</sup>	29,1±0,87 <sup>ef</sup>	27,4±1,07 <sup>f</sup>
Ps47	32,9±0,87 <sup>b</sup>	26,9±0,87 <sup>f</sup>	36,5±2,71 <sup>b</sup>	20,9±0,87 <sup>c</sup>	32,3±0,67 <sup>d</sup>	28,4±0,84 <sup>e</sup>
Ps52	25,8±1,03 <sup>e</sup>	15,8±1,03 <sup>i</sup>	24,9±0,73 <sup>f</sup>	11,1±0,7 <sup>hi</sup>	22,7±0,48 <sup>h</sup>	16,6±0,51 <sup>h</sup>
Ps53	29,5±0,52 <sup>c</sup>	28±0,81 <sup>e</sup>	36,7±1,01 <sup>b</sup>	14,5±0,52 <sup>fg</sup>	41,7±1,49 <sup>a</sup>	41,9±0,99 <sup>a</sup>
Ps65	28,9±0,87 <sup>c</sup>	18,7±0,82 <sup>h</sup>	23,2±0,78 <sup>g</sup>	15±0,94 <sup>f</sup>	28,5±1,08 <sup>f</sup>	24,8±0,78 <sup>g</sup>
Ps66	29,8±0,91 <sup>c</sup>	34,8±1,03 <sup>a</sup>	29,3±0,94 <sup>e</sup>	21,8±1,68 <sup>b</sup>	26,6±0,84 <sup>g</sup>	34,4±1,57 <sup>b</sup>
Ps68	29,5±0,52 <sup>c</sup>	29,4±0,69 <sup>d</sup>	31,9±0,87 <sup>cd</sup>	19,5±0,52 <sup>d</sup>	35,1±1,37 <sup>c</sup>	32±0,94 <sup>c</sup>
PPDS	0,729	0,843	0,999	0,721	0,772	0,900

NT: Control, les resultats presentent la moyenne des donnees ± PPDS. Les differents lettres indiquent les resultat statistique evaluatee par PPDS.

### Partie 5 : Etude du mécanisme de résistance du blé

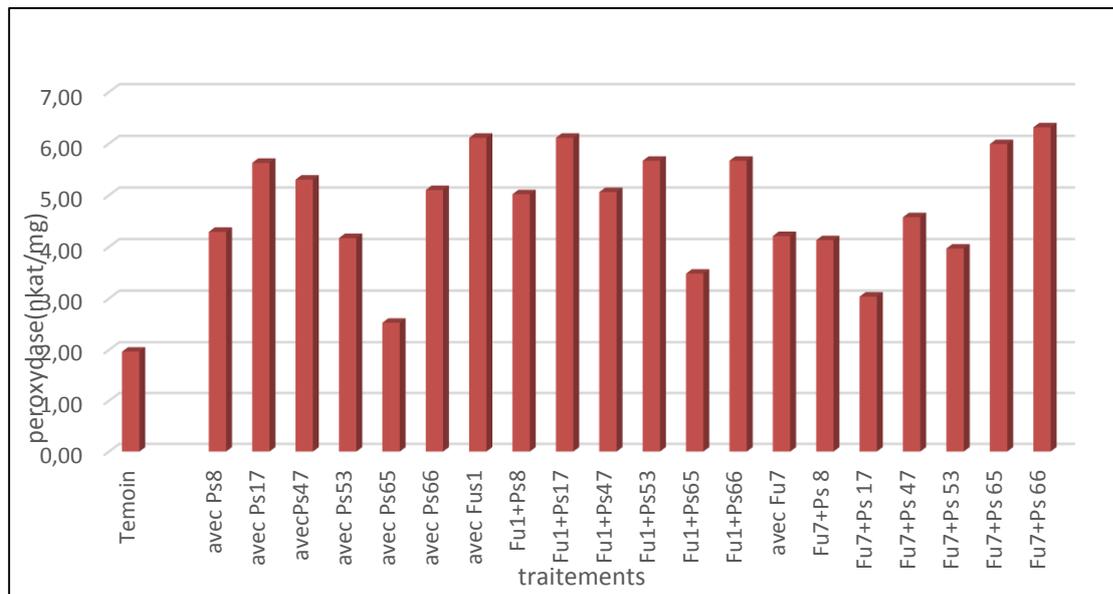
Dans le but d'étudier la possibilité d'induction de résistance au blé par les souches de *Pseudomonas fluorescens*, des échantillons des plantes témoins et traités par les souches ont été analysés avant et après 96 heures de l'infection par les deux isolats de *Fusarium*. Cette induction est déduite par une analyse biochimique des activités enzymatique à savoir : la Lipoxygénase, la peroxydase, la chitinase, la glucanase, et la phenyl-alanine- amonialyase.

- Nos isolats n'ont pas stimulés la voie de la Lipoxygénase, du fait qu'une baisse quantité excréte a été signalé par les plantes seulement bactérisés (à l'exception de celles inoculer par Ps8 et Ps17, qui montrent une activité remarquable en comparant avec le témoin négatif). Cependant, tous les traitements après l'infection par Fus1, montrent une activité supérieur à celle marqué chez le témoin positif (traité uniquement par Fus1), et le même résultat a été observé uniquement avec les traitements Ps8 et Ps53 après infection par Fus7 (Figure 29).



**Figure 29 : Production de la lipoxygénase**

-Une bonne stimulation de la voie de peroxydase a été signalée, avec des valeurs supérieures observées chez toutes les plantes traitées avant et après infection par les deux agents phytopathogènes (on comparant avec le témoin négatif) (Figure 30).



**Figure 30 : Stimulation de la voie de Peroxydase.**

-Un autre résultat positif pour la stimulation de la résistance chez les plantes a été remarqué via la production de l'enzyme glucanase, du fait que, la quantité produite par tous les traitements avant et après infection avec les deux champignons, été forte que celle enregistré par le témoin négatif, avec une bonne stimulation marqué pour le traitement Ps17 (Figure 31).

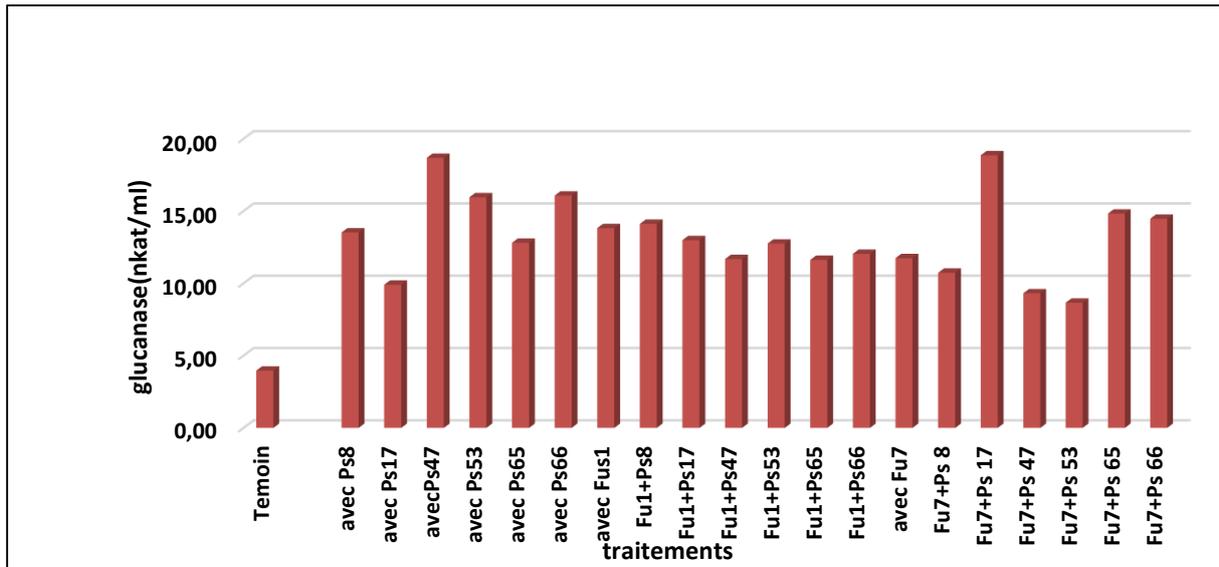


Figure 31 : Activité glucanase.

-Contrairement à la production de la glucanase, aucune stimulation de la voie de la chitinase n'a été enregistrée avec les plantes bactérisés en le comparant avec le témoin négatif, de même pour celle traitées et infectés par Fus1, mais lors de l'infection avec Fus7, une stimulation a été signalée chez les plantes traitées par Ps17 (Figur32).

