

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université BLIDA 01
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention Du Diplôme de Master
Option : Microbiologie

Thème

Recherche des molécules bioactives d'intérêt à partir
d'une collection de souches de *Pseudomonas*
spp. fluorescents isolées de l'endophytosphère du palmier
dattier et étude de leur effet antifongique.

Réalisé par : *M^{lle}*. Ferfera Niamat

M^{lle}. Nefradji Soumia

Soutenu le 13/07/2022

Devant le jury composé de :

Mme Touaibia. M	MCA	Présidente
Mme Benhoua. I	MCB	Examinatrice
Mme Ait Saadi. N	MCB	Promotrice

Promotion 2021-2022

REMERCIEMENT

Tout d'abord, nous remercions Dieu, le Tout- Puissant et Le Miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience durant toutes ces années d'études, afin que nous puisse en arriver là.

Nous avons l'honneur de remercier sincèrement notre promotrice Mme Ait Saadi, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour la confiance, la disponibilité, la générosité et le grand soutien qu'elle nous a accordé pour faire aboutir ce travail.

Nos vifs remerciements vont aussi aux membres du jury Mme Touaibia, et Mme Benhouna qui nous ont fait l'honneur en acceptant d'examiner ce travail, qu'elles trouvent ici le témoignage de notre haute considération et notre profond respect.

Un énorme merci à l'ingénieur de laboratoire phytobactériologie Mme Salma à sa sympathie, sa patience qu'on a pu effectuer notre partie expérimentale dans des bonnes conditions.

En fin, nous tenons à exprimer nos sincères remerciements aux personnes qui nous ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire, particulièrement Mme Tafifat enseignante en Université de Saad Dahleb Blida pour son aide et ses conseils précieux.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A ma famille la plus chère de ma vie

A ma source de force, ma mère qui par ses sacrifices consentis et son affection profonde m'a toujours guidé sur la voie du succès

Mon très chère père pour son amour, son soutien et son sacrifice afin que rien n'entrave mes études.

A ma source d'énergie, ma sœur Ibtissem celle qu'elle ma supporter et encourager tout au long de mon parcours.

A mon cher frère Islem qu'il a était toujours une source de joie.

A toute ma famille, qui m'ont toujours encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire, Cette réussite n'aurais jamais vu le jour sans l'appui moral et intellectuel des membres de ma famille

A ma meilleure amie Manel celle qui a partagée avec moi les moments d'émotions lors de la réalisation.

A mon cher binôme Soumia celle qui a participé à cette réussite pour son soutien, son aide et son support dans les moments difficiles.

Niamat

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents...

Qui sont toujours présents pour faire mon bonheur. Pour leur patience, leurs encouragements, conseils, et leurs sacrifices.

À mon chère frère Mohammed et mes adorables sœurs Sara, Hadjer, Assia qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études, et à toute ma famille.

À ma copine et mon binôme Niamat et mes amies Meriem, Bouchra, Bouchra H

À toute la promotion de microbiologie 2021 / 2022

Soumia

Résumé

Notre travail a pour but d'identifier et d'évaluer la capacité des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents isolées de l'endophytosphère du palmier dattier de produire quelques métabolites secondaires ainsi que la mise en évidence de leur effet antifongique.

Les résultats de l'identification selon quelques tests de la clé dichotomique et les tests LOPAT nous a permis de retenir 12 souches sur 25 présentant les caractéristiques des *Pseudomonas* spp fluorescents. 10 souches peuvent être affiliées aux *Pseudomonas putida* ou au sein du groupe intermédiaire entre *P. putida* et *P. fluorescens* et 2 souches aux espèces de *P. fluorescens* ou bien *P. aureofaciens* ou bien *P. chlororaphis*.

Les résultats de la mise en évidence de leur capacité à produire des molécules bioactifs ont révélé que 100% des souches ont le pouvoir de produire l'ammoniac, 80% produisent l'amylase, 75% sont aptes à synthétiser l'acide indole acétique (AIA), 41,6% produisent de cyanure d'hydrogène (HCN), 50% produisent les phosphatases, et seulement 25% sont avérés productrices des enzymes protéolytiques. En revanche, ces derniers se sont montrés incapables de produire les phénazines, les lipases et les acides organiques.

Les huit souches qui ont montré une forte production des métabolites secondaires ont été criblées *in vitro* pour leur activité antagoniste vis-à-vis de deux formes de *Fusarium oxysporum* sur trois milieux différents (PDA et King B et le milieu Mixte) par la technique de confrontation directe. Les souches de *Pseudomonas* (KFR2, TBR51, TRR5) ont montré une inhibition importante de la croissance mycélienne avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 88%.

Mots clés : *Pseudomonas* spp fluorescents, endophytes, métabolites secondaires, antagonisme, *Fusarium oxysporum*.

Abstract

Our work aims to identify and evaluate the ability of *Pseudomonas* spp fluorescent strains isolated from the endophytosphere of the date palm to produce some secondary metabolites as well as to demonstrate their antifungal effect.

The identification results according to some dichotomous key tests and the LOPAT tests allowed us to select 12 out of 25 strains with the characteristics of *Pseudomonas* spp.fluorescents. 10 strains may be affiliated with *Pseudomonas putida* or within the intermediate group between *P. putida* and *P. fluorescens*, whereas two strains with *P.fluorescens* or *P. aureofaciens* or *P.chlororaphis*.

The results of the demonstration of their ability to produce bioactive molecules revealed that 100% of the strains have the power to produce ammonia, 80% produce amylase, 75% are able to synthesize indole acetic acid (AIA), 41.6% produce hydrogen cyanide (HCN), 50% produce phosphatases, and only 25% were able to produce proteolytic enzymes. In contrast, the latter have shown unable to produce phenazines, lipases and organic acids.

The eight strains that showed high production of secondary metabolites were screened *in vitro* for their antagonistic activity against both forms of *Fusarium oxysporum* in three different media (PDA and King B and Mixed) by the technique of direct confrontation. As a result, *Pseudomonas* strains (KFR2, TBR51, and TRR5) showed a significant inhibition of mycelial growth with inhibition rates of up to 88%.

Keywords: *Pseudomonas* spp fluorescent, endophytes, secondary metabolites, antagonism, *Fusarium oxysporum*.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم قدرة سلالات *Pseudomonas spp* المشعة المنتقة من الغلاف الداخلي لنخيل التمر، على إنتاج بعض المركبات الأيضية الثانوية في المختبر وكذلك لإثبات تأثيرها المضاد للفطريات.

سمحت لنا نتائج بعض إختبارات المفتاح الثنائي واختبارات LOPAT باختبار 12 من 25 سلالة مع خصائص *Pseudomonas spp. fluorescents*. انتسبت 10 سلالات إلى *Pseudomonas putida* أو ضمن المجموعة الوسيطة بين *P. putida* و *P. fluorescens*، بينما انتسبت سلالتين إلى *P. fluorescens* أو *P. aureofaciens* أو *P. cloraphis*.

أظهرت نتائج إثبات قدرة *Pseudomonas spp* المشعة على إنتاج المركبات الأيضية الثانوية أن 100% من السلالات لديها القدرة على إنتاج الأمونيا، و 80% تنتج الأميلاز، و 75% قادرة على إنتاج AIA، و 41.6% تنتج سيانيد الهيدروجين (HCN)، و 50% تنتج الفوسفاتاز، و 25% فقط لها القدرة على إنتاج الأنزيمات البروتينية، في المقابل، أظهر هذا الأخير تسجيل إنعدام تام لإنتاج lipase، phénazine، acide organique.

تم فحص السلالات الثماني التي أظهرت إنتاجاً مرتفعاً من الايضات في المختبر بحثاً عن نشاطها العدائي ضد كلا شكلي *Fusarium oxysporum* في ثلاث أوساط مختلفة (PDA و King B و Mixte) من خلال تقنية المواجهة المباشرة نتيجة لذلك، أظهرت سلالات *Pseudomonas* (KFR2، TBR51، TRR5) نشاط عدواني مختبري فعال ضد الفطريات، مع معدلات تثبيط تصل إلى 88%.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas spp fluorescents*، نابوت داخلي، المركبات الأيضية الثانوية، الخصم، *Fusarium oxysporum*.

Liste de figures

Figure 1 : Schéma descriptif d'un palmier dattier (Chao et Krueger, 2007).....	4
Figure 2 : Les Oasis algérienne, lieux de culture du palmier dattier (Boulanouar, 2015).....	7
Figure 3 : La rhizosphère et les micro-organismes associés (Phillippot et <i>al.</i> , 2013).....	10
Figure 4 : Les interactions entre le PGPB, les phytopathogènes et les plantes (Ngalimat et <i>al.</i> , 2021).....	12
Figure 5 : Description des effets directs et indirects des PGBR sur la croissance des plantes (Gupta et <i>al.</i> , 2015).....	13
Figure 6 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux <i>Pseudomonas</i> (Bossis et <i>al.</i> , 2000).....	14
Figure 7 : Arbre phylogénétique de la vie (Garrido-Sanz et <i>al.</i> , 2016).....	16
Figure 8 : Mécanismes multiples employés par les endophytes et leurs métabolites dans la gestion des maladies des plantes (Yandong et <i>al.</i> , 2022).....	18
Figure 9 : Purification des souches de <i>Pseudomonas.spp</i> fluorescents endophytique après plusieurs repiquages successifs.....	26
Figure 10 : Clé dichotomique d'identification des <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents d'après Bossis (1995).....	27
Figure 11 : Les tubes contenant le milieu Mueller Arginine (ADH 5%) inoculés et recouverts d'une couche de vaseline.....	29
Figure 12 : Les différentes étapes pour réalisation de test de production d'HCN.....	31
Figure 13 : Ensemencement d'une culture de <i>pseudomonas spp.</i> fluorcsents sur bouillon nitraté.....	32
Figure 14 : Ensemencement en spots des souches de <i>Pseudomonas spp.</i> fluorcsents sur milieu Pikovskaia.....	33
Figure 15 : Ensemencement en spots des souches de <i>Pseudomonas spp.</i> fluorcsents sur milieu TSA additionnée de 1% d'acide oléique.....	34

Figure 16 : Méthode de conformation directe en boite de pétrie entre les souches de <i>Pseudomonas</i> spp .fluorescents et le champignon <i>Fusrium oxysporum</i>	35
Figure 17 : Ensemencement d'une souche de <i>Pseudomonas</i> spp .fluorescents sous forme de deux stries en parallèles.....	36
Figure 18 : Transplantation d'un disque fongique au centre de boite de pétrie contient la souche de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents après incubation de 24h.....	36
Figure 19 : Les fluorescences des isolats bactériens sous UV (350-400nm).....	39
Figure 20 : Le test de potasse indicateur de Gram : La formation d'un filament mucoïde confirme le Gram négatif.....	40
Figure 21 : Résultat positive pour les souches testées catalase et oxydase.....	40
Figure 22 : Résultat de la production de levane sucrase sur les souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents.....	41
Figure 23 : Production d'acide indole acétique (AIA) et d'autres types d'acide indole acétique par quelques souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorecsents.....	44
Figure 24 : la production d'acide cyanhydrique (HCN) par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorecsents.....	45
Figure 25 : Production de phosphatase par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorecsents.....	46
Figure 26 : Production d'amylase par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorecsents.....	47
Figure 27 : Production des enzymes protéolytiques par les souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorecsents.....	47
Figure 28 : Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieude culture PDA.....	49
Figure 29 : Activité antifongique des souches testées sur milieu PDA.....	49
Figure 30 : Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieu King B.....	50
Figure 31 : activité antifongique sur milieu King B.....	50
Figure 32 : Activité antifongique sur milieu Mixte.....	51
Figure 33 : Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieu Mixte.....	51

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classement des pays producteurs de dattes à travers le monde en 2013	6
Tableau 2 : Maladies et ravageurs signalés sur le palmier dattier en Algérie.....	9
Tableau 3 : Cordonnés des échantillons utilisés.....	25
Tableau 4 : Quelques Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches.....	25 38
Tableau 5 : Spectre de réponse d'identification selon de la clé dichotomique proposée par Bossis (1995).....	42
Tableau 6 : Spectre de réponse d'identification selon les tests LOPAT.....	43
Tableau 7 : Nombre et taux des souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents producteurs des métabolites secondaire.....	43
Tableau 8 : Production de cyanide d'hydrogène.....	44
Tableau 9 : Production de phosphatase	45
Tableau 10 : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur milieu King B.....	64
Tableau 11 : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur milieu PDA.....	64
Tableau 12 : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur milieu Mixte.....	65

Liste des abréviations

AIA : Acide Indole Acétique

ATP : Adénosine 5'-triphosphate

CWDE : Enzymes dégradant les parois cellulaires

DAPG : Diacetyl-phloroglucinol

Foa : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

Fol : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

HCN: Cyanure d'hydrogène

ISR: Induced Systemic Resistance

LOPAT : Levane sucrase, oxydase, pectinase, arginine dihydrolase, test d'hypersensibilité au Tabac

µl : Microlitre

µm : Micromètre

NBY : Nutrient broth yeast extract

PCA : Phénazine-1-carboxylate

PDA: Potato dextrose agar

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PLT : Pyolutéorine

PRN : Pyrrolnitrines

PVK : Pikovskaia (milieu de culture)

TSA : Tryptic-soy-agar

UV : Ultraviolet

Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction1

Chapitre I : Synthèses bibliographique

I. La plante hôte, le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*).....3

I.1. Histoire et origine du palmier dattier3

I.2. Systématique et description morphologique du palmier dattier.....3

I.3. Répartition géographique et importance du palmier dattier.....5

I.3.1. Dans le monde.....5

I.3.2. En Algérie.....6

I.4. Les contraintes abiotiques et biotiques du palmier dattier7

I.4. 1. Les facteurs abiotiques.....8

I.4. 2. Les menaces et les maladies du palmier dattier.....8

I.5. Les méthodes de lutte.....9

II. Les rhizobactéries.....10

II.1. Notion de la rhizosphère.....10

II.2. Activité microbiologiques de la rhizosphère11

II.3. Bactéries promotrices de la croissance de la plante (PGPR).....12

III. Les *Pseudomonas* spp fluorescents13

III.1. Introduction au genre *Pseudomonas*13

III.1.2. Caractère généraux15

III.1.3. Diversité génomique15

III.2. *Pseudomonas* spp fluorescents endophytiques.....16

III.3. Effet bénéfiques de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents endophytiques.....	17
III.3.1.Action direct	18
III.3.1.1.Induction de la résistance aux maladies des plantes (ISR).....	18
III.3.1.2.Stimulation de la croissance des végétaux.....	19
III.3.2.Action indirects.....	19
III.3.2.1.Compétition spatiale/trophique.....	19
III.3.2.2.Antibiose.....	20
III.4.Métabolites secondaires phytobénéfiques	20
III.4.1.L'acide Indole Acétique (AIA)	20
III.4.2.Enzymes lytiques	21
III.4.3.Solubilisation de phosphore.....	21
III.4.4.Production de substances volatiles (HCN)	21
III.4.5.Production de sidérophores	22
III.4.6.Antibiotique.....	22
III.5.Application de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents	22

Chapitre II: Matériel et méthodes

I. Matériel.....	24
I.1. Matériel Non biologique.....	24
I.2.Matériel biologiques	24
I.2.1.Les souches bactériennes.....	24
I.2.2.Les souches fongiques.....	25
II. Méthodes	25
II.1. Purification des souches bactériennes.....	25
II.2. Conservation des souches.....	26
II.3.Identification des souches	26
II.4.Production des métabolites secondaires impliqués dans la phytostimulation et la lutte biologique	31
II.4.1. Production d'acide cyanhydrique (HCN).....	31
II.4.2. Synthèse d'acide indole acétique.....	31
II.4.3. Production d'ammoniac (NH ₃)	32
II.4.4. Production de phénazine.....	32

II.5. Production des enzymes	33
II.5.1. Solubilisation des phosphates	33
II.5.2. Production de lipase	33
II.5.3. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)	34
II.5.3.1. Activité amylolytique.....	34
II.5.3.2. Enzyme protéolytique	34
II.5.4. Test de production d'acide organique	34
II. Evaluation du pouvoir antagoniste <i>in Vitro</i>.....	35
a. Purification des souches fongiques.....	35
b. Essai d'antagonisme.....	35
c. Expression des résultats	36
 Chapitre III: Résultats et discussion	
I. Identification des souches <i>Pseudomonas spp.</i> fluorescents endophytiques.....	38
I.1. Caractérisation physiologiques et biochimique des isolats	39
A. Test de la fluorescence.....	39
B. Aspect des colonies	39
C. Examen microscopique	39
D. Test catalase et oxydase.....	40
E. Test de levane	40
F. Test d'hypersensibilité au Tabac.....	41
G. Test d'arginine dihydrolase	41
H. Gélatinolyse	41
I.2. Identification phénotypique des isolats.....	41
II. Métabolites secondaires.....	44
II. 1. La production d'acide indole acétique (AIA)	44
II.2. La production d'acide cyanhydrique (HCN)	44
II.3. Phénazines	45
II.4.5. Production de l'ammoniac.....	45
II.4. Production des enzymes	45
II.4.1. Phosphatases	46
II.4.2. Lipase	46
II.4.3. Pectinase	46

II.4.4.Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)	47
II.4.4.1. Production d'amylase	47
II.4.4.2. Production d'enzyme protéolytique	48
II.4.6.Production d'acide organique	48
III .Résultats de la sélection des souches de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents antagonistes <i>in vitro</i>	48
Discussion	52
Conclusion.....	58

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) constitue l'élément essentiel de l'écosystème oasien. Il joue un rôle important dans la protection des cultures sous-jacentes (fruitières, maraichères, fourragères ou céréalières). C'est une plante d'intérêt socio-économique majeur pour de nombreux pays elle permet la fixation des populations et le maintien des centres de vie (**Loutfi et El Hadrami, 2004**). L'Algérie est considérée parmi les principaux pays producteurs de dattes dans le monde, elle est classée le deuxième pays producteur de datte dans la zone arabe après l'Egypte ; avec une production de 1136025 tonnes en 2019 (**Faostat, 2020**).

La culture du palmier dattier est soumise à plusieurs facteurs abiotiques (sécheresse, stress salin) qui sont principalement dues au fait qu'il se développe sous des conditions désertiques hostiles. Ainsi que par plusieurs facteurs biotiques correspondant aux ravageurs du palmier dattier (**Benlarbi, 2019**). En effet, diverses maladies cryptogamiques, notamment causées par des champignons, menacent sérieusement sa production, tels que la fusariose vasculaire qui est sans doute la maladie cryptogamique la plus grave du palmier dattier due à un champignon tellurique *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Son expansion a été responsable de la perte de plus des deux tiers d'arbres de palmier dattier et résulte des pertes économiques importantes (**Dihazi, 2012**).

Cependant, la lutte contre les maladies de cette plantes cultivées, notamment celles causées par les champignons phytopathogènes se base essentiellement sur l'utilisation des produits chimiques (fertilisants, pesticides) qui sont à la base de l'amélioration de rendement de divers cultures (**Kirdi, 2011**). Par contre ces intrants chimiques ont provoqué des sérieux problèmes sur la biodiversité, la santé humaine, et le développement de la résistance chez les agents pathogènes (**Moin et al., 2019**). Ces contraintes ont obligé la communauté scientifique à chercher d'autres alternatives.

Par ailleurs, de nombreux micro-organismes antagonistes tels que les *Pseudomonas* sont des habitants communs des racines des plantes qui peuvent pénétrer à l'intérieur des racines et atteindre les parties aériennes (**Hallman et al., 1997; Siddiqui et Ehteshamul-Haque, 2001; Korejo et al., 2019**), et sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance des micro-organismes phytopathogène (**Nam et al., 2018**).

En particulier, les endophytes bactériens attirent l'attention en tant qu'agent de lutte biologique, en raison de leur colonisation des tissus végétaux et de leur effet positif sur la croissance des plantes, ainsi que la suppression des maladies telluriques (**Prieto et al., 2011 ; Cabanas et al., 2014**).

Le groupe *Pseudomonas* comprise un grand groupe hétérogène d'espèces Gram-négatives, appartenant aux *δprotéobactéries*, à la famille *Pseudomonadaceae* (**Palleroni, 2010 ; Peix, 2018**). Ils sont très ubiquistes, colonisent des niches écologiques très diverses, isolées de l'eau, du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux (**Mezaache, 2012**). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytes, sont connue comme des agents actifs de biocontrôle pour améliorer la croissance des plantes et induit une résistance contre les maladies et les stress (**Rahman et al., 2016 ; Kandel et al., 2017 ; Urooj et al., 2018**), en plus de leur effet antagoniste vis-à-vis des agents phytopathogènes. La grande diversité des mécanismes d'actions de ces *Pseudomonas* est liée à leur grande capacité à produire des molécules bioactives (**Tan et al., 2001 ; Widiyanti et al., 2017**), tels que les enzymes lytiques qui jouent un rôle dans la dégradation de la paroi cellulaire des agents phytopathogènes et l'inhibition de la germination des spores (**Gao et al., 2010**), les régulateurs de croissance comme l'acide indole acétique (AIA) (**Santner et al., 2009**), les substances volatiles (HCN) qui jouent un rôle dans l'inhibition de pathogènes des racines des plantes (**Sidiqui et al., 2006**).

Notre travail a été orienté dans le but de faire :

- ✓ Une pré-identification d'une collection de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolée de l'endophytosphère du palmier dattier.
- ✓ L'étude de leur capacité à produire des molécules bioactives d'intérêt biotechnologique tels que (l'AIA, HCN, phosphatase, amylase ...).
- ✓ L'implication de ces métabolites dans l'antagonisme *in vitro* vis-à-vis des deux formes de champignon *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* responsable de la fusariose vasculaire du palmier dattier, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* responsable de la fusariose vasculaire de la tomate).

Synthèse

bibliographique

I. La plante hôte, le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*)

I.1. Histoire et origine du palmier dattier

Le palmier dattier fut introduit sur les côtes orientales de l'Afrique par les Arabes, bien avant les premiers voyages des navigateurs européens de XV^{ème} siècle. A partir de son aire d'origine, la culture du dattier s'est répandue dans l'ancien continent. Vers l'Est, la culture du palmier dattier progressa de la basse Mésopotamie vers l'Iran, puis en direction de la vallée de l'Indus (**Sibihi, 2011**). Vers l'Ouest, Depuis l'Egypte, la culture du palmier dattier a gagné la Libye d'où elle progressa dans différentes directions : vers le Maghreb, elle se développa en Tunisie ; en Algérie dans le Souf, Ouest Rhir, le Tidikel, la Saoura et les Zibans ; au Maroc ; et enfin en Mauritanie, dans l'Adrar mauritanien (**Agoudjil, 2011**). Actuellement la culture du dattier s'étend dans l'Hémisphère Nord préférentiellement dans les régions arides et semi-arides chaudes (**VV Do Thi, 2011**).

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* L. par Linne en 1734. Le nom scientifique du palmier dattier provient de son fruit, «Phénix» en grec signifie violet ou rouge (fruit), et «dactylifera» signifie forme de doigt de la grappe de fruits (**Chao et Krueger, 2007**). Selon **Al-Alawi et al., (2017)** Dactylifera est un groupe du mot grec dactylus, qui signifie «doigt» et du mot latin «ferous», qui signifie «portant» désigne les grappes de fruits produites par cette plante.

