

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention de master en biologie

Option : Microbiologie / Bactériologie

Contribution à la production de composés à effet antibiotiques de nature phénazinique par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Réalisé par : Mlle LEHALALI Meriem

Soutenue le 23/12/2013

Devant un jury composé de :

Mr BESSAAD A.	MCB	Président
M^{me} M^{ed} Mahmoud F.	MAA	Examinatrice
M^{me} KEBBAS S.	MAA	Examinatrice
M^{me} AIT SAADI N.	MAA	Promotrice

2012 / 2013

Remerciements

Avant tout, je remercie le Dieu le tout puissant, de m'avoir doté d'une forte volonté et d'un courage pour réaliser ce travail.

*Je tiens à remercier Mme **AIT SAADI**, la directrice de mémoire, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour, merci pour m'avoir permis de travailler sur un thème de recherche aussi novateur, riche et passionnant, pour la disponibilité aux moments les plus difficiles, merci pour ces qualités humaines, pédagogiques et scientifiques, sa sympathie, sa simplicité et sa patience, pour ces remarques pertinentes et éclairées qui m'ont permis de mieux structurer mes idées. J'ai appris à ses côtés, et je lui adresse toute ma gratitude. Merci Madame.*

*Je remercie Monsieur **BESSAD** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Mes remerciements vont également à Mme **KEBBAS** et Mme **M^{ed} MAHMOUD** d'avoir accepté de participer à ce jury malgré ses nombreuses occupations. Je leur témoigne toute ma gratitude.*

*Je tiens également à remercier Mme **MOUHAMED MAHMOUD**, qui a rendu possible la réalisation de ce mémoire, un grand merci pour son aide scientifique et ces orientations qui m'ont permis de progresser dans la réalisation de cette étude, merci pour ces encouragements et son amitié.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à Mr **BOUTOUMI**, professeur au département de chimie, qui a bien voulu me consacrer son temps pour la réalisation de mon travail. Que dieu le protège.*

*Un immense merci à Mr **TEFFAHI**, pour son accueil chaleureux lors de mon passage au niveau de laboratoire d'hygiène, j'exprime également toute ma gratitude aux ingénieurs du groupe **ANTIBIOTICAL SAIDAL**, pour leurs aides et leurs gentillesse.*

*Je remercie infiniment et sans exceptions les ingénieurs des laboratoires de département d'agronomie et de chimie, particulièrement Mme **Hadjer**, Mme **Samia** et Mme **Farida** pour leurs aides et leurs conseils.*

Dédicaces

Je dédie affectueusement ce travail :

*Aux êtres les plus chers au monde. **Mes parents**, qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

A l'étoile de ma vie, ma source de patience, de soutien et d'amour, ma sœur, à qui je souhaite beaucoup de succès et de réussite.

A mon très cher frère .Que dieu te garde et te protège.

A mes grands parents qui n'ont pas cessés de prier pour moi, que dieu les garde pour nous.

*A tous mes cousins, mes cousines, mes oncles et mes tantes et spécialement à ma tante **Houda**, qui n'as pas hésité à tout moment d'offrir son aide.*

*A ma chère sœur amie **Asma**, qui a toujours été présente à mes cotés, je te remercie pour ton aide, ta gentillesse et pour tous les moments inoubliables qu'on a pu vivre ensemble.*

*A mes meilleurs amis : **Ali, Ilhem, Hayat, Sara, Yasmina, Samia, Khadija, Souad, Miria, Zola, Mohamed, Ifyes.***

Tous les étudiants et étudiantes de l'option microbiologie-bactériologie 2013.

Tous ce qui m'aiment et que j'aime.

Meriem

Résumé

Notre travail porte sur la production de composé à effet antibiotique de nature volatile à savoir le cyanure d'hydrogène et la production et l'identification des molécules de nature phénazinique par quelques souches de *Pseudomonas* spp fluorescents isolées de la rhizosphère de quelques arbres pour une éventuelle utilisation comme des biopesticides à effet antifongique et/ou antibiotique.

Nous avons testé la production des cyanures d'hydrogènes sur 21 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents parmi eux 19 souches (90,47%) ont montré une cyanogènes positive.

Le test d'antagonisme réalisé *in vitro* a montré que les souches de *Pseudomonas* ont un effet antifongique plus élevées par rapport à leur effet antibactérien avec des diamètres de zones d'inhibition allant jusqu'à 3,9 cm enregistrés par la souche F48 vis-à-vis de *Colleosporium* sp , comparativement avec les résultats enregistrés vis-à-vis des bactéries avec un maximum de zone d'inhibition de 1,26 cm. Parmi ces souches antagonistes, trois souches ont été sélectionné par le test de détection des souches productrice de phénazine à savoir PI9, BB9 et F20.

L'effet de l'activité antimicrobienne a été réalisé sur différents milieux de culture (GN, King B, ISP2, PDA) .Les résultats de notre étude nous ont permis de retenir le milieu King B comme le milieu idéal pour la production de métabolite secondaire.

Les composés à effet antibiotiques phénaziniques produits ont été extraits par divers solvants organiques et d'après les résultats d'antibiographie contre des germes-cibles, les extraits à l'acétate d'éthyle ont donné de meilleurs résultats par rapport aux dichlorométhane et l'hexane.

Les analyses de ces composés à effet antibiotiques phénaziniques par la chromatographie en couche mince (CCM) et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) indiquent que les deux souches PI9 et F20 sont productrices de l'acide phénazines-1-carboxylique (PCA). La souche BB9 est suspectée productrice d'un autre composé phénazinique.

Les Mots Clés :

Pseudomonas spp. fluorescents, antagonisme *in vitro*, métabolite secondaire, les phénazines, Biopesticide.

ABSTRACT

Our work focuses on the production of compound antibiotic effect of volatile nature namely hydrogen cyanide and the production and identification of molecules phénazinique by some strains of fluorescent *Pseudomonas* spp isolated from the rhizosphere of some trees for a possible use as biopesticides antifungal effect and/or antibiotic.

We tested the production of hydrogen cyanide of 21 strains of fluorescent *Pseudomonas* spp among them 19 strains (90, 47%) showed a positive cyanogenesis.

The antagonism test executed *in vitro* showed that *Pseudomonas* strains have a higher antifungal effect relative to their antibacterial effect with diameters of inhibition zones up to 3, 9 cm recorded by the strain F48 against *Colleosporium sp*, compared with recorded results against bacteria with a maximum inhibition of 1, 26 cm. Among this antagonistic strain, three strains were selected by testing for producing phénazines namely PI9, BB9 and F20.

The effect of the antimicrobial activity was performed on different culture media (GN, King B, ISP2 and PDA). The results of our study allowed us to retain the King B medium as ideal medium for the production of secondary metabolite.

The produced phenazinique compounds was extracted from various organic solvents, and after the results of antibiographie against germs - targets, the extracts of ethyl acetate gave the best results compared to dichloromethane and hexane.

The Analysis of these compounds of antibiotic phenazinique effect with thin layer chromatography (CCM) and high performance liquid chromatography(HPLC) indicate that both strains PI9 and F20 are productive of phenazine-1-carboxylic acid (PCA). The BB9 strain is suspected to be productive of another phenazinique compound.

Key words: *Pseudomonas* ssp. fluorescents, antagonism *in vitro*, secondary metabolite, phenazines, biopesticide.

ملخص

يركز عملنا على إنتاج مركب بتأثير المضادات الحيوية ذا طبيعة متبخرة و هو سيانيد الهيدروجين و إنتاج و تحديد الجزيئات ذات الطبيعة الفينازينية عن طريق بعض سلالات *Pseudomonas spp fluorescents* المعزولة من التربة المحيطة بجذور بعض الأشجار لاستعمالها المحتمل كمبيدات حيوية ذات تأثير مضاد للفطريات أو مضاد للبكتيريا

اختبرنا إنتاج سيانيد الهيدروجين لدى 21 سلالة من *Pseudomonas spp fluorescents*، من بينهم 19 سلالة (90,47%) التي أظهرت إنتاج ايجابي لسيانيد الهيدروجين.

أظهرت تجارب التضاد التي أجريت في المختبر بأن سلالات *Pseudomonas* لهم تأثير مضاد للفطريات أعلى بالمقارنة مع تأثيرهم المضاد للبكتيريا بأقطار تصل إلى 3,9 cm مسجلة من طرف السلالة F48 ضد *Colleosporium sp* , مقارنة مع النتائج المسجلة ضد البكتيريا مع حد أقصى يصل إلى 1,26 cm. من بين هذه السلالات العدائية، تم اختيار 3 سلالات عن طريق اختبار كشف السلالات المنتجة للفينازين و هي F20 و BB9 و PI9 .

تأثير النشاط المضاد للبكتيريا نفذ في أوساط زراعية مختلفة (GN, king B, ISP2, PDA). سمحت نتائج دراستنا بالاحتفاظ بالوسط King B كوسط مثالي لإنتاج المركبات الثانوية.

تم استخلاص المركبات الفينازينية المنتجة بمذيبات عضوية مختلفة، وحسب النتائج الأنتيبيوغرافية ضد الجراثيم المستهدفة، فإن مستخلصات أسيتات الأثيل أعطت نتائج جيدة مقارنة بثنائي كلور الميثان والهكسان.

تبين تحاليل هذه المركبات ذات تأثير المضادات الحيوية الفينازينية عن طريق la chromatographie en couche mince (CCM) و la chromatographie liquide haute performance (HPLC) بأن السلالتين PI9 و F20 منتجتين لـ (PCA) حمض الفينازين -1- كربو كسيل ، ويعتقد بأن السلالة BB9 هي سلالة منتجة لمركب فينازيني آخر.

الكلمات المفتاحية:

Pseudomonas spp fluorescents، التضاد في المختبر، المركبات الثانوية، الفينازين، مبيدات حيوية.

Liste des abréviations

AC : Acétate d'éthyle.

AM: Acétate d'éthyle-méthanol.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.

CA: Chloroforme-acétone.

CCM: Chromatographie sur couche mince.

CWBI : Centre Wallon de Biologie Industrielle.

D :Dichlorométhane.

DAPG : Diacétylphloroglucinol.

DRB : Rhizobactéries Déléteres.

FOA: *Fusarium oxysporum albidinis*.

GGT : *Gaymanomyces graminis var tritici*

G+C: Guanine+Cytosine.

GN: Gélose nutritive.

H: Hexane.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HCN: Cyanure d'hydrogène.

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance.

ISP2: International *Streptomyces* project.

ISR : Résistance Systématique Induite.

KB: King B.

NBY: Nutrient Broth Yeast extract.

NPR: Nodule Promoting Rhizobacteria.

OH-PCA : Hydroxyphénazine.

OILB : Organisation International de Lutte Biologique.

PCA : L'acide phénazine-1-carboxylique.

PCN : Phénazine-1-carboxamide.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

PHPR: Plant Health Promoting Rhizobacteria .

PLT: Pyoluteorine

PRN: Pyrrolnitrine

QS: Quorum Sensing.

Rf : Rapport frontal.

TSA: Tryptone Soya Agar.

Liste des figures

Figure 1 : Le marché mondial des biopesticides microbiens en 2005.	2
Figure 2 : Illustration schématique de la rhizosphère.	3
Figure 3 : Les principaux mécanismes d'action des PGPR.	5
Figure 4 : Interactions entre les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents, les micro-organismes phytopathogènes et les cellules racinaires.	11
Figure 5 : Les composés antibiotiques produits par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents.	16
Figure 6 : Complexe de régulation GacS/GacA chez les <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	17
Figure 7 : Disposition des souches de <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis des isolats fongiques et bactériens.	26
Figure 8 : Illustration de la technique des stries croisées.	28
Figure 9 : Protocole de production et d'extraction des phénazines.	29
Figure 10 : Résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches sur milieu de culture GN.	36
Figure 11 : Résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches sur milieu de culture KB.	36
Figure 12 : Résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches sur milieu de culture ISP2.	37
Figure 13 : Résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches sur milieu de culture PDA.	37
Figure 14 : Activité des extraits organiques de la souche PI9.	39
Figure 15 : Activité des extraits organiques de la souche BB9.	39
Figure 16 : Activité des extraits organiques des souches F20.	
Figure 17 : Activité des extraits organiques de la souche CHAO.	40

Figure 18 : Bioautographie des extraits des surnageants de culture des souches PI9, BB9 , F20 sur AM après révélation	41
Figure 19 : Bioautographie des extraits des surnageants de culture des souches PI9, BB9, F20 sur CA après révélation	42
Figure 20 : Profil d'HPLC de l'étalon.	43
Figure 21 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat F20.	44
Figure 22 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat BB9.	44
Figure23 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat PI9.	44
Figure 24 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat CHAO45	

Liste des TABLEAUX

Tableau I : Antibiotiques produits par les agents de biocontrôle bactériens.	15
Tableau II : Origine des souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.	22
Tableau III : production de cyanide d'hydrogène par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents	33

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1 Les biopesticides microbiens	2
I.2 Généralités sur les rhizobactéries	3
I.2.1 Notion de la rhizosphere	3
I.2.2 Généralités sur Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).....	4
I.2.3 Rhizobactéries bénéfiques non symbiotiques.....	6
I.3 Les <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents	6
I.3.1 Généralité	6
I.3.2 Taxonomie	7
I.4 Intérêt de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent agro-écologique	9
I.5 Mécanismes d'action de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescent	10
I.5.1 Action directe	11
I.5.1.1 Stimulation de la croissance	12
I.5.1.2 Induction systémique de la résistance des plantes	12
I.5.2 Action indirect.....	12
I.5.2.1 La compétition trophique	13
I.5.2.2 L'antibiose	13
I.6 Phénazines	18

I.6.1 Structure	18
I.6.2 Biosynthèses.....	19
I.5.3 Role et mode d'action des phénazines	20

Chapitre II : Matériel et Méthode

II.1 Matériel.....	21
II.1.1 Matériel biologique.....	21
II.1.2 Matériel non biologique.....	23
II.2 Méthodes.....	23
II.2.1 Purification des souches.....	23
II.2.2 Recherche des composés à effet antibiotique.....	23
II.2.2.1 Production de substances volatiles (HCN).....	24
II.2.2.2 Production de substances diffusibles : Phénazines.....	24

Chapitre III : Résultats et discussions

III. 1 Résultats de la recherche des composés à effet antibiotique.....	33
III.1.1 Résultats de la Production de substances volatiles (HCN).....	33
III.1. 2 Résultats de la Production de substances diffusibles : Phénazines.....	34
III.1.2.1 Résultats de la sélection des souches antagonistes in vitro	34
III.1.2.2 Résultats de détection de la synthèse des phénazines in vitro.....	35
III.1.2.3 Résultats de l'activité antibiotique sur différents milieux de culture.....	35

III.1.2.4 L'extraction des composés à effet antibiotique phénazinique.....	38
Discussion	45
Conclusion	51
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction

Depuis un siècle, le control des maladies des plantes s'est principalement effectué par l'utilisation massive des pesticides qui s'avèrent toxiques non seulement pour les pathogènes, les plantes mais aussi pour le consommateur (**Weller et al., 2002**).

L'attention aujourd'hui semble se porter sur l'utilisation des biopesticides comme une alternative plus viable que les pesticides chimiques .Les biopesticides désignent les pesticides d'origine biologique ,c'est-à-dire des organismes vivants ou substances d'origine naturelle synthétisée par ces derniers et plus généralement, tout produit de protection des plantes qui n'est pas issu de la chimie (**Rocherfort et al., 2006**).

Les rhizobactéries du groupe PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ont été utilisées pour lutter contre les maladies d'origine telluriques. Plusieurs études ont montré la capacité des PGPR d'améliorer la croissance des plantes et d'intervenir dans le biocontrôle des agents phytopathogènes telluriques (**Lemanceau, 1992**).Différentes espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été rapportés à la fois comme PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobactéria) et comme souches de biocontrôle (**De Salmone et al., 2001**).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour leur activité antagoniste envers plusieurs phytopathogènes (**Haas et Défago, 2005**).Elles exercent leur activité antagoniste au moyen de différents mécanismes incluant l'antibiose. Chez les *Pseudomonas*, l'antibiose implique plusieurs molécules antifongiques et/ou antibiotiques telles que la phénazine, la pyrolutérine, la pyrrolnitrine et le 2,4-diacétylphloroglucinol (**Haas et Défago, 2005**).

Les composés phénaziniques produites dans la rhizosphère des plantes contribuent à l'activité de contrôle biologique (**Mavrodi et al., 2001**).

Dans ce sens que notre travaille a été orienté dans le but de mettre en évidence à partir d'une collection de souches de *Pseudomonas* spp fluorescents :

- La production de composé à effet antibiotique de nature volatile à savoir le cyanure d'hydrogène.
- la production et l'identification des molécules diffusibles de nature phénazinique.

I.1 Les biopesticides microbiens

Tout comme les autres agents de lutte biologique, les biopesticides microbiens sont écologiquement beaucoup plus compatibles que les produits chimiques et ont une spécificité accrue vis-à-vis des pathogènes contre lesquels ils sont dirigés. Ils sont par conséquent moins dommageables pour les organismes non ciblés de la microflore endogène qui exerce une action bénéfique sur les plantes (Fravel, 2005 ; Thakore, 2006). Ces agents microbiens sont utilisés à travers le monde dans les champs et dans les serres (Ji et al., 2006 ; Lee et al., 2006 ; Minuto et al., 2006 ; Saravanakumar et al., 2007), pour combattre un grand nombre de maladies causées par des pathogènes du sol (Paulitz et Bélanger, 2001 ; Fravel, 2005).

Le marché des pesticides synthétiques avait diminué au cours des 5 dernières années grâce au développement des biopesticides et des récoltes génétiquement modifiées. Les biopesticides représentent 2,5% des ventes de produits phytosanitaires, alors qu'il était seulement de 0,2% en 2000 (Thakore, 2006). Parmi les biopesticides microbiens, les produits à base de bactéries représentent 74% du marché mondial (Figure 1).

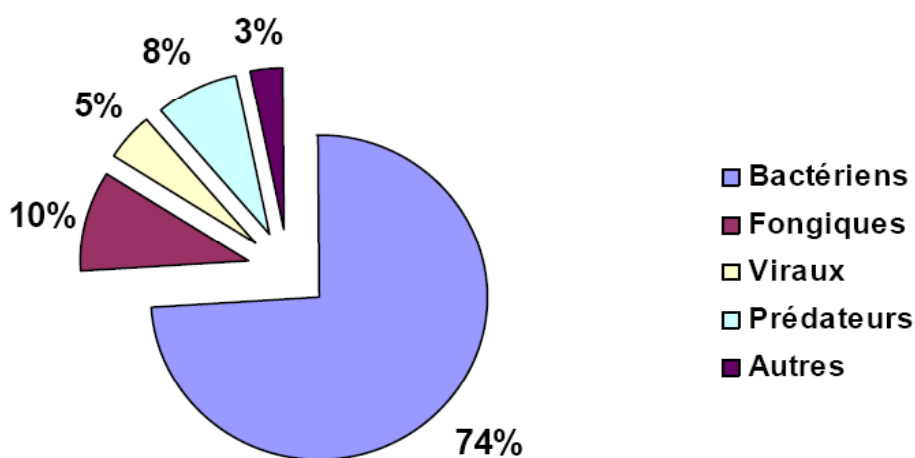


Figure 1 : Le marché mondial des biopesticides microbiens en 2005 (Thakore, 2006).

Les chercheurs travaillent à la mise au point de bactéries du sol colonisant les racines des plantes (rhizobactéries), pour améliorer la croissance des végétaux en empêchant les effets néfastes des agents pathogènes (exemple : champignon) (Boyetchko et Russel, 2009).

I.2 Généralités sur les rhizobactéries

I.2.1 Notion de la rhizosphère

La rhizosphère représente l'un des écosystèmes les plus complexes de la planète, presque toutes les racines de la planète devraient avoir une rhizosphère chimiquement, physiquement et biologiquement uniques (Maheshwari, 2010).

Le terme rhizosphère (étymologiquement rhiza : racine, sphère : ce qui entoure) a été proposé la première fois en 1904 par un chercheur Allemand (Hiltner) (Stengel et Gelin, 1998).

La rhizosphère est définie comme le volume de sol autour des racines vivantes, qui est influencée par l'activité racinaire (Hinsinger et al., 2009). On distingue en générale le rhizoplan qui est l'interface sol/ racine et le sol rhizosphérique qui est situé au voisinage immédiat de la racine et soumis à son influence (Cleyet-Marel et Hinsinger, 2000) (Figure 2).