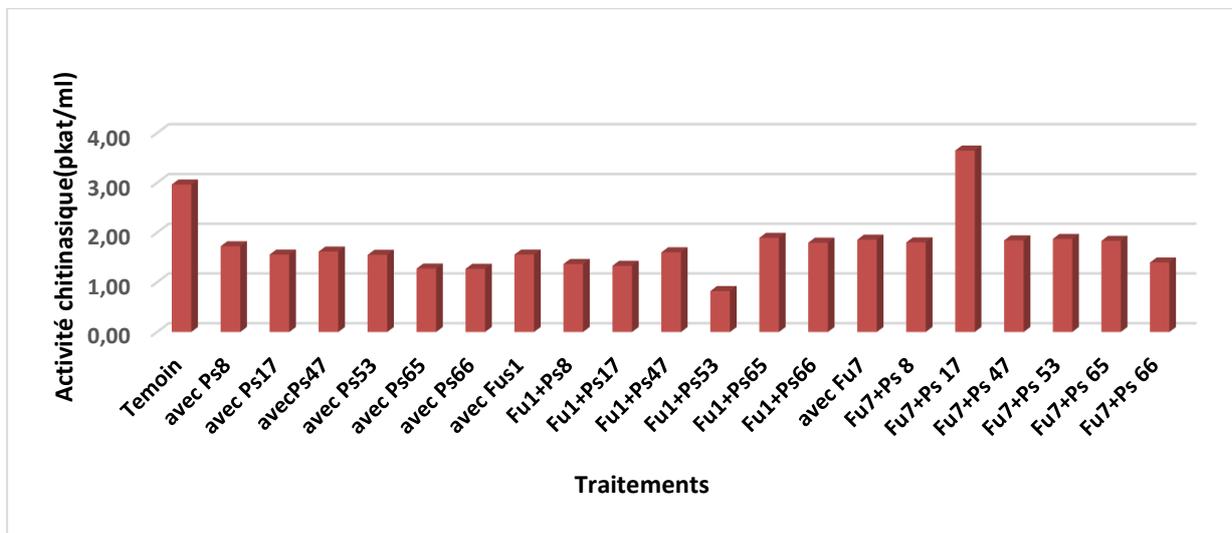
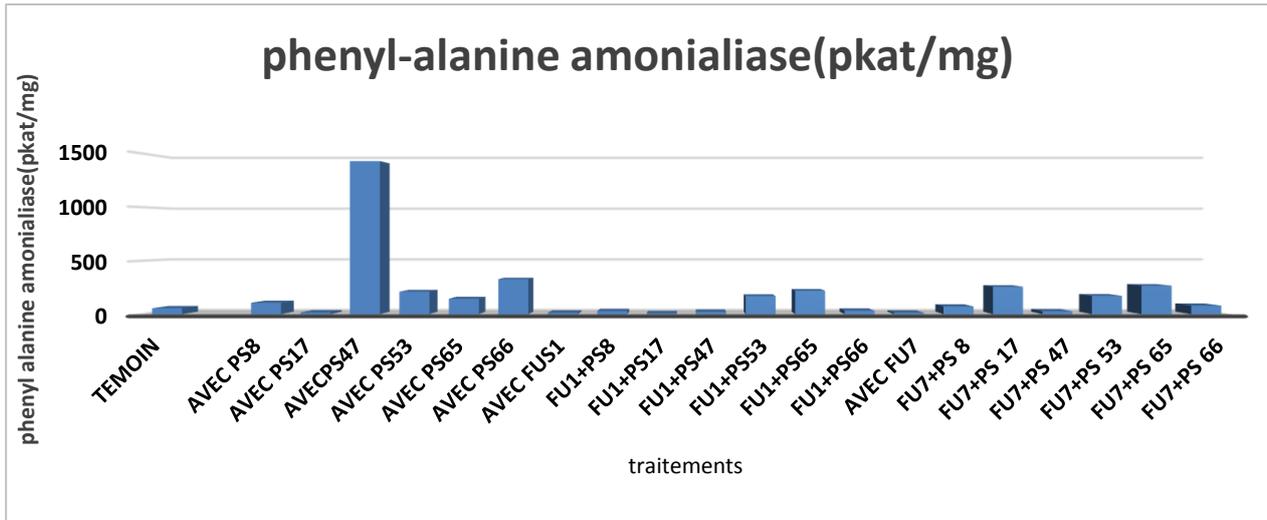


Figure 32 : Activité chitinasique

-Pour la voie de la phenylalanine ammonia lyase, une stimulation a été remarquée chez les plantes traitées par Ps8, Ps47, Ps53, Ps65 et Ps66 sans infection, mais lors de l'inoculation de l'agent pathogene (avec Fus1 ou Fus7), une baisse de l'activité été signalée (Figure 33).



**Figure 33** : activité phénylalanine - ammonia-lyase

En relation avec la résistance systémique induite par un agent pathogène, certaines PGPR sont capables de stimuler une résistance accompagnée avec des réactions de défense chez la plante lors d'infection.

Cependant les mécanismes de défense induits lors de l'ISR demeurent assez méconnus. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail visant à approfondir nos connaissances sur les voies métaboliques stimulées par les souches *Pseudomonas fluorescens* et permettant d'expliquer l'effet protecteur conféré par ces souches sur le blé contre la Fusariose.

Une étude fait par Ongena *et al.*, (2004), a montré que *P. putida* BTP1 est capable de stimuler la voie de la LOX lors de l'ISR chez le haricot. Dans d'autres exemples, l'ISR induite par la souche *P. fluorescens* Pf1 chez le riz et le thé a été associée avec l'accumulation de certaines enzymes de défense telles que la peroxydase, la polyphenol oxydase, la chitinase et la  $\beta$ -1,3-glucanases qui peuvent inhiber la croissance des champignons pathogènes (Nandakumar *et al.*, 2001; Saravanakumar *et al.*, 2007). Vanitha et Umesha, (2011), ont montrés que *P. fluorescens* induit la résistance chez la tomate contre *R. solanacearum*. Les plants prés-traités avec *P. fluorescens*, déclenchent les activités PAL, PPO, POX, et LOX comme réponse à l'invasion par *R. solanacearum*.

Il en ressort de cette expérience que nos isolats sont capables de stimuler quelques activités de défense chez le blé. Cependant, les résultats suggèrent qu'une étude biochimique complète est nécessaire pour poursuivre les évènements de la stimulation de la résistance, suivie par une analyse au niveau transcriptionnel de l'expression des gènes de différentes voies.

## **Discussion Générale**

L'application des micro-organismes pour le contrôle ou la suppression d'agents nuisibles ou pathogènes a été récemment imposée par des directives gouvernementales afin de minimiser voir même éradiquer l'utilisation des pesticides chimiques vu les préoccupations du grand public relatives d'une part au problème de résistance aux pesticides chimiques (Martinez *et al.*, 2013) et d'autre part, aux conséquences néfastes des résidus chimiques aussi bien sur l'environnement que sur la santé humaine (Whipps et Lumsden, 2001). C'est ainsi que les rhizobactéries qui favorisent la croissance des plantes (PGPR) sont considérées comme une alternative à l'utilisation de produits chimiques dans l'agriculture ! (Kloepper, 1993).

Ces PGPR sont souvent utilisées comme des rhizobactéries modèles (Sorensen *et al.*, 2001). Elles constituent une part importante (jusqu'à 10%) de la microflore rhizosphérique cultivable (Kragelund *et al.*, 1996). Certaines bactéries PGPR ont des effets positifs directs sur le partenaire végétale (Dobbelaere *et al.*, 2003) via notamment la production de phytohormones, de siderophores et d'antibiotiques. Parmi toutes les PGPR, les scientifiques se sont intéressés plus particulièrement aux *Pseudomonas fluorescens*, un groupe de bactéries très répandues et diversifiées qui colonisent de nombreuses niches écologiques et dont quelques grammes ou milligrammes/ha suffisent pour l'amélioration du rendement (Raaijmakers *et al.*, 1995). Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique.

Au niveau rhizosphérique les *P. fluorescens* peuvent avoir un effet bénéfique en mobilisant certains nutriments nécessaires à la croissance de la plante, en stimulant les mécanismes de résistance intrinsèques de la plante et en sécrétant des métabolites antimicrobiens.

Dans ce présent travail, nous avons procédé à isoler un maximum de *Pseudomonas fluorescens*, à partir de la rhizosphère du blé dur de la wilaya de Constantine, dont le but principal est mettre en évidence leurs caractères PGP.

L'identification des isolats a été réalisée, d'une part en se basant sur les caractères cultureux et métaboliques proposés dans le Bergyes manuel, (2005) de la systématique bactérienne, et compléter par l'utilisation des galeries API20 NE, et d'autre part avec une identification moléculaire via le séquençage du gène ADNr 16S appliqué seulement pour neuf souches.

L'identification des isolées fongiques a été effectuée en premier lieu par une caractérisation morphologique, en se basant sur des observations microscopique des structures de reproduction par les clés d'identification. Dans un second lieu, par une identification moléculaire basée sur le séquençage de l'ADNr 18S.

L'efficacité des isolats de *Pseudomonas* dans la lutte biologique repose sur la convergence d'une multitude de propriétés physiologiques, métaboliques et écologiques. Dans cette partie du travail, il en est ressorti des isolats présentant des caractéristiques qui en font des candidats potentiels dans la lutte biologique.

En effet, de nombreux isolats sont capables de synthétiser plusieurs métabolites secondaires reconnus comme importants dans le biocontrôle, l'induction de la résistance systémique, ou encore dans la phytostimulation. Parmi ces métabolites secondaires la production des siderophores, représente un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. La plus forte production des siderophores a été liée au genre *Pseudomonas*, et particulièrement à *Pseudomonas fluorescens* (Glick, 1995), qui libèrent les pyoverdine et pyochelines, et les deux sont dérivés de l'acide salicylique (Budzikiewicz, 1997). Ces composés ont une grande affinité pour le  $Fe^{3+}$ . En s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. En effet, certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer. Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser les sidérophores qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres habitants microbiens de la rhizosphère (Ongena *et al.*, 2002). La capacité des sidérophores d'agir comme agents efficaces dépend de la plante cultivée, du phytopathogène spécifique à supprimer, de la composition du sol, de la bactérie productrice, et de l'affinité du sidérophore spécifique pour le fer. Ainsi, même si une PGPR est un agent efficace suppresseur du pathogène dans des conditions contrôlées, son comportement sur le terrain est extrêmement difficile à prédire. D'autre part, malgré que la production des sidérophores soit un mécanisme important pour l'activité des PGPR, elle est rarement essentielle dans le biocontrôle (Ongena *et al.*, 2000; Meziane *et al.*, 2005). Un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température et la source de carbone) influence la production des sidérophores (Valdebenito *et al.*, 2006).

De par leurs propriétés intrinsèques, les *Pseudomonas* possèdent plusieurs mécanismes ayant des effets bénéfiques sur les plantes. L'une des principales activités améliorant la croissance des végétaux est l'alimentation minérale en phosphate. Le phosphore est un élément essentiel pour la croissance et l'activation des voies métaboliques comme la photosynthèse, l'oxydation biologique et l'absorption des nutriments et la division cellulaire (Illmer et Schinner, 1992). Il est le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote. Et même dans des sols qui en sont riches, le phosphore se trouve sous une forme insoluble, et seulement une

faible proportion (0.1%) est assimilable par les plantes (Stevenson et Cole, 1999). En plus le phosphore apporté par les fertilisants appliqués au sol se précipite en des formes insolubles, augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément (Goldstein, 1986). Les bactéries solubilisant le phosphore secrètent des acides organiques et des phosphatases, qui convertissent les formes insolubles de phosphates en ions de phosphates soluble monobasique ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) et dibasique ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Ce phénomène est attribué à la solubilisation minérale du phosphate (MP). Dans un contexte d'agriculture durable le scénario actuel est de s'orienter à l'application de PGPR solubilisatrices de phosphate en libérant des acides organiques, la chélation et l'échange d'ions afin d'augmenter la fertilité des sols (Gupta *et al.*, 2012), ces mêmes solubilisatrices sont impliqués dans la phytoextraction des métaux lourds (Jeong *et al.*, 2012). Les *Pseudomonas* sont les bactéries les plus actives dans la solubilisation du P (Miliani, 2012). Les PGPR jouent un rôle important dans les systèmes agricoles, en particulier comme biofertilisants (Piromyou *et al.*, 2011).

Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L- tryptophane pour la microflore rhizosphérique (Dastager *et al.*, 2010), ce dernier est considéré comme le précurseur de l'AIA, son addition au milieu favorise et augmente la synthèse de cette hormone (Glick, 1995). La synthèse d'AIA est largement répandue chez les rhizobactéries (Forlani *et al.*, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). La synthèse de cet hormone est variable entre les souches de différentes espèces. Cette variation est aussi influencée par les conditions de culture tel que la phase de croissance et la disponibilité du substrat (Mirza *et al.*, 2001) Parmi les rhizobactéries non symbiotiques, les *P. fluorescens* sont des pionnières dans la sécrétion de l'AIA (Karnwal, 2009; Miliani, 2012). Ces PGPR peuvent affecter la nutrition de la plante par la production des hormones (Alami *et al.*, 1999). La modification des équilibres hormonaux de la plante peut également améliorer la nutrition de la plante (par exemple l'auxine stimule la production de racines secondaires et de poils absorbants).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'inhibition des champignons par les PGPR; y compris la production d'agents antimicrobiens, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques telles que la chitinase, la cellulase, la protéase, la production de sidérophores, la compétition pour les nutriments ou une combinaison de ces mécanismes (Compant *et al.*, 2005). 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. Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. L'activité antifongique chez *Pseudomonas* est décrite comme un important mode d'action dans la suppression des maladies (Haas et Défago, 2005). Diverses

espèces de *Pseudomonas* possèdent des capacités inhibitrices vis-à-vis différents champignons phytopathogènes. Miliani, (2012) a montré que *P. fluorescens* (P9) est susceptible d'induire un antagonisme plus marqué vis à vis de *Pythium* par rapport à *P.putida* (P10), qui a signalé un pouvoir antagoniste important vis-à-vis des *F. oxysporum lycopersici* et *F.oxysporum f.sp radicis lycopersici* respectivement. Selon Raaijmakers *et al.*, (1995) ; Haas et Keel, (2003), certaines souches de *Pseudomonas* qui produisent de l'HCN, la viscosamide, la pyoluteorine, le 2,4- diacetylphloroglucinol, la pyrrolnitrine, les phenazines et les butyrolactones sont impliqués dans le biocontrôle. Certaines souches assurent une bonne protection contre les fusarioses vasculaires par production d'antibiotiques et de siderophores ( Bysens *et al.*, 1989; Natsh *et al.* , 1994; Harry *et al.*, 2005) telles les 2,4- diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, phenazine et l'acide cyanhydrique (Gardener *et al.* , 2000; Romano et Kolter, 2005; Frey-Klett *et al.*, 2005).

Le parasitisme et/ou la lyse des champignons par les rhizobactéries est facilitée par la production d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les parois des cellules fongiques. Les chitinases, les protease, les cellulase, et les pectinase sont des enzymes hydrolytiques d'importance majeure (Kishore *et al.*, 2005). La production d'enzymes hydrolytiques a été décrite chez de nombreuses bactéries impliquées dans le biocontrôle (Friedlender *et al.*, 1993 ; Viswanathan et Samiyappan, 2001). Toutefois chez les *Pseudomonas*, elles n'ont pas été décrites comme étant des traits importants du biocontrôle (Bagnasco *et al.*, 1998), et de telles activités ne sont toujours pas en corrélation avec l'inhibition fongique (Sindhu et Dadarwal, 2001). Certains PGPR produisent des antibiotiques volatiles, dont le plus important est l'HCN impliqué dans l'élimination de divers agents pathogènes. Bien que le cyanure soit un agent toxique capable de perturber l'activité des enzymes impliquées dans les processus métaboliques importants, son rôle comme substance biologique a été prouvé (Voisard *et al.*, 1989 ; Devi *et al.*, 2007). Le HCN bloque effectivement la voie de la cytochrome oxydase et est très toxique pour tous les micro-organismes. Toutefois, les microorganismes producteurs sont protégés (Bashan et de-Basan, 2005). Une corrélation positive est observée entre la production de HCN et la protection du concombre et de la tomate contre *Phytium ultimum* et *Fusarium oxysporum* respectivement (Ramette *et al.*, 2003). Dans cet étude, nous avons signalé la production de l'HCN chez 6 isolats uniquement, bien que l'HCN été produit par plusieurs rhizobactéries, et la production d'HCN par la souche *P. fluorescens* CHAO été suppressive vis-à-vis de la pourriture noire du tabac causé par *Thielaviopsis basicola* (Sacherer *et al.*, 1994). Les autres souches se sont avérées incapables de produire ce composé volatile. Ceci serait la conséquence

de l'inexistence de gènes (*hcn*) responsables de la synthèse de ce métabolite (Laville *et al.*, 1998) ou bien de l'absence d'un précurseur adéquat (Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986). Concernant l'antagonisme *in vivo*, le traitement par bactérisation des plantes de blé avant infestation par le pathogène a été assez significative, puisqu'elle a permis la protection des plantes pendant 45 jours, alors que le témoin positif a présenté un niveau de maladie d'ordre 3 depuis la deuxième semaine de l'infection. Expert et Digat, (1995), ont montré que l'on obtient une protection significative du tournesol vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum* par une bactérisation des semences avec des *P. fluorescens* ou avec des *P. putida*. Des augmentations significatives dans la croissance et le rendement des cultures en réponse à l'inoculation avec les PGPR ont été signalées (Biswas *et al.*, 2000 ; Ashgar *et al.*, 2002; Bashan *et al.*, 2004). Selon Nelson (2004), les PGPR sont capables d'exercer un effet bénéfique sur la croissance de la plante par augmentation du taux cumulé de la germination. Cet effet positif des PGPR sur la germination des graines et l'émergence du coléoptile serait attribuée à la capacité bactérienne de produire ou de modifier des hormones végétales qui jouent un rôle clé dans la germination (Barassi *et al.*, 2006). Miliani, (2012) a montré que l'effet des PGPR (P4, P9 et P10) été diversifié au sein de deux types de plantes (*Lens* sp et *Hordeum* sp) qui en déduire que l'effet promoteur de croissance avec des *P. fluorescens* et des *P. putida* été plus important chez *Lens* sp. par rapport à *Hordeum* sp. Ceci est due probablement à la compétition et l'activité anabolique à travers la sécrétions des bacteriosiderophores et des phytoisidérophores.

La reconnaissance de l'éliciteur occasionne un grand nombre de modifications physiologiques dans la plante. Beaucoup d'enzymes marqueurs voient alors leur activité biologique augmentée lors de SAR. Ces enzymes marqueurs permettent de caractériser la réaction systémique. La mesure de l'activité biologique de ces enzymes permet donc de mettre en évidence l'existence d'une réaction de défense suite à l'élicitation (plus l'activité d'une enzyme donnée est élevée, plus la réaction de la plante est jugée comme importante).

D'une manière générale, nos résultats démontrent que le traitement des plants de blé et avec des souches de *P. fluorescens* a conféré une diminution de la susceptibilité vis-à-vis la Fusariose, soit via une interaction directe avec le pathogène par antagonisme soit de manière indirecte par l'induction de la résistance systémique (ISR). Les effets bénéfiques de l'inoculation bactérienne ne se manifestent que si certaines conditions sont réunies. En fait, nos résultats sont en accord avec les données des PGPR. Les bactéries associées aux racines (PGPR) peuvent agir fortement sur la nutrition de la plante grâce à de nombreux mécanismes impliqués dans les relations mutualistes.

## **Conclusion Générale**

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.

Ces dernières années, l'acquisition des connaissances relatives aux PGPR et la plante ont été prodigieusement accélérés. Parmi les bactéries associées aux plantes les *Pseudomonas fluorescens* ont fait l'objet d'explorations suppressives des maladies des cultures par antagonisme direct entre la bactérie et les phytopathogènes du sol. Ce sont les bactéries les plus ubiquitaires que l'on rencontre dans différentes niches écologiques. Suite à leurs importances en lutte biologique ces bactéries ont imposées leur rôle dans la stimulation de la croissance végétale (agent PGPR), l'induction de résistance systémique (agent ISR).

Comme dans tout travail de recherche, des questions subsistent et de nouvelles perspectives s'ouvrent afin de compléter les connaissances sur l'implication des rhizobactéries comme inoculant. Les résultats obtenus jusque-là démontrent l'efficacité des souches de *Pseudomonas fluorescens* comme des agents PGPR. Ceci laisse envisager la possibilité de les exploiter dans les prochaines études expérimentales dans l'objectif de produire des biofertilisants.

Il serait intéressant aussi de poursuivre la caractérisation moléculaire de ces souches en réalisant d'autres tests sur les gènes de ménage.

La capacité de survie et de la colonisation racinaire de ces souches et la conservation de ses activités PGP dans un écosystème doivent être élucidées. D'autre part, les résultats obtenus lors de l'induction de résistance systémique chez le blé, méritent donc une expérimentation plus approfondie par exemple : étudier les voies métaboliques impliquées dans le procédé de l'ISR, et identifier les gènes impliqués dans la stimulation de la défense.

## Références bibliographiques

## A

**Ahemad, M., et Kibret, M., 2013.** Mecanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria :current perspective. *Journal of King Saud University. Science* 26, 1–20.

**Ahmad, F., I. Ahmad et M.S. Khan., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial Research*, 163: 173-81.

**Albert, F., et A.J. Anderson., 1987.** The effect of *Pseudomonas putida* colonization on root surface peroxydase. *Plant Physiol.* 85: 537-541.

**Altschul, F; Madden, T.L., Schäffer, A.A.; Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W et Lipman, D.J., 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389–3402.

**Amkraz. N., 2013.** Utilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents et des plantes aromatiques et médicinales contre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agent du chancre bactérien de la tomate. These de doctorat.

**Antoun H., Bordeleau L. M., et Gagnon C., 1980.** Identification d'un isolat d'actinomycète par la caractérisation partielle d'un antibiotique qu'il produit. *Phytoprotection.* 61, 79-87.

**Arif, F., Silini. A., Cherifi- Silini. H., et Ghoul. M., 2015.** Plant Growth Promoting and antagonistic traits of indigenous Fluorescent *Pseudomonas* spp. Isolated from Wheat rhizosphere and *A. Halimus* endosphere. *ESJ.* Vol 11, N:24.

**Arnou, L.E., 1937.** Colorimetric determination of the components of 3,4 di-hydroxy-phenylalanine tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* 118: 531.