I.2. Systématique et description morphologique du palmier dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante pérenne, classée dans le groupe des Spadiciflores avec l'existence des dattiers mâles dokhar et des dattiers femelles Nakhla, leur ordre est Palmale, la famille des Palmacées (Arecaceae) Angiospermes, monocotylédones, qui comprennent 200 genres et plus de 2 500 espèces, la sous-famille des Coryphoïdées, la tribu des Phoénicées, Genre : Phoenix et Espèce: Dactyliféra L (**Al-Alawi et al., 2017**).

L'espèce *Phoenix dactylifera* L. est l'une des cinq espèces domestiquées des Arecaceae, les quatre autres espèces sont le palmier areca (areca catechu), le palmier pêche (Bactris gasipaes), le cocotier (Cocos nucifera) et le palmier à huile (Elaeis guineensis) (**Jaradat, 2015**).

La description morphologique de cette espèce selon plusieurs auteurs est comme suit : c'est une plante monocotylédone à croissance apicale dominante composé de 3 parties, un système racinaire, un organe végétatif composé du tronc et de feuilles et un organe reproductif composé d'inflorescences mâles ou femelles (Figure 1) (**Freha, 2015**).

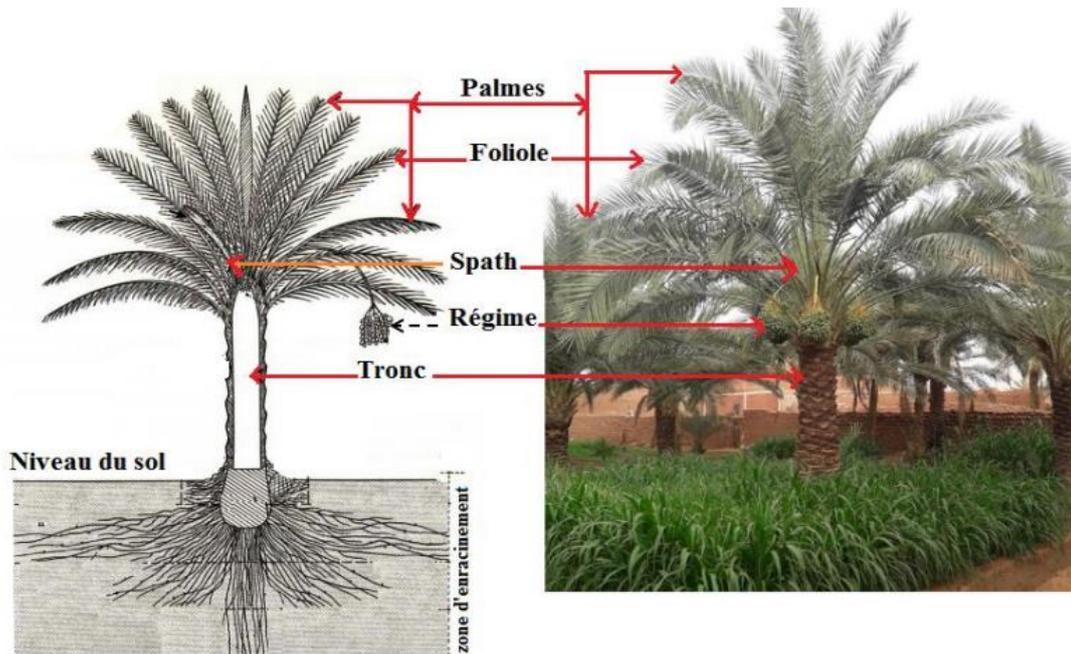


Figure 1 : Schéma descriptif d'un palmier dattier (Chao et Krueger, 2007) modifié.

a. Le système racinaire du palmier dattier est comme la majorité des monocotylédones denses et de type fasciculé, il est formé de plusieurs types de racines qui émergent partiellement au-dessus du niveau du sol dont le diamètre ne dépasse pas 1,5 cm avec une hauteur allant jusqu'à 50 cm de la base du tronc (Sedra, 2003).

b. L'organe végétatif est composé d'un tronc ou stipe cylindrique non ramifié couvert par des bases des pétioles des anciennes palmes mortes, lignifiées et de couleur marron brun. La hauteur de stipe peut atteindre de 10 à 30 m mais son épaisseur reste généralement le même durant toute la vie du palmier (Hadj, 2010 ; Amine, 2009). Les feuilles du palmier dattier présentent un pétiole et un limbe entier découpé en folioles et une série d'épines solitaires déposées sur un rachis bien développé l'ensemble constitue la palme. Sur le tronc en hélice se pose les palmes avec une dimension qui varie entre 2 et 6 m de longueur. Ces palmes demeurent vert en activité durant 4 à 7 ans ; puis se dessèchent, jaunissent, et meurent (Hadj, 2010).

c. L'organe reproductif est composé d'inflorescences mâles ou femelles (est une plante dioïque), les inflorescences (spadices) ont une forme de grappes d'épis (0,25 à 1 mètre de longueur) protégés dans des spathes. Elles sont formées à partir de bourgeons développés à l'aisselle des palmes avec une couleur vert-jaunâtre. Pour une meilleure fécondation en phœniciculture, la pollinisation artificielle est pratiquée (Sedra, 2003 ; Hadj, 2010).

I.3. Répartition géographique et importance du palmier dattier

I.3.1. Dans le monde

Le palmier dattier a une certaine importance socio-économique. En effet, la superficie cultivée en palmier dans le monde est de 800 000 ha (**Elhoumaizi et al. 2002**) et le nombre de dattiers est évalué à environ 100 millions (**Zaid, 2002**), effectif qui augmente chaque année (**Faostat, 2020**).

La distribution naturelle de ces palmiers est généralement dans les zones chaudes et arides par ce qu'il tolère les conditions désertiques et semi-arides. Spatialement, ces palmiers se répartissent à travers le monde. L'Asie est classée en première position avec 60 millions de palmiers dattiers partagés entre Iran, l'Irak, l'Arabie saoudite, le Bahreïn, les Émirats arabes unis, le Koweït, l'Oman, le Pakistan, le Turkménistan et Yémen. En deuxième position se trouve l'Afrique avec 32,5 millions de palmiers dattiers répartis sur l'Égypte, l'Algérie, la Libye, le Mali, le Maroc, la Mauritanie, le Niger, la Somalie, le Soudan, le Tchad et la Tunisie (**Freha, 2015**). Dernièrement, cette culture a été également introduite dans des nouvelles zones comme l'Australie, l'Espagne, le sud de la Chine, la Californie, le Mexique, l'Afrique australe, l'Inde, les États-Unis et l'Amérique du Sud (**Terral et al., 2012**). Le tableau 1 représente le classement des pays producteurs de dattes à travers le monde en 2013 (**Taghizadeh et al., 2019**). Le Classement des pays producteurs de dattes à travers le monde est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classement des pays producteurs de dattes à travers le monde en 2013 (Taghizadeh-alisaraei et *al.*, 2019).

Payé	Production par Tons	Pourcentage %	Classement
Egypte	1501799	19,69	1
L'Iran	1083720	14,21	2
Arabie Saoudite	1065032	13,96	3
Algérie	848199	11,12	4
Irak	676111	8,86	5
Pakistan	526749	6,91	6
Soudan	437835	5,74	7
Oman	269000	3,53	8
Emirats Arabes Unis	245000	3,21	9
Tunisie	195000	2,56	10
Libye	174040	2,28	11
Chine	150000	1,97	12
Maroc	107611	1,41	13
Yémen	54197	0,71	14
Autres	293331	3,85	
Totale	7627624		

I.3.2. En Algérie

L'importance socioéconomique et environnementale du palmier dattier en Algérie est une donnée connue et non discutable, que soit par la sédentarisation de la population, le marché d'emploi qu'elle offre dans les régions oasiennes et par la part de devise généré par l'exportation des dattes (**Benziouche, 2012**). Autrement dit, le palmier dattier constitue le pivot central du système oasien, où la vie était presque impossible en dehors de l'oasis ; c'est un écosystème très particulier, car il est fragile et complexe à la fois (**Benziouche et Chehat, 2010**).

Les oasis algériennes sont localisées dans 17 wilayas allant du Nord du Sahara jusqu'à l'extrême Sud : Adrar, Batna (E'Mdoukal), Béchar, Biskra, Djelfa, El-Bayadh, El-Oued, Ghardaïa, Illizi, Khenchela, Laghouat, M'sila (Bousaada), Naâma, Ouargla, Tamanrasset, Tindouf et Tébessa (**Figure 2**). Ces oasis occupent une superficie qui dépasse les 170 milles ha. Les wilayas possédant le plus grand nombre de pieds de palmier dattier sont dans l'ordre : Biskra, Adrar, El-Oued, Ouargla, Béchar, Ghardaïa et Tamanrasset, pour un taux de

93,27 % des palmiers au niveau national. Ces régions assurent naturellement la grande majorité de la production de dattes du pays (Blama, 2014 ; Moulai et Yahaya, 2019).

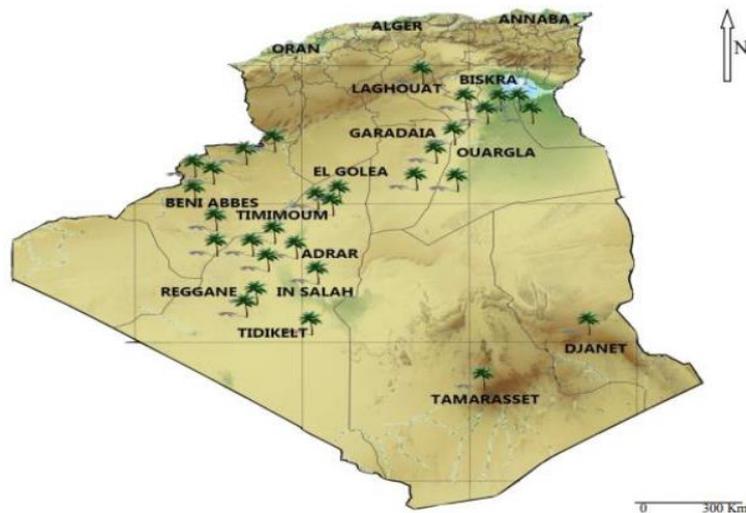


Figure 2 : les Oasis algérienne, lieux de culture du palmier dattier (Boulanouar ,2015)

Le patrimoine phœnicicole algérien dépasse les 20 millions de palmiers, répartie sur 952 cultivars, dont plus de 62 % de pieds de Deglet Nour. La production a connu une augmentation depuis la deuxième moitié de la première décade de ce millénaire. Le chiffre des exportations de dattes a dépassé les 71 millions de dollars en 2020 (Faostat, 2020 ; APS, 2021).

I.4. Les contraintes abiotiques et biotiques du palmier dattier

La culture du palmier dattier est soumise à plusieurs facteurs abiotiques (sécheresse, stress salin) Ainsi que par plusieurs facteurs biotiques comme les maladies dévastatrices comme le Bayoud (Mohamed Mahmoud, 2017 ; Benlarbi, 2019).

I.4. 1. Les facteurs abiotiques

Le palmier dattier est l'espèce clé de voûte de l'écosystème oasien algérien qui est affecté par de multiples facteurs abiotiques qui sont principalement dues au fait qu'il se développe sous des conditions désertiques hostiles tels que :

- La progression de la désertification et l'avancée des dunes de sable menaçant les oasis prennent de plus en plus d'importance.
- La salinisation du sol et de l'eau, due à une mauvaise gestion du drainage, entraîne une réduction du nombre de palmiers et du rendement des fruits (**Bouguedoura et al., 2015**).
- La salinité accentue les effets de la sécheresse en limitant les prélèvements de l'eau par la plante, par la réduction de la différence des potentiels osmotiques entre la solution du sol et la plante. Par conséquent, l'énergie biologique des plantes utilisée dans la production de la biomasse va être consommée pour extraire l'eau de la solution saline du sol (**Daddi Bouhoun, 2010**).
- Enfin, le vieillissement de nombreux palmiers dattiers ainsi que les maladies provoquant la dégénérescence des palmiers dattiers ont entraîné des altérations de la qualité des fruits et une baisse importante des rendements. Depuis de nombreuses années, les agriculteurs délaissent les dattes au profit de cultures plus rentables comme les légumes (**Bouguedoura et al., 2015**).

I.4. 2. Les menaces et les maladies du palmier dattier

Plusieurs facteurs biotiques correspondant aux ravageurs et d'agents phytopathogènes du palmier dattier. Les ravageurs s'attaquent à la plante elle-même et aux dattes sur pied, ou même entreposées (**Benlarbi, 2019**). Les maladies causées par des agents phytopathogènes ont entraîné la dégénérescence des palmiers dattier, une altération de la qualité de fruit et une baisse importante du rendement (**Bouguedoura et al., 2010**). Parmi ces maladies on trouve le Bayoud qui due à un champignon tellurique imparfait appelée *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (F.o.a), qui se manifestent par des modifications externes visibles qui se traduisent par des modifications internes au niveau des vaisseaux et des racines, et provoque le flétrissement par blocage de la circulation de l'eau dans les vaisseaux conducteurs qui résulte comme brunissement et formation de thylles (**Corbaz, 1990 ; Duhoux et Nicole, 2004**).

Des exemples de ravageurs et d'agents phytopathogènes les plus redoutables en Algérie, sur cette espèce, sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Maladies et ravageurs signalés sur le palmier dattier en Algérie (**Dakhia et al ., 2013**).

La maladie	Agent causal
Le Khamedj ou pourriture de l'inflorescence	<i>Mauginiella scaetae</i>
La pourriture du bourgeon ou Belâat	<i>Phytophthora sp</i>
La pyrale des dattes	<i>Ectomyelois ceratoniae</i>
Le Boufaroua	<i>Oligonychus afrasiasticus</i>
Le Cochenille blanche	<i>Parlatoria blanchardi</i>
Le Bayoud	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> (F.o.a)

I.5. Les méthodes de lutte

Il existe plusieurs méthodes de lutte contre les maladies signalés sur le palmier dattier tels que la lutte chimique qui consiste à pulvériser un fongicide sur la couronne foliaire du palmier, par deux applications suffisent : la première juste après la récolte et le nettoyage du palmier et la seconde au moment de l'émergence des spathes (**Anonyme, 2000**).

De plus, la lutte génétique par la production de variétés résistantes apparaît donc comme la seule façon la plus efficace de soutenir et de produire le palmier dattier. Par ailleurs, de nombreux micro-organismes antagonistes sont capables d'améliorer la santé des plantes en limitant la croissance des micro-organismes phytopathogène (**Bloemberg et Lugtenberg, 2001**). Les endophytes ont une efficacité comme agents de lutte biologique assurent un meilleur rendement par l'élimination du pathogène, tels que le *F. o. albedinis* (**Lamari et al., 2014**). L'utilisation d'agents d'organismes antagonistes, tels que les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) et plus spécifiquement les *Pseudomonas*, peut être aussi une méthode pratique dans le contrôle des maladies telluriques (**Kloepper et Schroth, 1978 ; Schmidt et al., 2004**).

II. Les rhizobactéries

II.1. Notion de la rhizosphère

La rhizosphère est définie comme la zone de sol entourant la racine (**Hiltner, 1904 ; Hartmann, Rothballer et Schmid, 2008**), qui est essentiel à la fois dans l'absorption des nutriments et les interactions avec divers microbes du sol (**Bakker et al., 2018**). La rhizosphère est l'une des niches écologiques les plus diversifiées avec plusieurs types de micro-organismes en raison de la riche disponibilité en nutriments des hôtes (**Venturi et Keel, 2016**). Cette relation mutualiste entre l'hôte et les microbes de la rhizosphère en fait un écosystème hautement compétitif dans la nature. Grâce à cela, la plante hôte et son microbiome concomitant acquièrent un avantage évolutif pour survivre dans diverses conditions défavorables en établissant des interactions étroites (**Mapelli et al., 2013**). Dans cette niche écologique les microorganismes peuvent être libres ou étroitement associés aux racines, l'association la plus stricte étant celle de la symbiose qui caractérise d'une part les relations entre les légumineuses et les rhizobiacées, bactéries fixatrices d'azote et d'autre part les relations entre les glomales, champignons formant des mycorhizes avec de très nombreuses espèces végétales (**Alabouvette et Cordier, 2018**) (figure 3).

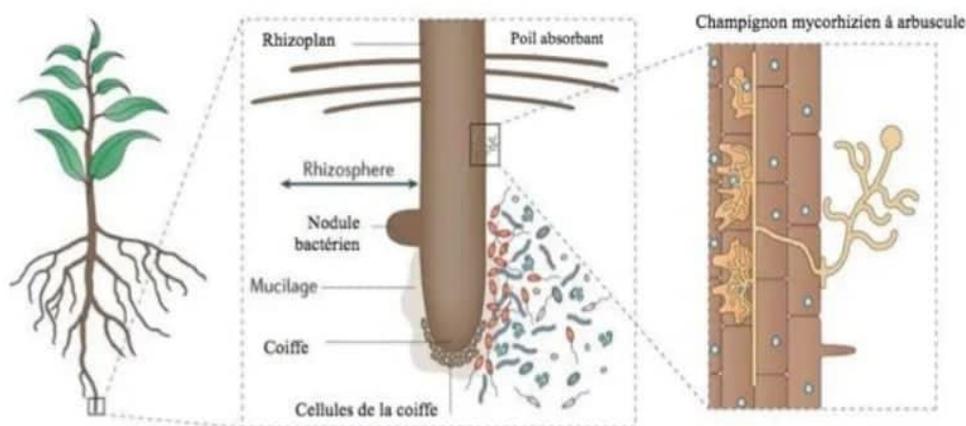


Figure 3 : La rhizosphère et les micro-organismes associés (**Phillippot et al., 2013**).

II.2. Activité microbiologiques de la rhizosphère

Le sol adhérent aux racines des plantes abrite une communauté bactérienne importante et diversifiée. La plante libère, en effet, au niveau de ses racines, des exsudats et des sources de nourriture (**Sasse et al., 2018**), permettent ainsi de sélectionner les micro-organismes capables de les utiliser (**Haichar et al., 2014**).

En effet, certaines bactéries sont capables d'entretenir des relations symbiotiques ou non symbiotiques avec leur plante hôte, en stimulant sa croissance via la production de phytohormones telles que l'auxine ou encore l'augmentation de la biodisponibilité de certains nutriments tels que le fer ou phosphate (**Vacheron et al., 2013**) (figure 4).

Ce sont également des bactéries très compétitives qui peuvent coloniser rapidement la rhizosphère et produisent par exemple des composés antimicrobiens capables d'inhiber la croissance d'autres microorganismes (**Venturi et Keel, 2016**). Cependant, d'autres bactéries phytopathogènes qui sont responsables de pertes économiques considérables liées à leur pouvoir pathogène vis-à-vis des plantes sont capables d'entretenir des interactions négatives et peuvent être de quatre natures différentes : la compétition, l'antagonisme, le parasitisme et la prédation (**Bakker et al., 2014**).

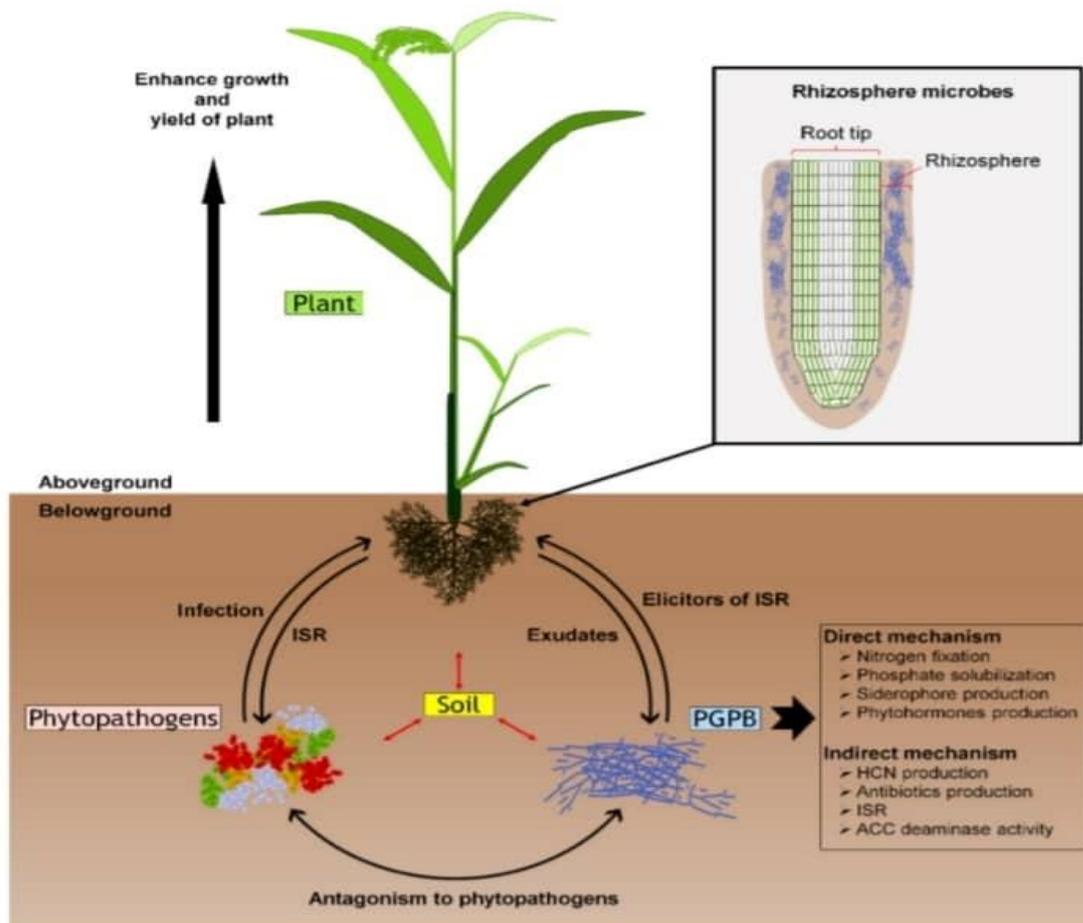


Figure 4 : Les interactions entre le PGPB, les phytopathogènes et les plantes (Ngalimat et al., 2021).

II.3. Bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Les rhizobactéries promotrices (PGPR) sont un groupe important de bactéries bénéfiques colonisant les racines qui prospèrent dans la rhizosphère et le sol de la plante. Ils présentent des interactions synergiques et antagonistes avec le microbiote du sol et s'engager dans un éventail d'activités d'importance écologique (Anirban, 2021).

Les rhizobactéries « PGPR » colonisent efficacement l'arène de la rhizosphère et favorisent la croissance des plantes, stimulent les défenses immunitaires, influencent l'équilibre hormonal, protègent des agents pathogènes et mobilisent les nutriments (Haas et Defago, 2005 ; Venturi et Keel, 2016). Les principaux candidats PGPR appartiennent aux phyla Cyanobactéries, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes et Proteobacteria (Figueiredo et al., 2010). Le groupe des *Pseudomonas* spp fluorescents offre de multiples exemples de bactéries bénéfiques mais aussi de bactéries délétères (Alabouvette et Cordier, 2018).