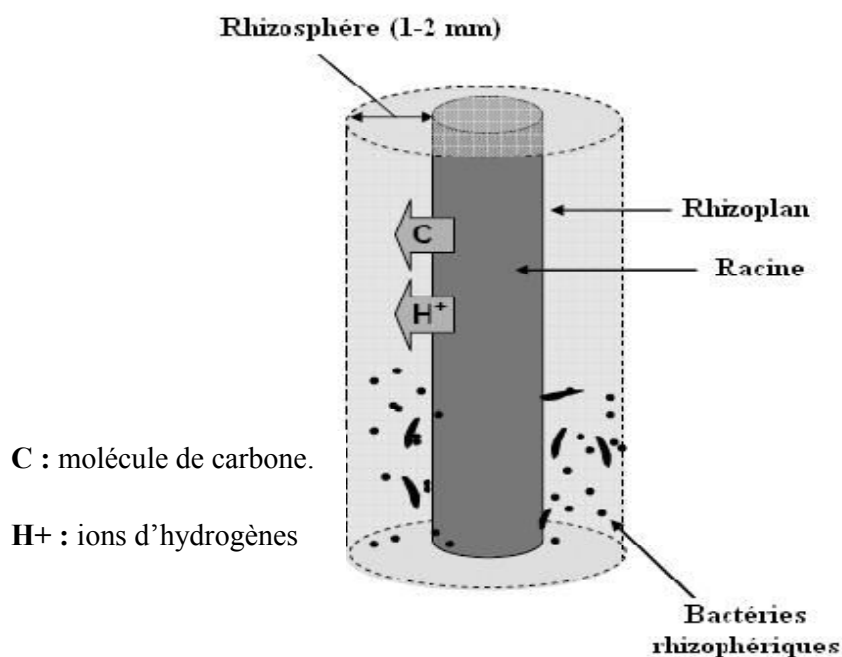


Figure 2 : Illustration schématique de la rhizosphère (Vega, 2007).

les systèmes racinaires modifient en effet leur environnement abiotique et biotique en libérant dans la rhizosphère des composés de diverses natures qui servent de substrats énergétiques aux communautés bactériennes (**Bais et al., 2004**), la libération de composés organiques par les racines vivantes des plantes est dénommée rhizodéposition (**Nguyen,2003**).L'exsudation racinaires fait partie du processus de la rhizodéposition (**Badri et Vivanco,2009**).

Les exsudats racinaires riches en acides aminés, monosaccharides et des acides organiques, constituent la principale source de nutriments, et le support dynamique de la croissance et des activités de divers micro-organismes dans le voisinage des racines (**Gnanamanickam, 2007**), la disponibilité des exsudats racinaires et leur acquisition par les micro-organismes sont essentiel à la multiplication microbienne dans la rhizosphère (**Oksinska et al., 2011**).

La rhizosphère des plantes est généralement occupée par les rhizobactéries délétères (DRB) qui peuvent inhiber la croissance des plantes, et les PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) (**Nehla et al., 1996**).Elles s'adaptent à l'environnement rhizosphérique et sont dénommées rhizobactéries (**Schroth et Hancock,1981**).

Les rhizobactéries sont considérées comme des concurrents microbiens efficaces dans la zone racinaire (**Bakker et al., 2007**).

I.2.2 Généralités sur Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) sont un groupe de bactéries vivantes libres qui colonisent la rhizosphère et permet la croissance des racines. (**Gnanamanickam, 2007**), Ils sont également nommé PHPR (Plant Health Promoting Rhizobacteria), ou NPR (Nodule Promoting Rhizobacteria) (**Hayat et al., 2010**)

Les PGPR permettent la croissance et le développement des plantes directement et indirectement par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes (**Hayat et al., 2010**) (**Figure 3**).

Nombreuses PGPR ont été identifiés comme agents de lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes, *Pseudomonas* spp, étant l'un des principaux groupes concernés (**De Bruijn, 2013**).

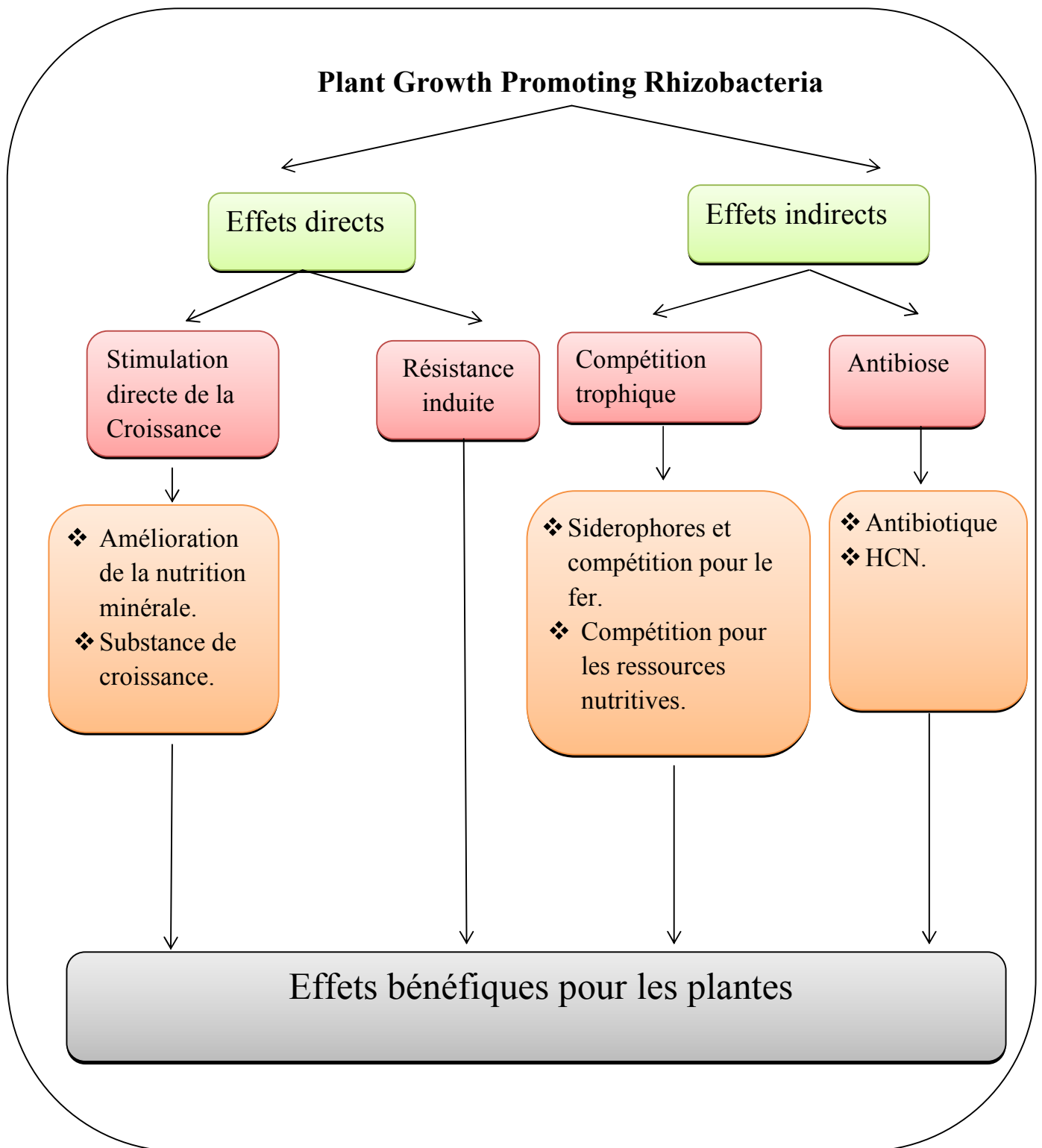


Figure 3 : Les principaux mécanismes d'action des PGPR (Mattar, 1993)

Les PGPR peuvent être divisés en deux groupes majeurs selon leur relation avec la plante hôte (**Khan, 2005**) :

1-Des rhizobactéries symbiotiques qui pourraient envahir l'intérieur des cellules (PGPR intracellulaires : par exemple : les bactéries des nodules).

2-Des rhizobactéries non symbiotiques qui restent à l'extérieur des cellules des plantes (PGPR extracellulaires : par exemple *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* ect).

I.2.3 Rhizobactéries bénéfiques non symbiotiques

Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces dont les plus étudiées sont : *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp* (**Lemanceau, 1992**). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol. Ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques et ils sont faciles à cultiver *in vitro* ou à manipuler au laboratoire (**Raaijmakers et al., 2002**).

I.3 Les *Pseudomonas spp* fluorescents

I.2.1 Généralité

Les *Pseudomonas spp.* fluorescents sont des bactéries qui se caractérisent par un rapport de bases azotées (C+G) allant de 58 à 70% (**Palleroni, 1984**). Ce sont des bacilles à gram négatif typique, chimiohétérotrophes mobiles avec un flagelle polaire (**Palleroni et al., 1973**). Elles peuvent se développer dans un milieu de base riche en éléments organiques ; à pH neutre et à une température comprise entre 4 et 43 °C (**Palleroni, 1984**). Ces bactéries non sporulantes sont aérobies obligatoires. (**Bossis et al., 2000**).

Les membres de ce groupe se caractérisent par leur aptitude à synthétiser en situation de carence en fer, des sidérophores présentant un groupe chromatophore jaune-vert fluorescent sous rayonnement ultraviolet (**Latour et Lemanceau, 1997**).

Pseudomonas fluorescents saprophytes sont ubiquitaires. Ils sont abondants dans divers environnements, tels que les environnements aquatiques et terrestres (**Delorme et al., 2002**), et

sont le groupe le plus étudié dans le genre *Pseudomonas* (**Shanmugam et al. ,2008**).Les espèces *P.fluorescens*, *P.putida* et *P.chlororaphis* se rencontrent dans divers biotopes à des densités élevées (**Benchabane, 2005**).

P.fluorescens et *P.putida* produisent la pyoverdine ;*P.fluorescens* peut être facilement distingué de *P.putida* par sa croissance à +4C° et une gélatinase + (**Monteil et Harf-Monteil .,2002**).

L'efficacité de certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent dans la protection biologique des plantes vis-à-vis de divers agents phytopathogènes, notamment ceux d'origine tellurique, a été démontrée dans de nombreux travaux (**Lugtenberget al., 2001 ;Ran et al.,2005**).

I.3.2 Taxonomie

Selon **Grimont (1998)**, le genre *Pseudomonas* est inclus dans :

- Règne : Bacteria
- Division : Proteobacteria
- Classe : Gammaproteobacteria
- Ordre : Pseudomonadales
- Famille : Pseudomonadaceae
- Genre : *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* appartient à la sous-classe de gamma-proteobacteria et comprend principalement *Pseudomonas* fluorescents ainsi que quelques espèces non fluorescents (**Botelho et Mendonça, 2006**).

Les *Pseudomonas* ont été regroupés en cinq groupes en fonction de la parenté de leurs gènes ARNr (I, II, III, IV, V) (**Maheshwari., 2013**).Actuellement, seuls les représentants de l'ARNr groupes I, sont inclus dans le genre *pseudomonas* et jusqu'à maintenant 128 espèces ont été valablement décrites pour ce genre, y compris les *pseudomonas* fluorescents (**Hofte et Altier, 2010**).

Le groupe de *Pseudomonas* fluorescent représente :

- 1) Les espèces phytopathogènes à cytochrome c oxydase-positive, comme *P. cichorii*, *P. marginalis* et *P. tolaasii*, (**Botelho et Mendonça ,2006**).
- 2) Les non-phytopathogènes, des souches non –nécrogènes, tels que *P.fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* et *P. aeruginosa* espèce type, (**Botelho et Mendonça ,2006**).
- 3) Les *Pseudomonas spp* fluorescent phytopathogènes nécrogène sans cytochrome c oxydase : *P. syringae* et *P .viridiflava* (**Botelho et Mendonça ,2006**).

Les *pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes renferment diverses espèces non pathogènes à cytochrome oxydase c552 positive (**Johnson et Palleroni, 1989**).Ce groupe a été représenté initialement par les espèces *P.chlororaphis*. *P.fluorescens*. *P.putida* et *P.aureofaciens* (**johnson et palleroni, 1989**) ; cette dernière a été rattachée par la suite à l'espèce *P.chlororaphis* (**Palleroni, 1984**).

Les études des caractères phénotypiques de *P.fluorescens* et de *P.putida* montre que ces deux espèces présentent une grande variabilité dans leurs subdivisions en biovars et intra biovars (sous-groupe) (**Bossis et al ., 2000**).*P.fluorescens* a été subdivisée en sept biotypes qui ont été par la suite regroupés en cinq biovars (I à V) (**Palleroni, 1984**), *P.putida* est subdivisée en deux biotypes A et B ou encore biovars A et B (**Bossis et al., 2000**).

I.4 Intérêt de *Pseudomonas* spp fluorescent agro-écologique

Les méthodes de lutte contre les ravageurs et les maladies à l'aide des pesticides chimiques peuvent être très efficaces, mais en même temps peuvent endommager l'environnement. En outre, l'utilisation répétée de ces produits chimiques encourage le développement de la résistance des organismes cibles, et a un effet négatif sur les organismes bénéfiques (**Garcia et al., 2004**).

L'incorporation des pesticides et d'insecticides nocifs comme des résidus présents dans nos produits agricoles a atteint un taux alarmant (**Maheshwari, 2013**). Récemment le centre d'intérêt a changé vers des stratégies respectueuses de l'environnement pour contrôler les pathogènes dévastatrices. (**Maheshwari, 2013**).

La lutte biologique par les bactéries rhizosphériques offre une alternative à l'utilisation de pesticides (**Mishra et Arora, 2012**). Selon l'OILB, la lutte biologique (en anglais: biological control ou biocontrol) consiste à utiliser des organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs et agents phytopathogènes (insectes, phanérogames, champignons et bactéries) (**Lepoivre, 2003**).

Les bactéries antagonistes sont considérées comme agents de lutte biologique idéales (**Mishra et Arora, 2012**). *Pseudomonas* fluorescents représentent un groupe important des bactéries de la rhizosphère qui ont un potentiel antagoniste prometteur pour une utilisation dans la lutte biologique contre les pathogènes telluriques fongiques. En raison de leur catabolique polyvalence, leurs excellentes capacités de coloniser les racines et leur capacité de produire une grande variété de métabolites antifongiques. *Pseudomonas* fluorescents ont reçu une attention particulière. Ils sont particulièrement adaptés à des applications comme agents de lutte biologique en agriculture parce qu'ils: (**Leefflang et al., 2002 ; Weller et al., 2002 ; Salman, 2010**).

- Peuvent utiliser des composés à l'intérieur des exsudats racinaires comme des nutriments.
- Sont abondamment présents dans les sols naturels, en particulier dans le système racinaire des plantes, qui est révélatrice de leur potentiel adaptatif.
- Ont un taux de croissance relativement élevé par rapport à beaucoup d'autres bactéries rhizosphériques.

- Elles assurent une protection efficace des plantes grâce à leurs propriétés suppressives de diverses maladies.
- Elles sont facilement manipulables par les techniques classiques de génétique et modernes de biologie moléculaire.

De nombreuses études ont mis en évidence les aptitudes de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent dans l'amélioration de la croissance et la protection sanitaire des plantes (**Meziane et al.,2005 ;Ton et al.,2005**). Ces rhizobactéries jouent aussi un rôle dans la préservation de l'environnement par la dissimilation des nitrates et la dégradation des composés xénobiotiques (**Lemanceau,1992**).

Parmi plusieurs agents de lutte biologique, *Pseudomonas* fluorescents sont équipées de multiples mécanismes de lutte biologique contre les agents phytopathogènes (**Alagesaboopathi et Selvankumar ,2011**).

I.5 Mécanismes d'action de *Pseudomonas* spp fluorescent

Les mécanismes par lesquels les agents de lutte biologique bactériens peuvent prodiguer leur effet protecteur sont multiples et peuvent varier pour un microorganisme donné en fonction du pathosystème (couple hôte végétal/pathogène) sur lequel il est appliqué (**Compant et al., 2005**).

Pseudomonas spp et plus spécifiquement les souches de *Pseudomonas* fluorescents peut supprimer les agents pathogènes des plantes transmises par le sol par une variété de mécanismes tels que la concurrence pour les ressources (par ex le fer, éléments nutritifs fournis par les racines) (**Costaa, 2006**), la résistance systémique induite (**Van Loon et al., 1998**), la production d'antibiotiques diffusibles (**Haas et Défago, 2005; Raaijmakers et al., 2002**), et cyanure d'hydrogène (**Van Loon, 2007**) (**Figure 4**).

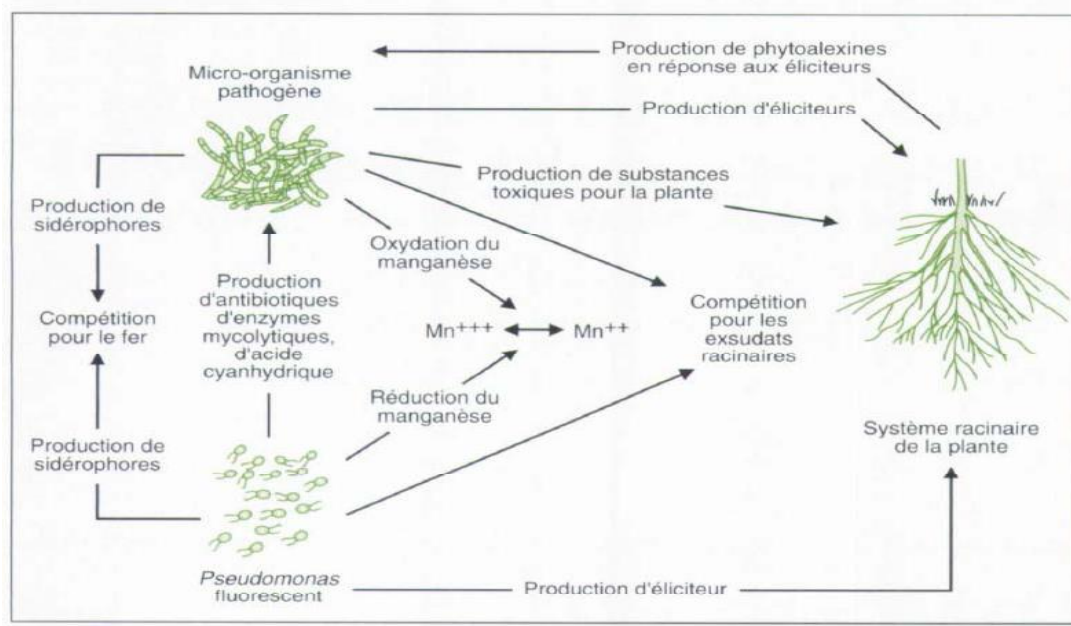


Figure 4 : Interactions entre les *Pseudomonas* spp. fluorescents, les micro-organismes phytopathogènes et les cellules racinaires (Jacques et al., 1993).

Selon Dowling et O'gara (1994) ; Parmer et Dadarwal (1999), les effets bénéfiques de ces rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol-racine et sont conditionnés par des actions directes et/ou indirectes sur la plante (Figure 3).

I.5.1 Action directe

Il s'agit de la modification du métabolisme et de la physiologie de la plante, les rhizobactéries secrètent des substances qui stimulent directement la croissance végétale (Lifshitz et al., 1987) et améliorent la résistance des plantes (Ton et al.,2001) .

I.5.1.1 Stimulation de la croissance

Les rhizobactéries exercent un effet bénéfique sur la croissance végétale (Cohen et al., 2005 ;Lidia et al.,2007 ; Sturz et Christie,2003). Les *Pseudomonas* spp fluorescents contribuent à l'amélioration de l'alimentation minérale des plantes essentiellement pour le fer, le phosphore, l'azote et le manganèse (Compant et al., 2005).

La réduction du manganèse du sol par les *Pseudomonas* spp fluorescents pourrait augmenter sa disponibilité et favoriser son assimilation par la plante (Weller et al., 2002).La sécrétion d'acides organiques et de phosphatases facilitent la conversion de formes insolubles

de phosphore en formes disponibles pour les plantes (**Richardson,2001**).Les espèces de *Pseudomonas spp* .fluorescents comme *P.chlororaphis* ,*P.putida* et *P.aeruginosa* ont été identifiés comme rhizobactéries solubilisant le phosphate (**Bano et Musarat,2003**).

Les siderophores peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer (**Lemanceau, 1992**).En effet, le fer ferrique chelaté par les siderophores peut être assimilé directement par le système racinaire (**Benchabane, 2005**).