**Asghar, H., Z. Zahir, M. Arshad et A. Khaliq., 2002.** Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol. Fertil. Soils*, 35: 231-237.

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmen, Z.G. et Smith, 1991.** In: *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley and Sons, New York, NY. [Links ]. Mak, Y.M., Sornarajah, R. and Ho, K.K, p.1.6.1 and 1.6.4.

## B

- Bagnasco P, L De La. Fuente, G. Gualtieri , F.et Noya, and A. Arias ., 1998.** Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30:1317-1322.
- Bakker, A,W., Schipperes, B., 1987.** Microbial Cyanide production in the rhizosphere in 10relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp* mediated plant growth stimulation. *Soil Biol.Biochem.* 19: 451-457.
- Barassi, C.A., G. Ayrault, C.M. Creus, R.J. Sueldo et M.T. et Sobrero., 2006.** Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Hort.*, 109: 8-14.
- Barazani, O. and J. Friedman., 1999.** Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. *J. Chem. Ecol.*, 25: 2397-2406.
- Bashan, Y. et L.E. De-Bashan., 2005.** Bacteria. pp: 103-115. *In: Encyclopedia of Soils in the Environment.* Hillel D.(ed.). Elsevier, Oxford, U.K.
- Bashan, Y., G. Holguin et LE. De-Bashan., 2004.** *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 50: 521-577.
- Beauchamp C. J., 1993.** Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection.* 74(1), 19-27.
- Becker, D., R. Stanke, I. Fendrik, W.B. Frommer, J. Vanderleyden, W.M. Kaiser et R Hedrich., 2002.** Expression of the  $\text{NH}_4^+$  transporter gene LEAMT1; 2 is induced in tomato roots upon association with  $\text{N}_2$ - fixing bacteria. *Planta*, 215: 424-429.
- Bell-Perkins, L. J., et J.M. Lynch., 2002.** Rhizosphere microbiology, p. 2713-2728. *In G. Bitton (ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, A Wiley-Interscience Publication, Canada.*
- Benhamou, N., R.R. Bélanger et T.C. Paulitz., 1996a.** Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and Ri T-DNA transformed pea roots: host response to colonization by *Pythium ultimum* Trow. *Planta* 199 : 105-117.

- Benhamou, N., R.R. Bélanger et T.C. Paulitz., 1996b.** Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in RiT-DNA transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii* and *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 86 : 1174-1185.
- Benhamou, N., J.W. Kloepper, A. Quadt-Hallman et S. Tuzun., 1996c.** Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol.* 112 : 919-929.
- Benhamou, N et Rey, A., 2012.** Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection*, 92 : 1-23.
- Bent, E., 2005.** Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In *Multigenic and induced systemic Resistance in Plants*, edited by S.Tuzun and E. Bent: Springer, NY.
- Berger, L.R., et Reynolds, D, M., 1958.** The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem Biophys Act* 29: 522-534.
- Bholay AD, PU. Jadhav, BV. Borkhataria, and MV. Dhalkari ., 2012.** Fluorescent Pseudomonads as plant growth promoting rhizobacteria and their siderophore genesis. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci* 3(1): 27-32.
- Biswas, J.C., L.K. Ladha et F.B. Dazzo., 2000.** Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **64**: 1644-1650.
- Blumer, C., and D. Haas., 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 173: 170-177.
- Bossis E., 1995.** Les Pseudomonas fluorescents de la rhizosphère : étude taxonomique et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée, Thèse de doctorat, Université de Nantes, France, 143p.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. et Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .**20**: 51-63.
- Budzikiewicz H., 1997.** Secondary metabolites from Fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol Rev*,10: 209-228.

**Brik, J.M., Bostock, R.M., et Silvestone, S.E., 1991.** Rapid insitu assay for indol acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *App Environ Microbiol* 57: 535-538.

**Bultreys, A., et I. Gheysen., 2000.** Production and comparison of peptide siderophores from strains of distantly related pathovars of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas viridiflava* LMG 2352. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 325-331

**Burd, G.I., Dixon, D.G. et Glick, B.R., 1998.** A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10):3663-3668

**Bultreys A., et Gheysen I., 2000.** Production and comparison of Peptide sidérophores from strains of distantly related pathovars of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas viridiflava* LMG 2352. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (1): 325-331.

**Bysens S., Heugens K., Poppe J et Hofte M., 1995.** Involvement of Pyochelin and pyoverdine in suppression of pythium- induced damping-off of Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7 NSK2. *Applied and environmental Microbiology*, 865-871.

## C

**Castric, P., 1977.** Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen cyanide biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 130: 826-831.

**Cakmakci, R., Donmez, F., Aydin, A. et Sahin, F., 2006.** Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38(6):1482-1487.

**Cappuccino, J.C., et Scherman, N., 1992.** In *Microbiology: A laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edn. Benjamin/Cummings, New York, p:125-179.

**Cattelan AJ, Hartel PG, et Fuhrmann JJ., 1999.** Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J* 63:1670–1680

**Chaiharn, M., Chunchaleuchanon, S., Kozo, A., et Lumyong, S., 2008.** Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *J. KMITL Sci. Tech.*, 8: 18-23.

**Chao WI, Nelson EB, Harman GE, et Hoch HC., 1986.** Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathol.*, 76: 60-65.

**Charest, M.H., C.J. Beauchamp et H. Antoun., 2005.** Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52: 219–227.

**Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, et E. Ait Barka., 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959

**Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M. et Ousley M.A., 1993.** Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11),3899-3905.

**Curl E. A. et B. Truelove., 1986.** The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.

#### D

**Dastager, S.G., C.K. Deepa et A. Pandey., 2010.** Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.*, 27: 259-265.

**Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. 1ère édition, INRA, Paris.

**Defago, G., 1993.** 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* 42: 311–312.

**Delarras, C., 2014.** Pratique en microbiologie de laboratoire, Lavoisier, P: 144.

**Deshwal V. K., 2012.** Pseudomonas aeruginosa as biological control agent against plant pathogenic fungus Sclerotinasclerotiorum. *Int. J. Plant, Animal Env. Sci* 2(1): 14-17.

**De Souza, J. T., M. De Boer, P. DeWaard, T.A. Van Beek, et J.M. Raaijmakers., 2003.** Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7161-7172.

**De Weert S, Vermeiren H, Mulders I H, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg G V, Vanderleyden J, De Mot R, et Lugtenberg B J., 2002.** Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15, 1173-1180.

**De Weger, L., A., van Arendonk, J. J. C. M., Recourt, K., van der Hofstad, G. A. J. M., Weisbeek, P. J., et Lugtenburg, B., 1988.** Sierophore mediated uptake  $Fe^{3+}$  by the plant growth- stimulating *Pseudomonas putida* strain WCS358 and by other rhizosphere microorganisms. *J. Bacteriol.* 170:4693-4698.

**Digat, B. et Gardan, L., 1987.** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP.* 17: 559-568.

**Dimkpa, C., I. Tanjawanad, et F. Asch., 2009.** Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x. p 1-13

**Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. et Okon, Y., 2003.** Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 22(2):107-149.

**Dommergues Y. et Manganot F., 1970.** Écologie Microbienne du sol. Masson, Paris.

**Doumbou C.L., Salove M.K., Crawford D.L. et Beaulieu C., 2001.** Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection.* 82, 85-1021.

**Dunne, C., J. J. Crowley, Y. Moenne-Loccoz, D. N. Dowling, F. J. De Bruijn et F. O’Gara., 1997.** Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology*, 143 : 3921-3931.

## E

**El-Katatny M.H., Gudelj, M. K.-H. Robra, K.H, Elnaghy. M.A. et Gübitz. G. M., 2001.** Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:137–143.

**Expert, J.M. et Digat, B., 1995.** Biocontrol of Sclerotinia wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains. *Can. J. Microbiol.* 41(8): 685-691.

**Eyquem, A., Alouf, J., et Montagnier, J.L., 2000.** Traité de microbiologie clinique. Deuxièmes mises à jour et compléments. PICCIN, p : 238

**Ezawa, T., S. E. Smith et F. A. Smith., 2002.** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil.* 244:221-230.

## F

- Fenice, M., L. Selbman, F. Federici, et N. Vassilev., 2000.** Application Encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresource Technol.* 73: 157-162.
- Fernández, , 2007.** O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods* 70:127–131.
- Forlani, G., Pastorelli, R., Branzoni, M. et Favilli, F., 1995.** Root colonization efficiency, plant growth promoting activity and potentially related properties in plant associated bacteria. *J. Gen. Breeding*, 49: 343–352.
- Frankenberger W.T., et Arshad,M., 1991.** Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133: 1-8.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schnid, R., Berg, G. et Bahl, H., 2001.** Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch. Microbiol.* 176: 421–426.
- Frey-Klett P., chavatte M., Clause M. L., Courier S., Le Roux C., Raaijmakers J.,Martinotti m.G., Pierrat J.C et Garbaye J., 2005.** Ectomycorrhizal symbiosis Affects functional diversity of rhizosphere Fluorescent Pseudomonads. *New Phytologist*, 165: 317-328.
- Fridlender, M., Inbar, J. et Chet. I., 1993.** Biological control of soil-borne plant pathogens by a b-1,3-glucanase–producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 25:1211–1221.

## G

- Gardener B.B., Mc., Schroeder K.L., Kaloger, Raaijmakers J. M., Thomashow L.S., et Weller D. M., 2000.** Genotypic and Phenotypic Diversity of *phlD*-Containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of Wheat. *App. Enviro. Microbiol.* Vol 66(5): 1939-1946.
- Garbaye, J., 1994.** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis (Tansley review,76). *New Phytologist*, 128: 197-210.

**Ginard M, Lalucat J, Tummler B. Romling U., 1997.** Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*47:132–143

**Glick, B.R., 1995.** *Canadian Journal of Microbiology*, 41 (2), 109–117.

**Glick, B.R., 2012.** *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications.* Hindawi Publishing Corporation, Scientifica.

**Goldstein, A. H., 1986.** Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspectives and future prospects. *Am. J. Alternate Agric.* 1: 51-57.

**Gomez Ramirez, M., L. I. Rojas Avelizapa, N. G. Rojas Avelizapa, et R. Cruz Camarillo., 2004.** Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods.*56: 213-219.

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

**Gokarn, K., 2010.** Siderophores and Pathogenecity of Microorganisms. *J. Biosci Tech* 1: 127-134.

**Gorden, A,S., et weber R,P., 1951.** Colorimetric estimation of indole acetic. *Plant physiology* 26: 192-195.

**Goswami, D., Thakker J,N., et Dhandhukia P,C., 2016.** Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Soil & Crop Sciences.*

**Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B. et Tewari, R., 2012.** Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological Research* 167: 358– 363.