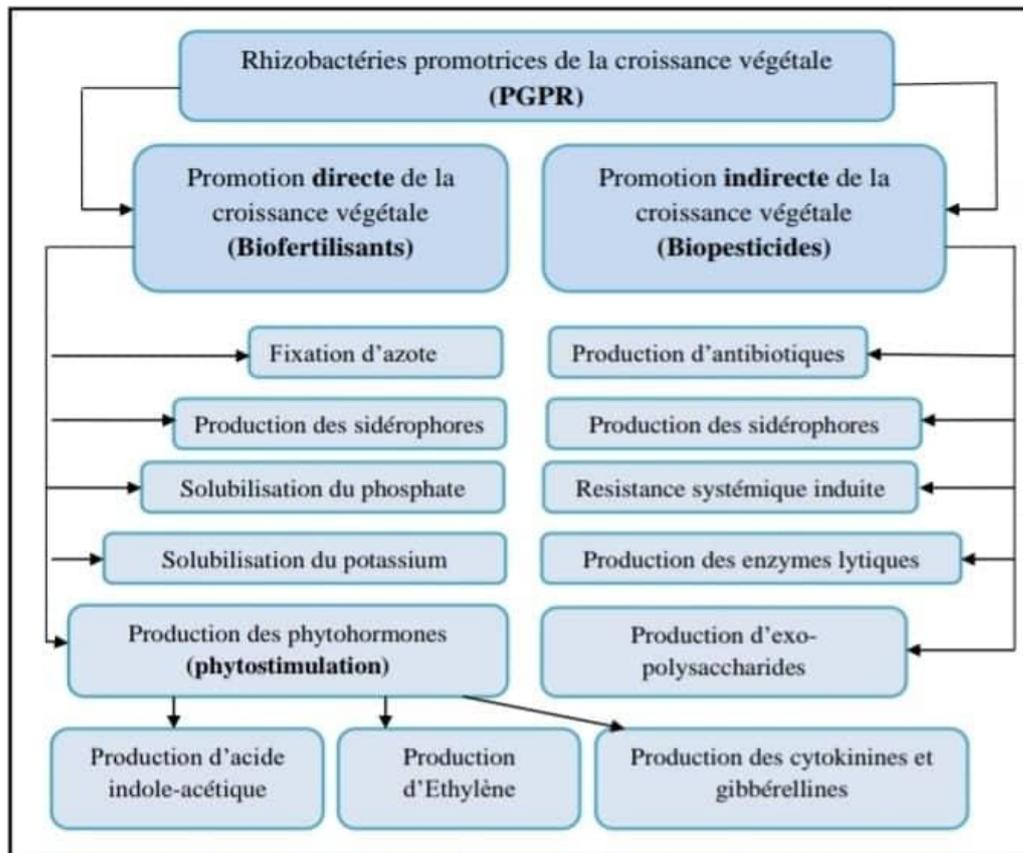


Figure 5 : Description des effets directs et indirects des PGPR sur la croissance des plantes (Gupta et al., 2015).

III. Les *Pseudomonas* spp fluorescents

III.1. Introduction au genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* a été découvert en 1894 par Migula, c'est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plusieurs espèces bactériens (Palleroni, 1992 ; Silby et al., 2011 ; Loper et al., 2012). Ces espèces sont génétiquement, écologiquement et fonctionnellement diversifiées et peuvent être trouvées dans de nombreux habitats terrestres et aquatiques (Palleroni, 2009). Cependant depuis la découverte de ce genre, le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations dues principalement à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Garrido-Sanz et al., 2016).

Avec l'application des résultats du séquençage de l'ADNr 16S, certaines des espèces de ce genre ont été redistribuées dans d'autres genres des sous-classes α , β ou γ des protéobactéries (Kersters et al., 1996 ; Rajwar et Sahgal, 2014).

Les membres du genre *Pseudomonas* (sensu stricto) appartiennent au groupe I de la sous-classe des gamma-protéobactéries. Néanmoins, de nouvelles espèces de sont décrites chaque année (Arnau *et al.*, 2015 ; Wang et Sun, 2016 ; von Neubeck *et al.*, 2017 ; Kimura *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2019).

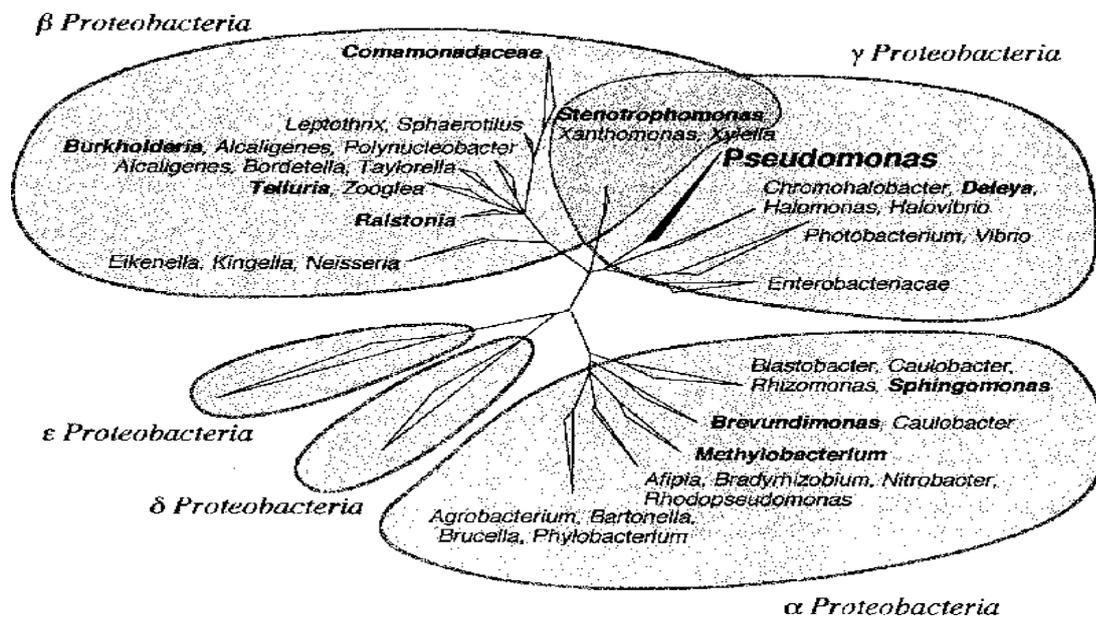


Figure 6 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis *et al.*, 2000).

Le groupe *Pseudomonas* comprend un grand groupe hétérogène d'espèces Gram-négatives, appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* (Palleroni, 2010 ; Peix, 2018). Selon Meliani, (2012), les caractéristiques morphologiques de base communes à presque toutes les espèces de *Pseudomonas* sont la forme de bacille droit et fini de 0,5-1,3 μm , la présence d'un ou plusieurs flagelles polaires. Ces bactéries non sporulantes sont mobiles par une ciliature polaire, rarement non mobiles. Ces caractéristiques morphologiques définissent les «*Pseudomonas*», mais l'appartenance au genre *Pseudomonas* nécessite certains caractères physiologiques supplémentaires, comme un métabolisme énergétique strictement respiratoire et la nutrition du type chimoorganotrophe.

Ils sont d'un grand intérêt en raison de leur importance dans les maladies humaines et végétales, par exemple, *P.aeruginosa* agent pathogène humain (Gellatly et Hancock, 2013) et *P.syringe* un phytopathogène de divers espèces de plantes cultivé (Morriset *et al.*, 2013), et en raison de leur potentiel pour la stimulation de la croissance plantaire et les applications

biotechnologiques, par exemple, *P.fluorescens* (Loperet *al.*, 2012) et *P.putida* (Wuet *al.*, 2011 ; Rocaet *al.*, 2013).

III.1.2. Caractère généraux

Au sein du groupe *Pseudomonas* sensu stricto, les *Pseudomonas* spp fluorescents comprennent toutes les espèces ayant la capacité de produire un pigment fluorescent jaune-vert appelé pyoverdine, spécialement *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *P. putida* et *P. fluorescens* (Palleroni, 2009). Ce pigment est soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme (Paulsen *et al.*, 2005 ; Wong, Levi *et al.*, 2011).

Les *Pseudomonas* spp fluorescents sont faciles à cultiver, comme ils 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). Dans ce groupe, les espèces saprophytes sont à cytochrome Oxydase, catalase positive, possèdent une arginine dihydrolase et ne provoquent pas de réaction d'hypersensibilité sur tabac (Stanier *et al.*, 1966 ; Palleroni, 1984 et 1992). Avec un taux élevée en GC de 58-70% (Palleroni, 2009 ; Meliani, 2012 ; Mishra et Arora, 2017).

Le groupe *Pseudomonas* spp fluorescents se caractérisent par une grande hétérogénéité phénotypique et génotypique (Bossis *et al.*, 2000). Ce groupe renfermaient initialement en *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.chlororaphis* et *P. aureofaciens* rattachée par la suite à *P. chlororaphis* (Johnson et Palleroni, 1989). *P. fluorescens* a été subdivisé en sept biotypes qui ont été par la suite regroupés en cinq biovars (I à V), deux biotypes ayant évolué en *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* (Palleroni, 1984), pour ensuite être fondus dans une même espèce *P. chlororaphis* et pour *P. putida* a été subdivisées en biotypes A et B renommés par la suite biovars A et B (Johnson et Palleroni, 1989).

III.1.3. Diversité génomique

De nombreux génomes de *Pseudomonas* spp ont été séquencés durant ces dix dernières années : Les '*Pseudomonas* Genome Database' (Winsor *et al.*, 2010 ; Winsor *et al.*, 2016) comprends présentement 528 génomes complets et 9106 'draft genomes', incluant les génomes de souches phytobénéfiques appartenant aux espèces *P. putida* (Nelson *et al.*, 2002), *P. protegens* (Paulsen *et al.*, 2005) et *P. chlororaphis* (Shen *et al.*, 2012). L'analyse comparative de ces génomes a considérablement enrichi nos connaissances sur la structure et la diversité

Les endophytes représentent un groupe écologiquement hétérogène. Ils se rencontrent au niveau du système racinaire, du système caulinaire et des feuilles (**McInroy et Kloepper, 1995**) et peuvent être aussi présentes dans d'autres parties de la plante telles que les fruits, les tubercules, les graines et les ovules, dans les écorces, les chaumes des tiges, dans le xylème et notamment attachées à la paroi des vaisseaux (**Wilson, 2000**).

La colonisation d'une plante par un endophyte est la réaction d'un équilibre antagoniste (**Schulz et Boyle, 2005**). Comme mentionné ci-dessus, les endophytes sont des micro-organismes qui vivent dans les plantes et ne présentent aucun symptôme de maladie. Cependant les voies de colonisation utilisées par les endophytes sont similaires à celles utilisées par les pathogènes (**Schulz et Boyle 2005 ; Kogel et al., 2006**). Ils peuvent coloniser les plantes de manière opportuniste via une blessure, mais peuvent également pénétrer dans la plante au moyen d'exo-enzymes de dégradation, ainsi que par la production de métabolites phytotoxiques (**Caldwell et al. 2000 ; Schulz et Boyle., 2005**).

III.3. Effet bénéfiques de *Pseudomonas* spp fluorescents endophytiques

les *Pseudomonas* spp fluorescents endophytes permet d'améliorer le développement de la plante-hôte, en sécrétant divers métabolites qui améliorent directement ou indirectement la tolérance de l'hôte à différents stress, les rendant ainsi bénéfiques pour les plantes, et ils servent potentiellement d'agents biologiques prometteurs dans le biocontrôle des maladies telluriques (**Widiantini et al., 2017**).

Les mécanismes clés des endophytes sont basé sur la compétition avec les agents pathogènes pour la niche et la nutrition (**De Meyer et al., 2015**), la production de composés antimicrobiens, la sécrétion d'enzymes lytiques, l'induction de la résistance systémique chez les plantes hôtes et la production de hormones végétales et régulateurs favorisant la croissance des plantes (figure 8).

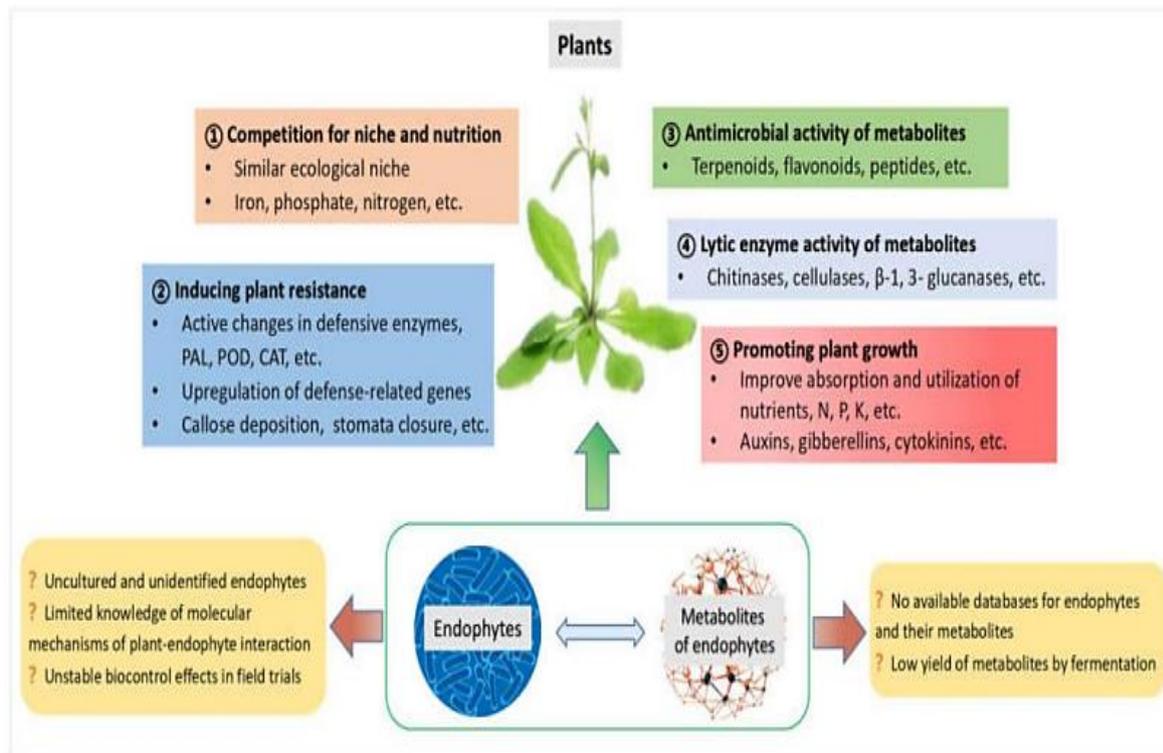


Figure 8 : Mécanismes multiples employés par les endophytes et leurs métabolites dans la gestion des maladies des plantes (Yandong *et al.*, 2022).

Les effets bénéfiques de ces *Pseudomonas* endophytiques s'opèrent à travers de multiples mécanismes, y compris des mécanismes directs et indirects (Jeyanthi et Kanimozhi, 2018). Les mécanismes directs impliquent la fixation de l'azote, la solubilisation des minéraux (le phosphore et le fer), la production de sidérophores et la production de phytohormones (par exemple, les auxines, les cytokinines, les gibbérélines et l'éthylène). Pendant ce temps, les mécanismes indirects sont principalement dus aux activités de biocontrôle de ces PGPR en réponse au stress biotique en produisant des antibiotiques (Tiwari *et al.*, 2017).

III.3.1.Action direct

III.3.1.1.Induction de la résistance aux maladies des plantes (ISR)

Les *Pseudomonas* spp fluorescents sont connues depuis longtemps pour leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes (Van loon, 2007).

Cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites. De plus, ces métabolites peuvent non seulement inhiber les microorganismes pathogènes, mais également induire l'expression de gènes liés à la

défense des plantes et activer la réponse immunitaire de l'hôte (**Bastias et al., 2017 ; Khare et al., 2018**).

En effet, l'utilisation de *Pseudomonas* spp fluorescents endophytiques dans une certaine partie de la plante entraîne une réduction significative de l'indice de maladie, même si les agents pathogènes sont infectés dans différentes parties de l'hôte (**Yandong et al., 2022**).

De nombreux métabolites de *Pseudomonas*, tels que les sidérophores, le CLP, le DAPG et les composés organiques volatils (COV), y compris l'acétoïne et le 2,3 - butanediol, agissent comme un éliciteur de l'ISR (**Arshad et al., 2007**). De plus, l'ISR implique une phytohormone l'éthylène qui stimule les réponses de défense de la plante hôte contre une variété de phytopathogènes (**Glick, 2012**). Ces composants bioactifs pourraient fournir une ressource alternative prometteuse pour la gestion des maladies des plantes (**Wu et al., 2018**).

III.3.1.2. Stimulation de la croissance des végétaux

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont la capacité de synthétiser des métabolites secondaires. Ces derniers influencent positivement sur la croissance des plantes (**Struz et Christie, 2003**). En favorisant une amélioration généralisée sur la nutrition minérale de la plante, essentiellement pour le fer, le phosphore, l'azote et le manganèse (**Compant et al., 2005**).

La stimulation de la croissance des plantes peut être due à la synthèse microbienne de substances de croissance analogues aux phytohormones (**Shanmugaiah et al., 2015**) tels que : l'auxine, l'acide gibbérellique, cytokinines et de l'éthylène et des composés vitaminiques (**Li et al., 2018**).

III.3.2. Action indirects

III.3.2.1. Compétition spatiale/trophique

La compétition avec les microorganismes pathogènes pour la niche et la nutrition, est un mécanisme prometteur pour l'utilisation des *Pseudomonas* spp fluorescents endophytiques dans le contrôle des maladies des plantes (**Liarzi et al., 2013**).

En effet, la colonisation dans les tissus végétaux est l'une des propriétés fondamentales des *Pseudomonas* endophytiques (**Latz et al., 2018**). Ces derniers peuvent occuper préférentiellement les sites d'invasion des agents pathogènes dans les plantes et entrent en compétition avec les microbes pathogènes pour la nutrition, ce qui tend à réduire le nombre de

sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (**Messaoudi, 2015**).

La compétition pour les nutriments se fait généralement par la disponibilité en fer dans le milieu. Par la sécrétion de sidérophores, les *Pseudomonas* spp. fluorescents piègent le fer présent dans le milieu en privant les autres microorganismes et en inhibant leurs pouvoirs de pathogénicité (**Meliani, 2012**).

III.3.2.2. Antibiose

Ce mécanisme est le plus connu et le plus répandu chez les *Pseudomonas* spp fluorescents, ce qui leurs confèrent la particularité d'être des agents de biocontrôle. Nombreux métabolites secondaires à activités antifongiques et / ou antibactériennes sont synthétisés par ces derniers tel que l'acide cyanhydrique (HCN), La pyoluteorine, le DAPG, la pyrrolnitrine et les phénazines (PCA) (**Defago, 1993 ; Haas et Defago, 2005**).

III.4. Métabolites secondaires phytobénéfiques

Les effets bénéfiques déployés par les *Pseudomonas* endophytiques sur la biotechnologie agricole reposent sur la capacité de ces organismes à produire une large gamme de métabolites bioactifs tels que les phytohormones, les enzymes lytique, les antibiotiques... (**Christina et al., 2013 ; Brader et al., 2014**).

III.4.1. L'acide Indole Acétique (AIA)

La synthèse microbienne des phytohormones est connue depuis longtemps. Il est rapporté que 80% des micro-organismes isolés de la rhizosphère de diverses cultures possèdent la capacité de synthétiser et libérer des auxines comme métabolites secondaires (**Patten et Glick, 1996 ; Ramos-Solano et al., 2010**).

L'acide indole-3-acétique (AIA) est une phytohormone synthétisée par de nombreuses PGPR, Elle favorise la division cellulaire, stimule la germination des graines et des tubercules, augmente le taux de développement du xylème et des racines en initiant la formation de racines latérales et adventives (**Campanoni, 2005**). Cette auxine médie les réponses à la lumière, à la gravité et à la fluorescence, contrôle la photosynthèse, la formation de pigments, la biosynthèse de divers métabolites, la résistance aux conditions stressantes ainsi que dans les interactions plantes-bactéries (**Spaepen et Vanderleyden, 2011**). C'est une hormone essentielle à la formation de nodules (**Choudhury et al., 2019**).

L'AIA a été impliqué dans pratiquement tous les aspects de la croissance des plantes et le développement, ainsi que les réactions de défense. Cette diversité de la fonction se traduit par l'extraordinaire complexité de l'AIA biosynthétique, le transport et les voies de signalisation (Santner et al., 2009).

III.4.2. Enzymes lytiques

Les *Pseudomonas* spp fluorescents produisent diverses enzymes telles que les chitinases, les cellulases, les β -1, 3-glucanases, les pectinases, les glucanases et les protéases (Gao et al., 2010 ; Rajulu et al., 2010). Ces enzymes présentent une activité hyperparasitaire peuvent dégrader la paroi cellulaire des agents pathogènes ou inhiber la germination des spores (Santoyo et coll., 2016 ; Carmona-Hernandez et al., 2019).

C'est un moyen efficace pour stimuler la croissance des végétaux, supprimer les phytopathogènes et de permettre à l'hôte d'obtenir une protection contre le stress biotique et abiotique (Yandong et al., 2022).

III.4.3. Solubilisation de phosphore

Le phosphore est un autre nutriment essentiel au fonctionnement des végétaux après l'azote, car il joue un rôle crucial dans de nombreuses réactions enzymatiques. De la même façon que l'azote, le phosphore ne peut pas être directement assimilé par la plante car il forme dans le sol de nombreux complexes (Khan et al., 2009). La solubilisation du phosphore en phosphate peut être réalisée par *Pseudomonas* spp fluorescents lors de la sécrétion de phosphatases, le rendant ainsi assimilable par la plante (Otieno et al., 2015 ; Mtos et al., 2017).

III.4.4. Production de substances volatiles (HCN)

La production d'acide cyanhydrique (cyanogénèse bactérienne) par certaines souches de *Pseudomonas* spp fluorescents peut jouer un rôle primordial dans le biocontrôle des agents phytopathogènes (Siddiqui et al., 2007).

Les exsudats racinaires contiennent de la glycine connue pour être un précurseur de la synthèse bactérienne d'acide cyanhydrique, et en présence HCN synthase elle est décarboxylée en HCN et en CO₂ (Nandi et al., 2017). L'HCN est hautement toxique contre les phytopathogènes en bloquant la voie du cytochrome oxydase (Voisard et al., 1989 ; Devi et al., 2007 ; Devi et Kothamasi, 2009).

III.4.5. Production de sidérophores

Le terme sidérophore, du grec «sideros», signifie «porteur de fer». Ces métabolites secondaires de faible poids moléculaire (200 - 2000 daltons), riches en hétéroatomes (oxygénés et azotés) susceptibles d'interagir avec les ions métalliques. Dont le rôle est de solubiliser et de chélater le fer avec une grande affinité dans le milieu extracellulaire et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes (**Neilands, 1995 ; Renshaw et al., 2002**).

La chélation de fer par les microorganismes est un caractère très recherché et présente un intérêt considérable en agriculture. Cette activité assure d'une part une source de fer assimilable par la plante et d'autre part assure une compétition avec les agents phytopathogènes, un caractère recherché dans le biocontrôle des agents phytopathogènes (**Guerrieri et al., 2020**).

Les siderophores des deux espèces *Pseudomonas fluorescens* et *P.putida* se traduisent par l'émission d'un pigment fluorescent appelé « pyvoredine » qui montre une affinité élevée pour le Fe³⁺ forment avec le fer un complexe : « ferri-pyoverdin » (**Trapet et al., 2016 ; Kumar et Sharma, 2017**). Les pyoverdines produites par les espèces de *Pseudomonas* contiennent trois groupes fonctionnels Hydroxamate, Catécholates et Carboxylate (**Benzina et al, 2020**).

III.4.6. Antibiotique

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des producteurs potentiels d'une gamme variée d'antibiotiques avec un large spectre d'action, jouent un rôle crucial dans la lutte biologique contre les maladies fongiques et bactériennes. Parmi ces antibiotique les pyolutéorine (PLT) (**Nowak-Thompson et al ., 1997**), les phenazines (pcA) (**Chincholkar et Thomashow, 2014**), les pyrrolnitrines (PRN) (**Mujumdar et al ., 2014 ; Weller el al ., 2016**), le 2,4- diacétyl-phloroglucinol (DAPG), les tropolone et l'oomycine...