1.5.1.2 Induction systémique de la résistance des plantes

La reconnaissance de certaines bactéries de la rhizosphère par la plante peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (**Van Loon, 2007**).Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (**Jourdan et al., 2008**).

Le phénomène d'induction de la résistance se traduit par une augmentation de la capacité de se défendre contre un large spectre d'agents pathogène (fongiques, bactéries et viraux) (**Pieterse et al., 2002**). Il a été démontré également que *Pseudomonas spp.* fluorescents peuvent jouer le rôle d'éliciteurs sur l'activation des gènes de défense des plantes (**Soylu et al., 2002**).

1.5.2 Action indirect

Elle concerne la modification des équilibres microbiens au niveau de la rhizosphère (**Kloepper et Schroth 1981**). Les *pseudomonas* fluorescents produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui pourraient jouer un rôle dans l'effet antagoniste de ces micro-organismes dans le sol. Ces agents inhibiteurs peuvent être scindés en quatre groupes : les antibiotiques, les siderophores, les enzymes et l'acide cyanhydrique (HCN) (**Jacques et al., 1993**).

I.4.2.1 La compétition trophique

La compétition consiste en « la consommation ou le contrôle de l'accès à une ressource comme les nutriments, l'espace ou tout autre facteur dont la disponibilité est limitée » (Widden, 1994). 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).

La compétition trophique instaurée par les *Pseudomonas* spp fluorescents porte particulièrement sur la compétition pour le fer (Loper et Buyer, 1991), par la synthèse des sidérophores et de protéines membranaires réceptrices (Dujiff et al., 1999) .

Les 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).

Les espèces de *Pseudomonas* fluorescents ont un grand pouvoir de chélation du fer et pourraient rendre l'ion ferrique inaccessible aux autre 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).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des siderophores appelés pyoverdines ou pseudobactines (Lemanceau, 1992), Toutefois, certaines souches de *Pseudomonas spp* produisent un autre sidérophore non fluorescent qui est la pyocheline avec une affinité inférieure pour le fer (Mercado-Blanco et al., 2001).

I.5.2.2 L'antibiose

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques (Defago, 1993 ; De Souza et al., 2003).

Les antibiotiques sont des métabolites microbiens bioactifs qui à faible concentration inhibent la croissance ou l'activité métabolique d'autres micro-organismes. Les antibiotiques naturels ont fait l'objet de la recherche intense pour les 70 dernières années (Mavrodi et al., 2011). Il est généralement admis que dans les écosystèmes terrestres, les antibiotiques

naturels s'accumulent en concentrations inhibitrices principalement dans des environnements riches en éléments nutritifs (**Mavrodi et al., 2011**).

Les antibiotiques constituent un mécanisme efficace de lutte contre les agents phytopathogènes d'autant que certaines de ces substances ont un large spectre d'action vis-à-vis des champignons (**Lepoivre, 2003**).

La production d'antibiotiques par certains *pseudomonas* spp fluorescents est maintenant reconnu comme un facteur important dans la capacité de lutte contre les maladies (**Ossilivan et Ogara , 1992**) . De nombreux *Pseudomonas* fluorescents sont capables de produire différents métabolites à activité antibiotique ou antifongique, tels que le 2-4 diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG), la pyolutéorine, la pyrrolnitrine, les phénazines, le HCN et les butyro-lactones (**Suty ,2010**) (**Tableau I**).

Tableau I : Antibiotiques produits par les agents de biocontrôle bactériens

Antibiotique	Espèce/souche	Référence
2,4-diacétylphloroglucinol	<i>Pseudomonas spp.</i> Q2-87 CHAO Pf-5 Q8r1-96	Vincent et al. (1991) Keel et al. (1992) Howell et Stipanovic (1979) Raaijmakers et Weller (2001)
Phénazines	<i>Pseudomonas spp.</i> 2-79RN ₁₀ 30-84 PCL1391	Weller (1983) Pierson et Thomashow (1992) Chin-A-Woeng et al.(1998)
Oomycine A	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Hv37a	Gutterson et al. (1986)
Pyolutéorine	<i>P. fluorescens</i> Pf-5 CHAO	Howell et Stipanovic (1979) Keel et al.(1992)
Pyrrrolnitrine	<i>P. fluorescens</i> BL915 <i>Burkholderia cepacia</i> B37w	Ligon et al.(2000) Burkhead et al.(1994)
Viscosinamide	<i>P. fluorescens</i> DR54	Nielsen et al. (1999)
Butyrolactones	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 63-28	Gamard et al. (1997)

(Raaijmakers et al.,2002)

Les premières molécules antibiotiques à avoir été isolées d'une souche (Pf-5) de *P. fluorescens* et identifiées sont la pyrrolnitrine en 1979 (Howell et Stipanovic, 1979), puis la pyolutéorine (Howell et Stipanovic, 1980). Par la suite, d'autres composés ont été isolés comme la phénazine (Thomashow et Weller, 1988), le DAPG (Vincent et al., 1991), la pyocyanine et la viscosamide (Nielsen et al., 1999) (Figure 5).

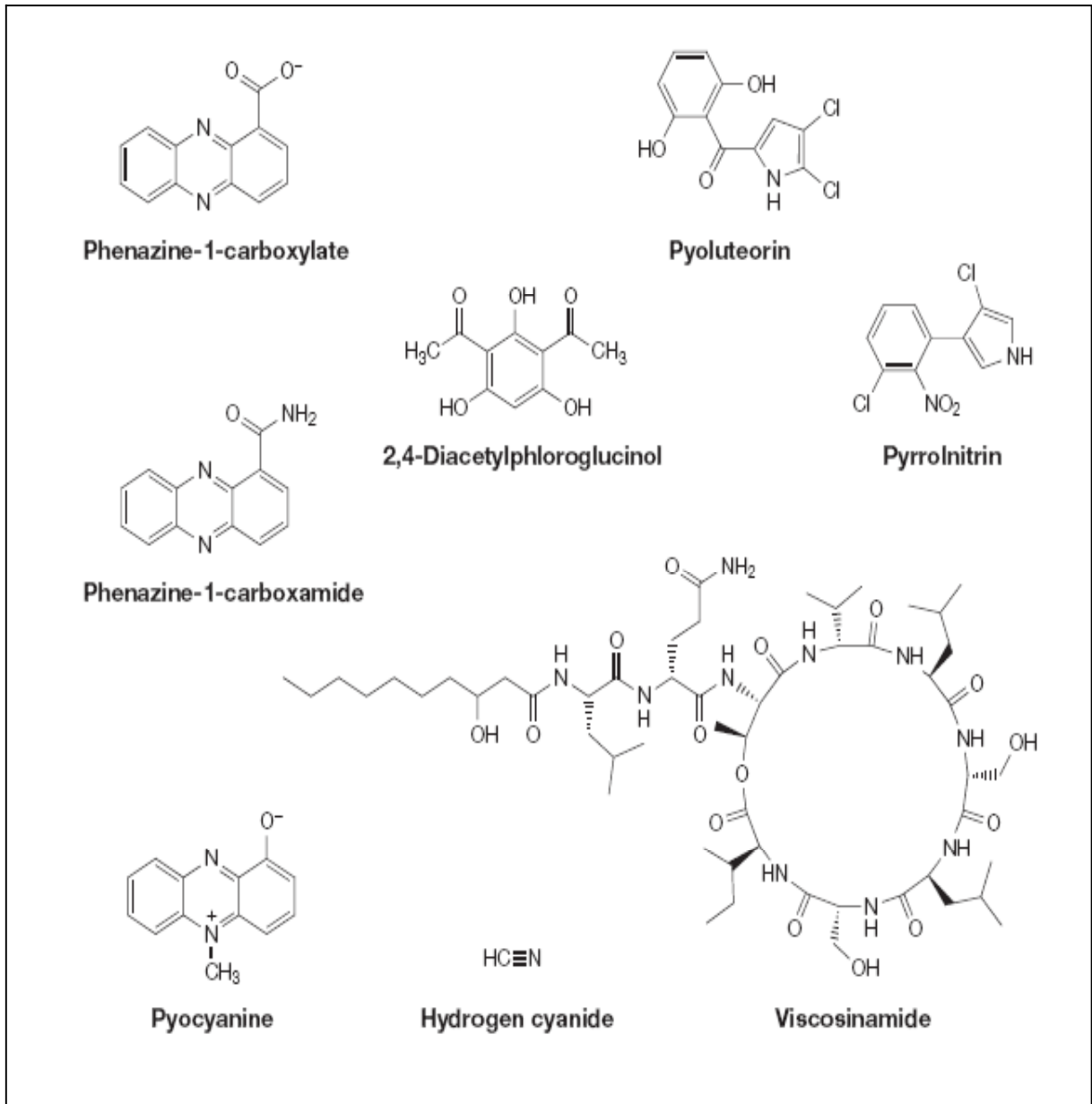


Figure 5 : Les composés antibiotiques produits par les *Pseudomonas fluorescens* (Haas et Défago, 2005).

- **Régulation de la production des antibiotiques par le genre *Pseudomonas***

Récemment, le complexe de régulation de ces gènes a été en partie élucidé. Ce complexe, nommé GacS/GacA, est impliqué dans le phénomène de QS (Quorum Sensing). Ce complexe est très conservé au sein des *Pseudomonas* et on retrouve des systèmes analogues chez d'autres espèces comme *Erwinia carotovora*, *Vibrio harveyi* et *Vibrio cholerae* (Bejerano-Sagie et Xavier, 2007). Chez les *P. fluorescens*, le récepteur membranaire GacS s'autophosphoryle à la réception d'un signal. La phosphorylation est transmise à la protéine GacA qui va activer la transcription d'ARNs Rsm Z, X, Y. Ces ARNs vont réprimer les répresseurs Rsm E et A des gènes de voies de biosynthèse des molécules antibiotiques et antifongiques (Figure 6).

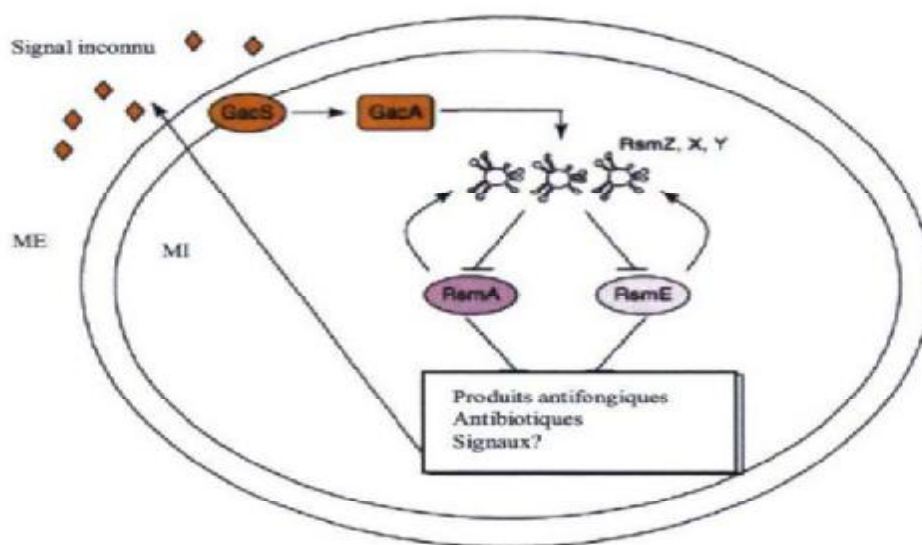


Figure 6 : Complexe de régulation GacS/GacA chez les *Pseudomonas fluorescens* (Bejerano-Sagie et Xavier, 2007).

Les composés antimicrobiens clés chez les *Pseudomonas* spp fluorescents sont les phénazines (Shanahan et al., 1992).

I.6 Phénazines

Les propriétés des antibiotiques sont connues depuis plus de 150 ans, mais les progrès au cours des deux dernières décennies ont fourni de nouvelles données importantes sur la génétique, la biochimie et la régulation de la synthèse des phénazines, ainsi que le mode d'action et le rôle fonctionnel de ces composés dans les nouvelles connaissances de l'environnement (**Mavrodi et al., 2006**).

I.6.1 Structure

Les phénazines représentent une vaste famille de molécules hétérocycliques azotées fortement pigmentées et capables d'une action antibiotique à large spectre (**Delaney et al., 2001 ; Chin-A-Woeng et al., 2003 ; Mavrodi et al., 1998**). L'aptitude à les produire est limitée aux bactéries (**Mavrodi et al., 2010**).

Les phénazines sont synthétisés par un nombre limité de genres bactériens, y compris *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Brevibacterium* et *Streptomyces* (**Mavrodi et al., 1998**). La capacité de produire les phénazines est bien documentée dans trois espèces de *Pseudomonas* vivant dans le sol: *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* (actuellement classé comme *P. chlororaphis*) et le pathogène opportuniste humain et animale *P. aeruginosa* (**Rehm, 2008**).

Les phénazines ont des spectres d'absorption caractéristique avec deux pics dans la plage des UV et au moins un pic dans la plage du visible qui détermine les couleurs (**Mavrodi et al., 2010**). Ces phénazines sont produites à la fin de la phase exponentielle et stationnaire (**Delaney et al., 2001**).

Plus de 50 phénazines sont présentement connues, toutes ayant le même noyau hétérocyclique, et certaines souches peuvent produire jusqu'à 10 dérivés différents en même temps (**Gross et Loper, 2009**).

I.6.2 Biosynthèses

La biosynthèse de ces composés semble débiter avec l'acide shikimique duquel est tiré le chorismate qui sera transformé en acide 2,3-dihydro-3-oxo anthranillique. Ce dernier pourra alors se dimériser pour former le premier composé de la famille, soit l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA). C'est à partir du PCA que seront dérivées les autres molécules comme la pyocyanine, la phénazine-1-carboxamide (PCN) et l'hydroxyphénazine (OH-PCA) (**Chin-A-Woeng et al., 2003**).

L'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) est l'un des principales substances antifongiques (**Li et al., 2010**), a été rapporté chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, comme *P. fluorescens* (**Gurusiddaiah et al., 1986**), *P. chlororaphis* (**Pierson et Thomashow, 1992**) et *P. aeruginosa* (**Anjaiah et al., 1998**). L'efficacité de la PCA a été démontré contre un nombre de champignons phytopathogènes comme *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium* sp., *Polyporus* sp., *Rhizoctonia solani*, et les bactéries pathogènes comme *Actinomyces viscosus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia amylovora* (**Thomashow et al., 1990**).

La phénazine-1-carboxamide (PCN), a aussi été rapportée chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, tel que *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis* (**Mavrodi et al., 2001**). La PCN diffère du PCA par la présence du groupement carboxamide (CONH) au lieu du groupement hydroxyle sur le carbone 1 du noyau phénazine (**Chin-A-Woeng et al., 1998**).

La pyocyanine (5-N-méthyl-1-hydroxyphénazine) est un facteur de pathogénicité produit par *P. aeruginosa* (**Gross et Loper, 2009**). Cette phénazine de couleur bleue est toxique pour une large gamme de bactéries et champignons (**Hassan et Fridovich, 1980**).

La voie de biosynthèse de base est hautement conservée dans *Pseudomonas* spp. fluorescent, mais diffère sensiblement de celle des autres genres bactériens producteurs de phénazine (**Mavrodi et al., 2001**).

Les conditions de croissance peuvent aussi influencer sur le nombre et les types de phénazines synthétisé par une souche individuelle (**Mavrodi et al., 1998**).

I.5.3 Role et mode d'action des phénazines

Dans le sol, les phénazines peuvent favoriser la réduction minérale microbienne et peuvent fonctionner comme des navettes électroniques, en facilitant l'accès des bactéries et des plantes au fer et aux nutriments tels que le phosphate, oligo-éléments et de composés organiques associés aux phases minérales (**Mavrodi et al., 2010**).

Ces hétérocycles expriment un large spectre d'activité sur les bactéries et les champignons (**Smirnov et Kiprianova, 1990**). Les phénazines jouent aussi un rôle dans la compétition rhizosphérique, incluant la survie et la compétence des bactéries productrices (**Mazzola et al., 1992**).

L'implication des phénazines dans la compétition écologique se traduit également par une action directe sur le biocontrôle des pathogènes racinaires fongiques (**Cook et al., 1995**).

Le spectre d'action étonnamment large des phénazines, ainsi que le mécanisme de cette action au niveau cellulaire ne sont pas à ce jour bien compris. On peut cependant croire, en se référant à la structure de ces molécules, que suite à leur diffusion à travers la membrane de la cellule cible, elles pourraient agir comme accepteur d'électron et court-circuiter la chaîne respiratoire. Cette interférence dans le transport normal des électrons aurait pour effet de produire une grande quantité de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'ions superoxyde O_2^- . La quantité de ces deux molécules cytotoxique serait alors suffisante pour surcharger la superoxide dismutase et mener directement à la mort de la cellule (**Delaney et al., 2001**). La bactérie productrice est protégée de l'effet de ces molécules par l'activité très élevée de la superoxyde dismutase (**Chin-A-Woeng et al., 2003**).

En présence de pyochéline chargée en ions ferreux, les phénazines catalysent la formation des radicaux libre, qui endommagent les lipides et autres macromolécules (**Haas et Défago, 2005**).

| Notre travail consiste à la contribution de la production de composés à effet antibiotiques de nature phénazinique par quelques souches de *Pseudomonas* spp fluorescents, a été réalisé au niveau de :

- Laboratoire de fin d'étude de biologie, d'agronomie, de chimie organique à l'université SAAD DAHLEB de Blida
- Laboratoires de microbiologie, physicochimie du groupe pharmaceutique ANTIBIOTICAL SAIDAL de Médéa.
- Laboratoire de l'EPH de Boufarik et laboratoire d'hygiène de Blida.

Durant une période allant du mois d'Avril jusqu'au mois de Novembre 2013.

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel biologique

II.1.1.1 Les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents

Des travaux antérieurs ont permis d'isoler 21 souches bactériennes issues de la rhizosphère de quelque arbre présentant les caractéristiques morphologiques et biochimiques des *Pseudomonas* spp fluorescents. (**Tableau II**).

Tableau II: Origine des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents

Les souches de <i>Pseudomonas</i>	Origine géographique	La rhizosphère de la plante
BB2	Bechar (Beni abbas)	Palmier dattier
BB6	Bechar (Beni abbas)	Palmier dattier
BB7	Bechar (Beni abbas)	Palmier dattier
BB9	Bechar (Beni abbas)	Palmier dattier
BB10	Bechar (Beni abbas)	Palmier dattier
BT3	Bechar(Taghit)	Palmier dattier
BT5	Bechar(Taghit)	Palmier dattier
BT7	Bechar(Taghit)	Palmier dattier
BS4	Bechar(Taghit)	Palmier dattier
F8	Ouargla	Palmier dattier
F19	Tipaza	Tomate
F20	Ouargla	Palmier dattier
F21	Ouargla	Palmier dattier
F25	Ouargla	Palmier dattier
F27	Tipaza	Tomate
F43	Tipaza	Tomate
F48	Tipaza	Tomate
F23	Ouargla	Palmier dattier
PI9	Ghardaïa	Poirier
PI11	Ghardaïa	Poirier
GP4	Ghardaïa (Metlili)	Pommier

II.1.1.2 Champignons et bactéries phytopathogènes

Les champignons et les bactéries phytopathogènes, provenant de la collection du laboratoire de phytopathologie d'Agronomie de Blida sont : *Ralstonia solanacearum* ,*Clavibacter michiganens* , *Agrobacterium tumefaciens* ,*Erwinia carotovora* et *Rhodotorula mucilaginosa* , *Geotriticum sp* ,*Gaeumannomyces graminis var tritici* ,*Pythium ultimum*, *Eutypia lata*, *Botrytis cinerea* ,*Fusarium oxysporum f sp lini* ,*Coleosporium sp* ,*Fomitiporia sp*.

II.1.1.3 Germes pathogènes

Les bactéries tests utilisées pour le test d'antibiogramme proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie du groupe ANTIBIOTICAL SAIDAL, il s'agit de 3 souches de références : *Escherichia coli* ATCC10536, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 .Nous avons utilisé également un champignon phytopathogène à savoir *Fusarium oxysporum f albedenis*.

II.1.1.4 Les Antibiotiques

La PCA « l'acide phénazine-1-carboxylique » (le standard), nous a été envoyé par le professeur THONART Philippe de laboratoire de biotechnologie microbienne de Gembloux (Centre Wallon de Biologie Industrielle « CWBI »).

II.1.2 Matériel non biologique

Nous avons utilisé comme matériel non biologique : les milieux de culture (**Annexe 2**), les produits chimiques, verreries et appareillages (**Annexe1**).