## H

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

**Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M., et Kuc, J., 1982.** Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 73-82.

**Hariprasad, P. et Niranjana, S.R., 2009.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil*, 316: 13-24

**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

**Harry A. J., Hoitink H.A.J., Nameth S.T., et Krause M. S., 2005.** Chemical and biological control of *Xanthomonas* bacterial blight of geranium. Floriculture industry research and scholarship trust. Department of Plant Pathology OARDC/OSU:4

**Holt, J, G., Krieg, N, R., Sneath, P, H,A., Staley, J, T., et Williams, S, T., 1994.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn. Baltimore: Williams & Wilkins.

## I

**ILLMER, P. et E SCHINNER., 1995.** Solubilization of inorganic calcium phosphates - solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 257-263.

## J

**Jacques, P., P. Delfosse, M. Ongena, P. Lepoivre, P. Cornélis, N. Koedam, L. Neirinckx, et P. Thonart., 1993.** Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agric.* 2 : 301-307.

**Jacques, M. A., 1994.** Écologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllé de *Cichorium endivia* var. *latifolia* L. Thèse de doctorat, université de Paris-XI, Orsay, 123 p.

**Jeong S., Moon H. S., Nama K., KimJ. Et Kim T. S., 2012.** Application of phosphate-solubilizing bacteria for enhancing bioavailabilitu and phytoextraction of cadmium (Cd) from polluted soil. *Chemosphere*, 88: 204-210.

**Joffin J. N. et Leyral G., 2006.** Microbiologie technique, Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaine. P368.

**John M K 1970.** Colorimetric determination of phosphorus in plant materials and soil as with ascorbic acid. Soil Science; 109: 214-220.

**Joseph, B., R. Ranjan Patra et R. Lawrence., 2007.** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Plant Prod. 1: 141- 152.

**Jourdan, E., M. Ongena, et P. Thonart. , 2008.** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **12**: 437-449.

## 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

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

**Kauffmann, S . Dorey, S et Fritig, B., 2001.** Les stratégies de défense. Pour la Science, p. 116–121.

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

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

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

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

**King, E.O., M.K. Ward, et D.E. Raney., 1954.** Two simple methods for the determination of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.

**Kishore, G.K., Pande, S. et Podile, A.R., 2005.** Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with chitinolytic bacteria. *Phytopathol.* 95:123–132.

**Klarzynski, O et Fritig, B., 2001.** Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie,* 324:953–963.

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

**Kloepper J.W., Lifchitz R. et Zablotowicss R.M., 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.

**Kloepper, J.W., 1993.** Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Pages 255-274 dans B.Melting (éd.), *Soil microbial technologies.* M. Dekker Inc., New York, É.-U.

**Kragelund. L., Leopold. C., et Nydroe. O., 1996.** Outer membrane protein heterogeneity within *Pseudomonas fluorescens* and *P.putida* and use of OprF antibody as a prob for Rrna homology group I pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology,* 62: 480-485.

**Kumar, A., A. Kumar, S. Devi, S. Patil, C. Payal et S. Negi., 2012.** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Res. Sci. Technol.,* 4: 01-05.

## L

**Laville, J., C. Blumer, C. Von Schroetter, V. Gaia, G. Delfago, C. Keel et D. Haas., 1998.** Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.,* 180 : 3187- 3196.

**Leclère, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M. et Jacques, P., 2005.** Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(8):4577-4584.

**Lee, S.B. et Taylor, J.W., 1990.** Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Chapter 34. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky and T. White, eds.). Academic Press, Orlando, Florida.

**Lee S.B et Taylor J.W., 1992.** Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species inferred from the internal transcribed space of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution.* 9: 636-653 .

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

**Lesslie .J. F et Summerell B. A., 2006.** The fusarium laboratory Manual. Blackwell publishing. Iowa, USA.

**Lim, H.S., Kim, Y.S. et Kim, S.D., 1991** *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 510–516.

**Loper J, E. et Henkels, M.D., 1999.** Utilisation of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology.* 65, 5357-5363.

**Lugtenberg, B., et F. Kamilova., 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.

## M

**Maniatis, T., Fritsch, E. F. et Sambrook, J., 1982.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

**Manjula, K., Kishore, G.K. et Podile, A.R., 2004.** Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved effective than cell free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Can. J. Microbiol.* 50: 737-744.

**Marchal N et Bourdon J.L., 1982.** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries.Ed. Doin, Paris.

**Marmur, J., 1961.** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. mol. Biol.* 3, 208.

**Martínez, M. L., von Poser, G., Henriques, A., Gattuso, M., et Rossini, C., 2013.** Simaroubaceae and Picramniaceae as potential sources of botanical pesticides. *Industrial Crops and Products* 44: 600-602.

**Mercado-Blanco, J., et P.A.H.M. Bakker., 2007.** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek.* 92: 367-389

**Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L. C., Hofre M., et Bakker P. A.H.M., 2005.** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology.* 6: 177-185.

**Mezzache. S., 2012.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* Isolées de la rhizosphere de la pomme de terre. Thèse de doctorat.

**Migula, W., 1894.** Ueber ein neues System der Bakterien. *Arb. Bakt. Inst. Karlsruhe* 1:235-238

**Milner, J.L., L. Silo-Suh, J.C. Lee, H. He, J. Clardy, et J. Handelsman., 1996.** Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3061-3065

**Mirza, M.S, W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand, K.A. et Malik ., 2001.** Isolation, partial characterization and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil*, 237: 47-54.

**Molano J, Duram A, et Cabib E ., 1977.** A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal Biochem* 83:648-656.

## N

**Natsh A., Keel C., Hanspeter, P., Dieter., et gene V.D., 1994.** Contribution of the global regulator gene gac A to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CH 10 introduced into soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7): 2553-2560.

- Naik, P. R. & Sakthivel, N. 2006.** Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology*, 157, pp. 538–546.
- Nakayama, T., Y. Homma, Y. Hashidoko, J. Mizutani, et S. Tahara., 1999.** Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4334-4339
- Nandakumar R, Babua S, Viswanathanb R, Raguchandera T, et Samiyappan R., 2001.** Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem.* 33:603-612
- Natsch, A., Keel, C., Pfirter, H.A., Haas, D. et Défago, G., 1994.** Contribution of the global regulator gene *gac A* to persistence and dissipation of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 introduced into soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2553-2560.
- Nehal M. Elekhtyar., 2015.** Efficiency of *Pseudomonas fluorescence* as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for the Enhancement of Seedling Vigor, Nitrogen Uptake, Yield and Its Attributes of Rice (*Oryza sativa L.*). *Ijsr in Agricultural Sciences*. P: 57-67.
- Nelson, L.M., 2004.** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Online Crop Management* , 10.1094/CM-2004-0301-05-RV.
- Neilands, J.B., 1981.** Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 715–731.
- Nielsen K, et al., 1998** Sustained oscillations in glycolysis: an experimental and theoretical study of chaotic and complex periodic behavior and of quenching of simple oscillations. *Biophys Chem* 72(1-2):49-62.
- Nielsen, M.N. et Sorensen, J., 1999.** Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 30, 217–227.
- 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

- Olmar B., Weber I., Leonardo M., Cruz J.L., Baladani J., et Dobereiner., 2001.** Herbaspirillum-like bacteria in banana plants .Brazilian Journal of Microbiology, 32 : 201.
- Omidvani M, RA. Rsharifi , M. Ahmadzadeh, et P A. Dahaji., 2010.** Role of fluorescents Pseudomonads Siderophore to increase Bean Growth factor. Journal of Agricultural Science. Vol 2 (N3): 242-247.
- Ongena, M., F. Daayf, P. Jacques, P. Thonart, N. Benhamou, , TC. Paulitz, et RR. Bélanger ., 2000.** Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent Pseudomonads. *Plant Pathol.* 49(4):523-530.
- Ongena, M., A. Giger, P. Jacques, J. Dommes et P. Thonart., 2002.** Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Euro. J. Plant Pathol.*, 108: 187-196.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. et Sahin, F., 2006.** Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* 111(1):38-43.
- O'Sullivan D.J. et O'gara F., 1992 .** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56, 662-676.

P

- Palleroni, N.J., 1984.** Genus I. Pseudomonas Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- Palleroni, N.J. et Moore, E.R.B., 2004.** Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In "Pseudomonas", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, pp. 3-44.
- Patten, C.L. et Glick, B.R., 2002.** Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. *Can. J. Microbiol.* 48: 635-642.

**Pepper, I.L. et C.P. Gerba., 2004.** Environmental Microbiology A Laboratory Manual SECOND EDITION. Elsevier Academic Press. p 3-10.

**Pérez-Miranda, S., N. Cabirol, R. George-Téllez, L. S. Zamudio-Rivera, et F. J. Pepper I.L., et Gerba C.P.,2004.** Environmental Microbiology A laboratory Manual Second Edition. Editor : E. R. Ioya. Pp : 37-49

**Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S. et Fernández, F.J., 2007.** O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods.* 70 : 127–131.

**Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. et Robaglia, C., 2003.** Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189–199.

**Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q. and Gullino, M.L., 1997.** Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 11(3):131-140.

**Pidwirny, M., 2006.** Biogeochemical cycling: Inputs and outputs of nutrients to ecosystems. Fundamentals of Physical Geography, 2nd Edition. <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/9p.html>.

**Pikovaskya, R, E., 1948.** Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species: *Microbiologia.* 17: 362-370.

**Piromyou P., Buranabanyat B., Tantasawat P., Tittabutr P., Boonkerd N., et Teaumroog N., 2011.** Effect of plant growth promoting rhizobacteria(PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage com cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology,* 47: 44-54.

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

## R

**Raaijmakers, J.M., Bitter, W., Punte, H.L.M., Bakker, P.A.H.M., Weisbeek, P.J. et Schippers, B., 1994.** Siderophore-receptor PupA as a marker to monitor wild-type *Pseudomonas putida* WCS358 in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1184–1190.

**Raaijmakers, J. M., Leeman, M., Van Oorschot, M. M., Van der Sluis, I., Schippers, B., et Bakker, P. A. H. M., 1995.** Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85(10) : 1075-1081.

**Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. et Samiyappan, R., 2001.** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protect.* 20 (1):1-11.

**Ramette, A., M. Frapolli, G. Defago, et Y. Moenne-Loccoz., 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16: 525-535.