IV. Application de *Pseudomonas* spp fluoresnents

Les *Pseudomonas* sont largement utilisées dans de nombreux secteurs biotechnologiques et industriels tels que l'alimentation, la pharmacie et l'écologie... Ces bactéries agissent comme PGPR possèdent des propriétés à la fois de régulation de la croissance des plantes et de résistance aux maladies, de plus divers mécanismes de rétroaction à médiation chimique sont également impliqués dans la bonne régulation de la croissance des plantes par *Pseudomonas* spp (**Rodríguez et al., 2020**). Ces propriétés comprennent leur capacité à produire une large gamme des métabolites.

Les *Pseudomonas* spp fluorescents sont actuellement utilisées en médecine pour leur pouvoir à synthétiser l'antibiotique topique le plus largement utilisé au monde (mupirocine) pour traiter les infections à SARM des tissus mous et de la peau ou pour décoloniser les patients à risque avec cette bactérie **(Bojarska et al., 2014 ; Mercer et al., 2017 ; Yankey et Isaacson, 2018 ; Lounsbury et al., 2018 ; Poove likunnel et al., 2018 ; Jin et al., 2018)**.

En effet, *Pseudomonas fluorescens* peut déclencher la biosynthèse du flavonoïde, catéchines et des anthocyanes dans le fruit de mures (*Rubus sp*) dans le cadre d'une réponse systémique induite (ISR) **(Garcia et al., 2015)**, et offrent donc des avantages potentiels pour la santé humaine dans la réduction du risque des maladies chroniques et en plus particulier le cancer **(Chen, 2013)**.

Matériel et méthodes

Notre travail qui porte sur l'identification et caractérisation des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents isolé de l'endophytosphère du palmier dattier ainsi que l'étude de leur effet antifongique a été réalisé au niveau de laboratoire de Phytobactériologie l'Université Saad Dahleb Blida 1 sur une période de 03 mois. Il comporte trois parties :

- I. Identification préliminaire des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytiques.
- II. Production des métabolites secondaires impliqués dans la phytostimulation et la lutte biologique.
- III. Evaluation de l'activité antagoniste des souches productrices des métabolites secondaires à l'égard d'un champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*.

I. Matériel

I.1. Matériel non biologique :

Le matériel non biologique représenté par, la verrerie, l'appareillage, les milieux de culture est consigné en annexe I et II.

I.2. Matériel biologiques :

I.2.1. Les souches bactériennes

Vingt-cinq souches bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été utilisées dans notre travail. Les souches bactériennes ont été isolées en Mai 2021 de l'endophytosphère du palmier dattier des différentes variétés de la région Kenadsa et Taghit communes algériennes de la wilaya de Béchar située à 22 km et 93 km respectivement de cette dernière tableau 3.

Tableau 3 : Cordonnés des échantillons utilisés

Isolats	Age	Cultivar	Région
TBR21	2 ans	Biskra	Taghit
TBR51			
TBF1			
TBF5			
TBJ6			
TBJ9			
TCR2	20 ans	Cherka	
TCF1			
TCF8			
TCF14			
TCF2			
TCF7			
TCF11	25 ans	Ras El Hmar	
TP31			
TPJ1			
TRR5			
TRF4	20 ans	Hmira	Kenadsa
TRJ5			
TRJ10			
KHE7			
KHE62			
KTE41	20 ans	Tinaser	
KFR2	19 ans	Feggous	
KMR2	35 ans	Hamriya	
KMR7			

I.2.2. Les souches fongiques

Pour évaluer l'activité antagoniste des souches bactériennes, nous avons utilisé deux formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*). Ces souches fongiques appartient à la collection du laboratoire de mycologie (département de biotechnologie l'université Blida1).

II. Méthodes

II.1. Purification des souches bactériennes

La pureté des isolats bactériennes de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été vérifiée sur milieu King B (King et al ,1954) (annexe II.) en réalisant plusieurs repiquages successifs jusqu'à l'obtention des souches pures (figure 9).



Figure 9 : Purification des souches de *Pseudomonas*.spp. fluorescents endophytique après plusieurs repiquages successifs.

II.2. Conservation des souches

Les souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents purifiées ont été conservées sur milieu B de King additionné de 25% de glycérol sur des tubes inclinés.

II.3. Identification des souches

La vérification préliminaire des caractères génériques a été effectuée selon les tests classiques décrits par Lelliot et Stead (1987) et Schaad (1988) : coloration de Gram, morphologie cellulaire, oxydase, catalase et la voie d'utilisation du glucose. Les caractérisations spécifiques et infraspécifiques ont été réalisées selon quelques tests de la clé dichotomique d'identification des *Pseudomonas spp.* fluorescents saprophytes, proposée par Bossis (figure 10) et les tests de LOPAT.

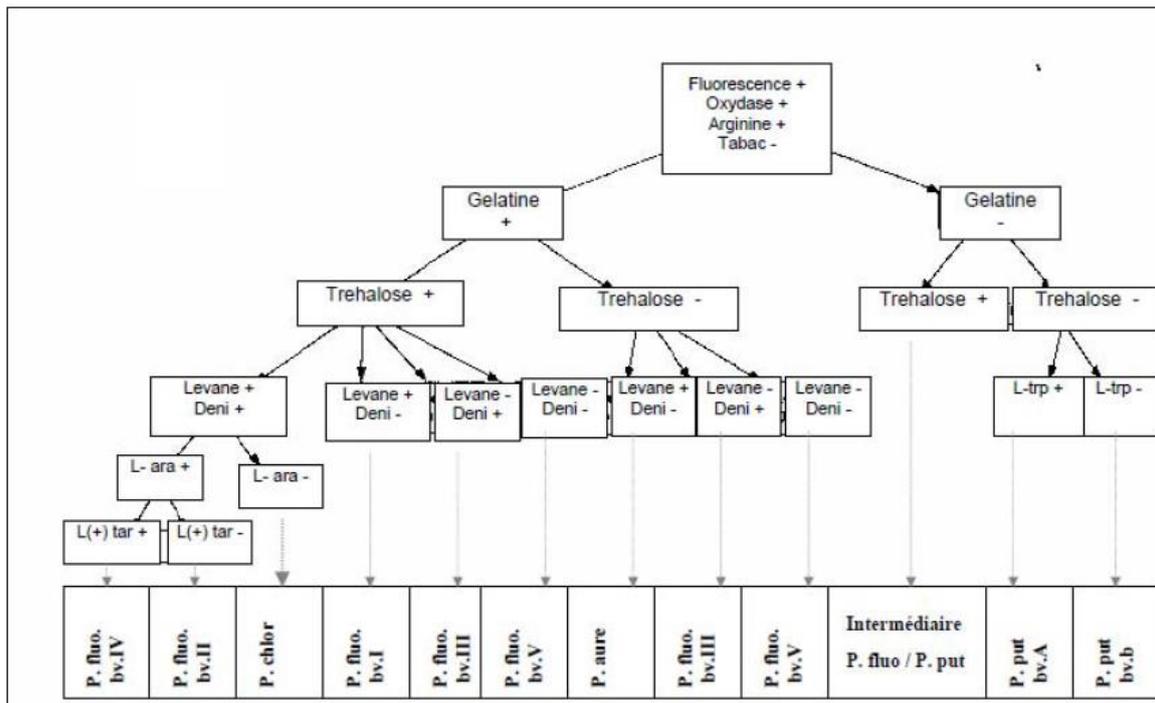


Figure 10 : Clé dichotomique d'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents d'après **Bossis (1995)**.

P : *Pseudomonas*; **fluor**: *fluorescens*; **chlor**: *chlororaphis*; **aure**: *aureofaciens*; **put**: *putida*, **bv**: biovar **Trp** : tryptophane, **Deni** : dénitrification, **tar** : tartrate ; **ara** : arabinose.
+ : réaction positive, - : réaction négative.

➤ Test de la fluorescence

La production de pigment fluorescent diffusible a été recherchée sur milieu King B ensemencée avec une culture pure, après incubation de 24 à 96 h à 26°C. Le pigment fluorescent a été révélé sous lampe UV (350-400 nm) dans une chambre noire (**Bultreys et Gheysens, 2000 ; Olmar et al., 2001**).

➤ La coloration de Gram

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle permet d'observer la forme, le mode de regroupement et de distinguer entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique sur des cultures jeunes de 24 h. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame propre et fixé à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène. Après fixation, une solution de violet de Gentiane et de lugol ont été respectivement appliquées sur le frottis. La décoloration est ensuite effectuée par

un lavage des lames à l'alcool à 95°. Après un lavage abondant avec un jet d'eau distillée stérile, le frottis subit une deuxième coloration à l'aide d'une solution de fuschine basique pendant 30 secondes. Le frottis a été observé sous microscope avec l'ajout de l'huile à immersion X100. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram (+) positifs tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram (-) négatifs (**Hildbrand et al., 1988**).

➤ **Test de KOH**

Le test de l'hydroxyde de potassium 'KOH' peut être utilisé comme test de confirmation pour la coloration de Gram. Il se base sur le fait que la paroi des bactéries à Gram négatif est lysée par le KOH alors que la paroi des bactéries à Gram positif n'est pas détruite. Chez les bactéries à Gram négatif, la lyse de la paroi libère l'ADN qui formera une substance visqueuse au contact du KOH.

Le test se réalise de manière extrêmement simple et rapide avec une anse stérile, on prélève une colonie bactérienne qui est placée dans deux gouttes d'une solution de KOH à 3%. Après avoir homogénéisé la culture dans le KOH durant 15 à 30 secondes, l'anse est retirée lentement du liquide. Lorsque la bactérie est à Gram négatif, il se forme un filament visqueux bien visible. Pour une bactérie à Gram positif, la formation du filament n'est pas observée (**George et al., 1983**).

➤ **Test d'arginine dihydrolase**

Le complexe enzymatique capable de dégrader l'arginine en anaérobiose, agissant selon deux types de réaction enzymatiques : dégradation de l'arginine en citrulline (arginine desmidase) et sa transformation en ornithine (citrulline ureidase). Certains *Pseudomonas* spp sont capables de dégrader l'arginine. Des tubes contenant le milieu Mueller Arginine (ADH 5%) inoculés ont été recouverts d'une couche de vaseline et incubés à 28°C pendant 5 jours. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette suite à l'alcalinisation du milieu dû à la présence de l'ammoniaque (**Hildebrand, 1988**) (**figure 11**).



Figure 11 : Les tubes contenant le milieu Mueller Arginine (ADH 5%) inoculés et recouverts d'une couche de vaseline.

➤ **Test d'oxydase**

La recherche de l'oxydase est le test de base pour l'identification des bactéries à Gram négatif. Une culture bactérienne jeune de 24h est étalée sur un papier Wathman stérile à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, une goutte de réactif N diméthyl paraphénylène diamine est rajouté. La présence de l'enzyme cytochrome oxydase se manifestant par l'apparition d'une coloration violette après 10 secondes. La réponse est positive tardive lorsqu'elle est apparaît en retard (10 à 60 secondes), après ce temps la réponse est négative (**Klement et al ., 1990**).

➤ **Test hypersensibilité de tabac**

Pour la réaction d'hypersensibilité sur tabac (**Klement, 1963**), une suspension bactérienne a été infiltrée dans le limbe foliaire de jeunes plantules de *Nicotiana tabaccum* var xanti. L'infiltration a été effectuée par injection à l'aide d'une seringue stérile, en piquant latéralement une surface du limbe au niveau des nervures principales, qui se traduit par l'apparition d'une plage humide. Sur une autre zone de la même feuille une autre infiltration est réalisée avec de l'eau distillée stérile (témoin). Après 48 à 72 h s'il y a apparition de tâches nécrotiques et formation de collapses au niveau de la zone infiltrée, la réponse est positive.

➤ **Gélatinolyse**

La production de la gélatinase est mise en évidence sur le milieu gélatine (Annexe II). Les tubes de gélatine solidifiée sont ensemencés par piqûre centrale avec les souches bactériennes et incubés à 28°C pendant 7 à 10 jours.

Il est nécessaire de mettre les tubes au froid (4°C/30 min) avant de les observer, sachant que la gélatine étant une protéine liquide à la température d'incubation. Ainsi, les tubes où la gélatine n'est pas dégradée se solidifient, alors que ceux qui restent liquides révèlent une activité hydrolytique des souches (**Ekpenyong et al., 2016**).

➤ **Production de levane sucrase**

Le test de levane sucrase a été effectué sur milieu levane (Annexe II). Après ensemencement du milieu en boîte de Pétri par une culture jeune âgée de 24h et incubation pendant 3 à 5 jours, le développement de colonies blanchâtres, convexes et bombées, étincelantes et muqueuses indique la présence de levane sucrase (**Hildebrand et al., 1988**).

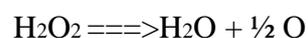
➤ **Activité pectinolytique**

La production de pectinases a été déterminée selon la méthode décrite par Cattelan et al., (1999) sur le milieu gélosé M9 (**Miller, 1974**), supplémentée de 4,8g / l de pectine et de 1.2g d'extrait de levures. Après 2 jours d'incubation à 28 ° C, les boîtes de pétries ont été traitées avec quelques gouttes d'HCL (73g/l). L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive.

➤ **Test catalase**

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

Pour réaliser ce test, une colonie bactérienne isolée âgée de 24h est déposée sur une lame en verre propre et sèche en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10 volumes. Une réaction positive se traduit par l'apparition des bulles, suite au dégagement d'O₂ (**Dickey, 1988**).



III. Production des métabolites secondaires impliqués dans la phytostimulation et la lutte biologique

III.1. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La capacité à produire l'acide cyanhydrique par les bactéries isolées a été vérifiée selon la méthode **Wei et al., (1991)**. Chaque souche âgée de 24h a été ensemencée à l'aide d'une anse stérile sur milieu TSA (Tryptone Soya Agar) additionnée de glycine (4,4 g/l). Un papier Whatman N°01 imprégné d'une solution de couleur jaune (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium) a été déposé sur le couvercle de chaque boîte de Pétri en position inversée. Celles-ci ont été scellées avec du Parafilm, incubées à 28 °C pendant 4 jours (figure 12) et vérifiées quotidiennement afin d'identifier les souches producteurs d'HCN capables de virer la couleur du papier du jaune à l'orange.

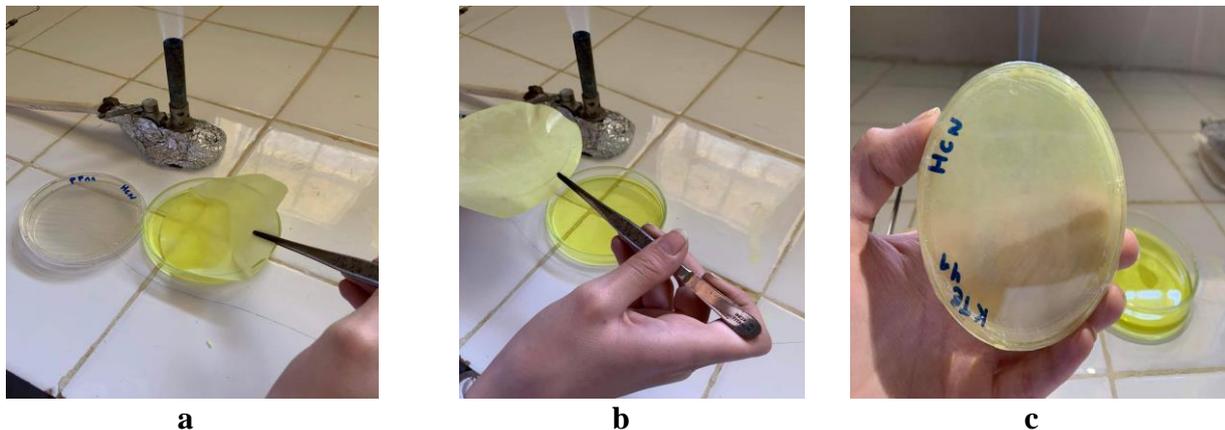


Figure 12 : Les différentes étapes pour réalisation de test de production d'HCN.

a : Traitement du papier whatman par une solution de picrate de sodium. **b :** Dépôt de disque de papier whatman au fond du couvercle de la boîte. **c :** une boîte scellée avec du parafilm après ensemencement et dépôt du papier whatman traité par le réactif révélateur au fond du couvercle.

III.2. Synthèse d'acide indole acétique

La production d'IAA a été déterminée selon la méthode standard de **Bric et al.,(1991)**. Une colonie isolée jeune de 24h a été étalée sur papier Whatman n° 1 stérile (80mm de diamètre) déposé précédemment sur gélose Luria-Bertani enrichi du tryptophane (Annexe 02), puis incubée à 28°C/48h. Le papier a été récupéré, puis traité avec le réactif de Salkowski (2% de FeCl₃ à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique). Les disques de papier filtre ont été saturés dans une boîte de Pétri en les plongeant directement dans le réactif, après 10 à 30 min. La production d'IAA et/ou de ses analogues se manifeste par la formation d'un halo rose à rouge

autour des colonies. Pour les souches productrices d'autres types d'indoles la coloration est jaune à jaune brune (Naik et Sakthivel , 2006).

III.3. Production d'ammoniac (NH₃)

Le test qualitatif, de production d'ammoniaque a été réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Il consiste à inoculer 100 µl de la suspension bactérienne dans 10 ml d'eau peptonée (EP) (Cheminova) (figure 13). Après incubation (28 °C, 96h), 500 µl du réactif de Nessler (Prolabo) ont été ajoutés, le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH₃ par les souches testées.

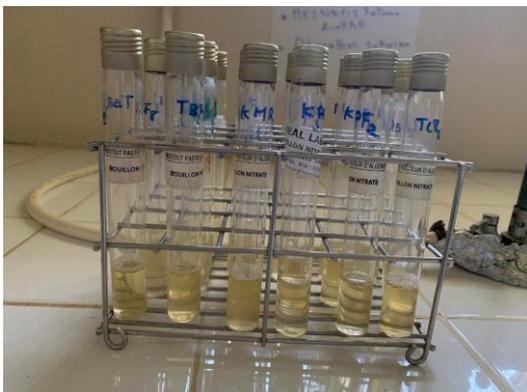


Figure 13 : Ensemencement d'une culture de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur bouillon nitraté.

III.4. Production de phénazine

La production de phénazine a été recherchée selon la méthode de **Thomashow et Weller (1988)**. La méthode consiste à ensemercer le milieu NBY (Nutrient Broth Yeast extract) (Annexe II) additionné de glucose (2%) avec une culture de *Pseudomonas*. spp fluorescent de 24h puis incubé pendant 48h à 28°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.

III.5. Production des enzymes

III.5.1 Solubilisation des phosphates

La recherche de Phosphatases a été effectuée sur milieu Pikovskaia (**Mehta et Nautiyal, 2001**) par ensemencement en spots d'une culture jeune de *Pseudomonas*. spp fluorescents âgée de 24h sur boîte de pétri (figure 14). Après incubation (96h à 28°C), la décoloration du milieu autour des colonies est un indicateur d'une solubilisation des phosphates. Cette méthode est basée sur la décoloration du Bleu-Bromo-Phenol (BPB) suite à l'abaissement du pH du milieu par la production de phosphatases.



Figure 14 : Ensemencement en spots des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur milieu Pikovskaia.

III.5.2. Production de lipase

La recherche de lipases est effectuée par la mise en culture des souches jeunes de *Pseudomonas* spp. fluorescents âgés de 24h sur milieu TSA (Tryptone Soya Agar) additionné de 1% d'acide oléique par la méthode d'ensemencement en spots (figure 15). Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies après incubation (5 à 7 jours à 28°C) (**Degroot et al., 1991**).

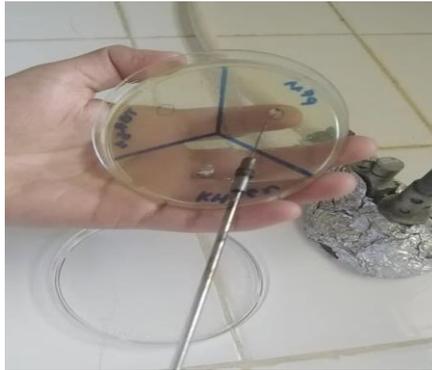


Figure 15 : Ensemencement en spots des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur milieu TSA additionnée de 1% d'acide oléique.

III.5.3. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

III.5.3.1. Activité amylolytique

La mise en évidence de la capacité des souches étudiées à dégrader l'amidon est réalisée sur un milieu de culture à base d'amidon (gélose à l'amidon) (annexe II).

Les souches ont été ensemencées par épuisement dans une boîte de pétri, puis incubées à 28°C pendant 24 heures. La présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noirâtre. Ceci implique une absence d'activité amylolytique. En revanche, si l'amidon est hydrolysé, un halo clair apparaîtrait autour des colonies après inondation de la boîte par une solution de lugol ce qui traduit une présence d'activité amylolytique chez les souches (**Vinoth Raj et al., 2009**).

III.5.3.2. Enzyme protéolytique

L'activité protéolytique a été déterminée (**Smibert et Krieg, 1994**) sur gélose au lait écrémé par ensemencement en spots d'une culture jeune âgée de 24h sur boîte de pétri, puis incubées à 28°C pendant 2 jours.

La réaction positive se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (**Naik et Sakthivel, 2006**).

III.5.5. Test de production d'acide organique

Le test de la production d'acide organique bactérien consiste à inoculer une suspension bactérienne âgée de 24h sur le bouillon minimal M9. Après 2 à 3 jours d'incubation et après l'ajout de réactif de rouge de méthyl. L'apparition d'une couleur rose dans le milieu indique la formation d'acide organique (Trivedi et Patil, 2013).

IV. Evaluation du pouvoir antagoniste *in Vitro*

IV.1. Purification des souches fongiques

La pureté des souches fongiques a été réalisée par transplantation successif des disques de champignon de 7 jours dans des boîtes de pétrie contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jehnston et Booth, 1983) (Annexe II). Ces derniers ont été incubés à 30°C pendant 7 jours. Les souches purifiées ont été conservées à 4°C.

IV.2. Essai d'antagonisme

Le pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents a été déterminé par l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes. La détermination d'activité antagoniste *in vitro* des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis de deux souches fongiques de *Fusarium oxysporum* (G1 et G2) a été réalisée sur trois milieux différents (PDA et King B et le milieu Mixte) (Annexe II) par la méthode de confrontation directe dans le but de déterminer le meilleur milieu d'activité antagoniste (figure 16).

La méthode utilisée est celle décrite par Vincent et al. (1991). Les souches de *Pseudomonas*.spp fluorescents sont étalées sous forme d'une ligne sur une distance de 1,5 cm à partir des deux bords d'une boîte de pétrie contenant du milieu gélosé (figure 17). Après 24 h d'incubation, un disque fongique de 6 mm venant d'une culture de 7 jours est déposé au centre de la boîte (figure 18). L'ensemble est incubé à une température de 28°C pendant sept jours. Deux répétitions ont été effectuées pour chaque interaction.

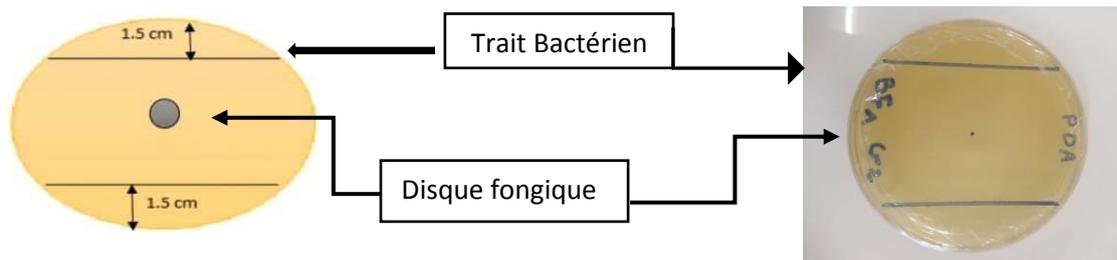


Figure 16 : Méthode de conformation directe en boite de pétrie entre les souches de *Pseudomonas* spp .fluorescents et le champignon *Fusrium oxysporum*.