II.2 Méthodes

II.2.1 Purification des souches

La pureté des souches bactériennes de *Pseudomonas* a été vérifiée sur le milieu B de King (**King et al., 1954**) en réalisant plusieurs repiquages successifs. Les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents purifiées ont été conservées à une température de 4°C, sur le milieu cétrimide incliné (dans un tube à vis).

La purification des souches bactériennes pathogènes et phytopathogènes a été vérifiée sur le milieu GN (Gélose nutritif) en réalisant plusieurs repiquages successifs.

La purification des souches fongiques pathogènes est réalisée après plusieurs repiquages par transplantation successive des disques mycéliens du champignon dans des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé à base de pomme de terre : PDA (Potato Dextrose Agar) (**Johnston et Booth, 1983**).

II.2.2 Recherche des composés à effet antibiotique

II.2.2.1 Production de substances volatiles (HCN)

[La production de cyanide d'hydrogène (HCN) a été recherchée par la technique de **Bakker et Schippers (1987)**. Le milieu TSA (Tryptone Soya Agar) supplémenté avec 4,4 g/l de glycine a étéensemencé à partir d'une culture de *Pseudomonas* spp fluorescents âgée de 24h. Un papier Whatman n°1 (Ø= 8cm) imprégné d'une solution de couleur jaune (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium) a été déposé aseptiquement sur la face interne du couvercle de la boîte de Pétri ; scellée ensuite par le para film . Après incubation à 28 °C pendant 4 jours, la production d'HCN se traduit par le virage du papier du jaune à l'orange. Le cyanide d'hydrogène réagit en effet sur l'acide picrique pour donner une matière colorante (l'acide isopurpurique) qui exprime le virage de la couleur.] |

II.2.2.2 Production de substances diffusibles : Phénazines

➤ Sélection des souches antagonistes in vitro

La détection d'éventuelles activités antifongiques et antibactériennes des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents vis-à-vis d'une collection de microorganismes phytopathogènes composée de neuf isolats fongiques et quatre isolats bactériens.

Le pouvoir antimicrobien des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents a été déterminé par la mise en culture duelle des souches de *Pseudomonas* avec des champignons et bactéries phytopathogènes.

Pour les champignons, la méthode utilisée est celle décrite par **Vincent et al. , (1991)**. Les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents âgées de 24 h sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boîte de Pétri contenant du milieu King B (**Annexe 2**), à l'opposé un disque fongique de 6 mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte (**Figure 7-A**). L'ensemble est incubé à une température de 28 °C pendant une semaine. Trois répétitions ont été faite pour chaque interaction.

Les résultats sont notés lorsque la croissance des mycélia dans les boîtes des témoins atteint les points d'inoculation des souches bactériennes (**Hariprasad et al., 2009**). La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de

Pseudomonas comparé au témoin non inoculé indique la présence d'une activité antagoniste. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

$$I\% = [(R-r)/R] \times 100$$

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

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

r: diamètre de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (mm)

Les témoins dans le cas des cultures fongiques étaient représentés par des disques mycéliens de chaque isolat fongique sans la présence des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents.

Pour les bactéries phytopathogènes, des disques de papier wathman (n°3) imprégnés dans la crème bactérienne de *Pseudomonas* âgée de 24 h ont été déposés à la surface d'un milieu de culture, préalablementensemencé par les souches phytopathogènes puis incubé à 25 °C. Cette technique a été réalisée à raison de trois répétitions (**Figure 7-B**).

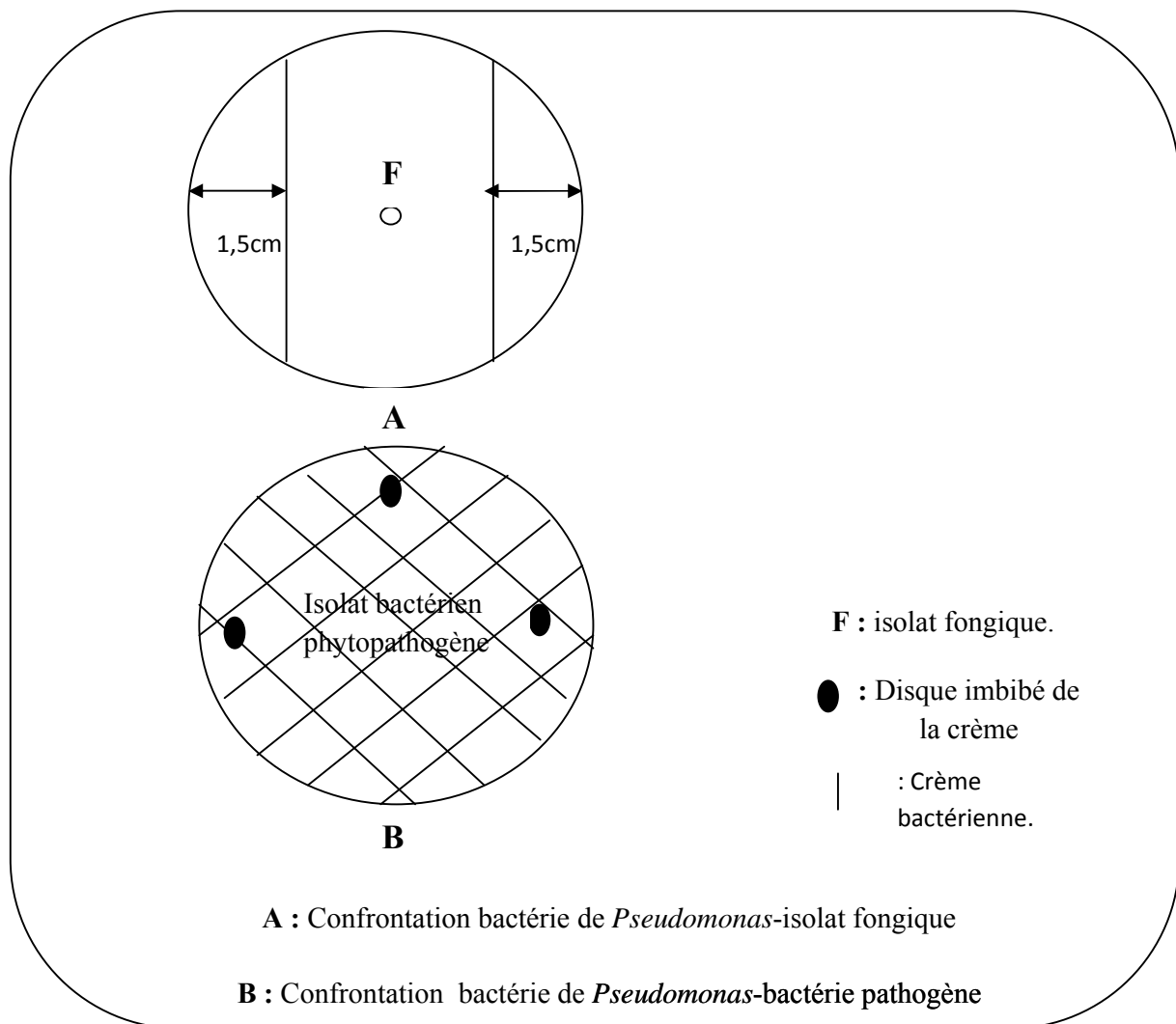


Figure 7 : Disposition des souches de *Pseudomonas* vis-à-vis des isolats fongiques et bactériens (Original, 2013).

➤ **Détection de la synthèse des phénazines *in vitro***

La production de phénazines, *in vitro*, a été recherchée selon la méthode de **Thomashow et Weller, (1988)**, dans le milieu NBY (Nutrient Broth Yeast extract) additionné de glucose (2%) sur les souches ayant manifestées un pouvoir antagoniste (les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents) vis-à-vis des souches pathogènes fongiques et bactériennes. Le milieu a été ensemencé avec une culture de 24h et incubé pendant 48h à 25°C.

L'examen des cultures sous UV (356 nm) montre le développement de colonies pigmentées avec des halos sombres noirâtres, révélateur d'une activité phénazinique.

➤ **Mise en évidence de l'activité antibiotique sur différents milieux de culture**

Les souches trouvées positives pour la production de phénazines, leur pouvoir antagoniste *in vitro* a été étudié de manière plus détaillée par la technique des stries croisées (**Williston et al., 1947 ; Waksman, 1945**). Celle-ci est une technique simple et pratique, largement utilisée dans les programmes de criblage pour des souches microbiennes productrices d'activités antibiotiques. Les tests ont été réalisés vis-à-vis de différents types de microorganismes et sur quatre milieux de culture différents :

- Le milieu King B ou « KB » (**King et al., 1954**).
- Le milieu gélose nutritive ou « GN » (**Gardan et Luisetti, 1981**).
- Le milieu Potato Dextrose Agar ou « PDA » (**Jonhston et Booth, 1982**).
- Le milieu ISP2 « International *Streptomyces* Project » (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Sur chaque milieu, en trois répétitions, les souches de *Pseudomonas* spp .fluorescents ont été ensemencées en un seul trait à la surface des milieux solides et en bordure de la boîte de Pétri et incubées à 28 °C. Après 24 h, les microorganismes à tester (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Fusarium oxysporum f albedenis*) ont été ensemencés en traits perpendiculaires au trait de culture précédemment réalisés et incubés à la même température pendant 2 à 5 jours.

A titre de témoins, les souches tests ont été cultivées selon la même procédure sans la présence de souches de *Pseudomonas* spp .fluorescents, pour évaluer leur croissance optimale dans les mêmes conditions de culture.

La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures des microorganismes tests et les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents suspectées productrices de phénazines.

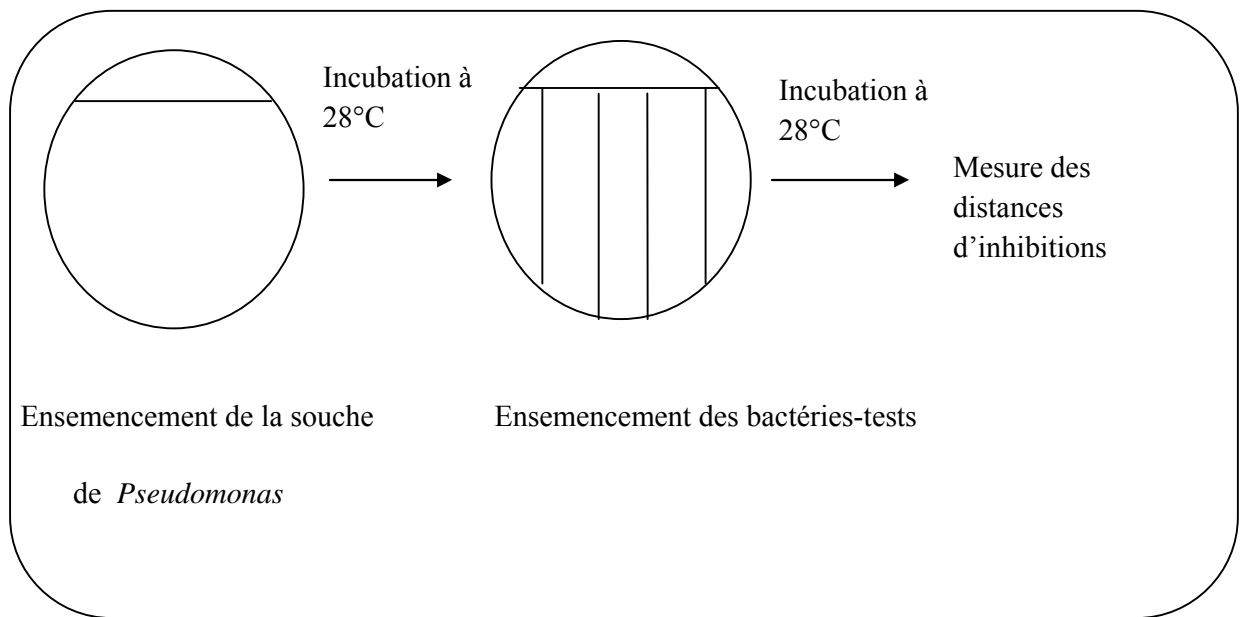


Figure 8 : Illustration de la technique des stries croisées (Original, 2013).

➤ **Extraction des composés à effet antibiotique : phénaziniques**

Les souches ayant montré une activité antimicrobienne ont été sélectionnées pour l'extraction de composés à effet antibiotique par solvant. Le protocole général d'extraction des antibiotiques de nature phénaziniques est illustré dans **la Figure 9 (Benchabane, 2005)**.

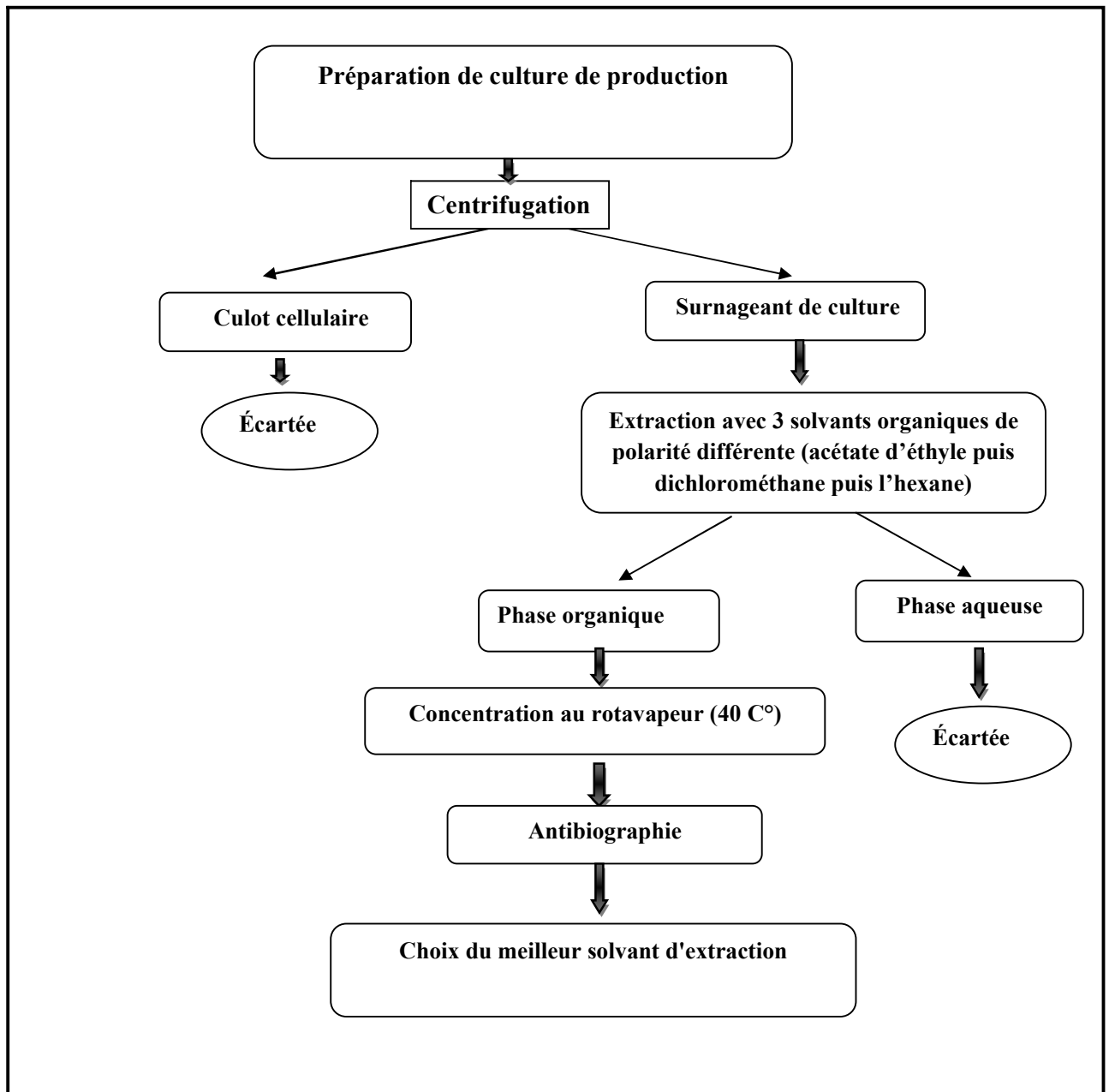


Figure 9 : Protocole de production et d'extraction des phénazines (Original, 2013).

Pour la préparation de la culture, chaque souche a été cultivée dans 100 ml de milieu King B à l'état liquide ensemencés avec 3 ml d'une préculture de 24 h ; l'incubation a été faite à 25 °C sous agitation continue (150 rpm) pendant 48h. La culture obtenue a été centrifugée (5000 tour / 15 min à la température ambiante).

L'extraction des composés antibiotiques a été faite à partir du surnageant de culture ; à cet effet trois solvants de différentes polarités ont été testés : acétate d'éthyle, dichlorométhane et l'hexane.

L'extraction a été effectuée dans une ampoule à décanter avec un mélange à volume égale de solvant(s)/surnageant de culture ; puis agité doucement quelques secondes avec dégazage de temps à autre.

Après agitation et décantation, les phases organiques ont été récupérées séparément, filtrées sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau, puis évaporées sous vide à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (de marque Buchi heating bath B-490).

Les extraits secs obtenus ont été récupérés dans 1 ml de méthanol avant d'être soumis à une antibiographie ; les résultats de cette dernière ont servi à déterminer le meilleur solvant d'extraction.

➤ **Antibiographie**

Les extraits obtenus à partir des surnageants de culture des souches productrices de phénazines plus la souche de référence (CHAO) ont été testés contre les microorganismes-cibles choisis : (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Staphylococcus aureus*).

Des disques de papier wathman (n°3) de 6 mm de diamètre ont été imprégnés avec 30 µl d'extrait organique, puis séchés totalement à l'aide d'un séchoir à froid. Les disques ont été ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 30 min avant d'être déposés stérilement à la surface d'une Muller Hinton, préalablement ensemencé par les microorganismes-tests.

Les boîtes sont d'abord mises à 4°C pendant 2 h pour une meilleure diffusion des éventuels composés antibiotiques et ensuite incubées 24 h à 28 °C.

La lecture des résultats consiste à déterminer le diamètre des zones d'inhibition autour des disques. Le solvant permettant d'obtenir le diamètre d'inhibition le plus élevé est considéré comme le meilleur solvant d'extraction.

➤ **Analyse des composés à effet antibiotique : phénaziniques**

Puisque, les *Pseudomonas* spp produisant les phénazines, synthétisent une mixture de composés phénaziniques (**Delanay et al., 2001**), il semble impératif d'essayer de fractionner l'extrait brut avant de chercher à l'identifier.

La purification des substances actives des souches de *Pseudomonas* a été réalisée par CCM et l'identification par HPLC.

A. Chromatographie en couche mince

Selon les descriptions de **Betina (1973)**, la séparation des composés à activité antibiotique, à partir des extraits de surnageant de chaque souche de *Pseudomonas* testée, a été réalisée par chromatographie en couche mince sur gel de silice (silcagel ; 20×20 cm, 0,25 mm d'épaisseur) dont le but de séparer les différents composés d'un mélange homogène et de les identifier.

Les échantillons (les extraits des souches productrices de phénazines) ont été déposés sous forme de spots de 150 µl à l'aide d'un capillaire à des points repères au bord inférieur de la plaque (le standard étant l'acide phénazine-1-carboxylique « PCA »). Puis ont été séchés par un séchoir.

Deux associations de solvants ont été appliquées : le solvant AM (acétate d'éthyle-méthanol ; 100/15) et le solvant CA (chloroforme-acétone ; 9/1).

Les plaques ont été placées dans les cuves en position verticale, lorsque le front du solvant se trouve à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque ; la plaque a été retirée et séchée à l'air libre, la position du front de solvant doit être marquée.

o La révélation chimique

La révélation chimique a été réalisée avec le formaldéhyde- H_2SO_4 révélateur de composés aromatiques polycycliques. Après pulvérisation des plaques avec le révélateur, les résultats ont été lus à chaud (5 min à 100°C) et le rapport frontal (Rf) a été calculé.

Le Rf est le rapport de la distance entre le dépôt et la tache active sur la distance séparant le dépôt du front du solvant.

$$R_f = \frac{\text{La distance entre le dépôt et la tache active}}{\text{La distance séparant le dépôt du front du solvant}}$$

B. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les spots ont été grattés et élués dans du méthanol sous agitation (100 rpm) pendant 2 h à la température ambiante. Après filtration du mélange (silice + méthanol), le filtrat limpide a été évaporé à sec et conservé au congélateur pour analyse ultérieure par HPLC.