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

**Rapilly F., 1968.** Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Annales des Epiphyties Volume 19. N° hors-série. INRA. Paris. pp 25-39 and 102.

**Reetha S, G. Selvakumar, G. Bhuvaneswari, P. Thamizhiniyan, et T. Ravimycin ., 2014.** Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas* fluorescence and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences P*: 75-80

**Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier et H. Antoun., 2001.** Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 1741-1747.

**Roberts, W,K., et Selitrennikoff, C,P., 1988.** Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J Gen Microbiol*.134: 169–176.

**Romano J.D., et Kolter R., 2005.** *Pseudomonas-Saccharomyces* interactions: influence of fungal metabolism on bacterial physiology and survival. *J. bacterial*, 187(3): 940.

**Ronald, M Atlas. , 2010.** Handbook of MICROBIOLOGICAL MEDIA Fourth Edition, Taylor and Francis Group. Yt P: 349.

- Sacherer P., Défago G., et Haas D., 1994.** Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gac A* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Let, 116: 155-160.
- Sahu, G. K. et S. S. Sindhu., 2011.** Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp. Res. J. Microbiol., 10: 735- 749.
- Sakthivel, N. et Gnanamanickam, S.S., 1987.** Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for the enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.). Appl Environ Microbiol 53, 2056–2059.
- Salisbury, F.B., 1994.** The Role of Plant Hormones. In: *Plant-Environment Interactions*. Wilkinson, R.E. (ed.). Marcel Dekker, New York, USA., pp. 39-81.
- Sands, D.C., A. et Det Rovira., 1971.** *Pseudomonas fluorescens* biotype G, the dominant fluorescent pseudomonad in South Australian soils and Wheat rhizospheres. J. App. Bacteriol. 34: 261-275.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A., et Estelle, M., 2009.** Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nature Chem. Biol. 5, 301–307.
- Saravanakumar, A., J. Sesh Serebiah, G.A. Thivakaran et M. Rajkumar., 2007.** Benthic macrofaunal assemblage in the arid zone mangroves of gulf of Kachchh – Gujarat. J. Ocean Univ. China, 6, 33-39
- Sayyed, R., M.D. Badgujar, H.M. Sonawane, M.M. Mhaske et S.B. Chincholkar., 2005.** Production of microbial iron chellators (siderophores) by fluorescent *Pseudomonads*. Indian J. Biotechnol., 4: 484-490.
- Schaad, N.W., 1992.** Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2<sup>nd</sup> Edn, International Book Bistributing Co, Lucknow, 44-58.
- Schoebitz, M., C. Ceballos, L. et Ciampi., 2013.** Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. *J Soil Sci Plant Nutr*, 13:1–10
- Schwyn, B., et J. B. Neilands., 1987.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochem. 160 :47–56.

- Sreedevi B, Preethi S, et KumariJ Pramoda., 2014.** Isolation, production and optimization of siderophore producing *Pseudomonas* from paddy soil. *Int J Pharm Res Sci.* 2(1):71–88.
- Seifert K., 2001.** *Fusarium* and anamorph generic concepts. pp. 15 - 28 en: *Fusarium*. Summereli B. A et al. (eds). APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Sharma, A. et B.N. Johri., 2003.** Combat of iron deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiol. Res.*, 158: 77-81. DOI: 10.1078/0944-5013-00182
- Siddiqui, S., Siddiqui, Z. A., et Ahmad, I., 2005.** Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates for the biocontrol of a wilt disease complex of *Pigeonpea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5): 729-732.
- Sood, C. R., S. V. Chanda et Y. D. Singh. , 2002.** Effect of different nitrogen sources and plant growth regulators on glutamine synthetase activities of radish cotyledons. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 28: 46-56.
- Sorensen.J., Jensen. L., et Nybroe. O., 2001.** Soil and rhizosphere as habitat for *Pseudomonas* inoculant: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single- cell studies. *Plant and soil*, 232. 97-108.
- Spaepen, S.,Vanderleyden,J., et Remans,R., 2007.** Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol.Rev.* 31: 425– 448.
- Spaepen, S., et Vanderleyden, J., 2011.** Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>.
- Stevenson, F.j. et Cole, M.A., 1999.** The phosphorus cycle. In: *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. John Wiley and Sons, pp.279-329.
- Sweta Kachhap., Anita Chaudhary., et Singh, S, D., 2015.** Response of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in relation to elevated temperature conditions in Groundnut (*Arachis Hypogaea* L.). *The Ecoscan* 9 (3-4):771-778.

T

**Tanaka, Y., Kojima, M. et Uritani, I., 1974.** Properties, development, and cellular-localization of cinnamic acid and 4-hydroxylase in cut-injured sweet potato. *Plant and Cell Physiology* 15 : 843-854.

**Tao G, T. Shu-Jun, C. Miao-Ying, et X. Guang-Hui., 2008.** Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*. 18: 515–523.

**Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, Shilpi Mittal, A.K. Tripathi, et B.N. Johri., 2005.** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89: 136-150

**TABUC. C., 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. These de doctorat

**Tokala, R. K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford., H. Salove, L.A. Deobald, F.J. Bailey, et M.J. Morra., 2002.** Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *S. lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2161-2171.

**Tortora JG, Funke RB, et Case LC., 2002.** Microbiology An introduction. Media update of 7 Edn.including bibliography and index publisher . Daryl Fox; pp: 258-260.

**Tousson, T.A., et P.E. Nelson., 1976.** Fusarium. A pictorial guide to the identification of Fusarium species according to the taxonomic system of Synder and Hansen. 2<sup>nd</sup>, ed, University Park and London: The Pennsylvania State University Press. pp43.

**Twisha P. et P. B. Desai., 2014.** Study on Rhizospheric microflora of Wild and Transgenic varieties of Gossypium species in Monsoon. *Res. J. Recent. Sci.*, 3 : 42- 51.

V

**Vakalounakis DJ, et Fragkiadakis GA., 1999.** Genetic diversity of Fusarium oxysporum isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* 89:161-168

- Valdebinito, M., A.L Crumbliss., G. Winkelman et K. Hantke., 2006.** Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin and yersinianbactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int. J. Med. Microbiol.* 296:513-520.
- Vanitha SC, Umesha S., 2011.** *Pseudomonas fluorescens* mediated systemic resistance in tomato is driven through an elevated synthesis of defense enzymes. *Biol Plantarum.* 55:317–322.
- Van Loon, L.C., Bakker, P. et Pieterse, C. M. J., 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- Van Loon, L.C., et P.A.H.M. Bakker., 2005.** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, p. 39-66. *In* Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer Science Dordrecht, The Netherlands.
- Van Peer, R., G.J. Niemann et B. Schippers., 1991.** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81 : 728-734.
- Verma, J. P., J. Yadav, K. N. Tiwari, Lavakush et V. Singh., 2010.** Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on crop production. *Int. J. Agr. Res.,* 5: 954 – 983.
- Vessey, J.K., 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil,* 255 : 571–586.
- Vincent, M.N., Harrison, L.A., Brackin, J.M., Kovacevich, P.A., Mukerji, P., Weller, D.M., et Pierson, E.A., 1991.** Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2928–2934
- Viswanathan, R. et Samiyappan, R., 2001.** Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went. *Causing red rot disease in sugarcane. Microbiol. Res.* 155: 309–314.
- Voisard, C, Keel, C, Haas, D. et Défago, G., 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8:351–358

W

**Wei, G., J.W. Kloepper et S. Tuzun., 1994.** Induced systemic resistance to cucumber diseases and increase plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. Pages 70-71 dans M.H. Ryder, P.M. Stephens et G.D. Bowen (eds.), Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. CSIRO, Glen Osmond, Australie.

**Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., et Lane, D.J., 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697–703.

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

**Weller, D.M., 1988.** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26 : 379-407.

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

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

**Whipps JM, et Lumsden RD., 2001.** Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. 9-22.

**White T. J., Bruns T., Lee S., et Taylor J. I ., 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics .In:Innis Gelfand M.A., Sninsky D.H., White M.T.J.(eds). PCR protocols: a guide to methods and applications.New York:Academic Press. p3 15-322.

Z

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

**Zdor, R.E. et A.J. Anderson., 1992.** Influence of root colonizing bacteria on the defense response of bean. *Plant Soil* 140 : 99-107.

**Zeller, S.L., H. Brandt et B. Schmid., 2007.** Host-Plant Selectivity of Rhizobacteria in a Crop/Weed Model System. *PloS ONE*, **2**(9): 1-7.

**Zilinsiky F.J., 1983.** Maladies des céréales à paille : guide d'identification :CIMMYT, MexicoD.F.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Milieux de culture

#### **Bouillon Luria Bertani LB (g/l)**

- 10 g Peptone
- 5 g Extret de levure
- 10 g Sodium Chloride

#### **Milieu King B (g/l)**

- 20 g Peptone
- 10ml Glycérol
- 1.5g Phosphate dipotassique
- 1.5g Sulfate de magnésium, 7 H<sub>2</sub>O
- 15g Agar

#### **Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)**

- 200g de pomme de terre,
- 20g d'agar,
- 20g de dextrose.

Le milieu a été autoclave pendant 20 min à 121°C.

#### **Milieu Pikovskaya**

- 10g D –Glucose
- 0.5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>
- 0.2g NaCl
- 0.1g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

- 0.2g KCl
- 0,5g Extrait de levure :
- 0.002g  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$
- 0.002g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- 5g  $Ca_3(PO_4)_2$
- 1000 ml Eau distillée

**Milieu CAS :**

2,7 mg de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  dissous dans 10 ml de HCl 10 mM avec 1,21g/l de chrome Azurol S (CAS) dissous auparavant dans 50 ml d'eau distillée. Ce mélange, de couleur bleu foncée, est ajouté très lentement sous agitation à 1,821g de HDTMA (Hexa méthylammonium bromure) dissous dans 40 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 7. La solution bleu foncé obtenue est autoclavée à 121 °C /15 min.

A 900 ml de King B, 100ml de la solution CAS- HDTMA est ajouté dans une erlenmeyer stérile (le mélange doit être homogénéisé). Couler ce milieu dans les boites de pitre, puis ensemencée les isolats

**Annexe 2 : Courbe d'étalonnage (pour les phosphates) :**

On prépare une solution stock de  $KH_2PO_4$  contenant 0.4393g de  $KH_2PO_4$  diluer dans 1 litre d'eau distillé pour faire une concentration de 100µl / ml de Phosphate. Pour préparer une gamme étalonnage à partir d'une solution de 2 µg/ml (on prend 20ml de la solution stock est diluer pour 1litre). 2.5, 5, 10, 20, et 25 ml de la solution (2µg/ml) sont transférés a des flacons de 50ml de volume, a jouter 5ml de la solution réactionnel, et le volume est complété avec d'eau distille a 50ml, lire l'absorbance a 880nm après 30min.