Figure 17 : Ensemencement d’une souche de *Pseudomonas* spp .fluorescents sous forme de deux stries en parallèles.

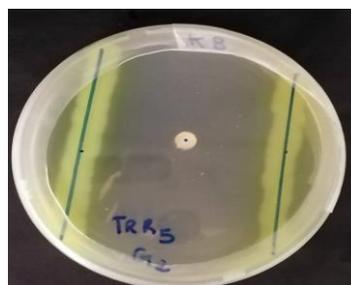


Figure 18 : Transplantation d’un disque fongique au centre de boite de pétrie contient la souche de *Pseudomonas* spp.fluorescents après incubation de 24h

- **Expression des résultats**

La réduction du diamètre des colonies mycéliennes des champignons pathogènes en présence des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents comparé au témoin non inoculé, indique la présence d'une activité antagoniste ou non. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante (**Wang *et al.*, 2012**) :

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

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 ont été représentés par des disques mycéliens de chaque souche fongique sans la présence des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents.

Résultats et discussion

Au cours de cette étude, nous avons procédé à l'identification et la caractérisation d'une collection de 25 souches isolées de l'endophytosphère du palmier dattier. Les résultats de l'identification des souches, la mise en évidence de la production des métabolites secondaires et de leur activité antagoniste sont présentés ci-après.

I. Identification des souches *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytiques

Les résultats de l'identification des 25 isolats provenant de l'endorhizosphère du palmier dattier des différentes variétés des deux régions (Kenadsa et Taghit) situées dans le sud de l'Algérie de la wilaya de Béchar sont illustrés dans le tableau 4

Tableau 4 : Quelques Caractéristiques morphologiques et biochimiques des 25 souches testées

Souches	Aspect	Forme	Coloration de Gram	Oxydase	Catalase	Pigment
TBF1	Jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
TBF5	Jaune, muqueuse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
TBJ6	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
TBJ9	Blanche, lisse	Circulaire	BGP	-	+	Jaune-vert
TRJ5	Verte, muqueuse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TRF4	Jaune, muqueuse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TRJ10	Jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
TPF2	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TPF7	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TPF11	Verte, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TPF31	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TPJ1	Blanche, muqueuse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TBR21	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TBR51	Jaune verte, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
TCR2	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TRR5	Jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
TCF1	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TCF8	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
TCF14	Verte, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert
KFR2	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
KHE7	Blanche, muqueuse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
KHE62	Jaune, lisse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
KMR2	Blanche, muqueuse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
KMR7	Jaune, muqueuse	Circulaire	BGN	+	+	Jaune-vert
KTE41	Blanche, lisse	Circulaire	BGN	-	+	Jaune-vert

+: Positif; -: négatif, BGN: Bacille à Gram négative, BGP: Bacille à Gram positive

I.1. Caractérisation physiologiques et biochimique des isolats

A. Test de la fluorescence

Le test de la fluorescence réalisé sur les 25 isolats a révélé la présence d'un pigment fluorescent traduisant par une couleur jaune verdâtre sous la lampe UV (350-400nm), dans l'intensité de la fluorescence varie d'une souche à autre (figure 19). Nous avons constaté que la fluorescence varie non seulement en fonction des souches mais aussi selon l'âge de la culture. La coloration et l'intensité du pigment émis varie du vert jaune au jaune brun. Ces mêmes observations ont été signalées par **Digat et Gardan (1978)**.

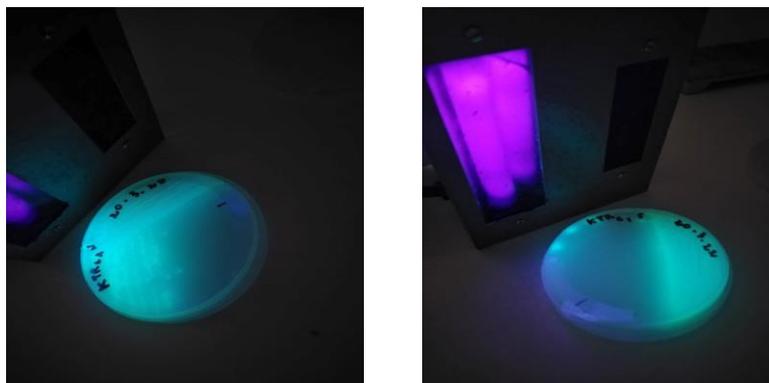


Figure 19 : Les fluorescences des isolats bactériens sous UV (350-400nm).

B. Aspect des colonies

Après purification, les souches bactériennes ont montré sur le milieu KB des caractères cultureux très rapprochés. D'une manière générale, les colonies présentent un contour régulier, la coloration est souvent crème et parfois beige. Pour toutes les souches, l'aspect des colonies est lisse, leur élévation est convexe et le diamètre varie de 0.5 à 4 mm et cela en fonction de l'âge de la culture. Les résultats de la caractérisation physiologique est biochimique sont représentés dans le tableau 3.

C. Examen microscopique

La coloration de Gram a révélé que 1 sur 25 isolats soit 96% sont des bacilles à Gram négatif. Ce constat est vérifié par le test de potasse indicateur de Gram. L'augmentation de la viscosité du KOH et la formation d'un filament mucoïde confirme que ces bactéries sont à Gram négatif (Tableau 3 et Figure 20).

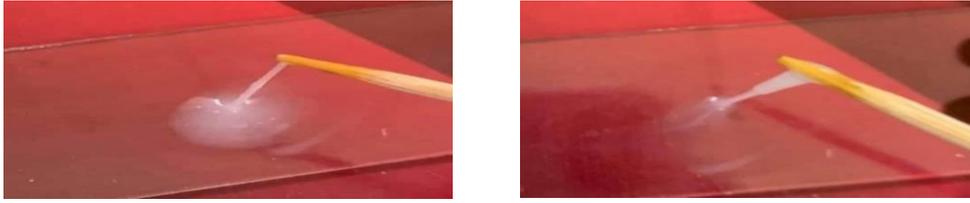


Figure 20 : Le test de potasse indicateur de Gram : La formation d'un filament mucoïde confirme le Gram négatif.

D. Test catalase et oxydase

Dans le test de catalase, l'apparition des bulles d'air due à un dégagement gazeux de dioxygène est observée pour les 25 (100%) isolats signifiant qu'elles possèdent la catalase, et sont dites catalase positive (Tableau 3 et Figure 21).

L'activité oxydase a été notée positive chez 12 sur 25 (48 %) isolats indiquée par l'apparition d'une couleur violette (Tableau 3 et Figure 21).

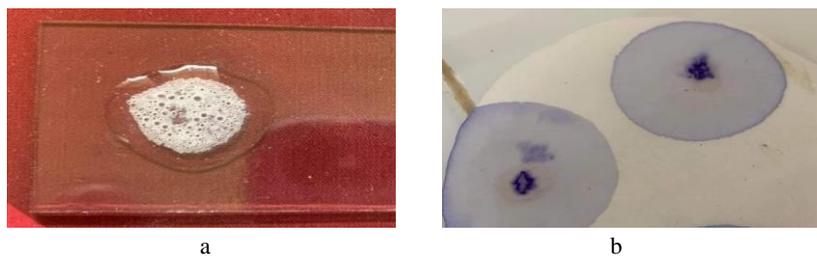


Figure 21 : Résultat positive pour les souches testées de catalase et oxydase
(a): catalase, (b): oxydase

E. Test de levane

La production de levane sucrase a été notée positive chez 19 sur 25 (76%) isolats testés indiquée par l'apparition d'une culture bombée, étincelantes, muqueuses et brillante. L'absence de ce type des colonies a confirmé un test négatif pour les autres souches (Tableau 3 et Figure 22).

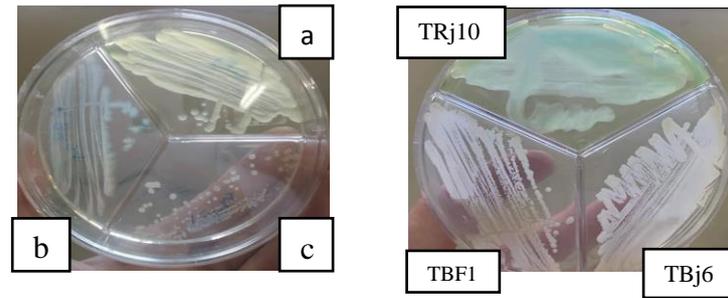


Figure 22 : Résultat de la production de levane sucrose sur les souches de *Pseudomonas* spp.fluorescents.

a : Production de levane sucrose, b, c : absence de la production de levane

F. Test d'hypersensibilité sur Tabac

Les résultats de test d'hypersensibilité sur Tabac montrant qu'aucune réaction positive n'est observée marquée par l'absence de tâches nécrotiques et formation de collapses au niveau de la zone infiltrée.

G. Test d'arginine dihydrolase

La dégradation de l'arginine a été notée chez toutes les souches testées (100%). Le résultat positif se traduit par l'apparition d'une coloration violette suite à l'alcalinisation du milieu.

H. Gélatinolyse

La production de la gélatinase a été révélée chez 2 souches seulement parmi les 25 (8%) traduisant par la liquidification du milieu suite à une activité hydrolytique des souches.

I.2. Identification phénotypique des isolats

Les méthodes de caractérisation ont permis une identification préliminaire des isolats issus du biotope étudié. La sélection initiale a permis de constituer une collection de 25 souches bactériennes fluorescentes. Les tests de l'oxydase et de l'arginine-dihydrolase, considérés comme des tests déterminatifs dans l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Bossis, 1995), ont été pratiqués sur les 25 souches. L'étude des cytochromes respiratoires a permis de distinguer *P. aeruginosa* des autres espèces saprophytes ayant une cytochrome C oxydase (Stanier et al., 1966) et de la plupart des espèces phytopathogènes dépourvues de cette enzyme (Lelliot et al., 1966; Sands et al., 1967; Palleroni, 1984). Le test de l'hypersensibilité (HR) a

permis de discriminer davantage les saprophytes des phytopathogènes, lesquels provoquent une réaction d'hypersensibilité (Klement,1963).

Les résultats ont permis de retenir 12 souches [oxydase (+), arginine (+) et tabac (-)], apparentées à des *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes, soit un taux de 41,32% du total des souches isolées.

Les caractères physiologiques et biochimiques des isolats bactériens, selon les réactions obtenues dans les tests discriminatifs proposés par Bossis (1995), ont permis de regrouper la grande partie des souches (83%) en : *Pseudomonas putida* ou au sein du groupe intermédiaire entre *P. putida* et *P. fluorescens*. Les souches qui ne correspondent pas aux profils des espèces citées (16%) sont affiliés aux espèces de *P. fluorescens* ou bien *P. aureofaciens*, ou *P. chlororaphis*). Les résultats de quelques tests de la clé dichotomique sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Spectre de réponse d'identification selon de la clé dichotomique proposée par Bossis (1995).

Souches / Tests	Fluorescence	Arginine	Oxydase	Tabac (HR)	Gélatine	Tréhalose	Levane	Dénitrification	L-arabinose	L-tartrate	L-tryptophane	
TBF1	+	+	+	-	-	nt	-	nt	nt	nt	nt	<i>P.putida</i> / <i>P.fluorescens</i> - <i>Putida</i> *
TBF5	+	+	+	-	-	nt	+	nt	nt	nt	nt	
KFR2	+	+	+	-	-	nt	-	nt	nt	nt	nt	
TBR51	+	+	+	-	-	nt	-	nt	nt	nt	nt	
TRF4	+	+	+	-	-	nt	+	nt	nt	nt	nt	
KHE7	+	+	+	-	-	nt	+	nt	nt	nt	nt	
KMR2	+	+	+	-	-	nt	+	nt	nt	nt	nt	
TRJ10	+	+	+	-	-	nt	+	nt	nt	nt	nt	
KHE62	+	+	+	-	-	nt	+	nt	nt	nt	nt	
KMR7	+	+	+	-	-	nt	-	nt	nt	nt	nt	
TBJ6	+	+	+	-	+	nt	-	nt	nt	nt	nt	<i>P.fluorescens</i> / <i>P.chlororaphis</i> / <i>P.aureofaciens</i>
TRR5	+	+	+	-	+	nt	+	nt	nt	nt	nt	

+ : réaction positive, - : réaction négative, Nt : non déterminé, * : Groupe intermédiaire entre *P. fluorescens* et *P. putida*

Par ailleurs, selon les résultats obtenus par le test LOPAT, on peut regrouper nos souches en deux sous- groupes V (Va et Vb) de *Pseudomonas* fluorescents, qui ne diffèrent que par le caractère levane discriminé par **Lelliott et al., (1966)** (tableau 5).

Tableau 6 : Spectre de réponse d'identification selon les tests LOPAT

Les souches	LOPAT					Le groupe de LOPAT
	Levane	Oxydase	Pectinase	Arginine dihydrolase	Tabac	
TBF5	-	+	-	+	-	Va
TBj6	-	+	-	+	-	
KFR2	-	+	-	+	-	
TBR51	-	+	-	+	-	
TBF1	+	+	-	+	-	Vb
KHE7	+	+	-	+	-	
KMR7	+	+	-	+	-	
KMR2	+	+	-	+	-	
KHE62	+	+	-	+	-	
TRJ10	+	+	-	+	-	
TRR5	+	+	-	+	-	
TRF4	+	+	-	+	-	

+ : réaction positive, - : réaction négative,

II. Métabolites secondaires

Les résultats de la recherche de la production des métabolites secondaires testés sur les 12 souches de *Pseudomonas* spp.fluorescents isolées de l'endophytosphère du palmier dattier sont illustrés dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Nombre et taux des souches de *Pseudomonas* spp.fluorescents producteurs des métabolites secondaire.

Métabolites secondaires	Amm	AIA	Phos	HCN	Amy	Prot	Lip	Pect	phen
Nombre des souches	12	9	6	5	10	3	0	0	0
Pourcentage	100%	75%	50%	41,6%	83%	25%	0%	0%	0%

HCN : Acide cyanhydrique, AIA : Acide indole acétique, Phos : Phosphatase, Amm : Ammoniac, Amy : Amylase, Pect : Pectinase, Lip : Lipase, Prot : Protéase

Selon le tableau 7, 100% des souches ont le pouvoir de produire l'ammoniac NH_3 , 50% produisent les phosphatases, 75% sont apte à produire l'acide indole acétique (AIA), 41,6% produisent l'acide cyanhydrique (HCN), 25% sont capable de produire les enzymes protéolytiques, par contre ont a marqués une absence totale de production de pectinase, lipase, les acides organiques et la phénazine.

II. 1. La production d'acide indole acétique (AIA)

La production d'acide indole acétique (AIA) et/ou de ses analogues a été notée positive chez la plupart des souches testées. Toutefois 9 de ces derniers (75%) ont développées une coloration rose à rouge après 10 à 30min d'addition de réactif révélateur (Réactif de Salkowski). Pour les souches productrices d'autre type d'indoles (25%), la coloration est jaune à jaune brune dont l'intensité varie d'une souche à une autre (figure 23).

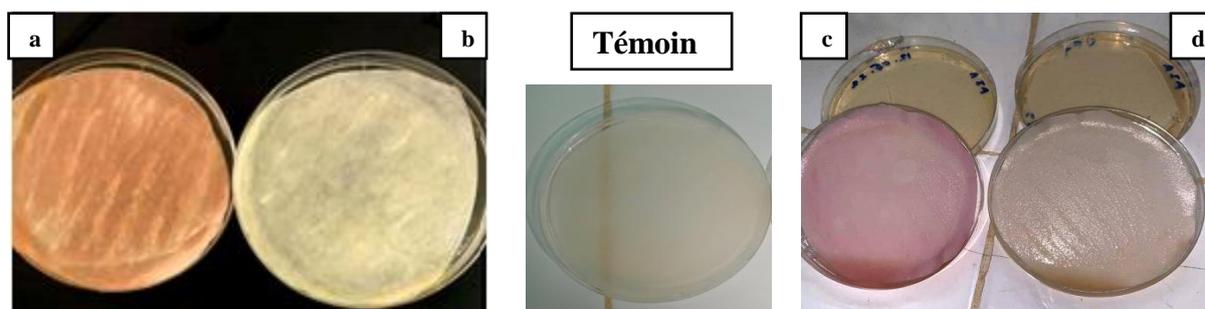


Figure 23 : Production d'acide indole acétique (AIA) et d'autres types d'acide indole acétique par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

a, c : Production d'acide indole acétique (AIA) par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

b, d : Production d'autre type d'acide indole acétique par les souches *Pseudomonas* spp. fluorescents.

II.2. La production d'acide cyanhydrique (HCN)

Tableau 8 : Production de cyanure d'hydrogène

Souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents testées	Production d'HCN
TRR5, TRJ10, TRF4, TBR51, KHE62	+
TBF5, KMR7, KMR2, TBJ6, KHE7, TBF1, KFR2	-

+ : production, - : aucune production

La production d'acide cyanhydrique (HCN) a été testée sur 12 souches. Les résultats illustrés par le tableau 8 ont montré que seulement 5 souches (41.6 %) ont indiqué leur capacité à produire l'acide cyanhydrique révélé par le changement de la couleur jaune du papier wattman vers la couleur orange (Tableau 8 et figure 24).

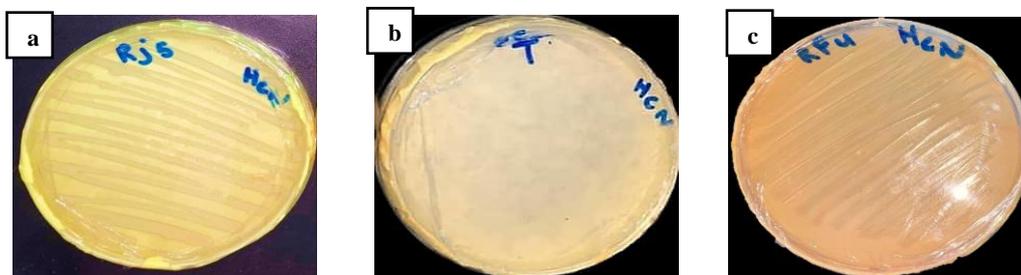


Figure 24 : la production d'acide cyanhydrique (HCN) par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

a : résultat positive, b : témoin, c : résultat négative

II.3. Phénazines

La production de phénazine a été révélée par l'examen sous UV (356 nm) des cultures bactériennes ensemencées sur le milieu NBY additionné de glucose (2%) et incubées pendant 2 jours à 28 °C. Les résultats montrant qu'aucune réaction positive n'est observée marquée par l'absence des colonies pigmentées avec des halos sombres noirâtres après l'examen des cultures sous UV (356 nm).

II.4.5. Production de l'ammoniac

La production de l'ammoniac a été notée chez toutes les souches testées (100%). Le résultat positif se traduit par le virage de la couleur du milieu vers le jaune ou orange.

II.4. Production des enzymes

II.4.1. Phosphatases :

Tableau 9 : Production de phosphatase

Souches de <i>Pseudomonas</i> testées	solubilisation du phosphate
TBF1, TBF5, TRF4, KHE7	++
KMR7, KMR2	+
TBJ6, TRJ10, TBR51, KHE62, KFR2, TRR5	-

++ : Fortement productrice, + : faiblement productrice, - : aucune production

Le test de solubilisation du phosphate indique que 50% des souches testées synthétisent la phosphatase qui solubilise le phosphore inorganique sous forme bicalcique. Ces dernières ont développées un halo clair autour des spots et/ou décolorent le milieu de culture. L'intensité de la couleur du milieu de culture et le diamètre des halos sont variable selon les souches, dénotant une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphore selon les souches testés (Tableau 9, figure 25).

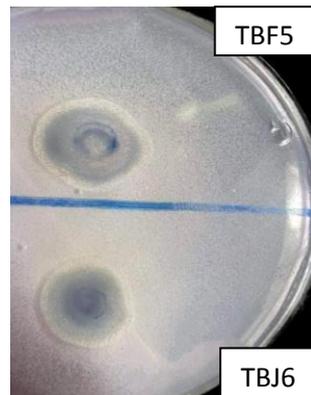


Figure 25 : Production de phosphatase par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

II.4.2.Lipase

Une réaction négative marquée par l'absence d'halos clairs autour des spots a été observé pour l'ensemble des souches testées lors de la mise en évidence de la production de lipase dans le milieu TSA (Tryptone Soya Agar) additionnés de 1% d'acide oléique après 7jours d'incubation à 28 °C.

II.4.3.Pectinase

Sur gélose M9 supplémentée de 4,8g / l de pectine, les 12 souches bactériennes testées se sont montrées incapable de produire la pectinase. Après 2 jours d'incubation à 28° C, et application de quelques gouttes d'HCL (73g/l) aucun halo indiquant le pouvoir hydrolytique n'est observé autour des colonies bactériennes.

II.4.4. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

II.4.4.1. Production d'amylase

L'activité amylolytique a été testée sur un milieu de culture à base d'amidon. La plus part des souches testées (83%), ont montré une réaction positive dans la dégradation de l'amidon par production d'amylase. L'apparition d'un halo clair autour des colonies après 24h d'incubation et inondation de la boîte par une solution de lugol indique une réaction positive (figure 26), en revanche la présence de l'amidon dans le milieu donnera une couleur bleue noirâtre. Ceci implique une absence d'activité amylolytique (figure 26).

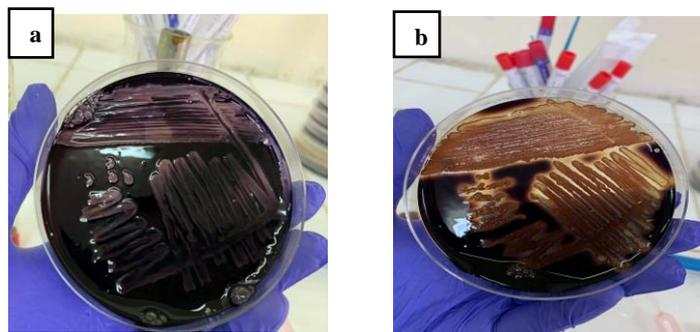


Figure 26 : Production d'amylase par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents.

a : résultat négative, b : résultat positive

II.4.4.2. Production d'enzyme protéolytique

La production des enzymes protéolytiques a été révélée chez trois souches bactériennes seulement. Ces derniers ont développées un halo clair autour des colonies en dégradant les protéines par production de protéase (Figure 27).

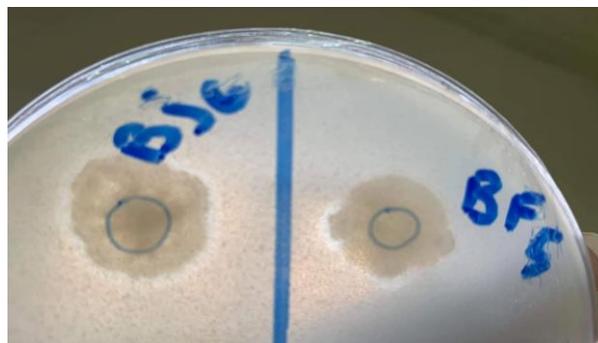


Figure 27 : Production des enzymes protéolytiques par les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents .

II.4.6. Production d'acide organique

Sur bouillon minimal M9, les souches testées se sont manifesté par une absence totale de la production d'acide organique. Après incubation 48h à 28 ° C et l'addition de réactif de rouge de méthyl, marqué par l'absence du couleur rose.

III .Résultats de la sélection des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents antagonistes *in vitro*

Les huit souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f sp albedinis* (G1), et *Fusarium oxysporum f sp lycopersici* (G2) sur trois milieux différents (PDA, KB, Mix). Cette inhibition se traduit par la réduction du diamètre des colonies de *Fusarium*, par rapport au témoin.

Les résultats obtenus ont montrent que huit souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents exercent des effets antagonistes vis-à-vis des deux formes de *Fusarium oxysporum*, mais à des degrés divers. Cette variation dépend des souches antagonistes testées, des milieux de cultures.

- **Sur milieu PDA :**

Les résultats de l'effet antagoniste exercé par les deux formes de *F. oxysporum* ont montré que le diamètre des colonies mycéliennes a été réduit fortement en présence des souches antagonistes de *Pseudomonas spp* fluorescents, comparé au témoin non inoculé. L'action inhibitrice la plus forte est estimée pour les souches KFR2, TRR5 et TBR51 avec un pourcentage d'inhibition de 80%, 71% et 69% contre G1 et de 88%, 81%, et 67% contre G2 respectivement. TBF1 a montré un taux d'inhibition moins important de 24% contre G1 et 54% contre G2 (Figure 28).

Les souches TBf5, KHE62, KMR2 montrent une très faible inhibition, même négligeable contre G1 (<15%) qui sont respectivement de 15%, 10% et 15% par contre la souche KHE7 a montré une activité négligeable et presque nulle de 5% contre les 2 souches fongiques.

Au - delà du 7ème jour, nous remarquons une stabilité dans l'inhibition de la croissance mycélienne en confrontation avec toutes souches antagonistes (Figure29).

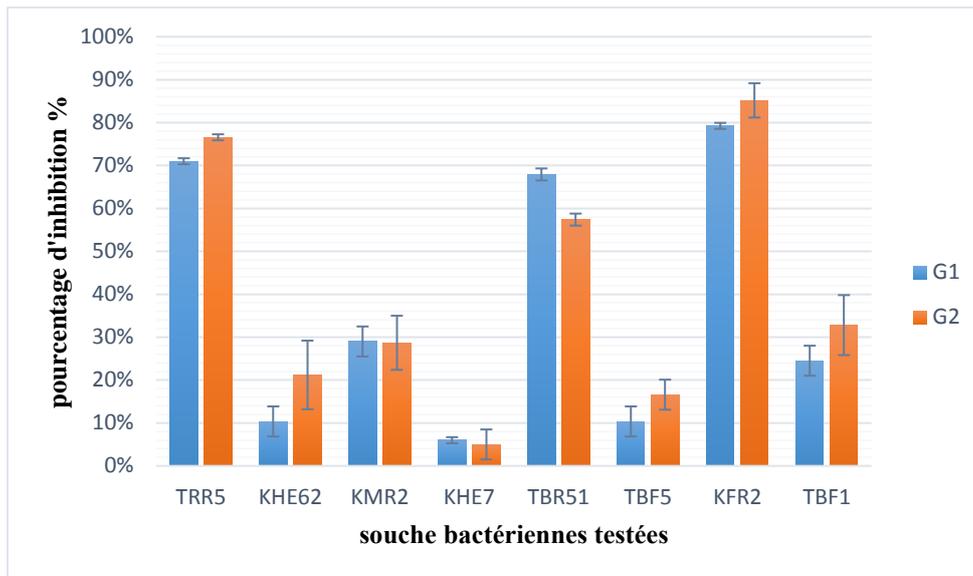


Figure 28 : Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieu de culture PDA.

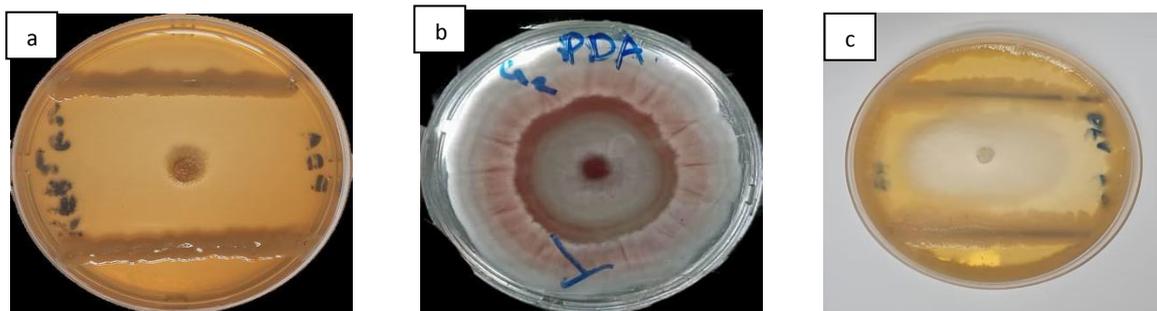


Figure 29 : Activité antifongique des souches testées sur milieu PDA.

a: Forte activité antagoniste contre G2 b : Témoin , c : activité antagoniste contre G2

- **Sur le milieu King B :**

L'activité antifongique des souches testées sur milieu KB a été marquée fortement positive chez KFR avec 88,57 %, la souche TBR51 avec 84,28% et pour la souche TRR5 avec 84 % d'inhibition contre G2. Par contre elles ont marquées un taux d'inhibition moins important contre G1 avec respectivement 56%, 46% ,46%. Concernent les souches bactériennes KMR2, KHE7, KHE62 et TBF1, nous avons noté respectivement le même taux d'inhibition contre G1 et G2 de 40% et de 35% pour KMR2 et KHE7, 34% contre G1 et 46.4% contre G2 , 30% et 50% contre G1 G2 pour les souches KHE62 et TBF1. La souche TBF5 montre la plus faible action inhibitrice contre G2 avec un pourcentage d'inhibition de 23% (Figure 30).

Au du 7^{ème} jour et avec les même souches, nous notons une stabilité de l'effet antagoniste (Figure 31). Après 30 jours de confrontation avec les souches KMR2 et KHE7 contre G2, le pathogène a repris sa croissance pour atteindre le même diamètre (8cm) que celui du témoin.

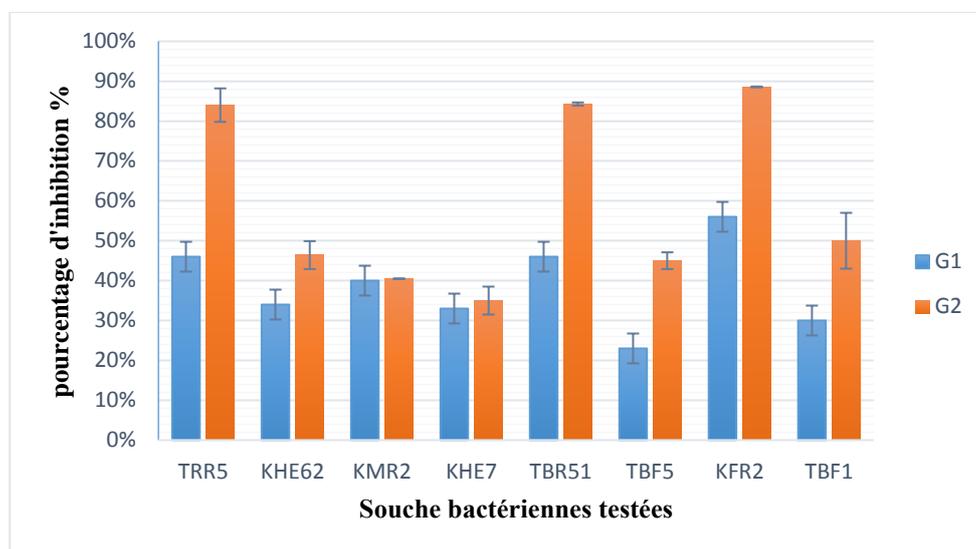


Figure 30 : Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieu King B

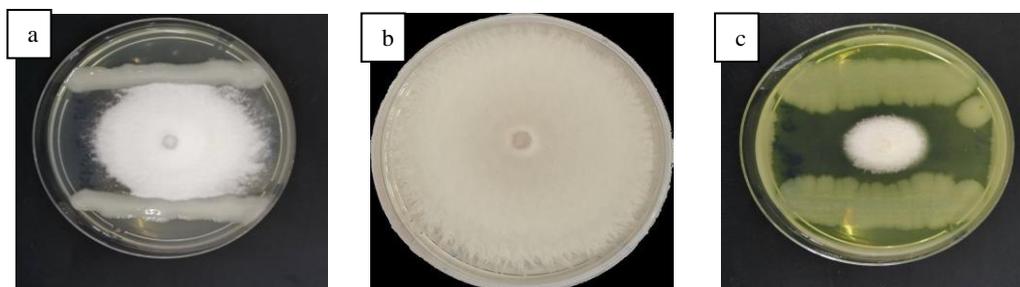


Figure 31 : activité antifongique sur milieu King B.

a : absence d'activité antagoniste contre G2, b : témoin, c : activité antagoniste contre G2

- **Sur le milieu mixte :**

Les résultats de l'activité antagoniste sur le milieu Mixte (figure 32), montrent une forte activité antifongique chez les souches TBR51, TRR5 et KFR2 avec des taux d'inhibition de 81%, 81% et 72% vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (G1), et de 76,25%, 81% et 78,12% contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (G2) respectivement. La souche TBF1 a montré une activité antagoniste moins importante avec un taux d'inhibition égale à 51% contre le G2. En revanche la souche à montrer une faible activité contre G1 à 30%.

Concernent les souches KHE7, KMR2, KHE62 nous avons remarquée des taux d'inhibition de 30% ,47% et 46% contre G1 et contre G2 de 30%, 42%, 31% respectivement. La souche TBF5 a montré la plus faible activité avec un taux d'inhibition de 25% contre G1 et 28% contre G2.

Au du 7 ème jour et avec les même souches, nous notons une stabilité de l'effet antagoniste. Après 30 jours de confrontation avec la souche KMR2 contre G1, le pathogène a repris sa croissance pour atteindre le même diamètre (8cm) que celui du témoin.

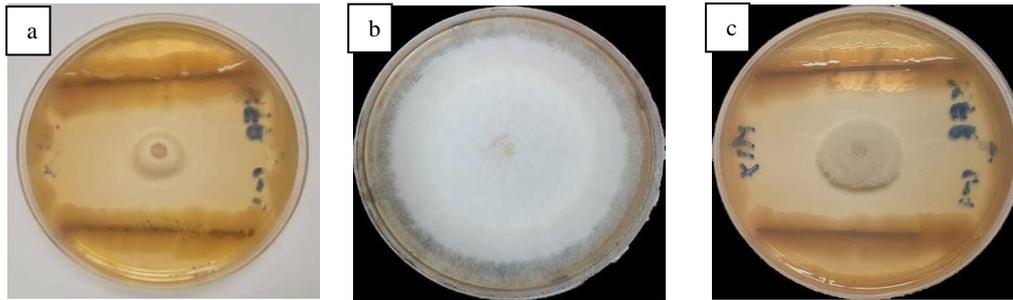


Figure 32 : Activité antifongique sur milieu Mixte.

a : forte activité antagoniste contre G2 b : Témoin c : Forte activité antagoniste contre le G2

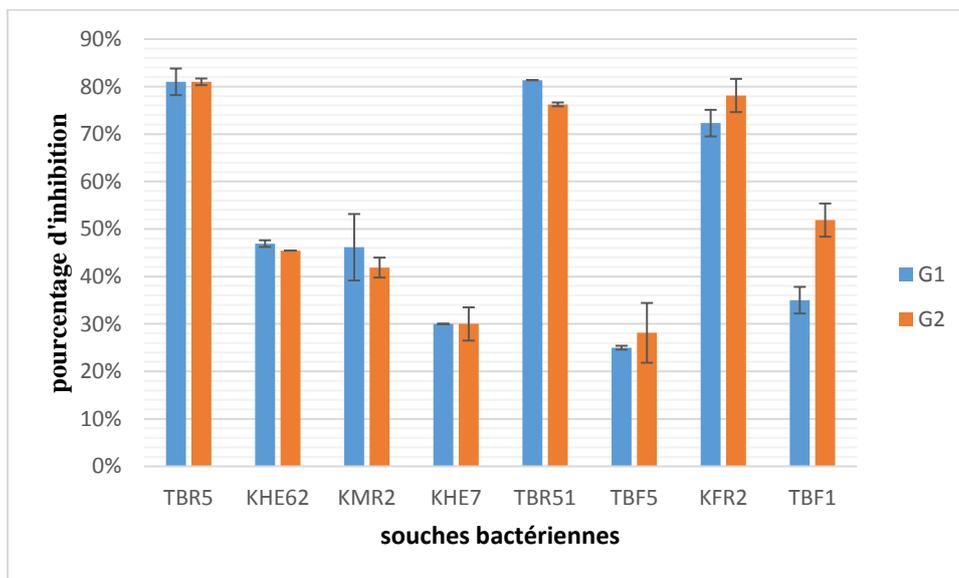


Figure 33 : Résultats de l'activité antifongique des différentes souches sur milieu Mixte.

Discussion

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont des bactéries hautement adaptables et cosmopolites dans différents habitats tels que le sol et la rhizosphère végétale. Comme ils peuvent pénétrer et occuper les tissus internes de la plante, formant le microbiome endosphérique (Vokou et al., 2012).

L'identification des 25 isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytiques a été basée en premier par la production de pigment fluorescent, la caractérisation morphologique, l'examen microscopique, le test d'oxydase, la catalase, l'arginine dihydrolase, ainsi que le test LOPAT et quelque test de la clé dichotomique proposé par Bossis (1995). Les résultats obtenus de ces tests ont permis de sélectionner 12 souches présentant les caractéristiques du groupe *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Les études réalisées depuis plus d'un siècle sur ce genre bactérien ont mis en évidence une complexité dans ses caractéristiques taxonomiques. La majorité des études taxonomiques sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents a révélé la complexité de la variabilité au niveau des différentes espèces appartenant à ce groupe (Palleroni et Stanier, 1964 ; Digat et Gardan, 1987 ; Bossis et al., 2000 ; Palleroni, 2015). En effet, il est souvent difficile de réaliser une identification précise et de faire la distinction entre les différentes espèces (Benchabane, 2005 ; GarridoSanz et al., 2016 ; Benoussaid, 2018).

Selon la clé dichotomique proposée par Bossis (1995), l'hydrolyse de la gélatine permet la distinction de *P. putida* des autres *Pseudomonas* spp. fluorescents. D'après les résultats obtenus 83% des souches sont affiliées à *P. putida* ou *P. intermediae* tandis que 16% appartenant aux autres espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents (*P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*) (tableau 5).

Par ailleurs, selon les résultats obtenus par le test LOPAT on peut regrouper nos souches en deux sous-groupes V (Va et Vb) de *Pseudomonas* fluorescents (tableau 6), qui ne diffèrent que par le caractère levane discriminé par Lelliott et al., (1966). De plus le pouvoir pectolytiques et l'induction de la réaction d'hypersensibilité au tabac est une caractéristique des *Pseudomonas* spp. phytopathogène (Lelliott et al., 1966 ; Lelliott et Stead, 1987 ; Cottyn et al., 2009).

Outre leur signification taxonomique, les tests biochimiques utilisés pour l'identification des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents, peuvent être considérés comme indicateurs de l'aspect métabolique de ces bactéries, qui semble être un avantage pour leur adaptation au sol et à la rhizosphère (Mezaache, 2012).

Les tests de l'oxydase et de l'arginine dihydrolase sont considérés comme des tests déterminatifs dans l'identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Mercenier *et al.*, 1980 ; Digat et Gardan, 1987 ; Jacques, 1994 ; Bossis, 1995). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents à cytochrome oxydase positive sont des microorganismes hétérotrophes qui ont l'aptitude d'utiliser une gamme étendue de composés organique (Latour et Lemanceau, 1997). Contrairement aux espèces oxydase-négative qui sont toutes phytopathogènes (Misaghi et Grogan, 1969 ; Palleroni, 1984). De plus, l'arginine a un rôle physiologique important pour générer des substrats à haut niveau d'énergie sous forme d'ATP en absence d'oxygène. Cette voie est considérée comme la seule voie anaérobique chez les *Pseudomonas* (Latour et Lemanceau, 1997). Nos résultats concorde avec ceux de Palleroni *et al.*, (1984) ; Jacques,(1994) et Bossis ,(1995).

Ces résultats concordent avec les résultats obtenu par plusieurs auteurs (Mezaache, 2012 ; Benoussaid, 2018) qui confirment que *Pseudomonas* est un group hétérogène difficile à identifier. L'identification phénotypique reste une étape primordiale voir indispensable pour l'identification des *Pseudomonas* spp fluorescents. Cependant, d'autres tests phénotypiques et génotypiques par des moyens moléculaires tels que PCR, électrophorèse, western blot, le MALDI-TOF-MS sont nécessaires pour identifier avec certitude ces bactéries.

Les *Pseudomonas* spp endophytiques sont une source riche de métabolites divers et fonctionnels qui améliorent directement ou indirectement la tolérance de l'hôte à différents stress, les rendant ainsi bénéfiques pour les plantes, et ils servent potentiellement d'agents biologiques prometteurs dans le biocontrôle des maladies telluriques (Tan *et al.*, 2001 ; Widiantini *et al.*, 2017). Les 12 souches testées pour leur pouvoir à produire les métabolites secondaires impliqués dans les activités phytobénéfique ont été révélé productrices de la plupart de ses métabolites.

L'acide indole-3-acétique est la phytohormone principale qui accélère la croissance et le développement des plantes en améliorant la croissance des racines et des tiges. Elle est impliqué dans la division cellulaire, la différenciation et la formation de faisceaux vasculaires (Campanoni, 2005) ainsi que dans les interactions plantes-bactéries (Spaepen *et*

Vanderleyden, 2011). C'est une hormone essentielle à la formation de nodules (**Choudhury et al., 2019**). La production de cet acide par *Pseudomonas* spp. fluorescents a été impliquée dans pratiquement tous les aspects de la croissance des plantes et le développement, ainsi que les réactions de défense.

La réalisation de ce test *in vitro* par les souches *Pseudomonas* spp. fluorescents, nous a permis de constater que la plus part des souches testées sont capable de synthétiser l'AIA en présence de tryptophane, qui est secrété naturellement par les exsudats racinaires (**Kamilova et al., 2006**). Ce dernier est considéré comme le précurseur, du fait que son adjonction est nécessaire à la production de cette hormone (**Benoussaid, 2018**).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Chaiharn et Lumyong, (2011)**, qui ont constaté qu'environ 80 % des bactéries de la rhizosphère peuvent sécréter de l'AIA, cela semble être dû à une forte quantité de matières organiques dérivées des racines des plantes et des exsudats radiculaires nécessaires à la croissance microbienne. L'absence de la production chez les trois souches serait liée donc à la perte de l'information génétique et du mécanisme physiologique de la biosynthèse de l'AIA (**Mishra et al., 2010**).

L'acide cyanhydrique (HCN) est un métabolite secondaire volatil qui inhibe la croissance et le développement des micro-organismes. Cet acide produit par certaines bactéries endophytique joue un rôle primordial dans le biocontrôle des agents phytopathogènes (**Siddiqui et al., 2007**) et la réduction de la gravité des maladies telluriques (**Voisard et al., 1989 ; Thomashow, 1990**). La production de l'HCN par les *Pseudomonas* fluorescents est impliquée dans l'inhibition de la croissance de plusieurs agents phytopathogènes fongiques, en agissant directement sur les cellules en bloquant les cytochromes oxydases dans la chaîne respiratoire (**Blumer et Hass, 2000 ; Devi et al., 2007 ; Devi et Kothamasi, 2009**).

Les résultats de notre étude, sur la production de substances volatile (HCN) ont montré que parmi les 12 souches, 5 ont montré une cyanogénèse positive en présence de la glycine qui joue un rôle comme précurseur de cyanides, et en présence d'HCN synthase elle est décarboxylée en HCN et en CO₂ (**Nandi et al., 2017**). Cette différence revient à la variabilité génétique chez les *Pseudomonas*. Les résultats obtenus au cours de cette expérimentation concordent avec plusieurs travaux précédents qui ont démontré la capacité des *Pseudomonas* fluorescents endophytes à produire l'acide cyanhydrique (HCN) (**Karmegham et al., 2020 ; Naglimat et al., 2021**).

Le phosphore est le deuxième nutriment essentiel au fonctionnement des végétaux après l'azote, car il joue un rôle crucial dans de nombreuses réactions enzymatiques. De la même façon que l'azote, le phosphore ne peut pas être directement assimilé par la plante car il forme dans le sol de nombreux complexes (Khan et al., 2009). La solubilisation du phosphore en phosphate peut être réalisée par les bactéries endophytes lors de la sécrétion de phosphatases, le rendant ainsi assimilable par la plante (Otieno, 2015 ; Mtos, 2017).

En effet, il a été démontré que *Pseudomonas* spp. fluorescents est impliqué dans la solubilisation des phosphates insolubles. Ces espèces améliorent la croissance des plantes en augmentant la disponibilité en phosphore assimilable (Tilak et al., 2005).

Dans cette étude, les 6 souches qui ont la capacité de solubiliser le phosphore sont indiquées par la formation d'un halo de solubilisation et /ou par changement de la couleur du milieu de culture. Cette réaction n'est pas due à la production d'acide organique mais à la production d'enzymes phosphatases. Ceci concorde avec les résultats obtenus par Naglimat et al., (2021) qui ont montré la capacité des *Pseudomonas* spp. fluorescents de solubiliser le phosphore. L'absence de phosphatase chez les autres souches serait expliquée par leur déficience enzymatique. En effet, la disponibilité de formes solubles du phosphate dans le milieu entraîne leur association avec les acides organiques libérés, en formant des composés organo-phosphatés. Ces derniers seraient difficiles à dégrader par les souches bactériennes de *Pseudomonas* (Chaiharm et Lymyong, 2009).

Les *Pseudomonas* endophytiques produisent diverses enzymes telles que les protéases et amylases (Gao et al., 2010 ; Rajulu et al., 2010). Ces enzymes peuvent dégrader la paroi cellulaire des agents pathogènes ou inhiber la germination des spores. C'est un moyen efficace pour augmenter la résistance de l'hôte contre les phytopathogènes et de permettre à l'hôte d'obtenir une protection contre le stress biotique (Cook et al., 2010).

D'après nos résultats de la production de ces enzymes, 25% et 83% des souches ont été productrices respectivement des protéases et amylase. Ces résultats confirment que ces bactéries peuvent produire des enzymes hydrolytiques en l'occurrence des protéases qui provoquent la lyse de la paroi des champignons phytopathogènes (CWDE : cell wall degrading enzymes). Ceci concorde avec les résultats de Naik et Sakyhivel, (2006) qui ont montré que la souche *Pseudomonas* PUP6 produirait des protéases ayant une activité CWDE et avec les résultats de Siala et al., (2016) qui ont observé l'activité amylolytique chez *Pseudomonas* spp. fluorescents endophytiques.

La production d'ammoniac (NH₃) est une caractéristique importante des *Pseudomonas* endophytes, cette propriété influencent indirectement sur la croissance des plantes, qui est par l'alcalinisation du milieu qu'il provoque, peut avoir un effet inhibiteur, principalement sur la croissance d'espèces fongiques phytopathogènes (**Benchabane, 2005**). Nos résultats montrent que 100% des souches produisent l'ammoniac. Ceci concorde avec les résultats de **Ali, (2019)** et **Agarwal *al.*, (2020)**, qui ont constaté que tous les isolats testés se sont avérés productrice d'ammoniac.