Les extraits purifiés ont été analysés par HPLC (Appareil utilisé est de marque SHIMADZU). Les expérimentations ont été réalisées en phase inverse, la phase stationnaire de la colonne C18 est une silice greffée avec des groupements organiques apolaires et la phase mobile est polaire. Elle consiste en un mélange d'eau distillée et de méthanol avec un gradient continu : Eau-Méthanol (80-20%).

Le débit du solvant utilisé est fixée à 1 ml/min et la longueur d'onde de détection dans l'UV est de 220 nm. Avant l'injection des échantillons, la phase stationnaire (colonne) est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 10 min. Lorsque la colonne est stabilisée, 20 µl de l'extrait ultra-filtrés par un filtre de 0,45 µl est injecté à l'aide d'une seringue de 1 ml. Les résultats obtenus sont donné sous forme de chromatogramme.

III.1 Résultats de la recherche des composés à effet antibiotique

III.1.1 Résultats de la Production de substances volatiles (HCN)

La cyanogénèse a été recherchée par la technique de **Bakker et Schippers(1987)** sur les 21 souches de *Pseudomonas* spp fluorescent testées et sur les souches de référence. Les résultats sont illustrés par le **tableau III**.

Tableau III : production de cyanide d'hydrogène par les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents

Les souches de <i>Pseudomonas</i> testées	La production d'HCN	Les souches de référence	La production d'HCN
BB2	-	B445	++
BB6	++	B447	++
BB7	-	CHAO	++
BB9	+		
BB10	++		
BT3	++		
BT5	++		
BT7	++		
BS54	++		
F8	++		
F19	++		
F20	+		
F21	+		
F25	+		
F27	+		
F43	+		
F48	+		
F23	++		
PI9	++		
PI11	++		
GP4	+		

++ : Fortement productrice - : Aucune production + : Faiblement productrice

Parmi les souches testées, 19 souches ont montré une cyanogénèse positive, en comparant avec les souches de référence et deux ont montré une cyanogénèse négative (**Tableau III**). Pendant les premières 24 heures, un léger virage du papier imprégné d'acide picrique a été observé chez les souches HCN⁺, pour devenir plus apparent après 36h et net entre 48 à 72h. Montrant que la production va en s'intensifiant après 48h.

La production a été faible chez 6 souches de *Pseudomonas* fluorescents tandis qu'elle a été forte chez 13 souches. Ces dernières semblent les plus performantes en production de l'HCN, en virant la couleur du papier vers l'orangée foncée.

III.1. 2 Résultats de la Production de substances diffusibles : Phénazines

III.1.2.1 Sélection des souches antagonistes in vitro

Les résultats des tests de détection de l'activité antagoniste *in vitro*, réalisé par les 21 souches de *Pseudomonas* fluorescents vis-à-vis de neuf isolats fongiques et 4 isolats bactériens, montrent des activités antagonistes avec des taux variables.

Vingt-et-une souches de *Pseudomonas* spp fluorescents (100 %) ont montré des activités antagonistes au moins à l'encontre d'un agent phytopathogène fongique et bactérien, parmi lesquelles une souche a provoqué l'inhibition de la croissance de 50% des isolats, et 20 souches ont provoqué l'inhibition de la croissance de plus de 50% des isolats fongiques et bactériens parmi eux neuf souches ont montré l'inhibition de la croissance de la totalité des isolats phytopathogènes testées.

Le degré d'antagonisme varie selon que les interactions soient avec les bactéries ou les champignons.

Les résultats de l'effet antagoniste exercé par les champignons ont montré que 3 souches ont provoqué l'inhibition de moins de 50%, une souche a inhibé la croissance de 50% des isolats fongique et 16 souches ont provoqué l'inhibition de plus de 50% des isolats parmi eux 9 souches ont permis l'inhibition de la totalité des isolats fongiques.

Le taux le plus élevé a été enregistré par la souche F48 (78%) vis-à-vis de l'isolat *Colleosporium* sp, la souche BB6 (76%) vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et le taux le plus faible a été signalé par la souche F19 (2%) vis-à-vis de l'isolat *Geotriticum* sp.

Concernant les bactéries phytopathogènes, une souche a provoqué l'inhibition de moins de 50% et 20 souches ont noté une inhibition de plus de 50% des isolats bactériens parmi lesquelles 17 souches de *Pseudomonas* fluorescents ont provoqué un effet antagoniste à l'encontre de la totalité des isolats.

L'effet inhibiteur le plus élevé est noté pour la souche BB9 vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*, la souche F20 vis-à-vis de *Clavibacter michiganens*. En revanche 5 souches ont montré le plus faible effet vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum* et 7 vis-à-vis de *Erwinia carotovora*, 6 souches à l'encontre d'*Agrobacterium tumefaciens* et 7 souches à l'encontre de *Clavibacter michiganens*.

En comparant les résultats du test d'antagonisme, nous remarquons que les souches de *Pseudomonas* ont noté un taux d'inhibition plus élevé vis-à-vis des isolats fongiques par rapport aux bactéries phytopathogènes.

III.1.2.2 Résultats de détection de la synthèse des phénazines in vitro

Selon les résultats du test d'antagonisme qui a été réalisé sur les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents, 21 des souches étudiées (100%) ont possédé un effet antagoniste au moins à l'encontre d'un agent phytopathogène fongique et bactérien.

Les essais de la production des phénazines in vitro ont montré que parmi 21 souches antagonistes, trois souches (BB9, PI9, F20) ont révélé des zones sombres autour des colonies qui synthétisent des composés phénaziniques.

Nous rappelons que ces derniers ont manifesté un pouvoir antagoniste important vis-à-vis des souches pathogènes fongiques et bactériennes avec un taux allant de 62% enregistré par la souche F20 vis-à-vis de l'isolat *Colleosporium sp*, 66% par la BB9 vis-à-vis l'isolat *Geotriticum sp* et 70% par la souche PI9 vis-à-vis de l'isolat *Botrytis cinerea*.

D'après les résultats obtenus les souches PI9, BB9, F20 sont les souches suspectées productrice des composés phénaziniques, en plus de la souche de référence CHAO.

III.1.2.3 Résultats de l'activité antibiotique sur différents milieux de culture

Le pouvoir antimicrobien des 3 souches productrices de phénazines (PI9, BB9, F20) plus les deux souches de référence (B454, CHAO) a été déterminé par la méthode des stries croisées (Williston et al., 1947). Les résultats sont représentés par les figures 10, 11, 12, 13.

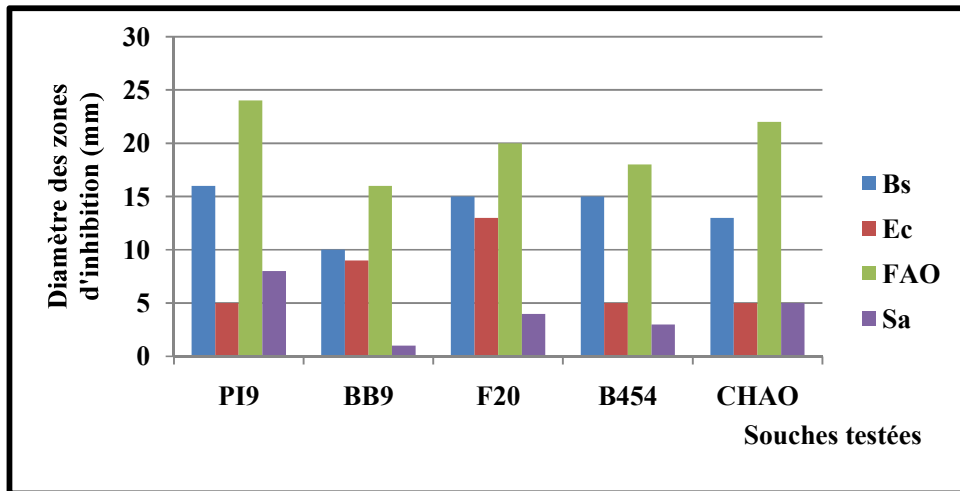


Figure 10: Résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches sur milieu de culture GN.

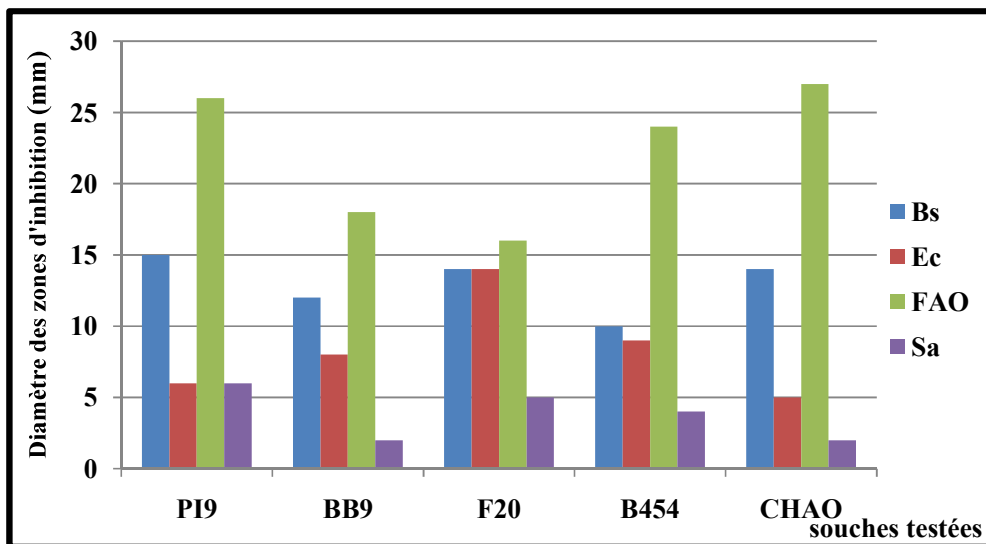


Figure 11: Résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches sur milieu de culture KB.

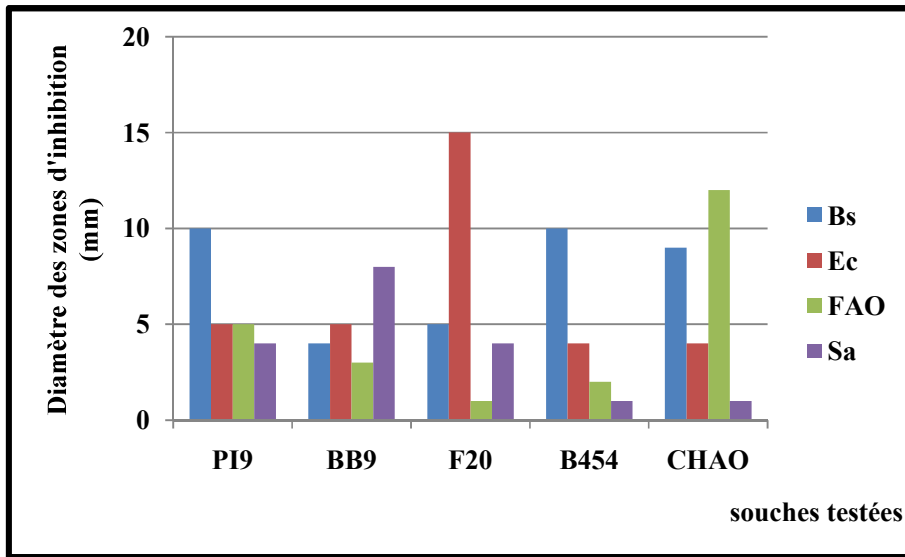


Figure 12 : Résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches sur milieu de culture ISP2.

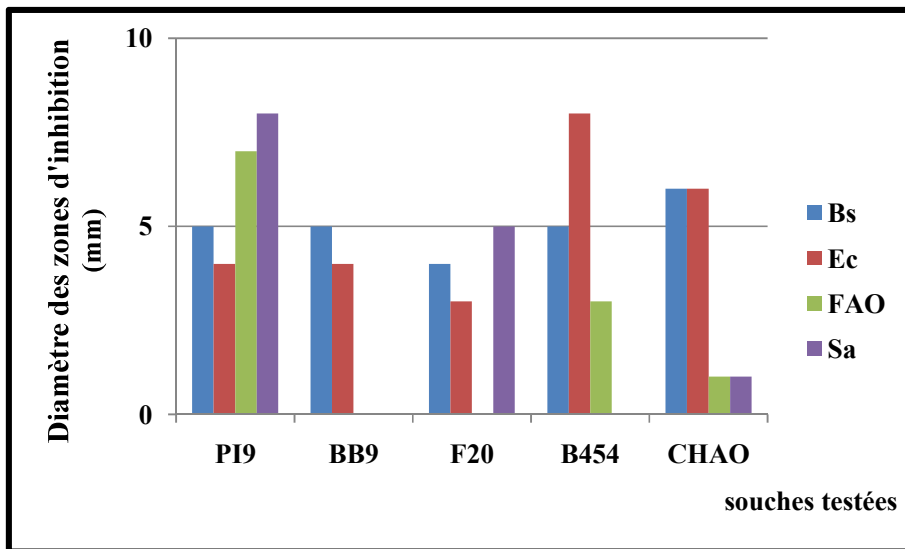


Figure 13: Résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches sur milieu de culture PDA.

D'après les résultats de l'activité antimicrobienne des différentes souches de *Pseudomonas* sur chaque milieu de culture, nous remarquons que Les activités antimicrobiennes des souches PI9, BB9, F20 s'étendent sur la majorité des germes testés .Cependant, leur intensité varie selon les germes cibles et aussi selon les milieux de culture utilisés.

Sur le milieu GN nous avons obtenus une forte inhibition par les souches PI9, F20 vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition respectivement de l'ordre de 16 mm et 8 mm et des activités moyennes contre *Escherichia coli* et *Fusarium oxysporum* (**Figure 10**).

Sur le milieu King B , Le diamètre de la zone d'inhibition le plus élevé est enregistré par la souche PI9 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* après la souche de référence CHAO , alors que le plus faible diamètre a été signalé par la souche BB9 et la CHAO vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (2 mm).Ce milieu a donnée de meilleurs résultats vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*, *Bacillus subtilis* ,*Escherichia coli* et un degré moindre contre *Staphylococcus aureus* pour la majorité des souches de *Pseudomonas*(**Figure 11**).

Concernant le milieu ISP2, l'activité antimicrobienne est faible vis-à-vis de différents souches pathogènes testées (**Figure 12**).

Comparativement, le milieu PDA n'a pas donné des résultats intéressants, nous avons observé une très faible activité antimicrobienne, ce dernier était le moins performant (**Figure 13**).

En comparant les résultats de diamètre des zones d'inhibition par rapport aux milieux utilisés (GN, KB, ISP2 et PDA), nous remarquons que les diamètres sont plus élevés sur le milieu KB.

III.1.2.4 L'extraction des composés à effet antibiotique phénazinique

L'extraction des composés à effet antibiotique a été effectuée à partir des souches PI9, BB9, F20 dans le milieu de culture King B qui a donné de meilleurs résultats de point de vue activité biologique .Les extraits obtenus ont été testés par antibiographie afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction.

A. Résultats de l'antibiogramme

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le meilleur solvant d'extraction. Cette étude est basée sur la mesure de diamètre des halos d'inhibition de l'extrait obtenu. Les résultats qualitatifs du pouvoir antimicrobien sur les souches étudiées sont représentés dans les figures 14, 15, 16 et 17.

A : Extrait à l'acétate d'éthyle, **D** : Extrait au dichlorométhane, **H** : Extrait à l'hexane.

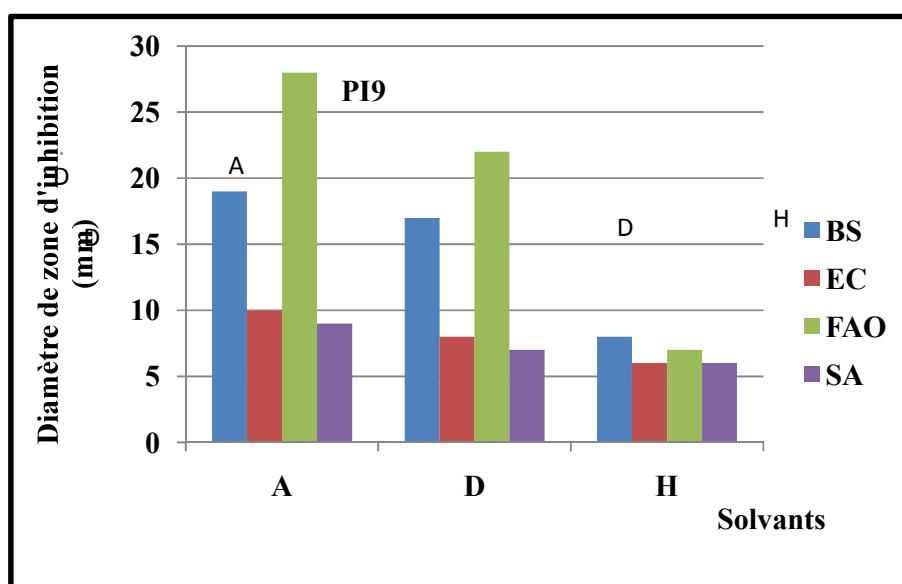


Figure 14: Activité des extraits organiques de la souche PI9.

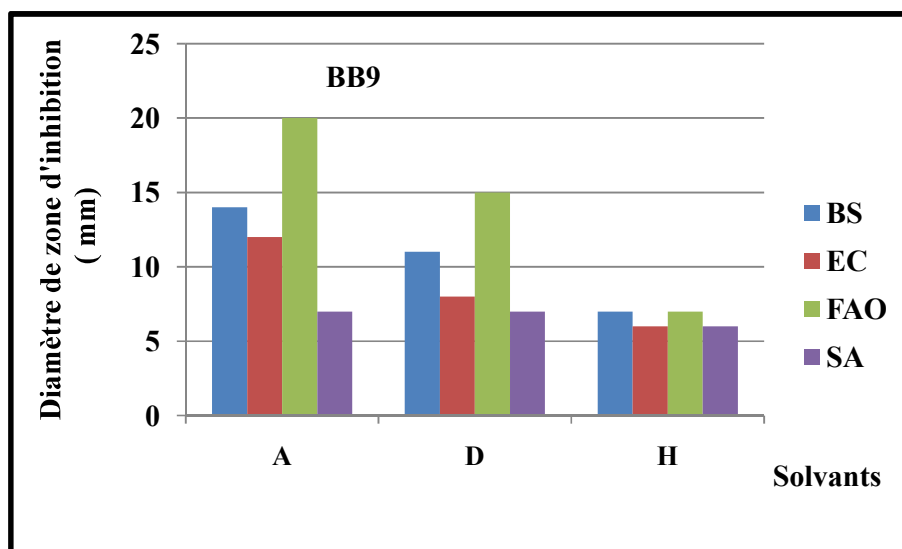


Figure 15 : Activité des extraits organiques de la souche BB9.

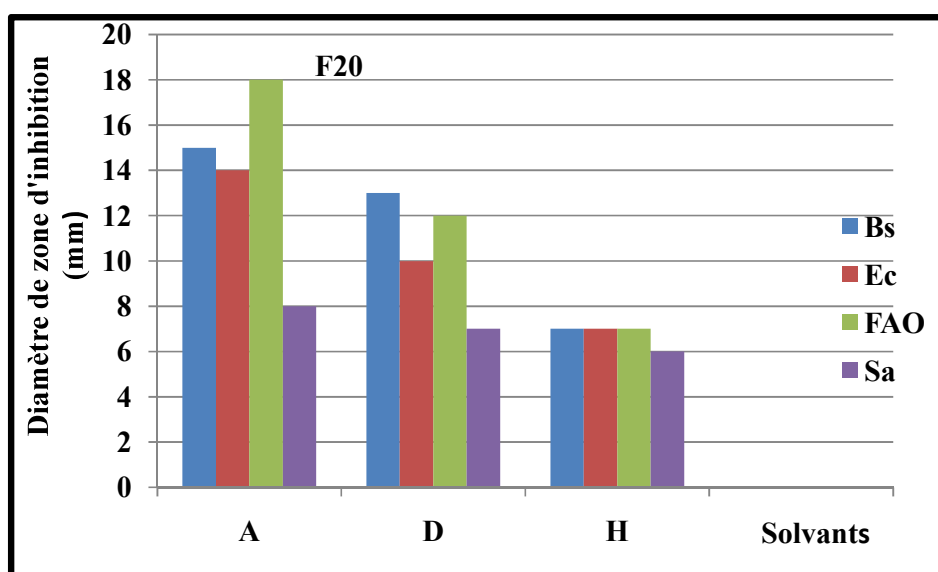


Figure 16 : Activité des extraits organiques de la souche F20.