**Annexe 3 : Réactif de Nessler**

Iodure de potassium	50g
Dichlorure de mercure	solution saturée
Solution d'hydroxyde de Na 9N	400ml

## Annexe 4 : Tableau résultats des différents tests enzymatiques réalisés :

Souches	Lipase	production NH3	Amylase	Production HCN	Chitinase Halo (mm)	Céllulase	Pectinase	Protéase	Lécithinase
Ps1	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Ps2	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Ps4	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Ps6	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Ps7	+	+	-	-	-	++	+	-	-
Ps8	+	+	-	-	-	++	++	+	+
Ps9	-	+	-	-	-	++	+	-	-
Ps10	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Ps11	-	+	+	-	-	+++	+++	+	+
Ps12	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Ps13	+	+	-	-	-	++	+	+	+
Ps14	-	+	-	-	-	+	++	-	-
Ps15	-	+	-	-	-	+++	+++	-	-
Ps16	-	+	-	+	-	+	+	+	-
Ps17	+	+	-	-	-	+++	+++	+	+
Ps18	+	+	-	+++	-	+	+	+	+
Ps19	+	+	-	-	-	+++	+++	+	+
Ps22	-	+	-	-	-	+++	+++	-	-
Ps23	+	+	-	-	-	+++	+++	+	+
Ps25	+	+	-	-	-	++	++	-	+
Ps26	+	+	-	+++	-	+	+	+	+
Ps29	+	+	-	-	+ (18)	+++	+++	+	+
Ps30	-	+	-	+	-	+	+	+	-
Ps31	-	+	-	-	-	+	+	-	-

<b>Ps34</b>	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<b>Ps35</b>	+	+	-	-	+ (20)	+++	+++	+	+
<b>Ps37</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps40</b>	+	+	-	-	+ (16)	+++	+++	-	+
<b>Ps42</b>	+	+	-	-	-	+++	+++	+	+
<b>Ps43</b>	+	+	-	-	-	++	++	+	+
<b>Ps43<sub>1</sub></b>	-	+	-	-	+ (17)	++	++	+	+
<b>Ps45</b>	-	+	-	-	+ (21)	+	+	-	-
<b>Ps47</b>	+	+	-	-	+ (15)	++	++	-	+
<b>Ps50</b>	-	+	-	-	-	++	++	-	-
<b>Ps52</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps53</b>	-	+	-	-	-	+	+	+	-
<b>Ps56</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps57</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps60</b>	+	+	-	-	-	++	++	+	+
<b>Ps61</b>	+	+	-	-	-	+	+	-	+
<b>Ps62</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps63</b>	+	+	-	-	-	++	++	+	+
<b>Ps64</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps65</b>	+	+	-	+++	-	++	+	+	+
<b>Ps66</b>	+	+	-	-	+ (25)	++	+	+	+
<b>Ps67</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps68</b>	+	+	-	-	-	+	++	+	+
<b>Ps69</b>	+	+	-	-	-	++	+	+	+
<b>Ps70</b>	+	+	-	-	-	+++	++	+	+
<b>Ps70<sub>2</sub></b>	-	+	-	-	-	+	+	+	-
<b>Ps71</b>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>Ps73</b>	+	+	-	-	+ (16)	+	+	-	-

Ps74	+	+	-	-	-	++	+	+	+
Ps77	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Ps78	+	+	-	+	-	+	+	+	+

**Note:** +++ haute production, ++ production moyenne, + faible production, - pas production

## Annexe 5 : Sequence Partiel des *Pseudomonas fluorescens*

>Ps 7 : *P.fluorescens* strain DmBR 2

```
CTTTCAGAAGCCGTAAACCATGCAAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTTGCTTCTTTGAGAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGC
TAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCT
AGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAA
GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATA
AGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACTGAG
GTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCAA
CTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTGTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTTTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAAACTTTTCTAGAGATAG
ATTGGTGGCCTTTTCGGGGAACATTGAGACAGGTGCTTGCATGGCCTGTCGTGAGCTCGTTCGTGG
AGATGTTTGGGTTTAAAGGTCCCGTACGAGCGCATCCTTGCTCCTTACTTACCAGGCCACCGTTC
```

> Ps 8: *P.fluorescens* strain NITDPY

```
AGGGGGGCCTACCCATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGG
GTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCG
CATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGG
ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA
ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTT
AAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCG
GCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGT
AAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATT
CAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACTGAGGTGCGAAA
GCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCAACTAGCCGTT
GGAAGCCTTGAGCTTTTGTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA
GCAACGCGAAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAAACTTTTCTAGAGATAGATTGGTGC
CCTTCGGGAAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGGAAATGGTTTGG
GTTTAAAGTCTCGTAACGAGCGCAATCCTTGGCTCCTTAGCTTAAACCAGGCACACCGGTTAAAT
G
```

> Ps: 12 *Pseudomonas* sp EP\_S\_49

```
GGGGCCTACCATGCAAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTGAGCGGCGGACGGGTG
AGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCAT
ACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTA
```

GCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTC  
 AACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG  
 GCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGT  
 TGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCCGGCTA  
 ACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA  
 GCGCGCGTAGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAA  
 ACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
 AGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT  
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGA  
 ATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAG  
 GTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAA  
 GCAACGCGAAGAACCCTTTACCACGGCCCTTGACATGCAGAGAAACTTTTTCCAGAGATGGGATTG  
 GTTGCCTTCTGGTAACCTCTGACACAGGTGCCTGGCAATGGCTGTCGTCAGCTCGTTCGTGATG  
 GATGGGGTTAAGTTCCTGACGAGCGCAGTCCATTGATTCCTTTAGTTAACTCAGC

> Ps 26: *P. fluorescens* strain d qe01

CGCGGCCTACCATGCCAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGT  
 GAGTAAAGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCA  
 TACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATT  
 AGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT  
 CACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG  
 GCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAG  
 TTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTCGAGTTACCGACAGAATAAGCACCCGGCT  
 AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA  
 AGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCA  
 AAACTGTGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT  
 ATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC  
 GTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG  
 GGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA  
 GGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAA  
 GCAACGCGAAGAAACCTTACCAGGGCCTTGACATCCAATGAAACTTTCCAGAGATGGATGGGTG  
 CTTCCGGGAAACATTGAGACAGGTGCTGCCATGGGCTGTCGTTACGCCTCGTTGTTCCGGTGAAGAA  
 ATTGCTCTGGGGCCATTATATAACAGGAGGCTACTATTATCTCTCGCTGGTTGGCTAGTACTATAC

> Ps 34: *P. fluorescens* strain NITDPY

TAGCGGGGGCATAACATGCAAGGTGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTTTGAGAGCGGCGG  
 ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAAT  
 ACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGT  
 CGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATG  
 ATCAGTCACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG  
 ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCA  
 CTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGC  
 ACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG  
 GCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG  
 CATTCAAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGC  
 GTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGC  
 GAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAG  
 CCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGG  
 CCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAAT  
 TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTTCTAGAGATAGATTGGT  
 GCCTTCGGGGAAACATTGAGACAGGTGCTTGCATGGGCTGTCGTTACGCTCGTGTTCGGTGAAGAT  
 GTTTGGGGTTAAGTTCCTGGTAACGAAGCCGCAAGCCCCCTTGATCCTTTTAGCTTAACTCCAGGC  
 CAATCGG

> Ps 43: *P. fluorescens* strain NITDPY

CTTTTTCCCTTGCCCTCGTTTACAACACTTCCCATGGTGTGACGGGGGGAGGGTTCAAGGCCCGG  
AACGTATTCACCGCAGCAAGGGGAACGGAAAGTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTTCGAGTTG  
CAGACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCGCCGGCTTGACGCCCTC  
TGCCCTACCATTTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCC  
ACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCGGTCTCCTTAAAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGA  
CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCA  
GCACCTGGGTTCTAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCA  
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT  
TCCTTTGAGTTTCACTTTCGCGACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACCTAACGCGTTACCTTCGATACT  
GCGTGCCAAATGACCCCAACATCCAGTTTCGATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGCTATCTAAT  
CCTGTTTGCCTTCCCCACGTTTTTCGGCTTCACTGTGAGTGCCTGGCCCCCGAACCTGCCTTCGCCAT  
GGATGTTCTCCCAAATCCTCTACGCATTTCACTGTTACACCGGGGTAATTTCCGCTACCTCTTCT  
ACCACACTTAATTTGTTCCAGTTTCCACTTGCCAGCTTCCCCAGG

>Ps 47:P fluorescens A506

CGTGGGGGGCCCTTACCATGCCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGG  
ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAAT  
ACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGT  
CGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATG  
ATCAGTCACACTGGAAGTGCAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGG  
ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCA  
CTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGC  
ACCGGTAACCTGTGCGCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGG  
GCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC  
CATTCAAACTGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAG  
CCGTTGGGAAGCCTTGGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTAC  
GGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  
ATTCGAAGCAACGCGAAGAAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATT  
GGTGCCTTCGGGAACCATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGGATGTT  
GGGTTTAAGTTCCCGTACGAAGCGCACTCTGGTTCCTTAGTTTACCTAAGCCACCGTTTCTG

> Ps 65: P fluorescens strain B-Exp9

CTACACCACCTTGTCTTCCCCTCCTTCCATGGTCAGACTAAAATACTTCTGGTGCAACCAACTCC  
ATGGAGAGAGGGGGGGTGTGCATGCCCGGGACGTATTCACCGCGACAGGAGAAGGGGGAGGA  
TTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGT  
AGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA  
GCTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCT  
TAGAGTGCCACCCTAACGTGCTGGAACCTAAGGACAAGGGTGGCGTTCGTTACGGGACTTAACCC  
AACATTTACAACCCAAGCTGACAACAGCCATGCATTTTTTCGGTTTTCAATGCTCCCAAAGGCACC  
AATCCATCTCTGGAAGTCCCTGGAATGTCAAAGCCTGGAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATT  
AAACCACATGTTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGCAATTTTAAAGTTTCAACCTTGCGCCCTC  
TCCCCCGGG