Dans la troisième partie de ce travail, le choix des huit souches a été effectué par rapport à la forte production des métabolites secondaires. L'étude de l'activité antagonisme *in vitro* a été révélée chez les huit souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents qui ont été testées pour leur capacité à inhiber la croissance mycélienne de F.o.a (**G1**) et de F.o.l (**G2**) sur trois milieux différents (PDA, KB, Mixte). Avec des effets antagonistes divers. Cette variation dépend non seulement des espèces et des souches antagonistes testées, mais aussi de la composition du milieu de culture. Les résultats obtenus concordent avec ceux déjà obtenu par plusieurs auteurs qui ont montré que les *Pseudomonas* sont connues pour leurs activités antagonistes envers plusieurs microorganismes phytopathogène (**Haas et Defago, 2005**).

La différence dans l'activité antagoniste exercée par ces bactéries peut être expliquée par la production d'une ou plusieurs substances antimicrobiennes. Cela dépend de l'espèce, de la nature du métabolite ainsi que la quantité libérée dans le milieu utilisé (**Kamilova, Validov et al., 2005**). Le pouvoir antimicrobien des souches TBR51, TRR5, KFR2 est meilleur sur le milieu KB et Mixte avec des taux d'inhibitions presque identique allant jusqu'à 88%. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par **Benoussaid, (2018)** et celle obtenue par **Karmegham et al.,(2020)** qui ont constaté que *Pseudomonas spp.* fluorescent présente un effet antagoniste claire contre *Fusarium oxysporum* avec des taux d'inhibition allant jusqu'à 70%. , qui ont constaté que *Pseudomonas spp.* fluorescents endophytiques présentent un effet antagoniste claire contre *Fusarium oxysporum*.

Ce pouvoir antagoniste s'exprime bien sur le milieu KB qui est considéré comme sélectif pour les *Pseudomonas spp.* fluorescents et qui est expliquée par la synthèse des sidérophores qui chélatent les ions de fer trivalent, suite à la production de pigment fluorescents (**Hass et al., 1991 ; Lemanceau, 2007 ; Dahdah et al., 2015**). Le groupe de *Pseudomonas spp.* fluorescents intervient dans l'inhibition des microorganismes pathogènes et la suppression des maladies par le phénomène de compétition vis-à-vis du fer (**Dahdah**

et al., 2015). Ces résultats suggèrent que l'activité antagoniste exercée par les différentes souches sur le milieu Mixte, n'est pas due à l'action des sidérophores, car ce milieu ne favorise pas la production des pigments fluorescents. Ceci peut être expliqué par l'implication d'autres mécanismes d'action, telle que les métabolites à effet inhibiteurs.

D'autres part, le même essai sur le milieu PDA révèle la présence des zones d'inhibitions autour du pathogène fongique. Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet bénéfique de *Pseudomonas* spp fluorescents en excréant nombreux métabolites secondaires à activités antifongiques et / ou antibactériennes. Ces métabolites sont représentés par l'acide cyanhydrique (HCN) (**Haas et Defago, 2005 ; Devi et Kothamsi, 2009**) qui confèrent la particularité d'être des agents de biocontrôle par le mécanisme de l'antibiose et à la synthèse des enzymes (Protéase, amylase) qui peuvent dégrader la paroi cellulaire des agents pathogènes et jouer un rôle primordial dans la protection de l'hôte contre le stress biotique et les agents phytopathogènes.

Cependant, à travers nos résultats nous avons marqué chez certaines souches bactériennes une stabilité dans l'inhibition de la croissance mycélienne détectée après 15 et 30 jours de confrontation. L'absence de stabilité de l'inhibition détectée chez d'autres souches peut être expliquée par la production de quantités insuffisante du métabolite secondaire par les *Pseudomonas* spp fluorescents pour l'activité inhibitrice. Ce constat peut être expliqué par d'éventuelles intensités de production de métabolites secondaires dans les premiers jours, et leur probable dégradation après 7 jours de confrontation.

*Conclusion et
perspectives*

Les endophytes sont des microorganismes qui colonisent les tissus internes des plantes, sans causer de dommages apparents à son hôte (**Kado, 1992 ; Urooj et al., 2018**). Certains d'entre eux, notamment les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connue comme des agents actifs de biocontrôle pour améliorer la croissance des plantes, en sécrétant divers métabolites qui favorise la tolérance de l'hôte à différents stress (**Kandel et al., 2017 ; Korejo et al., 2017 ; Rahman et al., 2016 ; Urooj et al., 2018**).

Notre travail a permis de faire une pré-identification d'une collection de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées de l'endophytosphère du palmier dattier, et l'étude de leur capacité à produire des métabolites secondaires impliqués dans la lutte biologique, ainsi que leur pouvoir antagoniste vis-à-vis les deux forme d'agent phytopathogènes *Fusarium oxysporum*.

L'identification macroscopique et microscopique tels que la coloration de Gram, et biochimiquement (test d'oxydase, catalase, arginine dihydrolase), ainsi que quelques tests de la clé dichotomique et le test LOPAT, nous a permis de sélectionner 12 isolats des 25 appartenant au *Pseudomonas* spp. fluorescents, dont 83% peuvent être affiliées à *P. putida* ou au groupe intermédiaire entre *P. putida* et *P. fluorescens* et 16% affiliés à *P. fluorescens*/ *P. aureofaciens*/ *P. chlororaphis*.

Les 12 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents endophytes sont testées pour leur pouvoir à produire des métabolites secondaires impliqués dans les activités phytobénéfiques. D'après nos résultats 100% des souches ont le pouvoir de produire l'ammoniac, 80% produisent l'amylase ,75% sont apte à synthétiser l'acide indole acétique (AIA), 41,6% produisent de cyanure d'hydrogène (HCN), 50% produisent les phosphatases, et seulement 25% sont avérés productrices des enzymes protéolytiques. En revanche, ces derniers ont montrés incapables de produire les phénazines, lipases et les acides organiques.

Les huit souches de *Pseudomonas* spp fluorescents endophytes sélectionnées sur la base de la forte production des métabolites secondaires ont montré une activité antagoniste importante *in vitro* vis-à-vis les deux formes du champignon *Fusarium oxysporum*. Les meilleurs résultats ont été observés sur le milieu KB et Mixte avec la souche KFR2 qui à montrer un pouvoir inhibiteur le plus élevé avec un taux d'inhibition égale à 80% contre FOA (**G1**), et 88% contre FOL (**G2**).

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses. D'un point de vue taxonomique, il serait nécessaire de procéder à l'identification phénotypiques plus sophistiqué et génotypiques par des moyens moléculaires tels que PCR, électrophorèse, western blot..., car le groupe *Pseudomonas* spp.fluorescents est un groupe très hétérogène nécessitant des études génétiques plus profondes.

Etant donné que l'effet bénéfique des souches *Pseudomonas* spp.fluorescents endophytes a été prouvé *in vitro*, il est souhaitable de continuer ce travail dans le but de quantifier les métabolites secondaires produits par ces bactéries, et qualifier d'autres métabolites pouvant être impliqués dans la promotion de la croissance des plantes. Des études plus approfondies doivent être réalisées afin d'identifier les gènes responsables de la promotion de la croissance et de l'effet antagoniste prouvé *in vitro*.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Agrwal, H ; Dowarah, B ; Baruah, PM ; Bordoloi, KS ; Krishantreya, DB ; Agrwal, N ., 2020.** Endophytes from *Gnetum gnemon* L. can protect seedlings against the infection of phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* as well as promote plant growth in tomato., *Microbiological Research* 238 :126503.
- Agoudjil B, Benchabaneb A, Boudennec A., 2011.** Renewable materials to reduce building heat loss: characterization of date palm wood. *Energy Build*; 43, 491.
- Alabouvette C, Cordier C., 2018.** Fertilité biologique des sols : des microorganismes utiles à la croissance des plantes. *Innovations Agronomiques*, INRAE, 69, 10.15454/ UIJG8Lf .hal-02058232.
- Al-Alawi, R., Al-Mashiqri, J.H., Al-Nadabi, J.S.M., Al-Shihi, B.I., Baqi, Y., 2017.** Date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.): Natural products and therapeutic options. *Frontiers in Plant Science* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00845>
- Algérie Presse Service (APS), 2021.** Transformation des dattes: une filière émergente dans l'attente de l'amélioration du cadre juridique. Algérie Presse Service (APS).
- Amine, B., 2009.** Caractérisation phytochimique et activité antioxydante de quelques cultivars de *Phoenix dactylifera* L. Mémoire de magistère Université d'Oran Es-Sénia, Algeria.
- Amir, H., Benaceur M., Laoufi Z., Amir A., et Bounaga N., 1985.** Le palmier dattier et la fusariose. XIII contribution à l'étude de l'écologie microbienne du sol de 2 palmeraies sahariennes atteintes de Bayoud. *Revue d'Ecologie et Biologie du sol*, 22- 313- 330.
- Anonyme, 2000.** Bulletin phytosanitaire concernant la lutte contre la cochenille blanche du palmier dattier. Avertissement agricole. Ed. SRPV Biskra.
- Anirban Basu; Priyanka Prasad; Subha Narayan Das; Sadaf Kalam; R. Z. Sayyed; M. S. Reddy and Hesham El Enshasy, (2021).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects, *Sustainability*, 13, (3), 1-20.
- Arshad, M; Saleem, M; Hussain, S., 2007.** Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends Biotechnol.*, 25, 356–362.
- Arnau, G.V., Sánchez A.L., Delgado D.A, 2015.** *Pseudomonas yamanorum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a subantarctic environment., *international journal of systematic and evolutionary microbiology* Volume 65, Issue Pt_2.
- Bakker , M. G. , Schlatter , D. C. , Otto - Hanson , L. , and Kinkel , L. L., (2014) .** Diffuse symbioses: roles of plant - plant, plant - microbe and microbe - microbe interactions in structuring the soil microbiome. *Mol. Ecol.* 23, 1571-1583. doi : 10.1111 / mec.12571

Références bibliographiques

Bahriz H, Bouras N, 2020. Etude de la Maladie du Bayoud, le Comportement Variétal du Palmier Dattier vis-à-vis du *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* dans la Vallée du M'Zab. African Review of Science, Technology and Development Volume 5, N 1, 46p.

Benchabane M., 2005. Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Thèse Doctorat d'état, FSB-USTHB, Alger, 235 p.

Benlarbi L., 2019. Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum f sp albedinis* agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier et moyens de lutte. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. 175.

Benoussaid N, 2018. Etude de quelques caractères phénotypiques et génotypiques du métabolisme secondaire lie au biocontrôle et la phytostimulation chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents. Thèse de Doctorat. Université Saad Dahleb, Blida.

Benzina Tihar F., Oulebsir-Mohand Kaci H., Hamid S., Reghmit A-E et Sahir-Haloune F., 2021. Détermination et caractérisation des sidérophores synthétisés par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents phyto-bénéfiques, Revue Nature et Technologie, 13 (1) : 39-52.

Benziouche S.E ., (2012). Analyse de la filière dattes en Algérie ; constats et perspectives de développement, cas de la Daïra de Tolga. Thèse de Doctorat, ENSA, ElHarrach – Alger, Algérie, 470 p.

Benziouche S.E et Chehat F ., (2010). La conduite du palmier dattier dans les palmerais des Ziban ; Quelques éléments d'analyse. Européen Journal of Scientifique Recherche, 42 (4), 644-660.

Blama A ., (2014) Dix-sept wilayas productrices de datte, une richesse inépuisable pour l'Algérie. Le Monde des Dattes, 1, 14-15.

Blumer C. et Haas D., 2000. Iron regulation of the hcnABC genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Microbiology, 146, 2417- 2424.

Bojarska J, Maniukiewicz W, Fruzin´ski A, Jedrzejczyk M, Wojciechowski J, Krawczyk H (2014) Structural and spectroscopic characterization and Hirshfeld surface analysis of major component of antibiotic mupirocin—pseudomonic acid A. J Mol Struct 1076:126–135

Bossis E., 1995. Les *Pseudomonas* fluorescents de la rhizosphère : étude taxonomiques et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée. Thèse Doctorat, Université de Nantes, France, 143 p.

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.

Bouammar B., (2010). Le développement agricole dans les régions sahariennes ; Etude

Références bibliographiques

de cas de la région de Ouargla et de la région de Biskra. Thèse de Doctorat, Département des sciences économiques, Université de Ouargla, Algérie, 290 p.

Bougedoura, N., Bennaceur, M., & Benkhalifa, A. (2010). Le palmier dattier en Algérie : situation, contraintes et apports de la recherche. Biotechnologies du palmier dattier. IRD Éditions, Paris, 16-22.

Bougedoura N., Bennaceur M, Babahani S et Benziouche S.E (2015) Date Palm Status and Perspective in Algeria. In : Date palm Genetic Resources, Cultivar Assessment, Cultivation Practices and Novel Products. Springer, 125-168.

Boulanouar A., 2015. Bio écologie de l'entomofaune des différentes palmeraies de la région de la Saoura (Béchar) : Application a quelques espèces fréquentant la plante hôte Phoenix dactylifera. Thèse Doc. Univ. Tlemcen. Algérie.

Brader G, Compant S, Mitter B., (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. Curr Opin Biotechnol 27: 30-37.

Bric J. M., Bostock R. M et Silverstone E. S., 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. and Env. Microbiol., 57 (2): 535-538.

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

Cappuccino J. C. et Sherman N., 1992. Microbiology: A laboratory manual, third ed. Benjamin/cummings. Pub. Co., New York, pp. 125-179.

Carmona - Hernandez, S., Reyes - Pérez, J.J., Chiquito - Contreras, R.G. Rincon - Enriquez, G., Cerdan - Cabrera, C.R. Hernandez - Montiel, LG., 2019. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. Agronomy 9 (3), 121-135.

Chao, C.C.T., Krueger, R.R., 2007. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Overview of biology, uses, and cultivation. HortScience 42, 1077–1082.

Chen A, Chen Y., 2013. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. Food Chem.

Chikh Aissa, A., 1991. Etude de l'efficacité du bromure de méthyle et de la chloropicrine sur *Fusarium oxysporium* f. sp. *albedinis*. Bulletin du réseau maghrébin de recherche sur la phœniciculture et la protection du palmier dattier. Ed. FAO. Alger, Pp 17 – 24.

Chincholkar S. et Thomashow L., 2014. Microbial Phenazines. Biosynthesis, Agriculture and Health. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 251p

Références bibliographiques

- Christina A, Christopher V, Bhore SJ (2013)** Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics. *Pharmacogn Rev* 7 : 11-16.
- Chaudhary P, Sharma A., 2018.** Response of Nanogypsum on the Performance of Plant Growth Promotory Bacteria Recovered from Nanocompound Infested Agriculture Field Environment and Ecology 37 (1B) : 363—372.
- Compant S, Duffy B, Nowak J (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.
- Daddi Bouhoun M, 2010.** Contribution à l'étude de l'impact de la nappe phréatique et des accumulations gypso-salines sur l'enracinement et la nutrition du palmier dattier dans la cuvette de Ouargla (Sud Est Algérien), thèse de doctorat, Université Badji Moktar de Annaba.
- Dakhia N., Ben salad MK ., Roumani M., Belhamra M., 2013.** État phytosanitaire et diversité variétale du palmier dattier au Bas Sahara Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides*. 17pp .
- Dastogeer KMG , Tumpa FH , Sultana A , Akter MA , Chakraborty A., 2020.** Plant microbiome - an account of the factors that shape community composition and diversity , *Current Plant Biology*. doi : <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100161>
- Defago G., 1993.** 2, 4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol*. 42: 311–312.
- De groot A., Filloux A. et Tommassen J., 1991.** Conservation of xcp genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other Gram-negative bacteria. *Mol. General. Genet*. 229: 278-284.
- De Meyer, S. E., De Beuf, K., Vekeman, B., & Willems, A. (2015).** A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 83, 1–11.
- Devi , K. K. , Seth , N., Kothamasi , S., Kothamasi , D. (2007) .** Hydrogen cyanide producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (rambur) by cyanide poisoning under in vitro conditions . *Current microbiology* . 54 (1) . 74-78 .
- Digat, B. and Gardan, L., 1987.** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP*. 17: 559-568.
- Dihazi A, 2012.** Interaction Palmier dattier-*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* : Induction des réactions de défense par l'acide salicylique et rôle de quelques microorganismes antagonistes de l'agent pathogène dans le contrôle de la maladie du Bayoud. Thèse de Doctorat. Université IBN ZOHR Agadir.
- Do Thi V.V, 2011.** Matériaux composites fibres naturelles/polymère biodégradables ou non. Thèse de PhD, Université de Grenoble.

Références bibliographiques

- Ekpenyong, M., A. Atim, O. Abraham et A. Sylvester. (2016).** Production and activity kinetics of gelatinase by *Serratia* sp. SLO3. *Nigerian J. Biopesticides*, 1 (1): 70-82.
- Elhoumaizi, M. A, Saaidi, M., Oihabi, 2002.** Phenotypic diversity of date-palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) from Morocco.
- Faostat., (2020).** production FAOSTAT Food and agriculture Organisation of the United Nations. Rome.
- Figueiredo, M. do V. B., Seldin, L., de Araujo, F. F., & Mariano, R. de L. R. (2010).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. *Microbiology Monographs*, 21–43.
- Freha, G., 2015.** Caractérisation physicochimique, phytochimique et biochimique de cinq variétés de dattes d ' Algérie, *Phoenix dactylifera* L. Effets de leur ingestion sur certains paramètres biologiques (Glycémie, profil lipidique, index glycémique et pression artériel. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, Algeria.
- Garcia-Seco D, Zhang Y, Gutierrez-Mañero FJ, Martin C, Ramos-Solano B (2015)** Application of *Pseudomonas fluorescens* to Blackberry under Field Conditions Improves Fruit Quality by Modifying Flavonoid Metabolism. *PLoS ONE* 10(11): e0142639.
- Garrido-Sanz D., Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Martín, M., Rivilla R., et Redondo-Nieto M., 2016.** Correction : Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS One* 11, e0150183.
- Gao, F. ; Dai, C. ; Liu, X. 2010.** Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4,1346–1351.
- George M. Carlone, Manuel J. Valadez, and M. John Pickett Methods for Distinguishing Gram - Positive from Gram - Negative Bacteria. Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1983, p. 1157-1159.**
- Glick, B.R. Plant growth-promoting bacteria. 2012.** Mechanisms and applications. Scientifica.
- Guerrieri , MC , Fanfoni , E. , Fiorini , A. , Trevisan , M. , Puglisi , E. , 2020.** Isolement et criblage de PGPR extracellulaire de la rhizosphère des plants de tomates après un travail réduit du sol et des cultures de couverture à long terme . *Plantes* 9, 668.
- Haas D., Défago G., 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319.
- Hadj, S.T., 2010.** Etude ethnobotanique, activité antioxydante et analyse phytochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du Sud-Est Algérien. Mémoire de magister Université d'Oran–Es Senia Algérie.
- Hildebrand, D.C., 1988.** Pectate and pectin gel for differentiation of *Pseudomonas* sp. And other bacterial plant pathogens. *Phytopathol.* 61: 1430-1439.

Références bibliographiques

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T., 1994. Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. Ninth Edition.

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

Jean-Louis, C., 2011. Microbiologie alimentaire, Contrôle microbiologique des aliments.

Jeguirim, M., Khiari, B., Limousy, L., 2019. Biomass feedstocks, in: Jeguirim, M., Limousy, L. (Eds.), Char and Carbon Materials Derived from Biomass. Elsevier Inc., pp. 1–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814893-8.00001-8>

Jeyanthi, V. ; Kanimozhi, S., 2018. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-prospective and mechanisms : A review. *J. Pure Appl.Microbiol.*, 12, 733–749.

Jin Y, Li M, Shang Y, Liu L, Shen X, Lv Z, Hao Z, Duan J, Wu Y, Chen C, Pan J, Yu F., (2018). Sub-inhibitory concentrations of mupirocin strongly inhibit alpha-toxin production in high-level mupirocin-resistant MRSA by down-regulating *agr*, *saeRS*, and *sarA*. *Front Microbiol* 9:993.

John A. McInroy and Joseph W. Klopper, 1995. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton, <https://doi.org/10.1139/m95-123>.

Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B., 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809-1817.

Kandel S. L., Joubert P. M., Doty S. L., 2017. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 5, p. 77-103.

Karmegham ,N ; Vellasamy, S ; Natesan ,B ; Sharma,PM ; Al Farraj,D ; Elshikh M,2020. Caractérisation du métabolite antifongique phénazine des pseudomonades fluorescentes (PF) de la rhizosphère du riz et leur effet sur la brûlure de la gaine du riz. *Journal saoudien des sciences biologiques*, vol 27, p 3313-3326

Kerstens K., Ludwig W., Vancanneyt M., Devos P., Gillis M. et Schleifer K. H., 1996. Recent changes in the classification of pseudomonads: an overview. *Syst.Appl.Microbiol.*, 19: 465-477.

Khan, Z.ÿ ; Doty, SL., 2009.Caractérisation des endophytes bactériens des plants de patate douce. *Sol végétal*, 322, 197–207

Khare, E. ; Mishra, J. ; Arora, N.K., 2018. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant : Developments and Prospects. *Front. Microbiol*, 9, 2732.

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

Références bibliographiques

Kimura N, Watanabe T, Suenaga H, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Hanada S, Hirose J., 2018. *Pseudomonas furukawaii* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Volume 68, Issue 5.

Klement, Z., 1963. Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas. *Nature*.199, 299-300.

Kloepper J. W. et Schroth M. N., 1978. Plant Growth Promoting Rhizobacteria on radishes, In : *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*. Angers, France, pp. 879-882.

Kogel KH, Franken P, Hückelhoven R Curr Opin Plant Biol 9, (2006). The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley, 358–363.

Lamari, L., Bouras, N., Boudjella, H., Ould EL Hadj-Khelil, A., Ould El Hadj, M. D., et Sabaou, N., 2014 - Influence de quelques souches bactériennes d'origine saharienne sur l'expression de la fusariose du lin et du palmier dattier. *Algerian journal of arid environment*. vol. 4, n° 2, 65- 77.

Latour, X. and Lemanceau, P., 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp., *Agronomie*, 17: 427–443.

Latz, M. ; Jensen, B. ; Collinge, D. ; Jørgensen, H.J.L., 2018. Endophytic fungi as biocontrol agents : Elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecol. Divers.*, 11, 555–567.

Lelliott, R.A. and Stead, D.E., 1987. In: T.F. Preece (Ed.). *Methods in Plant pathology*. Vol 2: *Methods for diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell. Oxford. UK, 212 p.

Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470–489.

Li, N., Alfiky, A., Wang, W., Islam, M., Nourollahi, K., Liu, X., Kang, S., 2018. Reconnaissance et inhibition médiées par les composés volatils entre les agents de lutte biologique contre *Trichoderma* et *Fusarium oxysporum*. *De face. Microbiol.* 9, 2614.

Liarzi, O. ; Ezra, D., 2013. Endophyte-Mediated Biocontrol of Herbaceous and Non-herbaceous Plants. In *Advances in Endophytic Research* ; Springer : Berlin/Heidelberg, Germany ; pp. 335–369.

Lelliott, R.A. and Stead, D.E., 1987. In: T.F. Preece (Ed.). *Methods in Plant pathology*. Vol 2: *Methods for diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell. Oxford, UK, 212 p.

Lelliott, R.A., Billing. E. and Hayward, A.C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29:470-489.

Loper J.E., Hassan K.A., Mavrodi D.V., Davis E.W., Lim C.K., Shaffer B.T., Elbourne L.D.H., Stockwell V.O., Hartney S.L., Breakwell K., Henkels M.D., Tetu S.G., Rangel L.I.,

Kidarsa T.A., Wilson N.L., van de Mortel J.E., Song C., Blumhagen R., Radune D., Hostetler J.B., Brinkac L.M., Durkin A.S., Kluepfel D.A., Wechter W.P., Anderson A.J., Kim Y.C., Pierson L.S., Pierson E.A., Lindow S.E., Kobayashi D.Y., Raaijmakers J.M., Weller D.M., Thomashow L.S., Allen, A.E. et Paulsen I.T., 2012. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet.* 8, e1002784.

Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, Davis EW, Lim CK, Shaffer BT, Elbourne LDH, Stockwell VO, Hartney SL, Breakwell K, Henkels MD, Tetu SG, Rangel LI, Kidarsa TA, Wilson NL, van de Mortel JE, Song C, Blumhagen R, Radune D, Hostetler JB, Brinkac LM, Durkin AS, Kluepfel DA, Wechter WP, Anderson AJ, Kim YC, Pierson LS, Pierson EA, Lindow SE, Kobayashi DY, Raaijmakers JM, Lounsbury N, Eidem T, Colquhoun J, Mateo G, Abou-Gharbia M, Dunman PM, Childers WE (2018) Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA that synergize with mupirocin. *Bioorg Med Chem Lett* 28:1127–1131.

Mapelli , F. , Marasco , R. , Rolli , E. , Barbato , M. , Cherif , H. , Guesmi , A. , Ouzari , I., Daffonchio , D. , Borin , S. , 2013. Potentiel pour la plante promotion de la croissance des bactéries rhizo associées à *Salicornia* poussant dans les sols hypersalins tunisiens . *Bio Med Res . Int .* 1e13 , 248078 .

Matos A. D. M., Gomes I. C. P., Nietsche S., Xavier A. A., Gomes W. S., Dos Santos J. A., Pereira M. C. T., 2017. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 89, p. 2945-2954.

Mehta S. et Nautiyal C. S., 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.*, 43 (1): 51-56.

Meliani, A., 2012. Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens* Doctorat université d'Oran.

Mercenier, A., Simon, J. P., Van der Wauven, C., Haas, D. and Stalon, V., 1980. Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 144: 159-163.

Mercer DK, Katvars LK, Hewitt F, Smith DW, Robertson J, O'Neil DA (2017) NP108, an antimicrobial polymer with activity against methicillin- and mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 61(9) :e00502–e00517.

Messaoudi, H., 2015. Effets de l'inoculation avec des bactéries rhizosphériques sur la croissance du blé et le développement de quelques bio-agresseurs qui lui sont associés.

Meyer J. M. et Abdallah M. A., 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* : biosynthesis, purification et physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.*, 107: 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 (Algérie), 221p.

Références bibliographiques

- Misaghi, I. and Grogan, R. G., 1969.** Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* 59: 1436-1450.
- Mishra M., Kumar U., Mishra P. K. et Prakas V., 2010.** Efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria for the enhancement of *Cicer arietinum* L. Growth and germination under salinity. *Adv.Bacterial. Research.*, 4 (2): 92-96.
- Mishra J.and Arora N K., 2017.** Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*
- Moin, S., Ali, S.A., Hasan, K.A., Tariq, A., Sultana, V., Ara, J., Ehteshamul-Haque, S., Managing, 2019.** The root rot disease of sunflower with endophytic fluorescent *Pseudomonas* associated with healthy plants, *Crop Protection* (2020), j.cropro.105066.
- Moulai A et Yahaya A (2019)** Note d'actualité sur les Oasis d'Algérie. Rapport, RADD0, Montpellier, France, 12 p.
- Naik P. R. et Sakthivel N., 2006.** Functional characterization of a novel hydro carbon clastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.*, 157: 538-546.
- Nandi, M., Selin, C., Brawerman, G., Fernando, W. G. D., & de Kievit, T. (2017).** Hydrogen cyanide, which contributes to *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 biocontrol, is upregulated in the presence of glycine. *Biological Control*, 108, 47–54.
- Nam, H.S., Anderson , A.J. , Kim , Y.C. , 2018.** Biocontrol efficacy of formulated *Pseudomonas chlororaphis* 06 against plant diseases and root - knot nematodes . *Plant Pathol . J.* 34 (3) , 241 .
- Neilands (1995).** Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* vol. 270 (45) : 26723–26726.
- Nelson K. E., Weinel C., Paulsen I. T., Dodson R. J., Hilbert H., Martins dos Santos V. A. P., and Brinkac L. (2002).** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology.*4(12):799-808.
- Ngalimat, M.S. ; MohdHata, E. ; Zulperi, D. ; Ismail, S.I. ; Ismail, M.R. ; Mohd Zainudin, N.A.I. ; Saidi, N.B. ; Yusof, M.T. 2021.** Plant Growth-Promoting Bacteria as an Emerging Tool to Manage Bacterial Rice Pathogens. *Microorganisms*, 9, 682.
- Nowak-Thompson B., Gould S. J. et Loper J. E., 1997.** Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorinbiosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Gene*, 204:17-24.
- Olmar B., Weber I., Leonardo M., Cruz J.L., Baladani J., et Dobereiner., 2001.**Herbaspirillum-like bacteria in banana plants .*Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 201.

- Otieno N., Lally R. D., Kiwanuka S., Lloyd A., Ryan D., Germaine K. J., Dowling D. N., 2015.** Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* 6, p. 745.
- Palleroni N. J., 1992a.** Introduction to the family Pseudomonadaceae, 3071-3085. A. Ballows, H. G. Trüper, M. Dworking, W. Harder and K. H. Schleifer .Eds... In *The Prokaryotes*, Springer Verlag, New York.
- Palleroni N. J., 1992b.** Present situation of the taxonomy of aerobic Pseudomonads, 105-115. S. Galli, S. Silver and B. Witholt .Eds., In *Pseudomonas : Molecular Biology and Biotechnology*, 60, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Palleroni N. J., 1984.** Gram-negative aerobic rods and cocci: family I Pseudomonadaceae, 141-168. Krieg, Holt, William and Wilkings .Eds., In *Bergey's manual of bacteriology*, 1, William & Wilkins, Baltimore.
- Palleroni NJ (1992)** Introduction to the Pseudomonadaceae. *The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification and applications*, vol. III, 2nd ed (Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schlepper KH, eds), 3071-3085. Springer, New York.
- Palleroni, N.J. (2009).** The genus *Pseudomonas*. Dans "Practical handbook of microbiology", 2ème édition, Goldman, E. et Green, L.H. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Etats-Unis.231- 242p.
- Palleroni N. J. (2010).** The *Pseudomonas* story. *Environmental microbiology*. 12(6): 1377-1383.
- Palleroni N.J., 2015.** *Pseudomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc. in association with Bergey's Manual Trust, pp.1-105. Doi : 10.1002/9781118960608.gbm01210.
- Patten, C.L; Glick, B.R., 1966.**Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic Acide.can.J. Microbiol, 42, 207-220.
- Patil, R. H., Patil, M. P., & Maheshwari, V. L. (2016).** Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi. *Studies in Natural Products Chemistry*, 189–205.
- Paulsen , IT , Press , CM , Ravel , J., Kobayashi , DY , Myers , GSA , Mavrodi , DV , DeBoy , RT , Seshadri , R , Dodson, JR, Durkin,SA, Brinkac,ML, Daugherty, SC, Sullivan ,SA, Rosovitz ,MJ, Gwinn ,ML , Zhou,L, Schneider,JD, Cartinhour,WS, Nelson,CW, Weidman J , Watkins, K , Tran,K , Khouri,H, Pierson,AE , Pierson,AE, Thomashow,SL, Loper E.J., 2005.** Séquence complète du génome de la plante commensale *Pseudomonas fluorescens* Pf - 5 . *Nat . Biotechnol .* 23 , 873e878 .
- Poovelikunnel TT, Gethin G, Solanki D, McFadden E, Codd M, Humphreys H (2018)** Randomized controlled trial of honey versus mupirocin to decolonize patients with nasal colonization of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 98:141–148.

Références bibliographiques

- Rajulu, M.B.G. ; Thirunavukkarasu, N. ; Suryanarayanan, T.S. ; Ravishankar, J.P. ; El Gueddari, N.E. ; Moerschbacher, B.M. 2010.** Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. *Fungal Divers.* 47, 43–53.
- Rajwar, A., Sahgal, M., Johri, B. N. (2013).** Legume–Rhizobia Symbiosis and Interactions in Agroecosystems. *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*, 233–265.
- Ramos-Solano, B., Lucas García, J.A., Garcia-Villaraco, A. (2010).** Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L.. *Plant Soil* 334, 189–197.
- Rayda Siala, Ines Ben Chobba, Tatiana Vallaey, Mohamed Ali Triki, Mouna Jrad, Manel Cheffi, Imen Ayedi, Amine Elleuch, Ahmad Nems, Frederique Cerqueira, Radhouane Gdoura, Nouredine Drira, and Néji Gharsallah,** “Analysis of the Cultivable Endophytic Bacterial Diversity in the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Evaluation of Its Antagonistic Potential against Pathogenic *Fusarium* Species that Cause Date Palm Bayoud Disease.” *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, vol. 4, no. 5 (2016) : 93-104.doi : 10.12691/jaem-4-5-2.
- Renshaw J., Robson G., Trinci A., Wiebe M., Livens F., Collison D (2002)** And Taylor R., *Fungal Siderophores : Structures, Functions and Applications.* *Mycological Research*, 106 (10) 1123-1142.
- Sah, S., Singh, N., Singh, R., 2017.** Acquisition du fer chez le maïs (*Zea mays* L.) à l'aide de Sidérophore de *Pseudomonas*. *3 Biotech* 7, 1-7.
- Santoyo, G., Moreno - Hagelsieb, G., Del Carmen Orozco - Mosqueda, M., Glick, B.R., 2016.** Plant growth - promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183, 92-99.
- Santner, A., Estelle, M., 2009.** Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**, 1071–1078.
- Sedra, M. H. 1985** - Potentiel infectieux et réceptivité de quelques sols de palmeraies à la fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud) causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Thèse de 3^{ème} cycle. Inst. Agro. Véter. Hassan II. Rabat, Maroc. 88 p.
- Sedra, Schmidt CS, Agostini F, Leifert C, Killham K, Mullins CE., 2003.** Le Palmier Dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc. Influence de la température du sol et du potentiel matriciel sur la colonisation des semis de betterave à sucre et la suppression de l'amortissement de *Pythium* par les bactéries antagonistes *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis*. *Phytopathologie.* (94), (2004) : 351-363.
- Shanmugaiah, V., Nithya, K., Harikrishnan, H., Jayaprakashvel, M., Balasubramanian, N., 2015.** Mécanismes de biocontrôle des sidérophores contre les pathogènes bactériens des plantes. *Approches durables du contrôle des bactéries phytopathogènes*, pp. 167-190.
- Siala R, Ben Chobba I, Vallaey T, Ali Triki M, Jrad M, Cheffi M, Ayedi I, Elleuch A, Nems A, Cerqueira F, Gdoura R, Drira N, and Gharsallah N., 2016.** " Analysis of the

Références bibliographiques

Cultivable Endophytic Bacterial Diversity in the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Evaluation of Its Antagonistic Potential against Pathogenic *Fusarium* Species that Cause Date Palm Bayound Disease. " Journal of Applied & Environmental Microbiology, vol. 4, no. 5 : 93-104 . Doi : 10.12691 / jaem - 4-5-2.

Sibihi D, 2011. Matériaux composites a matrice époxyde chargée par des fibres de palmier dattier : effet de l'oxydation au tempo sur les fibres. Thèse doctorat, INSA De Lyon.

Siddiqui ZA (2006). PGPR : Prospective biocontrol agents of plant pathogens. PGPR Biocontrol and Biofertilization. Springer, Berlin.

Siddiqui Z. A., Baghel G. et Akhtarn M. S., 2007. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and Plant Growth - Promoting Rhizobacteria on lentil. World. J. of Microbiol. and Biotechnol. , 23: 435-441.

Silby , MW , Cerdano - Tarraga , AM , Vernikos , GS , Giddens , SR , Jackson , RW , Preston , GM , Zhang , X.ex. , Moon, CD. , 2009. Analyses génomiques et génétiques de la diversité et des interactions végétales de *P. fluorescens*. Génome Biol.

Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev, 35(4) : 652-680.

Smibert R. M. et Krieg N. R., 1994. Phenotypic characterization. In: Methods for general and molecular Bacteriology. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (Ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 607-654.

Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiol, 146: 2345-2350

Stanier R. Y., Palleroni N. J. et Doudoroff M., 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. Microbiol., 43 (2) : 159-271.

Sturz A. V., and 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. 72(2):107-123.

Taghizadeh-alisaraei, A., Motevali, A., Ghobadian, B., 2019. Ethanol production from date wastes: Adapted technologies, challenges, and global potential Ahmad. Renewable Energy 143, 1094–1110.

Terral, J.F., Newton, C., Ivorra, S., Gros-Balthazard, M., de Morais, C.T., Picq, S., Tengberg, M., Pintaud, J.C., 2012. Insights into the historical biogeography of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using geometric morphometry of modern and ancient seeds. Journal of Biogeography 39, 929–941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02649.x>

Thomashow L. S. et Weller D. M., 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. J. Am. Soc. Microbiol., 170, 3499-3508.

Références bibliographiques

- Thomashow L. S. et Weller D. M., 1990.** Role of antibiotics et siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant et Soil.*, 129, 93-99.
- Tiwari, S. ; Prasad, V. ; Chauhan, P.S. ; Lata, C., 2017.** *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Front. Plant. Sci.*, 8, 1510.
- Trivedi MK, Patil S, Tallapragada RM., 2013.** Effect of biofi eld treatment on the physical and thermal characteristics of vanadium pentoxide powders. *J Mater Sci Eng.* 11: 001.
- Van LoonL. C., 2007.** Plant responses to plant growth-promotingrhizobacteria.*Eur J Plant Pathol.*119:243–254.
- Van Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., 2011.** Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. *Microb Ecol* 61, 723–728.
- Von Neubeck.M, Huptas.C, Glück. C, Krewinkel.M, Stoeckel. M, Stressler T, Fischer L, Hinrichs J, Scherer S, Wenning M., 2017.** *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk. *International journal of systymatic and evolutionary microbiology*, Volume 67, Issue 6.
- Venturi, V., Keel, C., 2016.** Signalisation dans la rhizosphère. *Tendances Plant Sci .* 21, 187e198.
- Vincent M. N., Harrison L. A., Brackin J.M., Kovacevich P. A., Mukerji P. et Weller D. M., 1991.** Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 57: 2928-2934.
- Vinoth R. S., Kanikkay R. A., Tyagi M. G., Shah N. H., Amala J. J. A., Infant S. B. et Sathiyaseelan K., 2009.** Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Res. in Sci. and Tech.*,1 (1): 008-013.
- Vokou D , Vareli K. Zarali E , Karamanoli K , Constantinidou H - IA , Monokrousos N., 2012.**Exploring biodiversity in the bacterial community of the Mediterranean phyllosphere and its relationship with airborne bacteria , *Microb Ecol.*64 : 714-24 .
- Voisard C., Keel C., Haas D. et Défago G., 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.*, 8 (2) : 351-358.
- Wang Y.N., He W.H., He H., Du X., Jia B., Zeng Z.P., AnM.L. et Chen, G.C., 2012.** *Pseudomonas nitritireducens* sp. nov., a nitrite reduction bacterium isolated from wheat soil. *Arch. Microbiol.* 194, 809–813.
- Wang, Q., Sun, Y., Zhou, K., Liu, W., Lu, Q., Ming, C., Feng, X., Du, J., Jia, X., Li, J., 2016.** Isolation of a non-fermentative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, using intracellular carbon for denitrification and phosphorus-accumulation and relevant metabolic mechanisms, *Bioresource Technology*, 211, 6-15.

Références bibliographiques

Weller DM, Thomashow LS, Allen AE, Paulsen IT ., 2012. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet.* 8, e1002784.

Widiantini, F.; Herdiansyah, A.; Yulia, E., 2017. Biocontrol Potential of Endophytic Bacteria Isolated from Healthy Rice Plant against Rice Blast Disease (*Pyricularia oryzae* Cav.). *KnE Life Sci.* 2, 287–295.

Wu, G. ; Liu, Y. ; Xu, Y. ; Zhang, G. ; Shen, Q. ; Zhang, R., 2018. Exploring Elicitors of the Beneficial Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Induce Plant Systemic Resistance and Their Interactions with Plant Signaling Pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31, 560–567.

Xia, Y. ; Liu, J. ; Chen, C. ; Mo, X. ; Tan, Q. ; He, Y. ; Wang, Z. ; Yin, J. ; Zhou, G., 2022. The Multifunctions and Future Prospects of Endophytes and Their Metabolites in Plant Disease Management. *Microorganisms*, 10, 1072. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051072>.

Xuemei Shen, Mingmin Chen, Hongbo Hu, Wei Wang, Huasong Peng, Ping Xu, Xuehong Zhang, 2012. Genome Sequence of *Pseudomonas chlororaphis* GP72, a Root-Colonizing Biocontrol Strain.

Yankey H, Isaacson G (2018) Efficacy of topical 2% mupirocin ointment for treatment of tympanostomy tube otorrhea caused by community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 109:36–39.

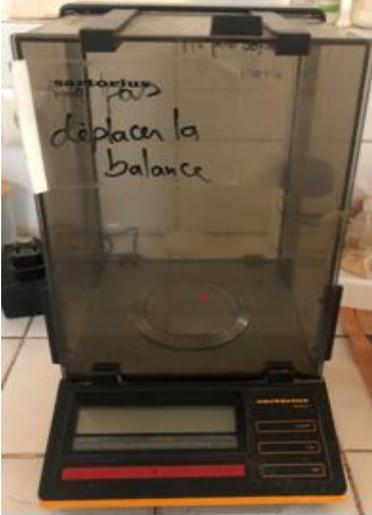
Yan, L., Zhu, J., Zhao, X. 2019 . Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 3327–3340.

Zaid A et De Wet P.F (2002) Botanical and systematic description of the date palm. *FAO Plant Prod. Prot*, 156, 1-2

Annexes

Annexe I : Le matériel utilisé au laboratoire

Nom de l'appareil	Photo (Originale)	Nom de l'appareil	Photo (Originale)
Etuve		Vortex	
Autoclave		Microscope optique	

Balance		Lampe UV	
Four		Réactif de HCN	

Annexe II : Composition des Milieux de cultures

<p align="center">Milieu B de King (KB) (King et al., 1954)</p> <p>Peptone (Difco) 20g Glycerol (Prolabo) 15ml K₂HPO₄ (Sigma) 1.5g MgSO₄ (Sigma) 1.5g Eau distillée 1000ml pH=7.2 autoclavage 20 minutes à 120°C</p>	<p align="center">Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthor et Booth, 1983)</p> <p>Pomme de terre 200g Dextrose 20g Agar 15g Eau distillée 1000 ml pH=7 autoclavage 20 minutes à 120°C</p>
<p>Milieu Levane (Hildebrand et al., 1988)</p> <p>Extrait de levure 2 g Bactopeptone 5 g NaCl 5 g Saccharose 50 g Agar 15 g Eau distillée 1000 ml pH = 7,2 autoclavage 20 minutes à 120° C</p>	<p>Milieu gélatine (Lelliot et Stead, 1987)</p> <p>Extrait de levure 3 g Gélatine 120 g Eau distillée 1000 ml pH 7 autoclavage 20 minutes à 120 °C</p>
<p>Milieu LB (Gardan et Luisetti, 1981)</p> <p>Bactotryptone 10g Extrait de levure 5 g NaCl 5 g Agar 15g Eau distillée 1000 ml pH = 7,2 autoclavage 20 minutes à 120° C</p>	<p>Milieu de Pikovskaia (Pikovskaya, 1948) (solubilisation des phosphates)</p> <p>Sucrose 10g Ca₃ (PO₄)₂ 5g MgCl₂.6 H₂O 5g MgSO₄. 7 H₂O 0,25g KCl 0,2g (NH₄)₂SO₄ 0,1g BPB 0,25g Eau distillée 1000 ml pH7 autoclavage 20 minutes à 120° C</p>
<p>Milieu pour les enzymes protéolytiques</p> <p>CAA 5g Extrait de levure 2,5g glucose 1g Agar 15g Solution de lait écrémé (7%) Eau distillée 1000 ml pH7 autoclavage 20 minutes à 120° C</p>	<p>NBY à 2% de glucose</p> <p>Bouillon nutritif (Difco) 8g Extrait de levure (Difco) 2g K₂HPO₄ 2g KH₂PO₄ 0.5g Glucose 2g MgSO₄-7H₂O 0.25g Eau distillée 1000 ml pH7 autoclavage 20 minutes à 120° C</p>
<p>Milieu pour production d'AIA LB à 5 mm de tryptophane et 0,06% de SDS</p>	<p>Milieu pour production d'HCN TSA ou TSB à 4,4 g de glycine</p>

Annexe III : Tableaux de quelques résultats

Tableau 10 : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur milieu King B

KingB Souches de <i>Pseudomonas</i>	La moyenne de diamètres d'inhibition %	Ecartype
TRR5	G1=46% G2=84%	G1=0,07 G2=0,042
KHE62	G1=34% G2=46,4%	G1=0,08 G2=0,035
KMR2	G1=40% G2=40,71%	G1=0,4 G2=0,001
KHE7	G1=33% G2=35%	G1=0,9 G2=0,035
TBR51	G1=46% G2=84,28%	G1=0,28 G2=0,001
TBF5	G1=23% G2=45%	G2=0,07 G2=0,021
KFR2	G1=56% G2=88,57%	G1=0,001 G2=0,001
TBF1	G1=30% G2=50%	G1=0,07 G2=0,07

Tableau 11: Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur milieu PDA

PDA Souches de <i>Pseudomonas</i>	La moyenne de diamètres d'inhibition %	Ecartype
TRR5	G1=71% G2=76,58%	G1=0,007 G2=0,007
KHE62	G1=10,37% G2=46,4%	G1=0,035 G2=0,007
KMR2	G1=29% G2=28,7%	G1=0,035 G2=0,063
KHE7	G1=6% G2=5%	G1=0,07 G2=0,035
TBR51	G1=67,92% G2=57,40%	G1=0,014 G2=0,014
TBF5	G1=10,37% G2=16,6%	G1=0,035 G2=0,035
KFR2	G1=79,24% G2=88,57%	G1=0,007 G2=0,04
TBF1	G1=24,52% G2=32,81%	G1=0,035 G2=0,07

Tableau 12 : Diamètres d'inhibition de chaque souche vis-à-vis de chaque isolat fongique sur milieu Mixte

Milieu Mixte Souches de <i>Pseudomonas</i>	La moyenne de diamètres d'inhibition %	Ecartype	
TRR5	G1=81% G2=81%	G1=0,028	G2=0,007
KHE62	G1=46,92% G2=45,45%	G1=0,007	G2=0,0001
KMR2	G1=46,15% G2=28,7%	G1=0,07	G2=0,021
KHE7	G1=30,76% G2=30%	G1=0,0001	G2=0,035
TBR51	G1=81,35% G2=76,25%	G1=0,0001	G2=0,004
TBF5	G1=25% G2=28,12%	G1=0,004	G2=0,063
KFR2	G1=72,30% G2=78,12%	G1=0,028	G2=0,035
TBF1	G1=35,38% G2=51,87%	G1=0,028	G2=0,035