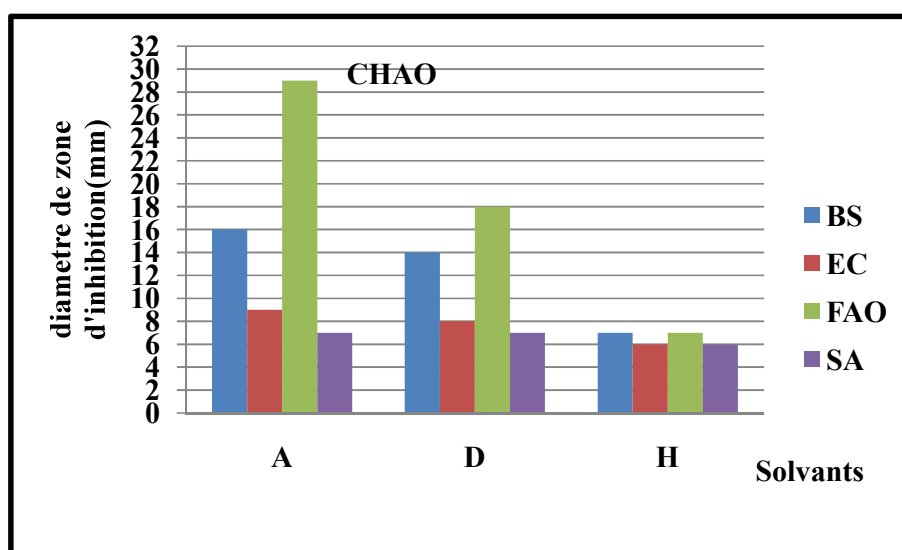


Figure 17 : Activité des extraits organiques de la souche CHAO.

D'après les résultats mentionnés dans les figures ci-dessus, nous remarquons que les diamètres des zones d'inhibition varient d'un solvant à un autre. L'extrait à l'acétate d'éthyle s'est montré efficace contre *Bacillus subtilis* et *Foa* pour les souches *PI9*, *BB9*, *F20* et la *CHAO*. La zone d'inhibition enregistrée s'étend de 14 mm à 19 mm contre *Bacillus subtilis* et de 18 mm à 28 mm contre *Foa*. Pour le dichlorométhane les zones d'inhibitions s'étendent de 11 mm à 17 mm contre *Bacillus* et de 8 mm à 10 mm contre *E. coli* et de 12 à 18 mm contre *Foa*. Pour l'hexane les zones d'inhibition s'étendent de 6 à 8 mm. La zone d'inhibition

enregistrée contre *Staphylococcus aureus* s'étend de 6 mm à 9 mm pour toutes les souches de *Pseudomonas* et dans tous les solvants utilisés.

Le métabolite extrait au moyen de l'acétate d'éthyle a empêché la croissance de la plupart des microbes pathogènes examinés, le deuxième solvant était le dichlorométhane puis l'hexane. Ceci atteste que le meilleur solvant d'extraction était l'acétate d'éthyle suivi par le dichlorométhane. Les résultats ont été inintéressants pour l'hexane.

Les disques témoins qui ont été imbibés par les solvants utilisés lors de l'extraction et séchés dans les mêmes conditions ont été testés et n'ont révélé aucune activité antimicrobienne.

B. Résultat de la Chromatographie en couche mince

La chromatographie en couche mince a été établie dont le but de la purification. Les extraits obtenus par le meilleur solvant d'extraction provenant du surnageant de la culture de milieu King B ont été déposés au bord inférieur de la plaque, après migration du solvant les résultats ont été notés et illustrés dans la **figure 18 et 19**.

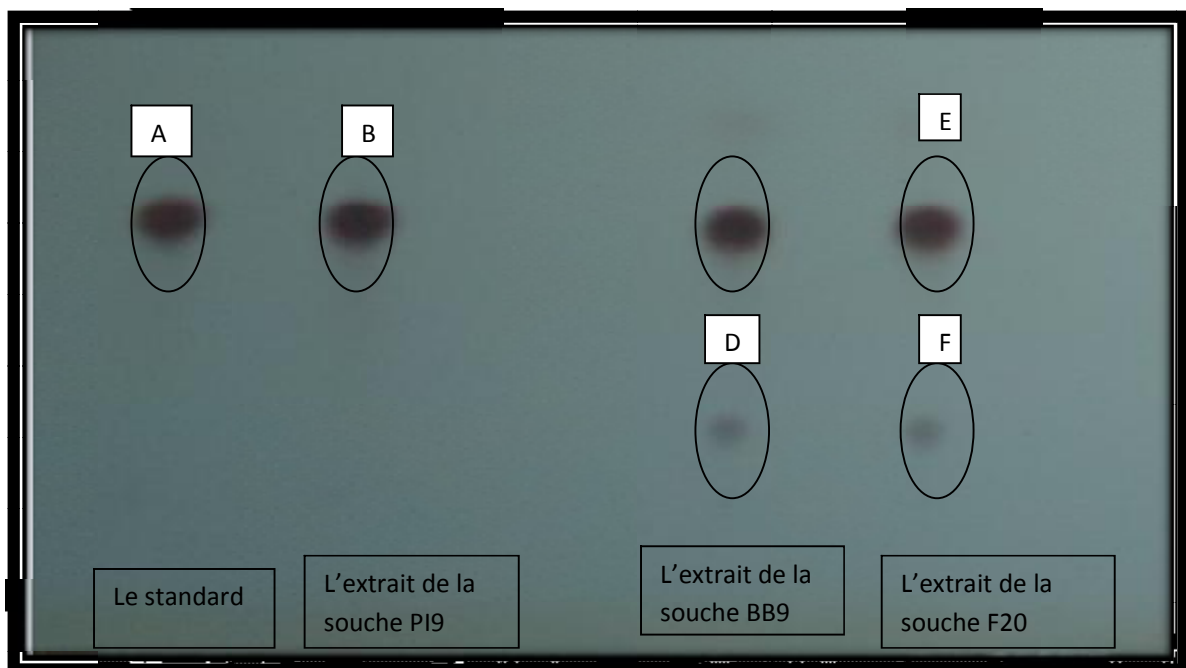


Figure 18 : Bioautographie des extraits des surnageants de culture des souches PI9, BB9, F20 sur AM après révélation (Originale, 2013).

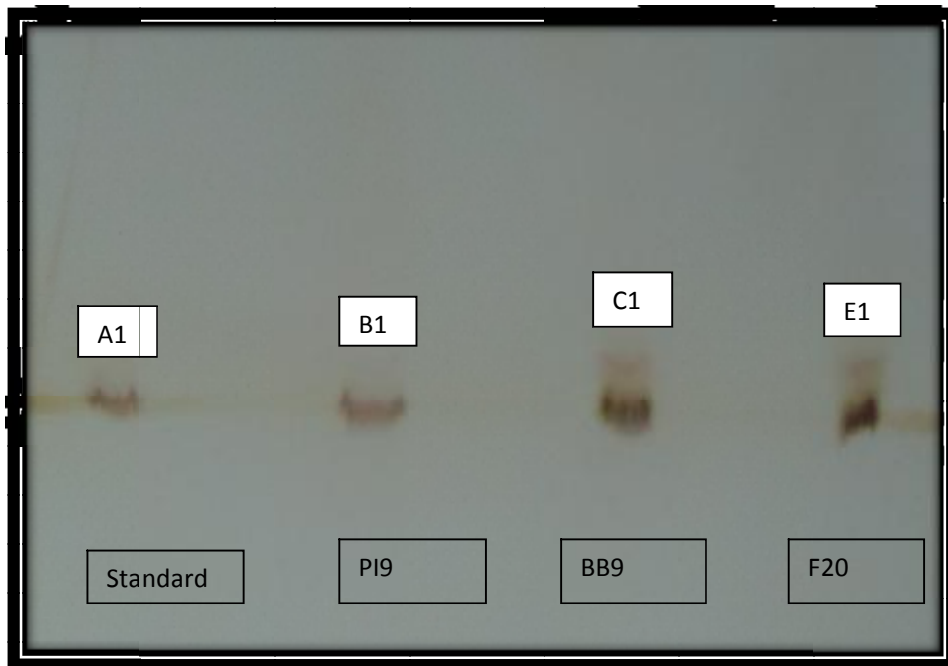


Figure 19: Bioautographie des extraits des surnageants de culture des souches PI9, BB9, F20 sur CA après révélation (Original, 2013).

D'après les résultats obtenus de la phase mobile acétate d'éthyle-méthanol (AM), le nombre des taches détectées sont les suivants :

- Pour le standard, une tache nommée A.
- Pour la souche PI9, une tache nommée B.
- Pour la souche BB9, deux taches nommée C et D.
- Pour la souche F20, deux taches nommée E et F.

Pour la phase mobile chloroforme-acétone (CA), le nombre des taches détectées sont :

- Pour le standard, une tache nommée A1.
- Pour la souche PI9, une tache nommée B2.
- Pour la souche BB9, une tache nommée C1.
- Pour la souche F20, une tache nommée E1.

La phase mobile AM permet d'obtenir une bonne séparation des différents composés contenus dans les extraits de la souche PI9, BB9, F20 que celle de la phase mobile CA où la séparation n'a pu être obtenue.

Ces résultats ont permis de retenir le premier mélange AM comme phase mobile idéale pour la séparation de différentes fractions des extraits des 3 souches.

Après la révélation chimique par le formaldéhyde- H_2SO_4 (révélateur de composés aromatiques polycycliques).L'extrait de surnageant de chaque culture sur milieu King B a révélé 1 tache actif colorée sur AM.

Les composés B et E des extraits des souches PI9, F20 ont montré une ressemblance avec la molécule standard l'acide phénazine 1-carboxylique (**Figure18**).Tandis que le composé C a un Rapport frontal (Rf) différent de Rapport frontal du standard, ce qui permet d'affirmer que ce dernier est un autre type de phénazines.

C. Résultats de l'analyse par HPLC

La mise en évidence et l'identification des composés à effet antibiotiques phénaziniques a été réalisé par HPLC. Les composés C.B.E et le composé de la souche de référence CHAO ont été purifiés par chromatographie sur couche mince.

L'identification des phénazines a été réalisée en comparaison avec l'élution du standard (PCA) dans les mêmes conditions expérimentales. Les différents chromatogrammes de l'HPLC sont illustrés sur les Figures suivantes :

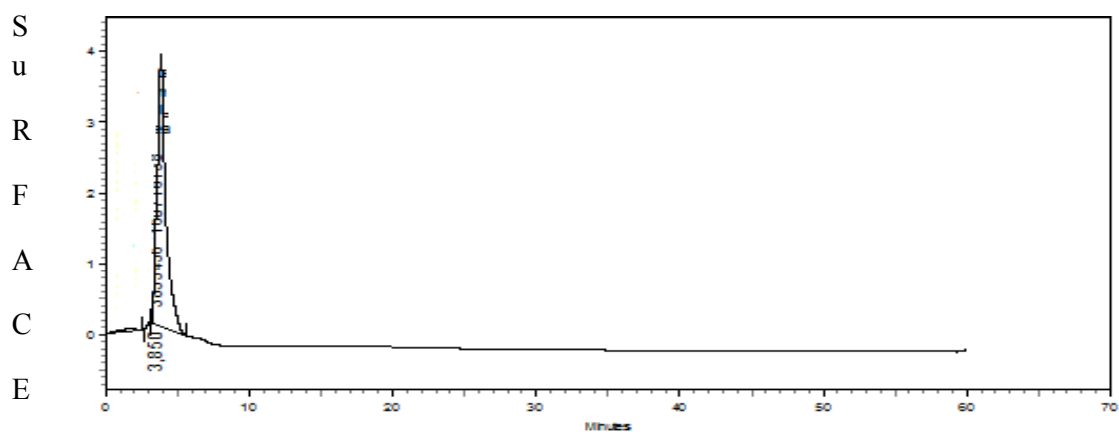


Figure 20: Profil d'HPLC de l'étalon

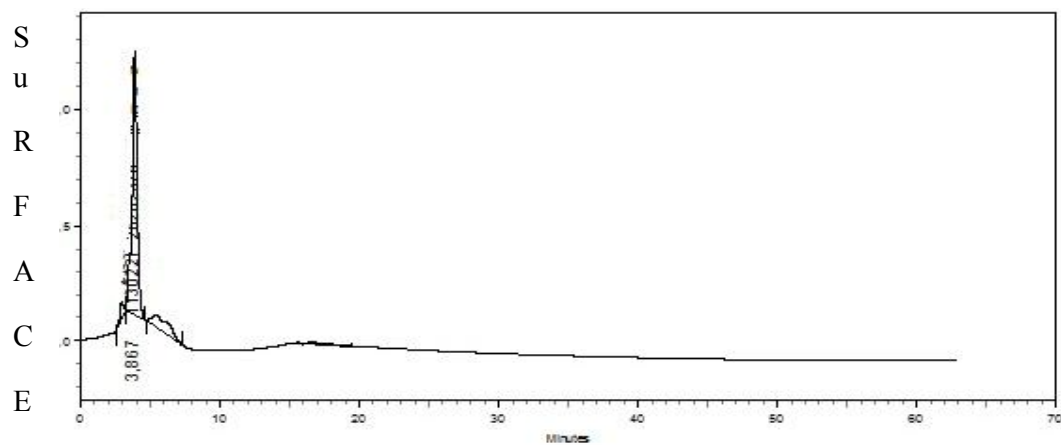


Figure 21: Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat F20

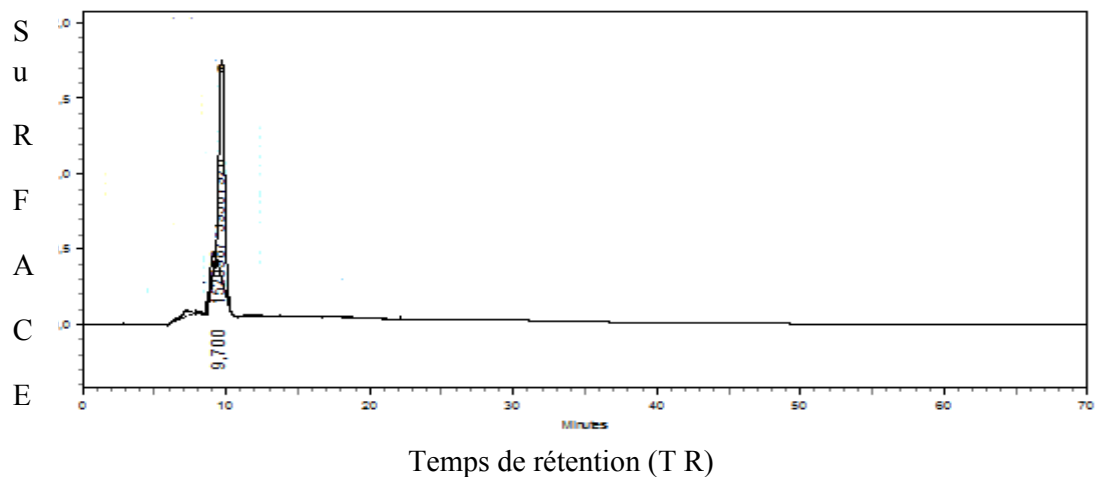


Figure 22 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat BB9

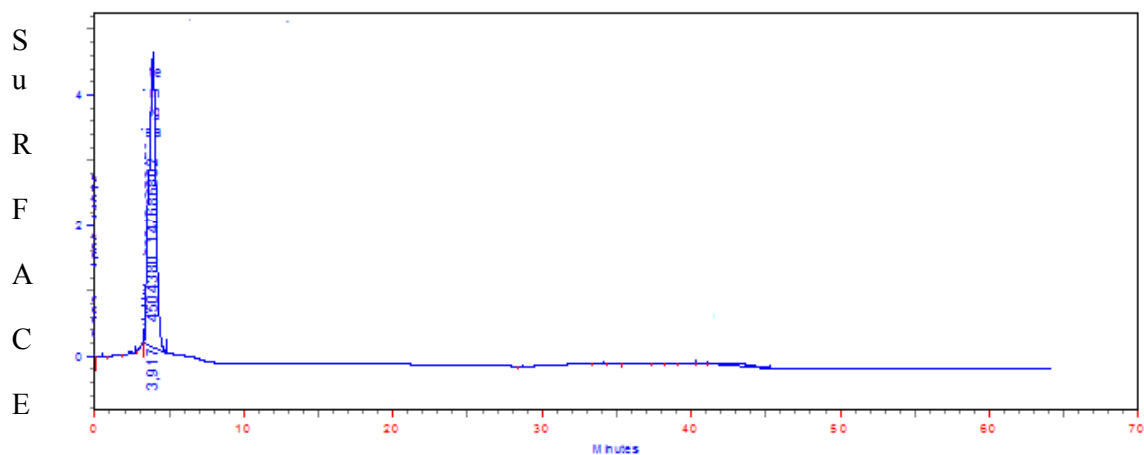
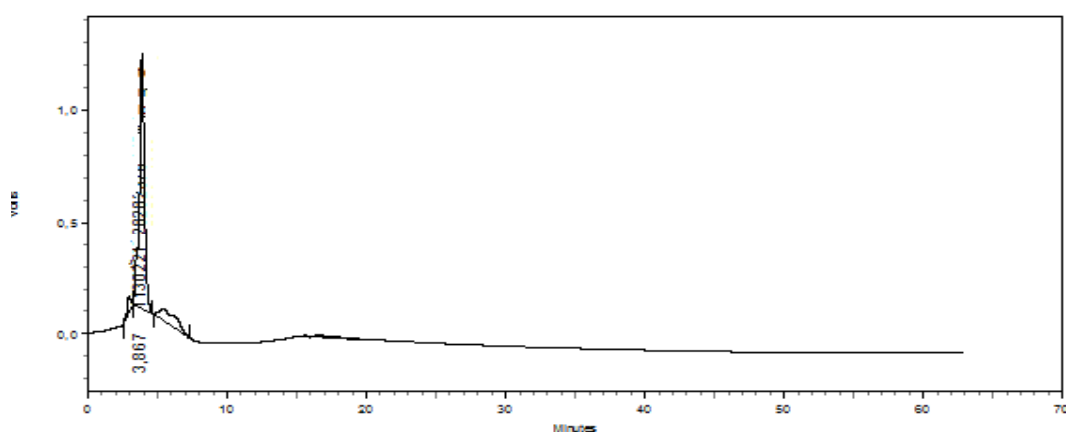


Figure 23 : Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat PI9.



Temps de rétention (T R)

Figure24: Profil d'HPLC après injection de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'isolat CHAO

Discussion

Certains PGPR produisent des antibiotiques volatiles, dont le plus important est l'HCN (Voisard *et al.*, 1989). L'HCN se forme à partir d'un acide aminé en l'occurrence la glycine (Castric, 1977) par l'HCN synthétase (Castric, 1994).

Les résultats de notre étude sur la production de substances volatile (HCN) ont montré que parmi 21 souches, 19 souches (90,47%) ont montré une cyanogénèse positive.

Une différence existe entre les souches en termes d'intensité de production de HCN, celle-ci revient à la variabilité d'expression des gènes présentés chez les *Pseudomonas* producteurs. Cette variabilité permettant de les classer en deux groupes : faibles producteurs (6 souches) et forts producteurs (13 souches de *Pseudomonas* fluorescents, plus les 3 souches de référence) (Ramette *et al.*, 2003). L'absence de production chez certaines souches serait due à la perte ou l'absence des gènes responsable de la biosynthèse. La production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression de différents d'agents pathogènes. Il agit directement sur les cellules en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire (Blumer et Haas, 2000).

Ces résultats concordent avec les résultats de Rabhi, 2011, en effet leur travail montre que Sept souches de *Pseudomonas* sont HCN+ parmi dix souches de *Pseudomonas* fluorescents. La production est faible chez Ps2, Ps8, Ps7, Ps10, Ps12, tandis qu'elle est forte chez Ps13 et

CHA0. Ce dernier montre que les souches de *Pseudomonas* peuvent se comporter différemment et a des degrés variables dans le processus de la production d'HCN.

Dans la présente étude sur l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* fluorescents vis-à-vis de différents isolats fongiques et bactériens, les résultats obtenus reflètent clairement que ces 21 souches de *Pseudomonas* fluorescents testées ont la capacité inhérente à induire des effets antagonistes sur la croissance du mycélium et par conséquent sur la prolifération de ces champignons et sur la croissance des bactéries phytopathogènes. Les taux d'inhibition toutefois varient selon la souche de *Pseudomonas* testées et selon le champignon ou la bactérie phytopathogène cible.

La forte activité antagoniste exercée par les souches de *Pseudomonas* fluorescents à l'encontre de *Colleosporium sp*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Gaeumannomyces graminis var tritici*, *Botrytis cinerea*, *Geotriticum sp*, *Pythium ultimum*, *Fomitiporia sp*, *Fusarium oxysporum f sp lini* (taux d'inhibition étend de 36% à 78%) pourrait associer à l'implication de siderophores. La diffusion de ses molécules a accentué le déficit en fer au voisinage de la colonie bactérienne, en conduisant à l'inhibition de la croissance mycélienne à sa proximité. Les mêmes constatations sont signalées par **Albouvette et al., (1998)**.

Le mécanisme principal mis en cause dans l'effet antagoniste des souches de *Pseudomonas* fluorescents *in vitro* est celui de la chélation du fer ferrique par les siderophores suite à la production du pigment fluorescent. Ce mécanisme est sous l'influence des conditions de culture et dépend aussi des caractéristiques des souches bactériennes (**Digat, 1992**).

Le fer est un facteur limitant pour le développement des microorganismes et leurs activités biologiques (**Loper et Buyer., 1991**), il a un rôle important dans la régulation de plusieurs métabolites extracellulaires produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents, notamment les siderophores et les antibiotiques, autres métabolites fongostatiques (**Lemanceau, 1992**) et des composés volatils (HCN) (**Laville et al., 1998**).

Les souches de *Pseudomonas* qui exercent un effet antagoniste moindre vis-à-vis de différents isolats fongiques et des différentes bactéries phytopathogènes : *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganens*. Ce phénotype observé serait causé par des composés autres que les sidérophores. Les substances antibiotiques comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), l'acide phénazine carboxylique (PCA), la pyrrolnitrine (PRN) et la pyoluteorine (PLT) sont probablement reliées

à cette inhibition. La variabilité dans l'inhibition observée entre les souches de *Pseudomonas* s'expliquerait par la quantité d'antibiotique produite.

Les résultats sont proches de ceux obtenus par plusieurs auteurs. En effet, **Costa** et ses collaborateurs, (2006) ont montré que sur 142 *Pseudomonas* spp fluorescents isolé à partir de la rhizosphère de maïs, 50 isolats ont révélé un potentiel antagoniste élevé par ailleurs les études de **Bensaid (2006)** ont également montré que la souche S20 de *Pseudomonas fluorescens* a provoqué des taux d'inhibition allant de 22,45% à 33,02%. Ces résultats obtenus sont comparables à ceux observés chez nos souches, à titre exemple F8 vis-à-vis de *Gaeumannomyces graminis var tritici* (24%), F27 vis-à-vis de *Gaeumannomyces graminis var tritici* (30%).

Les microorganismes réduisent la gravité des maladies par l'utilisation des mécanismes d'antagonisme direct (compétition, antibiose, parasitisme) et indirects qui s'expriment à travers des modifications de la physiologie de la plante (induction de la résistance). Ces différents modes d'action ne sont pas exclusifs l'un de l'autre, au contraire ils ont coexisté souvent dans un même organisme et s'expriment individuellement, successivement ou en synergie et concourent à l'efficacité de l'antagoniste. Une même souche microbienne n'utilise pas nécessairement les mêmes mécanismes pour limiter la gravité d'une maladie, selon la culture considérée et les conditions d'environnement (**Alabouvette, 2004**).

Après le test d'antagonisme qui a montré que 21 (100%) des souches de *Pseudomonas* étudiées sont antagonistes au moins à un agent phytopathogène fongique et bactérien. Les souches antagonistes ont subi le test de détection de la synthèse de phénazines, trois souches (PI9, BB9, F20) ont révélé des zones sombres autour des colonies traduisant la production de composé à effet antibiotique phénazinique, on note que ces derniers présentent un fort effet antagoniste, en plus des deux souches de référence B454 et CHAO.

Ces résultats concordent avec les résultats de **Benchabane, (2005)**, rapportant que la production de phénazines *in vitro* a révélé des zones sombres autour des colonies productrices de phénazine, trois (P6, D2 et A6) des 11 souches antagonistes *in vitro* synthétisent des composés phénaziniques, en plus de la souche de référence CHAO. Cette même constatation a été observée par **Mezaache, (2012)**.

Les trois souches suspectées productrices de phénazines (PI9, BB9, F20) font l'objet d'une étude antimicrobienne sur différents milieux de cultures (GN, King B, ISP2, PDA).

Les résultats obtenus pour les activités antagonistes sur les milieux solides montrent que le spectre d'action est semblable pour les cinq souches (PI9, BB9, F20, B454, CHAO) de *Pseudomonas* fluorescents. Il s'agit d'un spectre large touchant aussi bien les champignons que les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ; ceci pourrait suggérer la présence chez une même souche de nombreux métabolites variables selon le milieu de culture utilisé. La production de métabolites secondaires impliqués dans l'antagonisme microbien est sous l'effet du milieu de culture (**Meyer et Abdallah ,1978**). L'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des espèces et souches testées, mais aussi de la composition du milieu de culture (**Digat, 1992**).

Le pouvoir antimicrobienne des souches PI9, BB9, F20 est mieux dans le milieu King B, ces résultats sont proches de ceux obtenus par **Reddy Battu et Reddy (2009)**. En effet, leur étude a révélé que le milieu King B était le meilleur pour la production des métabolites efficaces .Les études de **Benchabane (2005)** ont également montré que le meilleur milieu pour la production de métabolite secondaire est le milieu King B.

Les distances d'inhibition obtenues sont le résultat d'un antagonisme exercé par les molécules à activité antimicrobienne produites par les souches PI9, BB9, F20 et ayant diffusé dans le milieu de culture. Ce phénomène est communément appelé : antibiose (**Baker et Cook, 1974**).

Les métabolites secondaires isolés des microorganismes et qui exhibent soit une activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique ou antiprotozoaire), antitumorale et/ou antivirale, sont dits antibiotiques (**Berdy, 2005**).

La synthèse des antibiotiques est étroitement liées au métabolisme cellulaire, qui est à son tour liée à la disponibilité des éléments nutritif ainsi que d'autre stimuli environnementaux (**Thomashow, 1996**), tels que les différents minéraux, les sources de carbone, le pH, la température ainsi que d'autres paramètres de l'environnement (**Bender et al., 1999**) .

Thomashow et Weller, (1990), révèlent la première démonstration expérimentale, utilisant une approche génétique pour démontrer l'implication d'un antibiotique produit par une souche de *Pseudomonas* dans la suppression d'un agent phytopathogène. Ces derniers ont utilisé une souche de *P. fluorescens* productrice d'acide phénazine carboxylique, isolée de la rhizosphère du blé et fortement antagoniste envers *Gaeumannomyces graminis var tritici*. Ce

type de démonstration a été réalisé également pour d'autres composés comme le DAPG, la pyrrolnitrine, la pyoluteorine et le HCN (**Haas et Keel, 2003**).

Les composés à effet antibiotiques phénaziniques secrétés dans les différents milieux de culture par les souches PI9, BB9, F20 ont fait l'objet d'extraction par trois solvants de polarité différentes : acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'hexane.

L'efficacité de ces solvants a été déjà rapportée dans l'extraction de phénazines (**Gurusiddiah et al., 1986**). Parmi ces solvants l'acétate d'éthyle a permis l'obtention de meilleurs résultats.

Les extraits phénaziniques obtenus par extraction avec le solvant adéquat et produit à partir du milieu de culture optimisé ont été séparé par CCM et identifier par HPLC.

La comparaison des résultats de différents techniques chromatographiques CCM et HPLC du standard PCA avec celui des composés produits par les souches PI9 et F20 en plus de leur activité antimicrobienne plus marquée a permis de mettre en évidence et d'identifier la PCA comme composé actif des souches citées ci-dessus. Cependant la souche BB9 possède une activité antimicrobienne marquée et produit des composés de nature phénazinique mais sa composition diffère que celle du PCA produit par les souches PI9 et F20.

Les résultats obtenus montrent que la souche PI9 est la plus performante parmi tous les autres souches sélectionnées et productrice des phénazines .Cela est traduit par une activité antimicrobienne beaucoup plus marqué que celle de la souche F20 et une production plus importante en PCA.

Les antibiotiques de type PCA et autres phénazines sont les déterminants majeurs dans le contrôle biologique des phytopathogènes telluriques par les *Pseudomonas* spp. fluorescents (**Thomashow et Weller, 1996**).

La production de phénazines est impliquée aussi bien dans la survie de la bactérie que dans l'inhibition du pathogène. Ces antibiotiques sont produits vers la fin de la phase exponentielle et pendant la phase stationnaire (**Turner et Messenger, 1986**).

Notre résultat montre que les souches productrices des composés à effet antibiotiques phénaziniques présentent un taux d'inhibition très élevé avec *G. graminis* var *.Tritici* Allant jusqu'à 50% Ceci a été observé dans les études de **Thomashow et ses collaborateurs (1990)**, en effet , ils ont trouvé que les antibiotiques produits sur les racines saines et plus spécifiquement la PCA pourrait servir comme une importante première ligne de défense contre l'infection primaire par *G. graminis* var *.Tritici* et ce dernier présente des taux d'inhibition très élevé avec la PCA qu'avec d'autre antibiotique même par rapport aux autres champignons.

Les phénazines chez *Pseudomonas* joueraient un rôle important dans la lutte biologique contre les maladies infectieuses des plantes (**Thomashow et Weller, 1988 ; Thomashow et al., 1990**). Il est intéressant de noter dans notre cas que les composés majoritaires extraits à partir des souches PI9, BB9, F20 semblent appartenir au groupe des phénazines.

Les phénazines jouent aussi un rôle dans la compétition rhizosphérique, incluant la survie et la compétence des bactéries productrices (**Mazzola et al., 1992**).

Malgré qu'il est admis aujourd'hui que les rhizobactéries, particulièrement les PGPR peuvent engendrer des gains appréciables, il demeure toujours que leur application sur terrain rencontre des difficultés. Ces difficultés concernent surtout l'aspect formulation et méthodes d'applications, en plus de ces considérations, on doit garantir leur efficacité et leur stabilité en pratique.

En conclusion, nous pouvons dire que le présent travail, a montré que :

La production de cyanure d'hydrogène a été retrouvée chez un nombre important de souches, 19 souches (90,47%) parmi 21 souches (100%) de *Pseudomonas* spp fluorescents.

La mise en évidence de l'effet antagoniste microbien *in vitro* chez les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents vis-à-vis des différents isolats fongiques (*Colleosporium* sp, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotriticum* sp, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum f sp lini*, *Fomitiporia* sp, *Eutypia lata*, *Botrytis cinerea*, *Gaeumanomyces graminis var tritici*) et bactériens phytopathogènes (*Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganens*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*) a permis de détecter des activités antifongiques fortes chez une grande partie de ces souches : BB10 (74%) ,F48 (78%) ,F27 (72%) ,PI9 (70%), BB6 (76%). Qui se sont avérées très efficaces à des degrés divers. Les souches de *Pseudomonas* fluorescents ont montré un effet antifongique plus élevées par rapport à leur effet antibactérien.

Parmi les souches qui ont manifesté un pouvoir antagoniste, 3 souches ont été productrice de phénazines.

Ultérieurement, nous avons testé l'activité microbienne des trois souches suspectées productrices de phénazines dans les différents milieux de culture. A travers ces résultats, on conclut que l'activité antimicrobienne *in vitro* dépend non seulement des souches mais aussi du milieu de culture. Le milieu King B c'est le milieu qui a donné les meilleurs résultats.

La bonne extraction des composés à effet antibiotique phénazinique a été obtenue par l'acétate d'éthyle à partir du milieu King B .Les composés à effet antibiotiques phénaziniques ont marqué une activité antimicrobienne vis-à-vis des agents phytopathogènes telluriques et vis-à-vis de pathogènes à intérêt médicale. Donc ils peuvent être évalués pour une utilisation dans le domaine médicale en plus de domaine agro-alimentaire.

D'après les résultats des analyses de ces composés par CCM et HPLC, nous avons constaté que les deux souches PI9 et F20 sont des souches productrices de l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), ce derniers est impliqué dans les mécanismes de lutte biologique vis-à-vis de nombreux agents phytopathogènes telluriques tandis que la souche BB9 semble être productrice d'un autre type de phénazines.

Parmi ces souches la souche PI9, probablement a été la souche la plus performante dans la production de phénazines, cette performance se visualise sur l'activité antimicrobienne.

En perspective :

- ❖ Pour cerner les résultats obtenus lors des analyses, il serait plus intéressant de tester tous les standards relatifs aux autres dérivés de phénazines.
- ❖ Il est souhaitable de poursuivre l'étude de la production de composés à effet phénazinique sous serre et en plein champ dans le but de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et de voir leur potentiel pour une utilisation en stratégie de lutte contre les agents phytopathogènes comme un biopesticide. De plus il est plus avantageux d'utiliser les produits biologiques et d'éviter ceux de synthèse qui poseront des problèmes d'accoutumance.
- ❖ Etudier la production d'autres métabolites secondaires telle que : les siderophores, les enzymes protéolytiques et la production d'autres types d'antibiotiques : la pyrrolnitrine, la pyrrolnitrine et le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG).
- ❖ Tester l'effet du pH, de la température et de l'aération sur la production de composé à effet antibiotique.

- ❖ **Alabouvette C., 2004 :** Les méthodes de protection des plantes alternatives à la lutte chimique. INRA, UMR Microbiologie Géo chimie des sols. BP 86510, 21065 Dijon Cedex.
- ❖ **Alagesaboopathi C. et Selvankumar T., 2011:** Antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* and strain improvement of *Rhizobium* species. *Int. J. Biosci.* **11** (6), 54-63.
- ❖ **Albouvette C., Schippers B., Lemanceau P., Bakker P.A.H.M., 1998:** Biological control of *Fusarium* wilts, 15-36.
- ❖ **Anjaiah V., Koedam N., Nowak-Thompson B., Loper J. E., Hofte M., Tambong J. T. and Cornelis P., 1998 :** Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 847–854.
- ❖ **Badri D.V. and Vivanco J.M., 2009:** Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* **32**, 666-681.
- ❖ **Bais H.P., Park S.W., Weir T.L., Callaway R.M. and Vivanco J.M., 2004:** How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant science.* **9**, 26-32 .
- ❖ **Baker K.F. et Cook R. J., 1974:** Biological control of plants pathogens. Freeman and Co., San Francisco, USA. 433p.
- ❖ **Bakker A.W. et B. Schippers., 1987:** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth-stimulation. *Soil. Biol. Biochem.* **19**, 451-457.
- ❖ **Bakker P.A.H., Lemanceau P., Raaijmakers J., Bloemberg G., Hofte M., Cooke B.M., 2007:** New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. Dordrecht: Springer. The Netherlands, p365.
- ❖ **Bano N. and Musarrat J., 2003:** Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Cur. Microbiol.* **46**, 324- 328.
- ❖ **Bejerano-Sagie M. et Xavier K.B., 2007:** The role of small RNAs in quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* **10**, 189-198.
- ❖ **Benchabane M., 2005 :** Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Thèse de doctorat, Université de science et de la technologie Houari BOUMEDIENE. 13-86p.

- ❖ **Bender C.L., Rangaswamy V .and Loper J., 1999:** Polyketide production by plant-associated *Pseudomonads* .Annu Rev.Phytopathol.N°37,175-196.
- ❖ **Bensaid F., 2006 :** Etude de l'effet des *Pseudomonas spp fluorescens* et l'isolat Fo47 de *Fusarium oxysporum* non pathogène dans la lutte biologique vis-à-vis de la fusariose vasculaire. Mémoire de magister agro .Blida .135p.
- ❖ **Berdy J., 2005 :** Bioactive Microbial Metabolites.J.Antibiot.**58** (1) ,1-26.
- ❖ **Betina, V., 1973:** Bioautography in paper and the layer chromatography and its scope in the antibiotic field.J.Chromato.**78**, 41-51.
- ❖ **Blumer C. et Haas D.,2000:** Mechanism,regulation ,and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Arch.Microbiol **173**,170-177.
- ❖ **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.
- ❖ **Botelho G.R .and Mendonça-Hagler L.C., 2006:** *Fluorescent Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops-An overview. Brazilian journal of microbiology **37**, 401-416.
- ❖ **Boyetchko S.M. et Russel H., 2009 :** *Pseudomonas fluorescens* BRG 100, un biopesticide d'agriculture et d'agroalimentaire Canada.No.AAC10857.NO.Cat A.52-120/3.
- ❖ **Castric P.A .,1977:** Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis.J.Bacteriol.**130**, 826-831.
- ❖ **Castric, P.A ., 1994:** Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeuginosa* hydrogen cyanide synthase.Curr.Microbiol.**29**:19-21.
- ❖ **Chin-A-Woeng T. F., Bloemberg G. V. and Lugtenberg B. J. , 2003:**Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. New. Phyto. **157**, 503-523.
- ❖ **Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Van der Bij A., Van der Drift K., Schripsema J., Kroon B., Scheffer R., Keel C., Bakker P., Tichy H., De Bruijin F., Thomas-Oates J. and Lugtenberg B.J., 1998:**Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis*PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusariumoxysporum*f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **11**,1069–1077.

- ❖ **Cleyet-Marel J-C. et Hinsinger P., 2000 :** Le sol milieu vivant, un territoire qui reste à découvrir et à valoriser. Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 7.numéro 6.Montpellier .France : 3-490.
- ❖ **Cohen M.F., Yamasaki H. and Mazzola M., 2005:** Brassica nopus seed meal soil amendment modifies microbial community structure,nitric-oxide production and incidence of rhizoctonia root rot.Soil biology and biochemistry **37**,1215-1227
- ❖ **Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C. and Barka E.A., 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.
- ❖ **Cook R. J., Thomashow L. S., Weller D. M., Fujimoto D., Mazzola M., Bangera G. and Kim D. S., 1995:** Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against rootdisease. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**,4197-4201.
- ❖ **Costa R.,Gomes N.C.M .,Peixoto R.S.,Rumjanek N.,Gabriele B.,Mendonça-Haglerb L.C.S .,Smalla K., 2006:** Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas spp.* Associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. Soil Biology & Biochemistry **38**, 2434-2447.
- ❖ **De Bruijn F.J., 2013:** Molecular microbial ecology of the Rhizosphere.V.1.Editeur: Hoboken, N.J.:Wiley Blackwell. Toulouse, p1269.
- ❖ **De Salamone G.I.E., Hynes R.k. and Nelson L.N., 2001:** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobactéria and selected mutants.*Can.J.Microbiol.***47**, 103-113.
- ❖ **De Souza J. T., De Boer M. , DeWaard P., Van Beek T.A. et Raaijmakers J.M. , 2003:** Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. **69**, 7161-7172.
- ❖ **Defago G., 1993:** 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. Plant Pathol. **42**, 311–312.
- ❖ **Delaney S.M., Mavrodi D.V., Bonsall R.F. and Thomashow L.S., 2001:** *PhzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *J. Bacteriol.* **183**,318-327.
- ❖ **Delorme S., Lemanceau P., Christen R., Corberand T., Meyer J-M. And Gardan L.,2002:** *Pseudomonas lini* sp nov .,a novel species from bulk and rhizospheric soils. International .Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**52**, 513-523.

- ❖ **Digat B., 1992 :** Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. *Phytoma. Défense des végétaux*. **441**, 34-38.
- ❖ **Dowling D. N. and O’Gara F., 1994:** Metabolite of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **12**, 133-140.
- ❖ **Duijff B. J., Recorbet G., Bakker P. A. H. M., Loper J. E. and Lemanceau P., 1999:** Microbial antagonism at the root level is involved in suppression of *Fusarium* wilt by the combination of non pathogenic *Fusarium oxysporum* F047 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology*. **89**, 1073-1079.
- ❖ **Fravel D. R., 2005 :** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 337-359.
- ❖ **Garcia C., Pascual J.A., Mena E. et Hernandez T., 2004:** Influence of the stabilisation of organic materials on their biopesticide effect in soils. *Bioresource Technology* **95**, 215-221.
- ❖ **Gardan L. et Luisetti G., 1981:** Méthodes d’isolement et d’identification des bactéries phytopathogènes. INRA Angers. France. 32 p.
- ❖ **Gnanamanickam S. S., 2007:** Plant-associated bacteria. Editeur: Dordrecht: Springer. The Netherlands, p712.
- ❖ **Grimont P.A.D ., 1998 :** Taxonomie des *Pseudomonas*. *Méd. Mal INFECT.* **28**, 65-71.
- ❖ **Gross H. et Loper J.E., 2009:** Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp . *Journal of The Royal Society of Chemistry. Nat. Prod. Rep.* **26**, 1408-1446 .
- ❖ **Gurusiddaiah S., Weller D.M., Sarkar A. and Cook R. J., 1986:** Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 488-495.
- ❖ **Haas D. and Défago G., 2005:** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 307–319.
- ❖ **Haas D. and Keel C., 2003:** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**, 117-153.

- ❖ **Hariprasad P., Navya H.M. , Chandranayaka S. et Niranjana S.R., 2009:** Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biol. Control.* **50**, 307-316.
- ❖ **Hassan H.M. and Fridovich I., 1980:** Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J. Bacteriol.* **141**, 156–163.
- ❖ **Hayet R.,Ali S.,Amara U.,Khalid R.,Ahmed I., 2010:** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review.*Ann Microbiol* **60** (4),579-598.
- ❖ **Hinsinger P., Bengough A.G., Vetterlein D. and Young L.M., 2009:** Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* **321**,117-152.
- ❖ **Höfte M. et Altier N.. 2010:** *Fluorescent pseudomonads* as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* **161**,464-471.
- ❖ **Howell CR. et Stipanovic R.D., 1980:** Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* **70**, 712-715.
- ❖ **Howell CR. et Stipanovic R.D., 1979:** Control of *Rhizoctoniasolani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* **69**,480-482.
- ❖ **Jacques P.I.A., Deflosse P.H., Ongena M., Lepoivre P.H., Koredon N., Keinnch L.et Thomort P.H.,1993:** Les mécanismesbiologiques développés par les *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. cahier d’agriculture. revue 2 ,301-307.
- ❖ **Ji P., Campbell H.L., Kloepper J.W., Jones J.B., Suslow T.V. and Wilson M., 2006:** Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control.* **36** (3), 358-367.
- ❖ **Johnson, J.et Palleroni N.J.,1998:** Desoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species.*Int J syst bacteriol.***39**,230-235.
- ❖ **Jonsthon A. and Booth C., 1982:** Plant pathologist’s pocket book. 2nded Commonwealth.Mycological Institute. Kew Surrey. England,p 439.
- ❖ **Jourdan E., Ongena M. et Thonart P., 2008 :** Caractéristiques moléculaires de l’immunité des plantes induite par les Rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol.Agron.Soc. Environ.***12**, 437-449.
- ❖ **Kamilova F., Validov S. , Azarova T., Mulders I. et Lugtenberg B., 2005:** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**, 1809–1817.

- ❖ **Khan A.G., 2005:** Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J.Trace Elem Med boil.* 18, 355-364.
- ❖ **King E.O; Ward,M.K. and Raney D.E.,1954:** Two simple media for the demonstration of pyocyanine and fluorescin. *JLabClin Med*, 301-307.
- ❖ **Kloepper JW. and Schroth MN.,1981:** Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 71,642-664.
- ❖ **Latour X. et Lemanceau P., 1997 :** Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes à oxydase positive. *Agronomie.* 17 (9-10), 427-443.
- ❖ **Laville J., Blumer C., von Schroetter C., Gaia V., Défago G., Keel C., Haas D., 1998:** Characterization of the hcn ABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *J Bacteriol.* 180,3187-3196.
- ❖ **Lee J.P., Lee S.W., Kim C.S., Son J.H., Song J.H., Lee K.Y., Kim H.J., Jung S.J. and Moon B.J., 2006:** Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control.* 37(3), 329-337.
- ❖ **Leefflang P.,Smit E., Glandorf D. C. M., Van Hannen E.J. and Wernars K., 2002:** Effects of *Pseudomonas putida* WCS358r and its genetically modified phenazines producing derivative on the *Fusarium* population in a field experiment, as determined by 18S rDNA analysis. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1021-1025.
- ❖ **Lemanceau P., 1992:** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *pseudomonas* spp.fluorescent. *Agronomie. revue* 12 ,413-437.
- ❖ **Lepoivre P., 2003 :** Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. 1^{ere} édition, Editions De Boeck Université. Bruxelles : Gembloux ,P427.
- ❖ **Li Y., Jiang H., Du X.,Huang X., Zhang X.,Xu Y., Xu Y.,2010 :** Enhancement of phenazine-1-carboxylic acid production using batch and fed-batch culture of *gacA* inactivated *Pseudomonas* sp. M18G. *Bioresource Technology* 101, 3649–3656.
- ❖ **Lidia S. P., Edward Z. and Stawomir G., 2007:** The influence of mycorrhiza on the growth and yielding of strawberry and the processes taking place in the rhizosphere. *International Conference Rhizosphere .revue* 2,1-12.

- ❖ **Lifshitz R., Kloepper J.W., Kozlowski M., Carlson J., Tipping E.M.Z., Aleska I., 1987:** Growth promoting of canola seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can J Microbiol* 33 ,pp390-395.
- ❖ **Loper JE, Buyer JS., 1991:** Siderophores in microbial interactions on plant surfaces *Mol Plant-Microbe Interac* 4, 5-13.
- ❖ **Lugtenberg B. J. J., Dekkers L., Bloemberg V.G., 2001:** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* .*Ann. Rev. Phytopathol* ,461-491.
- ❖ **Maheshwari D.K., 2010:** Plant growth and health promoting bacteria. Editeur:Heidelberg .New York :Springer-Verlag .Collection :Microbiology monographs.18, p433.
- ❖ **Maheshwari D.K., 2013:** Bacteria in Agrobiolgy: Disease management .Springer Heidelberg .New York Dordrecht London,p 487.
- ❖ **Marchal N., Bourdon J.L. and Richard Cl., 1987 :** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin editor. Paris, p38.
- ❖ **Mattar J., 1993 :** Les *Pseudomonas* spp .fluorescents de la rhizosphère : Caractérisation ,incidence de la température et microflore autochtone sur la colonisation racinaire .Thèse de Doctorat. Université Lyon. 130p.
- ❖ **Mavrodi O.V., McSpadden Gardener B.B., Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Weller D.M. and Thomashow L.S., 2001:** Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91, 35–43.
- ❖ **Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Delaney S. M., Soule M. J., Phillips G., and Thomashow L. S., 2001:** Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 183,6454-6465.
- ❖ **Mavrodi D.V., Peever T.L., Mavrodi O.V., Parejko J.A. , Raaijmakers J.m., Lemanceau P., Mazurier S., Heide L., Blankenfeldt W., Weller D.M. and Thomashow L.S., 2010 :** Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *American Society for Microbiology. Applied and environmental microbiology.* 76 (3), 866-879.
- ❖ **Mavrodi D.V., Mavrodi O.V., Parejko J.A. , Bonsall R.F. , Kwak Y-S., Paulitz T.C., Thomashow L.S. and Weller D.M., 2011:** Accumulation of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid in the rhizosphere of dryland cereals. *Appl. Environ. Microbiol* 78 (3) ,804-812.

- ❖ **Mavrodi D.V., Blankenfeldt W. and Thomashow L.S., 2006:** Phenazine compounds in *fluorescent pseudomonas spp* biosynthesis and regulation. Annual review of phytopathology. volume 44 annual reviews. pp 417-445.
- ❖ **Mavrodi, D. V., Ksenzenko V. N., Bonsall R. F., Cook R. J., Boronin A. M. and Thomashow L. S., 1998:** A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. J. Bacteriol. **180**,2541-2548.
- ❖ **Mazzola M., Cook R. J., Thomashow L. S., Weller D. M. and Pierson L. S., 1992 :** Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2616-2624.
- ❖ **Mercado-Blanco J .and Bakker P.A.H.M. , 2007:** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas spp* :exploiting bacterial traits for crop protection . Antonie van Leeuwenhoek **92**,367-389.
- ❖ **Mercado-blanco J., Van der Drift K.M.G.M., Olsson P.E. , Thomas-Oates J.E., Van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M., 2001:** Analysis of the pms *CEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens*. WCS374., J. Bacteriol., N°183, 1909-1920.
- ❖ **Meyer J M. and Abdallah MA., 1978:** The *fluorescent* pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. J. Gen. Microbiol. **10** 7,319-328.
- ❖ **Mezaache S., 2012 :** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse doctorat. Université Ferhat ABBAS .Sétif. 95p.
- ❖ **Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L. C., Hofte M. and Bakker P.A.H.M., 2005:** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 177-185.
- ❖ **Minuto A., Spadaro D., Garibaldi A. and Gullino M.L., 2006:** Control of soil borne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protect.* **25**(5), 468-475.
- ❖ **Mishra S. et Arora N.K., 2012:** Management of black rot in cabbage by rhizospheric *Pseudomonas* species and analysis of 2, 4-diacetylphloroglucinol by qRT-PCR. *Biological control* **91**:32-39.

- ❖ **Monteil H. et Harf-Monteil C., 2002** : *Pseudomonas* et apparentés. Revue Française des laboratoires. **2002**, 31-10.
- ❖ **Nehla D.B .,Allen S.J . and Brown J.F ., 1996**: Review Deleterious rhizosphere bacteria : an integrating perspective. Applied Soil Ecology **5**,1-20.
- ❖ **Nguyen C., 2003**: Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls .INRA. EDP sciences. Agronomie **23** , 375-396.
- ❖ **Nielsen T.H., Christophersen C., Anthoni U.and Sorensen J., 1999**: Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. Journal of Applied Microbiology **86**, 80-90.
- ❖ **O'sullivant D.J. and O'gara F., 1992**: Traits of fluorescent pseudomonas spp involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological review .American society for microbiology **56**(4), 662-676.
- ❖ **Palleroni N.J., 1984**: Gram negative aerobic rods and cocci: family Pseudomonadaceae, William and Wilknes.Baltimore, 141-168.
- ❖ **Palleroni N.J., Kunisawa R. , Contopolou R. and Doudoroff M., 1973**: Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*, int. J, system. Bacteriology. Revue **23**,333-339.
- ❖ **Parmer N. et Dadarwal k. R., 1999**: Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. Journal of applied. Microbiology.revue **86**, 36-44.
- ❖ **Paulitz T.C. and Bélanger R.R., 2001**: Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**,103-133.
- ❖ **Pierson L.S.III and Thomashow L.S., 1992**: Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens*30-84. *Mol. Plant Microbe-Interact.* **5**,330-3
- ❖ **Pieterse C. M. J., Van Wees S. C. M., Ton J., Van Pelt J. A. and Van Loon L. C., 2002**: Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biol.**4**, 535-544.
- ❖ **Raaijmakers J.M. ,Vlami M. and De souza J.T.,2002**: Antibiotic production by bacterial biocontrol agent.Antonie Van Leeuwenhoek,revue **81** (1-4),537-547.





- ❖ **Rabhi N.E.H. , 2011:** Isolement de *Pseudomonas spp.* fluorescents d'un sol salé. Effet d'osmoprotecteurs naturels.Thèse de Magistère .Université de FERHAT Abbas .Sétif.62.
- ❖ **Ramette M.,Frapolli G.,Défago .and Moenne-Loccoz Y., 2003:** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol*fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability*,Molecular Plant-Microbe Interactions,**16** (6),525-535.
- ❖ **Ran L.X., Liu C.Y., Wu G.J., Van Loon, L.C. and Bakker P.A.H.M., 2005:** Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by *fluorescent pseudomonas spp.*in China.*Biol.Control* **32**,111-120.
- ❖ **Reddy Battu P. and Reddy M., 2009:** Isolation of secondary metabolites from *Pseudomonas fluorescens* and its characterization .Recherche asiatique chim 2 de J.(1) ,26-33.
- ❖ **Richardson A.E., 2001:** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants *Aus. J. Plant Physiol.* **28**(9), 897–906.
- ❖ **Salman M.,2010:** Determination of antibiotic activity on plasmids from fluorescent pseudomonads isolates CW2,WB15 and WB 52 against pre-emergence damping-off caused by *Pythiummultimum* and *rhizoctoniasolani* in cucumber. *Biological control* **53**, 161-167.
- ❖ **Saravanakumar D., Vijayakumar C., Kumar N. and Samiyappan R., 2007:** PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *CropProtect.* **26**(4),556-565.
- ❖ **Schirling E.B. and Gottlieb D., 1996:** Methods for characterization of *Streptomyces* species *INT J SystBacetriol* **16**, 3313-3340.
- ❖ **Schroth MN, Hancock J.G., 1981:** Selected topics in biological control *Annu Rev Microbiol.* **34**,453-476.
- ❖ **Shanahan P.,O'sullivan D.J.,Simpson P.,Glennon J.D. and O'gara F.,1992:** Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from fluorescent pseudomonas and investigation of physiological parameters influencing its production.*APP Environ microbial* **58**,353-358.
- ❖ **Shanmugam V, Singh Ajit N, Verma R, Sharma V.,2008:** Diversity and differentiation among fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres with whole-cell protein profiles. *Microbiol Res* **163**,571-578.
- ❖ **Smirnov V.V. and Kiprianova E.A., 1990:** *Bakteriiroda Pseudomonas* (Bacteria of the Genus Pseudomonas), Kiev: *NaukovaDumka*, 100-111.

- ❖ **Soylu S., Bennett M. H., Mansfield J. W., 2002:** Induction of Phytoalexin Accumulation in Broad Bean (*Vicia faba*) Cotyledons Following Treatments with Biotic and Abiotic Elicitors. *Turk J Agricfor* .**26**, 343-348.
- ❖ **Stengel P. et Gelin S.,1998 :** Sol : interface fragile .Editeur :Institut national de la recherche agronomique. INRA. Paris, p 213.
- ❖ **Sturz A.V.et Christie B.R.,2003:** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: The management of soil quality and plant disease with rhizobacteria ,soil and tillage research. revue **72**,107-123.
- ❖ **Suty L., 2010 :** La lutte biologique : vers de nouveaux équilibres écologiques. Collection : Sciences en partage. Editions Quae. Versailles France 328.
- ❖ **Thakore Y., 2006:** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology* **2**, 194-208.
- ❖ **Thomashow L. S. and Weller D. M., 1990:** Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant and Soil*.**129**, 93–99.
- ❖ **Thomashow L.S. and Weller D. M., 1996:** Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: *Plant-microbe interactions*, vol. 1. G. Stacey and N. T. Keen (ed.), Chapman and Hall, London, United Kingdom, 187–236.
- ❖ **Thomashow L.S., 1996:** Biological control of plant root pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* N° 7, 343-347.
- ❖ **Thomashow L.S., Weller D.M., Bonsall R.F. and Pierson L.S., 1990:** Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.* **56**, 908-912.
- ❖ **Thomashow LS, Weller DM.,1988:** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var tritici* .*J.Bacteriol* **170**,3499-3508.
- ❖ **Ton J., Davison S., Van Loon L.C. and Pieterse C.M.J.,2001:** Heritability of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance and basal resistance in Arabidopsis. *Eur. J. Plant Pathol.***107**, 63-68.
- ❖ **Ton J.,Jakab G.,Toquin V.,Flors V.,Iavicoli A.,Maeder M.N.,Métraux J-P. and Mauch-Mani B.,2005:** Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis.*Plant cell*.**17**,987-999.
- ❖ **Turner J.M. and Messenger A.J., 1986:** Occurrence, biochemistry and physiology of phenazines pigment production. *Adv.Microb.Physiol.***27**,211-275.

- ❖ **Van Loon L. C., 2007:** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**, 243-254.
- ❖ **Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M. and Pieterse C. M. J., 1998:** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453–483.
- ❖ **Vega N.W.O., 2007:** A review on beneficial effect of rhizosphere bacteria on soil nutriment availability and plant nutrient uptake .*Revue. Fac.Nal.Agr.Medellin.* **60** (1), 3621-3643.
- ❖ **Veselova A., Klein S.H., Bass I.A., Lipasova V.A., Metlitskaya A.Z., Ovadis M.I., Chernin L.S. and Khmel I.A., 2008:** Quorum Sensing Systems of Regulation, Synthesis of Phenazine Antibiotics, and Antifungal Activity in Rhizospheric Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. *Rus. J. Genetics.* **44**, 1400–1408.
- ❖ **Vincent M.N., Harrison L.A., Brackin J.M., Kovacevich P.A., Mukerji P. and Weller D.M., 1991:** Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2928–2934.
- ❖ **Voisard C., Keel C., Haas D. and Défago G., 1989:** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO.J.* **8**, 351-358.
- ❖ **Waksman S.A., 1945:** Microbiological antagonism and antibiotic substances. The Commonwealth Fund. New York.
- ❖ **Widden P., 1994:** Competition and the fungal community. Dans: The mycota IV. Environmental and Microbiological (Esser, K, Wicklow, D.T., Svderstrvm, B.E.). Springer-Verlag. Berlin. Allemagne, 135-147.
- ❖ **Williston E.H., Zia-Walrath P., Youmans G.P., 1947:** Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against virulent human type Tubercle Bacilli. *J. Bacteriol.* **54**, 563-568.

Annexe 1 : Matériel de laboratoire utilisé

Appareils

Nom de l'appareil	Photo (Originale)	Nom de l'appareil	Photo (Originale)
Hotte microbiologique à UV (BIOHAZARD)		Hotte chimique	
Shaker		Etuve (DIGITHEAT)	

Centrifugeuse
(Centrifuge
4225)



Vortex
(HEIDOLPH)



Bain-marie
(memmert)



Balance
analytique
(Mettler
Toledo)



Réfrigérateur
4°C (Labco)



Autoclave
(Cisa)



HPLC
(SHIMADZU)



Evaporateur
rotatif (Buchi
heating bath B-
490)



Plaque
chauffante
(BIBBY)



Produits chimiques

Acétate diethyl: $C_4H_8O_2$ (SIGMA-ALDRICH)

Dichlorométhane: CH_2CL_2 (SIGMA-ALDRICH)

Hexane: $CH_3(CH_2)_4CH_3$ (SIGMA-ALDRICH)

Méthanol : CH_3OH (SIGMA-ALDRICH)

Sulfate de Sodium anhydre : Na_2SO_4 en poudre (SIGMA-ALDRICH)

Petits matériel et consommables

Ampoules à décanter avec des supports adéquats

Anse en platine

Bec Bunsen

Boite Pétri en plastique 90 mm

Boite Pétri en verre 90 mm

Ballon

Couton

Cuve

Spatule

Disques en papier

Embouts 50 ml

Entonnoirs en verre

Eppendorfs 1,5 ml et 2 ml

Eprouvettes graduées 100 ml

Erlenmeyers 100 ml et 250 ml

Flacons 250 ml

Micropipettes réglables

Papier aluminium

Para-film

Papier whatman n°1

Piluliers 25 ml

Pinces

Pipettes Pasteur

Règle graduée

Seringue en plastique

Seringue en verre

Portoir

Ecouvillons stériles

La gaze, Ciseaux

Scalpel

Tubes à essai 20 ml

Annexe 2 : Composition des milieux de culture

Milieu B de King (KB) (King et al., 1954)

Peptone	20g
Glycérol	15 ml
K ₂ Hpo ₄	1, 5 g
MgSO ₄	1,5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH=7,2 autoclavage 20 minutes à 120°C.

Note : c'est la même composition des milieux solides que liquides sauf que ces derniers ne contiennent pas d'agar.

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthor et Booth, 1982)

Pomme de terre	200g
Dextrose	20g
Agar	15g
Eau distillé	1000 ml

pH=7 autoclavage 20 minutes à 120°C.

Milieu GN (Gélose nutritif) (Gardan et Luisetti, 1981)

Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Peptone	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0 g
Eau distillé	1000 ml

pH=7 autoclavage 20 minutes à 120°C

Milieu ISP2 (International Streptomyces Project) (Shirling et Gottlieb, 1966)

Extrait de levure 4g
Extrait de malt 10g
Glucose 4g
Agar 15g
Eau distillé 1000 ml

Milieu Mueller Hinton (Marchal et al., 1987)

Extrait de viande 2 g
Hydrolysate de caséine 17,5 g
Amidon 1,5 g
Agar 12 g
Eau distillé 1000 ml

Milieu NBY (Nutrient Broth Yeast Extract) à 2% de glucose

Bouillon nutritif 8g
Extrait de levure 2g
K₂HPO₄ 2g
KH₂PO₄ 0,5g
MgSO₄-7 H₂O 0,25 g
Glucose 2 g
Agar 15 g
Eau distillé 1000 ml

Milieu Cétrimide

Peptone de gélatine 16 g
Peptone de caséine 10 g
Bromure de tétradonium (cétrimide) 0,2 g
Acide nalidixique 15 mg
Sulfate de potassium 10 g

Chlorure de magnésium 1,4 g

Agar 10 g

Eau distillé 1000 ml

pH=7,1

Milieu TSA (Tryptone Soya Agar) à 4,4 g de glycine

Tryptone 15 g

Peptone de soja 5g

Chlorure de sodium 5g

Agar 15 g

Eau distillé 1000 ml

pH=7,3