> Ps 66: P fluorescens strain DmBR 2

CCCCGGCGGGTAACCGTCCCTCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGG  
TGTGACGGGAGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTA  
GCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATT  
AGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGT  
AAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGT  
GCCACCATTACGTGCTGGTAACCTAAGGACAAGGGTTCGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATC  
TCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATC  
TCTAGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACCATG  
CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGC  
GGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAAGCTCAAGGCTTCCAACGGCTAGTTGACATCGTT

TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGACGTA  
 TTAGTCCAGGTGGTTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCCGCTACACAG  
 GAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGTCTGTGAGTTTTTGAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCC  
 GGGGATTTACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGGATTAACG  
 CTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGGTGTGTCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGTGCGGTAACGT  
 CAAAACCTGCCAGAGTTATTAATCTTACTAGCCCCCTTTCCTTCCCAAACCTTAAAGTGTCTTTACAAA  
 TCGAAGGACCGTTCCTTCCACACACGCGGCCAATTGGTCTTGGGGAATTCA

### Annexe 6: Sequence Partiel du gene ITS1 / ITS4 des souches de Fusarium.

>Seq1 [organism=Fusarium culmorum] F. culmorum Fus 1

ACCCCCCACTCGGCCAAGTTAACTCCCAACCCCCTGTGACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCA  
 GCCCGCGCCCCGTAAAAGGTGACGGCCCGCCGAGGAACCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACCTTC  
 TGAGTATAAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAG  
 AACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  
 ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAG  
 CTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCCAAATACATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCAT  
 AGCGTAGTAATTTACATATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTCAAACCCCCACTTCTGA  
 ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACCATATCACTAACCCGAGCCAC  
 CCCCCCCCC

>Seq2 [organism=Fusarium pseudograminearum] F.pseudograminearum Fus 2

GAGAGTTCACTCCCCAAACCCTGTGACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCCGCGCCCC  
 GTAAAACGGGACGGCCCGCCGAGGAACCCCAAACCTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTATAAAA  
 AACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAA  
 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC  
 GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGG  
 AGCTGCGTCCGCGCACTCCCCAAATACATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTA  
 CACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAACCCCAAACCTTCTGAATGTTGACCTCGGAT  
 CAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>Seq3 [organism=Fusarium pseudograminearum] F.pseudograminearum Fus 3

GGCTCAACTCCCAAACCCTGTGACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCCGCGCCCCGTA  
 AAACGGGACGGCCCGCCGAGGAACCCCAAACCTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTATAAAAAAC  
 AAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATG  
 CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCC  
 AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAG  
 CTGCGTCCGCGCACTCCCCAAATACATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACA  
 CATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAACCCCAAACCTTCTGAATGTTGACCTCGGATCA  
 GGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>Seq4 [organism=Fusarium pseudograminearum] F.pseudograminearum Fus 4

GATTCTTCTGATCCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCA  
 GTAACGATGTGTAATACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATGATTTGGGGAGTGCG  
 CGGACGCAGCTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCG  
 CCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTCACA  
 TTAATTATCGCATTTTGTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTT  
 GATTTATTTGTTTTTATACTCAGAAGTTCCACTAAAACAGAGTTTGGGGTTCTGCGCGGGGCCG  
 TCCCGTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACATAAGGTATGTTACAGGGGTTTGGG  
 AGTTGTAACCTCGGTAATGATCCCTTCCGAGGTTACCCCTAACGGG

## &gt;Seq5 [organism=Fusarium pseudograminearum] F.pseudograminearum Fus 5

TGGGGGTGAAATTCCCCAAACCCCCCTGTTGACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCG  
CCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCGAGGAACCCCAAACCTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTA  
TAAAAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA  
GCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG  
CGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTG  
TTGGGAGCTGCGTCCGCGCACTCCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTA  
ATTTACACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAAACCTTCTGAATGTTGACCT  
CGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAATCATTACCGAG  
TTTACAACCTCAAACCCTGCGTACATTCCCTTCGCTCGCCCCCGGAACCGCCCCCCCCCTAAAAA  
CGGAACGGCCGCATTCTTCTAACTGCCTCTTAGTCCACACCTCT

## &gt;Seq6 [organism=Fusarium pseudograminearum] F.pseudograminearum Fus 6

ACAAAATATGGTGTCTCAGGTTGTAGCTGGCTCCTCGGAGCAATGTGCACGCCCGCCATTTTTATC  
TTTCCACCTGTGCACCGACTGTAGGTCTGGATACCTCTCGCCGCAAGGCGGATGCGAGGGTTGCTC  
GTAAAGGGCTCCCCTCGAACTTCCAGGCTCTACGTCTTTTTACACACCCCAATAGTATGATGCAGA  
ATGTAGTCAATGGGCTTACAGCCTATAAAACACTATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCT  
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC  
GAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGCATTAAT  
TCTCAACCTCACCCGTTTTCTGAACGGGGTCGAGGCTTGGATGTGGGGGTTTGTGCAGGCTGCCTT  
ACTGGCGGTCTGCTCCCCTGAAATGCATTAGCGAGGTTTCATGCTGAACTTCCGTCTATTGGTGTGAT  
ATTATCTACCCGTGACGAGATCAGACTCGCTTCTAACCGTCCGCGAGGACATACCTTGCATTTG  
ACCTCAAATCAGTAGGACTACCCGCTGACTAGCATATCATAGCCGAGGAACGGATCATACGATAC  
TTATGGTGTCTCAGTTGAACTTGATCTCCGAGCCATGGGACGCCCGCCATTTTTTATCTTTTCTGTG  
ACCCGAACTGTGAAGGTGATACCTCTCTCGCTAGGGCGATGGCAAGGTTGTCTCTAAGTCTCTGAA  
TTCCAGGCTCAGAGTGTTAACCATAGTATGATGATGCAAGTGGATCTATGGTTCAGTCTTAAAC  
ATATACCTCGACAGGAATCTTGTGTCTCGCATGGAAGCGCGAAGGCTATATAGTGGCATTGCCAAT  
GGATGCAATTGAGCCTGTCTCTG

## &gt;Seq7 [organism=Fusarium pseudograminearum] F.pseudograminearum Fus 7

TTTTCCCTGCCCCCCCCCCCTCCCCTCGCCCCCGCCCGCTTACTCCAACCCTGTGACATACCT  
TATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCGAGGAACCCCAA  
ACTCTGTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTATAAAAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCT  
CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT  
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCG  
TCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCGTCCGCGCACTCCCCAAATACATTGGC  
GGTCACGTGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC  
GTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT  
CAATAAGCGGAGGAA

## &gt;Seq8 [organism=Fusarium pseudograminearum] F.pseudograminearum Fus 8

CGGGGTTCACTCCCCAACCCTGTGACATACCTTACTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCGGT  
AAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTTATTTGTAACCTTCTGAGTAAAACCA  
TAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAT  
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC  
CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGG  
GGATCGGCGAGCCTTATGGCAAGCCGGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCACTGCAGCCTCCATTG  
CGTAGTAGCTAACACCTCGAAACTGGAAACGCGGTGCGGCCAAGCCGTTAAAACCCCCCAACTT  
CTGAATGGTGGACCTCGGATCAGGGTAGGAAATACCCGCTGGAACCTTAAGCATTATCCAATAA  
GCGGAAGGAAGCCCCCTTACCGGGTTTTAAAATTCCAATCCTCCCCAAAAAACCTTAAGGGGCTGGG  
GAATCCCCCCCCCGCCACACCTGGCCCCCCCCCAAATACCCTCACCTTGTCTTCCGCCCCC  
TCCCCCCCCCACTCCCATTAACCTCACTTGTCCCCAGTTTTTTTTTTGTTTTTGGTTTGGTAGAA  
CGCTCAAATGCCCTACCAAATGTAAATTGG

## &gt;Seq9 [organism=Fusarium redolens] F.redolens Fus 9

ATCGAGACCCCCCCCCCCCCCGGCCCGGCTTCCCTCCCAACCCCTGTGACATACCTTACTGTTGCC  
TCGGCGGATCAGCCCGCGCCCGGTA AACACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTTT  
ATTTGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC  
ATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA  
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCC  
TCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCTTATGGCAAGCCGGCCCCGAAATCTAGTG  
GCGGTCTCACTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGTGCGGCCAA  
GCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC  
ATATCAATAAGCGGAGGAACCCCC

## &gt;Seq10 [organism=Fusarium pseudograminearum] F.pseudograminearum Fus 10

ACCCGGGTCGAGGTTCACTCCCAACCCCTGTGACATACCTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC  
GCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTTCTG  
AGTAAAACAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC  
ATTGCGCCCGCTGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGG  
GTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCCTTCTGGGCGGTGCCGCCCCGAAATACATTGGCGGTCTCG  
CTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCCGCAACTGGAACGCGGCGGGCCATGCCGTAAA  
ACCCCAACTTCTGAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTTAACTTAACATTATCAA  
TAAGCGGAAGGAAA

## &gt;Seq11 [organism=Alternaria graminicola] Fus 11

GTATCGTACCTGATCGAGGTCAAGGTTGAAAAAAGGCTTGCTGGACGCTGACCTTGGCTGGCGAAG  
AGCGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATGACTTTAAGGCGAGTCTCCA  
GCGAACTGGAGACAAAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACA  
GGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCT  
GCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT  
TGAAAGTTGTAATTAATTACGTTGTTACTGACGCTGATTGCTATTGCAAAAAGGTTTGTGGTTGGTCC  
TGAGGGCGGGCGAGCCTATTCTAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACACGGGTGAATAATTACAG  
AGGCCGGCCCCGCCGCGCACGCCGTGAAGCAGTGCTCAGCGGGGGTGTCCAGCCCGCCTTGTAT  
TGTGTAATGATCCCTCCGCAGCACCCCTACCGGAA

## &gt;Seq12 [organism=Fusarium redolens] F.redolens Fus 12

GTATCGTACATGATCCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGGTTTAAACGGCTTGGCCGCACCCGCGTTC  
CAGTTCGCGAGGTGTTAGCTACTACGCAATGGAGGCTGCAGTGAGACCGCCACTAGATTTCCGGGGC  
CGGCTTGCCATAAGGCTCGCCGATCCCAACACCAAACCCGAGGGCTTGGGGTTGAAATGACGCT  
CGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTG  
AATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATC  
CGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACAAATAAAAACAGAGTTTAGGG  
GTCCTCTGGCGGGCCGTTCCGTTTTACCGGGCGCGGGCTGATCCGCGAGGCAACAGTAAGGTATG  
TTCACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCTCGCAGGTCACCCTACGGA